

УДК 579.017.7: 577.151.3

**Б.М. Галкін, Т.О. Філіпова, В.О. Іваниця**

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **БАКТЕРІАЛЬНІ ЦИТОХРОМИ P-450: II. СТРУКТУРА І ФУНКЦІЇ**

*У статті представлено огляд сучасних наукових публікацій про молекулярну структуру, механізми монооксигеназного каталізу, генетику, систематику, еволюційне походження родин бактеріальних цитохромів P-450 і їх біологічні функції. Проведено порівняльний аналіз родин бактеріальних цитохромів P-450.*

*К л ю ч о в і с л о в а : бактеріальні цитохроми P-450, монооксигенази, гени CYP, НАДФН-цитохром P-450 редуктаза, ферредоксини, НАДН-ферредоксин редуктаза.*

У попередній статті була детально проаналізована структура цитохромів P-450, сучасна систематика цих ферментів, механізми монооксигеназного каталізу, біологічні функції цієї ферментної системи та еволюційне походження [1]. Значна частина інформації в ній [1] була присвячена родинам цитохрому P-450 еукаріотних клітин, але з кожним роком кількість повідомлень про нові цитохроми P-450 зростає, особливо це стосується бактеріальних цитохромів P-450, які беруть участь в деградації лігніну [32], ксенобіотиків [12] тощо, у метаболізмі ендогенних сполук, таких, як жирні кислоти [4], вітаміни [28], холестерол [20], у формуванні механізмів резистентності до антибіотиків [27] та у біосинтезі еритроміцину, міцинаміцину [12]. З огляду на велику різноманітність та виключну важливість біологічних функцій цих молекул виникла потреба детально проаналізувати сучасну інформацію щодо родин бактеріальних цитохромів P-450.

Перші бактеріальні цитохроми були виділені з *Pseudomonas putida* та бактероїдів *Bradyrhizobium japonicum* у 60-х роках 20 сторіччя [3, 9]. До 1984 року вже було знайдено цитохром P-450 залежні системи у 41 виду бактерій. На сьогодні цитохром P-450 знайдено у 905 видів еубактерій, 22 видів архей і 2 видів мімівірусів. У таблиці 1 наведені основні бактеріальні цитохроми P-450.



Таблиця 1

Бактеріальні цитохроми P-450

Table 1

Bacterial cytochromes P-450

Тривіальна назва	Систематична назва	Бактеріальне джерело	Властивості
P-450cam	CYP 101	<i>Pseudomonas putida</i>	Гідроксилаза камфори
P-450 BM-3	CYP 102	<i>Bacillus megaterium</i>	Гідроксилаза жирних кислот
P-450 pinF1	CYP 103	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Індукується вторинними метаболітами рослини
P-450 pinF2	CYP 104	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Індукується вторинними метаболітами рослини
P-450 SU1	CYP 105A1	<i>Streptomyces griseolus</i>	Індукується гербіцидами
P-450 SU2	CYP 105B1	<i>Streptomyces griseolus</i>	Індукується гербіцидами
P-450 VD25	CYP 105A2	<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	Гідроксилаза вітаміну D-3
P-450 (choP)	CYP 105C1	<i>Streptomyces sp.</i>	Метаболізм холестеролу (?)
P-450soy	CYP 105D1	<i>Streptomyces griseolus</i>	Трансформація ксенобиотиків
P-450 BM-1	CYP 106A1	<i>Bacillus megaterium</i>	Гідроксилаза жирних кислот
P-450meg	CYP 106A2	<i>Bacillus megaterium</i>	Гідроксилаза стероїдів
P-450ery F	CYP 107A1	<i>Streptomyces erythraea</i>	Біосинтез еритроміцину
P-450 (mycG)	CYP 107E1	<i>Micromonospora griseorubida</i>	Біосинтез міцинаміцину
P-450terp	CYP 108	<i>Pseudomonas sp.</i>	Окиснення терпенолів
P-450B.s.	CYP 109	<i>Bacillus subtilis</i>	Окиснення жирних кислот та метаболізм тестостерону



Тривіальна назва	Систематична назва	Бактеріальне джерело	Властивості
-	CYP 110	<i>Anabaena sp.</i>	Метаболізм алканів
P-450lin	CYP 111	<i>Pseudomonas incognita</i>	Гідроксилаза ліналіол 8-метил
P-450 VJ-1	CYP 112	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Експресується у аеробних умовах
P-450eryK	CYP 113	<i>Streptomyces erythraea</i>	Кінцева стадія біосинтезу еритроміцину
P-450 VJ-3	CYP 114	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Експресується в аеробних умовах
P-450 VJ-2	CYP 115P	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	P-450 псевдоген
-	CYP 116	<i>Rhodococcus sp. N286/21</i>	Деградація гербіцидів
P-450 VJ-4	CYP 117	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Експресується у аеробних умовах
-	CYP 51, 118 , 121,123, 124, 125, 126,128,130,132	<i>Mycobacteriaceae</i>	Окиснення жирних кислот
P-450 Арх.	CYP119	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	Термостабільний P-450. Пероксидазна активність
P-450 Cyanobac.	CYP120	<i>Synechocystis sp. PCC 6803</i>	Метаболізм ретинової кислоти
-	CYP 122	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Участь у біосинтезі рапаміцину
-	CYP127	<i>Rhizobium sp.</i>	не досліджено
-	CYP129	<i>Streptomyces peucetius</i>	C-14 гідроксилаза. Перетворення дауміцина у доксирубіцин
-	CYP131	<i>Streptomyces peucetius</i>	Участь у біосинтезі аміноглікозида дуаносаміна
-	CYP133	<i>Erwinia herbicola</i>	Перший цитохром P-450 у ентеробактерій

- інформація відсутня.



