



УДК 577.158.8.04

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АЛИФАТИЧЕСКОГО АЛЬДЕГИДА  
С ЦИТОХРОМОМ Р-450 В РЕАКЦИЯХ БАКТЕРИАЛЬНОЙ  
ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ***Данилов В. С., Исмаилов А. Д., Малков Ю. А.,  
Егоров Н. С.**Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова*

Идентифицирован альдегидсвязывающий компонент у люминесцентных бактерий *Photobacterium fischeri*. Показано, что алифатический альдегид связывается с оксидазой смешанных функций — цитохромом Р-450 — и находится в цепи окисления пиридиннуклеотидов. Определенная спектральным методом константа связывания альдегида с цитохромом Р-450 оказалась равной константе Михаэлиса реакции люминесценции бактериальной люциферазы. Субстраты (в том числе алифатические углеводороды) и ингибиторы оксидазы смешанных функций ингибируют свечение конкурентно с альдегидом. На примере деканала и декана обсуждаются особенности функционирования цитохрома Р-450 в реакциях бактериальной люминесценции.

Бактериальная люминесценция протекает при окислении FMNH<sub>2</sub> и алифатического альдегида (RCHO) молекулярным кислородом с участием специфического фермента люциферазы. Общая реакция выглядит следующим образом:



До последнего времени люциферазу рассматривали как индивидуальный фермент с двумя неидентифицированными субъединицами со свойствами флавиновой монооксигеназы (КФ 1.4.3.4) [1, 2]. Известно, что для функционирования таких систем необходимо присутствие ионов переходных металлов, наличие которых в ферментной системе показано не было [2].

В ряде реакционных схем биолюминесценции [1] алифатический альдегид формально присоединяют к пероксидированному флавину, хотя экспериментальных доказательств такого взаимодействия не существует. Также неясно, как может происходить свечение комплекса люцифераза — оксигенированный флавин в отсутствие альдегида [3]. Трудно объяснить из представлений о люциферазе как о флавиновой монооксигеназе тушение люминесценции фермента различного класса химическими соединениями, такими, как полициклические углеводороды, наркотики, инсектициды, анестетики и т. д. [4–6]. Перечень нерешенных вопросов можно продолжить. Все это приводит к тому, что исследователи настойчиво ищут новые механизмы бактериальной люминесценции, более адекватно отражающие суть явления. Одной из таких гипотез является мультиферментная модель [7], согласно которой люцифераза включает в себя три компонента: эмиттерный флавопротеид, железо-серосодержащий белок и цитохром Р-450. Для трансформации химической энергии в световую обяза-

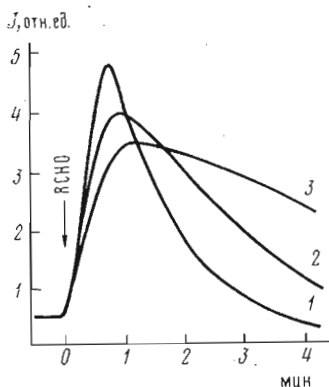


Рис. 1

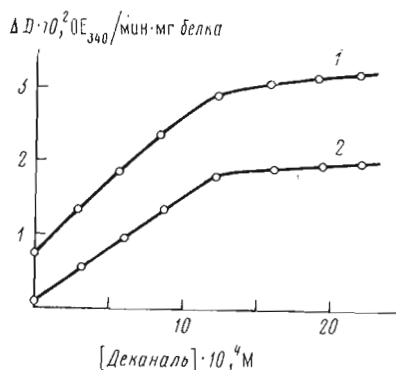


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика индуцируемого деканалем свечения препарата люциферазы. Опыты проводились в присутствии  $10^{-5}$  M NADH и  $10^{-4}$  M FMN. Концентрация белка в пробах 0,1 мг/мл. Концентрация деканала, M: 1 —  $2 \cdot 10^{-3}$ ; 2 —  $10^{-4}$ ; 3 —  $4 \cdot 10^{-5}$ .

