ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Деева Анна Андреевна

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

Специальность 03.01.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор
Кратасюк В.А.

Красноярск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Биолюминесцентная система бактерий является одной из наиболее хорошо изученных среди люциферазных ферментных систем, обнаруженных у светящихся организмов разной степени сложности. Основным ферментом системы является люцифераза, катализирующая окисление 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 бипферментных 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, не смотря 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 относительно 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 специфических сайтов связывания субстратов или структурных мотивов, отвечающих за взаимодействие между белками, которые возникли 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.

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 последовательности бактериальной люциферазы впервые описаны высоко консервативные участки данного белка и 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 альтернативных 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*. Установленные в ходе исследования критические аминокислотные остатки, играющие важную роль в функционировании ферментов и их взаимодействии, позволят производить сайт-направленный мутагенез с целью изменения свойств биферментной системы в составе биотестов. Полученные данные могут быть использованы для увеличения чувствительности и стабильности ферментов биолюминесцентной системы бактерий при конструировании тест-объектов.

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 результатов 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 приложения. Полный объем диссертации составляет **158** страниц текста с **37** рисунками и **30** таблицами. Список литературы содержит **149** наименований.

ГЛАВА 1

Обзор литературы

1.1 Молекулярная организация биолюминесцентной системы бактерий

Биолюминесценция — это уникальный ферментативный процесс, сопровождающийся потреблением кислорода и выделением света [1]. На данный момент описано большое количество организмов, способных испускать свет в видимой области спектра. Среди них представители разных царств живого, организмы, различающиеся не только средой обитания, но и сложностью организации: бактерии, одноклеточные эукариотические организмы (жгутиконосные водоросли, динофлагелляты), кишечнополостные, некоторые виды рыб, грибы, земляные черви, насекомые и др. Одной из наиболее хорошо изученных групп люминесцирующих организмов являются бактерии. Основное видовое разнообразие светящихся бактерий было обнаружено в морских водах, среди них как свободно живущие, так и симбионты, заселяющие световые органы глубоководных рыб и кальмаров. Позже были найдены пресноводные и наземные люминесцирующие виды бактерий (Таблица 1.1).

Основу биолюминесцентной системы бактерий составляет фермент фермент бактериальная люцифераза. Она катализирует реакцию, в ходе которой происходит окисление $FMNH_2$ и алифатического альдегида (RCHO) кислородом воздуха (O_2), в результате чего образуется FMN, жирная кислота (RCOOH) и молекула воды (Формула 1.1). Однако ни один из субстратов люциферазы не может существовать в клетке в свободном виде: $FMNH_2$ подвержен быстрому автоокислению, а альдегид в силу своей токсичности не накапливается в клетках бактерий.

$$FMNH_2 + RCHO + O_2 \rightarrow FMN + RCOOH + H_2O + h\nu \tag{1.1}$$

Согласно международной классификации бактериальные люциферазы относят к классу E.C.1. “Оксидоредуктаз”, так как они катализируют реакцию окисления субстрата, сопряженную с переносом протонов на молекулу-акцептор. В связи с тем, что субстратом биолюминесцентной реакции является восстановленный флавинмононуклеотид ($FMNH_2$), а конечным акцептором H^+ является молекулярный кислород, то бактериальные люциферазы относят к флавин-зависимым монооксигеназам - E.C.1.14.14.3.

Считается, что эффективная работа люциферазы обеспечивается сопряжением с другими ферментами. Альдегид поставляется ферментным комплексом восстановления жирных

Таблица 1.1: Виды и среда обитания биолюминесцентных бактерий [2]

Вид	Среда обитания
Aliivibrio *fischeri*	Прибрежные морские воды, световые органы кальмаров и рыб
logei	Прибрежные морские воды, донные отложения
salmonicida	Поврежденные ткани Атлантического лосося
sifiae	Прибрежные морские воды
“thorii”	Световые органы кальмаров
wodanis	Прибрежные морские воды, зараженный фермерский лосось, световые органы кальмаров
Photobacterium *aquimaris*	Прибрежные морские воды
damselae	Прибрежные морские воды
kishitanii	Световые органы и внешние покровы рыб
leiognathi	Прибрежные морские воды, световые органы рыб
mandapamensis	Прибрежные морские воды, световые органы рыб
phosphoreum	Прибрежные морские воды и воды открытого моря
Candidatus Photodesmus *katoptron*	Световые органы рыб семейства фонаеглазовые (*Anomalopidae*)
Shewanella *hanedai*	Прибрежные морские воды, донные отложения
woodyi	Прибрежные морские воды, чернила кальмара
Vibrio *azureus*	Прибрежные морские воды
“beijerinckii”	Прибрежные морские воды
campbellii	Прибрежные морские воды
chagasii	Прибрежные морские воды, внешние покровы и кишечник морских организмов
harveyi	Прибрежные морские воды донные отложения
mediterranea	Прибрежные морские воды
orientalis	Воды открытого моря, внешние покровы креветок
sagamiensis	Прибрежные морские воды
splendidus	Прибрежные морские воды
vulnificus	Прибрежные морские воды, моллюски
cholerae	Эстуарии, заливы прибрежных вод
Photorhabdus *asymbiotica*	Пораженная кожа человека
luminescens	Личинки насекомых, инфицированные гетерорабдитидными нематодами
temperata	Личинки насекомых, инфицированные гетерорабдитидными нематодами

кислот, состоящим из трансферазы, синтетазы и редуктазы [3]. Восстановление FMN осуществляет NAD(P)H-зависимая оксидоредуктаза [4] (Рисунок 1.1, А). Флавин мононуклеотид является распространенным многофункциональным метаболитом, а алифатический альдегид синтезируется из длинноцепочечных жирных кислот, которые также в большом количестве могут быть обнаружены в цитозоле. Скоординированная работа биолюминесцентной системы бактерий, как и других полиферментных систем, предполагает взаимодействие между

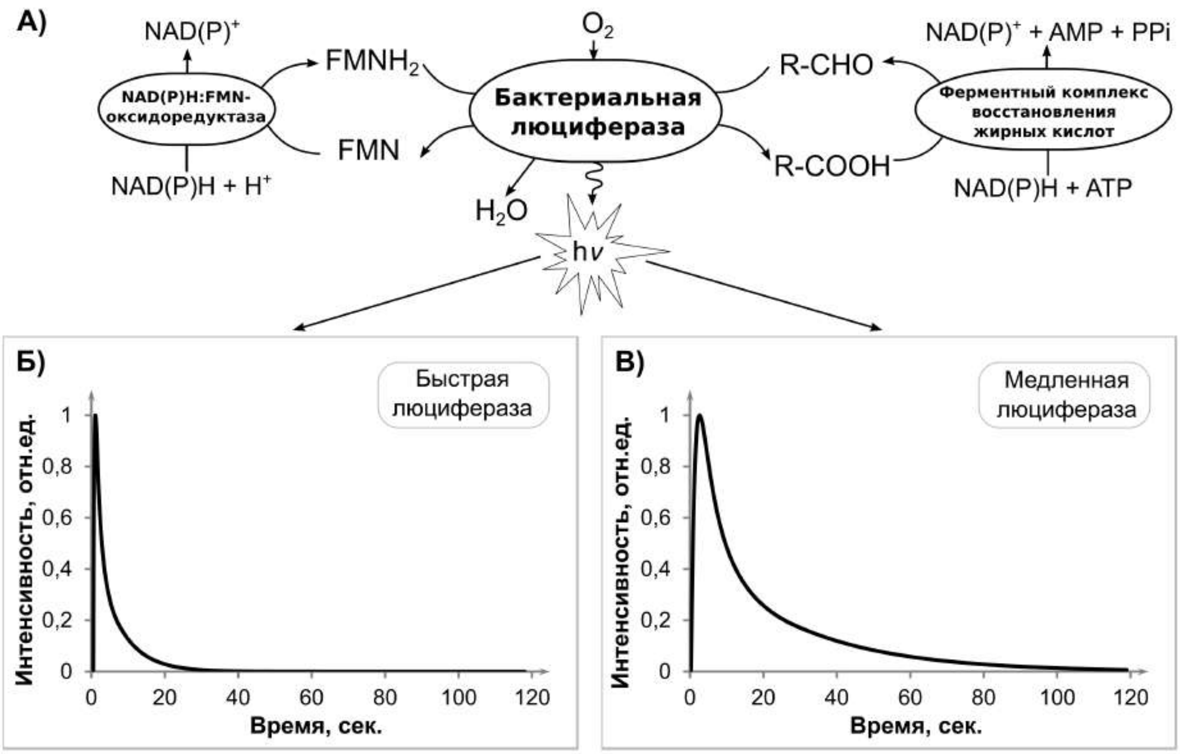

Рисунок 1.1: Схема химической реакции, катализируемой бактериальной люциферазой А) и стандартная кинетика светоизлучения «быстрых» Б) и «медленных» В) люцифераз

ферментами и образование белок-белковых комплексов. Однако, вопрос от том, как происходит передача субстратов между ферментами биолюминесцентной системы бактерий до сих пор остается открытым.

1.2 Субстраты биолюминесцентной реакции

Флавинмононуклеотид способен принимать и отдавать два атома H по атомам N^1 и N^5 изоаллоксазинового кольца (Рисунок 1.2). В биолюминесцентной реакции происходит депротонирование обоих атомов азота, при этом протонированный N^5 формирует водородную связь с атомом кислорода жирной кислоты в ходе образования эмиттера [5]. Люцифераза высокоспецифична к $FMNH_2$, так как ранее было обнаружено, что химическая модификация или удаление фосфатной группы, а также использование аналогов флавина значительно снижают активность реакции [6, 7].

К альдегиду люцифераза проявляет меньшую специфичность — в реакции может использоваться не только длинноцепочечный алифатический альдегид [8] и его производные, имеющие одну двойную связь между $C\alpha$ и $C\beta$ атомами углеводородной цепи [9], но и другие соединения [10]. Длина цепи молекулы альдегида, участвующей в реакции *in vitro*, также может варьировать от 8 до 16 атомов углерода (Рисунок 1.2). При этом интенсивность и квантовый выход реакции могут значительно различаться при использовании альдегидов различной длины в реакции с люциферазами из различных видов бактерий [8].

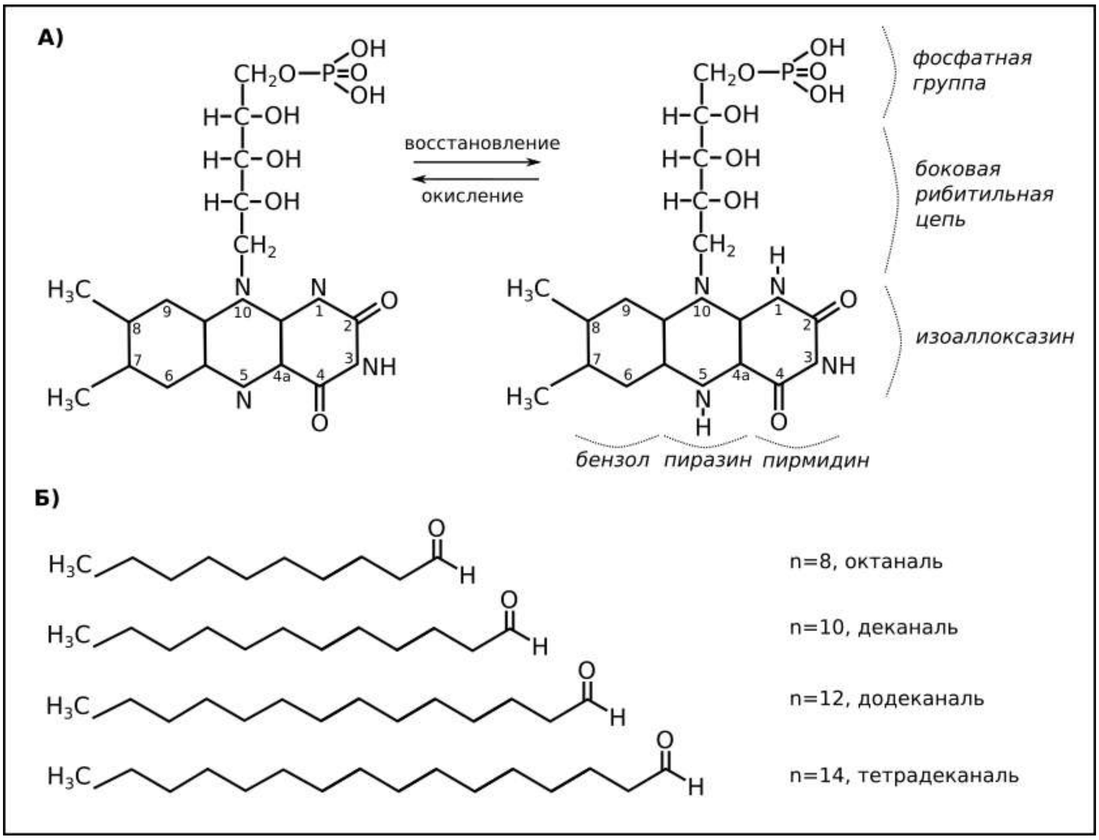

Рисунок 1.2: А) Структура окисленной и восстановленной форм флавинионнуклеотида. Б) Примеры структуры некоторых длинноцепочечных альдегидов

В ходе экспериментальных исследований было установлено, что по кинетике люциферазы в реакции *in vitro* с додеканалем все биолюминесцентные бактерии можно разделить на две группы: бактерии рода *Photobacterium* и *A. fischeri* имеют быструю кинетику затухания люминесценции (Рисунок 1.1, Б), а рода *Vibrio* – медленную (Рисунок 1.1, В) [11]. До распространения молекулярно-генетических методов, специфичность кинетических свойств в реакции с додеканалем позволяла быстро классифицировать бактерии из указанных родов, так как получение экстрактов люцифераз и измерение биолюминесценции представляет собой менее трудоемкий и сравнительно быстрый метод, в отличие от микробиологических методик.

Позже также было установлено, что люциферазы наземных бактерий рода *Photorhabdus* являются «медленными» [12], а люциферазы из морских бактерий рода *Shewanella* имеют схожую кинетику с люциферазами из бактерий рода *Photobacterium* [13], однако последние также могут быть выделены в отдельную группу бактерий со «средней» кинетикой [14].

Люциферазы из штаммов одного вида бактерий имеют одинаковые кинетические свойства, если в реакции используется один и тот же альдегид. Хотя ещё в ранних исследованиях было показано, что длина альдегидной цепи значительно влияет на кинетические характеристики биолюминесцентной реакции, какой именно альдегид используется в реакциях *in vivo*, до сих пор до конца не ясно. Для тусклых альдегидных мутантов *V. harveyi* было показано, что в реакции *in vivo* используется тетрадеканаль [15]. Однако идентификация альдегидов различной длины, выделенных из липидных экстрактов люминесцирующих бактерий *A. fischeri* и *P. phosphoreum*, при помощи метода масс-спектрометрии показала, что это в основном молекулы длинной 12, 14 и 16 атомов углерода [16]. При этом их относительное содержание составило 5, 63, 30 % для *P. phosphoreum* и 36, 32, 20 % для *A. fischeri*. Кроме того, были обнаружены различия в специфичности ферментных комплексов восстановления жирных кислот к длине углеводородной цепи восстанавливаемой ими жирной кислоты: C_{14} у морских люминесцентных бактерий, обладающих быстрыми люциферазами, и C_{10} у *V. harveyi* и *Ph. luminescens*. Роль альдегидного фактора в бактериальной биолюминесценции требует дополнительных исследований.

1.3 Строение бактериальных люцифераз

При небольших межвидовых различиях все люциферазы имеют сходное строение и представляют собой α/β-гетеродимеры. В среднем молекулярная масса люцифераз составляет около 76 кДа, при этом α-субъединица всегда больше β-субъединицы. Так, у наиболее изученной люциферазы *V. harveyi* молекулярная масса α-субъединицы равна 40 кДа, а β-субъединицы – 37 кДа [17]. Обе субъединицы состоят из последовательно уложенных восьми α-спиралей и восьми β-складчатых листов (Рисунок 1.3), которые формируют трехмерную структуру в виде $(\beta/\alpha)_8$-бочонка, также известную как TIM-бочонок. Такая пространственная структура является одной из наиболее распространенных среди всех известных на данный момент белков. Однако среди TIM-белков только бактериальная люцифераза способна катализировать реакцию светоизлучения [18].

Помимо сходства вторичной и третичной структур, субъединицы бактериальной люциферазы характеризуются высокой степенью идентичности аминокислотных последовательностей, особенно на N-конце [19]. Считается, что люцифераза возникла в результате дупликации гена *luxA*, кодирующего α-субъединицу, с последующей дивергенцией копии этого гена и образованием гена *luxB*, который кодирует β-субъединицу [19].

На данный момент расшифровано несколько кристаллических структур люциферазы *Vibrio harveyi*: с разрешением 1.5 Å [17] и 2.4 Å [20] без субстратов, а также 2.3 Å с продуктом реакции — FMN [21], что позволило достоверно определить положение активного центра. Он расположен на α-субъединице и представляет собой полость в центре β-бочонка,

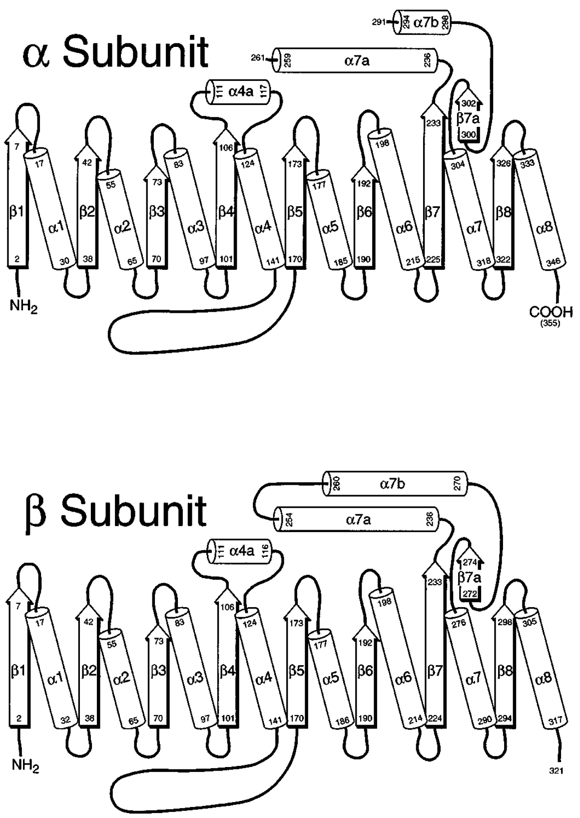

Рисунок 1.3: Топология вторичной структуры двух субъединиц бактериальной люциферазы. β-складчатые листы и α-спирали показаны стрелками и цилиндрами, соответственно. Основа $(\beta/\alpha)_8$-бочонка изображена посередине, различные вставки в виде петель и спиралей обозначены сверху и снизу. Складчатый лист $\beta 8$ образует сеть водородных связей с листом $\beta 1$, замыкая структуру бочонка. Номерами обозначены аминокислотные остатки начала и конца каждого элемента вторичной структуры [17]

состоящую главным образом из гидрофобных остатков [20]. Активный центр также находится достаточно близко к С-концевому фрагменту фермента, где у всех хорошо изученных ранее TIM-белков был найден активный центр.

Особый интерес представляет неупорядоченный участок вторичной структуры между двумя α-спиралями α7a и α7b, которые располагаются вдоль вершины $(\beta/\alpha)_8$-бочонка. Данный участок (с 262 по 290 остаток, Рисунок 1.3) находится вблизи активного центра и называется «мобильной петлей». Этот элемент отсутствует в структуре β-субъединицы и играет важную роль в функционировании α-субъединицы.

Часть мобильной петли была расшифрована для структуры люциферазы с FMN в активном центре, однако положение аминокислотных остатков 283—290 остается неизвестным в связи с высокой подвижностью данного участка. Известно, что петля может быть подвержена разрушению протеолитическими ферментами [22], что приводит к инактивации люциферазы. Однако связывание $FMNH_2$ или поливалентных анионов защищает фермент от протеолитической инактивации [23]. Значимость данной петли для эффективной работы фермента подтверждает и тот факт, что мутант люциферазы с утраченной петлей характеризуется снижением квантового выхода биолюминесценции на два порядка, несмотря на сохранение пространственной структуры и аффинности связывания субстратов [24].

На данный момент установлено, что мобильная петля претерпевает конформационные изменения при связывании субстратов в активном центре. Таким образом, она участвует в туннелировании и последующей фиксации субстратов, их стабилизации в активном центре и защите интермедиатов реакции от контактов с растворителем [25].

Функция β-субъединицы оставалась неизвестной до тех пор, пока анализ кристаллической структуры не позволил определить особенности её взаимодействия с α-субъединицей. Димеризация белка происходит за счет параллельной укладки четырех α-спиралей $\alpha 2$ и $\alpha 3$ обеих субъединиц. В состав обеих α-спиралей входят аминокислотные остатки глицина и аланина, что позволяет сформировать поверхность, подходящую для близкого контакта двух субъединиц, называемую α/β-интерфейсом. Так, глицин в 64-й позиции является консервативным для обеих субъединиц и между данными остатками формируется наиболее близкий контакт (Рисунок 1.4).

Гетеродимер бактериальной люциферазы образуется за счет формирования 22-х водородных связей [17, 26]. Помимо Gly64, среди наиболее близких взаимодействующих остатков можно выделить две псевдо-симметричные водородные связи между парами консервативных аминокислот His45/Glu88 и Arg85/Thr80 (Рисунок 1.4) [17]. Известно, что мутация αHis45 приводит к значительному снижению активности фермента за счет диссоциации субъединиц [27]. Мутации некоторых консервативных остатков α/β-интерфейса могут приводить к изменению конформации достаточно удаленных областей α-субъединицы, в том числе относящихся к активному центру фермента [28]. Кроме того, важную роль играет водородная связь между αPhe272 мобильной петли и βTyr151. Было показано, что замены βTyr151 на аланин, аспарагиновую кислоту, лизин, аргинин и треонин приводят к инактивации фермента, следовательно, β-субъединица стабилизирует конформацию мобильной петли α-субъединицы за счет формирования вышеуказанной водородной связи [21]. Более того, утрата петли ведет к частичной диссоциации гетеродимера, что не наблюдается для люцифераз дикого типа [24]. Таким образом, за счет взаимодействия между аминокислотным остатками α/β-интерфейса, β-субъединица участвует в формировании активной конформации α-субъединицы.

1.4 Строение активного центра люцифераз

Наибольший вклад в определение структуры активного центра люциферазы внесла работа З.Т. Кэмпбэлла с соавторами [21] по расшифровке кристаллической структуры бактериальной

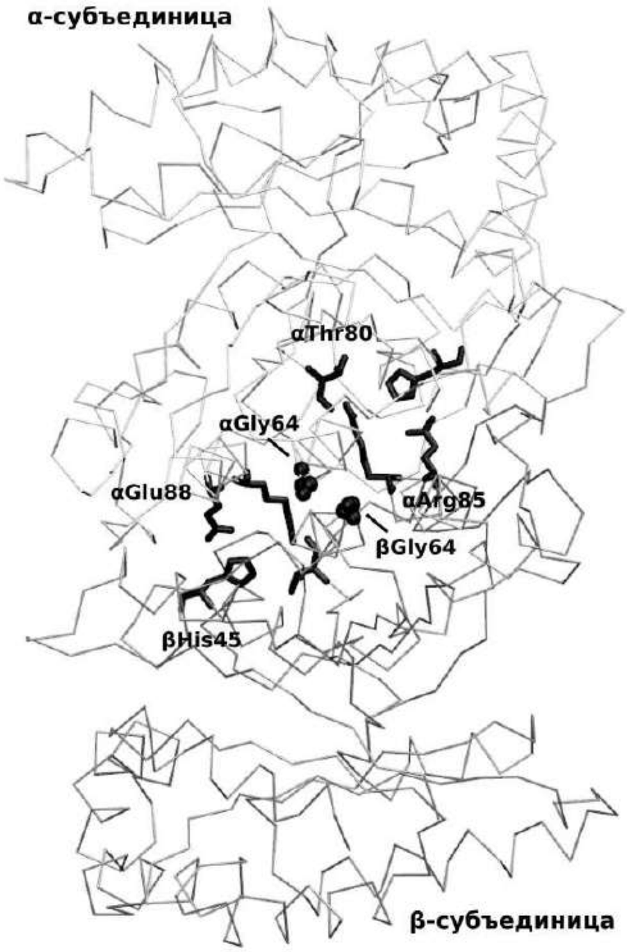

Рисунок 1.4: Схематическое изображение структуры бактериальной люциферазы. Черным цветом обозначен ряд важных остатков α/β-интерфейса

люциферазы с продуктом биолюминесцентной реакции — FMN. Помимо указанной работы, квантово-механические расчеты и эксперименты с сайт-направленным мутагенезом позволили определить критические аминокислотные остатки, играющие ключевую роль в формировании структуры активного центра, а также вторичной и третичной структур. Таким образом было выявлено 16 важных аминокислотных позиций в структуре люциферазы *V. harveyi*, которые представлены в Таблице 1.2.

На основании кристаллической структуры люциферазы [21] было показано, что FMN нековалентно связан с аминокислотными остатками активного центра. Диметил бензеноидный фрагмент кольца с si-стороны изоаллоксазина окружен гидрофобными остатками Phe6, Trp194 и Ser227 (на рисунке 1.5 обозначены желтым цветом). Предполагается, что данный гидрофобный участок также отвечает за связывание молекулы альдегида [39].

Ala74 и Ala75 образуют между собой цис-пептидную связь, которая достаточно редко встречается в белках и зачастую формирует сайт связывания лиганда или активный центр [40].

Таблица 1.2: Обобщенные результаты теоретических и экспериментальных исследований функционально важных аминокислотных остатков бактериальной люциферазы *V. harveyi*

№	А. о.	Метод исследования. Предполагаемые функции.
1	αGlu43	Анализ кристаллической структуры и квантово-химические расчеты. Формирует водородную связь с интермедиатом реакции. [5,21]
2	αHis44	Сайт-направленный мутагенез (αHis44Ala). Катализирует формирование интермедиатов реакции. [29]
3	αHis45	Сайт-направленный мутагенез (αHis45Ala, αHis45Asp, αHis45Lys). Формирование необходимой конформации фермента. [27]
4	αAla74	Гибкий докиг FMN в активный центр люциферазы. Возможно формирование водородной связи с N^5 атомом FMN. [30]
5	αAla75	Сайт-направленный мутагенез (αAla75Gly и αCys106Val). Формирует необходимую конфигурацию активного центра, в том числе за счет образования цис-пептидной связи с αAla74. [31]
6	αCys106	Сайт-направленный мутагенез (αCys106Ser, αCys106Ala, αCys106Val). Стабилизация 4а-гидропероксифлавина, формирование полости для связывания альдегида совместно с кольцом изоаллоксазина. [30,32]
7	αArg107	Сайт-направленный мутагенез (αArg107Ala, αArg107Glu, αArg107Ser). Связывание фосфатной группы флавина, стабилизация мобильной петли и ее защита от протеолиза. [33]
8	αTyr110	Анализ кристаллической структуры и квантово-химические расчеты. Формирует необходимую конфигурацию активного центра. [5,21]
9	αAsp113	Сайт-направленный мутагенез (αAsp113Asn), анализ кристаллической структуры. Электростатическое взаимодействие с αHis44, αLys112 и αHis45, формирование сети электростатических взаимодействий в активном центре. [21,34]
10	αArg125	Анализ кристаллической структуры. Взаимодействует с фосфатной группой FMN. [21]
11	αVal173	Сайт-направленный мутагенез (αVal173Ala, αVal173Cys, αVal173Thr, αVal173Ser) мутантной формы люциферазы с уже внесенными мутациями в двух позициях (αAla75Gly и αCys106Val). Совместно с Cys106 формирует поверхность для связывания re-стороны FMN. [35]
12	αGlu175*	Сайт-направленный мутагенез (αGlu175Gly) и анализ кристаллической структуры. Взаимодействует с фосфатной группой FMN, играет важную роль в формировании структуры активного центра, а также вторичной и третичной структур белка. [21,36,37]
13	αSer227	Сайт-направленный мутагенез (αSer227Phe, αSer227Trp, αSer227Tyr, αSer227Ala). Формирует структуру активного центра. [38]
14	αPhe272	Анализ кристаллической структуры. Взаимодействие с βTyr151, регулирует изменение конформации мобильной петли. [21]
15	αLys283 и αLys286	Сайт-направленный мутагенез (αLys283Ala, αLys286Ala). Фиксируют FMN и препятствуют проникновению растворителя в активный центр. [25]
* люциферазы *Ph. luminescens*		

Карбонильная группа Ala75 может образовывать водородную связь с O^4 атомом пиримидинового фрагмента кольца, а амидная группа, как с O^4, так и N^5. Совместно с Cys106, Val173 и Ile191 они находятся с re-стороны изоаллоксазинового кольца (на рисунке 1.5 обозначены розовым цветом), при этом сульфгидрильная группа цистеина направлена в сторону C^{4a} атома, который в свою очередь образует связь с молекулой O_2 при формировании интермедиата 4a-гидропероксифлавина [5]. Функциональная группа цистеина может формировать водородную связь с N^3 атомом пиримидинового фрагмента кольца [32], таким образом стабилизируя указанный интермедиат за счет формирования эндопероксида [39].

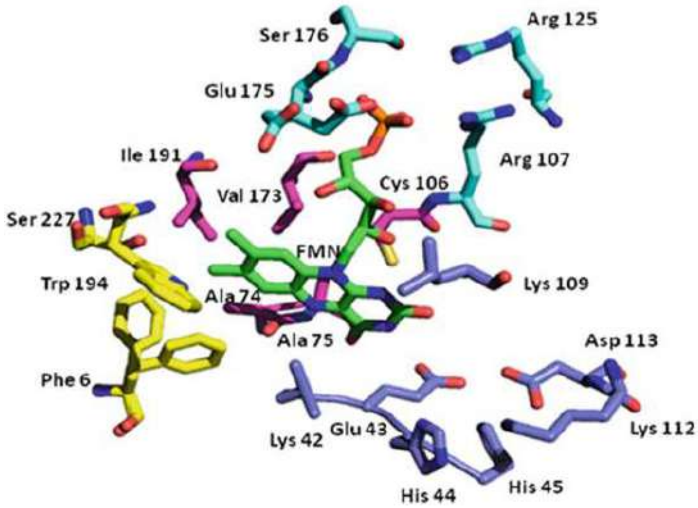

Рисунок 1.5: Аминокислотные остатки, формирующие сайт связывания FMN. В структуре белка было расшифровано две конформации остатков Phe6 и Glu175 [41]

Пиримидиновый фрагмент кольца окружен полярными аминокислотными остатками (на рисунке 1.5 обозначены фиолетовым цветом), которые формируют сеть водородных связей между собой, а также могут взаимодействовать с интермедиатами реакции (Таблица 1.2). Фосфатная группа флавина окружена остатками Arg107, Arg125, Glu175 и Ser176 (на рисунке 1.5 обозначены голубым цветом). Данные полярные незаряженные и положительно заряженные остатки формируют сайт связывания отрицательно заряженной фосфатной группы. Мутация указанных остатков влияет на аффинность связывания $FMNH_2$, но не оказывает никакого действия на формирование и стабилизацию 4a-гидропероксифлавина [33].

На данный момент мало известно о сайте связывания альдегида в активном центре люциферазы. Обнаружено лишь несколько аминокислотных остатков, мутация которых приводит к уменьшению аффинности связывания молекулы альдегида и протеканию реакции по «темновому» пути (Таблица 1.2). Исходя из данных молекулярного докинга FMN [30], а также физических свойств молекулы альдегида, а именно ее гидрофобности, было сделано предположение, что связывание альдегида происходит за счет взаимодействия с гидрофобными остатками активного центра (Рисунок 1.6, А). Кроме того, сравнение положения флавина в активном центре бактериальной люциферазы и алканмонооксигеназы [42] показало, что в обоих случаях происходит схожее связывание FMN, при этом кольцо изоаллоксазина обращено к углублению, расположенному напротив выхода из активного центра. Ли с соавторами [42] при помощи молекулярного докинга показали, что в эту полость в структуре алканмонооксигеназы может поместиться молекула длинноцепочечного алкана (Рисунок 1.6, Б). По аналогии, молекула альдегида может связываться с подобным участком в структуре люциферазы (Рисунок 1.6, А).

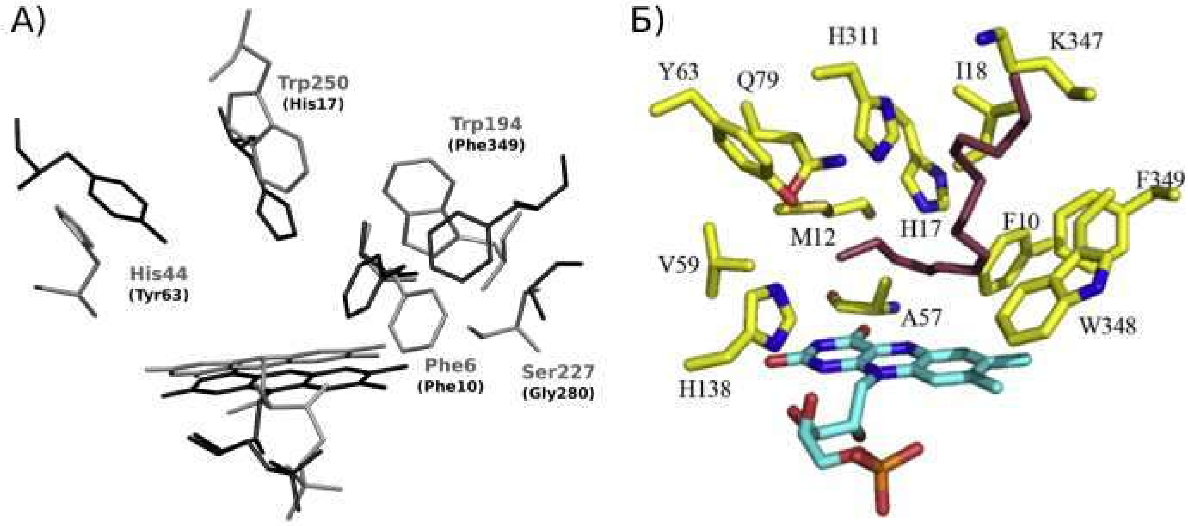

Рисунок 1.6: А) Суперпозиция структур активных центров бактериальной люциферазы (серым) и алканмонооксигеназы (черным) в комплексе с FMN. Показаны аминокислотные остатки, участвующие в связывании альдегида и их аналоги в структуре алканмонооксигеназы. Б) Активный центр алканмонооксигеназы, в котором молекула длинноцепочечного алкана обозначена коричневым цветом [30]

1.5 Типы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий

NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы биолюминесцентных бактерий обеспечивают синтез субстрата бактериальной люциферазы — восстановленного флавинмононуклеотида — $FMNH_2$ (Рисунок 1.1, А). К настоящему моменту хорошо описаны лишь оксидоредуктазы из организмов *V.harveyi*, *A.fischeri* и *P.leiognathi*: они различаются по механизму катализируемой реакции (последовательный или “пинг-понг”), предпочтению к NADH или NAD(P)H в качестве субстрата, наличию молекулы FMN в качестве кофактора, способности к димеризации, структуре и молекулярной массе (Таблица 1.3). Можно выделить следующие типы оксидоредуктаз:

- LuxG оксидоредуктазы, закодированные в том же опероне, что и люцифераза [43, 44];

- Fre оксидоредуктазы, которые могут обеспечивать биолюминесцентную реакцию восстановленным флавином в рекомбинантных бактериях, но также могут быть обнаружены и у светящихся бактерий [45,46];

- NADPH-зависимые нитроредуктазы (FRP), подробно изученные для бактерий *V. harveyi* [47–49];

- NADH-зависимые нитроредуктазы (FRD), выделенные из *V. harveyi* [50];

- NAD(P)H-зависимые оксидоредуктазы (FRG), обнаруженные в бактериях *V. harveyi* и *A. fischeri* [4,46,51].

Таблица 1.3: Экспериментально изученные NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы биолюминесцентных бактерий

Оксидоредуктаза, мол. масса (кДа)	Организм	Субстрат	Кофактор	Механизм реакции	Структура согласно классификации SCOP
LuxG (26)	*P. leiognathi*	NADP(H)	Нет	Последовательный	Греческий ключ
Fre (26)	*E. coli*	NADP(H)	Нет	Последовательный	Греческий ключ
FRG (-)	*V. harveyi*	NADP(H)	Нет	Последовательный	-
FRG (25)	*A. fischeri*	NADP(H)	FMN	Пинг-понг	Трехслойный сэндвич
FRP (26)	*V. harveyi*	NADPH	FMN	Пинг-понг	Трехслойный сэндвич
FRD (27)	*V. harveyi*	NADH	Нет	Последовательный	-

1.5.1 Структурно-функциональные характеристики оксидоредуктаз LuxG и Fre

Впервые ген, кодирующий оксидоредуктазу LuxG, был обнаружен в составе *lux*-оперона Свартсманом и соавторами в 1990 г. [52]. Ввиду того, что белок в чистом виде в то время выделить не удалось, а данных об аминокислотных последовательностях, закодированных в бактериальных геномах, было мало, функции LuxG оставались неизвестными. Позднее, после того как был расшифрован ген, кодирующий оксидоредуктазу Fre [53], выравнивание последовательностей Fre и LuxG показало, что они являются гомологами [54]. Это позволило высказать предположение о том, что LuxG также представляет собой NAD(P)H-зависимую оксидоредуктазу.

Оксидоредуктаза Fre *E. coli* была обнаружена в составе мультиферментного комплекса, в который также входят супероксиддисмутаза и рибонуклеотидредуктаза [55]. Последняя представляет собой гетеродимер, одна из субъединиц которого содержит железосодержащий центр, в состав которого входят два иона железа Fe^{3+}. В свободном виде ионы железа чаще всего встречаются в бивалентной форме, так как ионы Fe^{3+} подвержены гидролизу и формированию нерастворимых форм. В связи с этим в составе апоформы субъединицы рибонуклеотидредуктазы содержатся ионы Fe^{2+}. Оксидоредуктаза Fre способна восстанавливать различные производные флавина (FMN, FAD и рибофлавин) за счет окисления молекул NAD(P)H, после чего происходит перенос протонов с восстановленного субстрата на ионы железа с образованием Fe^{3+} (Рисунок 1.7).

Гены флавинзависимых оксидоредуктаз типа Fre люминесцентных бактерий ассоциированы с генами «домашнего хозяйства» [56]. Это говорит о том, что Fre, предположительно, восстанавливает производные флавина для различных клеточных нужд. Однако в рекомбинантных светящихся бактериях эта оксидоредуктаза может также поставлять $FMNH_2$ в биолюминесцентную систему, при этом ее активность сравнима с активностью эндогенной редуктазы *V. harveyi* [45] FRP. В свою очередь, для оксидоредуктазы LuxG было установлено, что она, подобно Fre, может быть задействована в восстановлении ионов железа *in vitro* [57].

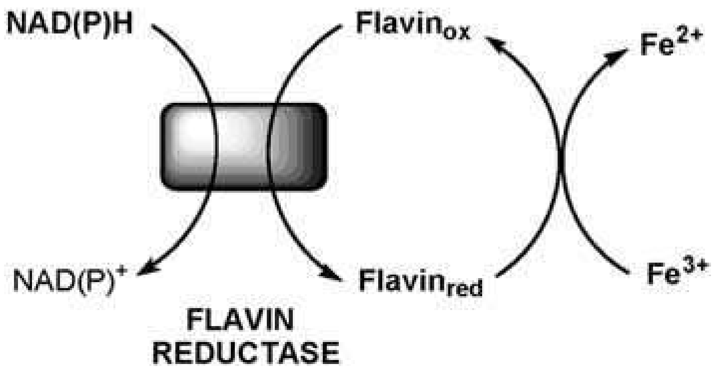

Рисунок 1.7: Схема восстановления ионов железа флавиновыми редуктазами [58]

Во многих светящихся бактериях были найдены как Fre, так и LuxG оксидоредуктазы. За исключением светящихся бактерий рода *Photorhabdus*, *lux*-оперон которых содержит только гены, кодирующие люциферазу и комплекс восстановления альдегида (последовательность генов *luxCDABE*). Поиск нуклеотидных последовательностей, кодирующих оксидоредуктазы – аналоги Fre из *E. coli*, проводился для следующих светящихся бактерий: *Ph. luminescence*, *A. fischeri*, *V. harveyi*, *V. orientalis*, *S. hanedai* и *P. leiognathi* [46, 59]. Попарное выравнивание найденных аминокислотных последовательностей показало, что оксидоредуктазы LuxG имеют значительные сходства с последовательностями Fre. Значение идентичности Fre из *E.coli* и оксидоредуктаз светящихся бактерий составило [59]:

- Fre *Ph. luminescens* — 73 %,
- Fre *A. fischeri* — 51 %,
- Fre *V. harveyi* — 48 %,
- Fre *V. orientalis* — 52 %,
- LuxG *A. fischeri* — 41 %,
- LuxG *V. harveyi* — 48 %,
- LuxG *P. leiognathi* — 36 %.

На основании этих данных было сделано предположение о том, что LuxG является флавин-зависимой оксидоредуктазой гомологичной Fre, появившейся в результате нескольких раундов дупликации одного гена [46].

Несмотря на то, что пространственная структура LuxG до сих пор неизвестна, некоторые ее особенности можно установить, используя структуру гомолога — оксидоредуктазы Fre из *E. coli* [60]. Она состоит из одной полипептидной цепи (232 остатка) и имеет массу 26 кДа. Структура Fre включает в себя два домена: флавин-связывающий с N-конца фермента и NAD(P)H связывающий домен с C–конца. N–концевой домен состоит из шести β-складчатых листов (Fβ1 – Fβ6) и одной α-спирали (Fα1) (Рисунок 1.8). В составе одного из листов была обнаружена цис-пептидная связь, образующаяся за счет Pro91. C-концевой домен имеет структуру α/β-типа, состоящую из шести листов (Nβ1 – Nβ6) и четырех спиралей (Nα1 – Nα4) (Рисунок 1.8). Один из последних складчатых листов является очень коротким и лишь один аминокислотный остаток образует водородную связь, необходимую для формирования вторичной структуры. Кроме того, C-концевой домен содержит три коротких 3_{10}–спирали.

Экспериментально было показано, что оксидоредуктаза Fre активна *in vitro* в виде мономера, однако кристаллизована была в виде двух димеров, связанных между собой дисульфидным мостиком (Cys149). Димеры же оказались образованы за счет взаимодействия гидрофобных участков, состоящих из Leu182, Leu186, Ile208, Leu212 [60]. Стоит отметить, что редуктаза LuxG активна в форме димера [43]. Но несмотря на то, что каждая субъединица LuxG в составе гомодимера связывает две молекулы NAD и две молекулы FMN, за один каталитический акт происходит восстановление лишь одной молекулы FMN. Такой механизм функционирования может быть обусловлен как стерическими ограничениями в активных центрах ферментов (если активные центры двух субъединиц расположены вблизи оси симметрии, то связывание лиганда с одним из сайтов может привести к стерическим ограничениям или изменению заряда, что будет препятствовать связыванию субстрата со вторым сайтом), так и индуцированным изменением четвертичной структуры белка в ходе катализа [61]. В случае оксидоредуктазы LuxG возможны оба механизма. При помощи ультрафильтрации, а также измерений спектра FMN, было показано, что связывание флавина возможно лишь после того, как формируется комплекс LuxG:NADH. Возможно, связывание NADH сопровождается конформационными перестройками белка, в связи с чем становится возможным связывание FMN. Кроме того, предполагается, что сайт связывания FMN расположен достаточно близко к интерфейсу взаимодействия двух субъединиц, в результате чего восстановление FMN в активном центре второй субъединицы невозможно до тех пор, пока не произойдет высвобождение $FMNH_2$ первой субъединицей.

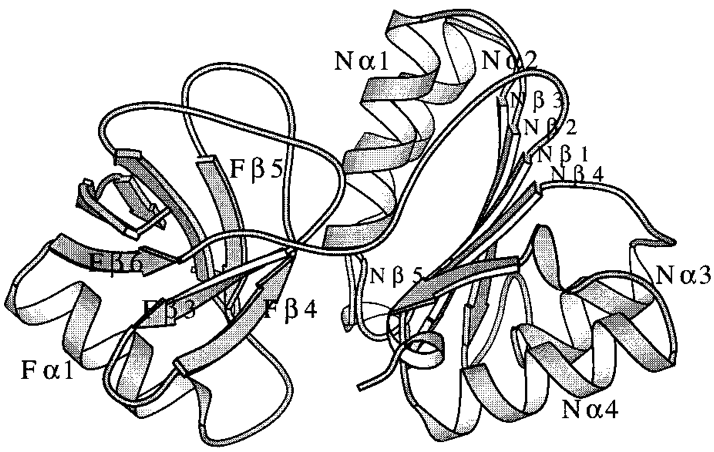

Рисунок 1.8: Структура оксидоредуктазы Fre, представленная с помощью ленточной модели [60]

Интересно, что Fre имеет значительные структурные сходства с белками семейства ферродоксин:$NADP^+$ редуктаз (FNR) [60], но в то же время сходство первичных последовательностей очень низкое (процент идентичных аминокислотных остатков $\leq$ 15 %) [62]. Консервативными являются лишь несколько функционально важных участков, отвечающих за связывание флавина и NAD(P). При помощи локального выравнивания было показано схожее расположение данных участков вдоль аминокислотной последовательности Fre [60]. Четыре ключевых участка из шести, формирующих область взаимодействия с производными флавина и никотинамидом в структуре оксидоредуктазы *Spinacia oleracea* (аминокислотные остатки RLYS, TGTG, CG и EVY) [46, 63], имеются также в составе LuxG и Fre, но они заменены на химически схожие последовательности (Таблица 1.4). Однако остаток аргинина из последовательности RLYS, отвечающей за взаимодействие с пирофосфатом в составе молекулы FAD, отсутствует в рассмотренных последовательностях LuxG.

