

УДК 577.151.042

ЭФФЕКТЫ ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ НА БАКТЕРИАЛЬНУЮ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНУЮ РЕАКЦИЮ

И.Е. Суковатая, Н.А. Тюлькова

(Институт биофизики, СО РАН. Красноярск, 660036, e-mail: biotech@ibp.ru)

Эффекты активации и ингибирования метанола, этанола и ацетона на активность люцифераз из двух видов светящихся бактерий *Photobacterium leiognathi* и *Vibrio harveyi* были изучены кинетическими графическими методами. Длинноцепочечные алифатические альдегиды: деканаль (C_{10}), додеканаль (C_{12}), тетрадеканаль (C_{14}) были использованы как субстраты с разной гидрофобностью. Кинетический анализ типов ингибирования и активации показал, что молекулы органических растворителей могут быть связаны в активном центре каждой из люцифераз.

Бактериальные люциферазы из *Photobacterium leiognathi* и *Vibrio harveyi* довольно широко изучены [1, 2]. В [3, 4] методами рентгеноструктурного анализа получили кристаллическую структуру люциферазы из *V. harveyi* с разрешением 2,4 и 1,5 Å. Эти люциферазы относятся к большому семейству белков – “ $(\alpha/\beta)_8$ -бочонкам” [4, 5]. Все бактериальные люциферазы гомологичны, и катализируют одну и ту же реакцию:



Реакция протекает через ряд промежуточных соединений с образованием С4- α -гидроксифлавина. Недавно определенная трехмерная структура люциферазы позволяет предположить, что активный центр находится в большой внутренней полости на α -субъединице, которая достаточно велика, чтобы разместить $FMNH_2$, O_2 и длинноцепочечный альдегид [4, 6]. Роль α -субъединицы до конца не известна, но предполагается, что она необходима для обеспечения высокого квантового выхода реакции [7, 8]. Аминокислотные последовательности двух субъединиц люцифераз имеют 32%-ю гомологию.

Люциферазы широко специфичны по отношению к альдегидному субстрату: длина цепи альдегида может составлять от 8 до 16 атомов углерода. Монотонная связь между параметрами биолюминесцентной реакции и длиной альдегидной цепи наблюдается не для всех люцифераз [9]. Аминокислотный остаток Arg107, вероятно, необходим для высокой каталитической активности люцифераз и связывания альдегида [10]. Было показано, что некоторые длинноцепочечные алифатические соединения, такие как кетоны, кислоты, спирты [11], разные органические растворители [12, 13], ингибируют люциферазу из *V. harveyi*. Однако мало что известно о природе участков связывания бактериальных люцифераз. Чтобы получить подробную информацию относительно каталитических свойств люцифераз, изолированных из разных видов светящихся бактерий (*Photobacterium leiognathi* и *Vibrio harveyi*), мы сравнили влияние органических растворителей на максимальную интенсивность свечения, используя в качестве

субстратов три альдегида разной гидрофобности. Существенным преимуществом проведения биолюминесцентной реакции в органических средах является увеличение растворимости гидрофобных субстратов. Кроме того, изучение структурно-функциональных взаимосвязей люцифераз в разных условиях имеет большое значение для фундаментальных исследований, как теоретических, так и прикладных.

Методы

Люциферазы из *Vibrio harveyi* (штамм 1212) и *Photobacterium leiognathi* (штамм 208) были получены, как описано в [14]. Измерение кинетических параметров биолюминесценции в буфере или в смесях буфера с органическим растворителем проводили, как описано в [15]. В каждом случае измеряли максимальную интенсивность свечения (I_{\max}), характеризующую максимальную скорость реакции. Типы активации и ингибирования органическими растворителями определяли традиционными графическими методами: Лайнуивера–Берка, Хейнса, Иди–Хофсти и Диксона [16, 17]. Величину I_{\max} исследовали как функцию активирующих и ингибирующих концентраций органических растворителей от концентрации альдегидного субстрата. Концентрации альдегидов C_{14} , C_{12} и C_{10} в реактивной смеси для выбранной концентрации органического растворителя были следующие: $(0,47 - 47) \cdot 10^{-7}$, $(0,5 - 5,4) \cdot 10^{-6}$, $(1,3 - 12,8) \cdot 10^{-3}$ М соответственно. Для статистической обработки полученных экспериментальных результатов использовали пакет программ Excel для Windows-98.