Рис. 2. Зависимость начальной скорости окисления NADH (1) и NADPH (2) препаратом люциферазы от концентрации деканала. Ось ординат — изменение поглощения при 340 нм. Измерения проводили по дифференциальной схеме «люцифераза — BSA» в буфере 0,1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 0,1$  M NaCl, pH 7,0. Концентрация NADH и NADPH —  $4 \cdot 10^{-4}$  M. Концентрация белка в пробах 9,6 мг/мл.

тельно наличие всех компонентов. Восстановление флавинов осуществляет NAD(P)H-дегидрогеназа (КФ 1.6.99.2). По данной схеме алифатический альдегид связывается на оксидазе смешанных функций — цитохроме P-450.

Настоящая работа выполнена с целью подтверждения этого предположения. Обсуждается также роль цитохрома P-450 в реакциях бактериальной люминесценции.

На рис. 1 показано влияние альдегида на свечение препарата бактериальной люциферазы при концентрациях ниже насыщающих. Видно, что с увеличением концентрации деканала растет максимальная интенсивность и уменьшается время затухания свечения. Поскольку при повторном введении всех субстратов реакции лишь NADH восстанавливал уровень свечения до максимального, был сделан вывод, что тушение свечения связано с лимитом по пиридиннуклеотидам. При избыточных концентрациях NADH максимальная интенсивность свечения и время затухания пропорциональны концентрации добавленного альдегида. Такого же характера закономерности наблюдали и в случае NADPH-зависимой люминесценции люциферазы.

Эти эксперименты могут свидетельствовать в пользу того, что в люминесцентной системе бактерий альдегиды существенно увеличивают потребление восстановленных пиридиннуклеотидов. Подтверждением этому служат спектральные исследования по влиянию альдегида в различных концентрациях на начальную скорость окисления NADH и NADPH (рис. 2). Аналогичным свойством обладает и структурный аналог деканала — алифатический углеводород декан. Однако максимальные скорости окисления NADPH, индуцируемые деканом, примерно в 2–3 раза меньше, чем в случае альдегида. Следовательно, оба соединения находятся в цепи окисления пиридиннуклеотидов, хотя их влияние на процесс люминесценции оказалось диаметрально противоположным.

Ранее было высказано мнение [8], что хотя декан в некоторой степени и уменьшает максимальный уровень свечения люциферазы с альдегидом, но поскольку общее количество испускаемых в реакции квантов света не изменяется, то он не взаимодействует с активным интермедиа́том и не оказывает эффекта на реакцию биолюминесценции. Из наших экспериментов следует, что декан является ингибитором свечения как

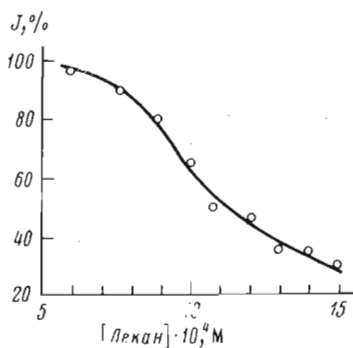


Рис. 3

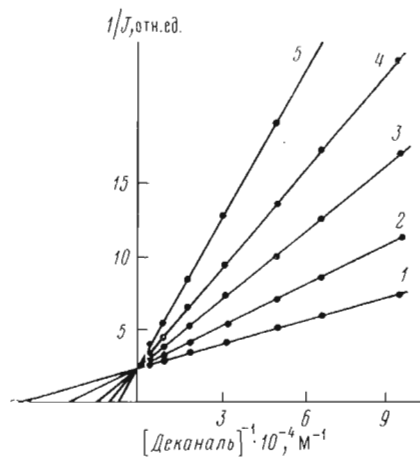


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость интенсивности люминесценции интактных клеток бактерий от концентрации декана. Концентрация клеток в пробе 0,7 ОЕ<sub>660</sub>

Рис. 4. Тушение альдегидзависимого свечения бесклеточного экстракта бактерий в отсутствие (1) и в присутствии декана в концентрации (М): 8 · 10<sup>-4</sup> (2), 1,0 · 10<sup>-3</sup> (3), 3,6 · 10<sup>-3</sup> (4), 7 · 10<sup>-3</sup> (5)

клеток (рис. 3), так и бесклеточного экстракта (рис. 4). Из графика рис. 4, построенного в координатах Лайнуивера — Берка, видно, что тушение свечения деканом протекает за счет конкуренции с альдегидом. Такая же картина наблюдалась и на частично очищенном препарате люциферазы. Константы ингибирования деканом равны 2,7 · 10<sup>-3</sup> М (для бесклеточного экстракта) и 3,7 · 10<sup>-4</sup> М (для частично очищенного препарата люциферазы).

