

Journal of Siberian Federal University. Biology

~ ~ ~

УДК 577.325.7

The Role of Electrostatic Interactions in Complex Formation between Bacterial Luciferase and NADPH:FMN-oxidoreductase

Anna A. Deeva^{*a},
Elena V. Nemtseva^{a,b} and Valentina A. Kratasyuk^{a,b}

^a*Siberian Federal University*

79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041, Russia

^b*Institute of Biophysics SB RAS*

Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS"

50/50 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036, Russia

Received 25.08.2017, received in revised form 25.09.2017, accepted 11.10.2017, published online 10.11.2017

*A possible mechanism of complex formation between bacterial luciferase and NADPH:FMN-oxidoreductase from *Vibrio harveyi* sustained by electrostatic forces is studied. The complex between the enzymes is important for a direct FMNH₂ transfer without a contact with solvent, which could cause a rapid autooxidation and the formation of reactive oxygen species. In the current work the diversity of possible relative positions of NADPH:FMN-oxidoreductase and luciferase was obtained with Monte-Carlo sampling governed by oxidoreductase internal charged groups and electrostatic field caused by luciferase. Among the structures with the minimal energies, the one was found that has a proper active sites orientation for a direct FMNH₂ transfer. Possible role of hydrogen bonding between Arg291 and Gln197 of luciferase and oxidoreductase, respectively, in stabilization of this complex is proposed.*

Keywords: bacterial bioluminescence, luciferase, NADPH:FMN-oxidoreductase, molecular docking, protein-protein interactions, substrate transfer.

Citation: Deeva A.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A. The role of electrostatic interactions in complex formation between bacterial luciferase and NADPH:FMN-oxidoreductase. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 20
DOI: 10.17516/1997-1389-0033.

© Siberian Federal University. All rights reserved

* Corresponding author E-mail address: adeeva@sfu-kras.ru

Роль электростатических взаимодействий в формировании комплекса между бактериальной люциферазой и NADPH:FMN-оксидоредуктазой

А.А. Деева^а, Е.В. Немцева^{а,б}, В.А. Кратасюк^{а,б}

^аСибирский федеральный университет
Россия, 660041, Красноярск, пр. Свободный, 79

^бИнститут биофизики СО РАН
Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр СО РАН»
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, 50/50

Методом молекулярного докинга исследован возможный механизм формирования белкового комплекса между бактериальной люциферазой и NADPH:FMN-оксидоредуктазой из *Vibrio harveyi* за счет электростатических взаимодействий. Комплекс между исследуемыми ферментами необходим для передачи люциферазе субстрата – молекулы FMNH₂, которая подвержена быстрому автоокислению с образованием активных форм кислорода при контакте с внутриклеточным растворителем. В настоящей работе с помощью метода Монте-Карло было получено многообразие возможных положений NADPH:FMN-оксидоредуктазы относительно люциферазы с учетом потенциала электростатического поля, создаваемого люциферазой. Показано, что среди структур с наименьшей энергией взаимодействия имеется комплекс, в котором ориентация активных центров обоих ферментов способствует прямой передаче флавина. Высказано предположение о роли водородной связи между Arg291 и Gln197 люциферазы и оксидоредуктазы соответственно в стабилизации комплекса между белками.

Ключевые слова: бактериальная билюминесценция, люцифераза, NADPH:FMN-оксидоредуктаза, молекулярный докинг, белок-белковые взаимодействия, туннелирование субстрата.

Введение

Флавінзависимые биферментные системы обнаружены у широкого круга микроорганизмов, где они участвуют в целом спектре метаболических реакций (Ellis, 2010; Huijbers et al., 2014). Такие системы состоят из оксидоредуктазы, которая производит восстановленный флавинонуклеотид (FMNH₂), и монооксигеназы, которая использует его для активации молекулярного кислорода и окисления ароматических и полициклических со-

единений. Предполагается, что скоординированная работа биферментной системы *in vivo* является более предпочтительной, чем передача FMNH₂, за счет свободной диффузии в среде, так как в первом случае вероятность образования активных форм кислорода из-за окисления нестабильной молекулы FMNH₂ значительно ниже (Gibson, Hastings, 1962; Szpilewska et al., 2003; Tu, 2008). Кроме того, физиологически важные молекулы NADPH, утилизируемые оксидоредуктазой в ходе ка-

тализа, используются более эффективно при образовании белкового комплекса. Однако механизм работы таких систем до конца не изучен. По-видимому, он не универсален, так как лишь для некоторых систем можно выделить стабильный комплекс при помощи стандартных методик, таких как перекрестное сшивание и аффинная хроматография (Abdurachim, Ellis, 2006; Sucharitakul et al., 2014).