Результаты

Степень влияния органических растворителей на активность люцифераз зависит от их концентрации. Результаты показали, что при небольших концентрациях метанола, этанола и ацетона активируются обе люциферазы, в то время как более высокие концентрации этих растворителей ингибируют активность люцифераз. На рис. 1, 2 приведен пример зависимости интенсивности свечения люцифераз в водно-метанольных

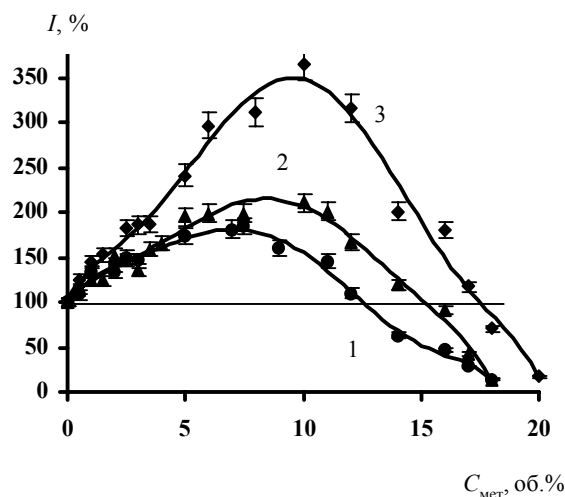


Рис. 1. Эффект метанола на максимальную интенсивность люминесценции (I) для люциферазы *V. harveyi* при использовании альдегидов с разной длиной алифатической цепи: 1 – деканаль, 2 – додеканаль, 3 – тетрадеканаль. Прямая горизонтальная линия – интенсивность свечения люциферазы в буферной реакционной среде

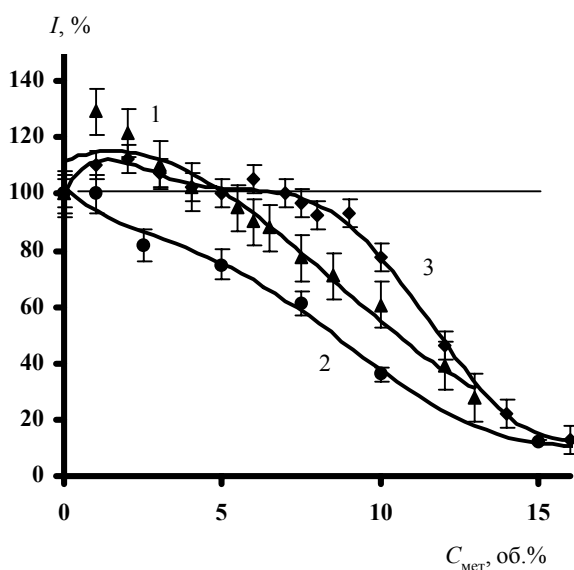


Рис. 2. Эффект метанола на максимальную интенсивность люминесценции (I) для люциферазы *P. leiognathi* при использовании альдегидов с разной длиной алифатической цепи: 1 – деканаль, 2 – додеканаль, 3 – тетрадеканаль. Прямая горизонтальная линия – интенсивность свечения люциферазы в буферной реакционной среде

смесях с разными альдегидами. Когда концентрации ацетона, этанола и метанола достигают 2,5 об.%, активность люциферазы возрастает на 50, 70 и 30% при использовании C_{10} и на 20, 50, 20% при использовании C_{14} соответственно. Если в качестве субстрата использовали альдегид C_{12} , активация интенсивности свечения не наблюдалась при концентрации растворителя, не превышающей 1 об.% (можно предположить, что такая концентрация растворителя не оказывает влияния на фермент). Активность этой люциферазы уменьшается с увеличением концентрации каждого из органических

растворителей. Органические растворители влияют на активность люциферазы из *P. leiognathi* в меньшей степени при использовании C_{14} , чем при использовании C_{10} . Среди применяемых органических растворителей метанол наиболее сильно активирует обе люциферазы с любым альдегидом. Этанол – более сильный активатор по сравнению с ацетоном. Когда концентрация каждого из растворителей (ацетона, этанола и метанола) составляла 2,5 об.%, скорость реакции увеличивалась на 50, 70, 30% при использовании C_{10} и на 20, 50, 20% при использовании C_{12} соответственно. Для последней люциферазы степень активации метанолом растет с увеличением числа атомов углерода альдегида.