Бактеріальні цитохроми P-450 належать до 196 родин, 409 підродин. У архей відомо 12 родин, 14 підродин [<http://drnelson.uthsc.edu/cytochromeP450.html>].

У *Escherichia coli* не знайдено ізоформ цитохрому P-450, але є система переносу електронів. Тому вона є зручним об'єктом для експорту генів цитохромів P-450 різних систематичних груп. Це дає змогу у подальшому вивчити їх молекулярну структуру. Усі бактеріальні цитохроми є розчинними сполуками, що спрощує їх виділення, очищення та вивчення гіперекспресії. Бактеріальні цитохроми P-450 вивчаються не тільки з погляду їх фізіологічних функцій, але і як можливий об'єкт для біотехнологічних процесів. Усі бактеріальні цитохроми належать до першого класу, оскільки перенос електронів здійснюється від НАД(Ф)Н до ФАД-залежної редуктази потім електрони потрапляють на залізо-сірчані білки і до цитохрому P-450 [10].

Найбільш детально вивчений бактеріальний P-450<sub>cam</sub> (CYP101) з *P. putida*. Це перший цитохром, у якого повністю розшифрована молекулярна структура [26]. Крім того, докладно вивчено компоненти цієї системи і механізм ферментативного каталізу. У CYP101 амінокислотна послідовність повністю відрізняється від амінокислотної послідовності еукаріотних цитохромів P-450.

### Цитохром P-450<sub>cam</sub> (CYP101)

Цитохром P-450<sub>cam</sub> з *P. putida* ATCC17453 було знайдено ще в 1965 році [9], а потім очищено до гомогенного стану [7]. Він каталізує, 5-екзогідроксилювання монотерпенових вуглеводнів, представником яких є D-камфора. Субстрат деградує до ацетату та ізобутирату, в подальшому ці сполуки використовуються як метаболічне паливо [20]. Ген P-450<sub>cam</sub> (camC), а також гени інших ферментів, які беруть участь у деградації камфори, розташовуються в САМ-плазміді об'ємом 230 кб. Ген camC був клонований і експресований у *E. coli*, визначена його нуклеотидна послідовність [20]. Цитохром P-450<sub>cam</sub> (CYP101) відновлюється НАДН за допомогою ФАД-залежної редуктази путідаредоксину та залізо-сірчанних білків. Вони закодовані в генах camA і camB, які відповідно розташовані до camC по 3' положенню. Ген camD, який кодує 5-екзо-гідроксикамфорну редуктазу, розташований по положенню 5' до гену camC. Ці гени складають 4 оперони camDCAB, функцією яких є кодування білків, відповідальних за перші кроки в деградації камфори. Оперон, який контролює білок репресор є геном camR. Він є попередником гену camD і записаний у протилежному напрямку від генів camDCAB. Гени camA і camB були клоновані і секвеновані, як і вся монооксигеназна система цитохрому P-450<sub>cam</sub>, і експресовані у *E. coli* [20]. Крім того, визначено нуклеотидні послідовності гену camR [20]. Кристалічна структура цитохрому P-450<sub>cam</sub> з субстратом камфорою була з'ясована в 1985 році з роздільною здатністю 2,6 ангстрем. Рентгеноструктурний аналіз кристалічної



структури P-450cam з камфорою з більш високою роздільною здатністю було проведено через два роки [26]. Просторове розташування кристалу зберігається при різних формах і сам цитохром P-450cam складається з 414 амінокислотних залишків (М.м. 45 кД). Структура наближається до трикутної призми з розміром 60 x 55 x 30 ангстрем. У молекулі присутні 12 альфа-спіралей, що приблизно складає 40% від загальної структури білка, і 10% представлено бета-складчастими структурами, розташованими антипаралельно альфа-спіралям. За відсутності субстрату в активному центрі P-450cam знаходяться 6 водневих залишків води, один з яких зв'язаний з гемом заліза [26]. Цистеїн (Cys-357) — п'ятий ліганд гему цитохрому P-450cam — також виявлено за допомоги рентгено-структурного аналізу кристалічної структури цього цитохрому. Цікаво відзначити, що п'ятий ліганд — цистеїн, який у поліпептидному ланцюгу білка знаходиться в 357 положенні, у всіх живих істот перебуває в одному і тому ж місці. Кристалічна структура цитохрому P-450cam також дозволила виявити структуру 6 ліганду, тобто місце, яке займає кисень під час каталізу, це або вода, або гідроксид йон [26]. Спектроскопічні дослідження дозволили виявити механізми монооксигеназного каталізу (рис. 1).