По предложенной недавно гипотезе о строении бактериальной люциферазы [7] роль компонента, связывающего альдегид, выполняет цитохром Р-450. Наличие этого цитохрома у люминесцентных бактерий *Ph. fischeri* было показано нами ранее [9]. Более того, этот гемопротеид обнаружен и в высокоочищенной люциферазе со степенью очистки по реакции с FMNН<sub>2</sub> в 525 раз [7]. Мы решили проверить, связываются ли с цитохромом Р-450 деканаль и декан.

Известно, что связывание различных гидрофобных соединений можно обнаружить спектрально по так называемым спектральным переходам гемопротеида. Добавление деканала и декана к препарату люциферазы вызывало увеличение поглощения при 380 нм и уменьшение при 420 нм (рис. 5). Такие изменения свойственны спектральным переходам первого типа. Ранее обнаруженные спектральные изменения при взаимодействии октанала с «интермедиатом II» [10] можно трактовать также как спектральный переход цитохрома Р-450, но второго типа. Для оксидаз смешанных функций превращения переходов первого типа во второй и обратно — явление известное [11] и может наблюдаться даже при изменении концентрации субстратов. Из рис. 5 видно, что деканаль и декан могут быть субстратами цитохрома Р-450, на котором, очевидно, и происходит их гидроксилирование. Взаимодействуя с цитохромом, субстраты меняют его донорно-акцепторные свойства, что находит отражение в структуре комплекса с СО. Спектр «дитионит+СО — дитионит» становится четко выраженным, величина абсорбции при 450 нм резко увеличивается. В данном случае происходит увеличение подвижности гемового железа в присутствии гидрофобносвязанных субстратов [12]. Следует отметить, что положение максимума спектрального перехода зависит от концентрации альдегида. С увеличением концентрации альдегида максимум сдвигался в коротковолновую область до 360 нм.

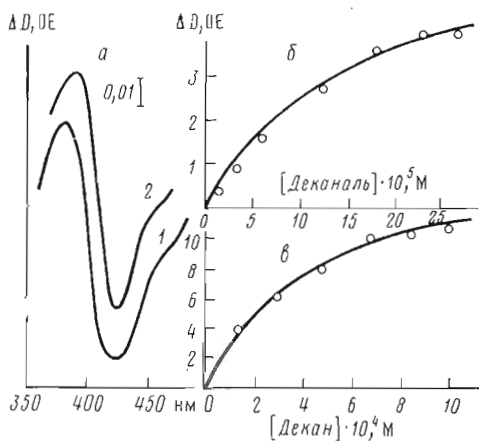


Рис. 5

Рис. 5. Спектральные переходы цитохрома Р-450 в присутствии декана и деканалья (1, 2а) и их зависимости от концентрации деканалья (б) и декана (в). Опыты проводились на бесклеточном экстракте. Концентрация белка 5,4 мг/мл

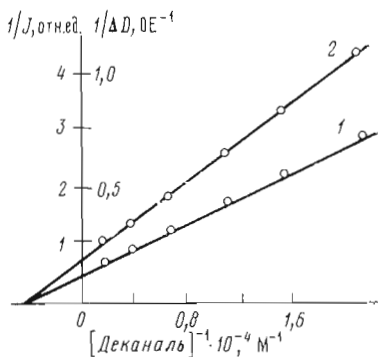


Рис. 6

Рис. 6. Зависимость интенсивности люминесценции (1) и величины спектрального перехода (2) цитохрома Р-450 препарата люциферазы от концентрации деканалья. Концентрация белка 1,3 мг/мл

Спектральные характеристики связывания деканалья с цитохромом Р-450 могут иметь отношение к биолюминесцентной реакции. Чтобы показать это, мы на том же белковом препарате провели исследования по влиянию различных концентраций альдегида на интенсивность свечения в присутствии избыточных концентраций NADH и FMN. Результаты экспериментов представлены на рис. 6. Константа связывания альдегида, измеренная спектральным методом, практически совпала с константой Михаэлиса реакции биолюминесценции ( $4,3 \cdot 10^{-5}$  M). Это свидетельствует в пользу того, что взаимодействие альдегида с цитохромом Р-450 может определять течение реакции люминесценции. Известно также, что для большинства субстратов цитохрома Р-450 их величины  $K_s$  примерно равны  $K_m$  и отражают сродство гемопротеида к субстрату [11].