Наиболее изученной флавинозависимой биферментной системой является бактериальная люцифераза и NADPH:FMN-оксидоредуктаза. В ходе реакции люцифераза последовательно связывает FMNH₂, поставляемый NADPH:FMN-оксидоредуктазой, молекулярный кислород (O₂) и алифатический альдегид (RCHO) (Meighen, 1991). В результате окисления субстратов формируется интермедиат в электронно-возбужденном состоянии, дезактивация которого происходит с испусканием фотона ($\lambda_{\max} \sim 490$ нм) (Hou et al., 2014; Luo, Liu, 2016). Возможность преобразовывать энергию химической реакции в свет делает данную ферментативную систему особо привлекательной для широкого круга прикладных направлений, включающих аналитические методы (Lonshakova-Mukina et al., 2015; Esimbekova et al., 2017), экологический мониторинг (Kratasyuk, Esimbekova, 2015) и биосенсоры (Roda et al., 2009; Ranjan et al., 2017). Однако вопрос о том, как происходит передача субстратов биолюминесцентной реакции, в частности FMNH₂, до сих пор остается открытым (Sucharitakul et al., 2014).

Предполагается, что непрерывное свечение бактерий обеспечивается за счет скоординированной работы компонентов полиферментной биолюминесцентной системы. Большинство из них закодировано в *lux*-опероне – непрерывном, консервативном и последовательно экспрессируемом наборе генов, который был обнаружен у всех извест-

ных светящихся бактерий (Meighen, 1993; Dunlap, Urbanczyk, 2013). Гены *luxC*, *luxD* и *luxE* кодируют белки, входящие в комплекс восстановления альдегида, и примыкают к генам *luxA* и *luxB*, кодирующим люциферазу. Это согласуется с тем, что синтез альдегидного комплекса должен происходить одновременно с люциферазой для осуществления эффективной передачи альдегида. В свою очередь механизм взаимодействия люциферазы и оксидоредуктазы не так очевиден. К настоящему времени известно три возможных источника FMNH₂ для люциферазы в клетке: (1) LuxG оксидоредуктазы, закодированные в том же *lux*-опероне (Lin et al., 1998; Nijvipakul et al., 2008), (2) оксидоредуктазы Fre, гомологичные Fre из *Escherichia coli* (Zenno, Saigo, 1994; Campbell, Baldwin, 2009a) и (3) оксидоредуктазы FRP и FRD, впервые найденные в *Vibrio harveyi* (Liu et al., 1997; Tu, 2008), и FRase I из *Aliivibrio fischeri* (Duane, Hastings, 1975; Zenno et al., 1994). Последние оксидоредуктазы на данный момент являются наиболее изученными благодаря серии работ Ту с соавторами (Lei, Tu, 1998; Jeffers, Tu, 2001; Jeffers et al., 2003; Low, Tu, 2003), в которых было показано, что оксидоредуктаза FRP может формировать комплекс с люциферазой. Однако их исследования стационарной кинетики ферментативной реакции (Lei, Tu, 1998; Jeffers, Tu, 2001) в ряде работ подвергаются серьезной критике (Campbell, Baldwin, 2009a; Tinikul et al., 2013; Sucharitakul et al., 2014).

Поскольку наибольшее количество экспериментальных доказательств в пользу комплекса было найдено для люциферазы и оксидоредуктазы FRP *V. harveyi* (Lei, Tu, 1998; Jeffers, Tu, 2001; Jeffers et al., 2003; Low, Tu, 2003), 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 (Tu, Hastings, 1980), а люциферазы некоторых бактерий способны взаимодействовать *in vivo* с вторичными эмиттерами биolumинесценции, такими как люмазиновый белок, за счет электростатических сил (Sato et al., 2010). В связи с этим можно сделать предположение, что формирование комплекса с оксидоредуктазой также происходит за счет электростатических взаимодействий.

В данной работе при помощи молекулярного докинга был изучен вклад электростатических взаимодействий в формирование комплекса между ферментами двухкомпонентной флавинзависимой системы бактериальная люцифераза и NADPH:FMN-оксидоредуктаза *V. harveyi*. В результате среди полученных конфигураций с наименьшей энергией взаимодействия была определена такая, для которой расположение активных центров обоих белков способствует прямой передаче FMNH₂, выполнен анализ структурных предпосылок к образованию комплекса.

Материалы и методы

Подготовка кристаллических структур

Для исследования межмолекулярных взаимодействий между ферментами биolumинесцентной системы использовались кристаллические структуры бактериальной люциферазы (PDB ID: 3FGC) (Campbell et al., 2009) и NADPH:FMN-оксидоредуктазы FRP (PDB ID: 2BKJ) (Tanner et al., 1999) из *V. harveyi*. Так как файлы структуры не содержат атомы водорода, они были добавлены, после чего проводилась их оптимизация в программном пакете CHARMM (Brooks et al., 2009). Координаты следующих мобильных элементов структуры отсутствуют в файлах, содержащих координаты атомов исследуемых белков:

- 3FGC: α Gly284, α His285, α Lys286, α Asp287, α Thr288, α Asn289;
- 2BKJ (симметрично в обеих субъединицах): Ala201, Ser202, Arg203, Thr204, Ser205, Asn206, Gln207, Lys208, Leu209.

Недостающие участки мобильных пептидов были реконструированы по гомологии при помощи программы MODELLER (Webb, Sali, 2014), после чего также проводилась их оптимизация в CHARMM.