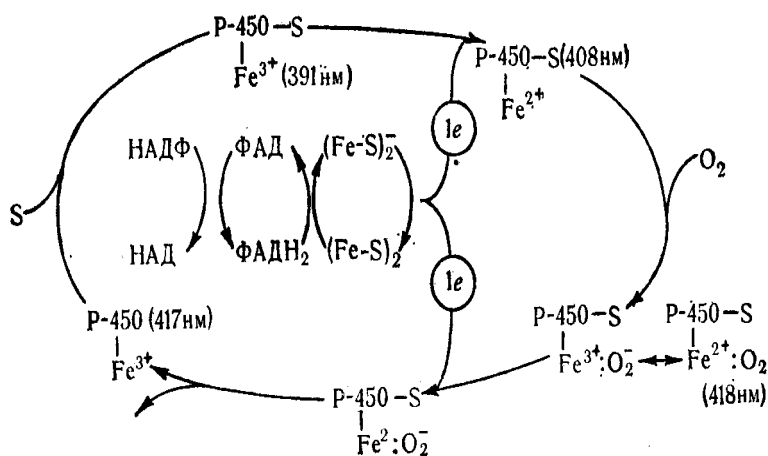


Рис 1. Механізми монооксигеназного каталізу *Pseudomonas putida*

Fig.1. The mechanisms of monooxygenase catalysis *Pseudomonas putida*

У стані спокою залізо в гемі цитохрому P-450cam знаходиться в трьохвалентному стані ( $\text{Fe}^{3+}$ ) низькоспінової форми ( $S = 1/2$ ). При зв'язуванні з камфорою з активного центру фермента витісняється вода, і залізо переходить в високоспінову форму ( $S = 5/2$ ). Спін-зрушення супроводжується збільшенням відновного потенціалу (-300 мВ до -170 мВ), що дозволяє одному електрону почати рух по електронтранспортній системі [26]. Залізо у гемі переходить в двовалентний стан ( $\text{Fe}^{2+}$ ) у високоспінової формі і зв'язує кисень. Утворюється супероксид-аніон ( $\text{O}_2^-$ ). Цей

комплекс дуже недовговічний. Далі утворюється трійчастий комплекс цитохром P-450, камфора,  $O_2^-$ . Другий електрон відновлює кисень до води, а субстрат перетворюється у гідроксильований продукт. Залізо у гемі переходить у трьохвалентний стан і гідроксильований субстрат відокремлюється від гемопротейну.

Також було досліджено роль окремих амінокислот. Phe-350 зберігається у інших цитохромів P-450 і за допомоги ван-дер-ваальсових зв'язків взаємодіє з гемом P-450cam. Його заміна на лейцин призводить до утворення апопротейнового комплексу. Все це свідчить про важливість цього амінокислотного залишку [35]. Мутація, що призводить до заміщення Cys-357 на гістидин або серин, також призводить до втрати активності цього ферменту [35]. Крім того, було показано, що амінокислотні залишки Arg-72, Arg-112, Arg-364 та Lys-344, що мають позитивний заряд, здійснюють контакти між P-450cam і путідаредоксином [25]. Мутанти, в яких здійснено заміну двох із цих амінокислотних залишків, втрачають позитивний заряд і набувають нейтрального або негативного заряду. Все це призводить до зниження асоціації P-450cam і путідаредоксину. Молекула камфори зв'язується з різними амінокислотними залишками, такими, як Phe-87, Leu-244, Val-247, Val-295 за допомоги взаємодій Ван-дер-Ваальса і сприяє регіоселективності і стереоспецифічності в монооксигеназному каталізі [36]. Камфора утворює водневий зв'язок з активним центром P-450cam тільки з Tug-96. Мутагенез цього залишку призводить до зниження активності і втрати абсолютної регіоспецифічності гідроксильовання, а також змінює спінову рівновагу заліза в гемі. Таким чином, Tug-96 грає важливу роль у забезпеченні переходу з низькоспінового стану в високоспіновий, який необхідний для перенесення електронів в P-450cam системі [36].

### Цитохром P-450 BM-3 (CYP102)

В останні роки ізоформи P-450 BM 3-6 *B. megaterium* використовуються як модель для вивчення мікросомальних цитохром P-450 залежних систем у ссавців. На даний час це єдина бактеріальна цитохром P-450 залежна система другого класу, хоч, на відміну від мікросомальних монооксигеназ, у яких ферментна система складається з двох білків, у ізоформ P-450 BM 3-6 відбулося об'єднання НАДФН цитохром P-450 редуктази і цитохрому P-450 в один білок.