Ряд фактов подтверждают это предположение. В работе [7] показано, что камфора, типичный субстрат цитохрома Р-450 из *Ps. putida* [13], и диметиланилин, субстрат микросомального цитохрома Р-450 [11], способны связываться с цитохромом Р-450 из светящихся бактерий. Более того, эти соединения ингибировали люминесценцию строго конкурентно по отношению к альдегиду. Ингибиторы оксидаз смешанных функций, такие, как производные хлорэтиламинов, также тушат свечение бактерий и очищенной люциферазы за счет конкуренции с альдегидом [2]. В наших опытах показано, что пропилгаллат, являющийся также специфическим ингибитором данного гемопротеида, был строго конкурентен в реакции люминесценции по отношению к деканалю с константой ингибирования, равной  $8,0 \cdot 10^{-5}$  M. Следовательно, вполне вероятно, что различные гидрофобные субстраты, в том числе алифатического альдегид, связываются с цитохромом Р-450 из люминесцентных бактерий.

Связывание гидрофобных соединений на цитохроме Р-450 возможно в нескольких гидрофобных областях, например, в качестве одного из лигандов гема либо через SH-группу [11]. В силу ряда соображений нам кажется более вероятным связывание алифатического альдегида через активную SH-группу апофермента. Циклические альдегиды не стимулируют реакцию люминесценции, что скорее всего свидетельствует о различном месте связывания алифатических и циклических соединений. Окись углерода не препятствует связыванию альдегида с цитохромом Р-450 [9]. Аль-

дегиды защищают активную SH-группу люциферазы от действия алкилирующих соединений [14]. Наконец, поскольку альдегиды с длиной цепи более 18 углеродных атомов неэффективны в реакции свечения, можно говорить об ограниченности гидрофобной емкости, где происходит связывание алифатических соединений размером около  $900 \text{ \AA}^3$ .

В литературе до сих пор нет ясного представления о функции альдегида в реакции люминесценции бактерий. Наличие свечения в препаратах люциферазы без добавленного альдегида и при низких температурах, где существенно ограничена диффузия реагентов, опыты с гидроксиламином привели к заключению, что альдегид действует на люциферазу только после образования возбужденного состояния, изменяет конформацию фермента и благоприятствует люминесценции [1, 2, 8]. При этом, как считалось, поток электронов в люминесцентной цепи и скорость окисления FMNH<sub>2</sub> не изменяются ни альдегидом, ни другими длинноцепочечными соединениями. В рамках возможного участия цитохрома P-450 как необходимого компонента биOLUMИнесцентной цепи могут быть по-новому объяснены некоторые аспекты взаимодействия альдегидов с люциферазой.

Известно что в ряду алифатических альдегидов константы связывания их с люциферазой из *Ph. fischeri* растут от 30 (C-8) до 0,05 мкМ (C-16). Вместе с тем общая светопродукция реакции не зависит от длины цепи альдегида [15]. Подобная закономерность получена и для других люминесцентных бактерий [2]. Очевидно, в данном случае определяющую роль играют гидрофобные взаимодействия субстратов с цитохромом P-450. Особенности строения гидрофобной области, где происходит связывание алифатических соединений, можно объяснить максимальный уровень начального свечения, наблюдаемый при иницировании реакции тетрадеканалем.