Расчет электростатического потенциала и белок-белковый докинг

Предварительно каждому атому обоих белков присваивали значения массы и заряда. Затем для молекулы люциферазы рассчитывали значение потенциала электрического поля с помощью программы APBS (Adaptive Poisson Boltzmann Solver) (Unni et al., 2011) при температуре 300 К и концентрации положительно и отрицательно заряженных ионов радиусом 2 Å равной 0.12 М. Расчет производился в прямоугольном боксе, центрированном вокруг молекулы белка. 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 $\epsilon = 4$, для ячеек раствора $\epsilon = 80$. 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 (You, Bashford, 1995; Ullmann et al., 2008).

Полученные значения электростатического потенциала для молекулы люциферазы в дальнейшем применяли для нахождения белок-белкового комплекса с наименьшей энергией электростатического взаимодействия (You, Bashford, 1995; Ullmann et al., 2008). Для поиска возможных конфигураций комплекса использовался метод Монте-Карло, реализованный в программе MC-Dock (Ullmann et al., 1997). Для отбора комплексов использовали критерий Метрополиса (Metropolis et al., 1953). 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 $7,9 \times 10^5$ возможных конфигураций, среди которых были выбраны десять с наименьшей энергией взаимодействия.

Результаты

Предварительный докинг

Для белков бактериальной люциферазы и оксидоредуктазы FRP были смоделированы остатки полипептидной цепи, отсутствующие в разрешенной кристаллической структуре, и проведен предварительный докинг. Первую 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 рис. 1. Энергия взаимо-

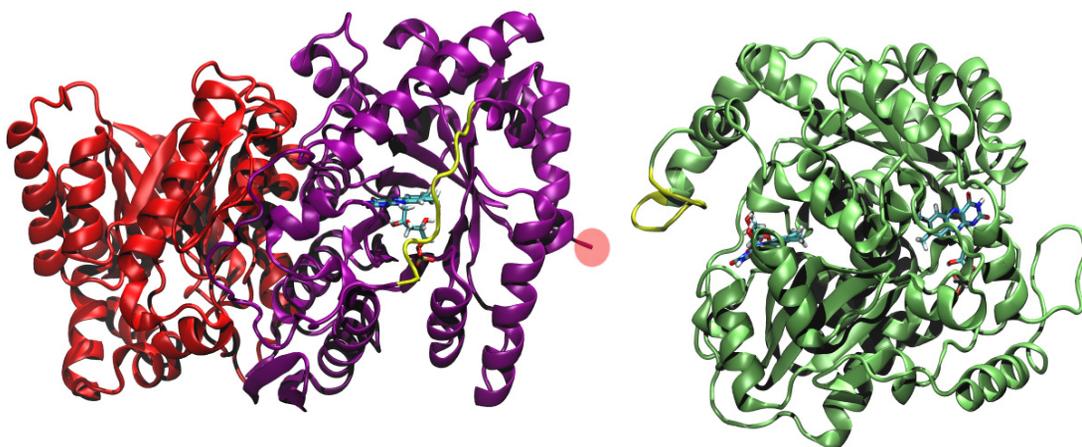


Рис. 1. Комплекс люциферазы (слева) и оксидоредуктазы (справа), полученный в результате предварительного докинга. α -субъединица люциферазы обозначена фиолетовым, а β -субъединица – красным цветом. Молекулы флавина указывают положение активного центра ферментов, они представлены при помощи «палочковой» модели, цветами показаны элементы. Красным кругом обозначен С-конец. Мобильные петли обоих ферментов выделены желтым цветом. Все рисунки сделаны при помощи программы VMD (Humphrey et al., 1996)

Fig. 1. Preliminary docking results for bacterial luciferase (left) and oxidoreductase (right). Luciferase α -subunit is colored purple and β -subunit is colored red. Flavin molecules indicate the position of the active site, they are depicted by a licorice representation, chemical elements are presented by different colors. The C-terminal is pointed by the red circle. Mobile loops of both enzymes are colored yellow. This image (and Fig. 2-3) is prepared with VMD (Humphrey et al., 1996)

действия для данного комплекса составила -15.7 ккал/моль. Далее было проанализировано взаимное положение активных центров исследованных ферментов.

Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер (рис. 1, структура слева), каждая из субъединиц которого формирует структуру $(\beta/\alpha)_8$ -бочонка, также известную как ТМ бочонка (Fisher et al., 1995). Активный центр расположен на α -субъединице, что видно по структуре связанного флавина, показанного на рис. 1 голубым цветом. Активный центр представляет собой полость в центре β -бочонка, состоящую, главным образом, из гидрофобных остатков и ряда критических аминокислот, играющих важную роль в связывании субстратов и стабилизации интермедиатов реакции (Deeva et al., 2016). NADPH:FMN-оксидоредуктаза – гомодимер (рис. 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_{Vh}) в каждом активном центре также содержится по одной дополнительной молекуле FMN в качестве кофактора (Tu, 2008). Известно, что моноферментная реакция, катализируемая FRP_{Vh}, происходит по механизму «пинг-понг», однако в присутствии бактериальной люциферазы механизм изменяется на последовательный, в котором осуществляется перенос кофактора от оксидоредуктазы к люциферазе (Tanner et al., 1996; Jeffers, Tu, 2001).