Гідроксилази, які метаболізують жирні кислоти у *B. megaterium* були виявлені в середині 1970-х років двадцятого століття. Фермент, відповідальний за цей процес був визначений як цитохром P-450 (ізоформи P-450 BM-1-3, CYP102). Цитохром P-450 BM-3 був виділений та очищений до гомогенного стану. Встановлено, що він є каталізатором швидкої монооксигеназної реакції окиснення насичених жирних кислот з довжиною ланцюга від C12 до C18. Оптимальна активність цього ферменту відзначена для пентадекаєнової (C15) і пальмітинової (C16)





кислот і вона сягає  $4600 \text{ моль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$ , ця ферментна активність є дуже високою. Гідроксилазна система бактерії здатна гідроксилувати і інші мононенасичені жирні кислоти, жирні спирти і жирні аміди, які мають однакову довжину вуглецевого ланцюга [21]. Ефіри жирних кислот не є субстратами цієї монооксигеназної системи. Алкани є інгібіторами монооксигеназної системи ненасичених жирних кислот, але їх метаболізм також протікає завдяки НАДФН залежному окисненню [18]. Гідроксилування жирних кислот в основному протікає по  $\omega$ -2 положенню, але в деяких випадках по  $\omega$ -1 і  $\omega$ -3 положеннях [20]. Гідроксилування пальміната за допомоги цієї ферментної системи є початковим етапом окиснювання цього субстрату [20]. Ця гідроксилазна система також здатна утворювати епоксиди в місцях подвійних зв'язків у молекулах жирних кислот [20]. Цитохром Р-450 ВМ-3 має незвично високу молекулярну масу (119 кДа), в порівнянні з іншими цитохромами Р-450, і для своєї каталітичної активності потребує кофактору НАДФН, а для більшості бактеріальних цитохромів Р-450 потрібен кофактор НАДН. У цитохром Р-450 ВМ-3 залежної системи було виявлено по одному молю ФАД, ФМН і гему на один моль ферменту, крім того, ця система здатна відновлювати цитохром *c* та інші штучні акцептори електронів [18]. Подібна властивість характерна тільки для мікосомальних цитохромів Р-450 ссавців. Обмежений протеоліз викликав розрив цитохрому Р-450 ВМ-3 на два домени. Перший домен — це поліпептид з молекулярною масою 66 кДа і він містить також флавін. Другий домен — поліпептид з молекулярною масою 55 кДа, містить гем. Перший домен зберігає редуктазну активність, другий домен здатний зв'язувати субстрат і утворює характерний СО-комплекс з максимумом поглинання 450 нм [20]. При протеолізі втрачається гідроксилазна активність по відношенню до жирних кислот. Тим не менш, протеоліз N-кінцевої частини домену, що містить гем, не впливає на ферментативну активність. Таким чином, цитохром Р-450 ВМ-3 складається з двох доменів і схожий на мікосомальні цитохроми Р-450 (цитохром Р-450 і НАДФН-цитохром Р-450 редуктази) [20]. Ген, що кодує цитохром Р-450 ВМ3 (CYP102) був клонований і експресований в *E. coli*. Очищений фермент з *E. coli* за функціональними, імунохімічними, і електрофоретичними властивостями є ідентичним ферменту з *B. megaterium*. У них виявлено подібність N-кінцевих амінокислотних послідовностей [22]. Первинна структура, яка була визначена шляхом розшифровки послідовностей нуклеотидів підтвердила наявність доменної структури у цитохрому Р-450 ВМ-3. N-термінальна ділянка гемового домену виявилась на 25% схожою з еукаріотною  $\omega$ -гідроксилазою жирних кислот у той час, як С-кінцевий фрагмент домену, що зв'язує флавін, на 33% схожий з печінковою НАДФН- цитохром Р-450 редуктазою. Ці два домени зв'язані гідрофільними пептидами. Гени, що кодують домени гему і флавіну, були виділені і експресовані в *E. coli* [17]. Кристалічна структура цитохрому



P-450 BM-3 схожа з цитохромом P-450cam. Вона є трикутною призмою і гем знаходиться між I і L спіралями. Cys-400 є п'ятим лігандом гему, шостий ліганд заміщений молекулами води [21]. Існує схожість між цитохромами P-450cam і P-450 BM-3 в будові C-кінцевої частини L-спіралі. Цитохром P-450 BM-3 складається з чотирьох основних пептидних вставок (розміром 7–17 амінокислот). Позитивно заряджені амінокислотні залишки можуть брати участь у процесах зв'язування різних поліпептидних ланцюгів. Причому, фрагмент Thr-268 і Glu-409 цитохрому P-450 BM-3 відповідає фрагменту Thr-252 і Glu-366 у цитохромі P-450cam [20]. Мутагенез Gly-570, Trp-574 і Tyr-536 в редуктазній області цитохрому P-450 BM-3 показав їх значення у зв'язуванні флавінмононуклеотиду. Були отримані і вивчені мутанти по Trp-96 [19]. Ця амінокислота відіграє важливу роль у забезпеченні переходу з низькоспінового стану в високоспіновий стан заліза у гемі, який необхідний для перенесення електронів в цитохром — P-450BM-3 залежній системі як посередника при перенесенні електронів в електронтранспортному ланцюгу, і зберігається у всіх вивчених цитохромах P-450. Заміна Trp-96 на ароматичні амінокислоти (Phe, Tyr), або на амінокислоту Ala призводять до зниження вмісту гему. Trp-96 знаходиться безпосередньо біля гему в цитохромі P-450 BM-3 і може утворювати водневий зв'язок з гемпропіонатом. Його роль в цитохромі P-450 BM-3 полягає в стабілізації гему.

