СОДЕРЖАНИЕ

[Глава 1 Литературный обзор 2](#_Toc466398060)

[1.1. Биология, экология и биолюминесцентная система светящихся бактерий 2](#_Toc466398061)

[1.2. NAD(F)H:FMN-оксидоредуктаза (FRP) биолюминесцентных бактерий вида *Vibrio harveyi* 3](#_Toc466398062)

[СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ 7](#_Toc466398063)

# Глава 1 Литературный обзор

## 1.1. Биология, экология и биолюминесцентная система светящихся бактерий

Биолюминесценция – способность живых организмов генерировать видимый свет в ходе биохимической реакции. Биолюминесценция характерна для самых разнообразных биологических видов: рыб, кальмаров, гидроидных полипов, водорослей, бактерий и многих других объектов. 80 % светящихся организмов являются обитателями морских акваторий от полярных до тропических зон, от поверхностных слоев до глубин океанов, а также известны виды, обитающие в пресных водах, на суше и даже в пещерах (некоторые виды грибов) [1, 2].

Самыми маленькими представителями светящихся организмов являются бактерии – фотобактерии. По современной классификации биолюминесцентные бактерии относят к родам *Photobacterium, Vibrio, Lucibacterium.* Люминесцентными видами рода *Photobacterium* являются: *P. phosphoreum и P. leiognathi.* Люминесцентными видами рода *Vibrio* являются: *V. fischeri, V. logei, V. harveyi, V. splendid.* Современная таксономия биолюминесцентных бактерий окончательно не определена и постоянно развивается, в связи с этим классификация все время меняется [3-5].

Все фотобактерии грамотрицательные подвижные палочки, факультативные анаэробы, хемоорганотрофы (углеводы, спирты, органические кислоты и т.д.) [1, 6]. Большинство видов биолюминесцентных бактерий выделяют хитиназу, амилазу, липазу, желатиназу. Культивирование светящихся бактерий возможно на искусственных средах при добавлении NaCl 2-3 %, разные виды бактерий культивируются при разных температурах, например, *Vibrio harveyi*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium leioghnati* оптимально растут при 25°С и являются мезофиллами, а *Photobacterium phosphoreum* может расти и при более низких температурах, так как является криофилом[[1]](#footnote-2). *Photobacterium phosphoreum* может обитать в водах, где t° воды ниже 15°C (на глубине океана свыше 500 метров) [2, 7].

В основе свечения всех живых организмов лежит хемилюминесцентный процесс[[2]](#footnote-3) преобразования энергии, в котором участвуют специфические ферменты – люциферазы, органические молекулы – люциферины и кислород [2, 6-8].

## 1.2. NAD(F)H:FMN-оксидоредуктаза (FRP) биолюминесцентных бактерий вида *Vibrio harveyi*

В качестве люциферина у фотобактерий могут функционировать восстановленный FMNH2, аналоги и изомеры флавинов, а также люмазин и рибофлавин в качестве вторичных эммитеров. Все бактериальные люциферазы – флавинзависимые монооксигеназы [6-8].

Люциферазы катализируют in vitro реакцию окисления длинноцепочечных алифатических альдегидов (RCHO) при участии восстановленного флавинмононуклеотида (FMNH2), продуктом реакции является излучение света в сине-зеленой области видимого спектра (**рис. 1**):

FMNH2 + O2 + RCHO → FMN + RCOOH + H2O + light



Рисунок 1 - Реакция бактериальной биолюминесценции

Особенность измерения активности бактериальных люцифераз состоит в том, что время, требуемое для одного каталитического цикла, намного больше, чем время жизни субстрата FMNH2, который автокаталитически окисляется кислородом менее чем за 1 сек  (1):

FMNH2 + O2 → FMN + H2O2  (1)

Поэтому в условиях запуска реакции одной порцией предварительно восстановленного FMN люцифераза успевает совершить всего один оборот. Наблюдается люминисцентная вспышка, затухающая по экспоненте, реакция протекает в нестационарном режиме. Проведение биолюминесцентной реакции с химически восстановленным FMNH2, сопровождается длительным свечением, обусловленным увеличением числа оборотов фермента в реакции [8-11].

Второй субстрат - RCHO подвержен медленному неферментативному окислению, и скорость окисления зависит от температуры и начальной концентрации. При комнатной температуре раствор альдегида, используемый для измерения биолюминесценции, стабилен в течение 8 ч. Неферментативное окисление альдегида, в отличие от FMNH2, не оказывает влияния на ход люминесцентной реакции, поскольку его скорость значительно меньше скорости значительно меньше скорости ферментативного окисления [6, 9-14].