Помимо всего прочего, было найдено важное структурное различие между Fre и белками семейства FNR. Мобильная петля между складчатым листом $F\beta5$ и спиралью $F\alpha1$ намного короче, чем у большинства FAD–связывающих флавопротеинов, что указывает на возможное отсутствие сайта связывания аденозинмонофосфата (AMP) в составе FAD (Рисунок 1.8) [60].

Таблица 1.4: Аминокислотные остатки, формирующие сайт взаимодействия с флавином и никотинамидом. Номер первого аминокислотного остатка указан для каждой функциональной последовательности

№	FNR *Spinacia oleracea*	Fre	Сайт взаимодействия
1	93 RLYS	46 RPFS	FAD
2	170 TGTG	110 GGTG	FAD и NAD
3	272 CGLKGM	200 AGRFEM	NAD
4	312 EVY	227 DAF	FAD

Сравнительный анализ известных третичных структур белков семейства флавопротеинов позволил обнаружить 10 консервативных аминокислот, 4 из которых полностью консервативны для Fre оксидоредуктазы [60]. К ним относятся три глицина (33, 111 и 201) и один аргинин (46). Gly33 находится в третьей позиции в составе β-складчатого листа II типа, для которого характерно наличие глицина ввиду стерических ограничений. Сравнительный анализ всех структур семейства ферродоксиновых:$NADP^+$ редуктаз показал, что Gly111 расположен в центре участка связывания NAD(P)H и, возможно, связывает пирофосфат, а Gly201 связывает никотинамидную часть. Arg46 находится на участке связывания фосфатной группы FMN и FAD и является консервативным остатком у всех флавопротеинов, за исключением LuxG.

Несмотря на то, что Fre и LuxG оксидоредуктазы были обнаружены более 20-ти лет назад, на данный момент не было проведено детального исследования их эволюционных взаимоотношений, а также сравнительного анализа кинетических характеристик. Некоторые предположения о функциональных особенностях данных ферментов можно сделать на основании различных экспериментальных данных [43, 55, 64]. Так, в Таблице 1.5 представлены результаты исследования кинетики реакции, катализируемой оксидоредуктазами Fre или LuxG. Активность ферментов определяли как скорость изменения концентрации флавина (FMN, FAD или рибофлавина) при постоянной концентрации NADH или NAD(P)H.

Видно, что для LuxG наибольшее сродство зарегистрировано к рибофлавину при избытке NADH (K_m в два раза меньше, чем для реакций с FMN и FAD). При использовании ферментом LuxG в качестве донора электронов молекулы NADPH были получены очень высокие значения K_m (0.64 mM для реакции с рибофлавином и 0.51 mM – с FMN), что, вероятно указывает на то, что NADPH не является физиологическим субстратом в реакции, катализируемой LuxG.

Таблица 1.5: Кажущиеся кинетические константы для различных производных флавина в присутствии NADH или NADPH (концентрация указана в скобках)

Оксидоредуктаза	Субстрат	K_m (μM)	k_{cat} (сек$^{-1}$)	Источники
Fre	FMN, NADPH (180μM)	2.2	2.7	[64]
	FMN, NADH (50μM)	1.5	11.3	
	Рибофлавин, NADPH (180μM)	2.5	52.2	
	Рибофлавин, NADH (50μM)	1.3	30.4	
	FAD, NADH (250μM)	0.8		[55]
LuxG	FMN, NADH (200μM)	2.7	10.6	[43]
	Рибофлавин, NADH (200μM)	1.2	9.6	
	FAD, NADH (200μM)	2.6	7.1	

В реакции, катализируемой оксидоредуктазой Fre с участием NADH, величина K_m сравнима для различных производных флавина. Однако, константа связывания FAD у Fre на два порядка больше, чем FMN и рибофлавина, что также подтверждается теоретическими расчетами молекулярной динамики FAD в комплексе с Fre [65]. Было показано, что FAD может принимать необычную изогнутую конформацию. При этом аминокислотные остатки петли, соединяющей α-спирали Fα1 и Fα5 флавин-связывающего домена (Gly65 и Asn70), и остатки сайта, связывающего NAD(P)H (Thr112 , Gln143 и Arg202), формируют дополнительные водородные связи с рибитильной цепью и ADP фрагментом молекулы FAD. В частности, анализ траектории молекулярной динамики показал, что между боковыми цепями Fre и FAD формируется 8.03$\pm$2.13 водородных связей, в то время как между Fre и FMN формируется лишь 4.75$\pm$1.72 водородных связей [65].

Таким образом, оксидоредуктазы Fre и LuxG схожи по первичной последовательности и могут участвовать, как в биолюминесцентной реакции, так и в реакции восстановления ионов железа. Однако, данные ферменты отличаются сродством к субстрату, что может быть вызвано особенностями их функционирования для обеспечения биолюминесцентной системы бактерий флавином (LuxG) или для восстановления железосодержащих центров других белков (Fre). Сравнительный анализ их кинетики, а также первичных последовательностей, позволит установить функциональные особенности и пролить свет на эволюцию *lux* оперона.

1.5.2 Структурно-функциональные характеристики нитроредуктаз FRG и FRP

Оксидоредуктазы FRP и FRG относят к классу E.C.1.5.1 "Оксидоредуктаз", так как они катализируют окислительно-восстановительную реакцию, в которой CH-NH группа используется в качестве донора электронов, а NAD^+ или $NADP^+$ в качестве акцептора. Данная реакция может протекать также в обратную сторону:

$$FMNH_2 + NAD^+ \rightleftharpoons FMN + NADH + H^+. \tag{1.2}$$

Оксидоредуктазы FRP и FRG оксидоредуктазы представляют собой гомодимеры, при этом активный центр белка расположен в полости, которая образуется в результате взаимодействия двух субъединиц в составе димера. Таким образом, оба белка содержат по два активных центра, расположенных симметрично относительно центральной оси фермента (Рисунок 1.9). Каждую из субъединиц FRG можно разделить на два домена: основной плотно упакованный домен (участки 2–89 а.о. и 135–218 а.о.), и небольшой подвижный домен (участок 90-134 а. о.), который не связан с основным доменом и «выпячивается» в сторону относительно него. Основной домен состоит из β-складчатого листа, сформированного четырьмя антипараллельными β-цепями. Семь α-спиралей окружают β-складчатый лист, формируя $\alpha/\beta/\alpha$-сэндвич. Две субъединицы формируют димер в результате взаимодействия четырех антипараллельных β-цепей одной субъединицы с параллельной β-цепью, расположенной на С-конце другой субъединицы. Подвижный домен состоит из двух α-спиралей [66]. Топология структуры FRP не отличается от FRG. Также в структуре присутствует основной домен, представляющий собой $\alpha/\beta/\alpha$-сэндвич (участки 15-161 а. о. и 226-240 а.о.), и подвижный домен (2-14 а. о. и 162-225 а. о.), который участвует во взаимодействии со второй субъединицей в составе гомодимера [47]. Главную роль в формировании гомодимера, как FRP, так и FRG играют подвижные домены.

Основное различие обсуждаемых нитроредуктаз состоит в том, что FRG способна связывать одну молекулу FMN в активном центре, в то время как FRP связывает две, одна из которых — кофактор, а другая — субстрат. Было показано, что FRP в моноферментной реакции работает по механизму «пинг-понг», но в биферментной реакции с люциферазой механизм работы FRP изменяется на последовательный (Таблица 1.6). Таким образом, при сопряжении с люциферазой оксидоредуктаза FRP способна отдавать свой кофактор ($FMNH_2$) в биолюми-

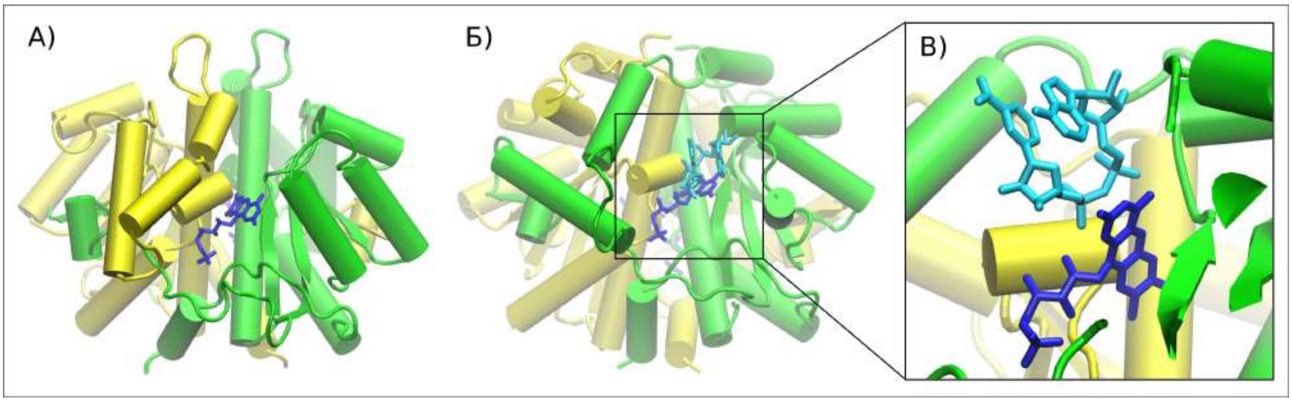

Рисунок 1.9: Пространственные структуры оксидоредуктаз А) FRG и Б) FRP (α-спирали изображены в виде цилиндров, β-складчатые листы — стрелок), расшифрованные вместе с кофактором — FMN (представлен при помощи палочковой модели синим цветом). Субъединицы в составе гомодимера обоих белков окрашены зеленым и желтым цветом. В) Кофактор (FMN, синий) и ингибитор (NAD, голубой), связанные с активным центром FRP [66, 67]

несцентную реакцию [68]. Более того, комплекс с люциферазой может образовывать именно мономер FRP *V. harveyi* [69] подобно мономеру Fre.

Таблица 1.6: Значение K_m и тип кинетики FRG *A. fischeri* и FRP *V. harveyi* в моноферментной и биферментной реакции с люциферазой (Luc) из *A. fischeri* и *V. harveyi* [68]

Фермент	$K_{m,FMN}$ (μM)	$K_{m,NADPH}$ (μM)	$K_{m,NADH}$ (μM)	Механизм реакции
$FRG_{A.f.}$	220	-	120	Пинг-понг
$FRG_{A.f.}$+$Luc_{A.f.}$	0.05	-	3.8	Последовательный
$FRG_{A.f.}$+$Luc_{V.h.}$	4	-	9	Пинг-понг
$FRP_{V.h.}$	8	20	-	Пинг-понг
$FRP_{V.h.}$+$Luc_{A.f.}$	0.2	1.1	-	Последовательный
$FRP_{V.h.}$+$Luc_{V.h.}$	0.3	0.02	-	Последовательный

Как и в структуре бактериальной люциферазы, фиксация субстратов в активном центре FRP происходит при участии мобильной петли, состоящей из девяти аминокислотных остатков:

- Ala201, Ser202, Arg203, Thr204, Ser205, Asn206, Gln207, Lys208, Leu209.

При помощи сайт-направленного мутагенеза было показано, что Arg203 отвечает за связывание NADPH в активном центре и не влияет на взаимодействие с FMN [70]. Также было установлено, что Glu99 играет важную роль в стабилизации гомодимера FRP, и его мутация приводит к диссоциации субъединиц [71].

Активные центры FRP и FRG различаются на участке связывания фосфатной группы, что обусловлено особенностями механизмов работы данных ферментов, в частности, оксидоредуктазой FRP FMN используется преимущественно как кофактор. В обеих структурах N-концевой и C-концевой участки субъединицы задействованы, как в формировании гомодимера, так и области связывания фосфатной группы в активном центре фермента (Рисунок 1.10):

- в структуре FRG это остатки Arg12, Thr14 и Arg208,
- в FRP – His11, Ser13 и Arg169.

В результате вставки из пяти аминокислотных остатков в составе C-концевой мобильной петли FRG, сайт связывания фосфатной группы также включает Lys206.

Сайт связывания изаллоксазина схож у FRP и FRG и состоит из функциональных аналогов, которые консервативны для обоих белков. Исключение составляет Arg15 FRP, NH-группа которого формирует водородную связь с N^1 атомом пиримидиновой части кольца. В структуре FRG аналогичный аминокислотный остаток отсутствует.

Два аминокислотных остатка FRG, Glu165 и Gly166, соответствуют Gly130 и Gly131 в структуре FRP, которые участвуют в формировании водородных связей с O^4 и N^5 изоаллоксазина [47] (Рисунок 1.10). Так как в образовании H-связи участвуют амидные группы основной цепи, то различия боковых цепей в структуре FRP и FRG не влияют на особенности взаимодействия с пиразиновой и пиримидиновой частью кольца FMN. Однако, анализ кристаллической структуры FRG показал, что NH группа Glu165 находится на расстоянии 3.2 Å и направлена в сторону, между атомами N^5 и O^4. По всей видимости, NH группа Glu165 формирует водородную связь только с O^4 атомом изоаллоксазина, но не с N^5 [66].

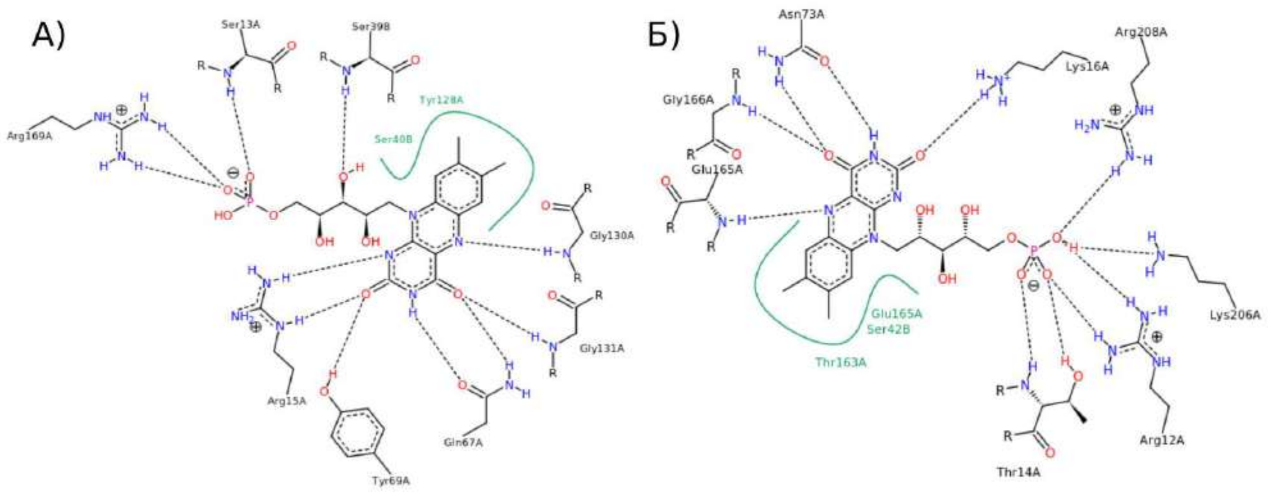

Рисунок 1.10: Схема связывания FMN в активном центре нитроредуктаз: А) FRP (Ser39B – аминокислотный остаток из второй субъединицы в составе гомодимера) [47]; Б) FRG (Ser42B – аминокислотный остаток из второй субъединицы в составе гомодимера) [66]

Многие авторы выделяют FRD оксидоредуктазу, впервые обнаруженную у *V. harveyi* [50], в отдельный тип. Однако при построении попарного выравнивания данной оксидоредуктазы с Fre *V. harveyi* нами было показано [56], что аминокислотная последовательность FRD полностью совпадает с Fre. Таким образом, FRD является оксидоредуктазой Fre типа, хотя и, вероятно, обладает большим сродством к NADH, чем к NADPH, поэтому ее впервые охарактеризовали, как NADH-зависимую.

1.6 Исследование комплекса между люциферазой и оксидоредуктазой

Сопряженную систему бактериальная люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза относят к классу двухкомпонентных флавин-зависимых систем, состоящих из FMN редуктазы и монооксигеназы, которая катализирует окисление различных субстратов [72, 73]. Роль редуктазы заключается в поставке восстановленного флавина для монооксигеназы, которая, в свою очередь, использует его для активации молекулярного кислорода. В отличие от флавопротеинов, которые имеют прочно или ковалентно связанную простетическую группу, во флавин-зависимых биферментных системах реакция происходит при участии двух ферментов, при этом молекула флавина передается от одного белка к другому. Такие системы были найдены только в бактериальных организмах, где они катализируют окисление ароматических и полициклических соединений для различных целей: биосинтез антибиотиков, биолюминесценция, окисление длинноцепочечных алканов, десульфация серосодержащих соединений и другие реакции [72].

Двухкомпонентная флавин-зависимая система бактериальная люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза была детально исследована одной из первых. Позднее были открыты и другие системы, при этом было установлено, что монооксигеназный компонент может катализировать целый спектр реакций (Таблица 1.7).

Несмотря на то, что каждая монооксигеназа катализирует уникальную реакцию, для всех систем характерно наличие общих свойств. Во-первых, все монооксигеназы используют для катализа восстановленный FMN, который поставляется оксидоредуктазой. Во-вторых, механизм функционирования данных ферментов включает стадию формирования интермедиата 4a-гидропероксифлавина, который отвечает за окисление второго субстрата.

Аналогом люциферазы из других двухкомпонентных флавин-зависимых систем на основании структурного сходства можно считать монооксигеназы SsuD и LadA [72]. LadA была выделена из *Geobacillus thermodenitrificans*, она катализирует реакцию инициации терминального окисления длинноцепочечных алканов до соответствующих первичных спиртов [74]. В реакции происходит окисление алканов с длинной углеводородной цепи от 15 до 36 углерод-

Таблица 1.7: Монооксигеназы, входящие в состав флавин-зависимых биферментных систем бактерий [72]

Монооксигеназа	Реакция
Бактериальная люцифераза (LuxAB)	Окисление длинноцепочечных альдегидов с испусканием сине-зеленого света
SsuD	Десульфация алкансульфонатов
ActVA	Биосинтез актинорходина
HpaH/C_2	Гидроксилирование *p*- гидроксифенилацетата
EmoA/EDTA-Mo	Деградация EDTA
NtaA/NTA-Mo	Деградация нитрилотриацетата
SnaA или PII_A синтаза	Биосинтез пристиномицина
LadA	Окисление длинноцепочечных алканов
Dsz/SoxA и C	Деградация дибензодиофена

ных атомов в результате взаимодействия с восстановленным FMN и молекулярным кислородом.

В отличие от LadA и бактериальной люциферазы монооксигеназа SsuD не катализирует окисление длинноцепочечных алканов или альдегидов, а участвует в разрыве C–S связи. Она катализирует превращение алкансульфоната в сульфид и альдегид соответствующей длины [75]. Этот фермент был выделен из разных бактерий, и было показано, что его экспрессия происходит только при недостатке серы [76]. В ходе ряда метаболических реакций сера восстанавливается и встраивается в серо-содержащие биомолекулы. Первые исследования монооксигеназы SsuD показали, что данный фермент способен катализировать удаление сульфогруппы SO_3H из алкенсульфонатов с длинной углеводородной цепи от 2 до 10 атомов [77].

Наибольший интерес в механизме функционирования двухкомпонентных флавин-зависимых систем представляет способ переноса $FMNH_2$. Восстановленный флавин может передаваться от оксидоредуктазы к монооксигеназе либо за счет свободной диффузии, либо в результате образования комплекса между белками. На данный момент были получены экспериментальные данные, свидетельствующие об альтернативных механизмах переноса $FMNH_2$, которые могут отличаться у различных исследуемых биферментных систем. Также было установлено, что для каждого из белков двухкомпонентной системы характерна определенная аффинность к редокс форме флавина [72, 78]. Как правило, афинность оксидоредуктазы выше к окисленной форме флавина, в то время как сродство монооксигеназы выше к $FMNH_2$ (Таблица 1.8). Таким образом, специфическое сродство фермента к субстрату обеспечивает перенос и быстрое связывание флавина монооксигеназой.

Таблица 1.8: Константы диссоциации окисленного $K_d(ox)$ и восстановленного $K_d(red)$ флавина для ферментов, входящих в состав двухкомпонентных флавин-зависимых систем [78]

Редуктаза	$K_d(red)$ (μM)	$K_d(ox)$ (μM)	Монооксигеназа	$K_d(red)$ (μM)	$K_d(ox)$ (μM)
C_1–HPA	$\gg 0.038$	0.038	C_2	1.2	Не связывает
HpaC	20	3	HpaA	≤ 2	≥ 250
ActVB	6.6	4.4	ActVA	0.39	19 – 26
SsuE	–	0.015	SsuD	–	10.2
$LuxG_{P.l.}$	–	Не связывает	$LuxAB_{V.c.}$ $LuxAB_{V.h.}$	1.8 36	11 84

Многие из описанных флавин-зависимых монооксигеназ способны использовать восстановленный флавин, поставляемый «посторонними» редуктазами, которые вовлечены в работу других метаболических путей. Такая способность утилизировать $FMNH_2$ из различных источников может говорить об отсутствии комплекса между белками в виду широкой специфичности монооксигеназы к разным оксидоредуктазам. Однако, оксидоредуктазы могут иметь схожие структурные мотивы, которые способствуют образованию белок-белкового комплекса. Расшифровка трехмерных структур различных оксидоредуктаз даст возможность установить наличие таких специфических структурных мотивов.

Существует большое разнообразие методов, позволяющих определить наличие или отсутствие комплекса между белками. Для исследования механизмов взаимодействия между ферментами двухкомпонентных флавин-зависимых систем были использованы стандартные методы протеомики: гель-фильтрация, аффинная хроматография, химические сшивки, аналитическое ультрацентрифугирование и динамическое светорассеяние [79, 80]. Большая часть этих методов используется для исследования достаточно стабильных комплексов и неприменима к слабым короткоживущим комплексам. Последние можно исследовать с помощью очень чувствительных методов флуоресцентной спектроскопии, которые позволяют детектировать перенос энергии между молекулами донора и акцептора, связанными с разными белками и расположенными на расстоянии 1 – 10 нм [81, 82].

Также для исследования белок-белковых взаимодействий были использованы такие подходы, как измерение эффективности работы монооксигеназы с различными оксидоредуктазами. Считается, что если для переноса $FMNH_2$ необходимо специфическое взаимодействие между моноксигеназой и оксидоредуктазой, то эффективность реакции будет выше при смешивании монооксигеназы и оксидоредуктазы из одного вида бактерий. Это обусловлено тем, что в ходе эволюции структуры двух белков подстроились друг под друга таким образом, чтобы обеспечивать эффективную передачу $FMNH_2$ [45].

Очень информативным подходом является исследование кинетики быстрых реакций, а именно отдельных констант скоростей ферментативных реакций. Данный подход использовался для определения влияния одного компонента флавин-зависимой биферментной системы (монооксигеназы), на кинетику реакции, катализируемую другим компонентом (оксидоредуктазой) [83]. Если для работы биферментной системы необходимо формирование комплекса между белками, то индивидуальные константы скоростей должны увеличиться для таких ключевых этапов, как диссоциация восстановленного флавина от редуктазы или его связывание с монооксигеназой, в присутствии обоих компонентов системы по сравнению с монoферментной реакцией. Если присутствие одного из компонентов не влияет на отдельные константы скоростей реакции, катализируемой вторым компонентом, то формирование комплекса не является необходимым или важным этапом при переносе восстановленного флавина между ферментами.

Исследование стационарной кинетики ферментативных реакций, также использовался при изучении комплекса между белками флавин-зависимых двухкомпонентных систем. В том числе для систем с бактериальной люциферазой [4, 68], алкансульфонат монооксигеназой [84] и стирол монооксигеназой [85]. В данных экспериментах определяли, насколько отличаются кинетические параметры моноферментной и биферментной реакций. Следует отметить, что интерпретация кинетических параметров стационарной реакции, таких как K_m, может быть достаточно нетривиальной задачей, так как их изменение не всегда говорит о формировании комплекса. В присутствии обоих компонентов системы изменение параметров стационарной кинетики может происходить в результате новых сформировавшихся условий, влияющих на индивидуальные константы скоростей реакции и на этап реакции, лимитирующий ее скорость. Так, анализ кинетики системы HPAH из бактерий *Acinetobacter baumannii* показал, что значение K_m редуктазной компоненты для флавина изменяется в присутствии оксигеназы. Стоит отметить, что это происходит не в результате формирования комплекса межу оксидоредуктазой и монооксигеназой, а вследствие изменения скорости окисления флавина в присутствии оксигеназы. Изменение параметров стационарной реакции при изучении белок-белковых комплексов нужно интерпретировать с учетом того, что полученные результаты являются косвенными и могут зависеть от большого количества факторов.

На данный момент достаточно подробно описан ряд двухкомпонентных флавин-зависимых систем из различных бактерий (Таблица 1.9). Однако, механизм их работы до конца не изучен. По-видимому, он не является универсальным, так как лишь для некоторых

Таблица 1.9: Механизм переноса $FMNH_2$ в флавин-зависимых биферментных системах

Ферменты	Механизм переноса	Метод
HPAH *Acinetobacter baumannii* (система p– гидроксифенилацетат гидроксилаза) C_1 – редуктаза C_2 – оксигеназа	Свободная диффузия	Нестационарная кинетика. Константа диссоциации $FMNH_2$ для C_1 не зависит от второго компонента реакции (сравнивались биферментные реакции с C_2 и cyt *c*) [79]
HPAH *E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa* (система p– гидроксифенилацетат гидроксилаза) $HpaC_1$ – редуктаза HpaA – оксигеназа *P. aeruginosa* HpaB – оксигеназа *E. coli*	Свободная диффузия Комплекс между белками /свободная диффузия	Диализная мембрана. HpaB и HpaC эффективно работали, как по разные стороны мембраны, так и находясь в одном компартменте [86] Нестационарная кинетика. Константа диссоциации $FADH^-$ для HpaC в присутствии HpaA значительно больше, чем в моноферментной реакции. Однако, так как константа скорости формирования 4а-гидропероксифлавина практически не отличается для моно- и биферментной реакции, то возможен перенос а счет свободной диффузии [87]
ActVA – оксигеназа ActVB – редуктаза из системы гидроксилирования дигидрокалафугина (предшественник антибиотика актинорходина) *Streptomyces coelicolor*	Свободная диффузия	Нестационарная кинетика. Присутствие ActVA (а также C_2, красителей DCIP и менадиона) не влияет на скорость диссоциации $FMNH_2$ [88]
SsuD – алкансульфонатмонооксигеназа SsuE – оксидоредуктаза	Комплекс между белками	Аффинная хроматография и химические перекрестные сшивки [89]
		Стационарная кинетика SsuE в присутствии и отсутствии SsuD. Кинетика реакции SsuE сменилась с упорядоченного последовательного механизма (предварительное связывание NADPH, затем FMN) на быстрый равновесный упорядоченный механизм в присутствии SsuD [84]
Стирен монооксигеназа StyA – монооксигеназа StyB – редуктаза	Свободная диффузия Комплекс между белками	StyA может работать одинаково эффективно с разными редуктазами (в том числе NADH-FMN оксидоредуктазой *V. fischeri* и PheA2) [90, 91] StyA1 из *Rhodococcus opacus* 1CP эффективно функционирует только совместно с редуктазой StyA2B [91]

систем можно выделить стабильный комплекс при помощи стандартных методик, таких как химические сшивки и аффинная хроматография. Известные на данный момент биферментные системы и предполагаемые механизмы функционирования описаны в Таблице 1.9 [78].

Наиболее изученной флавин-зависимой биферментной системой является бактериальная люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза. В ходе реакции люцифераза связывает $FMNH_2$, поставляемый NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазой, а также молекулярный кислород (O_2) и алифатический альдегид (RCHO) [92]. Существуют данные, как подтверждающие существование комплекса между белками для переноса флавина, так и опровергающие его (Таблица 1.10).

Таблица 1.10: Экспериментальные данные о механизме передачи $FMNH_2$ между оксидоредуктазой и люциферазой (Luc) светящихся бактерий

Ферменты	Механизм переноса	Метод
$Luc_{V. h.}$ и $Luc_{V. f.}$ $FRP_{V. h.}$ $FRG_{V. f.}$	Комплекс между белками	Стационарная кинетика. Уменьшение значения K_m для флавина в биферментной реакции [68]
$Luc_{V. h.}$ $FRP_{V. h.}$		Изменение анизотропии флуоресценции эозина, связанного с мономером FRP, в присутствии Luc [69]
$Luc_{V. h.}$ $FRP_{V. h.}$		Биолюминесцентный резонансный перенос энергии (BRET) между Luc и желтым флуоресцентным белком, связанным с FRP (FRP-YFP) [82]
$Luc_{V. h.}$ $FRP_{V. h.}$		Изменение кинетики реакции с пинг-понг на последовательную в присутствии Luc [93]
$Luc_{V. h.}$ $Fre_{E. coli}$ $FRP_{V. h.}$	Свободная диффузия	Интенсивность светоизлучения биферментной системы Luc и Fre сравнима с интенсивностью системы Luc и FRP. Оксидоредуктаза из того же вида бактерий не увеличивает биолюминесцентный сигнал, таким образом между Luc и FRP нет специфического взаимодействия [45]
$Luc_{P. l.}$ $Luc_{V. c.}$ C_2 $LuxG_{P. l}$		Нестационарная кинетика. Присутствие $Luc_{P. l.}$ (а также C_2 и $Luc_{V. c.}$) не влияет на скорость диссоциации $FMNH_2$ [83]

Уникальность люциферазной реакции состоит в том, что в результате окисления субстратов формируется интермедиат в электронно-возбужденном состоянии, дезактивация которого происходит с испусканием фотона (λ = 490 нм) [5]. Возможность преобразовывать энергию химической реакции в свет делает данную ферментативную систему особо привлекательной для широкого круга прикладных направлений, включающих аналитические методы [94, 95], экологический мониторинг [96] и биосенсоры [97, 98]. Однако, вопрос о том, как происходит передача субстратов биолюминесцентной реакции, в частности $FMNH_2$, до сих пор остается открытым (Таблица 1.10).

Полученные экспериментальные данные не всегда можно интерпретировать однозначно. В частности, изменение K_m при исследовании биферментной реакции не всегда свидетельствует о наличии комплекса. Как в случае системы HPAH из бактерий *A. baumannii*, где изменение связано с уменьшением скорости окисления флавина в присутствии оксигеназы.

Разнообразие оксидоредуктаз (FRP, FRG, LuxG и Fre), способных работать с люциферазой, также осложняет исследование механизмов переноса $FMNH_2$ между белками. На данный момент не было проведено сравнительного анализа эффективности работы различных оксидоредуктаз с люциферазой, как и анализа структурных мотивов и физико-химических характеристик, которые могли бы обеспечивать взаимодействие между белками.

В экспериментах, представленных в Таблице 1.10, не учитывалось микроокружение белков, которое может обеспечиваться их пространственной локализацией *in vivo*. Известно, что температура денатурации и энергия активации люциферазы зависят от ионной силы раствора [99], а люциферазы некоторых бактерий способны взаимодействовать *in vivo* с вторичными эмиттерами биолюминесценции, такими как люмазиновый белок, за счет электростатических сил [100]. В связи с этим можно сделать предположение, что во взаимодействии люциферазы и оксидоредуктазы также играет роль распределение поверхностного заряда на ферментах.

Сравнительно недавно в экспериментах по исследованию нестационарной кинетики реакции в системе бактериальная люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза было показано, что молекула $FMNH_2$ связывается с активным центром люциферазы в форме семихинона $FMNH^-$ [83], поэтому далее в работе будет использоваться это обозначение.

1.7 Заключение к главе

Анализ публикаций, посвященных структуре и функции люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий, показывает, что, несмотря на длительное изучение этой биолюминесцентной системы, остаётся ряд вопросов относительно работы упомянутых ферментов по отдельности и в сопряжении.

До сих пор остаётся неясной структурная основа различий субстратной специфичности и скорости катализа бактериальных люцифераз, которые, судя по отдельным экспериментальным данным, подразделяются на «быстрый» и «медленный» тип. Получение общих закономерностей сдерживается трудоёмкостью выделения и характеризации *in vitro* биолюминесцентных систем новых видов бактерий. Из 29 описанных к настоящему времени видов светящихся бактерий только для 6 видов, среди которых *A. fischeri*, *P. leiognathi*, *P. phosphoreum*, *V. campbellii*, *V. harveyi* и *Ph. luminescens*, можно считать функцию люциферазы экспериментально исследованной в той или иной степени. Попытки изменить скорость катализа люциферазы за счёт сайт-направленного мутагенеза двух аминокислотных остатков или даже больших фрагментов последовательности (67 а.о.), как правило, приводили к сильному снижению активности фермента на порядок и более, что связано, на наш взгляд, с отсутствием систематизированных знаний о структурных различиях двух групп люцифераз.

Бактерии можно считать одними из самых простых биолюминесцентных организмов, но регуляция ферментативного обеспечения свечения в них по праву считается одной из самых сложных. Это касается, в том числе, вопроса обеспечения люциферазы восстановленным флавином за счёт работы NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз. Как минимум 4 разных типа редуктаз считаются поставщиками флавинового субстрата люциферазе: LuxG, Fre, FRG и FRP. При этом, на наш взгляд, мало внимания было уделено до сих пор оксидоредуктазе, закодированной вместе с люцифразой в *lux*-опероне (LuxG). Про неё известно, что она гомологична Fre оксидореуктазе из *E. coli*, хотя и значительно отличается по ряду структурных и функциональных свойств. С эволюционной точки зрения именно LuxG редуктазы должны быть наиболее приспособлены для взаимодействия с бактериальной люциферазой, но экспериментальное исследование данного вопроса ещё не завершено.

Также анализ литературы показал, что из четырёх типов NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий наиболее изученным в плане участия в биолюминесцентной реакции является нитроредуктаза FRP *V. harveyi*. Несколькими экспериментальными методами было показано, что она образует белок-белковый комплекс с люциферазой, который, однако, не удаётся выделить напрямую. До настоящего времени не исследовано, за счет каких структурных особенностей происходит взаимодействие оксидоредуктаз с бактериальной люциферазой, и не имеют ли все NAD(P)H-зависимые флавиновые редуктазы на поверхности сходные структурные мотивы в области активного центра.

ГЛАВА 2

Материалы и методы

2.1 Аминокислотные последовательности люцифераз и оксидоредуктаз

В данной работе проводился анализ аминокислотных последовательностей двух видов ферментов биолюминесцентной системы бактерий: люцифераз и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз. На данный момент известно около двадцати видов морских светящихся бактерий, один пресноводный вид и три наземных (Таблица 1.1) [2]. Для большинства из них был частично или полностью расшифрован и аннотирован геном, который хранится в базе данных NCBI [101].

Исследуемый набор аминокислотных последовательностей был подготовлен следующим образом:

1. из базы данных NCBI были взяты геномы светящихся бактерий [2];

2. выполнен поиск по аннотированным локусам и определены аминокислотные последовательности люцифераз (Таблица 2.1) и оксидоредуктаз LuxG (Таблица 2.2), FRG (Таблица A.2) и FRP (Таблица A.3) согласно описанию кодирующих последовательностей (CDS) и генному окружению.

Для поиска аминокислотных последовательностей гомологов LuxG оксидоредуктаз использовался сервис BLAST [102]. В качестве поискового запроса были выбраны последовательности LuxG оксидоредуктаз *V. harveyi* (ID: ABX76849.1) и *P. leiognathi* (ID: KJF87632.1). Гомологи LuxG определялись при помощи алгоритма “protein-protein BLAST” (blastp), который строит попарные выравнивания поискового запроса и последовательностей из выбранных баз данных. В данной работе был выполнен поиск по следующим базам данных: GenBank [103], PDB [104], полипептидных последовательностей SwissProt [105], PIR [106] и PRF [107].

При поиске гомологов LuxG значение параметра e-value, учитывающего сходство запроса и найденной последовательности, задавалось не более e^{-10}. Для построения попарных выравниваний использовали матрицу замен BLOSUM62. В результате для каждого запроса был получен набор, состоящий из 1000 аминокислотных последовательностей. Полученный массив данных редуцировали следующим образом:

Таблица 2.1: Аминокислотные последовательности α– и β–субъединицы бактериальной люциферазы

Организм	ID кДНК	ID	Название	Длина (а.о.)
A. fischeri	CP000021.2	AAW87991.1 AAW87990.1	Luciferase alpha chain LuxA Beta subunit luciferase	355 326
A. logei	HQ450520.1	AEK79972.1 AEK79973.1	Alkanal monooxygenase alpha chain LuxA Alkanal monooxygenase beta chain LuxB	354 326
A. salmonicida	AF452135.1	AAM46720.1 AAM46721.1	LuxA LuxB	354 326
P. aquimaris	JQ229765.1	AFK80961.1 AFK80962.1	Alpha subunit luciferase Luciferase beta subunit	354 325
P. damselae	EU122290.1	ABX76858.1 ABX76859.1	Alpha subunit luciferase Beta subunit luciferase	354 326
P. kishitanii	AY341064.2	AAR04029.2 AAR04030.1	Alpha subunit luciferase Beta subunit luciferase	357 328
P. leiognathi	EF536338.1	ABS59226.1 ABS59227.1	Alpha subunit luciferase Beta subunit luciferase	354 326
P. mandapamensis	DQ988878.2 DQ790865.1	AAR04040.2 ABH09608.1	Alpha subunit luciferase Beta subunit luciferase	354 326
P. phosphoreum	KF926858.1 AY849487.1	AHJ80156.1 AAX51417.1	Luciferase alpha subunit Beta subunit luciferase	356 326
C. P. katoptron	AMSD01000002.1	EPE37470.1 EPE37469.1	Bacterial luciferase alpha subunit Bacterial luciferase beta subunit, LuxB	360 325
Sh. hanedai	AB261992.1	BAF40896.1 BAF40897.1	Luciferase alpha subunit Luciferase beta subunit	354 327
Sh. woodyi	CP000961.1	ACA87897.1 ACA87898.1	Alkanal monooxygenase Alkanal monooxygenase	356 326
V. campbellii	CP006606.1	AGU98401.1 AGU98402.1	Alkanal monooxygenase alpha chain LuxA (luciferase) Alkanal monooxygenase beta chain LuxB	355 324
V. chagasii	EU122293.1 EU122294.1	ABX76870.1 ABX76875.1	Alpha subunit luciferase Beta subunit luciferase	355 324
V. harveyi	DQ436496.1	ABD97811.1 ABD97812.1	Luciferase alpha subunit Beta subunit luciferase	355 324
V. orientalis	ACZV01000004.1	EEX94117.1 EEX94116.1	Luciferase alpha chain LuxA LuxB luciferase beta chain	355 324
V. vulnificus	EU122289.1	ABX76853.1 ABX76854.1	luciferase alpha chain LuxA beta subunit luciferase	355 324

продолжение Таблицы 2.1				
V. albensis	ACHV01000001.1	EEO02252.1 EEO02253.1	LuxA luciferase alpha chain LuxB luciferase beta chain	355 301
Ph. luminescens	AF403784.1	AAK98554.1 AAK98555.1	Luciferase alpha subunit Luciferase beta subunit	359 324
Ph. asymbiotica	FM162591.1	CAQ84604.1 CAQ84603.1	Luciferase Luciferase beta subunit	360 324
V. azureus	BATL01000077.1	GAD77484.1 GAD77483.1	Alkanal monooxygenase alpha chain Alkanal monooxygenase beta chain	355 324

1. из набора, состоящего из 2000 последовательностей, были удалены все повторяющиеся записи, в результате чего было получено 1072 уникальных аминокислотных последовательности;
2. 13 частично расшифрованных белковых последовательностей были исключены;
3. из групп аминокислотных последовательностей идентичных более, чем на 95 %, была выбрана одна, которая была включена в окончательный массив. Остальные были исключены, так как все они не могут быть использованы для корректного анализа.

Таким образом, в набор вошла 431 последовательность оксидоредуктаз (Приложение A, Таблица A.1), которая включает 398 аминокислотных последовательностей флавин-зависимых оксидоредуктаз различных бактерий, а также 14 последовательностей LuxG и 19 — Fre оксидоредуктаз светящихся бактерий. Идентификационные номера последовательностей LuxG оксидоредуктаз представлены в Таблице 2.2, Fre — в Таблице A.4 (Приложение A).

2.2 Филогенетический анализ

Филогенетический анализ для каждого набора аминокислотных последовательностей проводили следующим образом. Сначала при помощи программы MAFFT строили множественное выравнивание с учетом следующих параметров: штраф за раскрытие гэпа — 1.53, штраф за продление гэпа — 0.123, в качестве матрицы замен использовали BLOSUM62 [108]. Затем определяли оптимальную эволюционную модель по информационному критерию Акаике (AIC) с помощью программы ProtTest версии 3.4.2 [109]. Модели, которые использовались при реконструкции филогенетических деревьев, представлены в Таблице 2.3. В число оптимальных вошли следующие модели: Le-Gauscel (LG) [110] и Dayhoff [111]. LG-модель относительных скоростей замен аминокислот содержит улучшенные оценки частных весов для

Таблица 2.2: Аминокислотные последовательности LuxG оксидоредуктаз

Организм	ID кДНК, ID	Длина (а.о.)	Генное окружение
A. fischeri	CP000021.2, AAW87988.1	236	sodium-driven multidrug efflux pump, deoxycytidylate deaminase, **luxG**, luxE, luxB, luxA, luxD, luxC, luxI
A. salmonicida	FM178380.1, CAQ81713.1	235	putative cytidine and deoxycytidylate deaminase, luxI, luxR, **luxG**, luxE, luxB, luxA, luxD, luxC, luxR
C. P. katoptron	JGVJ01000011.1, KEY90296.1	235	ABC transporter membrane protein, ABC transporter binding protein, **luxG**, luxE, luxB, luxA, luxD, luxC
P. aquimaris	LZFA01000054.1, OBU15698.1	234	riboflavin synthase subunit alpha, **NAD(P)H-flavin reductase**, long-chain fatty acid–CoA ligase, hypothetical protein, alkane 1-monooxygenase, alkane 1-monooxygenase, acyl transferase, acyl-CoA reductase
P. kishitanii	JZSP01000005.1, KJG09990.1	234	riboflavin synthase subunit alpha, **FMN reductase**, long-chain fatty acid–CoA ligase, hypothetical protein, alkane 1-monooxygenase, alkane 1-monooxygenase, acyl transferase, acyl-CoA reductase
P. leiognathi	JZSK01000046.1, KJF87632.1	234	acyl-CoA reductase, luxD, alkane 1-monooxygenase, alkane 1-monooxygenase, long-chain fatty acid–CoA ligase, **FMN reductase**, riboflavin synthase subunit alpha
P. mandapamensis	DF093600.1, GAA05716.1	234	ribA, ribH, ribB, rib E, **luxG**, luxE, luxB, luxA, luxD, luxC, LumP
P. phosphoreum	LN794354.1, CEO41745.1	234	luxL, luxC, luxD, luxA, luxB, luxF, luxE, **luxG**, ribE, ribBA, ribH, ribA
Sh. woodyi	CP000961.1, ACA87900.1	236	luxA, luxB, luxE, **luxG**, conserved hypothetical protein
V. albensis	LOSL01000001.1, KTL49336.1	235	luxD, alkane 1-monooxygenase, long-chain fatty acid–CoA ligase, **luxG**, amino acid ABC transporter substrate-binding protein
V. campbellii	NC_009784.1, WP_021018158.1	233	ribB, **luxG**, long-chain-fatty-acid–CoA ligase, alkane monooxygenase, alkane monooxygenase, luxD, acyl-CoA reductase
V. harveyi	EU122288.1, ABX76849.1	233	luxC, LuxD, luxA, LuxB, luxE, **luxG**, ribB
V. orientalis	EU122287.1, ABX76842.1	233	luxC, LuxD, luxA, LuxB, luxE, **luxG**
V. vulnificus	EU122289.1, ABX76856.1	233	luxC, LuxD, luxA, LuxB, luxE, **luxG**

аминокислотных замен по сравнению с более ранними моделями, так как учитывает изменчивость скорости эволюции различных сайтов и была разработана на основании расширенного и более разнообразного набора аминокислотных последовательностей [110]. Чаще всего такие модели лучше подходят для реконструкции филогении, но есть и исключения, когда используют наиболее подходящую модель, которая адекватно описывает данные.

Таблица 2.3: Параметры моделей аминокислотных замен, рассчитанные при помощи программы ProtTest 3.4.2

Анализируемый белок	Модель	Параметр гамма-распределения	Соотношение инвариантных сайтов
LuxA	LG+G	1.418	0.000
LuxB	LG+G	1.110	0.000
LuxG и Fre	LG+I+G	0.875	0.043
LuxG и Fre светящихся бактерий, *E. coli* Fre	LG+I+G	1.157	0.085
FRP	Dayhoff+I+G+F	1.579	0.302
FRG	LG+I+G+F	1.411	0.082

Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия при помощи программы PhyML-3.1 [112]. Последовательности алканал-монооксигеназы из актинобактерий и протеобактерий использовали как внешнюю группу при построении филогенетического дерева α- и β-субъединицы [113]. При реконструкции эволюционных взаимоотношений флавин-зависимых оксидоредуктаз Fre и LuxG в качестве внешней группы использовали оксидоредуктазы семейства FNR из различных гамма-протеобактерий. Корень филогенетического дерева FRP оксидоредуктазы, а также FRG поместили в среднюю точку.

В качестве показателя устойчивости дерева использовали бутстрэп индексы, которые были рассчитаны на основе 1000 повторностей. При исследовании эволюции LuxG и Fre оксидоредуктаз также проводили байесовский анализ филогении в программе MrBayes v3.2.6 [114]. Для этого в программе указывали модель LG с фиксированными значениями параметров (Таблица 2.3) и запускали два независимых анализа MCMC со следующими условиями: 3000000 генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 50 генераций, то есть 60000 проб. Первые 25 % проб исключались из анализа («burn-in»).

Оценку совместной эволюции исследуемых белков проводили на основании коэффициента коэволюции, который рассчитывается, как коэффициент корреляции Пирсона между матрицами расстояний филогенетических деревьев с помощью сервера MirrorTree [115]. Для расчета данного коэффициента использовали филогенетические деревья, построенные без учета внешней группы. Для визуализации филогенетических деревьев использовали электронный ресурс iTOL [116].