Виявилось, що цитохром P-450 BM-3 здатний до індукції при введенні барбітуратів. Здатність фенобарбіталу індукувати цитохром P-450 ссавців добре відома. При індукції фенобарбіталом відбувається підвищення вмісту мРНК, що може вказувати на збільшення швидкості транскрипції [24]. Тим не менш, барбітуратна індукція бактеріальних P-450 представляється дуже незвичайною. Було показано, що додавання до культури *B. megaterium* 8 мМ фенобарбіталу посилює синтез цитохрому P-450 BM-3 у 28 разів, хоча фенобарбітал не є субстратом цього цитохрому P-450 [21]. Виділення цитохрому P-450 BM-3 показало, що його кількість значно зросла після індукції [21]. Інші барбітурати теж є індукторами цього гемопротейну і визначальною властивістю для індукції є ліпофільність субстратів. Генетичні дослідження показали, що одна ділянка в гені цитохрому P-450 BM-3 в 5' положенні відповідає за індукцію барбітуратами. Встановлено високу схожість у нуклеотидній послідовності між 17 bp, які знаходяться в 5' положеннях генів цитохрому P-450BM-3 та цитохрому P-450BM-1. Ці послідовності відповідають за барбітуратну індукцію [20]. Ген, що кодує білковий репресор гену цитохрому P-450 BM-3, був також знайдений і визначена амінокислотна послідовність білка, який кодує цей ген. Він теж розташовується в 5' положенні гену. Аналогічні механізми барбітуратної індукції і у вищих організмів [34]. Цитохром P-450 BM-3, крім реакцій окиснення жирних кислот, здатний метаболізувати різні ксенобіотики (реакції о-деметилування і гідроксилування) [15].



### Цитохром P-450terp (CYP 108)

Цитохром P-450terp комплекс відноситься до першого класу. Він виділений з *Pseudomonas spp.*, які здатні рости на  $\omega$ -терпенолі. Цитохром P-450terp залежні монотерпенові гідроксилази аналогічні цитохром P-450cam залежній камфорній гідроксилазі. Ген P-450terp (cyp108) був клонований, а отриманий фермент було виділено, очищено та досліджено його структуру [8]. Цитохром P-450terp дуже схожий на цитохром P-450cam. **Тим не менш, існують і певні структурні відмінності. В основному вони стосуються деяких змін в N-поліпептидних кінцях В, F і G спіралей білка. Геометрія розташування гему в ферменті відрізняється від його розташування в цитохромі P-450cam. Один із атомів азоту порфірину з залізом утворює більш короткий дистальний зв'язок. Поліпептидна спіраль, яка знаходиться в безпосередній близькості від гему, схильна до викривлення, як і у цитохрому P-450cam. У цих двох ензимів відмічено наявність молекул води, які можуть служити джерелами протонів в процесі каталізу [8].**

### Цитохроми P-450 роду *Streptomyces*

Стрептоміцети — це родина прокаріотів, які синтезують різні антибіотики. Крім того, за допомоги цитохромів P-450 вони здатні каталізувати гідроксилювання алкалоїдів, кумаринів [31], ретіноїдів [30]. Ці властивості допомагають їм вижити у несприятливих умовах навколишнього середовища та використовувати ці сполуки як основні джерела вуглецю та енергії [23].

### Цитохром P-450eryF (CYP 107 A1)

Цитохром P-450eryF з *Saccharopolyspora erythraea* є одним із бактеріальних цитохромів P-450, який виконує біосинтетичні функції. *S. erythraea* синтезує еритроміцин. Цитохром P-450eryF каталізує гідроксилювання 6-дезоксирітронолід у еритронолід В, які є попередниками цього макролідного антибіотика [33] (рис. 2). У *S. erythraea* два цитохроми P-450, які кодуються різними генами (off405 і eryF), але тільки цитохром P-450 eryF бере участь у біосинтезі еритроміцину. Топографія цитохрому P-450 eryF аналогічна топографії цитохрому P-450cam, незважаючи на те, що тільки 19% амінокислотних залишків у молекулі збігається. Основні відмінності цих гемопротеїдів у тому, що відбувається зміна орієнтації в просторі спіралі В. У цитохромі P-450eryF ця спіраль розташована перпендикулярно гему, тому змінюється орієнтація активного центру ферменту. Відмічено, що ця зміна дає змогу зменшити константу зв'язування субстрату. Амінокислота треонін Thr-252, яка розташовується поблизу активного центру цитохромів, змінюється у цитохрому P-450eryF на Ala-245, а це, в свою чергу, впливає на просторове розташування активного



центру. У цитохрому P-450eryF існує "залом" у поліпептидній спіралі поблизу гему, який можливий завдяки молекулам води. Вона може замінювати треонін, як донора водневих зв'язків [6].