Для всех используемых альдегидов рост концентрации органического растворителя приводил к инактивации люцифераз. Активность обоих ферментов резко падала с увеличением концентрации растворителя. Метанол, этанол и ацетон уменьшали активность ферментов до 50% по сравнению с начальной интенсивностью свечения при разных значениях концентрации (пороговая концентрация C_{50}). Активность люциферазы уменьшалась в следующем порядке: ацетон > этанол > метанол. Содержание ацетона, этанола и метанола в концентрациях, близких к 10, 12, 15 об.%, полностью ингибировало активность люциферазы из *P. leiognathi* при C_{10} , C_{12} и C_{14} соответственно, в то время как для люциферазы из *V. harveyi* полное ингибирование реакции наступало при концентрациях растворителей, близких к 12, 15, 20 об.% при C_{10} , C_{12} и C_{14} соответственно. При высоких концентрациях растворителя (20–90 об.%) активность люцифераз не наблюдалась.

Были определены типы активации и ингибирования люцифераз при разных концентрациях растворителей. Было также изучено влияние длины цепи альдегидов на кинетику люцифераз в водно-органических средах. Биолюминесцентная активность в средах, содержащих ацетон, метанол или этанол, была исследована при изменении концентрации растворителей и альдегидов. Было показано, что метанол – неконкурентный активатор (за исключением C_{14} для люциферазы из *V. harveyi*). По отношению к C_{14} активация люциферазы из *V. harveyi* всеми используемыми растворителями является не полностью конкурентной, активация люциферазы из *P. leiognathi* только ацетоном является полностью конкурентной. Активизация метанолом, этанолом и ацетоном люциферазы из *V. harveyi* была определена как не полностью конкурентная по отношению к C_{14} и неконкурентная по отношению к C_{12} . Во всех других случаях тип активации люцифераз органическими растворителями являлся неконкурентным. Другими словами, субстрат и активатор связываются с активным центром фермента независимо друг от друга, что приводит к увеличению скорости реакции [17].

Спирты – не полностью конкурентные ингибиторы люциферазы из *P. leiognathi* по отношению к C_{14} (рис. 3). Тип ингибирования люциферазы из *P. leiognathi* ацетоном был определен как не полностью неконкурентный

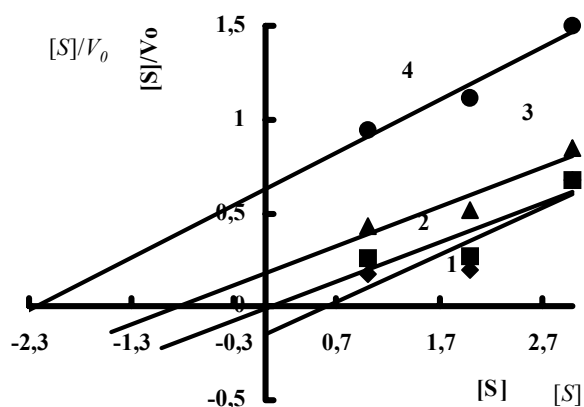


Рис. 3. Ингибирование биоломисцентной реакции, катализируемой люциферазой из *P. leiognathi* по отношению к тетрадеканалу в координатах Хейнса при фиксированных концентрациях этанола (об.%): 1 – контроль; 2 – 5; 3 – 7,5; 4 – 10

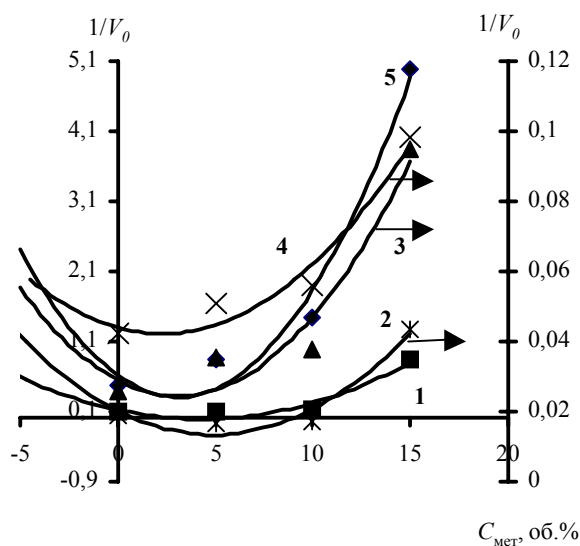


Рис. 4. Частично конкурентное ингибирование метанолом биоломисцентной реакции, катализируемой люциферазой из *P. leiognathi*, по отношению к тетрадеканалу в координатах Диксона при концентрации тетрадеканала (М): 1 – $4,5 \cdot 10^{-6}$; 2 – $45,47 \cdot 10^{-6}$; 3 – $23,5 \cdot 10^{-6}$; 4 – $11,8 \cdot 10^{-6}$; 5 – $4,5 \cdot 10^{-6}$