2.3 Анализ консервативных, вариабельных и специфичных позиций множественного выравнивания

Для множественного выравнивания аминокислотных последовательностей α– и β–субъединицы бактериальной люциферазы, оксидоредуктаз LuxG и Fre светящихся бактерий и Fre *E.coli*, оксидоредуктазы FRP, а также оксидоредуктазы FRG в программе Jalview [117] проводили поиск следующих типов столбцов выравнивания (Рисунок 2.1):

- Консервативные позиции — позиции выравнивания, в которых аминокислотный остаток совпадает для всего набора рассматриваемых последовательностей (идентичность 100 %). Предполагается, что мутация в этой позиции приводит к нарушению функции белка. Полученные данные о консервативных сайтах также сопоставляли с данными сервера NCBI Conserved Domains [118].

- Позиции консервативные $\sim$ 95 %, аминокислотные остатки в которых совпадают, но имеются 1–2 исключения.

- Специфичные позиции (specificity determining positions)— позиции выравнивания, в которых остатки консервативны только в рамках функциональной группы белков. К ним следует отнести два типа позиций: (1) аминокислотные остатки, которые консервативны внутри каждой группы последовательностей, но различаются между группами; (2) аминокислотные остатки, которые консервативны внутри одной группы последовательностей, но вариабельны в другой группе.

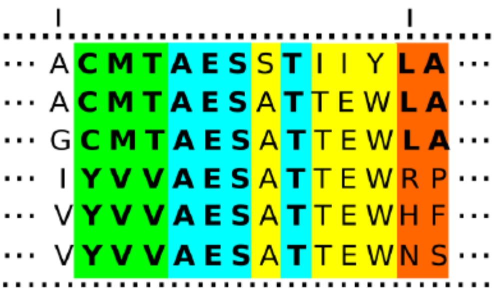

Рисунок 2.1: Схематическое представление множественного выравнивания, содержащего позиции разных типов: консервативные (голубой), консервативные не менее, чем на ~95 % (желтый), специфичные (зеленый и оранжевый) и вариабельные (белый)

Считается, что специфичные позиции определяют функциональные особенности группы белков внутри одного семейства. На данный момент разработан широкий набор методов, позволяющих выявить такие позиции. Они включают подходы, основанные на определении энтропии или количества информации в столбце выравнивания, методы выявления специфичных сайтов на основании скорости эволюции, подходы, учитывающие пространственную структуру белков, а также различные статистические методы [119, 120]. В данной работе для идентификации специфичных позиций использовали программу DIVERGE 3.0 [121]. Несмотря на то, что данная программа не позволяет точно различить нейтральные и адаптивные эволюционные изменения, по сравнению с другими методами у нее есть ряд весомых преимуществ. В частности, для определения специфичных сайтов используется параметрический статистический подход — метод наибольшего правдоподобия, а также строгие параметры оценки достоверности найденных сайтов.

С помощью программы DIVERGE 3.0 специфичные позиции определяли согласно следующему алгоритму:

1. аминокислотные последовательности множественного выравнивания разделяли на кластеры, соответствующие кладам филогенетического дерева;

2. для каждой пары кластеров определяли наличие дивергенции типа I по значению коэффициента θ_I и дивергенции типа II по значению коэффициента θ_{II}.

Дивергенцией типа I характеризуются специфичные позиции множественного выравнивания консервативные только у одного кластера последовательностей и вариабельные у другого. Дивергенция типа II свойственна для позиций, которые консервативны в обоих кластерах гомологичных белков, но различаются по физико-химическим характеристикам.

В обоих случаях, селективные ограничения для функциональных групп гомологичных белков существуют при $0 < \theta \leq 1$. Для определения позиций, которые вносят вклад в функциональные различия, в программе рассчитывается значение апостериорной вероятности:

$$Q_k = P(S|X), \tag{2.1}$$

где k – позиция выравнивания, S – состояние, которое описывает данную позицию, X – конфигурация аминокислотного остатка. В программе учитывается четыре конфигурации аминокислотных остатков: положительно заряженные (Lys, Arg, His), отрицательно заряженные (Asp, Glu), гидрофильные (Ser, Thr, Asn, Gln, Cys, Gly, Pro) и гидрофобные (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Val, Tyr). В качестве специфичных позиций, определяющих функциональные различия, выбирали те, для которых пороговое значение составило P $\geq$ 0.75 (cutoff).

Для того, чтобы избежать ложноположительных результатов в программе также определяли процент ложных специфичных позиций (FDR, false discovery rate):

$$FDR(c) = 1 - \sum_k Q_k / L_c, \tag{2.2}$$

где Q_k – значение апостериорной вероятности для позиции k, L_c – количество сайтов, которые отвечают пороговому критерию cutoff (c).

2.4 Модели белков

В работе использовали следующие кристаллические структуры белков, взятые из банка данных PDB [122]: люциферазы *V. harveyi* (PDB ID: 3FGC) [21], NADPH:FMN-оксидоредуктазы (FRP) *V. harveyi* (PDB ID: 2BKJ) [67] и оксидоредуктазы Fre *E. coli* (PDB ID: 1QFJ) [59]. Координаты следующих мобильных элементов структуры отсутствуют в файлах, содержащих координаты атомов исследуемых белков:

- 3FGC: αGly284, αHis285, αLys286, αAsp287, αThr288, αAsn289;
- 2BKJ (симметрично в обеих субъединицах): Ala201, Ser202, Arg203, Thr204, Ser205, Asn206, Gln207, Lys208, Leu209.

Недостающие участки мобильных петель были реконструированы по гомологии при помощи программы MODELLER [123]. Оптимизация реконструированных участков структуры проводилась в программном пакете CHARMM [124].

Модель люциферазы *P. leiognathi*, а также модель структуры оксидоредуктазы LuxG *V. harveyi* были получены при помощи метода моделирования пространственной структуры белка по гомологии. Для этого использовали сервер SWISS-MODEL [125].

В качестве шаблона для реконструкции структуры люциферазы *P. leiognathi* использовали кристаллическую структуру люциферазы *V. harveyi*. Построение выравнивания аминокислотных последовательностей производилось сервером (Рисунок 2.2). Результирующее выравнивание содержит одну делецию в случае α-субъединицы и две делеции и четыре вставки в случае β-субъединицы. Доля идентичных аминокислотных остатков для α-субъединицы составила 54.24 %, для β-субъединицы – 45.03 %. Согласно оценочной функции QMEAN4, которая определяет качество модели, полученной при помощи сервера, качество структуры *P. leiognathi* оказалось недостаточно высоким, в связи с чем проводили ее оптимизацию при помощи молекулярной динамики.

А)

```
Target     MKISNICFSYQPPGESHQEVMERFIRLGVASEELNFDGFYTLEHHFTEFGITGNLYIACANILGRTKRIQVGTMGIVLPT
3fgc.1.A   MKFGNFLLTYQPPELSQTEVMKRLVNLGKASEGCGFDTVWLLEHHFTEFGLLGNPYVAAAHLLGATETLNVGTAAIVLPT

Target     EHPARHVESLLVLDQLSKGRFNYGTVRGLYHKDFRVFGTSQEDSRKTAENFYSMILDASKTGVLHTDGEVVEFPDVNVYP
3fgc.1.A   AHPVRQAEDVNLLDQMSKGRFRFGICRGLYDKDFRVFGTDMDNSRALMDCWYDLMKEGFNEGYIAADNEHIKFPKIQLNP

Target     EAYSKK-QPTCMTAESSETITYLAERGLPMVLSWIIPVSEKVSQMELYNEVAAEHGHDINNIEHILTFICSVNEDGEKAD
3fgc.1.A   SAYTQGGAPVYVVAESASTTEWAAERGLPMILSWIINTHEKKAQLDLYNEVATEHGYDVTKIDHCLSYITSVDHDSNRAK

Target     SVCRNFLENWYDSYKNATNIFNDSNQTRGYDYLKAQWREWVMKGLADPRRRLDYSNELNPVGTPERCIEIIQSNIDATGI
3fgc.1.A   DICRNFLGHWYDSYVNATKIFDDSDQTKGYDFNKGQWRDFVLKGHKDTNRRIDYSYEINPVGTPEECIAIIQQDIDATGI

Target     KHITVGFEANGSEQEIRESMELFMEKVAPHLKDPQ
3fgc.1.A   DNICCGFEANGSEEEIIASMKLFQSDVMPYLKEKQ
```

Б)

```
Target     MNFGLFFLNFQPEGMTSEMVLDNMVDTVALVDKDDYHFKRVLVSEHHFSKNGIIGEPLTAISFLLGLTKRIEIGSLNQVI
3fgc.1.B   MKFGLFFLNFMNSKRSSDQVIEEMLDTAHYVD--QLKFDTLAVYENHFSNNGVVGAPLTVAGFLLGMTKNAKVASLNHVI

Target     TTHHPVRIGEQTGLLDQMSYGRFVLGLSDCVNDFEMDFFKRKRSSQQQFEACYEILNEALTTNYCQADDDFFNFPRISV
3fgc.1.B   TTHHPVRVAEEACLLDQMSEGRFAFGFSDCEKSADMRFFNRPTDSQFQLFSECHKIINDAFTTGYCHPNNDFYSFPKISV

Target     NPHCISE--VKQYILASSMGVVEWAARKGLPLTYRWSDSLAEKEKYYQRYLAVAKENNIDVSNIDHQFPLLVNINENRRI
3fgc.1.B   NPHAFTEGGPAQFVNATSKEVVEWAAKLGLPLVFRWDDSNAQRKEYAGLYHEVAQAHGVDVSQVRHKLTLLVNQNVDGEA

Target     ARDEVREYIQSYVSEAYPTDPNIELRVEELIEQHAVGKVDEYYDSTMHAVKVTGSKNLLLSFESMKNKDDVTKLINMFNQ
3fgc.1.B   ARAEARVYLEEFVRESYS-NTDFEQKMGELLSENAIGTYEESTQAARVAIECCGAADLLMSFESMEDKAQQRAVIDVVNA

Target     KIKDNLIK
3fgc.1.B   NIVKYHS-
```

Рисунок 2.2: Выравнивание аминокислотных последовательностей А) α- Б) и β-субъединицы люциферазы *P. leiognathi* и *V. harveyi*, используемое для моделирования структуры люциферазы *P. leiognathi* по гомологии

Для моделирования структуры оксидоредуктазы LuxG *V. harveyi* в качестве шаблона использовали оксидоредуктазу Fre *E. coli*. Выравнивание аминокислотных последовательностей представлено на Рисунке 2.3, оно содержит пять вставок. Идентичность последовательностей — 39.04 %. Полученную структуру затем также оптимизировали при помощи молекулярной динамики.

```
Target     MLCSIEKIEPLTSFIFRVLLKPSQPFEFRAGQYINVSLSFG-SLPFSIASCPSNCAFLELHIGGSDISKKNTLVMEELTN
1qfj.1.A   -SCKVTSVEAITDTVYRVRIVPDAAFSFRAGQYLMVVMDERDKRPFSMASTPDEKGFIELHIGASEINLYAKAVMDRILK

Target     SWVCGNMVEVSEARGEAWLRDESVKPLLLVAGGTGMSYTLSILKNSLEQGFTQPIYVYWGAKDMDNLYVHDELVDIALEN
1qfj.1.A   ----DHQIVVDIPHGEAWLRDDEERPMILIAGGTGFSYARSILLTALARNPNRDITIYWGGREEQHLYDLCELEALSLKH

Target     KNISYVPVTEISTCPQYAKQGKVLECVMSDFRNLAEFDIYLCGPCKMVEVARDWFCDKRGAEPEQLYADAFAYL
1qfj.1.A   PGLQVVPVVEQPEAGWRGRTGTVLTAVLQDHGTLAEHDIYIAGRFEMAKIARDLFCSERNAREDRLFGDAFAFI
```

Рисунок 2.3: Выравнивание аминокислотных последовательностей LuxG *V. harveyi* и оксидоредуктазы Fre *E. coli*, используемое для моделирования структуры LuxG по гомологии

2.5 Моделирование молекулярной динамики

Моделирование по гомологии представляет собой достаточно распространенный метод, позволяющий проводить исследование белков, структура которых не была расшифрована при помощи методов рентгеноструктурного анализа или ЯМР спектроскопии. По определению полученные при помощи данного метода структуры являются неточными, так как содержат дополнительную информацию по сравнению со структурой, используемой в качестве шаблона. Даже в случае высокой гомологии белков могут возникать ошибки при реконструкции мобильных участков, ориентации элементов вторичной структуры, а также деталей упаковки атомов. Даже незначительные неточности при реконструкции пространственной структуры белка могут оказаться критическими при исследовании активного центра или взаимодействий белок-лиганд. Метод молекулярной динамики может быть использован для оптимизации и улучшения качества полученных моделей. При этом достаточно 10–100 нс моделирования белка в растворе, заданных в явном виде [126].

В данной работе моделирование молекулярной динамики проводили в программном пакете GROMACS 5.1.4 [127] с использованием силового поля CHARMM36 [128]. Подготовка структур к моделированию проводилась следующим образом. Вначале белок помещали в центр кубического бокса с условиями периодической границы, при этом расстояние от атомов белка до границ бокса составляло минимум 1 нм. Затем всё доступное пространство бокса заполняли молекулами воды (модель SPCE). Для того, чтобы сделать заряд системы нейтральным, некоторое количество молекул воды в ней заменяли на ионы. Модель люциферазы *P. leiognathi* включала 10707 атомов белка, 40902 молекул воды и 31 ион Na^{2+}, люциферазы *V. harveyi* — 10423 атомов белка, 36668 молекул воды и 36 ионов Na^{2+}, оксидоредуктазы LuxG — 3620 атомов белка, 15946 молекул воды и 11 ионов Na^{2+}, оксидоредуктазы Fre — 3656 атомов белка, 12478 молекул воды и 9 ионов Na^{2+}.

При подготовке системы атомы растворителя добавляются автоматически в произвольном порядке, поэтому перед запуском основного моделирования необходимо провести минимизацию энергии растворителя. Для этого атомы белка фиксировались, в то время как в ходе процедуры минимизации атомы растворителя могли смещаться до тех пор, пока сила между ними не станет меньше 1000 кДж моль$^{-1}$ нм$^{-1}$. После этого проводилось несколько раундов релаксации растворителя при зафиксированной и не фиксированной структуре молекулы белка для того, чтобы стабилизировать температуру (300 К), давление (1 атм) и плотность системы. Детали расчетов для каждой системы представлены в таблице 2.4. Затем были сделаны расчеты основного моделирования в течение 20 нс. Электростатические взаимодействия в исследуемых системах рассчитывались с помощью алгоритма PME (Partial Mesh Ewald).

Для каждой исследуемой системы определяли параметр RMSD – среднеквадратичное отклонение атомов белка в данной конфигурации относительно начального состояния. Данный параметр характеризует изменение структуры молекулы белка.

Полученные в результате моделирования структуры проверяли на наличие стерических конфликтов путем построения карт Рамачандрана в программе PROCHECK [129].

Таблица 2.4: Параметры расчетов релаксации люцифераз (1) *P. leiognathi* и (2) *V. harveyi*, оксидоредуктаз (3) LuxG *V. harveyi* и (4) Fre *E. coli*

№	Система	Фиксация атомов белка	Ансамбль	Время расчета, нс
1	1-4	ДА	NVT	5
2	1-4	ДА	NPT	10
3	1-4	НЕТ	NPT	10

2.6 Белок-белковый докинг

Так как наибольшее количество экспериментальных данных свидетельствующих в пользу формирования комплекса между белками было найдено для люциферазы *V. harveyi* и NADPH:FMN-оксидоредуктазы *V. harveyi* (FRP), то именно данная пара ферментов была выбрана для моделирования белок-белковых взаимодействий. Предварительно в файлы структуры были добавлены атомы водорода, после чего проводилась их оптимизация в программном пакете CHARMM [130].

Каждому атому обоих белков присваивали значения массы и заряда. После чего, для молекулы люциферазы рассчитывали значение потенциала электрического поля с помощью программы APBS (Adaptive Poisson Boltzmann Solver) [131] при температуре 300 K и концентрации положительно и отрицательно заряженных ионов радиусом 2.0 Å равной 0.12 M. Расчет производился в прямоугольном боксе, центрированном вокруг молекулы люциферазы. В этом боксе была задана трехмерная сетка размером 255×255×255 с шагом 1.0 Å (для более точного расчета потенциала вблизи белка) и 2.0 Å (для исследования взаимодействий на дальних расстояниях). Каждой ячейке присваивали значения заряда, диэлектрической проницаемости и ионной силы. Для ячеек, полностью находящихся внутри белка, принимали $\varepsilon = 4$, для ячеек раствора $\varepsilon = 80$. Значение ионной силы внутри белка считали равным нулю. Для определения границы диэлектрической проницаемости между белком и растворителем использовали молекулу воды радиусом 1.4 Å. На основании данных параметров для каждой ячейки сетки рассчитывали значение потенциала при помощи линеаризованного уравнения Пуассона-Больцмана [132, 133].

Полученные значения электростатического потенциала для молекулы люциферазы в дальнейшем использовались для нахождения белок-белкового комплекса с наименьшей энергией электростатического взаимодействия [132, 133]:

$$G_{inter} = \sum_{i=1}^{N_q} q_i\phi(\{p\}, r_{q_i}) = \sum_{i=1}^{N_p} p_i\phi(\{q\}, r_{p_i}), \quad (2.3)$$

где N_q и N_p - количество зарядов в наборе $\{q\}$ и $\{p\}$, соответственно $\phi(\{p\},r_{q_i})$ — потенциал, создаваемый набором зарядов $\{p\}$ в точке с зарядом q_i, и наоборот $\phi(\{q\},r_{p_i})$ — потенциал, создаваемый набором зарядов $\{q\}$ в точке с зарядом p_i. В нашем случае каждый белок представлял собой набор точечных зарядов. Для поиска возможных конфигураций комплекса использовался метод Монте-Карло, реализованный в программе MC-Dock [134]. Для отбора комплексов использовали критерий Метрополиса [135]. В ходе симуляции молекула люциферазы была зафиксирована, в то время как оксидоредуктаза могла свободно перемещаться в поле, создаваемом люциферазой. Суммарно было произведено 100 запусков симуляции с 1×10^6 шагов для каждой при температуре 300 К. В результате, согласно критерию Метрополиса, было отобрано $7{,}9\times10^5$ возможных конфигураций, среди которых были выбраны десять с наименьшей энергией взаимодействия.

2.7 Визуализация и анализ трехмерных структур

Для визуализации и анализа моделей пространственных структур белков использовали программу VMD (Visual Molecular Dynamics) [136]. Для структурного выравнивания белков в VMD использовали плагин MultiSeq [136].

ГЛАВА 3

Сравнительный анализ структуры люцифераз светящихся бактерий

Данная глава посвящена исследованию первичных последовательностей и пространственных структур люциферазы различных светящихся бактерий. Обсуждаются особенности строения активного центра данного фермента, которые сформировались в ходе его эволюции.

3.1 Консервативные участки аминокислотных последовательностей бактериальных люцифераз

В данной работе анализировали аминокислотные последовательности люциферазы различных светящихся бактерий. Была найдена 21 аминокислотная последовательность α-субъединиц люциферазы и 21 последовательность β-субъединиц. Для каждого набора данных были построены попарные выравнивания и рассчитан процент идентичности аминокислотных последовательностей. Было установлено, что α-субъединица более консервативна (53–99%, медиана – 66%), чем β-субъединица (43–98%, медиана – 55%) (Приложение A, Таблица A.5) [113], что согласуется с ранее опубликованными данными для 6-ти видов из рода *Photobacterium*, *Photorhabdus* и *Vibrio* [92]. Обе субъединицы люциферазы являются гомологами с высокой долей идентичных аминокислотных остатков.

Кристаллическая структура люциферазы *V. harveyi* была расшифрована вместе с продуктом реакции — FMN, что позволило определить пространственное расположение активного центра фермента [17, 21]. В данной работе аминокислотами активного центра было принято считать остатки, которые находятся в радиусе 6 Å от атомов молекулы FMN. Важным элементом структуры люциферазы является поверхность взаимодействия двух субъединиц, которую также обозначают, как α/β-интерфейс. В рамках данной работы в качестве остатков интерфеса, были выбраны те аминокислоты α- и β-субъединицы, расстояние между атомами которых не превышает 4 Å.

Множественное выравнивание последовательностей α-субъединицы позволило выявить долю идентичных аминокислотных остатков — 38,02% (138 аминокислотных остатков), долю парных совпадений — 71,45% и долю парного сходства последовательностей — 90,44% [113]. В ряде экспериментальных работ было продемонстрировано, что 8 из 138 найденных идентичных аминокислотных остатков играют важную роль в функционировании фермента: αGlu43, αHis44, αHis45, αArg107, αTyr110, αAsp113, αArg125, αGlu175 [5,21,27,29,30,33,37].

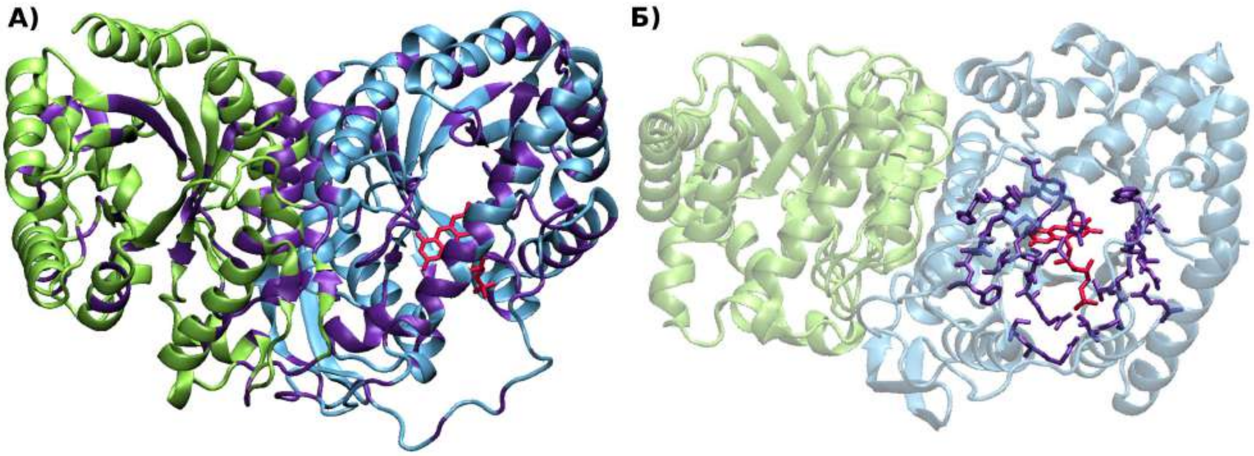

Рисунок 3.1: А) Пространственная структура бактериальной люциферазы в ленточном представлении. Голубым цветом показана α-субъединица, зеленым — β-субъединица, фиолетовым цветом обозначены консервативные аминокислотные остатки, красным цветом при помощи «палочковой» модели изображена молекула FMN. Б) Консервативные остатки активного центра люциферазы выделены фиолетовым цветом

Было обнаружено, что б**о**льшая часть активного центра и прилегающих к нему областей, состоит из консервативных аминокислот: 20 из 35 остатков, формирующих сайт связывания субстратов и его ближайшее окружение (Рисунок 3.1). Известно, что α-субъединица непосредственно отвечает за протекание биолюминесцентной реакции, поэтому наличие большой концентрации консервативных остатков в области активного центра не случайно. Они обеспечивают формирование структуры кармана каталитического центра и правильное расположение субстратов в нем.

Треть консервативных аминокислотных остатков β-субъединицы (25 из 76 идентичных позиций) локализовано на поверхности взаимодействия с α-субъединицей. Также 25 идентичных остатков α-субъединицы было обнаружено в области α/β-интерфейса. Ранее было показано, что аминокислоты, расположенные на поверхности контакта двух субъединиц люциферазы, играют важную роль в обеспечении стабильности фермента. Мутации некоторых из них могут изменять конформации достаточно удаленных областей α-субъединицы [28]. Кэмпбэлл с соавторами [21], установили что β-субъединица отвечает за стабилизацию активной конформации α-субъединицы за счет нековалентных взаимодействий. Полученные нами результаты подтверждают данные о функциональной роли β-субъединицы в составе бактериальной люциферазы.

3.2 Две группы люцифераз

3.2.1 Филогения каталитической α-субъединицы люциферазы

Для реконструкции филогении каталитической α-субъединицы бактериальной люциферазы использовали 21 аминокислотную последовательность. Было обнаружено, что они образуют две клады с высокой бутстрэп-поддержкой (Рисунок 3.2, А и Б) [113, 137]. В одну из клад входят α-субъединицы люцифераз *P. leiognathi, P. phosphoreum, A. fischeri* и *A. logei*, для которых ранее была зарегистрирована быстрая кинетика моноферментной биолюминесцентной реакции с додеканалем («быстрые» люциферазы, константа спада составляет 0.64 –1 c^{-1}). В другую кладу вошли α-субъединицы люцифераз бактерий *V. harveyi, V. splendidus* и *Ph. luminescens*, для которых ранее был обнаружен медленный спад биолюминесценции («медленные» люциферазы, константа спада около 0.12 c^{-1}) (Рисунок 3.2) [11, 36, 41].

Доля идентичных аминокислотных остатков внутри клады возросла до 65.01 % для α-субъединиц «медленных» и до 53.99 % для α-субъединиц «быстрых» люцифераз, соответственно (Рисунок 3.2). 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* принадлежат к «медленным» и имеет наибольшее сходство с белками из рода *Photorhabdus* [113].

Было выявлено 22 специфичные позиции выравнивания, которые приводят к точному разбиению последовательностей α-субъединицы люциферазы на две клады соответствующие двум функциональным группам люцифераз (Приложение А, Таблица А.6). Под точным разбиением стоит понимать следующее: в случае клады, в состав которой входят микроорганизмы родов *Vibrio*, *Photorhabdus* и вид *Candidatus photodesmus katoptron*, в позиции 183 находится аланин (αAla183), в то время как в другой кладе у представителей родов *Aliivibrio*, *Photobacterium* и *Shewanella* в этой позиции находится лейцин (αLeu183) (см. Рисунок 3.3), и т.п. Среди найденных позиций, определяющих разделение на группы, были обнаружены аминокислотные остатки одного типа (например, у всех «быстрых» – αArg271, а у всех «медленных» – αLys271), 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 остатки формируют сайты, отвечающие за специфические функции соответствующего подсемейства белков, при этом основная функция остается неизменной. Формирование специфических сайтов, значительно различаю-

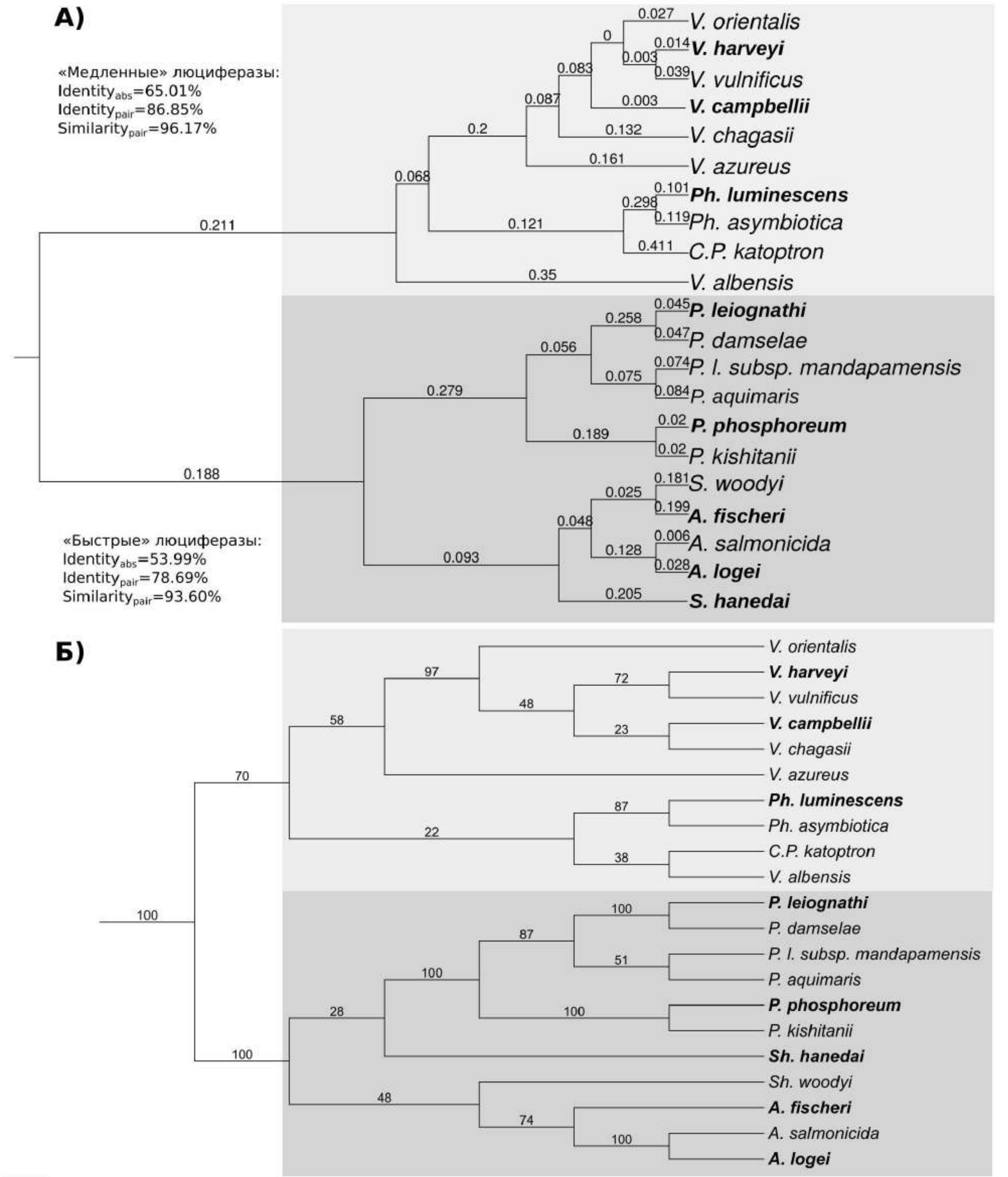

Рисунок 3.2: Филогенетические деревья аминокислотных последовательностей α-субъединицы бактериальной люциферазы. Бактерии в каждой из клад имеют схожую кинетику биолюминесцентной реакции. Названия бактерий, для которых кинетика была определена экспериментально, выделены жирным шрифтом. А) Кладограмма, для каждого узла указано число ожидаемых аминокислотных замен на сайт. Б) Кладограмма, указаны значения бутстрэп-индексов (количество повторностей – 1000) [113]

щихся 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 [121]. Из 22 найденных позиций 9 были отнесены к данному типу эволюционной дивергенции при помощи программы DIVERGE (Таблица 3.1). С учетом выбранного порогового значения среди данных позиций не было обнаружено ложноположительных результатов.

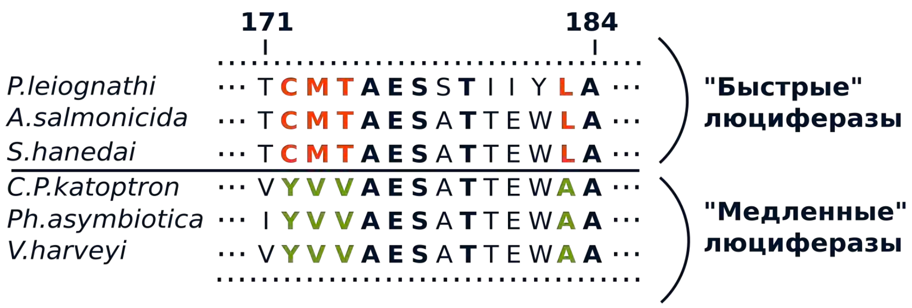

Рисунок 3.3: Фрагмент множественного выравнивания последовательностей α-субъединицы «быстрых» и «медленных» люцифераз. Оранжевым и зеленым шрифтом обозначены остатки, которые являются определяющими для разбиения аминокислотных последовательностей люциферазы

Кроме того, было обнаружено 26 специфичных позиций, которые частично вносят свой вклад в формирование двух клад (Приложение A, Таблица A.6). К ним следует отнести позиции выравнивания, в которых, например, у всех «быстрых» в позиции 26 имеется аргинин (αArg26), у всех «медленных» — аспарагин (αAsn26), а у *Ph. asymbiotica* и *Ph. luminescens* — αLys26. То есть наблюдается тенденция к разбиению, но есть 1–3 «организма-исключения». Анализ множественного выравнивания показал, что для группы последовательностей такие позиции консервативны не менее, чем на 80 %.

Таблица 3.1: Специфичные позиции множественного выравнивания, в которых аминокислотные остатки консервативны как у «быстрых», так и у «медленных» люцифераз, но различаются между группами. Жирным шрифтом обозначены позиции, для которых характерна функциональная дивергенция типа II ($\theta_{II} = 0.079 \pm 0.061$, Z score = 1.29)

	№ позиции выравнивания
Абсолютно консервативны для группы последовательностей	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 80 %	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**

В область активного центра попали 11 из 22 специфичных позиций выравнивания, которые консервативны внутри группы последовательностей и «быстрых», и «медленных» люцифераз, но различаются между группами. Известно, что четыре из них (αAla74, αAla75, αCys106 и αVal173) важны для функционирования «медленной» люциферазы *V. harveyi* [30–32, 35].

В то же время из 26-ти позиций, которые вносят частичный вклад в формирование двух клад, только две ранее были экспериментально охарактеризованы как функционально важные: αSer227 [38] и αLys286 [25]. Последний остаток входит в состав мобильной петли и участвует в связывании и стабилизации интермедиатов реакции. При исследовании точечных мутантов остатка αSer227 было показано, что данный остаток играет важную роль в формировании пространственной структуры фермента.

Анализ кристаллической структуры люциферазы показал, что остатки неточного разбиения равномерно распределены по всей структуре в отличие от аминокислот точного разбиения, которые в основном локализованы в активном центре (Рисунок 3.4). Возможно, аминокислоты точного разбиения необходимы для связывания субстратов обеспечения каталитической функции, в то время как остатки, участвующие в неточном разбиении, играют важную роль в укладке и стабилизации третичной структуры белка в целом.

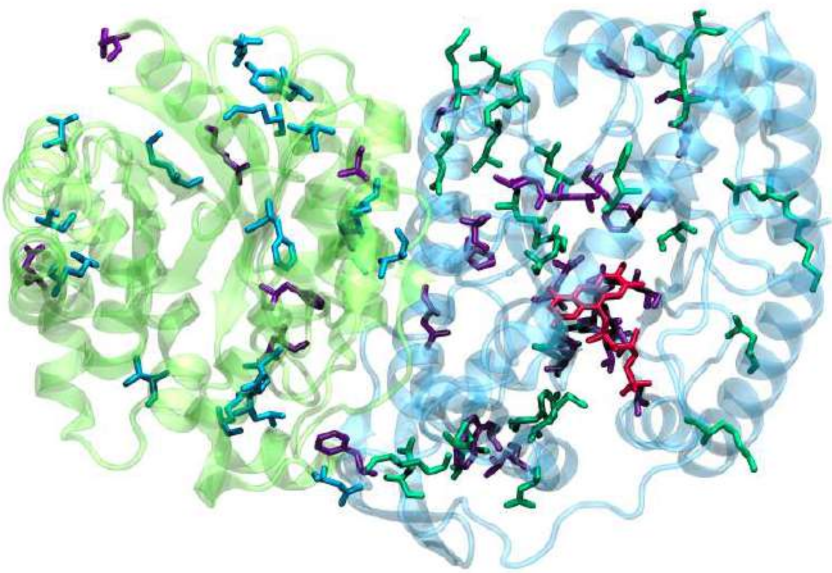

Рисунок 3.4: Структура бактериальной люциферазы в ленточном представлении, на которой обозначены аминокислотные остатки, участвующие в разбиении белков на две группы. α -субъединица обозначена голубым цветом, β-субъединица — зеленым, аминокислотные остатки точного разбиения — фиолетовым, неточного разбиения — зеленым для α-субъединицы и голубым для β-субъединицы, соответственно, молекула FMN в активном центре представлена малиновым цветом

К настоящему времени лишь две группы ученых [12, 36] исследовали вопрос о структурных различиях «быстрых», и «медленных» люцифераз. Валкова с соавторами [12] в эксперименте по изменению кинетики «медленной» бактериальной люциферазы из бактерий *Ph. luminescens* заменили 67 аминокислотных остатков α-субъединицы (со 166 по 233) на соответствующую последовательность «быстрой» люциферазы *P. phosphoreum*. Полученный химерный белок обладал схожими с «быстрой» люциферазой характеристиками: величина константы спада светоизлучения, термостабильность, зависимость константы спада и относительной интенсивности биолюминесценции от концентрации деканаля. Однако, активность химерного белка *in vivo* составила 0.03 % от активности дикого типа люциферазы *Ph. luminescens*. Сравнения значений максимума интенсивности биолюминесценции и квантового выхода для люцифераз дикого типа *Ph. luminescens* и *P. phosphoreum* и химерного белка в статье представлено не было. Скорость распада 4а-гидропероксифлавина составила 0.82 $с^{-1}$, в то время как для «быстрой» люциферазы *P. phosphoreum* она равна 0.64 $с^{-1}$.

Нами было обнаружено, что замененная часть α-субъединицы люциферазы *P. phosphoreum* (67 аминокислотных остатков) состоит из 24 консервативных остатков, 6 остатков точного и 3 остатков неточного разбиения [113]. Оставшиеся 34 аминокислоты не совпадают с теми, что входят в структуру «медленной» люциферазы *Ph. luminescens*. Такое различие могло вызвать значительное изменение в пространственной структуре белка и активного центра в частности, что привело к распаду интермедиатов по темновому пути. Это также объясняет низкую активность химерного белка *in vivo*.

Другой группой ученых [36] было установлено, что мутация αGlu175 также приводит к изменению кинетики люминесценции. Однако, нами было показано, что данная аминокислота является консервативной и встречается у всех люцифераз, поэтому она не может отвечать за кинетические свойства ферментов. По-видимому, мутация в данной позиции приводит к изменению структуры активного центра и ухудшению стабилизации интермедиатов реакции, что увеличивает вероятность их распада по темнового пути. Мутация в указанной позиции также значительно снижает активность фермента и интенсивность светоизлучения, поэтому следует отметить, что «быстрые» люциферазы не являются более тусклыми. Интенсивность биолюминесценции некоторых из них даже выше, чем у «медленных» [138].

3.2.2 Филогения β-субъединицы

В результате филогенетического анализа аминокислотных последовательностей β-субъединицы люциферазы было также обнаружено разбиение на две клады, согласующееся с представлением о существовании «быстрых» и «медленных» люцифераз (Рисунок 3.5). Архитектура дерева, включая положение корня, узлов и листьев, полностью совпала с филогенетическим деревом α-субъединиц (Рисунок 3.2). Было получено сравнительно высокое значение коэффициента корреляции между матрицами расстояния филогенетических деревьев α- и β-субъединиц, что указывает на их совместную эволюцию (табл. 3.2).

Таблица 3.2: 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

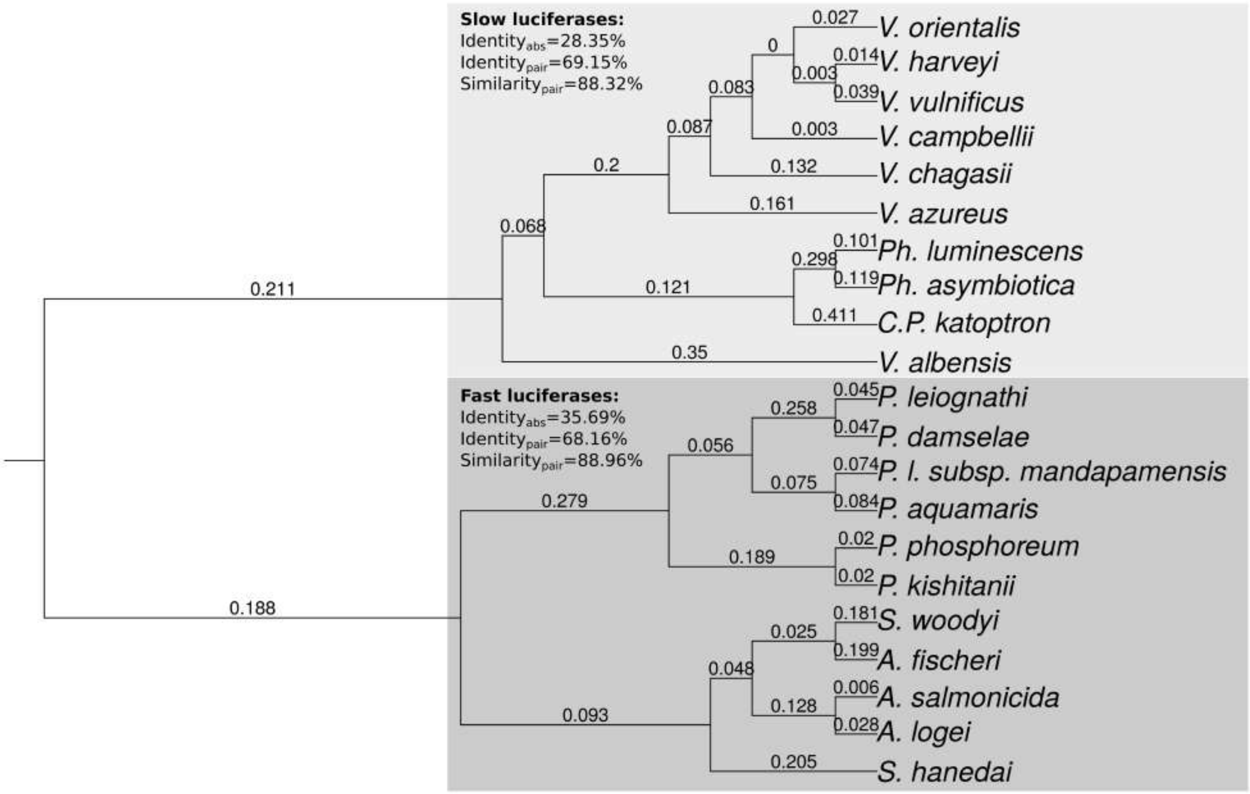

Рисунок 3.5: Филогенетическое дерево β-субъединиц бактериальных люцифераз. Бактерии в каждой из клад имеют схожую кинетику биолюминесцентной реакции [113]

Существует гипотеза о том, что β-субъединица возникла в результате дупликации гена, кодирующего α-субъединицу [19]. Однако, на основании полученных нами данных нельзя с точностью сказать возникла ли она в результате дупликации «быстрой» или «медленной» субъединицы. Возможно, разделение на группы произошло позже данного эволюционного события, что требует дополнительного исследования.

На основании множественного выравнивания 21 последовательности β-субъединицы было обнаружено лишь 7 специфичных позиций, однозначно определяющих разбиение на клады, и 19, которые частично вносят вклад в формирование двух групп белков (Приложение A, Таблица A.7). К настоящему времени экспериментально не было выявлено функционально важных аминокислотных остатков β-субъединицы, за исключением βTyr151 в структуре *V. harveyi* [21]. За счет взаимодействия βTyr151 и αPhe272 происходит стабилизация активной конформации α-субъединицы. αPhe272 относится к аминокислотам точного разбиения (у всех «быстрых» αTyr272), а βTyr151 не является консервативным и не относится к остаткам точного или же неточного разбиения. Однако, в данной позиции β-субъединицы может встречаться только тирозин или фенилаланин, как у «быстрых», так и у «медленных» люцифераз, что указывает на схожие механизмы стабилизации активной конформации α-субъединицы за счет стэкинг-взаимодействий между аминокислотным остатком мобильной петли и (αPhe/Tyr272) и ароматическим остатком β-субъединицы (βPhe/Tyr151).

3.3 Структурные различия активных центров «быстрых» и «медленных» люцифераз

В связи с тем, что значительная часть аминокислотных остатков точного разбиения формируют активный центр люциферазы, нами был проведен сравнительный анализ третичной структуры α-субъединицы «быстрой» или «медленной» люциферазы [113]. Для этого была реконструирована структура люциферазы *P. leiognathi*, как представителя «быстрых» люцифераз. Далее было выполнено структурное выравнивание полученной «быстрой» люциферазы и «медленной» люциферазы *V. harveyi*, для которой кристаллическая структура была расшифрована вместе с FMN.

Не смотря на то, что третичная структура в виде TIM-бочонка характерна для всех бактериальных люцифераз, аминокислотный состав активного центра имеет ряд особенностей, в том числе за счет указанных выше специфичных позиций выравнивания, определяющих функциональные особенности данного фермента. Таким образом, было найдено два различия в структуре активного центра «быстрых» или «медленных» люцифераз, обусловленных наличием четырех аминокислотных остатков, которые вносят свой вклад в точное разбиение люцифераз на две группы. Именно их положение относительно FMN было исследовано более подробно.