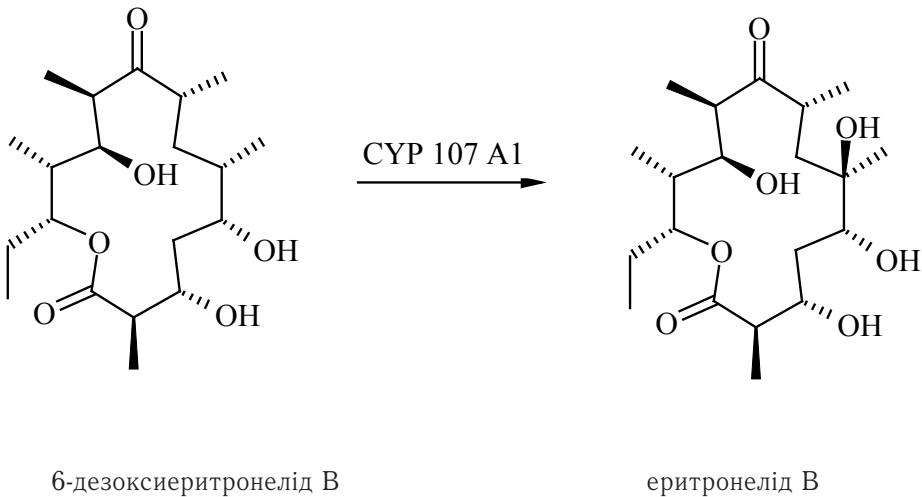


Рис. 2. Біосинтез попередника еритроміцину за допомоги CYP107 A1

Fig. 2. The biosynthetic step mediated by CYP107 A1 (eryF) in erythromycin biosynthesis

Інші представники роду *Streptomyces* синтезують близько двох третин природних антибіотиків і широкий спектр інших вторинних метаболітів. Це численні антибактеріальні препарати (наприклад, еритроміцин, тетрациклін), протипухлинні препарати (доксорубіцин), імунодепресанти (FK 506, рапаміцин), протипаразитарні агенти (авермектин, немадетин), протигрибкові препарати (амфотерицин, гризеофульвін, ністатин), серцево-судинні засоби (ловастатин). Ці природні сполуки відносяться до полікетидів, тому що їх молекули містять кілька карбонільних та/або гідроксильних груп відокремлених одна від одної метиленовим вуглицем (табл. 2).

У *Streptomyces griseolus* ATCC 11796 знайдені гени, що кодують два цитохром P-450 залежних фермента, які беруть участь у деградації похідних сульфосечовини. Ці сполуки є гербіцидами. Обидва ферменти індукуються сульфонілсечовиною та фенобарбіталом [23]. Інші цитохроми P-450 *Streptomyces* виявляють здатність до деметилювання гваяколу (*S. setonii*). *S. griseus* також за допомоги цитохрому P-450 здатні метаболізувати різні ксенобіотики [38].

Таблиця 2  
Роль цитохромів Р-450 у різних видів *Streptomyces* [14]Table 2  
The role of cytochrome P-450 in various species *Streptomyces* [14]

Вид	CYP P-450	Антибіотики	Активність
<i>S. griseus</i>	CYP105 D1, 105D2, 107F1	-	-
<i>S. griseolus</i>	CYP 105 A1, 105B1, 105C1	-	-
<i>S. carbophilus</i>	CYP105A3	-	-
<i>S. scerotialus</i>	CYP105 D3	-	-
<i>S. lividans</i>	CYP105 D4	-	-
<i>S. thermotolerans</i>	CYP107C1	-	-
<i>S. lavendulae</i>	CYP 105 F1, 107N1, 160A1	сомплестатин	анти-ВІЛ препарат
<i>S. tendae</i>	CYP105 K1, 162A1	нікоміцин	інсектицидний препарат
<i>S. fradiae</i>	CYP105L1, 113B1, 154B1	тілозин	ветеринарний антибіотик
<i>S. clavuligerus</i>	CYP105 M1	-	-
<i>S. venezuelae</i>	PikC (PicK)	пикроміцин	антибіотик
<i>S. erythraea</i>	CYP107A1	еритроміцин	антибіотик
<i>S. hygroscopius</i>	CYP107G1, 122A2, 122A3	рапаміцин	антибіотик
<i>S. antibioticus</i>	CYP107D1	олеандоміцин	антибіотик
<i>S. spheroides</i>	CYP163A1	новобіоцин	антибіотик
<i>S. maritimus</i>	CYP107R1	-	-
<i>S. peuretius</i>	CYP129A2, 131A1, 131.A2	даунорубіцин	протипухлинний антибіотик
<i>S. noursei</i>	CYP105H1, 161A1	ністатин	протигрибковий антибіотик
<i>S. nodosus</i>	Orf1, Orf2	амфотерицин	протигрибковий антибіотик
<i>S. acidscabies</i>	TxtC	тахтомін	фітотоксин
<i>S. avermitilis</i>	CYP171A1	авермектин	антипаразитарний антибіотик