Интересные наблюдения сделаны в работе [16]. Авторы наблюдали бифазную кинетику тушения свечения при одновременном введении двух альдегидов с различной длиной цепи, октаналь и деканаль, и интерпретировали эффект как образование определенного числа интермедиатов с пероксифлавином. На наш взгляд, это явление обусловлено различной гидрофобностью альдегидов. Менее гидрофобное соединение (октаналь) должно более медленно взаимодействовать с гемопротеидом, соответственно кинетика затухания будет более медленной по сравнению с деканалем. Скорость реакции в системе «октаналь — деканаль — люцифераза» лимитирована скоростью гидроксирования наименее гидрофобного субстрата, последнее определяет наблюдаемую кинетику тушения свечения.

Лимитирующей стадией окисления альдегида, как и других гидрофобных соединений, является разрыв C—H-связи. Последнее подтверждается обнаруженным изотопным эффектом [2]. Этим, по нашему мнению, объясняется наличие в реакции люминесценции бактерий долгоживущего интермедната. Наличие таких интермедиатов в реакциях цитохрома P-450 показано ранее [13].

Известно, что при хроматографических процедурах цитохром P-450 может быть в связанном состоянии с субстратами, в том числе и с липидами. Об этом свидетельствует большая чувствительность свечения очищенной люциферазы к действию фосфолипаз, установленная нами. Наличием эндогенного субстрата свечения, очевидно, и объясняется часто наблюдаемое свечение препаратов люциферазы без добавления в реакционную смесь альдегидов. Как указывалось выше, этот феномен вносил серьезные трудности в интерпретацию функции альдегида.

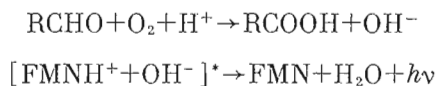
Считается, что альдегид связывается с люциферазой на последних стадиях реакции [1, 2]. Мы придерживаемся альтернативной точки зрения, выдвинутой в работе [17]. Поскольку связывание субстратов происходит как на окисленном, так и на восстановленном цитохроме P-450 [11], вполне очевидно, что связывание альдегида может предшествовать реакции свечения. Вместе с тем само связывание не означает осуществления реак-

ции окисления альдегида. Для последнего необходимо функционирование NAD(P)H-зависимой цепи переноса электронов.

Стимулирующее действие в небольших концентрациях спиртов (например, этанола) на стимулированное альдегидом свечение [8] можно объяснить повышением растворимости альдегидного фактора и доступности его к цитохрому P-450. На самом деле, спирты, как и алканы, являются ингибиторами свечения. Константа ингибирования свечения этанолом в наших экспериментах была равна  $5,5 \cdot 10^{-4}$  М.

Таким образом, деканаль и декан являются субстратами цитохрома P-450, связываются в одном месте, но деканаль индуцирует свечение, а декан — нет. Здесь уместно подчеркнуть, что по развиваемым представлениям [7] люцифераза — мультиферментный комплекс со следующей реакционной последовательностью: NAD(P)H → NAD(P)H-дегидрогеназа → → эмиттерный флавопротеид → люмиредоксин → цитохром P-450 → O<sub>2</sub>.

При функционировании люминесцентной системы на флавопротеиде образуется, вероятно, семихион флавина FMNH<sup>+</sup>, на цитохроме происходит гидроксильное соединение через стадию активации кислорода. Образующий комплекс с переносом заряда [FMNH<sup>+</sup>...OH<sup>-</sup>] для высвечивания должен получить дополнительную энергию. Свободная энергия окисления алифатических альдегидов [18] достаточна для возбуждения комплекса, и реакция люминесценции может быть представлена в следующем виде



В том случае, когда субстратом служит декан, энергетический выход реакции окисления недостаточен для возбуждения комплекса. Следовательно, люминесцентная реакция обязательно требует алифатического альдегида и регулируется на уровне цитохрома P-450.

### Экспериментальная часть

Работа проведена на штамме люминесцирующих бактерий *Photobacterium fischeri* № 6 МГУ. Бактерии выращивались на синтетической среде с пептоном, дрожжевым экстрактом и глицерином [4] в течение 24 ч при 25° С в ферментере «Magnaferm» (New Brunswick Sci. Co Ltd., США). В опытах использовались отмытые один раз в фосфатном буфере (0,2 М) при рН 7,0 клетки.