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 3.6, А). В обоих случаях данные остатки формируют участок активного центра важный для связывания субстрата за счет гидрофобных и стэкинг-взаимодействий. Замена гидрофобных аминокислот на лейцин или изолейцин, которые также гидрофобны, часто встречается в гомологичных белках, так как в целом не происходит изменения полярности активного центра. В связи с этим, данное различие активных центров не было выявлено при анализе функциональной дивергенции (Таблица 3.1). Однако следует отметить, что такое смещение может определять специфичность к альдегидному субстрату

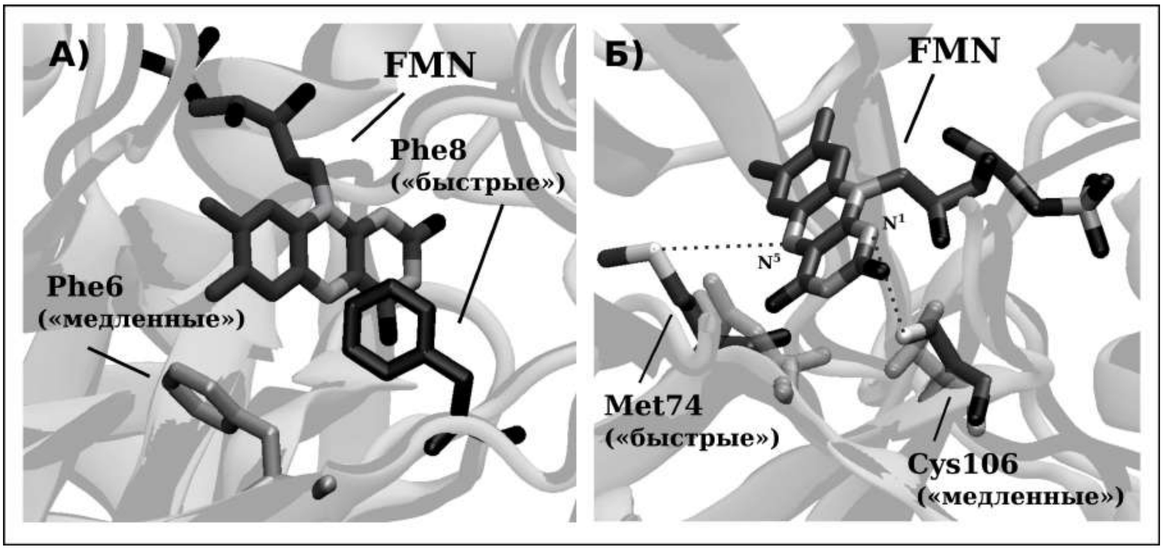

Рисунок 3.6: Структурное выравнивание активных центров быстрых (*P. leiognathi*) и медленных (*V. harveyi*) люцифераз. А) Сдвиг остатка фенилаланина. Б) Альтернативное взаимодействие серосодержащих аминокислотных остатков с флавином [113]

бактериальных люцифераз, так как αPhe6 и αSer227 формируют полость для связывания молекулы альдегида подобно структурным аналогам бактериальной люциферазы (Рисунок 1.6).

Во-вторых, было обнаружено важное структурное различие в положении серосодержащих аминокислот, способных принимать участие в стабилизации производных флавина: αAla74 у «медленных» и αMet74 у «быстрых», αCys106 у «медленных» и αVal106 у «быстрых» (Рисунок 3.6, Б). Биолюминесцентная реакция включает в себя ряд химических превращений интермедиатов в активном центре фермента. На одном из первоначальных этапов происходит связывание молекулы O_2 и депротонирование N^1 в составе молекулы флавина с образованием 4а-гидроперокси-флавина [5]. Абу-Соуд с соавторами [32] показали, что именно αCys106 принимает участие на данном этапе реакции, так как его замена на αVal106 приводит к формированию нестабильного комплекса люциферазы с 4а-гидроперокси-флавином и снижает активность фермента. Однако, двойная мутация αCys106Val и αAla75Gly позволяет получить фермент с достаточно высокой активностью в результате образования стабильного комплекса интермедиата 4а-гидроперокси-флавина с люциферазой [31]. Эти данные хорошо согласуются с нашими наблюдениями, в частности, αCys106 и αAla75 принадлежат к критическим аминокислотам «медленных» люцифераз, а αVal106 и αGly75 — «быстрых».

Роль остатков цистеина в структуре белка, зачастую, определяется его локализацией в клетке. Во внеклеточных белках цистеины очень часто выполняют структурную функцию за счет образования дисульфидных мостиков [139]. Во внутриклеточных белках они могут участвовать в формировании структуры, но также входить в состав сайта связывания или активного центра. Так, остатки цистеина часто встречаются в активном центре различных металлсодержащих белков, образуя связь с такими металлами, как цинк (например, цинковый палец [140]). Кроме того, цистеин может выступать в качестве акцептора протонов в активном центре фермента (например, каспазы или папаина [141]). В результате анализа аминокислотного состава активного центра «медленных» люцифераз нами не было найдено остатков цистеина, расположенных аналогично αCys106 в активном центре «быстрых» люцифераз. Учитывая экспериментальные доказательства функциональной значимости αCys106 для катализа, можно предположить, что его отсутствие у «быстрых» люцифераз связано с альтернативным механизмом связывания субстратов и стабилизации интермедиатов реакции.

В структуре «быстрых» люцифераз был найден серосодержащий остаток αMet74, который, по-видимому, может выполнять те же функции, что и αCys106, а именно стабилизация интермедиатов реакции. При этом более вероятно, что αMet74 будет взаимодействовать с N^5 атомом, в то время как αCys106 с N^1 (Рисунок 3.6, Б). Таким образом, αMet74, αGly75 и αVal106 формируют важный участок активного центра «быстрых» люцифераз, а αAla74, αAla75 и αCys106 выполняют те же функции у «медленных» люцифераз. Формирование двух различных активных центров в ходе эволюции люцифераз играет важную роль в филогенезе биолюминесцентных бактерий и их метаболизме.

3.4 Заключение к главе

Филогенетический анализ известных к настоящему моменту последовательностей бактериальной люциферазы выявил, что высоко консервативные белки этого семейства разделяются на две, ещё более консервативные, группы. При этом значительная часть аминокислотных остатков, определяющих разделение, лежит в активном центре люциферазы. Сопоставление видового состава двух найденных групп с известными экспериментальными данными о функционировании люцифераз из разных видов бактерий позволило заключить, что наблюдаемые группы – это так называемые «медленные» и «быстрые» люциферазы, различающиеся специфичностью к субстратам и скоростью катализа. Таким образом, в работе впервые было показано, что разделение люцифераз по кинетическим признакам закреплено эволюционно.

Молекулярное моделирование люциферазы «быстрого» типа и структурное выравнивание с «медленной» люциферазой, чья кристаллическая структура была расшифрована ранее, позволило определить ключевые различия активных центров, обеспечивающих разные скорости ферментативной реакции. Было установлено, что функционально важные аминокислотные остатки активного центра, известные по экспериментальным исследованиям, такие как серосодержащие и ароматические, располагаются в разных областях активного центра люцифераз двух групп. Было смоделировано взаимодействие этих ключевых аминокислот с флавином и показано два возможных альтернативных пути связывания субстрата и стабилизации интермедиатов, эволюционно закреплённых в двух группах люцифераз.

ГЛАВА 4

Филогенетический анализ окисдоредуктаз

В данной главе рассмотрены результаты филогенетического анализа NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз, способных работать совместно с люциферазой, поставляя $FMNH^-$ в биолюминесцентную реакцию. Также представлены результаты моделирования структур некоторых оксидоредуктаз и рассмотрены особенности строения активных центров.

4.1 Реконструкция филогенетического дерева LuxG и Fre окисдоредуктаз

LuxG оксидоредуктаза закодирована в том же опероне, что и люцифераза, но на данный момент практически не изучена. Прежде чем данный белок был охарактеризован экспериментально [43], его функция была предсказана на основе гомологии с оксидоредуктазой Fre *E. coli* [54]. Сходство с Fre по первичной последовательности позволяет проводить анализ пространственной укладки белка LuxG на основании кристаллической структуры Fre *E. coli* [59]. Последняя имеет в составе домены, найденные у семейства ферродоксин:$NADP^+$ редуктаз (FNR), и, несмотря на низкое сходство первичных последовательностей, имеет идентичную структуру функциональных сайтов, а также идентичный способ укладки третичной структуры (греческий ключ).

LuxG и Fre оксидоредуктазы были обнаружены достаточно давно, когда было открыто лишь несколько видов светящихся бактерий. На сегодняшний день расшифровано достаточное количество аминокислотных последовательностей данных белков, необходимое для определения их структурных особенностей, которые сформировались в ходе различных эволюционных процессов. Так как LuxG синтезируется совместно с люциферазой, детальное изучение её функциональных характеристик актуально для разработки биотестов и биосенсоров, обладающих б**о**льшей чувствительностью по сравнению с гибридными биолюминесцентными тест-системами, состоящими из бактериальной люциферазы и оксидоредуктаз различных типов.

В результате поиска гомологов оксидоредуктаз LuxG *V. harveyi* и LuxG *P. leiognathi* при помощи сервиса BLAST был получен набор аминокислотных последовательностей, в который вошли 33 последовательности LuxG, 31 последовательность Fre оксидоредуктаз светящихся бактерий и 367 аминокислотных последовательностей Fre нелюминесцентных бактерий (Приложение A, Таблица A.1). Несмотря на то, что поиск гомологов проводился для двух LuxG оксидоредуктаз, было найдено большое количество последовательностей Fre. Преобладание оксидоредуктаз типа Fre в исследуемом наборе данных не должно повлиять на топологию дерева при реконструкции филогении, так как значение e-value для анализируемых последовательностей ниже установленного порогового значения. Таким образом, на основе множественного выравнивания 431 аминокислотной последовательности было реконструировано филогенетическое дерево. Оно состоит из трех клад: Клада {1}, в которую вошли аминокислотные последовательности оксидоредуктазы LuxG; Клада {2}, состоящая из оксидоредуктаз Fre светящихся бактерий и нескольких Fre нелюминесцентных бактерий; Клада {3}, сформированная последовательностями оксидоредуктазы Fre, среди которых были обнаружены лишь Fre оксидоредуктазы из люминесцентных бактерий рода *Photorhabdus* (Рисунок 4.1, Приложение A, Рисунок A.1). Согласно методу Байеса полученные клады имеют высокую поддержку, и лишь некоторые клады с высокой поддержкой были получены при помощи бутстрэп анализа.

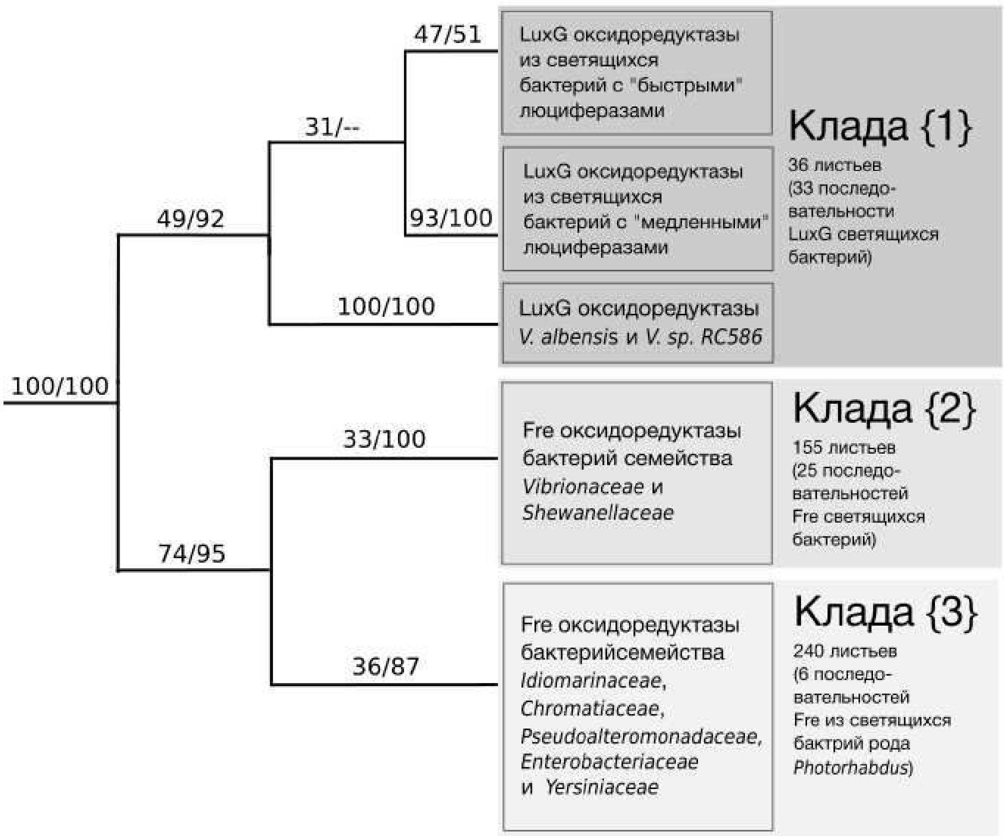

Рисунок 4.1: Схематическое представление кладограммы Fre и LuxG оксидоредуктаз, построенной методом ML с использованием модели LG+I+G, указаны значение бутстрэп-индексов/апостериорной вероятности в процентах

LuxG оксидоредуктазы формируют монофилетическую Кладу {1}, в которую не попали последовательности, аннотированные в базе данных NCBI, как оксидоредуктазы типа Fre. Некоторые из последовательностей в составе данной клады были идентифицированы, как NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, но анализ расположенных рядом генов позволил отнести эти оксидоредуктазы к типу LuxG. В данную кладу также попали NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы нелюминесцентных видов: *Photobacterium piscicola*, *Vibrio lentus* и *Vibrio sp. BCB494*. Последний вид является темновым мутантом, у которого произошла делеция гена *luxC* [142]. В некоторых штаммах бактерий вида *P. piscicola* были обнаружены гены *lux*-оперона [143], поэтому найденная последовательность также может быть идентифицирована, как LuxG оксидоредуктаза. В свою очередь бактерии вида *V. lentus* фенотипически схожи со светящимися бактериями вида *V. splendidus* [144], возможно детальное изучение генома бактерий *V. lentus* позволит установить наличие некоторых генов *lux*-оперона.

Клада {1} содержит две группы последовательностей LuxG белков, в частности, (1) группа, в которую входят белки из бактерий рода *Aliivibrio*, *Photobacterium* и *Shewanella*, и (2) группа, состоящая из LuxG оксидоредуктаз бактерий рода *Vibrio* и малоизученных бактерий *Candidatus Photodesmus katoptron*. Имеется также третья ветвь, которая объединяет LuxG оксидоредуктазы из патогенных бакетрий рода *V. albensis* (также известные, как *V.cholerae*) и последовательности оксидоредуктаз близкородственного вида *Vibrio sp.* RC586 [145]. Топология клады {1} близка с таковой для последовательностей α- и β-субъединицы [113] (Рисунок 4.2). Распределение основного числа последовательностей LuxG оксидоредуктазы внутри клады {1} соответствует ранее описанному разбиению аминокислотных последовательностей люциферазы на две группы: «быстрые» и «медленные». Полученный результат свидетельствует в пользу коэволюции *luxAB* и *luxG* генов, при этом для Fre оксидоредуктаз такого разбиения обнаружено не было.

Среди последовательностей Fre оксидоредуктаз гомологов LuxG были найдены белки как светящихся, так и нелюминесцентных бактерий, в основном из семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae*, а также несколько белков представителей семейств *Shewanellaceae*, *Idiomarinaceae*, *Chromatiaciae*, *Pseudoalteromonadaceae* и *Yersiniaceae* (Приложение A, Рисунок A.1). В состав клады {2} вошли аминокислотные последовательности Fre светящихся видов, а также ряда нелюминесцентных бактерий. Клада {3} состоит преимущественно из последовательностей Fre, но также согласно аннотации содержит последовательности аквакобаламин редукатз, 2-полипренил-фенол гидроксилаза-подобных оксидоредуктаз и CDP-6-диокси-дельта-3,4-глюкозин редуктаз. Вышеперечисленные ферменты также обладают оксидоредуктазной активностью и могут быть источником восстановленных флавинов в клетке. Кладу {3} также формируют Fre оксидоредуктазы биолюминесцентных бактерий рода *Photorhabdus*, в *lux*–опероне которых отсутствует ген, кодирующий LuxG оксидоредуктазу. Считается, что *lux*–оперон светящихся видов данных наземных бактерий был приобретен в

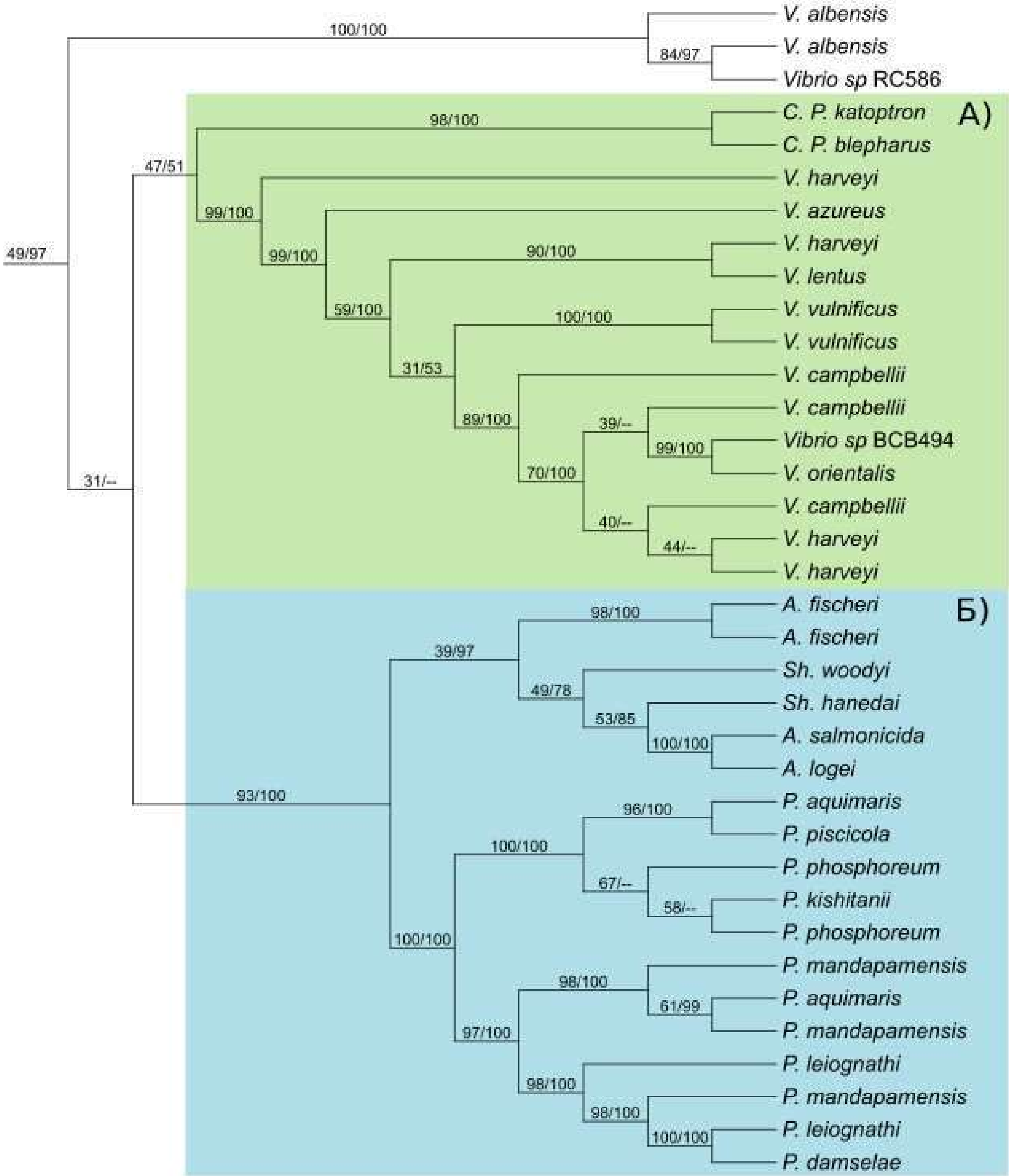

Рисунок 4.2: Клада {1}, состоящая из LuxG оксидоредуктаз светящихся бактерий. Данная клада входит в общее филогенетическое дерево оксидоредуктаз (Рисунок 4.1). В рамках клады можно выделить две основные группы последовательностей: А) группа LuxG оксидоредуктаз светящихся бактерий, кинетика моноферментной биолюминесцентной реакции которых была описана, как «медленная», Б) группа LuxG оксидоредуктаз биолюминесцентных бактерий, для которых наблюдается «быстрый» спад светоизлучения. Для статистической оценки топологии дерева использовался бутстрэп анализ и байесовский анализ. В обозначениях первое число указывает процент деревьев, полученных при помощи бутстрэп анализа (1000 повторностей), в которых были найдены соответствующие ветви. Второе число для каждой ветви указывает значение апостериорной вероятности, рассчитанное при помощи метода Байеса.

результате горизонтального переноса генов, поэтому Fre окисдоредуктазы могут выступать одним из основных источников $FMNH^{-}$ для их биолюминесцентной реакции [146].

Согласно полученному филогенетическому дереву LuxG и Fre окисдоредуктазы, возможно, произошли в результате дупликации гена, кодирующего их общего предка. Таким образом, паралогичные гены, возникшие в результате дупликации, значительно дивергировали ввиду различного давления отбора LuxG и Fre оксидоредуктазы, выполняющие специфические функции. Не стоит также отрицать возможное наличие селективно нейтральных эволюционных процессов, которые повлияли на формирование структурно-функциональных особенностей данных белков.

4.2 Консервативные аминокислотные остатки LuxG и Fre окисдоредуктаз

Мы провели поиск консервативных аминокислотных остатков Fre и LuxG окисдоредуктаз. Для построения выравнивания использовали 34 аминокислотные последовательности: 20 оксидоредуктаз Fre и 14 оксидоредуктаз LuxG. Общая длина выравнивания составила 242 аминокислотных остатка, попарная идентичность – 48.56%, попарное сходство – 78.51%. Также было выявлено 47 позиций, в которых аминокислотные остатки абсолютно консервативны или консервативны не менее, чем на 94 – 97%, при этом большая часть из них формирует сайты связывания молекул-лигандов (Рисунок 4.3).

Таким образом были найдены следующие консервативные аминокислотные остатки, соответствующие указанным далее позициям последовательности оксидоредуктазы Fre *E. coli* (Рисунок 4.4):

- Идентичные позиции (28 аминокислотных остатков): Ala32, Gly33, Gln34, Tyr35, Phe48, Ser49, Ala51, Pro54, Glu61, Leu62, His63, Gly93, Ala95, Ala109, Gly113, Ser115, Tyr116, Ser119, Tyr136, Gly138, Tyr146, Leu192, Asp196, Ile197, Typ198, Gly201, Met205, Asp227.
- Консервативные позиции не менее, чем на 97 % (10 аминокислотных остатков): Cys5, Pro24, Phe30, Gly65, Gly111, Thr112, Ile133, Trp137, Glu168, Asp188.
- Консервативные позиции не менее, чем на 94 % (9 аминокислотных остатков): Trp96, Gly110, Leu145, Pro165, Val166, Gly179, Val181, Ala219, Ala228.

4.3 Функциональные сайты LuxG и Fre окисдоредуктаз

В результате анализа множественного выравнивания 34 последовательностей LuxG и Fre было обнаружено 22 позиции, в которых расположены консервативные аминокислотные

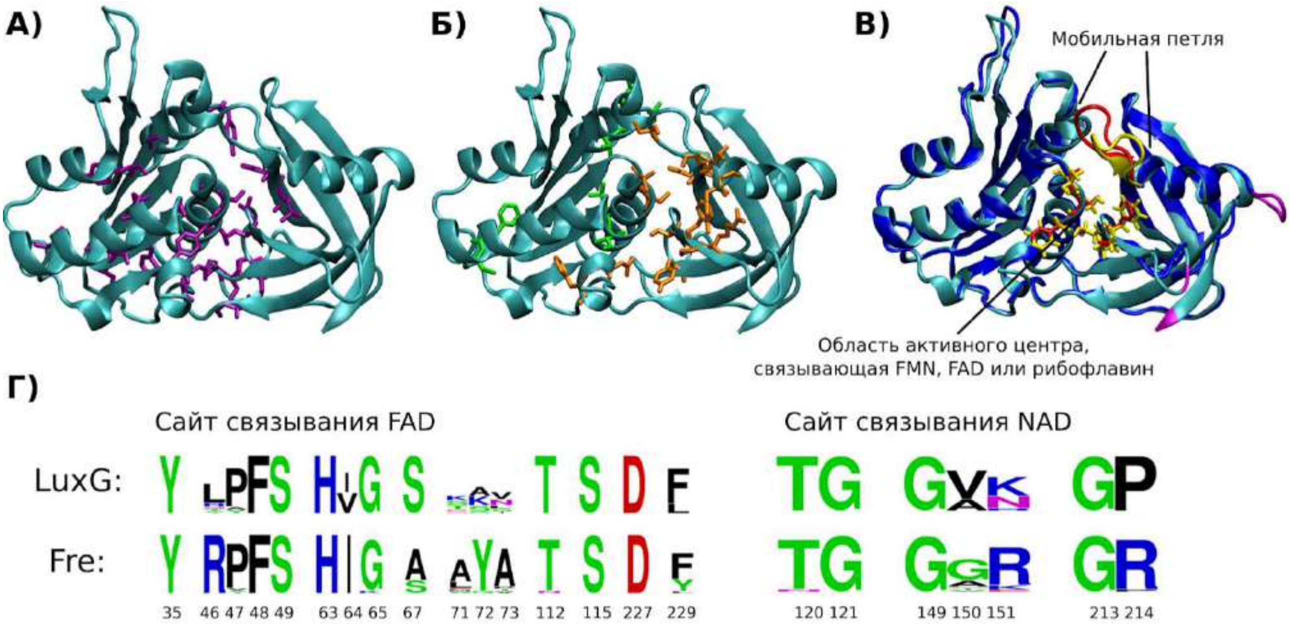

Рисунок 4.3: Функционально важные участки оксидоредуктаз Fre и LuxG: А) Консервативные аминокислотные остатки для Fre и LuxG обозначены розовым цветом на ленточной модели структуры Fre *E. coli*; Б) Сайт связывания FAD (оранжевые аминокислотные остатки) и NAD (зеленые аминокислотные остатки) в структуре Fre *E. coli*, найденные при помощи сервера NCBI Conserved domains; В) Структурное выравнивание Fre из *E. coli* (голубой) и модели LuxG *V. harveyi* (синий), где известные важные аминокислотные остатки Fre обозначены красным, и те же остатки в структуре LuxG — желтым цветом; Г) Аминокислотный состав сайтов связывания FAD и NAD оксидоредуктаз представлен в виде логотипов, которые построены по набору выровненных последовательностей. Величина буквы обозначает относительную частоту встречаемости остатка в каждой позиции последовательности, номера остатков указаны относительно структуры Fre *E. coli*

остатки, имеющиеся только в последовательностях оксидоредуктаз Fre (Приложение А, Таблица А.8). В свою очередь у всех LuxG оксидоредуктаз в соответствующих позициях выравнивания были найдены либо также консервативные аминокислотные остатки, либо вариабельные остатки. Кроме того, некоторые из остатков LuxG оказались схожими по физико-химическим свойствам с консервативными остатками Fre. В связи с этим был проведен дополнительный анализ обнаруженных позиций выравнивания на соответствие одному из двух типов функциональной дивергенции [121]. Для этого было реконструировано филогенетическое дерево, в котором были выделены кластеры последовательностей: (i) кластер LuxG и кластер Fre, (ii) LuxG, Fre светящихся бактерий и Fre *E. coli* и бактерий рода *Photorhabdus* (Рисунок 4.5).

Таким образом, три из 22-х позиций выравнивания соответствуют I типу функциональной дивергенции (Lys45, Arg46 and Phe 203) и две позиции – типу II (Ser67 and Arg 202) (Таблица 4.1). Значение коэффицента θ_{II} указывает на то, что для исследуемых групп белков не характерна функциональная дивергенция типа II. Исключение составляют Кластер 1 (после-

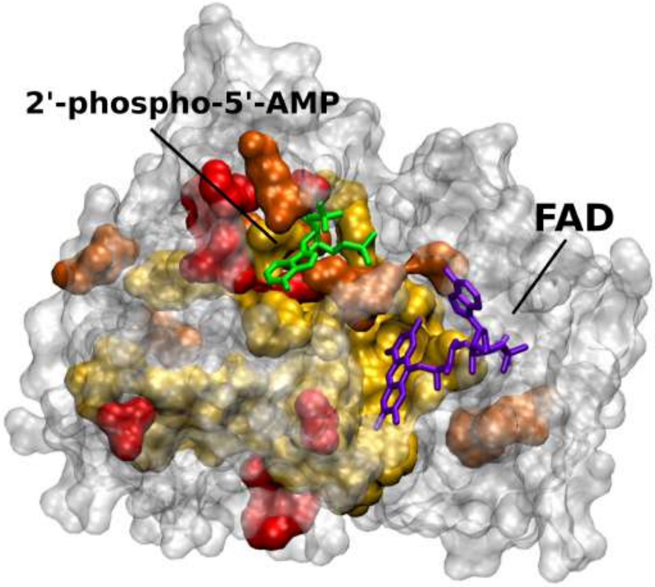

Рисунок 4.4: Расположение консервативных аминокислотных остатков на структуре оксидоредуктазы Fre *E. coli*. Идентичные остатки, найденные при выравнивании 14 LuxG и 19 Fre оксидоредуктаз светящихся бактерий и Fre оксидоредуктазы *E. coli* представлены в виде поверхности золотого цвета, консервативные не менее чем на 97 % представлены поверхностью оранжевого цвета, не менее чем на 94 % – красного цвета, остальная часть структуры изображена в виде прозрачной серой поверхности. Расположение лигандов, FAD (фиолетовый цвет) и 2'-фосфо-5'-АМФ (зеленый цвет) в флавин- и NAD(P)-связывающих сайтах, было установлено при помощи структурного выравнивания *E. coli* Fre и оксидоредуктазы *Spinacia oleracea* (PDB ID: 1FNC), обе молекулы представлены при помощи "палочковой" модели

довательности LuxG) и Кластер 2.1 (последовательности окисдоредуктаз Fre из светящихся организмов), для которых с учетом стандартного отклонения коэффициент θ_{II} может принимать значение $0 < \theta_{II} \leq 1$.

Девять из 22 специфичных позиций формируют сайты связывания субстратов, включая остатки перечисленные выше. Стоит отметить, что четыре специфичные позиции, консервативные у оксидоредуктаз LuxG соответствуют типу I функциональной дивергенции (Thr134, Leu151, Leu186 и His195) (Таблица 4.1), но ни одна из них не расположена в активном центре, либо в прилегающих областях. Специфичные позиции, которые были обнаружены в результате проделанного анализа, вероятно, играют важную роль в разделении Fre и LuxG на два подсемейства и обеспечивают функциональные различия данных белков.

Для анализа функциональных различий, которые могут быть обусловлены найденными специфичными позициями в первичных последовательностях LuxG и Fre, были подготовлены пространственные модели ферментов. Для этого в структуре Fre *E. coli* были реконструированы нерасшифрованные участки, а структура LuxG *V. harveyi* была создана при помощи моделирования по гомологии. Для оптимизации полученных моделей использовали метод молекулярной динамики (Приложение А, Рисунок А.3). Качество полученных моделей оценива-

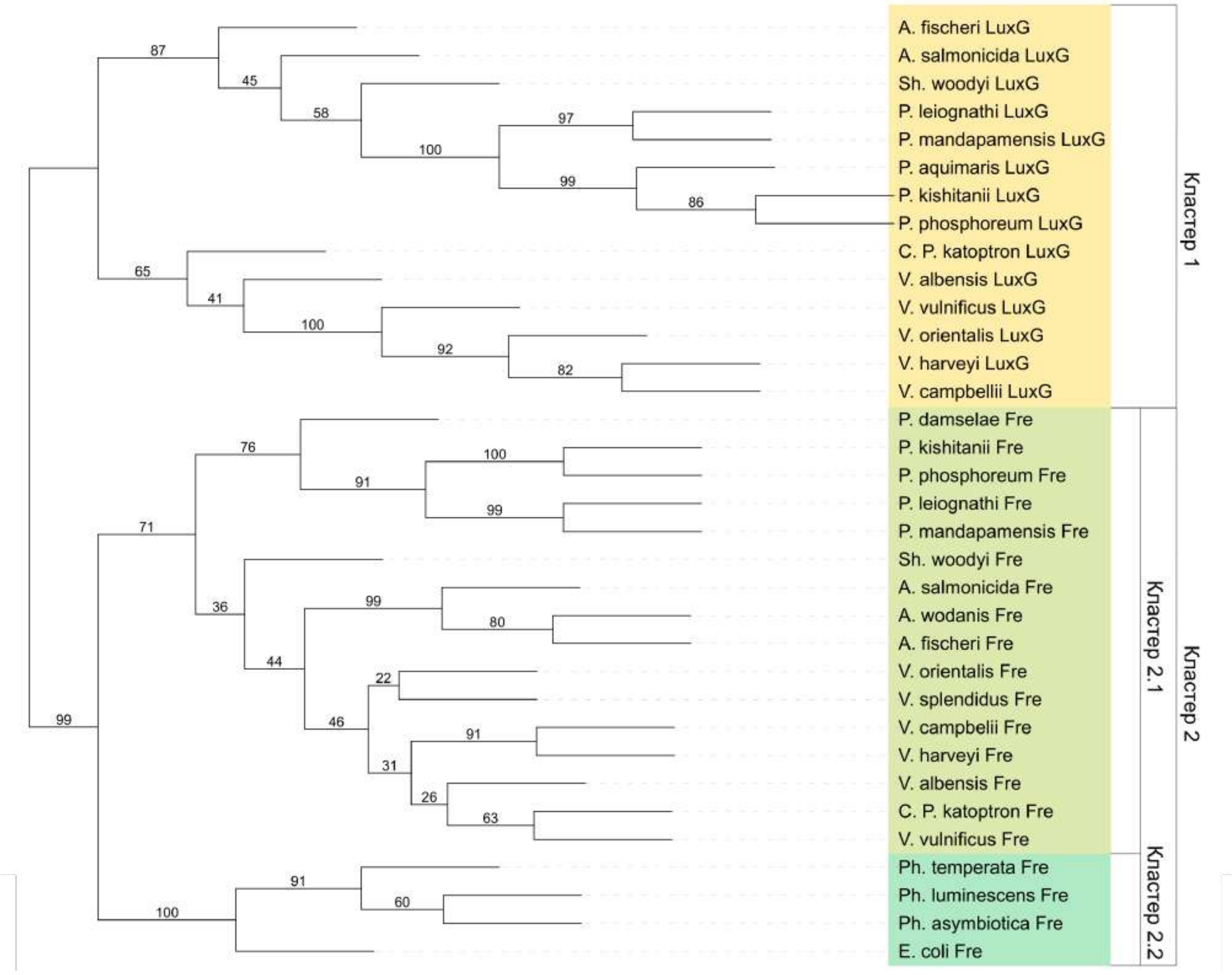

Рисунок 4.5: Кладограмма, использованная для анализа специфичных позиций LuxG и Fre оксидоредуктаз при помощи программы DIVERGE 3.0 [121], для каждой ветви указано значение бутстрэп-индекса в процентах (1000 повторений)

ли при помощи программы PROCHECK [129]. Было установлено, что до оптимизации 87.3 % остатков в структуре LuxG находились в наиболее выгодной конфигурации, после симуляции количество таких остатков составило – 90.7 %, что говорит о хорошем качестве полученной модели (Приложение A, Рисунок A.4). Для полученных моделей было сделано структурное выравнивание в программе VMD при помощи плагина MultiSeq. Координаты молекулы FAD (сайт посадки флавина) и 2’-фосфо-5’-AMP (сайт связывания NAD(P)H) были также определены при помощи выравнивания структуры Fre *E. coli* и оксидоредуктазы *Spinacia oleracea oxidoreductase* (PDB ID: 1FNC).

Дивергенцией типа I характеризуются специфичные позиции белков одного семейства, значительно различающиеся по скорости эволюции. Так, в одном подсемействе определенный остаток является консервативным, в то время как для другого подсемейства характерна значительная вариабельность в данной позиции. Arg46 относится к данному типу ди-

Таблица 4.1: Значения коэффициентов функциональной дивергенции типа I и типа II, полученные при анализе кластеров LuxG и Fre оксидоредуктаз (Рисунок 4.5). Позиции выравнивания, соответствующие одному из типов функциональной дивергенции, определялись на основании рассчитанного значения апостериорной вероятности ($P \geq 0.75$). Доля ложных специфичных позиций (FDR) для кластеров 1 и 2.1 составила 14 %, для кластеров 1 и 2.2 – 3 %. Используемая нумерация аминокислотных остатков соответствует позициям в последовательности Fre оксидоредуктазы *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	$\theta_I = 0.147 \pm 0.059$ (2.82) $\theta_{II} = -0.274 \pm 0.225$ (1.09)	45, 46, 134, 186, 195, 203, 232 Нет
Кластер 1 *vs* Кластер 2.1	$\theta_I = 0.217 \pm 0.066$ (3.84) $\theta_{II} = -0.196 \pm 0.207$ (0.95)	46, 134, 151, 186, 195, 203, 232 67, 202
Кластер 1 *vs* Кластер 2.2	$\theta_I = 0.279 \pm 0.095$ (3.25) $\theta_{II} = -0.241 \pm 0.163$ (1.48)	195 Нет

вергенции (Таблица 4.1). Данный остаток входит в состав функционального участка Arg46-Pro47-Phe48-Ser49 (RPFS), который является консервативным у всех Fre оксидоредуктаз (Рисунок 4.6, А). В данной позиции выравнивания у всех LuxG находится неконсервативный остаток (Рисунок 4.7)). 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, экспериментально было показано, что в то время как Fre обладает большей аффинностью к FAD, чем к FMN (константы диссоциации различаются на три порядка) [65], LuxG может катализировать восстановление FMN, FAD и рибофлавина с одинаковой эффективностью [43]. Вероятно, обсуждаемый консервативный участок определяет специфику связывания фосфатной или пирофосфатной группы флавинов LuxG и Fre оксидоредуктаз.

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 4.6, Б). Данные позиции можно отнести к типу I функциональной дивергенции, однако полученные для них значения апостериорной вероятности достаточно низкие P = 0,39 и P = 0,24, соответственно. Известно, что у белков семейства ферродоксин-NADP(+) оксидоредуктаз данная мобильная петля участвует в связывании функциональной группы аденозиндифосфата в составе FAD, который является кофактором

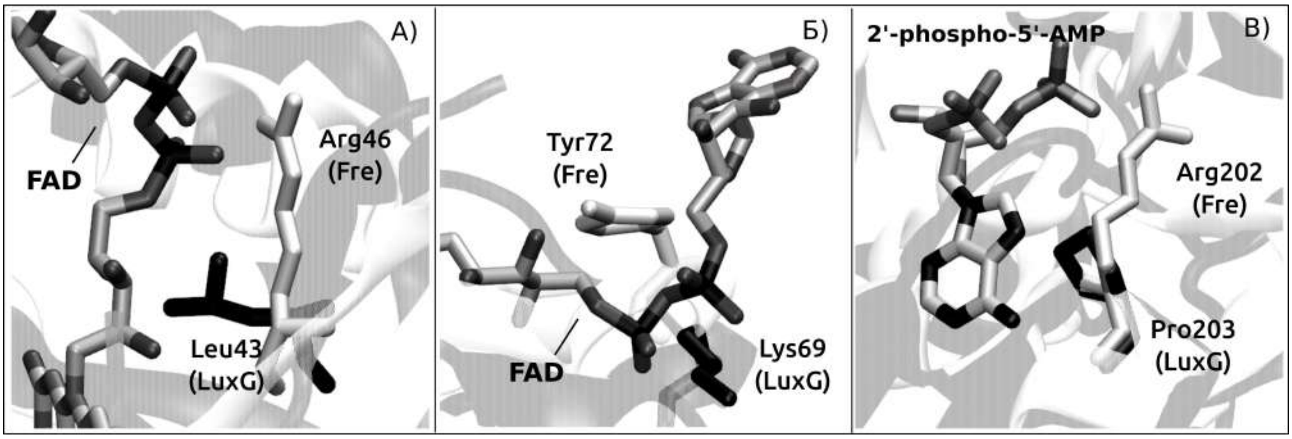

Рисунок 4.6: Структурное выравнивание активных центров Fre *E. coli* и LuxG *V. harveyi*. Специфичные позиции Fre (серый цвет) и LuxG (черный цвет), найденные в соответствующей позиции выравнивания, представлены при помощи «палочковой» модели. На рисунках (А) и (Б) изображены различия в связывании флавина; на рисунке (В) показаны различия в связывании NAD(P)H

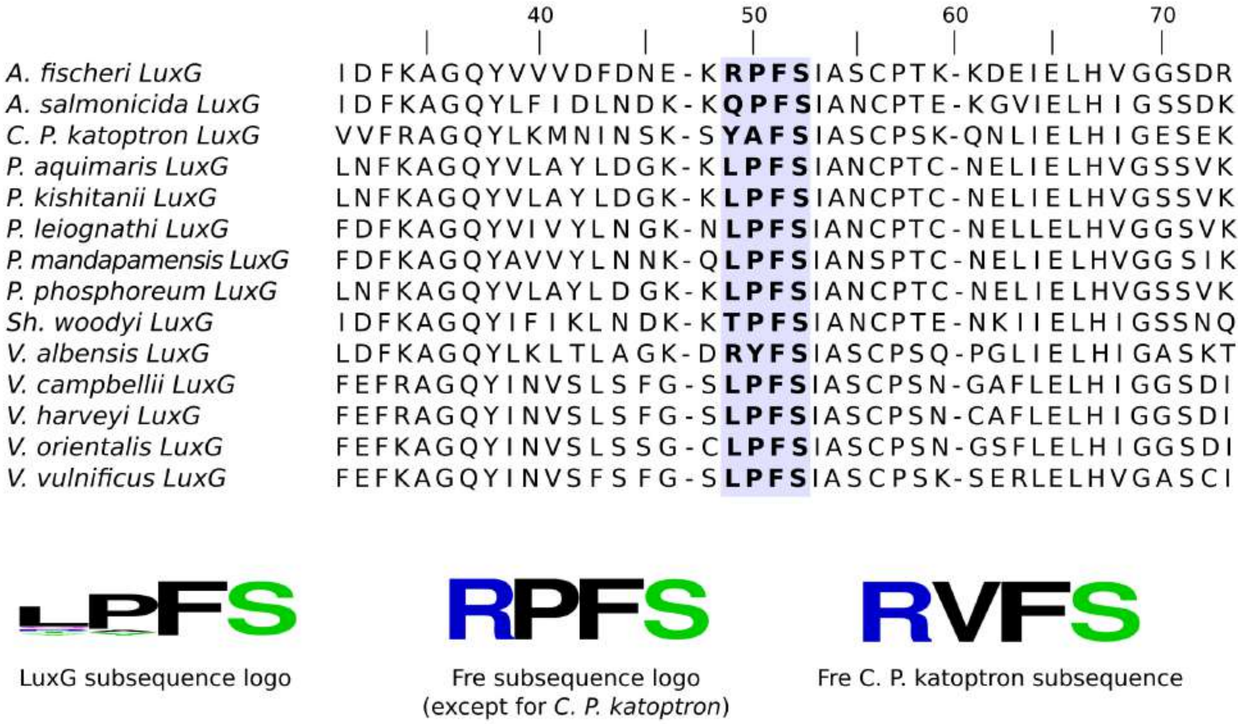

Рисунок 4.7: Фрагмент множественного выравнивания 14 аминокислотных последовательностей LuxG оксидоредуктаз, серым выделен функциональный сайт, соответствующий сегменту Arg46-Pro47-Phe48-Ser49 консервативному у Fre оксидоредуктаз. Ниже представлены логотипы, построенные по набору выровненных последовательностей, где величина буквы обозначает относительную частоту встречаемости остатка в каждой позиции последовательности

данных ферментов [60]. 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 среди белков одного подсемейства. Позиция 202 LuxG и Fre оксидоредуктаз характеризуется дивергеницей типа II. 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 (рис. 4.6, В). Это указывает на то, что Fre и LuxG оксидоредуктазы могут по-разному связывать NAD(P)H в активном центре.

На Рисунке 4.8 изображена поверхность оксидоредуктаз Fre и LuxG доступная растворителю вблизи от активного центра белков. На поверхности Fre оксидоредуктазы имеется несколько консервативных остатков, в то время как у LuxG остатки, которые могут обеспечивать взаимодействие с растворителем и другими белками не являются консервативными.

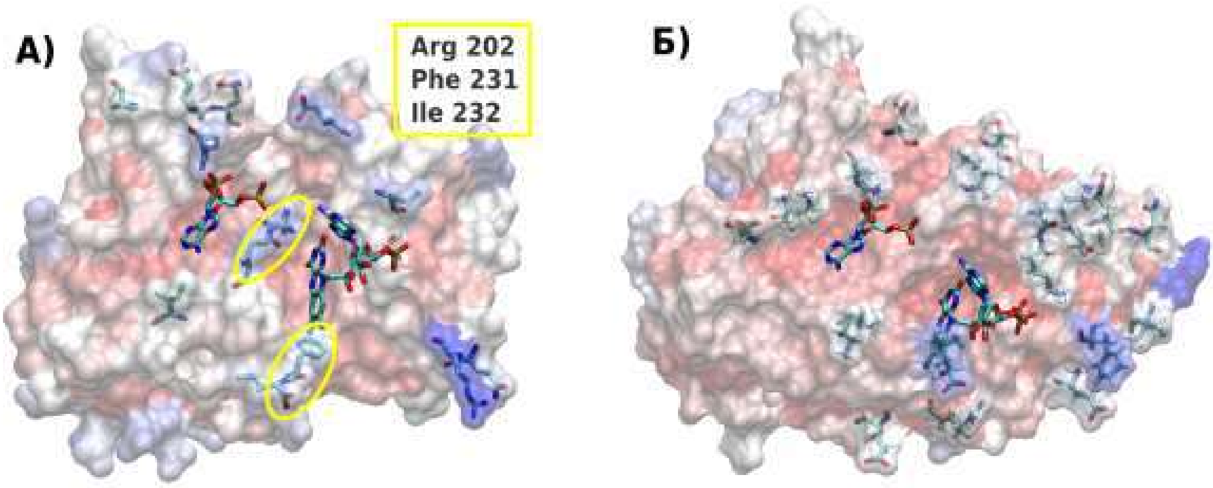

Рисунок 4.8: Фрагмент поверхности доступной растворителю А) оксидоредуктазы Fre и Б) оксидоредуктазы LuxG в области активного центра. Синим цветом на поверхности обозначены остатки доступные молекулам воды, красным — гидрофобные области. С помощью «палочковой» модели изображены субстраты, а также остатки, для которых параметр SASA > 95 Å^2. Желтым цветом обведены консервативные остатки для соответствующей группы белков (номера остатков указаны в рамке)

4.4 Филогения FRP и FRG окисдоредуктаз

Оксидоредуктазы FRP и FRG относятся к классу нитроредуктаз и участвуют в восстановительных реакциях азотосодержащих соединений. Исходя из анализа генного окружения известных полногеномных последовательностей нельзя отнести данные ферменты к какому-то конкретному метаболическому пути, так как оба они экспрессируются совместно с различными генами «домашнего хозяйства», и как рядом с frp, так и с frg геном можно обнаружить гены, кодирующие рибосомные белки, трансмембранные белки (ABC-транспортеры) и другие белки, участвующие в метаболизме.