Таким образом, ориентация белков в комплексе, представленном на рис. 1, предполагает возможность прямого переноса восстановленного флавина. Однако более внимательное рассмотрение полученной структуры указывает на то, что альтернативные конформации мобильных петель (обозначены на рис. 1 жел-

тым 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), которые обладают особой подвижностью (Campbell, Baldwin, 2009b). Экспериментально было показано, что она отвечает за защиту возбужденного интермедиата реакции от возможного тушения растворителем (Sparks, Baldwin, 2001) и фиксирует субстраты в активном центре (Campbell et al., 2010). Мобильная петля FRP_{Vh} (участок 201-209 а.к.о.) также фиксирует субстраты в активном центре (Wang et al., 2000). 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 С-концевых аминокислотных остатков бактериальной люциферазы (Leu351, Lys352, Glu353, Lys354, Gln355). Этот участок тоже довольно подвижен, расположен достаточно близко к активному центру (рис. 1, красный круг), его свободная карбоксильная группа способна в растворителе притягивать протоны, в результате чего происходит экранирование, которое может повлиять на взаимодействие между белками.

Анализ возможных комплексов между люциферазой и оксидоредуктазой

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 должна быть минимальна или представлять собой локальный минимум. Таким образом, в ходе расчетов траектория поиска сужается до определенной области, в которой расположен этот минимум. На рис. 2а синими точками изображены возможные позиции оксидоредуктазы относительно люциферазы с различными значениями энергии, при этом каждая из позиций была получена не менее 15 раз в ходе 100 запусков симуляции. По рисунку видно, что существует несколько областей с повышенной вероятностью нахождения оксидоредуктазы относительно люциферазы и однозначно предпочтительная конфигурация комплекса не определяется.

Однако среди десяти структур, соответствующих наименьшим значениям энергии взаимодействия (от -14.0 до -9.4 ккал/моль), была найдена конфигурация, для которой возможен прямой перенос флавина между активными центрами ферментов. Полученный комплекс с энергией электростатического взаимодействия -9.6 ккал/моль представлен на рис. 2б. 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.

Затем было рассчитано расстояние между аминокислотными остатками, которые могут принимать участие в формировании комплекса за счет образования водородных связей (табл. 1). Видно, что Arg291 и Gln197 люциферазы и оксидоредуктазы соответственно могут вносить наибольший вклад во

взаимодействие при туннелировании FMNH₂ между активными центрами белков.

Дополнительно было проведено проецирование электростатического потенциала на поверхность, доступную растворителю, для обоих белков (рис. 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 остатков аргинина (рис. 3, выделено зелеными овалами). Однако рядом с активным центром люциферазы находится впадина с отрицательным зарядом (рис. 3б, 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.

Обсуждение

Одной из проблем выявления белок-белковых взаимодействий признан 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 (Sucharitakul et al., 2014). 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.

Проведенные расчеты электростатического потенциала, создаваемого бактериальной люциферазой, и его влияния на взаимо-