- інформація відсутня



### Цитохром P-450 у мікобактерій

У родин мікобактерій знайдена велика кількість цитохромів P-450. Кількість цих гемопротеїнів у різних видів мікобактерій варіює у доволі широких межах. У *Mycobacterium tuberculosis* знайдено 20 різних видів цитохромів P-450 [14]. Тільки 12 із 20 ізоформ цитохромів P-450 знайдено у *M. smegmatis*. У *M. avium*, *M. avium* ssp. *Paratuberculosis* виявлено 40 ізоформ цитохрому P-450. Мікобактеріальні гени цитохромів P-450 складають близько 1% від усього геному роду мікобактерій [14]. У *M. leprae* знайдено тільки один цитохром P-450, який відсутній у *M. tuberculosis* і він має далеку спорідненість з цитохромами P-450 *M. smegmatis*. Крім того, у бактерій родини *Mycobacteriaceae* знайдено еукаріотні цитохроми P-450. Найбільш поширеною еукаріотною ізоформою гемопротеїну у *Mycobacteriaceae* є CYP51FX, який вірогідно був присутнім у предків актиноміцетів. Подібний феномен можна пояснити лише горизонтальним переносом генів та конвергентними еволюційними процесами. У геномі *M. tuberculosis* поряд з геном CYP51FX знаходиться ген ферредоксину. Подальші еволюційні процеси призвели до злиття цих генів. Подібну систему було знайдено у грамнегативних протеобактерій і метилотрофів. Тому у *Methylococcus capsulatus* ген цитохрому P-450 (CYP51FX) злитий з геном ферредоксину. Основною функцією цього гемопротеїну є синтез стеринів. Фермент носить назву 14 $\alpha$ -деметилаза [11].

Значна кількість ізоформ цитохромів P-450 у *M. tuberculosis* дозволяє цим прокаріотам бути стійкими до дії різних антибактеріальних агентів. При вивченні резистентності клінічних штамів *M. tuberculosis* до антибактеріальних препаратів та антибіотиків було встановлено, що рівень ізоформ цитохрому P-450 у резистентних до ізоніазиду та рифампіцину штамів у два рази вищий, ніж у чутливих до цих препаратів клінічних штамів *M. tuberculosis* [27].

Одним із перспективних напрямків у пошуку нових антибактеріальних препаратів є вивчення їх взаємодії з бактеріальними цитохромами P-450. Хімічні сполуки, які у своєму складі мають імідазольний фрагмент, здатні зв'язуватись з гемом цитохрому P-450, як шостий ліганд замість молекули води і тим самим блокувати ферментний каталіз. Ці препарати є конкурентними інгібіторами цитохромів P-450. Насамперед вони доволі відомі антигрибкові препарати, такі, як кетоконазол і флуконазол. Ці хімічні сполуки є інгібіторами ізоформи цитохрому P-450 (CYP51). Ця ізоформа гемопротеїну найбільш часто зустрічається у грибів, але існує і у *Mycobacteriaceae* та у роду *Streptomyces*. Тому деякі представники роду *Mycobacterium* чутливі до цих препаратів [14].

### Цитохроми P-450 архей

Цитохроми P-450 були виявлені у деяких архей (*Sulfolobus solfataricus*, *Thermus thermophilus* HB27). Досі не ясно, з'явилися ці гемопротеїни на пізніших етапах еволюції цитохромів P-450, чи вони виникли у них



на початку еволюційного процесу. Архейні цитохроми Р-450 важливі для використання у біотехнологічних процесах у зв'язку з високою термо- і баростабільністю. Якщо СУР101 *P. putida* зберігає стабільність білкової молекули при 54 °С, то СУР119 з *Sulfolobus solfataricus* зберігає стабільність білкової молекули при 91 °С. Крім того, архейний гемопротеїн не руйнується при дії тиску у 2 кбар. Термо- і баростабільність швидше за все досягається за рахунок збільшення гідрофобних та ароматичних залишків амінокислот, що зменшує кількість  $\alpha$ -спіралей. Цистеїн 317 зв'язаний з гемом і утворює тіолатний ліганд у п'ятому аксіальному положенні гему. Активний центр ферменту більш відкритий, ніж активні центри бактеріальних цитохромів [16].

У *Thermus thermophilus* HB27 був виділений термостабільний цитохром Р-450 (СУР175А1), який бере участь у метаболізмі  $\beta$ -каротиноїдів з утворенням зеаксантину ( $\beta$ ,  $\beta$ -каротин-3, 3'-діол). У структурі СУР175А1 дуже мало залишків ароматичних кислот на відміну від СУР119, а його термостабільність досягається за рахунок зниження загального розміру та зменшення лабільних залишків амінокислот, таких, як Asp, Gli, Cys [4].