FRP и FRG оксидоредуктазы представляют собой гомодимеры и содержат FMN в качестве кофактора. Однако для FRP из *V. harveyi* было показано, что в паре с люциферазой она способна отдавать кофактор ($FMNH^-$) в биолюминесцентную реакцию [68]. Более того, комплекс с люциферазой может образовывать именно мономер FRP *V. harveyi* [69] подобно мономерам Fre и LuxG.

На Рисунке 4.9 представлено филогенетическое дерево FRG и FRP оксидоредуктазы. Топология деревьев отличается от таковой для последовательностей α- и β-субъединицы люциферазы. Расчет коэффициентов корреляции между матрицами расстояния филогенетических деревьев показал, что только оксидоредуктаза LuxG эволюционировала совместно с люциферазой (Таблица 4.2).

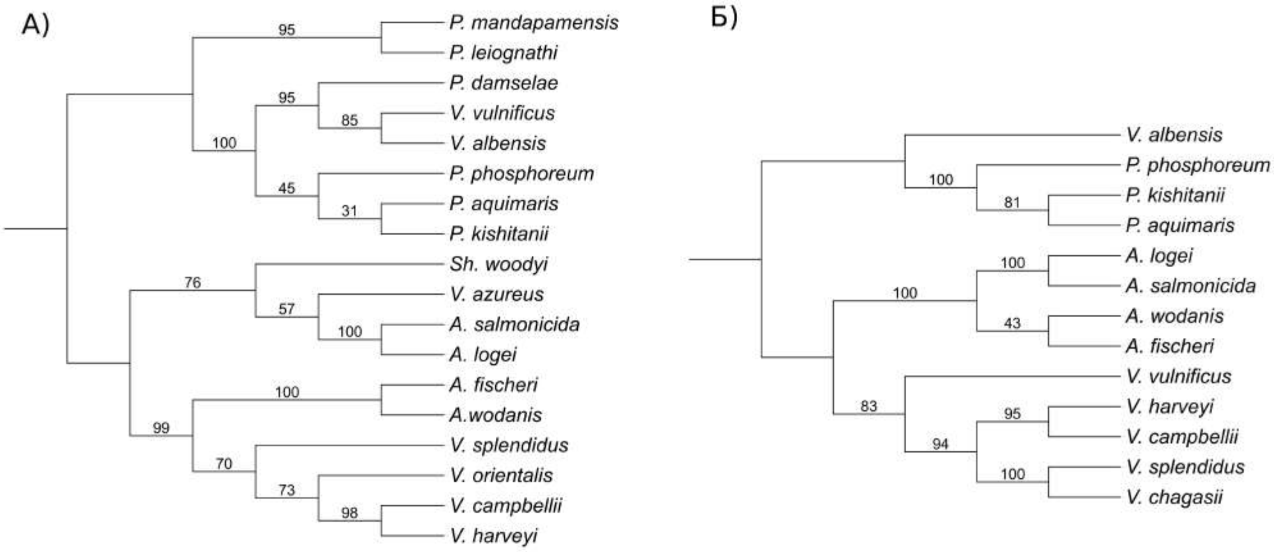

Рисунок 4.9: Кладограммы FRG (А) и FRP (Б) оксидоредуктаз, для каждого узла указаны значения бутстрэп-индексов в процентах (1000 повторностей)

Таблица 4.2: 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

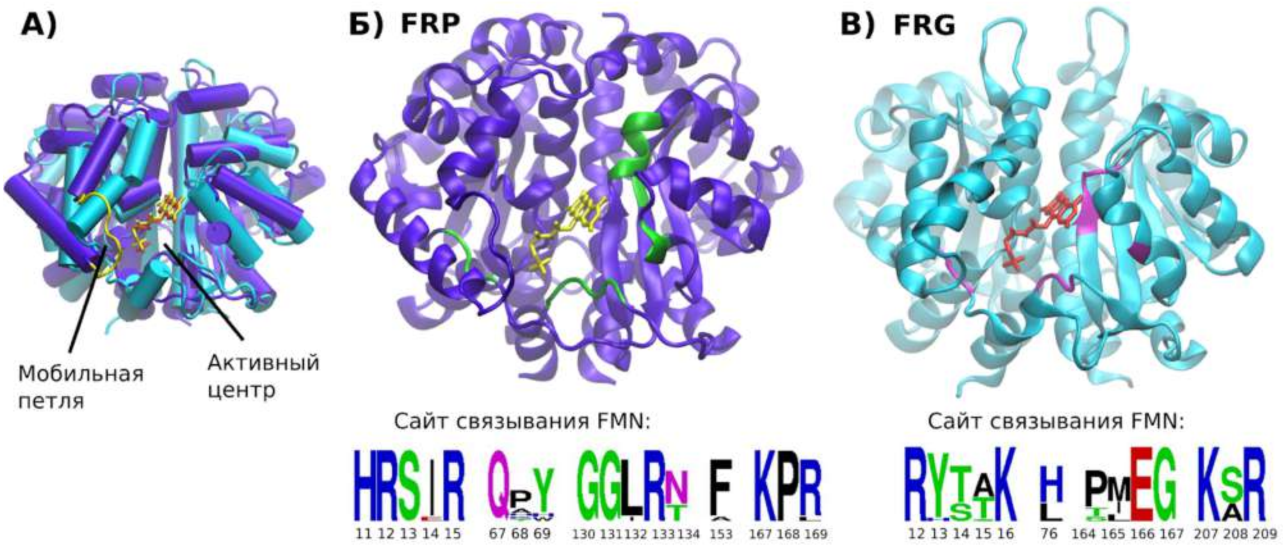

Рисунок 4.10: А) Структурное выравнивание оксидоредуктаз FRP и FRG, где молекула FMN в активном центре FRP обозначена желтым цветом, а в FRG — красным. Мобильная петля в структуре FRP обозначена желтым цветом; Б) Ленточная модель оксидоредуктазы FRP, остатки, формирующие сайт связывания FMN (желтый), обозначены зеленым цветом; В) Ленточная модель оксидоредуктазы FRG, остатки, формирующие сайт связывания FMN, обозначены розовым цветом. Ниже представлены логотипы для сайта связывания FMN, которы был обнаружен при помощи сервера NCBI Conserved Domains. Логотипы были построенны по набору выровненных последовательностей, где величина буквы обозначает относительную частоту встречаемости остатка в каждой позиции последовательности

Структурное выравнивание FRP и FRG (Рисунок 4.10, А) показало, что данные белки имеют одинаковое положение активного центра и консервативных доменов. Активный центр у обоих ферментов сформирован двумя субъединицами. Стоит отметить, что при структурном выравнивании белков положение молекулы FMN в активном центре также совпало. Помимо этого особый интерес представляет мобильная петля, расположенная у входа в активный центр оксидоредуктазы FRP, аналогично мобильной петле Fre. Данный элемент в структуре FRG представлен в виде альфа-спирали, что, вероятно, указывает на различные механизмы стабилизации субстратов в активном центре.

При помощи сервера NCBI Conserved Domains также были определены остатки, формирующие сайты связывания FMN у оксидоредуктаз FRP и FRG (Рисунок 4.10, Б и В). Данные оксидоредуктазы считаются флавопротеинами, так как содержат один флавин в качестве кофактора, при этом также могут связывать второй флавин в качестве субстрата и восстанавливать его (механизм «пинг-понг»). Возможно, поиск консервативных доменов показал именно сайт связывания кофактора, помимо которого есть также сайт связывания субстрата, положение которого на данный момент не известно.

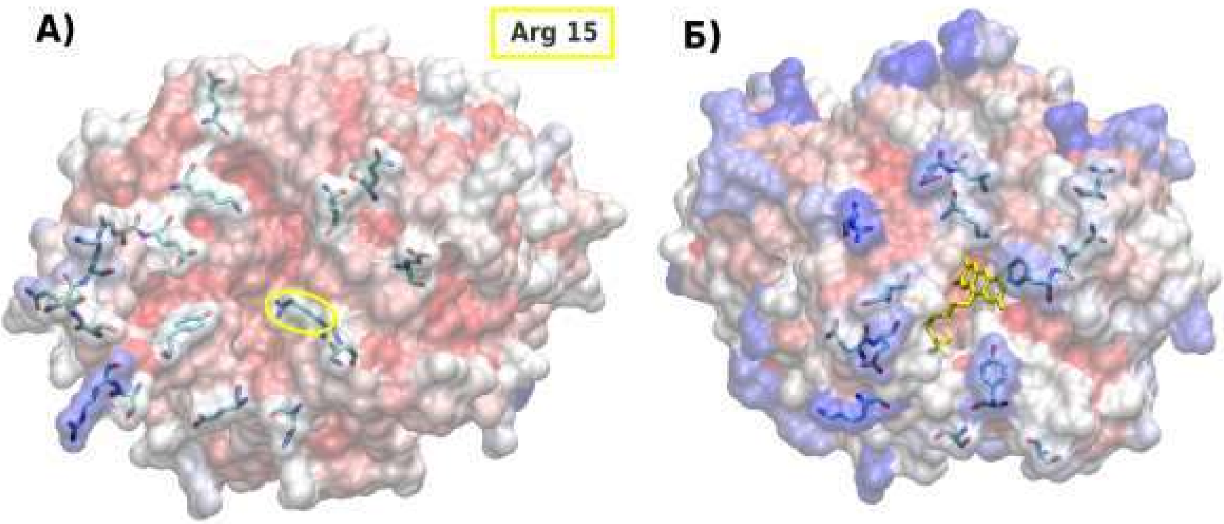

Рисунок 4.11: Фрагмент поверхности доступной растворителю А) оксидоредуктазы FRP и Б) оксидоредуктазы FRG в области активного центра. Синим цветом на поверхности обозначены остатки доступные молекулам воды, красным — гидрофобные области. С помощью «палочковой» модели изображены субстраты, а также остатки, для которых параметр SASA > 95 Å^2. Желтым цветом обведены консервативные остатки для соответствующей группы белков (номера остатков указаны в рамке)

На Рисунке 4.8 изображена поверхность оксидоредуктаз FRP и FRG доступная растворителю вблизи от активного центра белков. Мобильная петля FRP состоит из гидрофильных остатков, однако среди них не было найдено консервативных (Рисунок 4.8, А). Был найден лишь Arg15, который является консервативным и расположен на «входе» в активный центр. В структуре FRG нет мобильной петли, которая бы связывала субстраты в активном центре. Среди полярных остатков, формирующих «вход» в активный центр не было выявлено консервативных.

4.5 Заключение к главе

Филогенетический анализ найденных аминокислотных последовательностей четырёх типов NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаз светящихся бактерий (LuxG, Fre, FRP и FRG) позволил установить эволюционные связи между ними и с бактериальной люциферазой.

В частности, было получено весомое доказательство происхождения LuxG и Fre в результате дупликации гена общего предка, после чего оксидоредуктаза LuxG эволюционировала в составе *lux*-оперона вместе с бактериальной люциферазой. В ходе эволюции первичные последовательности оксидоредуктазы LuxG стали более вариабельны, чем последовательности Fre. Молекулярное моделирование пространственной структуры показало, что менее консервативными у LuxG стали как сайты связывания флавина, так и NAD(P)H. Сходство структуры с LuxG и распространённость Fre в микроорганизмах, вероятно, позволяет этой оксидоредуктазе выступать в роли поставщика восстановленного флавина для люциферазы в рекомбинантных штаммах светящихся бактерий, лишенных гена luxG. Оксидоредуктазы FRP и FRG демонстрируют низкую коэволюцию с бактериальной люциферазой, то есть не связаны функционально с биолюминесцентной системой светящихся бактерий. Однако, поскольку их редуктазная активность превалирует в некоторых видах светящихся бактерий, то они также могут поставлять восстановленный флавин люциферазе.

ГЛАВА 5

Моделирование взаимодействия между люциферазой и NADPH:FMN-оксидоредуктазой

5.1 Белок-белковый докинг

Поскольку наибольшее количество экспериментальных доказательств в пользу комплекса было найдено для люциферазы и оксидоредуктазы FRP *V. harveyi* [68, 69, 82, 93], именно эта пара была выбрана для поиска структурных предпосылок, которые могут внести вклад в формирование комплекса. Известно, что температура денатурации и энергия активации люциферазы зависят от ионной силы раствора [99], а люциферазы некоторых бактерий способны взаимодействовать *in vivo* с вторичными эмиттерами биолюминесценции (например, люмазиновым белком) за счет электростатических сил [100]. Данные факты позволяют сделать предположение, что электростатические взаимодействия играют роль и в формировании возможного комплекса люциферазы с оксидоредуктазой.

В данной работе при помощи молекулярного докинга был изучен вклад электростатических сил в формирование комплекса между ферментами двухкомпонентной флавинзависимой системы бактериальная люцифераза + оксидоредуктаза FRP *V. harveyi*. Для этого молекулу люциферазы помещали в прямоугольный бокс, в котором была задана трехмерная сетка, и затем рассчитывали значение электростатического потенциала в каждой ячейке сетки. Затем в тот же бокс помещали оксидоредуктазу и проводили поиск белок-белкового комплекса с наименьшей энергией электростатического взаимодействия (см. Главу 2.6). В результате среди полученных конфигураций с наименьшей энергией взаимодействия была определена такая, для которой расположение активных центров обоих белков способствует прямой передаче $FMNH^-$, выполнен анализ структурных предпосылок к образованию комплекса [147].

На первом этапе исследования проводили предварительный докинг белков. Начальную конфигурацию оксидоредуктазы относительно люциферазы выбирали случайным образом, после чего оксидоредуктаза могла свободно перемещаться и вращаться относительно фиксированного положения люциферазы. Комплекс с наименьшей энергией, полученный в ходе предварительных расчетов, представлен на Рисунке 5.1. Энергия взаимодействия для данного комплекса составила –15.7 ккал/моль.

Далее было проанализировано взаимное положение активных центров исследованных ферментов. Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер (Рисунок 5.1, струк-

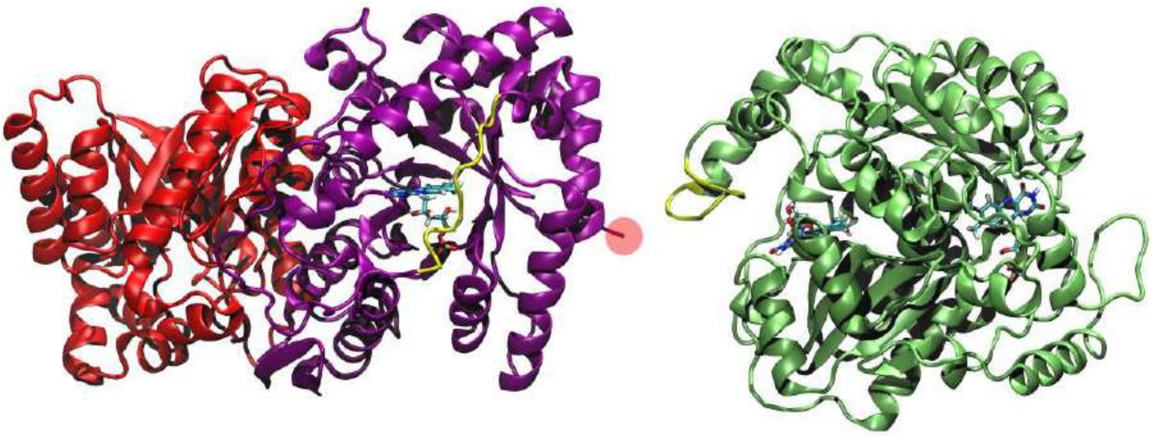

Рисунок 5.1: Комплекс люциферазы (слева) и оксидоредуктазы (справа), полученный в результате предварительного докинга. α-субъединица люциферазы обозначена фиолетовым, а β-субъединица красным цветом. Молекула флавина в активных центрах обоих ферментов представлена «палочковой» моделью, цветами показаны элементы. Красным кругом обозначен С-конец. Мобильные петли обоих ферментов выделены желтым цветом

тура слева), каждая из субъединиц которого формируют структуру (β/α)8-бочонка, также известную как TIM-бочонок [20]. Активный центр расположен на α-субъединице, что видно по структуре связанного флавина, показанного на Рисунке 5.1 голубым цветом. Активный центр представляет собой полость в центре β-бочонка, состоящую, главным образом, из гидрофобных остатков и ряда критических аминокислот, играющих ключевую роль в связывании субстратов и стабилизации интермедиатов реакции [113].

Оксидоредуктаза FRP представляет собой гомодимер (Рисунок 5.1, структура справа), обе субъединицы которого формируют два активных центра, расположенных симметрично в области межсубъединичного интерфейса. Каждый активный центр может связывать одну молекулу FMN, а в случае FRP *V. harveyi* ($FRP_{V.h.}$) в каждом активном центре также содержится по одной дополнительной молекуле FMN в качестве кофактора [4]. Известно, что монoферментная реакция, катализируемая $FRP_{V.h.}$, происходит по механизму «пинг-понг», однако в присутствии бактериальной люциферазы механизм изменяется на последовательный, в котором происходит перенос кофактора от оксидоредуктазы к люциферазе [47, 68].

Таким образом, ориентация белков в комплексе, представленном на Рисунке 5.1, предполагает возможность прямого переноса восстановленного флавина. Однако более внимательное рассмотрение полученной структуры указывает на то, что альтернативные конформации мобильных петель (обозначены на рисунке желтым цветом) могут повлиять на ориентацию белков, поскольку они содержат полярные аминокислотные остатки. Мобильная петля бактериальной люциферазы представляет собой последовательность консервативных аминокислотных остатков α-субъединицы (с 262 по 290 а.о.), которые обладают особой подвижностью [25]. Экспериментально было показано, что она отвечает за защиту возбужденного интермедиата реакции от возможного тушения растворителем [24] и фиксирует субстраты в активном центре [148]. Мобильная петля $FRP_{V.h.}$ (участок 201-209 а.о.) также фиксирует субстраты в активном центре [70]. Считается, что высоко подвижные, неупорядоченные участки белков не могут быть структурной основой для формирования стабильных межбелковых комплексов за счет электростатических взаимодействий, но при этом, в нашем случае, они могут внести искажение в результаты моделирования взаимодействия. В связи с этим, для следующего этапа докинга была удалена часть аминокислотных остатков мобильных петель. По этой же причине была также удалена часть C-концевых аминокислотных остатков бактериальной люциферазы (Leu351, Lys352, Glu353, Lys354, Gln355). Этот участок также довольно подвижен, расположен близко к активному центру (Рисунок 5.1, красный круг), его свободная карбоксильная группа способна в растворителе притягивать протоны, в результате чего происходит экранирование, которое может повлиять на взаимодействие между белками.

На следующем шаге вычислений были исследованы структуры люциферазы и оксидоредуктазы с «открытым» активным центром. Траектория вычислений содержит набор конфигураций, каждой из которых соответствует определенное значение энергии взаимодействия. При этом принимается, что в комплексе электростатическая энергия взаимодействия молекул минимальна или представляет собой локальный минимум.

В ходе расчетов траектория поиска сужается до определенной области, в которой расположен этот минимум. На Рисунке 5.2 (а) синими точками представлены 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. По рисунку видно, что областей с повышенной вероятностью нахождения оксидоредуктазы относительно люциферазы существует несколько 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. Полученный комплекс с энергией электростатического взаимодействия –9.6 ккал/моль представлен на Рисунке 5.2 (б). В данном комплексе активные центры ферментов расположены так, что перенос флавина возможен без значительного контакта с растворителем, поэтому дальнейшее исследование полученной конфигурации представляет особый интерес.

Было рассчитано расстояние между аминокислотными остатками, которые могут принимать участие в формировании комплекса за счет образования водородных связей. Видно, что

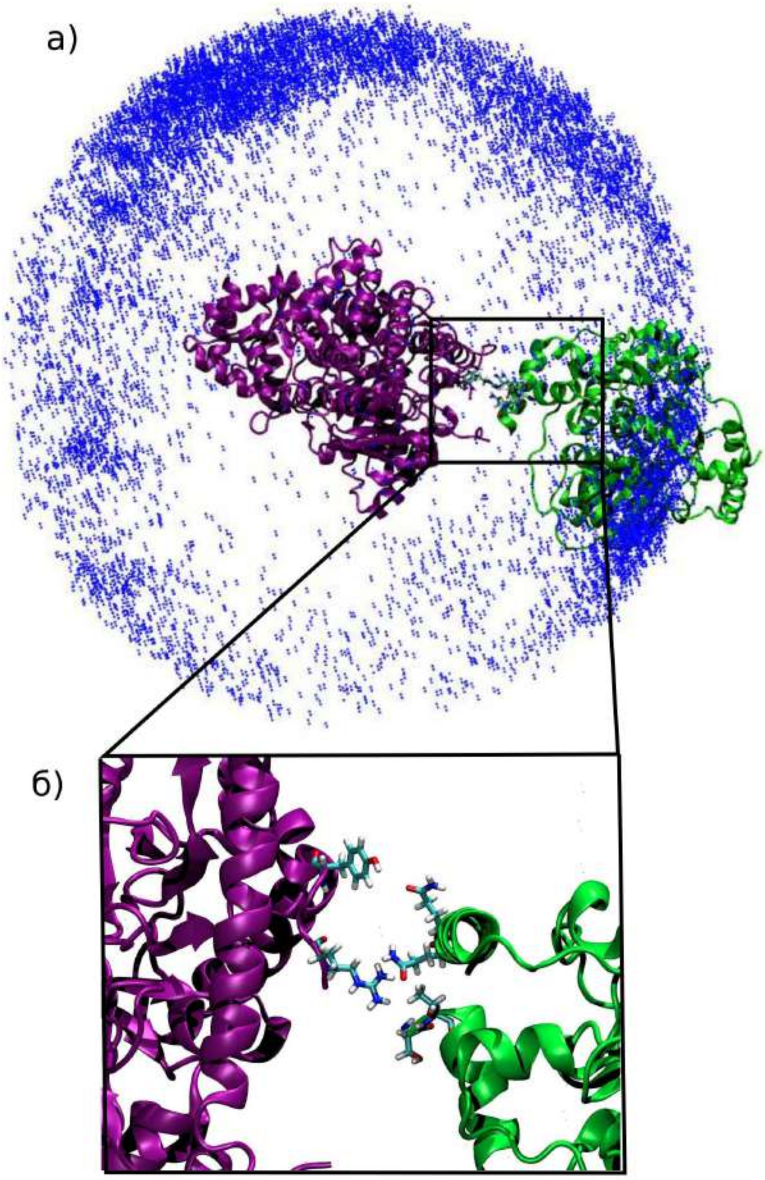

Рисунок 5.2: а) Позиции оксидоредуктазы относительно люциферазы (синие точки), полученные не менее 15-ти раз в ходе 100 симуляций. Точка отражает положение центра масс белка. б) Конфигурация комплекса с энергией взаимодействия –9.6 ккал/моль, для которой возможна прямая передача $FMNH^-$ между активными центрами ферментов. Оксидоредуктаза обозначена зеленым цветом, люцифераза – фиолетовым. Аминокислотные остатки, которые могут принимать участие в стабилизации комплекса, представлены «палочковой» моделью [147]

αArg291 и Gln197 люциферазы и оксидоредуктазы, соответственно, могут вносить наибольший вклад во взаимодействие при туннелировании $FMNH^-$ между активными центрами белков.

Дополнительно было проведено проецирование электростатического потенциала на поверхность, доступную растворителю, для обоих белков (Рисунок 5.3). Было установлено, что в активном центре как люциферазы, так и редуктазы выделяется положительно заряженная область, представляющая собой сайт посадки фосфатной группы флавина и состоящая из

Таблица 5.1: Расстояния между атомами аминокислотных остатков (а.о.), которые могут принимать участие в стабилизации белок-белкового комплекса [147]

Люцифераза		Оксидоредуктаза		Расстояние, Å
А.о.	Атом	А.о.	Атом	
Arg291	$N^{\eta 1}$	Gln197	$O^{\varepsilon 1}$	2.69
	$N^{\eta 2}$		$N^{\varepsilon 2}$	2.96
			$O^{\varepsilon 1}$	3.91
		Thr212	N	4.92
		Ser210	N	4.80
Tyr294	O^{η}	Gln 194	$O^{\varepsilon 1}$	4.10

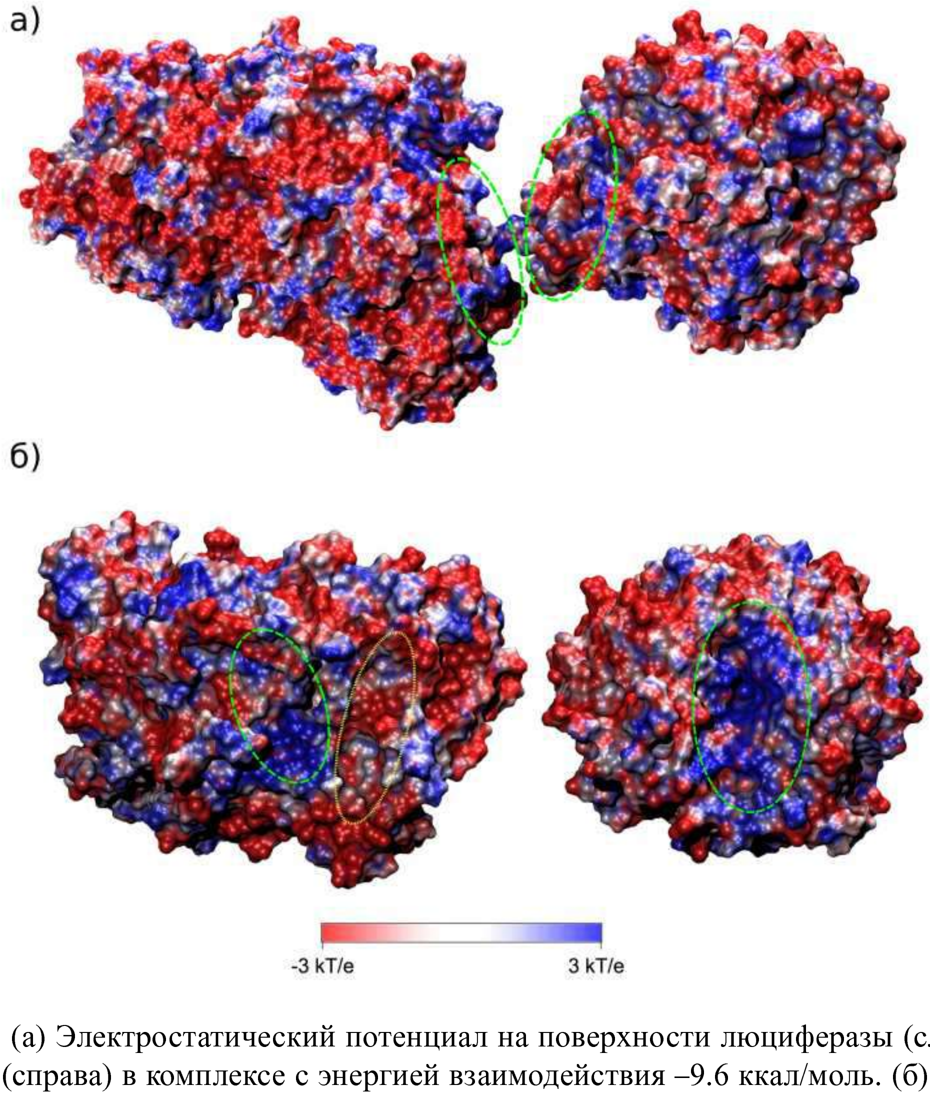

Рисунок 5.3: (а) Электростатический потенциал на поверхности люциферазы (слева) и оксидоредуктазы (справа) в комплексе с энергией взаимодействия –9.6 ккал/моль. (б) Вид поверхности взаимодействия белков в комплексе. Активные центры обозначены зеленым овалом. Отрицательно заряженный участок вблизи активного центра люциферазы выделен желтым овалом. Красный цвет на рисунке соответствует потенциалу – –3 kT/e, синий – 3 kT/e [147]

остатков аргинина (Рисунок 5.3, выделено зелеными овалами). Однако рядом с активным центром люциферазы находится впадина с отрицательным зарядом (Рисунок 5.3, б, выделено желтым овалом), которая соответствует по размеру положительно заряженному активному центру оксидоредуктазы. При образовании комплекса эти разноименно заряженные участки могут располагаться друг напротив друга, тем самым способствуя правильной ориентации белков и обеспечивая канал для переноса флавина.

Одной из проблем экспериментального доказательства осуществления белок-белковых взаимодействий является выбор параметра, который бы позволял с достоверностью идентифицировать формирование комплекса. Так, например, изменение значения K_m при исследовании стационарной кинетики ферментативной реакции не всегда может указывать на наличие взаимодействия между белками [78]. В настоящей работе впервые рассмотрен вопрос формирования белок-белкового комплекса между бактериальной люциферазой и NADPH:FMN-оксидоредуктазой с точки зрения механизма их взаимодействия, а именно за счет электростатических сил.

В целом, можно заключить, что проведенные расчеты электростатического потенциала, создаваемого бактериальной люциферазой, и его влияния на взаимодействие с оксидоредуктазой $FRP_{V.h.}$ показывают, что вклад электростатических сил в образование комплекса между этими белками, вероятней всего, не является определяющим. Был получен набор структур возможных комплексов с энергией электростатического взаимодействия от +36.1 до –14.0 ккал/моль, которые, по всей видимости, являются короткоживущими, так как вероятность их формирования достаточно мала. Среди комплексов с наименьшей энергией взаимодействия был найден такой, в котором взаимная ориентация ферментов может способствовать прямой передаче флавина между активными центрами. Можно сказать, 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 [45].

5.2 Влияние структурной вариабельности бактериальной люциферазы и оксидоредуктазы FRG на чувствительность ферментативных биотестов на их основе

Биферментная система, состоящая из бактериальной люциферазы и NAD(P)H:FMN-оксидоредуктазы, при достаточном количестве субстратов может быть источником стабильного свечения *in vitro* в течение нескольких минут, что легко детектируется современными приборами люминометрами. Поэтому данная система широко используется в качестве репортёрной, особенно в области токсикологии [96]. Ферменты светящихся бактерий обладают высокой чувствительностью к широкому кругу химических соединений и быстро реагирует на изменения в биохимическом окружении. На основе биферментной системы проводят конструирование более сложных ферментативных систем, что позволяет расширить спектр анализируемых ксенобиотиков. Дополнительные ферменты сопрягают с люциферазой и оксидоредуктазой либо за счет обеспечения потока субстратов (например, различные NAD(P)-зависимые дегидрогеназы) [149], либо за счет белок-белковых взаимодействий (например, гидролазы). Исторически сложилось так, что ферментативные биолюминесцентные биотесты основаны исключительно на люциферазе *P. leiognathi* и оксидоредуктазе FRG *A. fischeri*. Между тем, информация о структурной вариабельности данных классов белков позволяет высказать рекомендации по их комбинированию с целью повышения чувствительности того или иного типа ферментативного биотеста. В частности, чувствительность биферментной системы люцифераза+оксидоредуктаза FRG к действию трипсина и химотрипсина позволило оценить эффект пищевых добавок на данные эндопротеазы [95]. Было получено, что триферментная система с трипсином позволяет определять более низкие концентрации консервантов в образцах, чем система с химотрипсином (Таблица 5.2) [95].

Таблица 5.2: Предел чувствительности триферментных биолюминесцентных систем с трипсином и химотрипсином к пищевым добавкам (токсикологический параметр IC_{20}) [95]

Консервант	IC_{20}, мг/л	
	Химотрипсин	Трипсин
Бензоат натрия	4.0 ± 0.8	2.0 ± 0.4
Сорбат калия	12.0 ± 2.0	1.2 ± 0.1
Сорбиновая кислота	4.0 ± 0.5	0.1 ± 0.02

Возможны, как минимум, две причины, по которым чувствительность триферментных систем различна. Во-первых, исследованные токсиканты могут оказывать большее воздействие на трипсин, чем на химотрипсин. Во-вторых, репортёрная система теста – сопряженная реакция люциферазы с оксидоредуктазой может быть более подвержена расщеплению трипсином, чем химотрипсином. В этом случае минимальное изменение активности трипсина под действием токсиканта может быть зарегистрировано по интенсивности излучения биферментной системы.

В завершающей части работы были проанализированы сайты первичной последовательности бактериальной люциферазы и оксидоредуктазы, чувствительные к действию эндопротеаз.

Известно, что трипсин катализирует гидролиз пептидной связи по карбоксильной группе лизина и аргинина. Анализ аминокислотных последовательностей люциферазы показал, что в зависимости от вида бактерий α-субъединица белка содержит 14-24 остатка Lys и 12-21 остаток Arg, а β-субъединица — 12-24 остатка Lys и 5-16 остатков Arg. На основании множественного выравнивания последовательностей было установлено, что значительная часть остатков Arg и Lys, входящих в состав α субъединицы является консервативной. Также среди них были найдены остатки, которые вносят вклад в разбиение люцифераз на «быстрые» и «медленные» (Таблица 5.3).

Четыре остатка – αArg107, αLys112, αArg125 и αArg290 – являются консервативными и формируют активный центр люциферазы. После αArg290 идет αArg291, что снижает скорость гидролиза на данном участке полипептидной цепи. Остаток αLys286, участвующий в разбиении люцифераз на две группы, входит в состав мобильной петли люциферазы и связывает флавин в активном центре [25]. Известно, что гидролиз по карбоксильной группе αLys286 может приводить к значительному снижению активности фермента.

Таблица 5.3: Трипсин-чувствительные сайты в структуре бактериальной люциферазы (нумерация относительно последовательности *V. harveyi*)

Белок	Для всех		Для «быстрых»		Для «медленных»	
	Кол-во	№ а.о.	Кол-во	№ а.о.	Кол-во	№ а.о.
LuxA	17	2, 23, 85, 98, 100, 107, 112, 125, 201, 202, 238, 244, 274, 278, 290, 291, 352	5	22, 102, 268, 286, 354	3	26, 65, 268
LuxB	5	2, 85, 100, 119, 185	3	70, 110, 201	1	201

Анализ показал, что более чувствительной к действию трипсина является α-субъединица люциферазы, так как по сравнению с β-субъединицей она содержит большее количество Lys и Arg, гидролиз которых может привести к снижению активности фермента. Можно предположить, что наибольшей чувствительностью к действию трипсина обладает люцифераза *Ph. luminescens*, последовательность которой содержит 72 остатка Lys и Arg. При исследовании влияния консервантов на трипсин использовали люциферазу *P. leiognathi*, которая содержит 69 аминокислотных остатков Lys и Arg [95].

Химотрипсин расщепляет полипептидную цепь преимущественно после остатков аминокислот фенилаланина, тирозина, триптофана. Было установлено, что α-субъединицы содержат 4–6 остатков Trp, 11–17 остатков Tyr и 15–21 остатков Phe. В последовательности β-субъединицы присутствуют 2 остатка Trp, 10–16 остатков Tyr и 16–23 остатков Phe. Значительная доля аминокислотных остатков, как α-, так и β-субъединицы, является консервативной. Из них в активном центре люциферазы расположены αPhe49, αTyr110, αTrp194 и αTrp250, их гидролиз по карбоксильной группе может привести к значительной потере активности фермента. В целом, обе субъединицы люциферазы могут обладать высокой чувствительностью к химотрипсину, так как содержат большое число ароматических аминокислот. Люцифераза *P. leiognathi*, использованная для исследования влияния консервантов на химотрипсин, содержит 69 ароматических аминокислотных остатков [95]. Интересно, что, как и в случае трипсина, максимальную чувствительность к химотрипсину можно предположить у люциферазы *Ph. luminescens*, которая содержит 77 ароматических аминокислотных остатков.

Таблица 5.4: Химотрипсин-чувствительные сайты в структуре люциферазы (нумерация аминокислотных остатков относительно последовательности *V. harveyi*)

Белок	Для всех		Для «быстрых»		Для «медленных»	
	Кол-во	№ а.о.	Кол-во	№ а.о.	Кол-во	№ а.о.
LuxA	27	3, 10, 36, 40, 46, 101, 103, 110, 114, 117, 153, 163, 182, 194, 208, 246, 250, 251, 254, 261, 270, 277, 280, 294, 327, 343	5	6, 131, 132, 171, 272	4	8, 24, 131, 272
LuxB	18	6, 7, 10, 36, 46, 61, 101, 116, 117, 128, 150, 151, 153, 182, 194, 208, 246, 299	2	30, 105	2	34, 280

Помимо люциферазы в биолюминесцентной ферментативной тест-системе относительных активностей протеаз использовали оксидоредуктазу FRG *A. fischeri*. Данный фермент содержит 19 ароматических остатков, пептидные группы которых могут подвергаться гидролизу химотрипсином. По сравнению с окисдоредуктазами FRG из светящихся бактерий рода *Photobacterium*, в составе которых можно обнаружить до 23 ароматических аминокислот, FRG *A. fischeri* менее чувствительна к данной эндопротеазе. Возможно, тест-система, содержащая оксидоредуктазу FRG из того же вида бактерий, что и люцифераза (то есть *P. leiognathi*) могла бы обладать большей чувствительностью.

FRG *A. fischeri* содержит 17 остатков Lys и 7 Arg, четыре из которых формируют пептидную связь с положительно заряженными остатками, что может снижать скорость гидролиза трипсином. Оксидоредуктазы FRG из бактерий рода *Photobacterium* также содержат 24–25 остатков Lys и Arg, как и FRG *A. fischeri*. В связи с этим можно предположить, что использованная гибридная тест-система люцифераза *P. leiognathi* + оксидоредуктаза *A. fischeri*, вероятно, не менее чувствительна к трипсину, чем система, содержащая белки из одного организма.

Таким образом, анализ первичных последовательность люциферазы и оксидоредуктазы, использованных в тестовой системе активности эндопротеаз, говорит о том, что различные пределы чувствительности триферментных биотестов (Таблица 5.2) обусловлены влиянием токсикантов на эндопротеазы. Чувствительность биолюминесцентных ферментов к трипсину и химотрипсину с точки зрения структуры белков не различаются.

Полученные в ходе теоретического анализа и экспериментального исследования результаты [95] наглядно демонстрируют перспективность создания аналитической системы ферментативных тестов, включающей различные ферменты-биомаркеры и позволяющей оценивать безопасность применения как существующих, так и новых разрабатываемых пищевых добавок. Знание о вариабельности структуры ключевых ферментов таких тестов – люцифераз и оксидоредуктаз позволяет от эмпирического поиска перейти к направленному дизайну аналитических методов такого типа.

5.3 Заключение к главе

Был проведён поиск возможных структурных предпосылок образования комплекса между бактериальной люциферазой и четырьмя типами оксидоредуктаз с учетом вариабельности структуры ферментов. Анализ роли электростатического потенциала поверхности люциферазы и оксидоредуктазы FRP во взаимодействии белков показал, что электростатический механизм не может быть определяющим для образования комплекса. Кроме того, установлено, что у всех оксидоредуктаз, которые потенциально могли бы участвовать в прямой передаче восстановленного флавина люциферазе, отсутствуют консервативные аминокислотные остатки на поверхности вокруг активного центра, что свидетельствует об отсутствии специфических взаимодействий с образованием стабильного белок-белкового комплекса.

Накопленный массив данных о вариабельности структуры люцифераз и оксидоредуктаз светящихся бактерий может быть использован для конструирования биферментных биолюминесцентных систем с заданными свойствами, например, с высокой или низкой чувствительностью к эндопротеазам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В диссертационной работе проведен глобальный анализ аминокислотных последовательностей бактериальной люциферазы и оксидоредуктаз, которые принимают участие в биолюминесцентной реакции бактерий. Исследована вариабельность первичной структуры данных ферментов и охарактеризованы особенности их эволюции, что позволило выявить ряд важных функциональных характеристик. Впервые была предложена и исследована модель пространственной структуры «быстрой» люциферазы *Photobacterium leiognathi* и оксидоредуктазы LuxG *Vibrio harveyi*, структуры которых на данный момент не расшифрованы с помощью рентгеноструктурного анализа.

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей люцифераз показал, что первичная последовательность позволяет однозначно классифицировать люциферазы либо как «быстрые», которые имеют быструю кинетику затухания люминесценции в реакции с додеканалем и высокий квантовый выход в реакции с тетрадеканалем, либо отнести к типу «медленных», для которых характерна медленная кинетика и предпочтение деканаля в качестве субстрата. Был обнаружен ряд специфичных аминокислотных позиций, определяющих их функциональные особенности. При помощи сравнительного анализа известной структуры люциферазы *Vibrio harveyi* и смоделированной структуры люциферазы *Photobacterium leiognathi* было установлено, что в ходе эволюции люцифераз сформировалось два альтернативных способа взаимодействия флавина с активным центром за счёт серосодержащих аминокислотных остатков.

Исследование эволюции оксидоредуктаз LuxG и Fre показало, что данные ферменты произошли в результате дупликации гена, что связано с появлением *lux*-оперона. В результате функциональных ограничений оксидоредуктазы LuxG и Fre значительно дивергировали, вследствие чего консервативные остатки Fre, обеспечивающие специфичность взаимодействия с субстратом, оказались вариабельны в структуре LuxG. Таким образом, исследование показало, что широкая специфичность LuxG к различным производным флавина может обеспечиваться низкой консервативностью сайта связывания фосфатной/пирофосфатной группы FMN/FAD. Также было установлено, что консервативные остатки LuxG формируют активный центр фермента и прилегающие к нему области, в то время как поверхность белка сформирована вариабельными участками. Не смотря на коэволюцию LuxG оксидоредуктазы и люциферазы в составе *lux*-оперона, на поверхности LuxG отсутствуют функциональные сайты, которые могли бы обеспечивать взаимодействие с люциферазой для прямой передачи флавина. Вероятно, эффективная передача субстрата осуществляется за счет пространственной локализации LuxG вблизи люциферазы *in vivo*.

Исследована возможность формирования комплекса между люциферазой и NADPH:FMN-оксидоредуктазой *Vibrio harveyi* за счет электростатических взаимодействий. При помощи белок-белкового докинга с учетом электростатического потенциала белков было показано, что вклад электростатических сил в образование комплекса не является определяющим.

Таким образом, полученные результаты, имеют фундаментальное значение и важны для практического использования биферментной системы люцифераза+NAD(P)H:FMN-оксидоредуктаза в биолюминесцентном анализе.

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.

Результаты диссертационной работы опубликованы в следующих работах:

Статьи в журналах из списка ВАК РФ

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.

Тезисы докладов

1. Koval A.A., Nemtseva E.V. Structural parameters of tryptophan environment in Photobacterium leiognathi luciferase// Abstracts of young scientists school “Bioinformatics and systems biology”. Novosibirsk. - 2012. - p. 18

2. 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.

3. Koval 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

4. 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.

5. 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 Structure
Systems Biology, Novosibirsk. - 2014. - p. 37

6. Темлякова Е.А., Деева А.А., Немцева Е.В., Кратасюк В.А. Сравнительный анализ активных центров "медленных"и "быстрых"люцифераз светящихся бактерий / Темлякова Е.А., Деева А.А., Немцева Е.В., Кратасюк В.А. // 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

7. 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. Vol. 33, Supplement, 2015. - p. 115 - 116

8. 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

9. 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

10. 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.

11. 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.

12. Deeva A.A., Temlyakova E.A., Sorokin A.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.

13. 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

14. 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

15. 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. - c. 22

16. 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.

Литература

1. *Hastings, JW*. Bacterial bioluminescence / JW Hastings, Kenneth H Nealson // *Annual Reviews in Microbiology*. — 1977. — Vol. 31, № 1. — P. 549–595.

2. *Dunlap, Paul V*. Luminous bacteria / Paul V Dunlap, Henryk Urbanczyk // The Prokaryotes. — Springer, 2013. — P. 495–528.

3. *Wall, Lee*. Subunit structure of the fatty acid reductase complex from Photobacterium phosphoreum / Lee Wall, Edward A Meighen // *Biochemistry*. — 1986. — Vol. 25, № 15. — P. 4315–4321.

4. *Tu, Shiao-Chun*. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases / Shiao-Chun Tu // *Photochemical & Photobiological Sciences*. — 2008. — Vol. 7, № 2. — P. 183–188.

5. Understanding bacterial bioluminescence: a theoretical study of the entire process, from reduced flavin to light emission / Cong Hou, Ya-Jun Liu, Nicolas Ferré, Wei-Hai Fang // *Chemistry–A European Journal*. — 2014. — Vol. 20, № 26. — P. 7979–7986.

6. *Mitchell, George*. The effect of flavin isomers and analogues upon the color of bacterial bioluminescence / George Mitchell, J Woodland Hastings // *Journal of Biological Chemistry*. — 1969. — Vol. 244, № 10. — P. 2572–2576.

7. *Meighen, EA*. Flavine specificity of enzyme-substrate intermediates in the bacterial bioluminescent reaction. Structural requirements of the flavine side chain / EA Meighen, RE MacKenzie // *Biochemistry*. — 1973. — Vol. 12, № 8. — P. 1482–1491.

8. *Hastings, J Woodland*. The influence of aldehyde chain length upon the relative quantum yield of the bioluminescent reaction of Achromobacter fischeri / J Woodland Hastings, James Spudich, Gerhard Malnic // *Journal of Biological Chemistry*. — 1963. — Vol. 238, № 9. — P. 3100–3105.

9. Synthesis of α, β-unsaturated aldehydes as potential substrates for bacterial luciferases / Eveline Brodl, Jakov Ivkovic, Chaitanya R Tabib et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. — 2017. — Vol. 25, № 4. — P. 1487–1495.

10. Discovery of New Substrates for LuxAB Bacterial Bioluminescence / Tianyu Jiang, Weishan Wang, Xingkang Wu et al. // *Chemical biology & drug design*. — 2016. — Vol. 88, № 2. — P. 197–208.