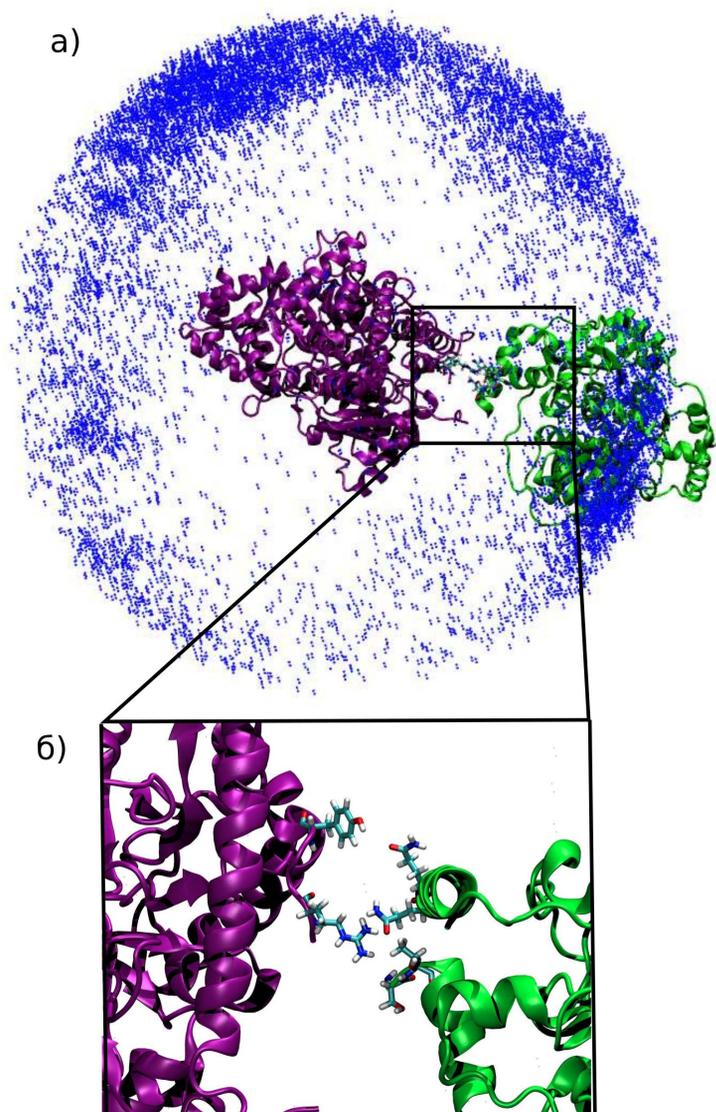


Рис. 2. Положения оксидоредуктазы относительно люциферазы (синие точки), полученные не менее 15-ти раз в ходе 100 симуляций. Точка отражает положение центра масс белка (а). Конфигурация комплекса с энергией взаимодействия -9.6 ккал/моль, для которой возможна прямая передача FMNH_2 между активными центрами ферментов (б). Оксидоредуктаза обозначена зеленым цветом, люцифераза – фиолетовым. Аминокислотные остатки, которые могут принимать участие в стабилизации комплекса, представлены при помощи «палочковой» модели

Fig. 2. Positions of oxidoreductase relative to luciferase (blue dots), which were derived not less than 15 times during 100 docking runs. A dot represents the center of mass of oxidoreductase (a). Configuration of the complex with corresponding interaction energy -9.6 kkal/mol. Such orientation of the enzymes could provide a direct FMNH_2 transfer (b). Oxidoreductase is colored green, luciferase – purple, probable amino acids involved into complex stabilization are shown with licorice representation

действие с NADPH:FMN-оксидоредуктазой *V. harveyi* показали, 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 видимо-

Таблица 1. Расстояния между атомами аминокислотных остатков, которые могут принимать участие в стабилизации белок-белкового комплекса

Table 1. Possible hydrogen-bonding partners in the complex between luciferase and NADPH:FMN oxidoreductase

Люцифераза		Оксидоредуктаза		Расстояние, Å
Аминокислотный остаток	Атом	Аминокислотный остаток	Атом	
Arg291	N ^{η1}	Gln197	O ^{ε1}	2,69
			N ^{ε2}	2,96
	N ^{η2}	Thr212	O ^{ε1}	3,91
			N	4,92
			N	4,80
Tyr294	O ^η	Gln194	O ^{ε1}	4,10

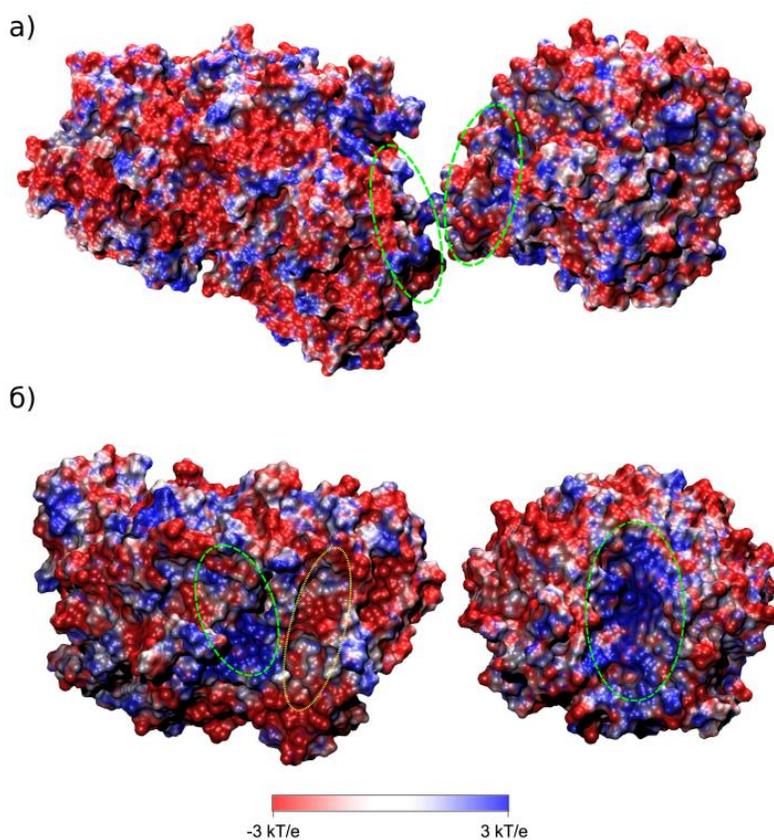


Рис. 3. Электростатический потенциал на поверхности люциферазы (слева) и оксидоредуктазы (справа) в комплексе с энергией взаимодействия -9.6 ккал/моль (а). Вид поверхности взаимодействия белков в комплексе (б). Активные центры обозначены зеленым овалом. Отрицательно заряженный участок вблизи активного центра люциферазы выделен желтым овалом. Красный цвет на рисунке соответствует потенциалу -3 кТ/е, синий $+3$ кТ/е

Fig. 3. Electrostatic surface representation for luciferase (left) and oxidoreductase (right) in complex with corresponding interaction energy -9.6 kkal/mol (a). A front view of the interaction surface for both proteins in complex (b). The active sites are marked by green oval curves. The negatively charged area on luciferase surface is marked by yellow oval curve. Red color refers to potential -3 kT/e, blue $+3$ kT/e

сти, короткоживущие, 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 (Campbell, Baldwin, 2009a).