относительно C_{14} . Тип ингибирования люциферазы из *P. leiognathi* изменяется при использовании C_{12} и C_{10} . В этих случаях ингибирование растворителями активности этой люциферазы не было конкурентным. Типы ингибирования этих растворителей относительно C_{12} для люциферазы из *V. harveyi* были определены как смешанные (не полностью). Ингибирующее действие всех используемых растворителей относительно C_{14} на активность люциферазы из *V. harveyi* имело конкурентный (не полностью) характер. Для детального кинетического исследования обычно используют вторичные зависимости, построенные по стандартным графикам ($1/[S]$, $1/V$) или $(V, V/[S])$, координаты Диксона ($1/V$, $[I]$) ($[S]$, $[I]$ – концентрации субстрата и ингибитора, V – скорость катализа). Эти зависимости линейны в

том случае, если фермент имеет только один участок связывания ингибитора [17]. В других случаях тип ингибирования определяется как не полностью конкурентный, не полностью смешанный и т.д. Анализ полученных в этих координатах данных показывает, что спирты конкурентно (не полностью) ингибируют ферментативную активность люциферазы из *P. leiognathi* (рис. 4). Оказалось, что все нелинейные зависимости в координатах Диксона являются параболическими функциями. Следовательно, в этих случаях две молекулы органического растворителя, как активатора или ингибитора, связываются на люциферазе.

Обсуждение

Один из наиболее важных выводов, касающихся использования бактериальных люцифераз в присутствии органических растворителей, состоит в том, что люциферазы способны иметь относительно высокую активность в этих средах, в частности в присутствии ацетона, метанола и этанола. Однако люциферазы могут эффективно использоваться только в присутствии малых концентраций органических растворителей по сравнению с другими ферментами, которые могут функционировать в органических растворителях так же, как в воде [18, 19]. Степень активации люцифераз зависит как от концентрации, так и от природы органического растворителя. Эффективность воздействия органических растворителей на активность люциферазы связана с их влиянием на структуру фермента. Увеличение скорости реакции происходило, возможно, из-за оптимизации структуры ферментов. Кроме того, присутствие водорастворимого органического растворителя могло модифицировать характер и число нековалентных взаимодействий, например ван-дер-ваальсовых, электростатических, гидрофобных или водородных связей. В результате этого каталитически активная конформация фермента в таком растворе изменяется. Анализ кинетики люцифераз в водно-органических реакционных средах показал, что $\log P$, характеризующий гидрофобные свойства органических растворителей и альдегидов, плохо коррелирует с параметрами биоломисцентной реакции. Степень гидратации фермента – важный фактор при катализе в органических растворителях [20, 21]. Известно, что люцифераза из *V. harveyi* является более жестким и гидрофобным ферментом по сравнению с люциферазой из *P. leiognathi*. Органический растворитель изменяет микроокружение белка, вследствие чего структура люциферазы из *V. harveyi* становится более гибкой, а это приводит к увеличению ферментативной активности. Таким образом, гидрофобная среда должна способствовать проникновению альдегидного субстрата в большей степени в активный центр люциферазы из *V. harveyi*. Поверхность молекул люциферазы из *P. leiognathi* более гидрофильна, поэтому добавление растворителя не приводит к значительному улучшению конформации фермента для связывания с субстратом. Следует отметить, что активность этого

фермента в воде превышает таковую для люциферазы из *V. harveyi*. Введение в реакционную смесь органических растворителей с более высокой концентрацией приводит к уменьшению активности обеих люцифераз. Люцифераза из *V. harveyi* сохраняет приблизительно 15% от начальной активности в 20%-м этаноле (рис. 1), в то время как люцифераза из *P. leiognathi* полностью неактивна при этих же условиях. Это наблюдение согласуется с предположением, что органические растворители увеличивают стабильность более гидрофобных ферментов. Люцифераза из *V. harveyi* более устойчива к инактивации используемыми растворителями, чем люцифераза из *P. leiognathi*. Уменьшение ферментативной активности при более высоких концентрациях растворителей, вызванное влиянием ацетона, метанола и этанола как гидрофильных растворителей, происходит за счет удаления ими "существенной" воды с поверхности фермента.