11. *Nealson, KH*. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. / KH Nealson, John W Hastings // *Microbiological reviews*. — 1979. — Vol. 43, № 4. — P. 496.

12. *Valkova, Nelly*. Control of luminescence decay and flavin binding by the LuxA carboxyl-terminal regions in chimeric bacterial luciferases / Nelly Valkova, Rose Szittner, Edward A Meighen // *Biochemistry*. — 1999. — Vol. 38, № 42. — P. 13820–13828.

13. Characterization ofAlteromonas hanedai (sp. nov.), a nonfermentative luminous species of marine origin / MJ Jensen, BM Tebo, P Baumann et al. // *Current Microbiology*. — 1980. — Vol. 3, № 5. — P. 311–315.

14. Shewanella woodyi sp. nov., an exclusively respiratory luminous bacterium isolated from the Alboran Sea / John C Makemson, Nada R Fulayfil, Warren Landry et al. // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. — 1997. — Vol. 47, № 4. — P. 1034–1039.

15. *Ulitzur, S*. Evidence for tetradecanal as the natural aldehyde in bacterial bioluminescence / S Ulitzur, JW Hastings // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1979. — Vol. 76, № 1. — P. 265–267.

16. *Shimomura, Osamu*. The aldehyde content of luminous bacteria and of an "aldehydeless" dark mutant / Osamu Shimomura, Frank H Johnson, Hiroshi Morise // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1974. — Vol. 71, № 12. — P. 4666–4669.

17. The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions / Andrew J Fisher, Thomas B Thompson, James B Thoden et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 1996. — Vol. 271, № 36. — P. 21956–21968.

18. *Wierenga, RK*. The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes / RK Wierenga // *FEBS letters*. — 2001. — Vol. 492, № 3. — P. 193–198.

19. *Baldwin, Thomas O*. Covalent structure of subunits of bacterial luciferase: NH2-terminal sequence demonstrates subunit homology / Thomas O Baldwin, Miriam M Ziegler, Dennis A Powers // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1979. — Vol. 76, № 10. — P. 4887–4889.

20. Three-dimensional structure of bacterial luciferase from Vibrio harveyi at 2.4 A resolution. / Andrew J Fisher, Frank M Raushel, Thomas O Baldwin, Ivan Rayment // *Biochemistry*. — 1995. — Vol. 34, № 20. — P. 6581–6586.

21. Crystal structure of the bacterial luciferase/flavin complex provides insight into the function of the β subunit / Zachary T Campbell, Andrzej Weichsel, William R Montfort, Thomas O Baldwin // *Biochemistry*. — 2009. — Vol. 48, № 26. — P. 6085–6094.

22. *Holzman, Thomas F*. Proteolytic inactivation of luciferases from three species of luminous marine bacteria, Beneckea harveyi, Photobacterium fischeri, and Photobacterium phosphoreum: evidence of a conserved structural feature / Thomas F Holzman, Thomas O Baldwin // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1980. — Vol. 77, № 11. — P. 6363–6367.

23. *Holzman, Thomas F*. The effects of phosphate on the structure and stability of the luciferases from Beneckea, harveyi, Photobacterium, fischeri, and, Photobacterium phosphoreum / Thomas F Holzman, Thomas O Baldwin // *Biochemical and biophysical research communications*. — 1980. — Vol. 94, № 4. — P. 1199–1206.

24. *Sparks, Jonathan M*. Functional implications of the unstructured loop in the (β/α) 8 barrel structure of the bacterial luciferase α subunit / Jonathan M Sparks, Thomas O Baldwin // *Biochemistry*. — 2001. — Vol. 40, № 50. — P. 15436–15443.

25. *Campbell, Zachary T*. Two lysine residues in the bacterial luciferase mobile loop stabilize reaction intermediates / Zachary T Campbell, Thomas O Baldwin // *Journal of Biological Chemistry*. — 2009. — Vol. 284, № 47. — P. 32827–32834.

26. Structure of the $\beta 2$ homodimer of bacterial luciferase from Vibrio harveyi: X-ray analysis of a kinetic protein folding trap / James B Thoden, Hazel M Holden, Andrew J Fisher et al. // *Protein science*. — 1997. — Vol. 6, № 1. — P. 13–23.

27. *Xin, Xing*. Functional consequences of site-directed mutation of conserved histidyl residues of the bacterial luciferase alpha subunit. / Xing Xin, Lei Xi, Shiao-Chun Tu // *Biochemistry*. — 1991. — Vol. 30, № 47. — P. 11255–11262.

28. *Inlow, Jennifer K*. Mutational Analysis of the Subunit Interface of Vibrio harveyi Bacterial Luciferase† / Jennifer K Inlow, Thomas O Baldwin // *Biochemistry*. — 2002. — Vol. 41, № 12. — P. 3906–3915.

29. *Huang, Shouqin*. Identification and characterization of a catalytic base in bacterial luciferase by chemical rescue of a dark mutant / Shouqin Huang, Shiao-Chun Tu // *Biochemistry*. — 1997. — Vol. 36, № 48. — P. 14609–14615.

30. Modeling of the bacterial luciferase-flavin mononucleotide complex combining flexible docking with structure-activity data / Leo Yen-Cheng Lin, Traian Sulea, Rose Szittner et al. // *Protein Science*. — 2001. — Vol. 10, № 8. — P. 1563–1571.

31. Implications of the reactive thiol and the proximal non-proline cis-peptide bond in the structure and function of Vibrio harveyi luciferase / Leo Yen-Cheng Lin, Traian Sulea, Rose Szittner et al. // *Biochemistry*. — 2002. — Vol. 41, № 31. — P. 9938–9945.

32. Kinetic destabilization of the hydroperoxy flavin intermediate by site-directed modification of the reactive thiol in bacterial luciferase. / Husam M Abu-Soud, Allan C Clark, Wilson Alex Francisco et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 1993. — Vol. 268, № 11. — P. 7699–7706.

33. *Moore, Celeste*. Relationship between the conserved α subunit arginine 107 and effects of phosphate on the activity and stability of Vibrio harveyi luciferase / Celeste Moore, Benfang Lei, Shiao-Chun Tu // *Archives of biochemistry and biophysics*. — 1999. — Vol. 370, № 1. — P. 45–50.

34. *Cline, Thomas W*. Mutated luciferases with altered bioluminescence emission spectra / Thomas W Cline, J Woodland Hastings // *Journal of Biological Chemistry*. — 1974. — Vol. 249, № 14. — P. 4668–4669.

35. Changes in the kinetics and emission spectrum on mutation of the chromophore-binding platform in Vibrio harveyi luciferase / Leo Yen-Cheng Lin, Rose Szittner, Romy Friedman, Edward A Meighen // *Biochemistry*. — 2004. — Vol. 43, № 11. — P. 3183–3194.

36. *Hosseinkhani, Saman*. Random mutagenesis of bacterial luciferase: critical role of Glu175 in the control of luminescence decay / Saman Hosseinkhani, Rose Szittner, Edward A Meighen // *Biochemical Journal*. — 2005. — Vol. 385, № 2. — P. 575–580.

37. *Madvar, Ali Riahi*. Critical role of Glu175 on stability and folding of bacterial luciferase: stopped-flow fluorescence study / Ali Riahi Madvar, Hossein Naderi-Manesh // *J. Biochem. Mol. Biol*. — 2007. — Vol. 40. — P. 453–458.

38. *Chen, Lorenzo H*. Random and site-directed mutagenesis of bacterial luciferase: investigation of the aldehyde binding site. / Lorenzo H Chen, Thomas O Baldwin // *Biochemistry*. — 1989. — Vol. 28, № 6. — P. 2684–2689.

39. *Lee, John*. Bioluminescence, the Nature of the Light / John Lee. — University of Georgia, 2016.

40. *Stewart, David E.* Occurrence and role ofcis peptide bonds in protein structures / David E Stewart, Atom Sarkar, John E Wampler // *Journal of molecular biology*. — 1990. — Vol. 214, № 1. — P. 253–260.

41. *Tinikul, Ruchanok*. Structure, Mechanism, and Mutation of Bacterial Luciferase / Ruchanok Tinikul, Pimchai Chaiyen // Bioluminescence: Fundamentals and Applications in Biotechnology-Volume 3. — Springer, 2014. — P. 47–74.

42. Crystal structure of long-chain alkane monooxygenase (LadA) in complex with coenzyme FMN: unveiling the long-chain alkane hydroxylase / Liu Li, Xueqian Liu, Wen Yang et al. // *Journal of molecular biology*. — 2008. — Vol. 376, № 2. — P. 453–465.

43. LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence / Sarayut Nijvipakul, Janewit Wongratana, Chutintorn Suadee et al. // *Journal of bacteriology*. — 2008. — Vol. 190, № 5. — P. 1531–1538.

44. *Crowley, Thomas E*. Expression, purification, and characterization of a recombinant flavin reductase from the luminescent marine bacterium Photobacterium leiognathi / Thomas E Crowley // *Biochemistry and Molecular Biology Education*. — 2010. — Vol. 38, № 3. — P. 151–160.

45. *Campbell, Zachary T*. Fre is the major flavin reductase supporting bioluminescence from Vibrio harveyi luciferase in Escherichia coli / Zachary T Campbell, Thomas O Baldwin // *Journal of Biological Chemistry*. — 2009. — Vol. 284, № 13. — P. 8322–8328.

46. *Zenno, Shuhei*. Identification of the genes encoding NAD (P) H-flavin oxidoreductases that are similar in sequence to Escherichia coli Fre in four species of luminous bacteria: Photorhabdus luminescens, Vibrio fischeri, Vibrio harveyi, and Vibrio orientalis. / Shuhei Zenno, Kaoru Saigo // *Journal of bacteriology*. — 1994. — Vol. 176, № 12. — P. 3544–3551.

47. Flavin Reductase P: Structure of a Dimeric Enzyme That Reduces Flavin† / John J Tanner, Benfang Lei, Shiao-Chun Tu, Kurt L Krause // *Biochemistry*. — 1996. — Vol. 35, № 42. — P. 13531–13539.

48. Vibrio harveyi NADPH-flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme. / Benfang Lei, Mengyao Liu, Shouqin Huang, Shiao-Chun Tu // *Journal of bacteriology*. — 1994. — Vol. 176, № 12. — P. 3552–3558.

49. *Jablonski, Edward*. Purification and properties of the NADH and NADPH specific FMN oxidoreductases from Beneckea harveyi / Edward Jablonski, Marlene DeLuca // *Biochemistry*. — 1977. — Vol. 16, № 13. — P. 2932–2936.

50. *Izumoto, Yoshitaka*. Cloning and nucleotide sequence of the gene for NADH: FMN oxidoreductase from Vibrio harveyi / Yoshitaka Izumoto, Takashi Mori, Kazumi Yamamoto // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. — 1994. — Vol. 1185, № 2. — P. 243–246.

51. *Inouye, Satoshi*. NAD (P) H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, Vibrio fischeri ATCC 7744, is a flavoprotein / Satoshi Inouye // *FEBS letters*. — 1994. — Vol. 347, № 2-3. — P. 163–168.

52. Delineation of the transcriptional boundaries of the lux operon of Vibrio harveyi demonstrates the presence of two new lux genes. / E Swartzman, Carol Miyamoto, Angus Graham, E Meighen // *Journal of Biological Chemistry*. — 1990. — Vol. 265, № 6. — P. 3513–3517.

53. Characterization of the flavin reductase gene (fre) of Escherichia coli and construction of a plasmid for overproduction of the enzyme. / Giannis Spyrou, E Haggård-Ljungquist, M Krook et al. // *Journal of bacteriology*. — 1991. — Vol. 173, № 12. — P. 3673–3679.

54. The hemoglobin-like protein (HMP) of Escherichia coli has ferrisiderophore reductase activity and its C-terminal domain shares homology with ferredoxin NADP+ reductase / SC Andrew, D Shipley, JN Keen et al. // *FEBS Lett*. — 1992. — Vol. 302. — P. 247–252.

55. *Fontecave, Marc*. NAD (P) H: flavin oxidoreductase of Escherichia coli. A ferric iron reductase participating in the generation of the free radical of ribonucleotide reductase. / Marc Fontecave, Rolf Eliasson, Peter Reichard // *Journal of Biological Chemistry*. — 1987. — Vol. 262, № 25. — P. 12325–12331.

56. Structural Patterns Among The Diversity Of Flavin-Dependent Ooxidoreductases From Luminous Bacteria and E. Coli / AA Deeva, EA Temlyakova, AA Sorokin et al. // *The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology. Abstracts*. — P. 66.

57. Ferric iron reductase activity of LuxG from Photobacterium leiognathi / Eui Ho Lee, Ki Seok Nam, Seon Kwang Lee et al. // *Korean Journal of Microbiology*. — 2016. — Vol. 52, № 4. — P. 495–499.

58. *Pierre, JL*. Chemistry for an essential biological process: the reduction of ferric iron / JL Pierre, M Fontecave, RR Crichton // *Biometals*. — 2002. — Vol. 15, № 4. — P. 341–346.

59. *Ingelman, Margareta*. The three-dimensional structure of flavodoxin reductase from Escherichia coli at 1.7 Å resolution / Margareta Ingelman, Vera Bianchi, Hans Eklund // *Journal of molecular biology*. — 1997. — Vol. 268, № 1. — P. 147–157.

60. Crystal structure of NAD (P) H: flavin oxidoreductase from Escherichia coli / Margareta Ingelman, S Ramaswamy, Vincent Nivière et al. // *Biochemistry*. — 1999. — Vol. 38, № 22. — P. 7040–7049.

61. *Nijvipakul, Sarayut*. Reduction kinetics of a flavin oxidoreductase LuxG from Photobacterium leiognathi (TH1): half-sites reactivity / Sarayut Nijvipakul, David P Ballou, Pimchai Chaiyen // *Biochemistry*. — 2010. — Vol. 49, № 43. — P. 9241–9248.

62. Is the NAD (P) H: flavin oxidoreductase from Escherichia coli a member of the ferredoxin-NADP+ reductase family? Evidence for the catalytic role of serine 49 residue / Vincent Nivière, Franck Fieschi, Jean-Luc Décout, Marc Fontecave // *Journal of Biological Chemistry*. — 1996. — Vol. 271, № 28. — P. 16656–16661.

63. *Karplus, P Andrew*. Atomic structure of ferredoxin-NADP+ reductase: prototype for a structurally novel flavoenzyme family / P Andrew Karplus, Mark J Daniels, Jon R Herriott // *Science*. — 1991. — Vol. 251, № 4989. — P. 60–67.

64. The mechanism and substrate specificity of the NADPH: flavin oxidoreductase from Escherichia coli / Franck Fieschi, Vincent Nivière, Christelle Frier et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 1995. — Vol. 270, № 51. — P. 30392–30400.

65. FAD Is a Preferred Substrate and an Inhibitor ofEscherichia coli General NAD (P) H: Flavin Oxidoreductase / Tai Man Louie, Haw Yang, Pallop Karnchanaphanurach et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2002. — Vol. 277, № 42. — P. 39450–39455.

66. 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 flavoproteins1 / Hideaki Koike, Hiroshi Sasaki, Toshiro Kobori et al. // *Journal of molecular biology*. — 1998. — Vol. 280, № 2. — P. 259–273.

67. Unusual folded conformation of nicotinamide adenine dinucleotide bound to flavin reductase P / John J Tanner, Shiao-Chun Tu, Leonard J Barbour et al. // *Protein science*. — 1999. — Vol. 8, № 9. — P. 1725–1732.

68. *Jeffers, Christopher E*. Differential transfers of reduced flavin cofactor and product by bacterial flavin reductase to luciferase / Christopher E Jeffers, Shiao-Chun Tu // *Biochemistry*. — 2001. — Vol. 40, № 6. — P. 1749–1754.

69. *Jeffers, Christopher E*. Complex formation between Vibrio harveyi luciferase and monomeric NADPH: FMN oxidoreductase / Christopher E Jeffers, Jeffry C Nichols, Shiao-Chun Tu // *Biochemistry*. — 2003. — Vol. 42, № 2. — P. 529–534.

70. *Wang, He*. Vibrio harveyi NADPH- FMN oxidoreductase Arg203 as a critical residue for NADPH recognition and binding / He Wang, Benfang Lei, Shiao-Chun Tu // *Biochemistry*. — 2000. — Vol. 39, № 26. — P. 7813–7819.

71. A single-residue mutation destabilizes Vibrio harveyi flavin reductase FRP dimer / Navneet Jawanda, Jerry Ebalunode, Alexey Gribenko et al. // *Archives of biochemistry and biophysics*. — 2008. — Vol. 472, № 1. — P. 51–57.

72. *Ellis, Holly R*. The FMN-dependent two-component monooxygenase systems / Holly R Ellis // *Archives of biochemistry and biophysics*. — 2010. — Vol. 497, № 1-2. — P. 1–12.

73. Flavin dependent monooxygenases / Mieke ME Huijbers, Stefania Montersino, Adrie H Westphal et al. // *Archives of biochemistry and biophysics*. — 2014. — Vol. 544. — P. 2–17.

74. Genome and proteome of long-chain alkane degrading Geobacillus thermodenitrificans NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir / Lu Feng, Wei Wang, Jiansong Cheng et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2007. — Vol. 104, № 13. — P. 5602–5607.

75. The Escherichia coli ssuEADCB gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl / Jan R van der Ploeg, Roksana Iwanicka-Nowicka, Tomasz Bykowski et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 1999. — Vol. 274, № 41. — P. 29358–29365.

76. *van der Ploeg, Jan R*. Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in Escherichia coli / Jan R van der Ploeg, Eric Eichhorn, Thomas Leisinger // *Archives of microbiology*. — 2001. — Vol. 176, № 1-2. — P. 1–8.

77. *Eichhorn, Eric*. Characterization of a two-component alkanesulfonate monooxygenase from Escherichia coli / Eric Eichhorn, Jan R van der Ploeg, Thomas Leisinger // *Journal of Biological Chemistry*. — 1999. — Vol. 274, № 38. — P. 26639–26646.

78. *Sucharitakul, Jeerus*. Mechanisms of reduced flavin transfer in the two-component flavin-dependent monooxygenases / Jeerus Sucharitakul, Ruchanok Tinikul, Pimchai Chaiyen // *Archives of biochemistry and biophysics*. — 2014. — Vol. 555. — P. 33–46.

79. Kinetics of a two-component p-hydroxyphenylacetate hydroxylase explain how reduced flavin is transferred from the reductase to the oxygenase / Jeerus Sucharitakul, Thanawat Phongsak, Barrie Entsch et al. // *Biochemistry*. — 2007. — Vol. 46, № 29. — P. 8611–8623.

80. *Abdurachim, Kholis*. Detection of protein-protein interactions in the alkanesulfonate monooxygenase system from Escherichia coli / Kholis Abdurachim, Holly R Ellis // *Journal of bacteriology*. — 2006. — Vol. 188, № 23. — P. 8153–8159.

81. *Yan, Yuling*. Analysis of protein interactions using fluorescence technologies / Yuling Yan, Gerard Marriott // *Current opinion in chemical biology*. — 2003. — Vol. 7, № 5. — P. 635–640.

82. Energy Transfer Evidence for In Vitro and In Vivo Complexes of Vibrio harveyi Flavin Reductase P and Luciferase.

83. The transfer of reduced flavin mononucleotide from LuxG oxidoreductase to luciferase occurs via free diffusion / Ruchanok Tinikul, Warintra Pitsawong, Jeerus Sucharitakul et al. // *Biochemistry*. — 2013. — Vol. 52, № 39. — P. 6834–6843.

84. *Gao, Benlian*. Altered mechanism of the alkanesulfonate FMN reductase with the monooxygenase enzyme / Benlian Gao, Holly R Ellis // *Biochemical and biophysical research communications*. — 2005. — Vol. 331, № 4. — P. 1137–1145.

85. Mechanism of flavin transfer and oxygen activation by the two-component flavoenzyme styrene monooxygenase / Auric Kantz, Franklin Chin, Nagamani Nallamothu et al. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 2005. — Vol. 442, № 1. — P. 102–116.

86. Functional analysis of the small component of the 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase of Escherichia coli W: a prototype of a new flavin: NAD (P) H reductase subfamily / Beatriz Galán, Eduardo Díaz, María A Prieto, José L García // *Journal of bacteriology*. — 2000. — Vol. 182, № 3. — P. 627–636.

87. Studies on the mechanism of p-hydroxyphenylacetate 3-hydroxylase from Pseudomonas aeruginosa: a system composed of a small flavin reductase and a large flavin-dependent oxygenase / Sumita Chakraborty, Mariliz Ortiz-Maldonado, Barrie Entsch, David P Ballou // *Biochemistry*. — 2009. — Vol. 49, № 2. — P. 372–385.

88. Mechanism and regulation of the two-component FMN-dependent monooxygenase ActVA-ActVB from Streptomyces coelicolor / Julien Valton, Carole Mathevon, Marc Fontecave et al. // *Journal of Biological Chemistry*. — 2008. — Vol. 283, № 16. — P. 10287–10296.

89. *Gong, Feng*. Combination of chemical cross-linking and pull-down assay to study transient protein-protein interactions / Feng Gong, Deirdre Fahy, Michael J. Smerdon // *Protocol Exchange*. — 2006.

90. Biochemical characterization of StyAB from Pseudomonas sp. strain VLB120 as a two-component flavin-diffusible monooxygenase / Katja Otto, Karin Hofstetter, Martina Röthlisberger et al. // *Journal of bacteriology*. — 2004. — Vol. 186, № 16. — P. 5292–5302.

91. StyA1 and StyA2B from Rhodococcus opacus 1CP: a multifunctional styrene monooxygenase system / Dirk Tischler, René Kermer, Janosch AD Gröning et al. // *Journal of bacteriology*. — 2010. — Vol. 192, № 19. — P. 5220–5227.

92. *Meighen, Edward A*. Molecular biology of bacterial bioluminescence. / Edward A Meighen // *Microbiological reviews*. — 1991. — Vol. 55, № 1. — P. 123–142.

93. *Lei, Benfang*. Mechanism of reduced flavin transfer from Vibrio harveyi NADPH- FMN oxidoreductase to luciferase / Benfang Lei, Shiao-Chun Tu // *Biochemistry*. — 1998. — Vol. 37, № 41. — P. 14623–14629.

94. *Lonshakova-Mukina, Victoria*. Impact of enzyme stabilizers on the characteristics of biomodules for bioluminescent biosensors / Victoria Lonshakova-Mukina, Elena Esimbekova, Valentina Kratasyuk // *Sensors and Actuators B: Chemical*. — 2015. — Vol. 213. — P. 244–247.

95. Inhibition effect of food preservatives on endoproteinases / Elena N Esimbekova, Anastasiya A Asanova, Anna A Deeva, Valentina A Kratasyuk // *Food chemistry*. — 2017. — Vol. 235. — P. 294–297.

96. *A Kratasyuk, Valentina*. Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology / Valentina A Kratasyuk, Elena N Esimbekova // *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. — 2015. — Vol. 18, № 10. — P. 952–959.

97. Bioluminescence in analytical chemistry and in vivo imaging / Aldo Roda, Massimo Guardigli, Elisa Michelini, Mara Mirasoli // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. — 2009. — Vol. 28, № 3. — P. 307–322.

98. Metal-enhanced luminescence: Current trend and future perspectives-A review / Rajeev Ranjan, Elena N Esimbekova, Maria A Kirillova, Valentina A Kratasyuk // *Analytica chimica acta*. — 2017. — Vol. 971. — P. 1–13.

99. *Tu, SHIAO-CHUN*. Physical interaction and activity coupling between two enzymes induced by immobilization of one / SHIAO-CHUN Tu, J Woodland Hastings // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1980. — Vol. 77, № 1. — P. 249–252.

100. Crystal structures of the lumazine protein from Photobacterium kishitanii in complexes with the authentic chromophore 6,7-dimethyl-8-(1'-D-ribityl) lumazine, and its analogues, riboflavin and flavin mononucleotide, at high resolution / Yuichi Sato, Satoshi Shimizu, Akashi Ohtaki et al. // *Journal of bacteriology*. — 2010. — Vol. 192, № 1. — P. 127–133.

101. *Coordinators, NCBI Resource*. Database resources of the national center for biotechnology information / NCBI Resource Coordinators // *Nucleic acids research*. — 2016. — Vol. 44, № Database issue. — P. D7.

102. Basic local alignment search tool / Stephen F Altschul, Warren Gish, Webb Miller et al. // *Journal of molecular biology*. — 1990. — Vol. 215, № 3. — P. 403–410.

103. GenBank / Dennis A Benson, Mark Cavanaugh, Karen Clark et al. // *Nucleic acids research*. — 2012. — Vol. 41, № D1. — P. D36–D42.

104. The protein data bank, 1999– / Helen M Berman, John Westbrook, Zukang Feng et al. // International Tables for Crystallography Volume F: Crystallography of biological macromolecules. — Springer, 2006. — P. 675–684.

105. *Consortium, UniProt*. UniProt: the universal protein knowledgebase / UniProt Consortium // *Nucleic acids research*. — 2016. — Vol. 45, № D1. — P. D158–D169.

106. The PIR-international protein sequence database / Winona C Barker, John S Garavelli, Peter B McGarvey et al. // *Nucleic Acids Research*. — 1999. — Vol. 27, № 1. — P. 39–43.

107. *Xu, Dong*. Protein databases on the internet / Dong Xu, Ying Xu // *Current protocols in molecular biology*. — 2004. — Vol. 68, № 1. — P. 19–4.

108. *Katoh, K*. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability / K Katoh, DM Standley // *Molecular Biology and Evolution*. — 2013. — Vol. 30, № 4. — P. 772–780.

109. ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution / D Darriba, GL Taboada, R Doallo, D Posada // *Bioinformatics*. — 2011. — Vol. 27, № 8. — P. 1164–1165.

110. *Le, Si Quang*. An improved general amino acid replacement matrix / Si Quang Le, Olivier Gascuel // *Molecular biology and evolution*. — 2008. — Vol. 25, № 7. — P. 1307–1320.

111. *Dayhoff, MO*. 22 a model of evolutionary change in proteins / MO Dayhoff, RM Schwartz, BC Orcutt // *Atlas of protein sequence and structure*. — 1978. — P. 345–352.

112. *Guindon, Stéphane*. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood / Stéphane Guindon, Olivier Gascuel // *Systematic biology*. — 2003. — Vol. 52, № 5. — P. 696–704.

113. Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis / Anna A Deeva, Evgenia A Temlyakova, Anatoly A Sorokin et al. // *Bioinformatics*. — 2016. — Vol. 32, № 20. — P. 3053–3057.

114. *Ronquist, Fredrik*. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models / Fredrik Ronquist, John P Huelsenbeck // *Bioinformatics*. — 2003. — Vol. 19, № 12. — P. 1572–1574.

115. Detection of significant protein coevolution / David Ochoa, David Juan, Alfonso Valencia, Florencio Pazos // *Bioinformatics*. — 2015. — Vol. 31, № 13. — P. 2166–2173.

116. *Letunic, Ivica*. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation / Ivica Letunic, Peer Bork // *Bioinformatics*. — 2006. — Vol. 23, № 1. — P. 127–128.

117. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench / Andrew M Waterhouse, James B Procter, David MA Martin et al. // *Bioinformatics*. — 2009. — Vol. 25, № 9. — P. 1189–1191.

118. CDD: NCBI's conserved domain database / Aron Marchler-Bauer, Myra K Derbyshire, Noreen R Gonzales et al. // *Nucleic acids research*. — 2014. — Vol. 43, № D1. — P. D222–D226.

119. *Chakraborty, Abhijit*. A survey on prediction of specificity-determining sites in proteins / Abhijit Chakraborty, Saikat Chakrabarti // *Briefings in Bioinformatics*. — 2014. — Vol. 16, № 1. — P. 71–88.

120. Disentangling evolutionary signals: conservation, specificity determining positions and coevolution. Implication for catalytic residue prediction / Elin Teppa, Angela D Wilkins, Morten Nielsen, Cristina Marino Buslje // *BMC bioinformatics*. — 2012. — Vol. 13, № 1. — P. 235.

121. An update of DIVERGE software for functional divergence analysis of protein family / Xun Gu, Yangyun Zou, Zhixi Su et al. // *Molecular biology and evolution*. — 2013. — Vol. 30, № 7. — P. 1713–1719.

122. The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data / Helen Berman, Kim Henrick, Haruki Nakamura, John L Markley // *Nucleic acids research*. — 2006. — Vol. 35, № suppl_1. — P. D301–D303.

123. *Webb, Benjamin*. Comparative protein structure modeling using MODELLER / Benjamin Webb, Andrej Sali // *Current protocols in bioinformatics*. — 2014. — Vol. 47, № 1. — P. 5–6.

124. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations / Bernard R Brooks, Robert E Bruccoleri, Barry D Olafson et al. // *Journal of computational chemistry*. — 1983. — Vol. 4, № 2. — P. 187–217.

125. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information / Marco Biasini, Stefan Bienert, Andrew Waterhouse et al. // *Nucleic acids research*. — 2014. — Vol. 42, № W1. — P. W252–W258.

126. *Fan, Hao*. Refinement of homology-based protein structures by molecular dynamics simulation techniques / Hao Fan, Alan E Mark // *Protein Science*. — 2004. — Vol. 13, № 1. — P. 211–220.

127. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / Mark James Abraham, Teemu Murtola, Roland Schulz et al. // *SoftwareX*. — 2015. — Vol. 1. — P. 19–25.

128. *Huang, Jing*. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data / Jing Huang, Alexander D MacKerell Jr // *Journal of computational chemistry*. — 2013. — Vol. 34, № 25. — P. 2135–2145.

129. *Laskowski, RA*. PROCHECK: validation of protein structure coordinates / RA Laskowski, MW MacArthur, JM Thornton // *International tables of crystallography, volume F. Crystallography of biological macromolecules*. — 2001. — P. 722–725.

130. CHARMM: the biomolecular simulation program / Bernard R Brooks, Charles L Brooks III, Alexander D Mackerell Jr et al. // *Journal of computational chemistry*. — 2009. — Vol. 30, № 10. — P. 1545–1614.

131. Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR / Samir Unni, Yong Huang, Robert M Hanson et al. // *Journal of computational chemistry*. — 2011. — Vol. 32, № 7. — P. 1488–1491.

132. *You, Tony*. An analytical algorithm for the rapid determination of the solvent accessibility of points in a three-dimensional lattice around a solute molecule / Tony You, Donald Bashford // *Journal of Computational Chemistry*. — 1995. — Vol. 16, № 6. — P. 743–757.

133. Investigating the mechanisms of photosynthetic proteins using continuum electrostatics / G Matthias Ullmann, Edda Kloppmann, Timm Essigke et al. // *Photosynthesis research*. — 2008. — Vol. 97, № 1. — P. 33.

134. *Ullmann, G Matthias*. Computational simulation and analysis of dynamic association between plastocyanin and cytochrome f. Consequences for the electron-transfer reaction / G Matthias Ullmann, Ernst-Walter Knapp, Nenad M Kostić // *Journal of the American Chemical Society*. — 1997. — Vol. 119, № 1. — P. 42–52.

135. *Metropolis, Nicholas*. The monte carlo method / Nicholas Metropolis, Stanislaw Ulam // *Journal of the American statistical association*. — 1949. — Vol. 44, № 247. — P. 335–341.

136. *Humphrey, William*. VMD: visual molecular dynamics / William Humphrey, Andrew Dalke, Klaus Schulten // *Journal of molecular graphics*. — 1996. — Vol. 14, № 1. — P. 33–38.

137. Differences of the active site structure as revealed by sequence analysis of slow and fast bacterial luciferases / Anna A Deeva, Evgenia A Temlyakova, Elena V Nemtseva et al. // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. — 2015. — Vol. 33, № sup1. — P. 115–116.

138. *Katsev, Andrey M*. Effects of hydrogen peroxide on light emission by various strains of marine luminescent bacteria / Andrey M Katsev, Grzegorz Węgrzyn, Hanna Szpilewska // *Journal of basic microbiology*. — 2004. — Vol. 44, № 3. — P. 178–184.

139. *Sevier, Carolyn S*. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells / Carolyn S Sevier, Chris A Kaiser // *Nature reviews Molecular cell biology*. — 2002. — Vol. 3, № 11. — P. 836–847.

140. *Bredenberg, Johan*. Modeling zinc sulfhydryl bonds in zinc fingers / Johan Bredenberg, Lennart Nilsson // *International Journal of Quantum Chemistry*. — 2001. — Vol. 83, № 3-4. — P. 230–244.

141. Old, new and emerging functions of caspases / Sonia Shalini, L Dorstyn, S Dawar, S Kumar // *Cell Death & Differentiation*. — 2015. — Vol. 22, № 4. — P. 526–539.

142. *O'Grady, Elizabeth A*. Mutations in the lux operon of natural dark mutants in the genus Vibrio / Elizabeth A O'Grady, Charles F Wimpee // *Applied and environmental microbiology*. — 2008. — Vol. 74, № 1. — P. 61–66.

143. Photobacterium piscicola sp. nov., isolated from marine fish and spoiled packed cod / Marian J Figge, Ilse Cleenwerck, Astrid van Uijen et al. // *Systematic and applied microbiology*. — 2014. — Vol. 37, № 5. — P. 329–335.

144. Vibrio lentus sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. / MC Macián, W Ludwig, R Aznar et al. // *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. — 2001. — Vol. 51, № 4. — P. 1449–1456.

145. Comparative genomic analysis reveals evidence of two novel Vibrio species closely related to V. cholerae / Bradd J Haley, Christopher J Grim, Nur A Hasan et al. // *BMC microbiology*. — 2010. — Vol. 10, № 1. — P. 154.

146. *Forst, Steven*. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria Xenorhabdus spp. and Photorhabdus spp. / Steven Forst, Kenneth Nealson // *Microbiological reviews*. — 1996. — Vol. 60, № 1. — P. 21.

147. *Деева, АА*. Роль электростатических взаимодействий в формировании комплекса между бактериальной люциферазой и NADPH: FMN-оксидоредуктазой / АА Деева, ЕВ Немцева, ВА Кратасюк // *Журнал СФУ. Биология*. — 2018. — Vol. 11, № 1. — P. 16–29.

148. *Campbell, Zachary T*. Analysis of the bacterial luciferase mobile loop by replica-exchange molecular dynamics / Zachary T Campbell, Thomas O Baldwin, Osamu Miyashita // *Biophysical journal*. — 2010. — Vol. 99, № 12. — P. 4012–4019.

149. Effect of viscosity on efficiency of enzyme catalysis of bacterial luciferase coupled with lactate dehydrogenase and NAD (P) H: FMN-Oxidoreductase / Oleg S Sutormin, Irina E Sukovataya, Shubhra Pande, Valentina A Kratasyuk // *Molecular Catalysis*. — 2018. — Vol. 458. — P. 60–66.

Приложение А

Материалы и методы

Таблица А.1: Аминокислотные последовательности, использованные для реконструкции филогенетического дерева LuxG и Fre оксидоредуктаз.

				Photobacterium leiognathi LuxG			*Vibrio harveyi* LuxG		
№	ID	Белок	Организм	Идентичность, %	Длина выравнивания	e-value	Идентичность, %	Длина выравнивания	e-value
1	AAA25621.1	LuxG	*Photobacterium leiognathi*	100.000	234	1.60e-172	40.870	230	1.78e-60
2	ABX76833.1	LuxG	*Photobacterium leiognathi subsp. mandapamensis*	92.735	234	3.63e-162	43.043	230	2.33e-63
3	ABX64426.1	LuxG	*Photobacterium leiognathi*	89.451	237	5.18e-155	42.060	233	6.90e-60
4	OBU43522.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium damselae*	90.598	234	2.88e-148	41.739	230	2.80e-54
5	KPA53110.1	FMN reductase	*Photobacterium leiognathi subsp. mandapamensis*	80.687	233	1.30e-142	41.558	231	1.99e-59
6	GAA05716.1	NAD(P)H-flavin reductase (luxG)	*Photobacterium leiognathi subsp. mandapamensis svers.1.1.*	80.258	233	1.62e-142	40.693	231	1.79e-58
7	AFK80965.1	putative flavin reductase	*Photobacterium aquimaris*	76.395	233	1.07e-132	41.991	231	3.62e-59

8	OBU15698.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium aquimaris*	67.811	233	7.19e-120	39.394	231	1.01e-55
9	ABU50704.1	LuxG	*Photobacterium kishitanii*	66.953	233	1.80e-118	38.961	231	7.69e-56
10	ABU98294.1	LuxG	*Photobacterium phosphoreum*	66.524	233	4.21e-116	38.961	231	2.62e-54
11	SKC31586.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium piscicola*	65.665	233	4.90e-115	40.851	235	1.56e-55
12	ACA87900.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Shewanella woodyi ATCC 51908*	55.128	234	7.20e-92	44.397	232	2.20e-63
13	AAM46723.1	luxG	*Aliivibrio salmonicida*	55.128	234	6.00e-91	45.064	233	3.19e-67
14	OCH23194.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Aliivibrio logei*	55.556	234	1.30e-90	45.494	233	6.22e-68
15	AAW87988.1	NAD(P)H-dependent FMN reductase LuxG	*Vibrio fischeri ES114*	53.617	235	6.27e-84	46.119	219	7.16e-59
16	BAB40799.1	hypothetical protein	*Shewanella hanedai*	52.766	235	1.52e-82	45.923	233	5.61e-67
17	EHN68290.1	LuxG FMN reductase	*Vibrio fischeri SR5*	51.695	236	2.69e-82	42.727	220	1.13e-50

18	OBU20659.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium aquimaris*	46.809	235	1.67e-73	43.534	232	2.20e-63
19	CEO37770.1	flavin reductase	*Photobacterium phosphoreum ANT-2200*	46.809	235	6.96e-73	43.534	232	1.11e-63
20	KJF84939.1	FMN reductase	*Photobacterium phosphoreum*	46.809	235	7.85e-73	43.534	232	5.38e-63
21	GAD31171.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium leiognathi lrivu.4.1*	45.532	235	1.46e-72	43.966	232	3.56e-65
22	OLQ95795.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio ponticus*	45.339	236	2.63e-72	39.914	233	1.43e-54
23	KGK09850.1	FMN reductase	*Vibrio navarrensis*	44.492	236	2.72e-72	42.060	233	3.09e-59
24	KJG13958.1	FMN reductase	*Photobacterium iliopiscarium*	45.532	235	3.57e-72	43.534	232	7.62e-63
25	SKC34395.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium piscicola*	46.383	235	4.03e-72	43.966	232	1.63e-63
26	KJG06683.1	FMN reductase	*Photobacterium kishitanii*	46.383	235	4.59e-72	43.103	232	8.59e-63
27	EAS62528.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium angustum S14*	46.383	235	5.41e-72	42.672	232	3.31e-62
28	KII78714.1	FMN reductase	*Vibrio renipiscarius*	44.068	236	5.90e-72	39.485	233	4.83e-54
29	KLV07360.1	FMN reductase	*Photobacterium aquae*	44.681	235	7.02e-72	45.259	232	1.96e-65
30	KYN84804.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio cidicii*	44.492	236	8.92e-72	42.060	233	1.56e-59
31	EEZ42141.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium damselae subsp. Damselae CIP 102761*	45.923	233	1.19e-71	43.162	234	8.37e-62

32	SKA19203.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium sp. H01100410B*	45.106	235	1.43e-71	43.966	232	1.06e-63
33	SJN15399.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. JB196*	44.726	237	1.57e-71	39.914	233	5.76e-55
34	ANU37975.1	Aquacobalamin reductase	*Vibrio scophthalmi*	44.915	236	2.18e-71	40.343	233	2.75e-56
35	KDM92392.1	FMN reductase	*Photobacterium galatheae*	44.255	235	1.59e-70	44.828	232	1.21e-65
36	KEY90296.1	flavin reductase luxG	*Candidatus Photodesmus katoptron*	46.581	234	2.80e-70	40.693	231	5.26e-67
37	KMV28964.1	FMN reductase	*Photobacterium swingsii*	43.830	235	3.88e-70	43.103	232	3.38e-62
38	KLV05776.1	FMN reductase	*Photobacterium ganghwense*	43.404	235	5.21e-70	43.103	232	5.87e-63
39	EGU36840.1	FMN reductase	*Vibrio ichthyoenteri ATCC 700023*	44.915	236	5.74e-70	39.914	233	2.49e-54
40	OLQ78186.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium sp. 13-12*	43.404	235	7.30e-70	43.534	232	9.17e-63
41	KGY10897.1	FMN reductase	*Vibrio tubiashii*	44.492	236	8.05e-70	40.343	233	1.67e-56
42	OLQ96082.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio panuliri*	44.492	236	1.01e-69	42.060	233	3.94e-57
43	SDH56305.1	aquacobalamin reductase	*Vibrio xiamenensis*	44.068	236	1.20e-69	39.485	233	1.05e-54
44	ADT85292.1	FMN reductase	*Vibrio furnissii NCTC 11218*	42.797	236	4.55e-69	39.914	233	5.82e-56
45	ELR64089.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium marinum*	42.979	235	4.86e-69	44.828	232	8.23e-65

46	KOR99632.1	FMN reductase	*Vibrio vulnificus*	44.492	236	5.02e-69	39.056	233	3.57e-56
47	OAN16925.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium jeanii*	42.979	235	5.79e-69	44.828	232	7.63e-65
48	KLV01547.1	FMN reductase	*Photobacterium aphoticum*	44.681	235	7.69e-69	45.259	232	9.80e-65
49	KHT60521.1	FMN reductase	*Photobacterium gaetbulicola*	43.830	235	7.77e-69	44.828	232	1.87e-63
50	OIN25389.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio barjaei*	43.644	236	1.27e-68	38.197	233	5.33e-58
51	EDL51761.1	FMN reductase	*Vibrio shilonii AK1*	43.220	236	2.28e-68	38.197	233	1.82e-57
52	EEX35197.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio coralliilyticus ATCC BAA-450*	43.220	236	2.31e-68	40.343	233	4.20e-56
53	KFA99671.1	FMN reductase	*Vibrio sp. ER1A*	43.220	236	2.60e-68	38.197	233	7.00e-58
54	OAJ95473.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio bivalvicida*	43.644	236	3.89e-68	40.343	233	1.33e-56
55	KIP67430.1	FMN reductase	*Vibrio harveyi*	43.220	236	4.02e-68	39.914	233	2.01e-54
56	GAL23470.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio maritimus*	44.068	236	4.02e-68	40.343	233	2.15e-60
57	KLN63401.1	FMN reductase	*Vibrio sp. VPAP30*	43.644	236	4.34e-68	40.343	233	1.63e-56
58	ELU49742.1	FMN reductase	*Vibrio campbellii CAIM 519 = NBRC 15631*	43.644	236	5.00e-68	39.485	233	2.07e-54
59	EGA71952.1	FMN reductase	*Vibrio sinaloensis DSM 21326*	44.068	236	5.34e-68	39.485	233	1.11e-56
60	SBO13012.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio mediterranei*	43.220	236	5.46e-68	38.197	233	6.77e-58

61	OHY90924.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio rotiferianus*	43.644	236	5.96e-68	39.485	233	3.00e-54
62	KJY84352.1	FMN reductase	*Vibrio galatheae*	42.373	236	1.07e-67	39.914	233	2.58e-56
63	EKM26409.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. HENC-03*	43.220	236	1.12e-67	39.914	233	2.66e-54
64	OCP99643.1	FMN reductase	*Vibrio parahaemolyticus*	44.068	236	1.22e-67	39.485	233	8.61e-57
65	GAL29325.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio variabilis*	43.644	236	1.71e-67	40.343	233	1.95e-60
66	EAS41221.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium profundum 3TCK*	43.404	235	1.91e-67	45.259	232	1.69e-66
67	KOO14057.1	FMN reductase	*Vibrio xuii*	42.797	236	2.15e-67	-	-	-
68	EGU53880.1	FMN reductase	*Vibrio tubiashii ATCC 19109*	43.220	236	2.45e-67	39.914	233	1.01e-54
69	SEG72352.1	aquacobalamin reductase	*Vibrio hangzhouensi*	44.068	236	2.59e-67	40.171	234	2.58e-58
70	OAM98638.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio europaeus*	43.220	236	2.62e-67	39.914	233	5.76e-55
71	KIN09718.1	FMN reductase	*Vibrio mytili*	42.373	236	2.68e-67	39.056	233	3.88e-53
72	EEX95529.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio orientalis CIP 102891 = ATCC 33934*	42.797	236	3.56e-67	38.627	233	7.58e-52
73	SJL83467.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. CECT 9027*	43.644	236	6.00e-67	42.489	233	1.66e-60
74	EEY39649.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio mimicus MB-451*	42.797	236	7.07e-67	39.485	233	5.52e-54
75	OEF27209.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio rumoiensis 1S-45*	43.460	237	8.78e-67	40.773	233	1.50e-56
76	OSP09588.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio alginolyticus*	42.797	236	9.90e-67	40.343	233	4.95e-56

77	EEY98014.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. RC586*	43.220	236	9.91e-67	39.485	233	9.19e-54
78	KJY84324.1	FMN reductase	*Vibrio neptunius*	42.373	236	1.03e-66	41.202	233	8.24e-57
79	EDN56157.1	oxidoreductase	*Vibrio antiquarius*	42.797	236	1.90e-66	39.914	233	1.51e-54
80	SKA13030.1	aquacobalamin reductase	*Vibrio cincinnatiensis DSM 19608*	44.304	237	3.46e-66	38.197	233	1.01e-50
81	EGA64738.1	FMN reductase	*Vibrio brasiliensis LMG 20546*	43.220	236	6.37e-66	39.485	233	8.98e-55
82	EPP19512.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio fluvialis PG41*	41.525	236	6.95e-66	39.744	234	1.10e-54
83	EGF42231.1	FMN reductase	*Vibrio parahaemolyticus 10329*	42.797	236	7.92e-66	40.343	233	1.26e-56
84	KOY43920.1	FMN reductase	*Vibrio parahaemolyticus*	42.797	236	8.64e-66	39.485	233	4.20e-54
85	KIP69433.1	FMN reductase	*Vibrio harveyi*	42.609	230	9.37e-66	82.403	233	3.89e-145
86	GAD77521.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio azureus NBRC 104587*	41.772	237	1.46e-65	39.914	233	9.39e-57
87	KEY59146.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Serratia sp DD3*	42.918	233	1.56e-65	40.086	232	7.06e-57
88	KLI72276.1	FMN reductase	*Vibrio alginolyticus*	42.373	236	2.00e-65	39.914	233	7.15e-55
89	KKD00171.1	FMN reductase	*Photobacterium halotolerans*	42.128	235	2.00e-65	43.534	232	1.13e-62
90	GAJ74048.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. JCM 18904*	43.277	238	2.25e-65	40.171	234	1.54e-53
91	ANO34007.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio breoganii*	44.492	236	2.46e-65	41.631	233	4.48e-53