В связи с характером полученных результатов стоит уделить внимание нескольким важным аспектам. Во-первых, отсутствие стабильного комплекса люциферазы с оксидоредуктазой может иметь особое функциональное значение. Передача FMNH₂ без формирования долгоживущего комплекса может быть предпочтительным способом для того, чтобы люцифераза могла эффективно взаимодействовать с другими белками биолюминесцентной системы бактерий. В частности, связывание молекулы альдегида также предполагает передачу данного гидрофобного субстрата без контакта с полярным микроокружением. Кроме того, для других оксидоредуктаз, способных поставлять FMNH₂ люциферазе (LuxG и Fre), было показано, что стабильный комплекс отсутствует, а перенос FMNH₂ происходит за счет свободной диффузии (Campbell, Baldwin, 2009a; Tinikul et al., 2013). Однако сами авторы работы не отрицают возможности существования короткоживущего комплекса при других условиях.

Во-вторых, в обзорной статье Эллиса (Ellis, 2010) было высказано предположение о том, что тунелирование субстрата от оксидоредуктазы к люциферазе должно сопровождаться конформационными перестройками

данных белков, а для этого достаточно слабого взаимодействия между ними. Поэтому комплекс не обязательно должен быть долгоживущим, чтобы произошло изменение структуры фермента, способствующее передаче прочно связанного кофактора (FMNH₂) от оксидоредуктазы к люциферазе (Tanner et al., 1999).

Ярким в прямом смысле примером такого транзитного комплекса является взаимодействие между белком клитином и зеленым флуоресцентным белком (GFPcg) у медузы *Clytia gregaria* (Titushin et al., 2011). В данном случае эффективный перенос энергии возбуждения на GFPcg свидетельствует о наличии комплекса, но экспериментально его выделить исследователям так и не удалось. Пространственные характеристики комплекса клитин-GFPcg, полученного при помощи гибкого докинга, указывают на слабое взаимодействие между белками (Titushin et al., 2011). Чтобы объяснить подобные наблюдения, было высказано предположение, что в ходе биолюминесцентной реакции клитин претерпевает некоторые конформационные перестройки, значительно повышающие его аффинность к GFP. Возможно, схожий механизм реализуется при взаимодействии и в паре белков люцифераза+NADPH:FMN-оксидоредуктаза. На данный момент одна из кристаллических структур люциферазы расшифрована без лигандов (Fisher et al., 1995), другая же получена для фермента с продуктом биолюминесцентной реакции – FMN (Campbell et al., 2009). В то же время известно, что в ходе биолюминесцентной реакции люцифераза претерпевает ряд последовательных конформационных изменений, детально до сих пор не описанных (Campbell et al., 2010). Возможно, что короткоживущий комплекс между NADPH:FMN-оксидоредуктазой и люциферазой может формироваться именно

с люциферазой, находящейся в одном из промежуточных конформационных состояний.

Заключение

Электростатический потенциал белковых макромолекул может играть важную роль в межмолекулярных взаимодействиях. Распределение зарядов на поверхности белка является определяющим фактором в ходе таких процессов, как молекулярное узнавание между белками и нуклеиновыми кислотами (Qin, Zhou, 2007), белок-белковые взаимодействия (например, взаимодействие бактериальной люциферазы с антенными белками (Sato et al., 2010)), взаимодействия белок-лиганд и др.

Наличие кристаллических структур бактериальной люциферазы (Campbell et al., 2009) и NADPH:FMN-оксидоредуктазы (Tanner et al., 1999) *V. harveyi* позволило провести вычислительный эксперимент по изучению возможных механизмов формирования комплекса между этими белками. Данный комплекс ранее исследовался в ряде экспериментальных работ (Lei, Tu, 1998; Jeffers, Tu, 2001; Jeffers et al., 2003; Low, Tu, 2003), а в настоящей работе он рассмотрен с позиции влияния электростатических сил на белок-белковое взаимодействие. В целом,

результаты показали отсутствие структурной специфичности между исследуемыми белками с точки зрения их электростатических свойств. Однако полученные данные не исключают возможности формирования транзитного комплекса, так как по результатам предварительного докинга и основного моделирования среди конфигураций с наименьшей энергией взаимодействия был получен комплекс, в котором возможна прямая передача FMN₂ между активными центрами ферментов. Согласно такой конфигурации комплекса важную роль может играть взаимодействие Arg291 и Gln197 люциферазы и оксидоредуктазы соответственно, и это предположение в дальнейшем может быть проверено экспериментально методами направленного мутагенеза белков.

Альтернативным объяснением наличия различных экспериментальных доказательств взаимодействия между люциферазой и редуктазой (Lei, Tu, 1998; Jeffers, Tu, 2001; Jeffers et al., 2003; Low, Tu, 2003) и одновременно невозможности выделить стабильный комплекс может быть предположение, что распределение электростатического потенциала в области активного центра люциферазы модулируется конформационными перестройками этого белка в ходе катализа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-00746 мол_a и при частичной поддержке Министерства образования и науки РФ (государственное задание на выполнение работ, проект № 6.7734.2017/БЧ, и государственное задание на проведение фундаментальных исследований РАН, проект № 01201351504).