Кинетические параметры биолюминесцентной реакции в водно-органических смесях зависят от природы растворителей и субстратов. Результаты исследования подтвердили, что растворители проявляют разные типы активации. Формально-кинетический анализ показал, что активация люциферазы из *P. leiognathi* спиртами является неконкурентной по отношению к S_{14} , в то время как ингибирование является не полностью конкурентным. Активация и ингибирование активности люциферазы из *V. harveyi* этанолом, метанолом и ацетоном не полностью конкурентны относительно S_{14} . Наблюдаемые кинетические эффекты позволяют предположить, что две молекулы органических растворителей могут быть связаны в активном центре каждой из люцифераз. Поскольку конкурентный тип взаимодействия определен только по отношению к S_{14} для обеих люцифераз, то можно предположить, что по крайней мере спирты могут связываться с ферментом преимуще-

ственно в области связывания дистальной метильной группы тетрадеканала. Анализ разных типов ингибирования биолюминесцентной реакции ацетоном показал, что область связывания люциферазы дистальной метильной группой тетрадеканала представлена набором ионогенных групп двух исследуемых люцифераз. Поскольку часть ингибиторов неконкурентна по природе, то возможно, что по крайней мере некоторые из участков связывания люциферазы с растворителями отличаются от таковых для альдегидных субстратов. Кроме того, определено, что две молекулы растворителя могут быть связаны в активном центре. Предполагается, что существуют два сайта связывания растворителя на молекулах люцифераз. Один из них является сайтом предпочтительного связывания, когда концентрация растворителей низка. В этом случае растворитель может регулировать изменение ферментативного активного центра таким образом, чтобы активность фермента возрастала. С другим сайтом растворитель связывается только тогда, когда его концентрация становится выше.

Как было показано ранее, сродство обеих люцифераз к этим альдегидам изменяется в водно-органических средах [15]. Конкурентные типы взаимодействия, определенные в данной работе, соответствуют только гидрофобным типам взаимодействия между люциферазой и альдегидами. Когда связывание люциферазы и альдегида обусловлено электростатическими взаимодействиями, типы активации и ингибирования, определенные нами в данной работе, отличаются от конкурентных. Различия в поведении двух люцифераз в водно-органических средах обусловлены, вероятно, их структурными особенностями. Изменения на уровне вторичной или третичной структуры люцифераз в органических растворителях могут приводить к уменьшению каталитической активности ферментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baldwin T.O., Nicoli M., Becvar J.E., Hastings J.W. // J. Biol. Chem. 1975. **250**. P. 2763.
- Гутельзон И.И., Родичева Э.К. и др. Светящиеся бактерии. Новосибирск, 1984.
- Fisher A.J., Raushel F.M., Baldwin T.O., Rayment I. // J. Biol. Chem. 1995. **34**. P. 6581.
- Fisher A.J., Thompson T.B., Thoden J.B. et al. // J. Biol. Chem. 1996. **34**. P. 21956.
- Moore S.A., James M.N. // Protein Sci. 1994. **11**. P. 1914.
- Huang S., Tu S-C. // Biochemistry. 1997. **36**. P. 14609.
- Meighen E.A., Bartlet I. // J. Biol. Chem. 1980. **25**. P. 11181.
- Escher A., O'Kane D.J., Szalay A.A. // Mol. Gen. Genet. 1991. **230**. P. 385.
- Watanabe T., Nakamura T. // J. Biochem. 1972. **72**. P. 647.
- Moore C., Lei B., Tu S-C. // Archiv. Biochem. Bioph. 1999. **370**. P. 45.
- Holzman T.L., Baldwin T.O. // Biochemistry. 1982. **21**. P. 6194.
- Curry S., Lieb W.R., Franks N.P. // Biochemistry. 1990. **29**. P. 46441.
- Francisco W.F., Abu-Soud H.M., Baldwin T.O., Raushel F.M. // J. Biol. Chem. 1993. **268**. P. 24734.
- Tjulkova N.A. Biological luminescence. Singapore, 1989. P. 369.
- Sukovataya I. E., Tjulkova N. A. // Luminescence. 2001. **16**. P. 271.
- Корниш-Боуден А. Принципы ферментативной кинетики. М., 1979.
- Келети Т. Основы ферментативной кинетики. М., 1990.
- Khmelnitsky Y.L., Levashov A.V., Klyachko N.L., Martinek K. Enzyme Microb. Technol. 1988. **10**. P. 710.
- Sellek G.A., Chaudhuri J.B. // Enzyme Microb. Technol. 1999. **25**. P. 471.
- Zaks A., Klivanov A. M. // J. Biol. Chem. 1988. **263**. P. 8017.
- Affleck R., Xu Z-F, Suzawa V. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. **89**. P. 1100.