92	EEY46491.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio mimicus VM223*	42.373	236	3.23e-65	40.343	233	6.16e-55
93	EGU61225.1	FMN reductase	*Vibrio nigripulchritudo ATCC 27043*	43.644	236	3.30e-65	40.773	233	7.96e-54
94	KOE77948.1	FMN reductase	*Vibrio alginolyticus*	44.068	236	3.97e-65	40.343	233	6.29e-51
95	KHT41488.1	FMN reductase	*Vibrio sinaloensis*	41.102	236	4.19e-65	37.768	233	7.28e-53
96	ANP75241.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio crassostreae 9CS106*	42.797	236	4.38e-65	40.773	233	5.70e-56
97	GAD69438.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio proteolyticus NBRC 13287*	42.797	236	5.94e-65	38.197	233	2.78e-51
98	OEF86504.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio splendidus 12E03*	42.373	236	7.97e-65	40.343	233	8.24e-56
99	KDO13991.1	FMN reductase	*Vibrio metoecus*	41.949	236	1.11e-64	39.056	233	8.87e-53
100	EPM42076.1	FMN reductase	*Vibrio natriegens NBRC 15636 = ATCC 14048 = 759*	41.949	236	1.22e-64	38.627	233	4.43e-54
101	AEX23490.1	FMN reductase	*Vibrio sp. EJY3*	41.949	236	1.60e-64	38.627	233	8.40e-54
102	SBT14586.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio celticus*	42.373	236	1.62e-64	39.914	233	9.80e-55
103	KHD24118.1	FMN reductase	*Vibrio caribbeanicus*	41.102	236	1.84e-64	37.768	233	9.97e-53
104	GAD81397.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio ezurae NBRC 102218*	45.339	236	1.87e-64	-	-	-
105	EEX35696.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio metschnikovii CIP 69.14*	44.068	236	1.90e-64	40.343	233	1.66e-52

106	GAM72442.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. JCM 19236*	44.915	236	2.06e-64	-	-	-
107	OEE79426.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio genomosp. F6 str. FF-238*	42.797	236	2.73e-64	39.485	233	3.72e-54
108	EDP57835.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. AND4*	43.038	237	3.01e-64	39.485	233	8.31e-54
109	KXF82669.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterovibrio coralii*	41.667	240	3.17e-64	43.830	235	3.02e-62
110	ELU50290.1	FMN reductase	*Vibrio campbellii CAIM 519 = NBRC 15631*	43.043	230	5.62e-64	95.708	233	3.85e-167
111	KOO05598.1	FMN reductase	*Vibrio hepatarius*	42.797	236	7.18e-64	39.485	233	1.38e-53
112	SBS66645.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio atlanticus*	41.949	236	7.92e-64	39.485	233	1.09e-55
113	KWU00001.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio toranzoniae*	41.525	236	9.33e-64	39.485	233	3.81e-54
114	GAD91039.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio halioticoli NBRC 102217*	45.763	236	9.34e-64	-	-	-
115	AEH31595.1	NAD(P)H-dependent FMN reductase	*Vibrio anguillarum 775*	42.979	235	9.98e-64	38.362	232	3.13e-52
116	OBT12921.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. UCD-FRSSP16 30*	43.220	236	1.03e-63	-	-	-
117	OMO35528.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. 10N.261.45.E1*	41.525	236	1.06e-63	39.485	233	1.07e-54
118	KOO03006.1	FMN reductase	*Vibrio nereis*	41.525	236	1.10e-63	39.056	233	4.63e-54
119	KZX68281.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. HI00D65*	41.525	236	1.19e-63	39.914	233	2.58e-55
120	ODA30874.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterovibrio pacificus*	40.586	239	1.33e-63	39.149	235	2.80e-51

121	GAM78832.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio ishigakensis*	44.492	236	1.57e-63	-	-	-
122	OCH59939.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio lentus*	42.609	230	1.65e-63	71.674	233	1.50e-126
123	EAQ52133.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. MED222*	41.949	236	1.81e-63	39.914	233	8.15e-56
124	OEE35873.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio ordalii FS-238*	42.979	235	1.84e-63	38.362	232	3.34e-52
125	EGS72709.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio cholerae BJG-01*	41.949	236	1.87e-63	39.485	233	1.10e-51
126	KPL96830.1	FMN reductase	*Vibrio splendidus*	41.949	236	3.19e-63	39.914	233	4.44e-55
127	EHD19679.1	Aquacobalamin reductase	*Brenneria sp. EniD312*	41.810	232	3.28e-63	39.224	232	2.45e-52
128	KQB06020.1	FMN reductase	*Vibrio metoecus*	41.525	236	3.45e-63	38.627	233	4.18e-52
129	CAV20334.1	Predicted flavodoxin oxidoreductases	*Vibrio tasmaniensis LGP32*	41.949	236	3.48e-63	39.485	233	6.01e-55
130	SHI14967.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio aerogenes CECT 7868*	43.644	236	4.10e-63	38.197	233	1.41e-50
131	OEE42287.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio ordalii FS-144*	42.979	235	4.63e-63	38.362	232	8.77e-52
132	OMQ20662.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Rahnella sp. J11-6*	42.060	233	5.53e-63	37.500	232	5.24e-52
133	OFJ28665.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio cholerae*	41.525	236	6.07e-63	39.485	233	7.76e-52
134	OCH67613.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio lentus*	41.949	236	8.78e-63	39.914	233	5.52e-56
135	KGR36820.1	FMN reductase	*Vibrio campbellii*	42.174	230	9.42e-63	97.425	233	1.65e-169
136	EOD81815.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Grimontia indica*	39.749	239	9.65e-63	41.909	241	1.41e-59

137	EEY73902.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Grimontia hollisae CIP 101886*	39.496	238	1.04e-62	42.324	241	7.45e-62
138	KFK92887.1	FMN reductase	*Serratia sp. Ag2*	42.060	233	1.42e-62	38.362	232	1.35e-53
139	CDG14916.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Serratia marcescens subsp. Marcescens Db11*	40.773	233	1.49e-62	38.793	232	1.10e-56
140	SHF95221.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio gazogenes DSM 21264*	43.096	239	1.76e-62	40.254	236	2.38e-57
141	ERM58944.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio cyclitrophicus FF75*	41.102	236	1.99e-62	39.914	233	7.72e-55
142	EEO03329.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio albensis VL426*	41.525	236	2.08e-62	39.485	233	1.28e-51
143	EXU74690.1	FMN reductase	*Erwinia mallotivora*	41.379	232	2.40e-62	40.086	232	1.09e-54
144	SJN58467.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio ruber DSM 16370*	43.096	239	2.87e-62	40.678	236	8.39e-59
145	OEE45583.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterovibrio calviensis FF-85*	40.167	239	3.13e-62	40.664	241	2.77e-58
146	KUI96963.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. MEBiC08052*	42.678	239	3.61e-62	40.678	236	8.96e-59
147	AHG20510.1	FMN reductase	*Chania multitudinisentens RB-25*	41.631	233	4.05e-62	38.362	232	2.68e-53
148	OCH01481.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Aliivibrio fischeri*	41.949	236	4.30e-62	41.631	233	1.93e-55
149	ABX76856.1	LuxG	*Vibrio vulnificus*	43.043	230	4.52e-62	75.107	233	3.67e-129

150	OAT26947.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Cosenzaea myxofaciens ATCC 19692*	42.060	233	5.03e-62	-	-	-
151	CZF85648.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Grimontia marina*	39.331	239	7.46e-62	41.909	241	1.26e-59
152	ABY56818.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. BCB494*	41.304	230	7.70e-62	93.562	233	7.83e-162
153	OIQ24935.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. MedPE-Swchi*	41.102	236	7.73e-62	39.485	233	1.29e-54
154	EMB49807.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio mimicus CAIM 602*	41.525	236	9.32e-62	40.773	233	2.34e-53
155	ORM79298.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea gaviniae*	40.086	232	1.04e-61	40.086	232	1.78e-54
156	CZF84318.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Grimontia celer*	38.912	239	1.07e-61	41.494	241	8.00e-60
157	ORM78271.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea deleyi*	41.202	233	1.63e-61	40.948	232	4.72e-57
158	SIO94458.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio sp. CECT 9026*	42.678	239	1.75e-61	40.254	236	1.38e-58
159	KGA56240.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Proteus vulgaris*	40.773	233	1.90e-61	38.362	232	7.42e-52
160	ORT48454.1	FMN reductase	*Vibrio sp. Qd031*	42.373	236	2.59e-61	39.914	233	1.88e-57
161	ORM79074.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea eucrina*	41.379	232	2.66e-61	39.224	232	2.26e-54
162	ABX76842.1	LuxG	*Vibrio orientalis CIP 102891 = ATCC 33934*	41.304	230	2.72e-61	93.562	233	3.33e-162
163	OFJ27323.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio cholerae*	45.378	238	2.83e-61	37.500	232	4.40e-54
164	AAA27537.1	luxG	*Vibrio harveyi*	41.304	230	2.97e-61	95.708	233	1.04e-164

165	AGB80612.1	2-polyprenylphenol hydroxylase-like oxidoreductase	*Serratia marcescens FGI94*	39.485	233	3.13e-61	37.931	232	6.55e-55
166	ANS40750.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Serratia plymuthica PRI-2C*	40.773	233	3.42e-61	38.362	232	1.42e-54
167	CDG18884.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Xenorhabdus doucetiae*	39.485	233	3.49e-61	37.931	232	1.84e-51
168	ERM09450.1	FMN reductase	*Pantoea agglomerans Tx10*	40.773	233	3.49e-61	40.517	232	1.49e-56
169	KOC88680.1	FMN reductase	*Erwinia iniecta*	40.948	232	3.57e-61	39.655	232	4.88e-54
170	AIX49918.1	FMN reductase	*Pantoea sp. PSNIH1*	41.379	232	3.57e-61	39.224	232	2.12e-54
171	AGU97355.1	NAD(P)H-dependent FMN reductase LuxG	*Vibrio campbellii ATCC BAA-1116*	41.739	230	3.65e-61	95.708	233	5.98e-167
172	KDN27589.1	FMN reductase	*Vibrio fortis*	39.407	236	3.70e-61	39.485	233	5.88e-55
173	ORM98582.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea septica*	39.914	233	3.73e-61	40.517	232	2.96e-56
174	SKA58699.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Enterovibrio nigricans DSM 22720*	39.331	239	4.12e-61	43.404	235	3.62e-60
175	ERK07210.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Serratia fonticola AU-P3(3)*	39.914	233	4.89e-61	39.655	232	6.69e-55
176	OQK58638.1	putative flavin reductase	*Vibrio vulnificus*	42.609	230	4.95e-61	75.107	233	2.31e-129
177	SIP74843.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Xenorhabdus innexi*	39.224	232	5.17e-61	38.362	232	1.28e-52
178	OEE63647.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterovibrio norvegicus FF-454*	39.749	239	5.23e-61	41.909	241	4.89e-61

179	CAQ77837.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Aliivibrio salmonicida LFI1238*	40.678	236	6.19e-61	40.343	233	7.57e-55
180	AGQ29094.1	FMN reductase	*Serratia liquefaciens ATCC 27592*	40.343	233	7.01e-61	37.931	232	2.80e-53
181	AEX54022.1	2-polyprenylphenol hydroxylase-like oxidoreductase	*Rahnella aquatilis CIP 78.65 = ATCC 33071*	38.793	232	9.29e-61	37.931	232	1.37e-53
182	OKP02669.1	CDP-6-deoxy-delta-3 4-glucoseen reductase	*Xenorhabdus eapokensis*	39.914	233	1.07e-60	38.793	232	3.74e-52
183	AIX75179.1	FMN reductase	*Pantoea sp. PSNIH2*	39.655	232	1.09e-60	40.086	232	3.68e-55
184	ODQ06814.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Shigella sp. FC130*	40.343	233	1.14e-60	37.931	232	3.31e-51
185	CBJ91905.1	flavin reductase FAD = preferred substrate	*Xenorhabdus nematophila ATCC 19061*	39.224	232	1.33e-60	-	-	-
186	SFU94775.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Xenorhabdus koppenhoeferi*	39.485	233	1.44e-60	-	-	-
187	KQN65911.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Serratia sp. Leaf51*	39.224	232	1.45e-60	38.362	232	4.82e-53
188	AIR69744.1	FMN reductase	*Dickeya solani*	39.224	232	1.45e-60	40.086	232	1.86e-55
189	AFJ93059.1	putative flavin reductase	*Candidatus Photodesmus blepharus*	43.038	237	1.51e-60	39.167	240	5.80e-56
190	ESS58733.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterobacter cloacae S611*	38.362	232	1.75e-60	37.069	232	3.24e-51

191	ABX76849.1	LuxG	*Vibrio harveyi*	40.870	230	1.79e-60	100.000	233	3.90e-173
192	KHN53122.1	FMN reductase	*Pectobacterium carotovorum*	39.655	232	2.01e-60	40.086	232	6.33e-54
193	EHS89048.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Klebsiella oxytoca 10-5245*	37.500	232	2.39e-60	38.793	232	6.76e-54
194	ACT08705.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Dickeya chrysanthemi Ech1591*	40.086	232	2.50e-60	38.362	232	1.14e-53
195	OEE33768.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio genomosp. F10 str. ZF-129*	40.678	236	2.57e-60	40.343	233	5.00e-57
196	SMB34237.1	flavin reductase	*Serratia proteamaculans*	40.343	233	2.70e-60	38.362	232	7.37e-54
197	AKJ40845.1	FMN reductase	*Pragia fontium*	41.202	233	2.73e-60	-	-	-
198	ARJ42116.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea alhagi*	38.362	232	2.88e-60	40.948	232	1.20e-55
199	OEF22706.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Aliivibrio logei 5S-186*	40.254	236	2.90e-60	40.343	233	9.82e-55
200	OON38587.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Izhakiella sp. D4N98*	40.773	233	3.11e-60	39.224	232	1.59e-52
201	EGU18578.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio mimicus SX-4*	42.342	222	3.31e-60	41.228	228	6.99e-53
202	ADU67518.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Pantoea sp. At-9b*	40.086	232	3.43e-60	39.224	232	6.76e-54
203	GAD77481.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio azureus NBRC 104587*	40.517	232	3.47e-60	69.957	233	8.28e-123
204	OOE68050.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Salinivibrio sp. IB868*	41.841	239	3.63e-60	41.772	237	4.78e-57
205	AOM42474.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Xenorhabdus hominickii*	40.086	232	4.12e-60	-	-	-

206	AJC64761.1	FMN reductase	*Dickeya zeae EC1*	39.655	232	4.40e-60	38.362	232	2.33e-53
207	BAK13439.1	NAD(P)H-flavin reductase Fre	*Pantoea ananatis AJ13355*	40.948	232	4.60e-60	41.379	232	5.04e-57
208	EHT98684.1	flavin reductase	*Pantoea stewartii subsp. Stewartii DC283*	40.517	232	4.96e-60	40.948	232	4.19e-55
209	WP_048637051.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Brenneria goodwinii*	39.655	232	5.53e-60	39.224	232	9.86e-53
210	CDS56488.1	flavin reductase	*Serratia symbiotica*	39.914	233	5.53e-60	38.362	232	1.46e-55
211	AGH72262.1	FMN reductase	*Edwardsiella piscicida C07-087*	40.086	232	5.72e-60	37.339	233	1.45e-50
212	SIO21087.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Salinivibrio sp. ES.052*	41.079	241	6.05e-60	41.350	237	4.73e-56
213	EIC82655.1	FMN reductase	*Serratia sp. M24T3*	39.914	233	6.37e-60	39.316	234	1.07e-53
214	GAB53555.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Atlantibacter hermannii NBRC 105704*	39.827	231	6.51e-60	38.793	232	1.51e-54
215	OAT49514.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Proteus hauseri ATCC 700826*	40.343	233	7.03e-60	37.069	232	4.39e-51
216	SFN89436.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Xenorhabdus japonica*	39.485	233	7.42e-60	37.500	232	2.15e-51
217	ACR67406.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Edwardsiella ictaluri 93-146*	40.086	232	7.50e-60	37.768	233	4.49e-51

218	KFC78296.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Ewingella americana ATCC 33852*	39.224	232	8.18e-60	37.069	232	4.54e-51
219	ERK17218.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea sp. AS-PWVM4*	40.086	232	8.73e-60	39.224	232	4.42e-54
220	OAE06826.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea sp. OXWO6B1*	40.948	232	9.53e-60	41.379	232	4.28e-57
221	OOE61925.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Salinivibrio sp. IB282*	41.004	239	1.03e-59	40.928	237	6.13e-57
222	CDH21317.1	flavin reductase	*Xenorhabdus bovienii str. Kraussei Quebec*	40.086	232	1.04e-59	37.931	232	6.85e-51
223	KLU14949.1	FMN reductase	*Xenorhabdus griffiniae*	39.914	233	1.09e-59	-	-	-
224	GAK85495.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio ponticus*	47.208	197	1.28e-59	-	-	-
225	EST56904.1	FMN reductase	*Proteus hauseri ZMd44*	39.914	233	1.59e-59	-	-	-
226	APZ07841.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Kosakonia cowanii*	37.931	232	1.64e-59	37.069	232	1.88e-51
227	GAL05644.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium aphoticum*	48.148	189	1.68e-59	46.842	190	7.90e-54
228	ADN00495.1	flavin reductase	*Dickeya dadantii 3937*	39.655	232	1.97e-59	39.655	232	2.21e-54
229	KQN51038.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Serratia sp. Leaf50*	39.485	233	2.02e-59	40.171	234	4.99e-56
230	AOV98303.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Edwardsiella hoshinae*	39.485	233	2.08e-59	38.627	233	1.74e-50
231	OSM98634.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Lonsdalea quercina subsp. Britannica*	37.931	232	2.20e-59	42.241	232	4.18e-59

232	OFI71188.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio cholerae*	44.118	238	2.20e-59	37.662	231	4.46e-55
233	ORJ22708.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Rouxiella silvae*	39.485	233	2.27e-59	40.171	234	2.38e-56
234	AIA69226.1	FMN reductase	*Pectobacterium atrosepticum*	39.224	232	2.45e-59	40.086	232	9.36e-54
235	KJG57835.1	FMN reductase	*Photobacterium kishitanii*	48.677	189	2.49e-59	44.211	190	1.63e-51
236	KGT87747.1	FMN reductase	*Erwinia typographi*	40.086	232	2.51e-59	39.224	232	6.34e-55
237	ANG94676.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Lelliottia amnigena*	37.500	232	2.71e-59	38.362	232	1.65e-51
238	ORM91958.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea cypripedii*	39.655	232	2.86e-59	38.793	232	7.53e-54
239	ORJ25628.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Rouxiella badensis*	39.485	233	2.86e-59	38.462	234	7.37e-54
240	EHM51952.1	FMN reductase	*Yokenella regensburgei ATCC 43003*	37.931	232	3.55e-59	38.362	232	1.66e-52
241	KFD24923.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Yokenella regensburgei ATCC 49455*	37.931	232	3.55e-59	38.362	232	1.66e-52
242	KHN89934.1	FMN reductase	*Pectobacterium carotovorum subsp. Actinidia*	39.655	232	3.87e-59	40.086	232	1.09e-53
243	AEX03292.1	FMN reductase	*Klebsiella michiganensis KCTC 1686*	36.638	232	3.92e-59	39.224	232	6.41e-55
244	BAA04597.1	NAD(P)H-flavin reductase Fre	*Photorhabdus luminescens*	41.379	232	5.55e-59	39.224	232	9.31e-52
245	SHO58031.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio quintilis*	42.797	236	5.75e-59	-	-	-

246	KMJ46574.1	FMN reductase	*Xenorhabdus khoisanae*	39.224	232	6.53e-59	37.931	232	1.78e-50
247	CBA27132.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Cronobacter turicensis z3032*	37.931	232	6.80e-59	38.793	232	6.27e-53
248	OAT28275.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Buttiauxella brennerae ATCC 51605*	38.362	232	7.36e-59	-	-	-
249	APQ28766.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Klebsiella pneumoniae*	37.500	232	7.77e-59	39.224	232	1.90e-54
250	EFE96784.1	FMN reductase	*Serratia odorifera DSM 4582*	38.197	233	9.63e-59	36.638	232	4.73e-53
251	KER02309.1	2-polyprenylphenol hydroxylase-like oxidoreductase	*Photorhabdus temperata subsp. Temperata Meg1*	40.517	232	1.24e-58	40.086	232	8.11e-53
252	OAT20718.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Buttiauxella gaviniae ATCC 51604*	38.362	232	1.35e-58	-	-	-
253	EON87181.1	FMN reductase	*Plesiomonas shigelloides 302-73*	38.793	232	1.38e-58	40.948	232	1.58e-55
254	AKH90359.1	FMN reductase	*Edwardsiella tarda*	38.627	233	1.44e-58	39.056	233	6.03e-52
255	OAT15361.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Buttiauxella noackiae ATCC 51607*	38.362	232	1.70e-58	-	-	-
256	KJO57750.1	FMN reductase	*Enterobacter aerogenes*	37.069	232	1.81e-58	39.655	232	8.59e-55
257	YP_004591811.1	FMN reductase	*Klebsiella aerogenes KCTC 2190*	37.069	232	1.94e-58	39.655	232	1.33e-54

258	ALD77596.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Citrobacter freundii*	38.362	232	2.11e-58	37.931	232	2.70e-52
259	EDU61458.1	FMN reductase	*Providencia stuartii ATCC 25827*	38.793	232	2.13e-58	37.069	232	1.41e-51
260	SLY41604.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Klebsiella pneumoniae*	37.069	232	2.14e-58	38.793	232	1.05e-53
261	KQN60323.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Erwinia sp. Leaf53*	39.655	232	2.16e-58	37.931	232	5.73e-53
262	KFX02738.1	FMN reductase	*Pectobacterium betavasculorum*	39.224	232	2.16e-58	40.086	232	1.05e-53
263	KFW98757.1	FMN reductase	*Pectobacterium carotovorum subsp. Carotovorum*	39.224	232	2.33e-58	40.086	232	1.78e-53
264	CDZ82106.1	FMN reductase	*Citrobacter koseri*	37.500	232	2.33e-58	37.500	232	1.80e-50
265	ORM62350.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea rodasii*	39.485	233	2.38e-58	38.793	232	1.28e-54
266	ERH65752.1	FMN reductase	*Pantoea dispersa EGD-AAK13*	39.655	232	2.57e-58	38.793	232	2.63e-54
267	ESN63351.1	Aquacobalamin reductase	*Serratia sp. ATCC 39006*	38.362	232	2.63e-58	40.948	232	1.51e-54
268	CDH06456.1	flavin reductase FAD = preferred substrate	*Xenorhabdus bovienii str. Oregonense*	39.655	232	2.68e-58	-	-	-
269	CCJ72387.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Cronobacter condimenti 1330*	37.500	232	2.83e-58	39.224	232	2.96e-53
270	KVJ41634.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterobacter cloacae subsp. Cloacae*	37.500	232	2.99e-58	-	-	-

271	OOF23362.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Salinivibrio sp. IB574*	40.167	239	2.99e-58	40.506	237	5.87e-55
272	KFJ99481.1	FMN reductase	*Klebsiella variicola*	37.069	232	3.09e-58	39.655	232	1.53e-54
273	CAR46946.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Proteus mirabilis HI4320*	39.914	233	3.19e-58	39.224	232	8.58e-54
274	OOE38145.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Salinivibrio sp. ML277*	41.004	239	3.30e-58	41.772	237	5.33e-57
275	EFP98381.1	FMN reductase	*Vibrio caribbeanicus ATCC BAA-2122*	39.831	236	3.53e-58	-	-	-
276	EFB70763.1	FMN reductase	*Providencia rustigianii DSM 4541*	39.224	232	3.63e-58	-	-	-
277	AKL14150.1	FMN reductase	*Kluyvera intermedia*	37.069	232	3.64e-58	40.086	232	9.90e-56
278	EFL91717.1	flavin reductase	*Candidatus Regiella insecticola LSR1*	39.655	232	3.72e-58	38.793	232	8.85e-53
279	CAX57773.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Erwinia billingiae Eb661*	39.224	232	3.72e-58	38.793	232	2.09e-53
280	KWZ93459.1	FMN reductase	*Citrobacter freundii*	37.931	232	3.72e-58	38.362	232	2.63e-52
281	OSN05240.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Lonsdalea quercina subsp. Iberica*	37.500	232	4.01e-58	41.810	232	2.09e-58
282	OCH12027.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Aliivibrio sp. 1S165*	41.949	236	4.08e-58	42.489	233	3.04e-54

283	AFJ48787.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Shimwellia blattae DSM 4481 = NBRC 105725*	37.500	232	4.19e-58	37.500	232	4.11e-51
284	EQB98935.1	FMN reductase	*Photorhabdus temperata subsp. Temperata M1021*	40.517	232	4.33e-58	40.086	232	2.68e-52
285	AGN86634.1	FMN reductase	*Enterobacter sp. R4-368*	37.069	232	4.47e-58	39.655	232	1.20e-55
286	ABU78914.1	hypothetical protein ESA 03717	*Cronobacter sakazakii ATCC BAA-894*	37.500	232	4.72e-58	38.793	232	4.87e-53
287	CCJ95087.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Cronobacter malonaticus 681*	37.500	232	4.72e-58	38.793	232	6.39e-53
288	EKT52949.1	FMN reductase	*Providencia burhodogranariea DSM 19968*	38.627	233	4.72e-58	36.638	232	2.09e-50
289	CDL82869.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Xenorhabdus cabanillasii JM26*	39.224	232	4.77e-58	-	-	-
290	CDL81657.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Xenorhabdus szentirmaii DSM 16338*	38.627	233	4.77e-58	-	-	-
291	SAP72942.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Klebsiella oxytoca*	37.069	232	4.88e-58	39.224	232	4.06e-54
292	ACS87507.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Dickeya paradisiaca Ech703*	38.362	232	4.93e-58	38.793	232	3.15e-52
293	EFE21410.1	FMN reductase	*Edwardsiella tarda ATCC 23685*	38.627	233	5.38e-58	38.627	233	7.23e-51

294	CCK17001.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Cronobacter universalis NCTC 9529*	37.500	232	5.56e-58	38.793	232	7.04e-53
295	ALB72236.1	FMN reductase	*Cronobacter muytjensii ATCC 51329*	37.500	232	5.62e-58	39.655	232	2.66e-54
296	AIR05198.1	FMN reductase	*Cedecea neteri*	38.793	232	5.87e-58	-	-	-
297	ETS98963.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Providencia alcalifaciens PAL-3*	38.793	232	5.87e-58	38.362	232	3.42e-51
298	EFE07841.1	FMN reductase	*Citrobacter youngae ATCC 29220*	37.931	232	6.06e-58	38.362	232	2.26e-52
299	ERH71526.1	FMN reductase	*Serratia marcescens EGD-HP20*	39.474	228	6.34e-58	39.207	227	2.24e-54
300	CSB36387.1	FMN reductase	*Vibrio cholerae*	43.056	216	6.45e-58	-	-	-
301	KMV32779.1	FMN reductase	*Franconibacter sp. DJ34*	37.339	233	6.83e-58	39.655	232	2.49e-54
302	OOE88845.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Salinivibrio sharmensis*	40.586	239	6.91e-58	41.350	237	2.49e-56
303	EJL87703.1	2-polyprenylphenol hydroxylase-like oxidoreductase	*Pantoea sp. GM01*	39.056	233	7.06e-58	40.086	232	6.99e-56
304	SFN50324.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Izhakiella capsodis*	38.627	233	8.43e-58	-	-	-
305	KDE34008.1	FMN reductase	*Kosakonia radicincitans UMEnt01/12*	37.500	232	8.49e-58	37.069	232	3.05e-52

306	SFJ98361.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Xenorhabdus mauleonii*	38.793	232	9.16e-58	-	-	-
307	CCJ87276.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Cronobacter dublinensis 582*	37.500	232	9.47e-58	39.655	232	3.23e-54
308	CBG90615.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Citrobacter rodentium ICC168*	37.069	232	9.57e-58	39.655	232	1.72e-53
309	SFU19921.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Kosakonia arachidis*	37.500	232	1.01e-57	37.500	232	4.71e-53
310	OAT30978.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Buttiauxella ferragutiae ATCC 51602*	37.931	232	1.02e-57	37.500	232	6.70e-51
311	KNC10833.1	FMN reductase	*Pantoea sp. RIT-PI-b*	39.056	233	1.04e-57	40.086	232	4.63e-56
312	ACX89961.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Pectobacterium parmentieri WPP163*	38.793	232	1.04e-57	39.655	232	2.62e-53
313	OOF14832.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Salinivibrio sp. PR919*	40.167	239	1.20e-57	40.084	237	1.81e-54
314	OCH25409.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Aliivibrio sp. 1S128*	41.949	236	1.23e-57	42.489	233	3.17e-54
315	CUU25516.1	FMN reductase	*Erwinia gerundensis*	38.793	232	1.40e-57	39.224	232	3.88e-53
316	CAQ85963.1	nad(p)h-flavin reductase	*Photorhabdus asymbiotica*	40.086	232	1.40e-57	39.224	232	6.82e-53
317	OHT24287.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Providencia stuartii*	37.931	232	1.48e-57	37.500	232	2.68e-53

318	EJS93626.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pectobacterium wasabiae CFBP 3304*	38.793	232	1.58e-57	39.655	232	2.54e-53
319	EJM97613.1	2-polyprenylphenol hydroxylase-like oxidoreductase	*Pantoea sp. YR343*	38.627	233	1.61e-57	39.655	232	1.40e-55
320	CPR16014.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Brenneria goodwinii*	39.556	225	1.63e-57	39.648	227	1.00e-51
321	OAT51620.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Kluyvera georgiana ATCC 51603*	36.207	232	1.68e-57	39.224	232	3.22e-53
322	EEB46669.1	FMN reductase	*Providencia alcalifaciens DSM 30120*	38.793	232	1.75e-57	-	-	-
323	ELO83121.1	FMN reductase	*Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Enteritidis str. SARB17*	37.069	232	1.76e-57	37.500	232	1.33e-50
324	CUX96291.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Candidatus Gullanella endobia*	39.224	232	2.22e-57	38.889	234	2.63e-52
325	CAG21807.1	putative NAD(P)H-flavin reductase	*Photobacterium profundum SS9*	46.561	189	2.57e-57	46.316	190	1.03e-55
326	SET68452.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Enterobacter sp. NFIX09*	37.069	232	2.69e-57	37.500	232	6.97e-53
327	OKP04221.1	CDP-6-deoxy-delta-3 4-glucoseen reductase	*Xenorhabdus thuongxuanensis*	39.485	233	2.72e-57	-	-	-

328	CCG85629.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Erwinia piriflorinigrans CFBP 5888*	39.224	232	2.75e-57	39.655	232	1.23e-54
329	EGB59584.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Escherichia coli M863*	36.638	232	2.78e-57	38.362	232	1.22e-52
330	ANI85054.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Kosakonia oryzae*	37.069	232	3.23e-57	37.500	232	8.56e-53
331	KLV62529.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Citrobacter sp. MGH106*	37.069	232	3.38e-57	37.500	232	1.62e-52
332	ODM56945.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio harveyi*	43.348	233	3.56e-57	54.936	233	9.79e-95
333	KFC93716.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Leminorella grimontii ATCC 33999 = DSM 5078*	38.793	232	3.76e-57	-	-	-
334	CUZ71168.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Serratia marcescens*	39.474	228	3.79e-57	39.545	220	4.66e-52
335	SCC37022.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Kosakonia oryziphila*	37.069	232	4.38e-57	37.931	232	3.30e-53
336	GAL47353.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Citrobacter werkmanii NBRC 105721*	37.931	232	4.38e-57	38.362	232	1.12e-52
337	EKT53056.1	FMN reductase	*Providencia sneebia DSM 19967*	37.931	232	4.53e-57	-	-	-
338	EGS66067.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio cholerae HC-02A1*	40.991	222	4.83e-57	-	-	-
339	CDG22707.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Xenorhabdus poinarii G6*	40.343	233	5.16e-57	-	-	-

340	AMO51125.1	2-polyprenylphenol hydroxylase	*Enterobacter sp. FY-07*	37.069	232	6.14e-57	38.362	232	4.09e-53
341	BAN96783.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Plautia stali symbiont*	39.224	232	6.91e-57	37.931	232	2.35e-52
342	OHY63460.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pluralibacter gergoviae*	35.776	232	7.07e-57	38.362	232	3.79e-53
343	KTQ45183.1	FMN reductase	*Enterobacter cancerogenus*	36.638	232	8.14e-57	37.931	232	1.38e-51
344	KIS43594.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Kosakonia radicincitans YD4*	37.069	232	8.23e-57	37.500	232	2.92e-53
345	KFC84912.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Buttiauxella agrestis ATCC 33320*	37.931	232	8.50e-57	-	-	-
346	AGB80186.1	2-polyprenylphenol hydroxylase-like oxidoreductase	*Enterobacteriaceae bacterium strain FGI 57*	36.481	233	8.97e-57	36.638	232	5.82e-51
347	KGP41832.1	FMN reductase	*Morganella morganii*	37.931	232	1.00e-56	-	-	-
348	EWG68287.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterobacter sp. DC4*	37.069	232	1.07e-56	-	-	-
349	CAE16776.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Photorhabdus luminescens subsp. Laumondii TTO1*	40.086	232	1.13e-56	40.086	232	9.46e-54
350	KKJ25055.1	FMN reductase	*Enterobacter hormaechei*	36.638	232	1.24e-56	-	-	-

351	KEY46097.1	FMN reductase	*Citrobacter amalonaticus*	37.931	232	1.30e-56	-	-	-
352	AJZ90724.1	FMN reductase	*Klebsiella michiganensis*	38.362	232	1.31e-56	-	-	-
353	KNC10907.1	FMN reductase	*Klebsiella sp. RIT-PI-d*	36.638	232	1.39e-56	38.793	232	7.47e-51
354	ORM64721.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea rwandensis*	38.197	233	1.45e-56	39.655	232	4.43e-55
355	AMA05435.1	FMN reductase	*Enterobacter asburiae*	37.069	232	1.50e-56	-	-	-
356	KFD03327.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Kluyvera ascorbata ATCC 33433*	35.776	232	1.54e-56	38.793	232	4.04e-52
357	CNL79355.1	FMN reductase	*Yersinia frederiksenii*	37.069	232	1.56e-56	-	-	-
358	KDF11234.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Citrobacter sp. MGH 55*	37.931	232	1.78e-56	36.638	232	1.60e-50
359	ORM72861.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pantoea wallisii*	38.793	232	1.84e-56	38.793	232	8.86e-54
360	KGB07650.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterobacteriaceae bacterium ATCC 29904*	36.910	233	1.92e-56	38.362	232	1.16e-53
361	KDW28071.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Escherichia coli 2-156-04 S3 C2*	36.638	232	1.92e-56	38.362	232	8.63e-52
362	KJV47061.1	FMN reductase	*Pantoea sp. BL1*	38.197	233	1.96e-56	38.793	232	4.72e-54
363	CBA71808.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Arsenophonus nasoniae*	38.362	232	2.07e-56	38.362	232	2.94e-51
364	OFC63365.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Candidatus Erwinia dacicola*	38.627	233	2.84e-56	38.362	232	3.32e-52

365	OEH01521.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterobacter kobei*	36.638	232	3.06e-56	-	-	-
366	OBU06884.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Morganella psychrotolerans*	37.069	232	3.20e-56	-	-	-
367	CNU77380.1	flavin reductase	*Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Bovismorbificans*	37.069	232	3.22e-56	-	-	-
368	ADO50427.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Enterobacter lignolyticus SCF1*	36.910	233	1.87e-64	37.339	233	1.45e-58
369	EQL96636.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio parahaemolyticus VP250*	44.000	200	1.91e-64	41.361	191	3.05e-54
370	OAT77501.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Mangrovibacter phragmitis*	37.768	233	2.42e-64	37.500	232	3.30e-58
371	AEW44205.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Serratia symbiotica str. 'Cinara cedri'*	41.126	231	2.93e-64	37.991	229	4.19e-54
372	ACY83005.1	FMN reductase	*Edwardsiella tarda EIB202*	40.367	218	3.04e-64	38.462	221	4.90e-56
373	EAS73719.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Vibrio alginolyticus 12G01*	43.500	200	2.99e-64	41.885	191	7.03e-54
374	EEP94694.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Yersinia aldovae ATCC 35236*	37.500	232	5.77e-64	37.069	232	1.79e-57
375	AIN46959.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Candidatus Baumannia cicadellinicola*	35.498	213	6.53e-64	35.043	234	3.66e-51
376	KGD80106.1	FMN reductase	*Tatumella morbirosei*	36.207	232	7.25e-64	37.069	232	3.65e-57

377	CNI36116.1	FMN reductase	*Yersinia massiliensis*	36.638	232	1.01e-63	36.638	232	1.19e-56
378	OAT50531.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Providencia heimbachae ATCC 35613*	39.224	232	1.04e-63	36.207	232	1.42e-55
379	EJF32104.1	FMN reductase	*Enterobacter sp. Ag1*	37.931	233	1.11e-63	37.069	232	1.66e-56
380	pdb|1QFJ|A	Chain A Crystal Structure Of Nad(p)h:flavin Oxidoreductase	*Escherichia Coli*	36.207	232	1.14e-63	38.362	232	1.97e-60
381	EPF12287.1	FMN reductase	*Cedecea davisae DSM 4568*	37.931	232	1.17e-63	36.638	232	4.41e-56
382	CNH24142.1	FMN reductase	*Yersinia pekkanenii*	37.069	232	1.18e-63	36.638	232	2.54e-56
383	KLW45736.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Enterobacter sp. MGH120*	36.207	232	1.18e-63	37.069	232	9.13e-58
384	KEA50438.1	FMN reductase	*Mangrovibacter sp. MFB070*	37.339	233	1.27e-63	37.069	232	1.52e-57
385	OQV75624.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Yersinia enterocolitica*	36.638	232	1.35e-63	37.069	232	1.33e-57
386	SFR18248.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Enterobacter sp. Kpr-6*	36.207	232	1.64e-63	37.069	232	3.94e-57
387	CNI21342.1	FMN reductase	*Yersinia mollaretii*	36.638	232	2.12e-63	36.638	232	5.28e-57
388	AKH63780.1	Fre	*Photorhabdus temperata subsp. Thracensis*	40.517	232	5.68e-58	39.655	232	6.12e-53
389	WP_011151391.1	Fre	*Vibrio vulnificus*	44.068	236	8.08e-68	39.056	233	2.19e-55

390	CEO41745.1	LuxG	*Photobacterium phosphoreum ANT-2200*	66.524	233	3.63e-118	39.394	231	3.06e-56
391	OAT37136.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Hafnia paralvei ATCC 29927*	-	-	-	38.793	232	7.39e-51
392	KLN98218.1	FMN reductase	*Moellerella wisconsensis*	-	-	-	37.069	232	1.42e-50
393	EGK17813.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Shigella flexneri K-272*	-	-	-	38.362	232	3.36e-52
394	ABB63836.1	ferrisiderophore reductase	*Shigella dysenteriae Sd197*	-	-	-	38.362	232	4.04e-52
395	ABP62606.1	oxidoreductase FAD/NAD(P)-binding domain protein	*Enterobacter sp. 638*	-	-	-	37.500	232	8.79e-51
396	ABB68314.1	ferrisiderophore reductase	*Shigella boydii Sb227*	-	-	-	38.362	232	1.64e-52
397	KFC92943.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Leclercia adecarboxylata ATCC 23216 = NBRC 102595*	-	-	-	37.931	232	1.68e-52
398	KOY61757.1	FMN reductase	*Photorhabdus heterorhabditis*	-	-	-	39.655	232	9.62e-52
399	SFR49615.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Idiomarina maritima*	-	-	-	40.598	234	5.41e-60
400	CED70162.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Aliivibrio wodanis*	-	-	-	41.202	233	2.37e-51
401	CCP01328.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Erwinia amylovora Ea644*	-	-	-	37.931	232	3.65e-51

402	OEY68265.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Rheinheimera salexigens*	-	-	-	38.793	232	1.03e-58
403	EOS93622.1	FMN reductase	*Erwinia tracheiphila PSU-1*	-	-	-	38.793	232	1.16e-58
404	AJF71149.1	FMN reductase	*Raoultella ornithinolytica*	-	-	-	38.362	232	1.26e-58
405	EAR26561.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Pseudoalteromonas tunicata D2*	-	-	-	39.316	234	1.89e-58
406	KFC00891.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Trabulsiella guamensis ATCC 49490*	-	-	-	39.056	233	2.05e-58
407	AHF75373.1	FMN (flavin) reductase	*Sodalis praecaptivus*	-	-	-	36.752	234	2.11e-58
408	BAE73392.1	flavin reductase	*Sodalis glossinidius str. 'morsitans'*	-	-	-	37.179	234	2.14e-58
409	OIV46905.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Sodalis sp. TME1*	-	-	-	36.752	234	2.28e-58
410	SDB42260.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Idiomarina indica*	-	-	-	41.202	233	3.33e-58
411	KDY89319.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Escherichia coli 2-474-04 S3 C1*	-	-	-	37.931	232	4.17e-58
412	EFE53490.1	FMN reductase	*Providencia rettgeri DSM 1131*	-	-	-	36.207	232	4.81e-58
413	ANI29578.1	FMN reductase	*Yersinia entomophaga*	-	-	-	36.638	232	6.74e-58
414	SEQ92922.1	aquacobalamin reductase/NAD(P)H-flavin reductase	*Rosenbergiella nectarea*	-	-	-	37.069	232	8.10e-58

415	KYP95067.1	FMN reductase	*bacteria symbiont BFo2 of Frankliniella occidentalis*	-	-	-	37.069	232	9.23e-58
416	CNF04581.1	FMN reductase	*Yersinia nurmii*	-	-	-	36.638	232	1.93e-57
417	AIN19112.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Yersinia kristensenii*	-	-	-	37.500	233	2.42e-57
418	EKT53186.1	FMN reductase	*Providencia rettgeri Dmel1*	-	-	-	36.207	232	2.42e-57
419	KEY90313.1	Fre	*Candidatus Photodesmus katoptron*	-	-	-	28.814	236	9.39e-37
420	ACA88697.1	Fre	*Shewanella woodyi ATCC 51908*	-	-	-	34.914	232	4.03e-47
421	KSY29118.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Citrobacter sp. 50677481*	-	-	-	38.793	232	5.79e-53
422	KMV72895.1	FMN reductase	*bacteria symbiont BFo1 of Frankliniella occidentalis*	-	-	-	38.793	232	2.68e-52
423	CCC32559.1	flavin reductase	*Salmonella bongori NCTC 12419*	-	-	-	37.500	232	1.45e-50
424	CAO95290.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Erwinia tasmaniensis Et1/99*	-	-	-	40.086	232	3.34e-55
425	CAX53989.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Erwinia pyrifoliae Ep1/96*	-	-	-	39.224	232	8.66e-53
426	GAL51993.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Citrobacter farmeri GTC 1319*	-	-	-	37.500	232	6.10e-52

427	CAQ91100.1	flavin reductase	*Escherichia fergusonii ATCC 35469*	-	-	-	38.362	232	4.17e-52
428	CSQ60622.1	Ferrisiderophore reductase 2C flavin reductase	*Shigella sonnei*	-	-	-	38.362	232	1.56e-52
429	AHF74834.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Candidatus Sodalis pierantonius str. SOPE*	-	-	-	36.752	234	9.18e-51
430	KUV42981.1	NAD(P)H-flavin reductase	*Escherichia coli*	-	-	-	38.362	232	1.32e-52
431	EEZ00161.1	LuxG NAD(P)H-dependent FMN reductase	*Vibrio sp. RC586*	-	-	-	37.931	232	2.06e-54

Таблица А.2: Аминокислотные последовательности FRG оксидоредуктаз.