Структурно биолюминесцентная система светящихся бактерий является фрагментом электронтранспортной цепи, включающей в себя NAD(F)H:FMN-оксидоредуктазу и люциферазу [9, 14]. Оксидоредуктаза катализирует восстановление флавина (2):

NAD(F)H+Н++FMN → NAD(F)+ + FMNH2 (2)

Бактериальная люцифераза – гетеродимер, состоящий из α и β субъединиц (α ‒40кДа, β ‒ 35кДа), которые кодируются luxA и luxB-генами люциферазного оперона. Принято считать, что α-субъединица обладает каталитическими свойствами, а β-субъединица принимает участие в формировании конформации активного центра [15-22].

В настоящее время определена кристаллическая структура люциферазы (**рис. 2**) *V.harveyi,* замороженной при -160°С в метиловом эфире полиэтиленгликоля, с разрешением 2.4 Ǻ и 1.5 Ǻ. Молекула люциферазы имеет вид параллелепипеда с размерами 75х45х40. Обе субъединицы складываются в однодоменный (α/β)8-бочонок. Две субъединицы – α- и β -, имеют идентичную топологию. Они связаны большой соприкасающейся поверхностью, центр которой оккупирован интересной формой параллельного 4-спирального пучка. В центре пучка – парные псевдо оси вращения, связывающие α и β-субъединицы. Спирали α2 и α3 каждой субъединицы из спирального пучка с двумя α2 спиралями, упакованы очень плотно. Спиральные оси на 6.05Å находятся в стороне от наиболее плотной точки, и имеют перекрестный угол 30º. Оси пучков α- и β-субъединиц связаны вращением на 80º и смещением на 34º [12, 23].



Рисунок 2 - Структура бактериальной люциферазы Vibrio harveyi

Строение NAD(P)H:FMN оксидоредуктазы (флавин редуктазы P), которая участвует в биолюминесценции, обеспечивая снижение FMN к люциферазе. 1.8 А° кристаллическая структура флавин-редуктазы Р (FRP) из *Vibrio harveyi* была решена путем многократного изоморфного замещения и показывает, что фермент представляет собой уникальный димер переплетенных субъединицы. Каждая субъединица состоит из двух доменов. Первый домен состоит из четырех антипараллельных нитей бета-листов, окруженных спиралями с обеих сторон. Второй домен протягивается от одной субъединицей и охватывает другую субъединицу и отвечает за переплетение двух субъединиц. Наша структура объясняет, почему флавин редуктаза P (FRP) является специфическим для FMN в качестве кофактора. FMN признает и тесно связывается сетью 16 водородных связей, а стерические соображения предотвращают связывание FAD. Гибкая петля, содержащая лизин и аргенин может объяснить специфичность NAD(P)H. Структура раскрывает информацию о нескольких аспектах каталитического механизма. Например, это показывает, что первый шаг в области катализа является гидрид переход от С4 до NAD(P)H кофактора FMN, включает в себя добавление к повторной поверхности FMN, вероятно, в положении N5 [24].

# СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Гительзон И. И. Светящиеся бактерии. / Гительзон И.И. Родичева Э. К., Медведева С. Е. и др. //Новосибирск: Наука. -1984.
2. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты. // М.: Наука. – 2009. – с. 246.
3. Baumann P. Revaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckea*./Baumann P., Baumann L., Bang S., Woolkalis M. // Curr. Microbiol. – 1980. – V. 4(3). P. 127-132
4. Baumann L.The marine gram-negative eubacteria. /Baumann L., Baumann P. // In The procariotes. Stuttgart. Springer-Verlag. – 1981. – P. 83-181
5. Baumann P. Evolutionary relationships in *Vibrio* and *Photobacterium*. A basis for a natural classification./Baumann P., Baumann L., Woolkalis M., Bang S. // Ann. Rev. Microbiol. – 1983. – V. 37. – P.363-398.
6. Shimomura O. Bioluminescence: Chemical principles and methods. / Shimomura O. // New Jersey: World Sci. Pub. – 2008. – P. 470.
7. Shilo M. Physiological characteristics underlying the distribution patterns of luminous bacteria in the Mediterranean sea and the gulf of Elate./ M. Shilo, T. Yetinson // Appl. Envirom. Microbiol. 1979. – V.38(4), P.577–584.
8. Shimomura O. The aldehyde content of luminous bacteria and of an “aldehydeless” dark mutant. / Shimomura O., Johnson F.H., Morise H. // Proc. Natl. Acad. Sci.USA. -1974. – V.71(12). – P. 4666-4668.
9. Петушков В.Н. Биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза из светящихся бактерий / В.Н. Петушков, Г.А. Кратасюк, Н.С. Родионова, А.М. Фиш, П.И. Белобров // Биохимия. – 1984. – Т.49, вып.4. – С. 692-702.
10. Tu SC. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases // Photochem. Photobiol. Sci. — 2007. — № 7.
11. Tu S. C. Activity coupling and complex formation between bacterial luciferase and flavin reductases //Photochemical & Photobiological Sciences. – 2008. – Т. 7. – №. 2. – С. 183-188.
12. Lei B. *Vibrio harveyi* NADPH-Flavin oxidoreductase: cloning, sequencing and overexpression of the gene and purification and characterization of the cloned enzyme. /B. Lei, M. Liu, S. Huang and S.C.Tu// Journal of bacteriology,1994, p. 3552-3558.
13. Jeffers C. E., Nichols J. C., Tu S. C. Complex formation between *Vibrio harveyi* luciferase and monomeric NADPH: FMN oxidoreductase //Biochemistry. – 2003. – Т. 42. –№. 2. – С. 529-534.
14. Sucharitakul J., Tinikul R., Chaiyen P. Mechanisms of reduced flavin transfer in the two-component flavin-dependent monooxygenases //Archives of biochemistry and biophysics. – 2014. – Т. 555. – С. 33-46.
15. Hastings J.W. Molecular mechanism in bacterial bioluminescence: on energy storage intermediates and role of aldehyde in the reaction./ Hastings J.W., Gibson Q.H., Friedland J., Spudich J. // Bioluminescence in progress. Acad. Press. – 1965. – P. 151-186.
16. Hastings J.W. Structurally-distinct bacterial luciferases. / Hastings J.W., Weber K., Friedland J., Eberhard A., Mitchell F.W., Gunsales A. // Biochemistry. – 1969. – V.8 (12). – P. 4681-4689.
17. Кудряшева Н.С., Физико-химические основы биолюминесцентного анализа./Кудряшова Н.С., Кратасюк В.А., Есимбекова Е.Н.//Учеб.пособие/ Краснояр. гос.ун-т. - Красноярск, 2002. - 154 с.
18. Кратасюк В.А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе./ Кратасюк В.А., Гительзон И.И.// Успехи микробиологии.-1987. - 21.- с. 3-30.
19. Albani J. R. Origin of tryptophan fluorescence lifetimes. Part 2: Fluorescence lifetimes origin of tryptophan in proteins //Journal of fluorescence. – 2014. – Т. 24. – №. 1. – С. 105-117.
20. Deeva A. A., Nemtseva E. V., Kratasyuk V. A. Structural properties of tryptophan microenvironment in bacterial luciferase //luminescence. – 111 river st, hoboken 07030-5774, NJ USA : WILEY-BLACKWELL, 2014. – Т. 29. – С.72-73.
21. Ismailov A. D. Photobiosensors Containing Luminescent Bacteria. /A. D. Ismailov, L. E. Aleskerova// Biochemistry (Moscow), 2014, Vol. 80 №6 201; pp. 733-744.
22. Tu S.C. Probing the Mechanisms of the Biological Intermolecular Transfer of Reduced Flavin. /S.C. Tu, B. Lei, M. Liu, C.K. Tang and C. Jeffers // The journal of nutrition, 2000, pp.331-332.
23. Jawanda N. *Vibrio harveyi* flavin reductase-luciferase fusion protein mimics a single-component bifunctional monooxygenase./ N. Jawanda, K. Ahmed, S.C. Tu // Biochemistry 2008, 47, 368-377.
24. Fisher A.J. The 1.5-A resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions./A.J. Fisher, T.B.Thompson, J.B.Baldwin, I.Rayment // the journal of biological chemistry; Vol. 271, No. 36, 1996, pp. 21956 –21968.
1. Криофильные (психрофильные) бактерии − холодолюбивые бактерии, бактерии, приспособившиеся к жизни при температуре от 0°С до 30-35°С. [↑](#footnote-ref-2)
2. Хемилюминесценция − люминесценция (свечение) тел, вызванная химическим воздействием, или при протекании химической реакции. [↑](#footnote-ref-3)