Бесклеточный экстракт получали разрушением густой суспензии отмытых клеток ультразвуком на холоде (22 кГц, 10 мин). Неразрушенные клетки и крупные фрагменты мембран отделялись центрифугированием при 10 000g. Частично очищенный препарат бактериальной люциферазы получали путем последовательного высаливания 30 и 80% сульфатом аммония с диализом [4].

Люминесценцию клеток и препарата люциферазы регистрировали фотометром с самописцем. Эксперименты проводились в термостатированной камере с перемешиванием. Спектральные характеристики снимали на спектрофотометре «Beckman 26» (США). Белок определяли по Лоурн. Реактивы — NADH, NADPH, FMN (Reanal, Венгрия), декан, деканаль (Fluka A. G., Швейцария).

Среда инкубации во всех опытах: 0,2 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 7,0, температура 22° С.

Связывание деканалья и декана с цитохромом P-450 определяли из спектральной константы диссоциации комплекса, численно равной концентрации субстрата, вызывающей полумаксимальные спектральные изменения ( $\Delta D$ ).  $\Delta D$  выражали в единицах поглощения и оценивали из величины перпендикуляра, опущенного из максимума спектра на осевую линию,

соединяющую минимум при 420 нм с точкой пересечения спектра при 350 нм. Интенсивность свечения определяли по уровню максимума и выражали в относительных единицах.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Hastings J. W. (1978) *Photochem. Photobiol.*, **27**, 397-404.
2. Hastings J. W., Neelson K. H. (1977) *Ann. Rev. Microbiol.*, **31**, 549-595.
3. Balny C., Hastings J. W. (1975) *Biochemistry*, **14**, 4719-4723.
4. White D. C., Dundas C. R. (1970) *Nature*, **226**, 456-458.
5. Johnson F. H., Plough B. (1959) *J. Cell. Comp. Physiol.*, **53**, 279-306.
6. Kössler F. (1968) *Arch. Microbiol.*, **64**, 146-157.
7. Данилов В. С. (1979) Докл. АН СССР, **249**, 477-479.
8. Hastings J. W., Gibson Q. H., Friedland J., Spudich J. (1966) in: *Bioluminescence in Progress* (Johnson F. H., Haneda Y., eds), pp. 151-186, Princeton univ. press.
9. Исмаилов А. Д., Егоров Н. С., Данилов В. С. (1979) Докл. АН СССР, **249**, 482-485.
10. Hastings J. W., Balny C. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 7288-7293.
11. Арчаков А. И. (1975) Микросомальное окисление, «Наука», М.
12. Reichman L. M., Annaev B., Rozantzev E. C. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **263**, 41-51.
13. Gunsalus I. C., Pederson T. C., Sligar S. G. (1975) *Ann. Rev. Biochem.*, **44**, 377-388.
14. Nicoli M. Z., Meighen E. A., Hastings J. W. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 2385-2392.
15. Spudich J. A. (1963) BS thesis. Univ. Illinois, Urbana, p. 63.
16. Baumstark A. L., Cline T. W., Hastings J. W. (1979) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **193**, 449-495.
17. McCapra F., Leason P. D. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **3**, 114-117.
18. Watanabe T., Nakamura T. (1976) *J. Biochem.*, **79**, 489-495.

Поступила в редакцию  
11.II.1980  
После доработки  
8.IV.1980

#### INTERACTION OF ALIPHATIC ALDEHYDE WITH CYTOCHROME P-450 IN REACTIONS OF BACTERIAL LUMINESCENCE

DANILOV V. S., ISMAILOV A. D., MALKOV Yu. A., EGOROV N. S.

*M.V. Lomonosov State University, Moscow*

An aldehyde-binding component of the luminescent bacteria *Photobacterium fischeri* has been identified. It is shown that aliphatic aldehyde participates in the oxidation chain of pyridine nucleotides and binds to a mixed-function oxidase — cytochrome P-450. The binding constant for aldehyde-cytochrome P-450 complex determined by a spectral method turned out equal to Michaelis constant for the luminescence reaction of bacterial luciferase. The substrates, including aliphatic hydrocarbons, and the inhibitors of mixed-function oxidases manifested a competitive inhibition with aldehyde. Some peculiarities of cytochrome P-450 functioning in bacterial luminescence were discussed using decane and decanal as an example.