№	Организм	ID кДНК	ID последова-тельности	Длина (а.о.)	Генное окружение
1	*Aliivibrio fischeri*	CP001133.1	ACH63629.1	218	outer membrane receptor protein, lipoprotein, **major NAD(p)h-flavin oxidoreductase**, ggdef domain protein, conserved hypothetical protein
2	*Aliivibrio logei*		WP_023604556.1	218	**NAD(P)H-dependent oxidoreductase**
3	*Aliivibrio salmonicida*	NC_011313.1	WP_044583565.1	199	transposase, hypothetical protein, **NAD(P)H-dependent oxidoreductase**, lipid A biosynthesis acyltransferase, IS30 family transposase
4	*Aliivibrio wodanis*	NZ_LN554847.1	WP_045103540.1	219	GGDEF domain-containing protein, LysR family transcriptional regulator, **NAD(P)H-dependent oxidoreductase**, methyl-accepting chemotaxis protein
5	*Photobacterium aquimaris*	LZEZ01000084.1	WP_065167653.1	217	**NAD(P)H-dependent oxidoreductase**
6	*Photobacterium damselae*		WP_005300298.1	217	**Oxygen-insensitive NAD(P)H-dependent nitroreductase NfsB**
7	*Photobacterium kishitanii*		WP_045044781	217	**oxygen-insensitive NAD(P)H-dependent nitroreductase NfsB**
8	*Photobacterium leiognathi*		WP_045069501.1	217	**NAD(P)H-dependent oxidoreductase**
9	*Photobacterium leiognathi subsp. mandapamensis*	DF093596.1	GAA03922.1	217	16S hypothetical protein, sensory box protein, **major NAD(P)H-flavin oxidoreductase**, putative uncharacterized protein
10	*Photorhabdus luminescens*		WP_011146775.1	183	**NAD(P)H nitroreductase**

продолжение Таблицы А.2

11	*Photobacterium phosphoreum*	LN794353.1	CEO41838.1	205	alcohol dehydrogenase, NAD(P)-dependent bacterial regulatory helix-turn-helix s, AraC family protein, **putative NAD(P)H oxidoreductase**, potassium:proton antiporter, polyamine transporter subunit, periplasmic-binding component of ABC superfamily
12	*Photorhabdus temperata*		WP_036837069.1	183	**NAD(P)H nitroreductase**
13	*Shewanella hanedai*	AB058950.1	BAB40800.1	145	**NAD(P)H-flavin reductase, partial**
14	*NAD(P)H-dependent oxidoreductase*		WP_012325073.1	217	
15	*Vibrio albensis*	LOSL01000002.1	KTL48454.1	217	SAM-dependent methyltransferase, LysR family transcriptional regulator, antibiotic biosynthesis monooxygenase, **NAD(P)H-dependent oxidoreductase**, multidrug transporter AcrB, hemolysin D transporter
16	*Vibrio azureus*		WP_021709843	218	**NAD(P)H-dependent oxidoreductase**
17	*Vibrio campbellii*	NC_009784.1	WP_012129665.1	218	response regulator, serine protease, membrane protein, **NAD(P)H-dependent oxidoreductase**, choline ABC transporter ATP-binding protein, choline ABC transporter permease subunit
18	*Vibrio harveyi*	CP009468.1	AIV07333.1	218	serine protease, hypothetical protein, **flavin reductase**, ABC transporter ATP-binding protein, ABC transporter permease

продолжение Таблицы А.2					
19	*Vibrio orientalis*		WP_004412886.1	218	**NAD(P)H-dependent oxidoreductase**
20	*Vibrio vulnificus*		WP_011081872.1	217	**oxygen-insensitive NAD(P)H-dependent nitroreductase NfsB**
21	*Vibrio splendidus*		WP_017075534.1	218	**NAD(P)H-dependent oxidoreductase**
22	*Escherichia coli*	CBWP010000032.1	CDL37947.1	217	Phenylalanine-specific permease, Uncharacterized protein ybdG, Uncharacterized protein ybdG, **Oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase**, Putative cytoplasmic protein, Transcriptional regulator, TetR family Outer membrane protein romA

Таблица А.3: Аминокислотные последовательности FRP оксидоредуктаз.

№	Организм	ID кДНК	ID последовательности	Длина (а.о.)	Генное окружение
1	*Aliivibrio fischeri*	CP001133.1	ACH64177.1	240	transcriptional regulator, LysR family, integral membrane protein, **NADPH-flavin oxidoreductase**, L-serine ammonia-lyase, nucleoside permease NupC, purine nucleoside phosphorylase
2	*Aliivibrio logei*		WP_017023383.1	240	**NADPH-dependent oxidoreductase**
3	*Aliivibrio salmonicida*	NC_011313.1	WP_012552293.1	240	iron ABC transporter, L-serine ammonia-lyase, magnesium transporter CorA, **NADPH-dependent oxidoreductase**, UPF0016 family membrane protein, LysR family transcriptional regulator, IS30 family transposase
4	*Aliivibrio wodanis*	NZ_LN554847.1	WP_045104351.1	240	ketodeoxygluconokinase, ketohydroxyglutarate aldolase, transporter, **NADPH-dependent oxidoreductase**, L-serine ammonia-lyase, thermolabile hemolysin, iron ABC transporter
5	*Photobacterium aquimaris*	LZEZ01000084.1	OBU09447.1	240	DNA starvation/stationary phase protection protein, patatin family protein, LysR family transcriptional regulator, **oxidoreductase**, hypothetical protein, RNA polymerase subunit sigma

продолжение Таблицы А.3					
6	*Photobacterium damselae*	ADBS01000001.1	EEZ42266.11	240	Transcriptional regulator, LysR family, multidrug efflux pump component MtrF, **putative oxidoreductase short-chain dehydrogenase**, hypothetical protein
7	*Photobacterium kishitanii*	JZSP01000001.1	KJG11169.1	240	membrane protein, hypothetical protein, hypothetical protein, **NADPH-flavin oxidoreductase**, excinuclease ABC subunit B, membrane protein, serine/threonine protein kinase
8	*Photobacterium leiognathi*		WP_053989214.1	263	**nitroreductase**
9	*Photorhabdus asymbiotica*		WP_036768356.1	246	**NADPH-dependent oxidoreductase**
10	*Vibrio albensis*	LOSL01000001.1	KTL50950.1	240	23S ribosomal RNA, 5S ribosomal RNA, tRNA-Asp, pseudouridine synthase, **NADPH-dependent oxidoreductase**, ferredoxin, protease
11	*Vibrio campbellii*	NC_009784.1	WP_041853597.1	240	rpatatin family protein, membrane protein, **NADPH-dependent oxidoreductase**, polysaccharide export protein Wza, phosphotyrosine protein phosphatase
12	*Vibrio harveyi*	CP009468.1	AIV07780.1	218	flavin oxidoreductase, phospholipase, membrane protein, **NADPH-flavin oxidoreductase**, sugar transporter, phosphotyrosine protein phosphatase, tyrosine protein kinase
13	*Vibrio vulnificus*		WP_011151649.1	240	**NADPH-dependent oxidoreductase**

продолжение Таблицы А.3					
14	*Vibrio splendidus*		WP_004740374.1	240	**NADPH-dependent oxidoreductase**
15	*Escherichia coli*	CBWP010000032.1	CDL37183.1	217	Inner membrane protein, Glutaredoxin 1, hypothetical protein YbjC, **oxygen-insensitive NADPH nitroreductase**, ribosomal protein S6 glutaminyl transferase, putative sensory transduction regulator, hypothetical protein, Putrescine ABC transporter putrescine-binding protein PotF

Таблица А.4: Аминокислотные последовательности Fre оксидоредуктаз.

№	Организм	ID кДНК	ID последовательности	Длина (а.о.)	Генное окружение
1	*Aliivibrio fischeri*	CP000020.2	AAW84557.1	236	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase, phenol hydroxylase P5 protein, **FRE**, predicted protoheme IX synthesis protein
2	*Aliivibrio salmonicida*	FM178379.1	CAQ77837.1	236	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxylyase, putative ferredoxin, **FRE**, transposase, membrane associated sulfatase
3	*Aliivibrio wodanis*	LN554846.1	CED70162.1	236	3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, Ferredoxin, **FRE**, protein HemY
4	*Candidatus Photodesmus katoptron*	JGVJ01000011.1	KEY90313.1	236	Aribosomal RNA small subunit methyltransferase, hypothetical protein, **FRE**, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxylyase, transcription termination factor rho
5	*Photobacterium damselae*	ADBS01000001	EEZ42141.1	234	universal stress protein A, putative acetate efflux pump MadN, **FRE**, hypothetical protein, 3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, transcription termination factor Rho
6	*Photobacterium kishitanii*	JZSP01000033.1	KJG06683.1	236	transcription termination factor Rho, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, ferredoxin, **Fre**, membrane protein
7	*Photobacterium leiognathi*	JZSK01000078.1	KJF85303.1	236	hypothetical protein, **FMN reductase**, ferredoxin, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, hypothetical protein, transcription termination factor Rho

продолжение Таблицы А.4

№	Организм	ID кДНК	ID последовательности	Длина (а.о.)	Генное окружение
8	*Photobacterium leiognathi subsp. mandapamensis*	DF093598.1	GAA05363.1	236	carboxylate transporter family protein, **FRE**, 2Fe-2S iron-sulfur cluster binding domain protein, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate decarboxylase
9	*Photobacterium phosphoreum*	LN794352.1	CEO37770.1	236	transcription termination factor, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, Ferredoxin , **FRE**, conserved hypothetical protein
10	*Photorhabdus asymbiotica*	FM162591.1	CAQ85963.1	233	fatty acid oxidation complex subunit alpha, 3-ketoacyl-coa thiolase, **Fre**, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, transcriptional activator rfah
11	*Photorhabdus luminescens*	BX470251.1	CAE16776.1	233	Fatty oxidation complex alpha subunit, 3-ketoacyl-CoA thiolase, **Fre**, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, Transcriptional activator RfaH
12	*Photorhabdus temperata*	CP011104.1	AKH63780.1	233	Falpha-aspartyl dipeptidase, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, **Fre**, 3-ketoacyl-CoA thiolase
13	*Shewanella woodyi*	CP000961.1	ACA88697.1	236	conserved hypothetical protein, UbiD family decarboxylase, **FRE**, transcriptional regulator CadC
14	*Vibrio albensis*	LOSL01000001.1	KTL50321.1	236	16S ribosomal RNA, **FRE**, ferredoxin, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase
15	*Vibrio campbellii*	NC_009784.1	WP_005535989.1	237	16S ribosomal RNA, **FRE**, ferredoxin, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, hypothetical protein, Rho

продолжение Таблицы А.4					
16	*Vibrio harveyi*	EU122288.1	WP_009696790.1	237	16S ribosomal RNA, **FRE**, ferredoxin, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase
17	*Vibrio orientalis*	ACZV01000001	EEX95529.1	237	rRNA, **FRE**, ferredoxin, 3-polyprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase
18	*Vibrio vulnificus*	NC_005139	WP_011151391.1	237	Integrase, **FRE**, ferredoxin, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase
19	*Vibrio splendidus*	AJZH02000003.1	OEE57136.1	237	**NAD(P)H-flavin reductase**, ferredoxin, 3-octaprenyl-4-hydroxybenzoate carboxy-lyase, hypothetical protein, transcription termination factor Rho
20	*Escherichia coli str. K-12*	NC_000913.3	NP_418286.1	233	rfaH (reverse), ubiD, **FRE**, Repeat region

Таблица А.5: Идентичность (%) аминокислотных последовательностей α- (верхняя правая часть таблицы) и β-субъединицы люциферазы различных светящихся бактерий.

	A. f.	*A. l.*	*A. s.*	*C. P. k.*	*P. a.*	*P. d.*	*P. k.*	*P. m.*	*P. l.*	*P. p.*	*Ph. a.*	*Ph. l.*	*S. h.*	*S. w.*	*V. al.*	*V. az.*	*V. c.*	*V. ch.*	*V. h.*	*V. o.*	*V. v.*
A. fischeri	-	81,64	82,77	61,80	74,86	65,25	73,67	74,86	64,41	73,39	62,08	63,20	80,79	82,54	61,41	61,69	61,69	62,08	61,41	61,69	61,97
A. logei	76,99	-	98,31	62,82	78,53	64,97	78,15	78,53	66,67	77,59	64,51	65,07	86,44	85,59	63,94	64,23	62,82	63,38	61,97	63,38	63,10
A. salmonicida	77,91	96,93	-	63,10	79,94	66,10	78,71	79,66	67,80	78,15	65,07	65,63	87,57	87,01	64,79	65,63	63,94	64,51	63,1	64,51	64,23
C. P. katoptron	55,21	54,91	54,60	-	61,69	53,24	59,50	61,69	53,80	59,78	78,89	80,28	65,92	64,43	80,56	81,13	81,97	80,34	80,56	81,13	81,41
P. aquimaris	62,77	62,77	63,08	49,54	-	75,14	86,27	95,48	75,42	86,27	61,69	62,82	81,36	79,94	62,54	62,25	62,25	61,97	60,56	61,97	61,97
P. damselae	58,41	58,41	58,41	47,56	72,09	-	69,19	74,86	96,89	69,47	55,21	55,77	67,51	67,23	56,06	54,37	54,37	54,08	53,24	53,80	54,65
P. kishitanii	61,04	63,19	62,88	50,15	73,54	69,21	-	87,96	70,03	98,88	60,89	61,45	80,11	78,71	60,06	61,45	61,45	60,06	61,17	60,89	61,45
P. mandapamensis	62,88	62,88	63,5	50,00	87,38	72,48	74,23	-	75,99	87,96	61,41	62,54	80,23	79,83	61,97	61,97	61,97	61,97	60,28	61,69	61,69
P. leiognathi	57,75	57,75	58,05	47,88	70,73	91,46	68,48	71,43	-	70,31	55,21	56,34	69,21	69,21	56,62	55,49	55,21	55,49	54,08	55,21	55,49
P. phosphoreum	61,04	64,11	63,8	49,85	73,54	68,6	96,34	73,93	67,88	-	61,17	61,73	79,83	77,87	60,34	61,73	61,73	60,34	61,45	61,17	61,73
Ph. asymbiotica	53,99	53,07	53,68	59,20	51,38	47,09	48,16	50,92	45,90	47,85	-	95,00	65,35	65,55	81,41	80,85	84,23	83,15	82,82	83,94	83,66
Ph. luminescens	52,76	52,76	53,37	59,57	51,08	48,01	48,77	51,23	47,11	48,77	83,02	-	65,63	65,83	83,38	83,1	85,63	85,11	84,23	85,35	85,07
S. hanedai	72,70	75,77	76,99	55,35	60,92	57,01	62,08	59,82	56,67	63,00	50,92	50,61	-	89,55	66,20	67,04	65,92	65,63	65,07	65,92	66,20
S. woodyi	75,77	76,38	77,30	54,60	61,23	57,80	62,27	60,12	56,84	62,27	51,23	50,61	73,93	-	66,48	65,35	64,51	64,89	63,66	65,07	64,79
V. albensis	51,50	55,15	55,48	54,82	50,66	48,52	50,50	48,84	47,88	49,83	57,14	57,81	53,82	57,48	-	80,28	84,51	84,79	83,66	83,66	83,94
V. azureus	51,23	52,15	52,76	58,95	44,92	44,82	46,32	45,40	43,94	45,71	60,49	61,11	50,31	50,61	62,13	-	87,89	87,61	87,32	88,73	87,89
V. campbellii	51,53	53,37	53,68	58,64	46,15	44,51	48,16	46,63	45,15	47,85	59,26	60,49	50,92	52,15	64,12	78,09	-	93,80	97,75	98,59	98,31
V. chagasii	50,92	52,15	52,76	57,72	45,85	42,99	45,71	45,40	43,03	46,93	56,17	57,41	50,92	51,53	62,13	74,69	83,95	-	92,96	94,37	92,96
V. harveyi	50,61	53,07	53,37	58,95	46,15	44,51	48,16	46,63	45,45	47,85	58,33	59,57	50,61	51,53	63,79	77,47	98,46	82,72	-	97,46	97,46
V. orientalis	51,53	53,07	53,37	58,95	46,15	45,12	49,08	46,63	44,85	48,47	59,88	61,11	50,92	52,15	63,46	77,78	97,22	82,72	96,30	-	97,75
V. vulnificus	51,23	53,99	54,29	59,57	45,85	44,21	48,47	46,32	44,85	48,16	58,64	59,88	51,84	52,15	63,79	78,40	95,99	82,41	95,37	94,14	-

Консервативные позиции исследуемых белков (100 % идентичность):

- Консервативные позиции α-субъединицы люцифераз (нумерация относительно *V. harveyi*): 1 — 2, 5, 11 — 13, 23, 28, 31 — 32, 36, 42 — 50, 53, 57, 60, 63 — 64, 66, 72 — 73, 77, 79 — 80, 82 — 83, 85, 88, 93 — 95, 97 — 101, 104, 107 — 110, 112 — 118, 124 — 125, 142, 153, 160, 163, 174 — 176, 179, 184, 187, 189 — 190, 192 — 196, 200 — 201, 204, 207 — 208, 212, 216, 224, 229, 231 — 232, 235, 239, 243 — 244, 246 — 247, 251, 253 — 254, 256 — 258, 260 — 261, 264, 269 — 271, 274, 276 — 277, 281, 284, 290 — 291, 293 — 295, 299 — 304, 307, 310 — 312, 316, 318 — 319, 326 — 331, 336, 340, 343, 347, 349, 351 — 352
- Консервативные позиции LuxG (нумерация относительно *V. harveyi*): 18, 28, 30 — 33, 45 — 48, 51, 58 — 60, 62, 64, 94, 96, 98 — 99, 107 — 108, 110, 112 — 114, 116 — 117, 120, 122, 134 — 135, 137 — 139, 146, 147, 152, 161, 164, 169, 180, 182, 189 — 190, 193, 196 — 199, 201 — 203, 206, 228, 232
- Консервативные позиции Fre (нумерация относительно *E. coli*: 5, 24, 32 — 36, 44, 45, 46, 48, 49, 51, 52, 61, 62, 63, 63, 93, 95, 109, 113, 114, 115, 116, 119, 136, 138, 146, 166, 174, 176, 182, 192, 196, 197, 198, 201, 202, 203, 205, 209, 210, 213, 227, 228, 231, 232
- Консервативные позиции FRP (нумерация относительно *V. harveyi*): 1, 2, 5, 11, 13, 15, 22, 30, 33, 37, 40, 44, 47, 53, 57, 65, 67, 70, 73, 76, 82, 99, 104, 107, 109, 110, 118, 119, 121, 124, 125, 127, 129, 130, 131, 132, 142, 143, 145, 146, 154, 158, 167, 168, 170, 177, 181, 192, 212, 213, 226
- Консервативные позиции FRG (нумерация относительно *V. harveyi*): 37, 39 — 42, 44 — 48, 59, 73, 81 — 82, 124, 138, 142, 144, 148, 159, 165-166, 168, 176, 182, 192, 194, 199, 201, 205 — 206, 208

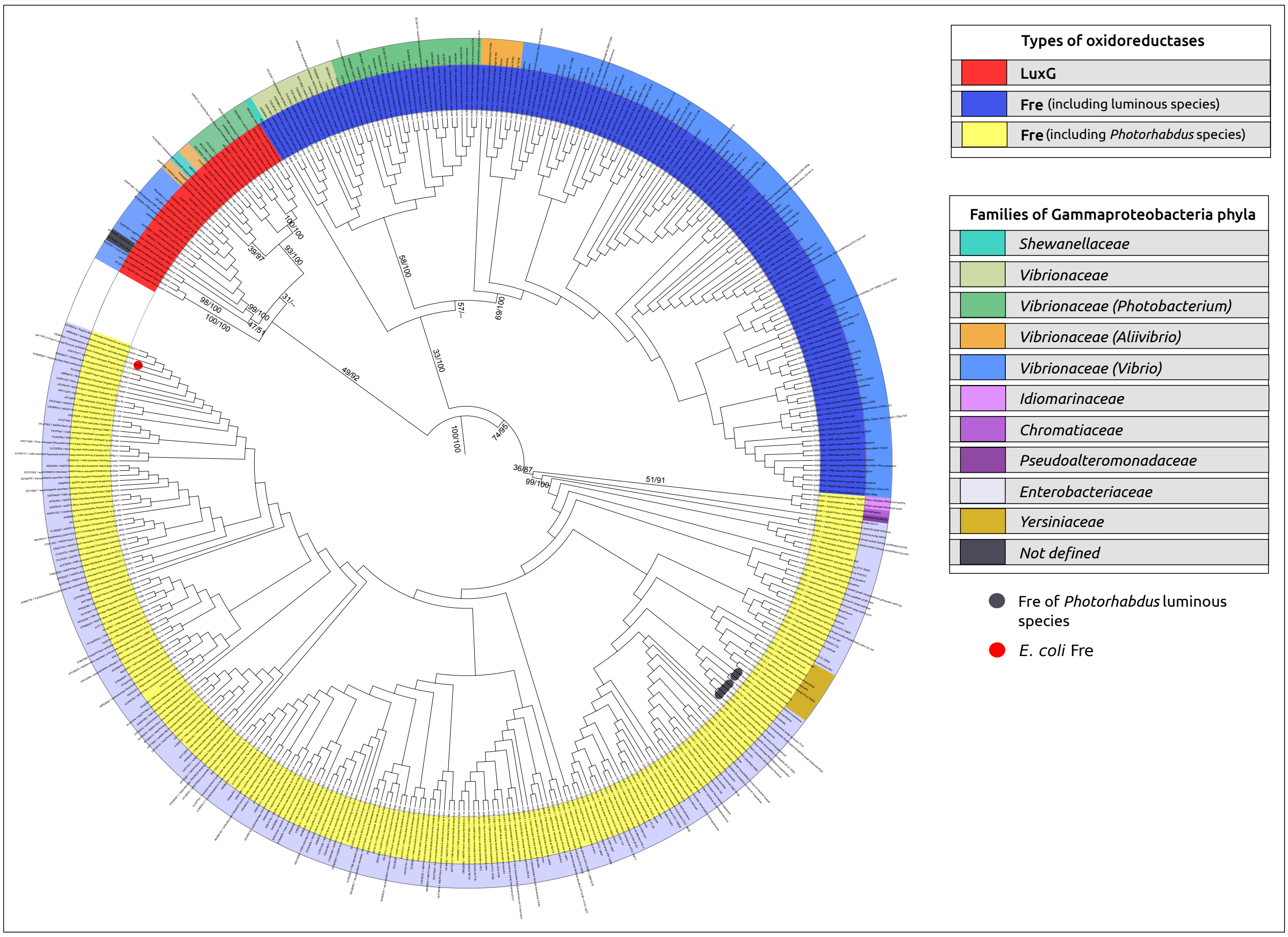

Рисунок А.1: Филогенетическое дерево Fre и LuxG оксидоредуктаз. Первое число указывает процент деревьев, полученных при помощи бутстрэп анализа (1000 повторностей), в которых были найдены соответствующие ветви. Второе число для каждой ветви указывает значение апостериорной вероятности, рассчитанное при помощи метода Байеса

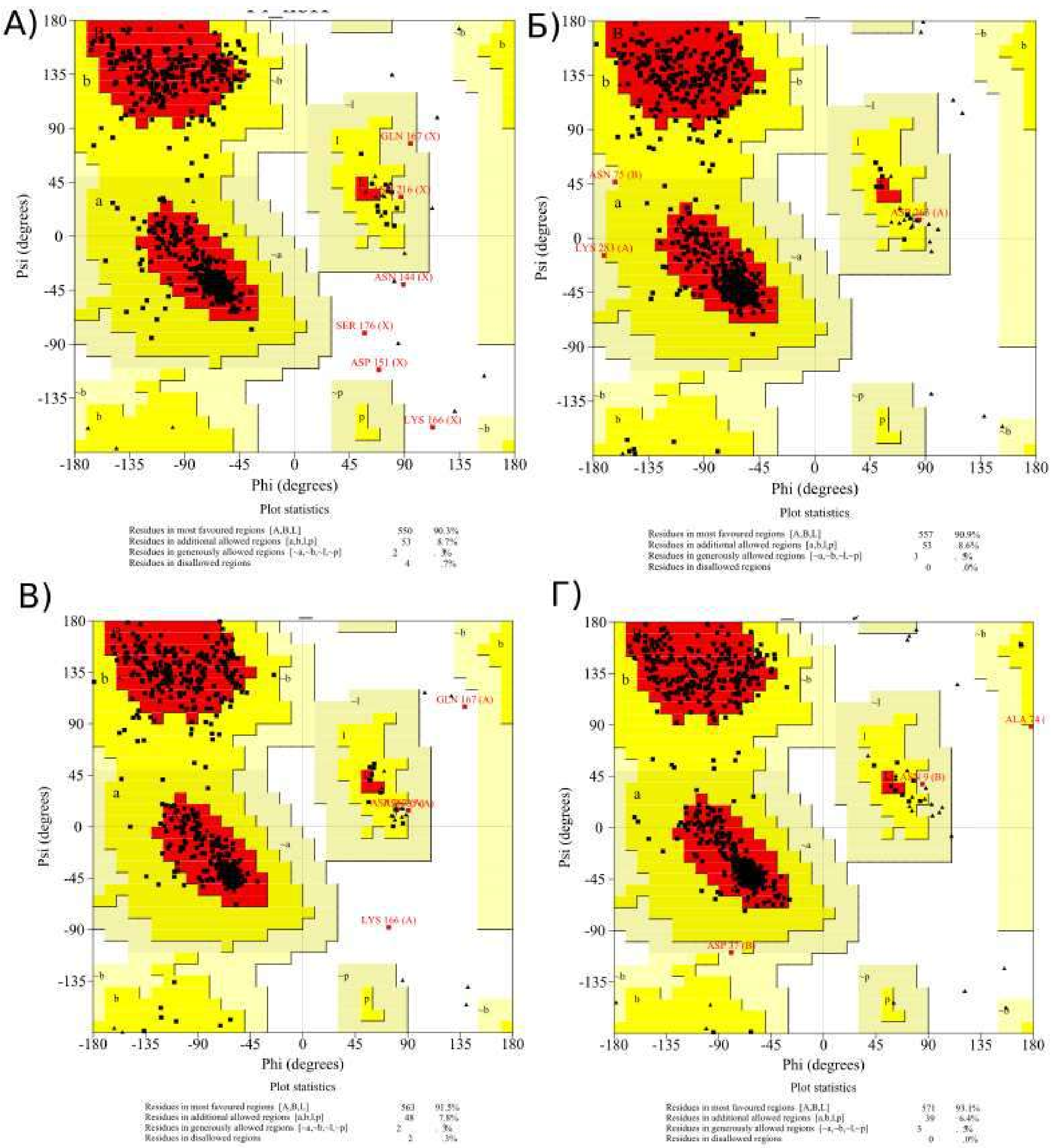

Рисунок А.2: Карты Рамачандрана, полученные для модели люциферазы *P. leiognathi* до (А) и после молекулярной динамики (В). Аналогично для модели белка люциферазы *V. harveyi* до (Б) и после (Г) молекулярной динамики. Было обнаружено, что до молекулярной динамики 90,3 % и 90.9% остатков люциферазы *P. leiognathi* и *V. harveyi* находились в наиболее выгодной конфигурации, а после молекулярной динамики — 91,5 % и 93,1 % остатков, соответственно. Анализ был выполнен при помощи программы PROCHECK [129].

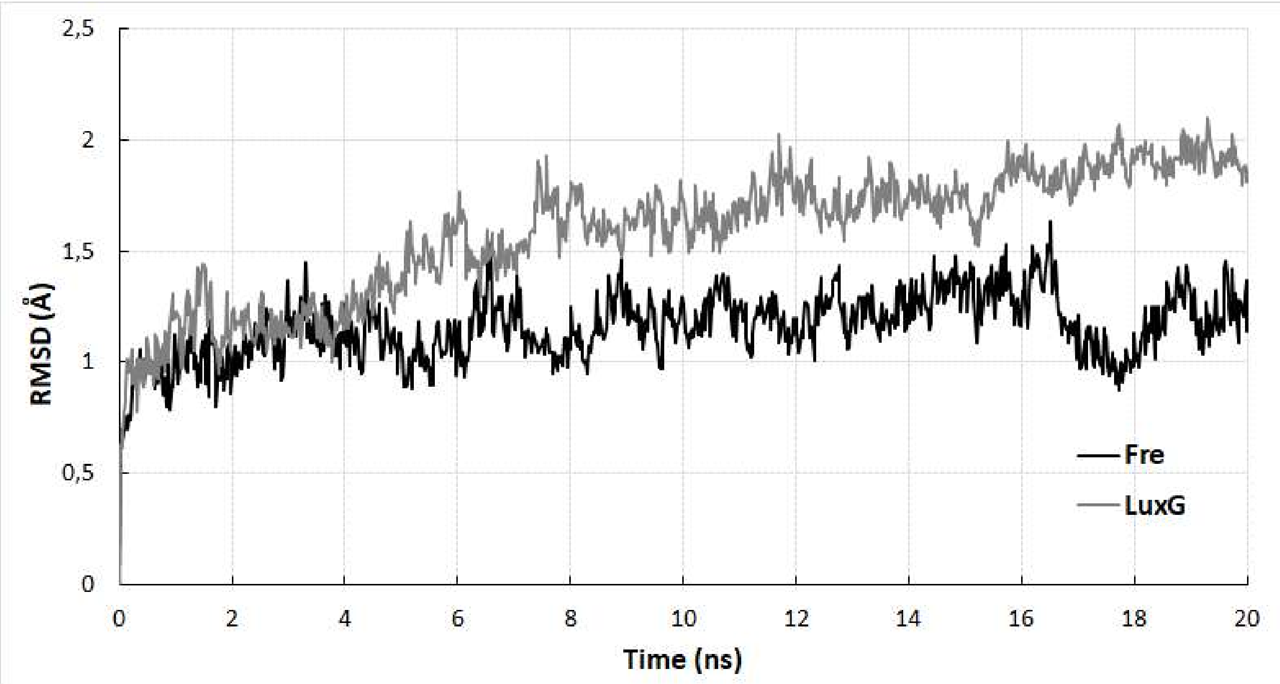

Рисунок А.3: Среднеквадратичное отклонение атомов основной цепи белка от начальной конфигурации.

Таблица А.6: Специфичные позиции выравнивания аминокислотных последовательностей α-субъединиц, которые вносят основной вклад в разбиение на две клады [113]

№	№ а.о.	№ а.о. *V. h.*	а.о.		Аутлаер/длина/а.о.
			«медленные»	«быстрые»	
1	6	6	F	I	-
2	7	7	L	C	*A. fischeri*/355/Y *P. phosphoreum*/356/-
3	8	8	L	F	-
4	9	9	T	S	-
5	15	15	L	E	*Ph. asymbiotica*/360/F *Ph. luminescens*/360/F
6	17	17	Q	H	*V. vulnificus*/355/H
7	22	22	K	D	*V. albensis*/355/Q *P. damselae*/354/E *P. leiognathi*/354/E
8	24	24	L	F	*V. azureus*/355/M Candidatus P. katoptron/360/M
9	26	26	N	R	*Ph. asymbiotica*/360/K *Ph. luminescens*/1-360/K
10	34	34	C	L	-
11	41	41	L	T	*A. logei*/354/I *A. salmonicida*/354/I
12	52	52	L	T	-
13	55	55	P	L	-
14	65	65	A	R	-
15	74	74	A	M	-
16	75	75	A	G	-
17	91	91	N	L	-
18	102	102	R	N	*V. azureus*/1-355/M *Candidatus P. katoptron*/1-360/K
19	105	105	I	V	*P. damselae*/1-354/T *P. leiognathi*/1-354/T
20	106	106	C	V	-
21	119	119	T	V	*P. damselae*/1-354/T *P. leiognathi*/1-354/T
22	123	123	N	D	*Candidatus P. katoptron*/1-360/E *S. woodyi*/1-356/E *A. fischeri*/1-355/E
23	127	127	L	I	-
24	128	128	M	T	*Ph. luminescens*/1-360/A *P. damselae*/1-354/A |*P. leiognathi*/1-354/A
25	131	131	W	F	-

26	132	132	Y	H	*P. damselae*/1-354/Y *P. leiognathi*/1-354/Y
27 28	134 170	134 170	L V	M T	*Candidatus P. katoptron*/1-360/I *Ph. asymbiotica*/1-360/I
29	171	171	Y	C	-
30	172	172	V	M	-
31	173	173	V	T	-
32	183	183	A	L	-
33	191	191	I	V	-
34	205	205	L	M	*Ph. asymbiotica*/1-360/I *P. damselae*/1-354/I *P. leiognathi*/1-354/L
35	230	227	S	T	*V. harveyi*/1-355/A
36	233	230	T	C	-
37	245	242	I	V	*V. azureus*/1-355/K
38	252	249	H	N	*A. fischeri*/1-355/S
39	271	268	K	R	*V. azureus*/1-355/Q *Ph. luminescens*/1-360/R
40	275	272	F	Y	-
41	276	273	N	H	*P. damselae*/1-354/L *P. leiognathi*/1-354/L
42	289	286	K	T	*V. albensis*/1-355/R *P. damselae*/1-354/A *P. leiognathi*/1-354/A
43	327	324	C	T	-
44	347	344	Q	M	*V. azureus*/1-355/E
45	348	345	S	T	*V. albensis*/1-355/A *P. damselae*/1-354/E *P. leiognathi*/1-354/E
46	351	348	M	A	-
47	356	353	E	D	*V. albensis*/1-355/S *S. woodyi*/1-356/E *A. fischeri*/1-355/E
48	357	354	K	P	*V. albensis*/1-355/T *Candidatus P. katoptron*/1-360/R

Таблица А.7: Специфичные позиции выравнивания аминокислотных последовательностей β-субъединиц, которые вносят основной вклад в разбиение на две клады [113]

№	№ а.о.	№ а.о. *V. h.*	а.о.		Аутлаер/длина/а.о.
			«медленные»	«быстрые»	
1	21	21	I	L	*C. P. katoptron*/1-325/L *V. azureus*/1-324/L
2	30	30	Y	L	*C. P. katoptron*/1-325/H
3	36	34	L	Y	*P. kishitanii*/1-328/K *P. phosphoreum*/1-328/K
4	46	44	N	H	-
5	60	58	V	A	*C. P. katoptron*/1-325/A
6	72	70	K	H	*P. damselae*/1-326/K *P. leiognathi*/1-326/E
7	78	76	H	Q	-
8	93	91	C	S	*P. damselae*/1-326/C *P. leiognathi*/1-326/G
9	105	103	P	L	*Ph. asymbiotica*/1-324/L *Ph. luminescens*/1-324/L
10	112	110	K	N	*Ph. asymbiotica*/1-324/R *A. fischeri*/1-326/S *P. mandapamensis*/1-326/S
11	120	118	N	K	*A. fischeri*/1-326/R
12	129	127	L	Q	C. P. katoptron/1-325/I *V. chagasii*/1-324/V
13	132	130	E	A	*C. P. katoptron*/1-325/A *V. chagasii*/1-324/A
14	160	158	V	I	*C. P. katoptron*/1-325/I *P. damselae*/1-326/V *P. leiognathi*/1-326/V
15	164	162	A	C	-
16	166	164	T	S	*P. damselae*/1-326/T
17	200	198	N	L	-
18	203	201	R	K	*C. P. katoptron*/1-325/K *Ph. asymbiotica*/1-324/K
19	253	251	V	I	*Ph. asymbiotica*/1-324/I *P. damselae*/1-326/V *P. leiognathi*/1-326/V

20	283	280	T	Y	*C.P. katoptron*/1-325/M *Ph. luminescens*/1-324/I
21	293	290	C	T	*C. P. katoptron*/1-325/S
22	300	297	M	L	*Ph. asymbiotica*/1-324/L *Ph. luminescens*/1-324/L
23	311	308	Q	V	-
24	321	318	N	K	-
25	325	322	T	N	-
26	326	323	H	L	*P. aquimaris*/1-325/K *Sh. hanedai*/1-327/I

Таблица А.8: Замены консервативных позиций Fre, обнаруженные в послдеовательностях оксидоредуктазы LuxG. Позиции консервативные для всех последовательностей Fre выделены жирным шрифтом (100 % идентичность)

№	Fre *E. coli* a.o.	Замены в LuxG	Комментарий
1	Val7	Val (*A.fischeri, A.salmonicida, C.p. katoptron, V.albensis, P. leiognathi*) Ile (*P. mandapamensis, P.phosphoreum, S.woodyi, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, P. kishitanii, P. aquimaris*) Leu (*V. vulnificus*)	Similar substitutions by other hydrophobic residues
2	Ser9	Lys (*A.fischeri, A.salmonicida, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus, P. leiognathi, P. kishitanii, P. aquimaris, P. mandapamensis, P.phosphoreum, S.woodyi*) Asp (*C.p. katoptron*) Thr (*V.albensis*)	Polar Ser was partially substituted by positively charged Lys
3	**Leu36**	Leu (*A.salmonicida, C.p. katoptron, V.albensis*) Val (*A.fischeri, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris, P. leiognathi*) Ala (*P. mandapamensis*) Ile (*S.woodyi, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus*)	Similar substitutions by other hydrophobic residues
4	Val39	Asp (*A.fischeri, A.salmonicida*) Asn (*C.p. katoptron*) Tyr (*P. mandapamensis, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris, P. leiognathi*) Thr (*V.albensis*) Ser (*V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus*) Lys (*S.woodyi*)	
5	Met40	Leu (*A.salmonicida, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, P. leiognathi, P. kishitanii, P. aquimaris, P.l. mandapamensis, P.phosphoreum, S.woodyi, V.albensis*) Phe (*A. fischeri, V. vulnificus*) Ile (*C.p. katoptron*)	Similar substitutions by other hydrophobic residues
6	**Asp44**	indel	The position is located within FAD-binding site. Loss of the negatively charged residue

№	Fre *E. coli* a.o.	Замены в LuxG	Комментарий
7	**Lys45**	Lys (*A. fischeri, A.salmonicida, P.phosphoreum, S.woodyi, P. kishitanii, P. aquimaris*) Ser (*C.p. katoptron, V. campbelii, V. harveyi, V. vulnificus*) Gln (*P. mandapamensis*) Asn (*P. leiognathi*) Asp (*V. albensis*) Cys (*V. orientalis*)	The position is located within FAD-binding site. Positively charged Lys was partly substituted by polar or negatively charged residues
8	**Arg46**	Arg (*A. fischeri, V. albensis*) Leu (*P.l. mandapamensis, P.phosphoreum, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus, P. leiognathi/, P. kishitanii, P. aquimaris*) Tyr (*C.p. katoptron*) Gln (*A.salmonicida*) Thr (*S.woodyi*)	The position is located within FAD-binding site. Loss of the charged residue
9	Ala66	Ala (*V. albensis, V. vulnificus*) Gly (*A. fischeri, P.l. mandapamensis, P. leiognathi, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis*) Ser (*A.salmonicida, P.phosphoreum, S.woodyi, P. kishitanii, P. aquimaris*) Glu (*C.p. katoptron*)	The position is located near NAD(P)-binding site
10	Glu68	Glu (*C.p. katoptron*) Asp (*A. fischeri, A.salmonicida, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis*) Ile (*P. mandapamensis*) Asn (*S.woodyi*) Val (*P. leiognathi, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris*) Cys (*V. vulnificus*) Lys (*V. albensis*)	Partial loss of the negatively charged residue
11	Asn70	Glu (*A. fischeri, P. leiognathi, P. mandapamensis, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris*) Ser (*A.salmonicida, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis*) Asp (*S.woodyi, V. albensis*) Ala (*C.p. katoptron*) Thr (*V. vulnificus*)	The substitution of Asn by other polar residues or negatively charged Glu and Asp

№	Fre *E. coli* a.o.	Замены в LuxG	Комментарий
12	Tyr72	Ala (*P. mandapamensis, P. leiognathi, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris*) Lys (*C.p. katoptron, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus*) Ser (*A. fischeri, A.salmonicida, S.woodyi*) Gly (*V. albensis*)	The position is located within FAD-binding site. Loss of the aromatic ring
13	Ala73	Val (*P.l. mandapamensis, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris, V. albensis*) Asn (*C.p. katoptron, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis*) Leu (*A. fischeri, A.salmonicida*) Ser (*S.woodyi, V. vulnificus*) Ile (*P. leiognathi*)	The position is located within FAD-binding site. The substitution of Ala by other hydrophobic residues or polar Asn and Ser
14	*Phe114*	Leu (*A. fischeri, A.salmonicida, P.l. mandapamensis, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris, P. leiognathi, C.p. katoptron, S.woodyi*) Met (*V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus*) Ile (*V. albensis*)	The position is located within FAD-binding site. Loss of the aromatic ring The substitution by other hydrophobic residues
15	**Arg118**	Asn (*A.salmonicida, P.l. mandapamensis, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris, P. leiognathi, S.woodyi) Leu (V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis*) Phe (*V. vulnificus*) Met (*V. albensis*) Ser (*A. fischeri*) Val (*C.p. katoptron*)	Loss of the positive charge. The substitution by polar Asn (Ser) or hydrophobic residues
16	**Val167**	Val (*P.l. mandapamensis, P. leiognathi*) Ile (*A. fischeri, A.salmonicida, S.woodyi*) Leu (*P.phosphoreum, V. albensis, P. kishitanii, P. aquimaris*) Thr (*V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus*) Ser (*C.p. katoptron*)	The similar substitution of Val by other hydrophobic residues or polar Thr and Ser
17	**Arg202**	Pro (*A. fischeri, A.salmonicida, P.l. mandapamensis, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris, P. leiognathi, C.p. katoptron, S.woodyi, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus, V. albensis*)	The position is located within NAD(P) binding site. Loss of the positive charge

№	Fre *E. coli* a.o.	Замены в LuxG	Комментарий
18	**Phe203**	Phe (A. fischeri, A.salmonicida, P.l. mandapamensis, P. leiognathi) Gln (P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris) Tyr (S.woodyi, V. vulnificus) Cys (*V. campbelii, V. harveyi*) Arg (*V. orientalis*) Met (*C.p. katoptron*) Ile (*V. albensis*)	The position is located within NAD(P) binding site
19	**Glu204**	Gly (*P. mandapamensis, P.phosphoreum, P. leiognathi, P. kishitanii, P. aquimaris*) Lys (*C.p. katoptron, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus*) Met (*A. fischeri, A.salmonicida*) Gln (*S.woodyi*) Asn (*V. albensis*)	The position is located within NAD(P) binding site. Loss of the negative charge
20	Ala206	Ala (*A. fischeri, A.salmonicida, S.woodyi*) Ile (*C.p. katoptron, V. albensis, V. vulnificus*) Val (*V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis*) Thr (*P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris*) Ser (*P. mandapamensis, P. leiognathi*)	The similar substitution of Ala by other hydrophobic residues or polar Thr and Ser
21	**Phe213**	Phe (*P. mandapamensis, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus*) Leu (*A. fischeri, A.salmonicida, C.p. katoptron, P.phosphoreum, S.woodyi, V. albensis, P. kishitanii, P.aquimaris, P. leiognathi*)	Partial loss of the aromatic ring
22	**Phe231**	Tyr (*A. fischeri, A.salmonicida, P. mandapamensis, P.phosphoreum, P. kishitanii, P. aquimaris, P. leiognathi, C.p. katoptron, S.woodyi, V. campbelii, V. harveyi, V. orientalis, V. vulnificus, V. albensis*)	Similar substitutions

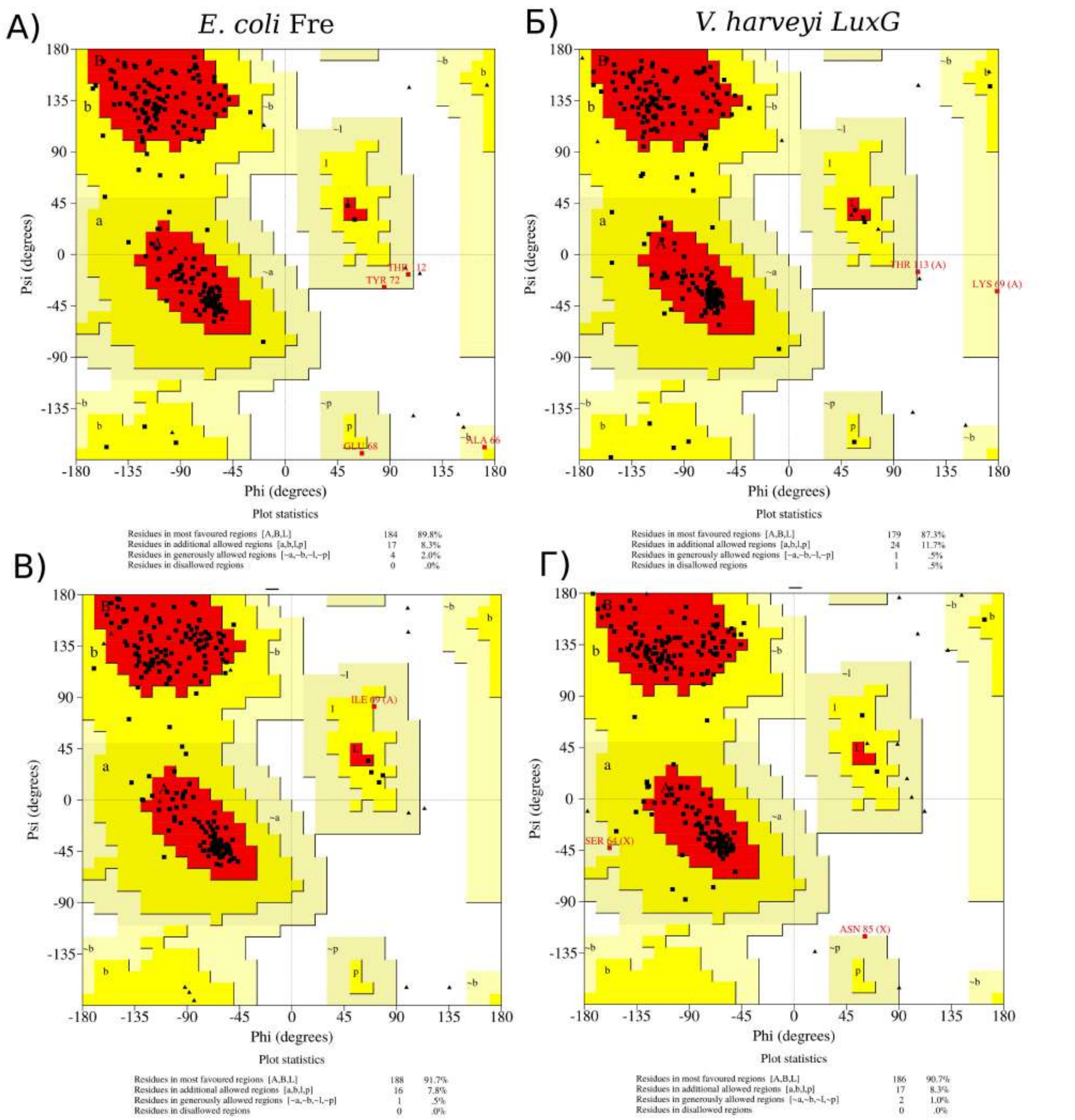

Рисунок А.4: Карты Рамачандрана, полученные для модели Fre *E. coli*, в которой были реконструированы нерасшифрованные участки до (А) и после молекулярной динамики (В). Аналогично для модели белка LuxG *V. harveyi* до (Б) и после (Г) молекулярной динамики. Было обнаружено, что до молекулярной динамики 89,8 % и 87,3% остатков Fre *E. coli* и LuxG *V. harveyi* находились в наиболее выгодной конфигурации, а после молекулярной динамики – 91,7% и 90,7% остатков, соответственно. Анализ был выполнен при помощи программы PROCHECK [129].