Авторы выражают благодарность проф. М.Г. Ульману и д-ру Л. Мюллеру из Лаборатории структурной биологии/биоинформатики Университета г. Байройт (ФРГ) за плодотворное обсуждение материала статьи и предоставленную возможность использовать программные пакеты MC-Dock и CHARMM.

Список литературы

Abdurachim K., Ellis H.R. (2006) Detection of protein-protein interactions in the alkanesulfonate monooxygenase system from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(23): 8153-8159

Brooks B.R., Brooks C.L., MacKerell A.D., Nilsson L., Petrella R.J., Roux B., Won Y., Archontis G., Bartels C., Boresch S., Caffisch A., Caves L., Cui Q., Dinner A.R., Feig M., Fischer S., Gao J., Hodoscek M., Im W., Kuczera K., Lazaridis T., Ma J., Ovchinnikov V., Paci E., Pastor R.W., Post C.B., Pu J.Z., Schaefer M., Tidor B., Venable R.M., Woodcock H.L., Wu X., Yang W., York D.M., Karplus M. (2009) CHARMM: the biomolecular simulation program. *Journal of Computational Chemistry*, 30(10): 1545-1614

Campbell Z.T., Baldwin T.O. (2009a) Fre is the major flavin reductase supporting bioluminescence from *Vibrio harveyi* luciferase in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13): 8322-8328

Campbell Z.T., Baldwin T.O. (2009b) Two lysine residues in the bacterial luciferase mobile loop stabilize reaction intermediates. *Journal of Biological Chemistry*, 284(47): 32827-32834

Campbell Z.T., Weichsel A., Montfort W.R., Baldwin T.O. (2009) Crystal structure of the bacterial luciferase/flavin complex provides insight into the function of the β subunit. *Biochemistry*, 48(26): 6085-6094

Campbell Z.T., Baldwin T.O., Miyashita O. (2010) Analysis of the bacterial luciferase mobile loop by replica-exchange molecular dynamics. *Biophysical Journal*, 99(12): 4012-4019

Deeva A.A., Temlyakova E.A., Sorokin A.A., Nemtseva E.V., Kratasyuk V.A. (2016) Structural distinctions of fast and slow bacterial luciferases revealed by phylogenetic analysis. *Bioinformatics*, 32(20): 3053-3057

Duane W., Hastings J.W. (1975) Flavin mononucleotide reductase of luminous bacteria. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 6(1): 53-64

Dunlap P.V., Urbanczyk H. (2013) Luminous bacteria. *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 495-528

Ellis H.R. (2010) The FMN-dependent two-component monooxygenase systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 497(1): 1-12

Esimbekova E.N., Asanova A.A., Deeva A.A., Kratasyuk V.A. (2017) Inhibition effect of food preservatives on endoproteinases. *Food Chemistry*, 235: 294-297

Fisher A.J., Raushel F.M., Baldwin T.O., Rayment I. (1995) Three-dimensional structure of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* at 2.4 Å resolution. *Biochemistry*, 34(20): 6581-6586

Gibson Q.H., Hastings J.W. (1962) The oxidation of reduced flavin mononucleotide by molecular oxygen. *Biochemical Journal*, 83(2): 368

Hou C., Liu Y.J., Ferré N., Fang W.H. (2014) Understanding bacterial bioluminescence: a theoretical study of the entire process, from reduced flavin to light emission. *Chemistry-A European Journal*, 20(26): 7979-7986

Huijbers M.M., Montersino S., Westphal A.H., Tischler D., van Berkel W.J. (2014) Flavin dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 544: 2-17

Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1): 33-38

Jeffers C.E., Tu S.C. (2001) Differential transfers of reduced flavin cofactor and product by bacterial flavin reductase to luciferase. *Biochemistry*, 40(6): 1749-1754

Jeffers C.E., Nichols J.C., Tu S.C. (2003) Complex formation between *Vibrio harveyi* luciferase and monomeric NADPH: FMN oxidoreductase. *Biochemistry*, 42(2): 529-534

Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N. (2015) Applications of luminous bacteria enzymes in toxicology. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 18(10): 952-959

Lei B., Tu S.C. (1998) Mechanism of reduced flavin transfer from *Vibrio harveyi* NADPH-FMN oxidoreductase to luciferase. *Biochemistry*, 37(41): 14623-14629

Lin J.W., Chao Y.F., Weng S.F. (1998) Characteristic analysis of the luxG gene encoding the probable flavin reductase that resides in the lux operon of *Photobacterium leiognathi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246(2): 446-452

Liu M., Lei B., Ding Q., Lee J.C., Tu S.C. (1997) *Vibrio harveyi* NADPH: FMN oxidoreductase: preparation and characterization of the apoenzyme and monomer-dimer equilibrium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 337(1): 89-95

Lonshakova-Mukina V., Esimbekova E., Kratasyuk V. (2015) Impact of enzyme stabilizers on the characteristics of biomodules for bioluminescent biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 213: 244-247

Low J.C., Tu S.C. (2003) Energy transfer evidence for *in vitro* and *in vivo* complexes of *Vibrio harveyi* flavin reductase P and luciferase. *Photochemistry and Photobiology*, 77(4): 446-452

Luo Y., Liu Y.J. (2016) Bioluminophore and flavin mononucleotide fluorescence quenching of bacterial bioluminescence – a theoretical study. *Chemistry-A European Journal*, 22(45): 16243-16249

Meighen E.A. (1991) Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiological Reviews*, 55(1): 123-142

Meighen E.A. (1993) Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *The FASEB Journal*, 7(11): 1016-1022

Metropolis N., Rosenbluth A.W., Rosenbluth M.N., Teller A.H., Teller E. (1953) Equation of state calculations by fast computing machines. *The Journal of Chemical Physics*, 21(6): 1087-1092

Nijvipakul S., Wongratana J., Suadee C., Entsch B., Ballou D.P., Chaiyen P. (2008) LuxG is a functioning flavin reductase for bacterial luminescence. *Journal of Bacteriology*, 190(5): 1531-1538

Qin S., Zhou H.X. (2007) Do electrostatic interactions destabilize protein-nucleic acid binding. *Biopolymers*, 86(2): 112-118

Ranjan R., Esimbekova E.N., Kirillova M.A., Kratasyuk V.A. (2017) Metal-enhanced luminescence: current trend and future perspectives-a review. *Analytica Chimica Acta*, 971: 1-13

Roda A., Guardigli M., Michelini E., Mirasoli M. (2009) Bioluminescence in analytical chemistry and *in vivo* imaging. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(3): 307-322

Sato Y., Shimizu S., Ohtaki A., Noguchi K., Miyatake H., Dohmae N., Sasaki S., Odaka M., Yohda M. (2010) 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. *Journal of Bacteriology*, 192(1): 127-133

Sparks J.M., Baldwin T.O. (2001) Functional implications of the unstructured loop in the (β/α) 8 barrel structure of the bacterial luciferase α subunit. *Biochemistry*, 40(50): 15436-15443

Sucharitakul J., Tinikul R., Chaiyen P. (2014) Mechanisms of reduced flavin transfer in the two-component flavin-dependent monooxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 555: 33-46

Szpilewska H., Czyż A., Wgrzyn G. (2003) Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress. *Current Microbiology*, 47(5): 379-382

Tanner J.J., Lei B., Tu S.C., Krause K.L. (1996) Flavin reductase P: structure of a dimeric enzyme that reduces flavin. *Biochemistry*, 35(42): 13531-13539

Tanner J.J., Tu S.C., Barbour L.J., Barnes C.L., Krause K.L. (1999) Unusual folded conformation of nicotinamide adenine dinucleotide bound to flavin reductase P. *Protein Science*, 8(9): 1725-1732

Tinikul R., Pitsawong W., Sucharitakul J., Nijvipakul S., Ballou D.P., Chaiyen P. (2013) The transfer of reduced flavin mononucleotide from LuxG oxidoreductase to luciferase occurs via free diffusion. *Biochemistry*, 52(39): 6834-6843

Titushin M.S., Feng Y., Lee J., Vysotski E.S., Liu Z.J. (2011) Protein-protein complexation in bioluminescence. *Protein & Cell*, 2(12): 957-972

Tu S.C., Hastings J.W. (1980) Physical interaction and activity coupling between two enzymes induced by immobilization of one. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1): 249-252

Tu S.C. (2008) Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 7(2): 183-188

Ullmann G.M., Knapp E.W., Kostić N.M. (1997) Computational simulation and analysis of dynamic association between plastocyanin and cytochrome f. Consequences for the electron-transfer reaction. *Journal of the American Chemical Society*, 119(1): 42-52

Ullmann G.M., Kloppmann E., Essigke T., Krammer E.M., Klungen A.R., Becker T., Bombarda E. (2008) Investigating the mechanisms of photosynthetic proteins using continuum electrostatics. *Photosynthesis Research*, 97(1): 33-53

Unni S., Huang Y., Hanson R.M., Tobias M., Krishnan S., Li W.W., Nielsen J.E., Baker N.A. (2011) Web servers and services for electrostatics calculations with APBS and PDB2PQR. *Journal of Computational Chemistry*, 32(7): 1488-1491

Wang H., Lei B., Tu S.C. (2000) *Vibrio harveyi* NADPH-FMN oxidoreductase Arg203 as a critical residue for NADPH recognition and binding. *Biochemistry*, 39(26): 7813-7819

Webb B., Sali A. (2014) Protein structure modeling with MODELLER. *Protein Structure Prediction*: 1-15

You T.J., Bashford D. (1995) Conformation and hydrogen ion titration of proteins: a continuum electrostatic model with conformational flexibility. *Biophysical Journal*, 69(5): 1721-1733

Zenno S., Saigo K. (1994) 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*. *Journal of Bacteriology*, 176(12): 3544-3551

Zenno S., Saigo K., Kanoh H., Inouye S. (1994) Identification of the gene encoding the major NAD (P) H-flavin oxidoreductase of the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* ATCC 7744. *Journal of Bacteriology*, 176(12): 3536-3543