### Цитохроми Р-450 у ціанобактерій

Найбільш древнім цитохромом Р-450 є гемопротеїн у ціанобактерій, який міг з'явитися у мезопротерозойський період протерозойської ери. На даний час, виявлено 35 цитохромів Р-450, а їх гени знайдені у 10 видів ціанобактерій. У них є дві великі родини цих гемопротеїнів СУР110 і СУР120 [13]. СУР 110 ціанобактерії *Anabaena sp. strain PCC 7120* індукується гексадеканом. При цьому рівень мРНК підвищується у 2 рази, а рівень СУР110 у клітинах зріс учетверо. Довголанцюгові насичені і ненасичені жирні кислоти мають велику спорідненість з активним центром цього гемопротеїну, тому вони є субстратами СУР110. На підставі зв'язування різних субстратів цитохрому Р-450, а також амінокислотних послідовностей цього гемопротеїну зроблено висновок, що СУР110 є  $\omega$ -гідроксилазою жирних кислот *Anabaena sp. strain PCC 7120*. Він, на відміну від інших бактеріальних цитохромів, зв'язаний з цитоплазматичною мембраною клітин ціанобактерій, а саме, у мезосомах і тому СУР110 більше нагадує еукаріотний цитохром Р-450 [37]. У родині ціанобактеріальних цитохромів (СУР120) існують чотири підродини. СУР120А1 виділено з *Synechocystis sp. PCC 6803*, СУР120А2 з *Trichodesmium erythraeum IMS101*, СУР120В1 і СУР120С1 з *Nostoc punctiforme PCC 73102*. Усі ці гемопротеїни беруть участь у метаболізмі ретинової кислоти [13]. Низка цитохромів Р-450 ціанобактерій беруть також участь у метаболізмі терпенів [2].

На підставі літературних даних, викладених у даній статті, можна зробити висновок, що компоненти системи бактеріальних цитохромів Р-450 є розчинними формами. Їх гіперекспресія призводить до значного збільшення концентрації цих гемопротеїнів у бактеріальних клітинах.



Таким чином, можна накопичити значні кількості цих компонентів, які використовуються для остаточного з'ясування механізмів активації молекулярного кисню та зробити припущення про короткоживучі проміжні форми гему. Подібні дослідження допоможуть у подальшому використовувати ці системи для потреб промисловості. Бактеріальні цитохроми P-450 завдяки своїй здатності брати участь у катаболізмі ксенобіотиків забезпечують бактеріям можливість використовувати ці чужорідні речовини як єдине джерело вуглецю і енергії. Крім того, бактеріальні цитохроми P-450 можна використовувати для синтезу фармацевтичних препаратів та необхідних органічних сполук.

Основні успіхи у вивченні гемопротеїнів пов'язані з сайт-спрямованим мутагенезом для зміни каталітичних властивостей бактеріальних цитохромів P-450.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Галкін Б.М., Філіпнова Т.О. Цитохроми P-450: I. Загальні і еволюційні аспекти // Мікробіол. і біотехнол. — 2010. — № 3. — С. 8—20.
2. Agger S.A., Lopez-Gallego F., Hoye Th.R., Schmidt-Dannert Cl. Identification of Sesquiterpene Synthases from *Nostoc punctiforme* PCC 73102 and *Nostoc* sp. Strain PCC 7120 // J. Bacteriol. — 2008. — V. 190, № 18. — P. 6084—6096.
3. Appleby C.A. A soluble haemoprotein P 450 from nitrogen-fixing *Rhizobium* bacteroids // Biochim. Biophys. Acta. — 1964. — V. 147, № 2. — P. 399—402.
4. Blasco F., Kauffmann I., Schmid R.D. CYP175A1 from *Thermus thermophilus* HB27, the first  $\beta$ -carotene hydroxylase of the P450 superfamily // Appl. Gen. and Mol. Biotech. — 2004. — V. 64, № 1. — P. 671—674.
5. Boddupalli S.S., Estabrook R.W., Peterson J.A. Fatty Acid Monooxygenation by Cytochrome P-450BMw3 // J. Biol. Chem. — 1990. — V. 265, № 8. — P. 4233—4239.
6. Cupp-Vickery J.R., Poulos T.L. Structure of cytochrome P-450eryF involved in erythromycin biosynthesis // Nature Struct. Biol. — 1995. — V. 2, № 2. — P. 144—152.
7. Gunsalus I.C., Wagner G.C. Bacterial P-450cam methylene monooxygenase components: cytochrome m, putidaredoxin and putidaredoxin reductase // Meth Enzymol. — 1978. — V. 52. — № 1. — P. 166—188.
8. Hasemann C.A., Ravichandran K.G., Peterson J.A., Deisenhofer J. Crystal structure and refinement of cytochrome P450terp at 2.3 Å resolution // J. Mol. Biol. — 1994. — V. 236, № 4. — P. 1169—1185.
9. Hedegaard J., Gunsalus I.C. Mixed Function Oxidation: IV. An induced methylene hydroxylase in camphor oxidation // J. Biol. Chem. — 1965. — V. 240, № 10. — P. 4038—4043.





10. *Huang J.J., Kimura T.* Studies on adrenal steroid hydroxylases. Oxidation-reduction properties of adrenal iron-sulphur proteins // *Biochem.* 1973. — V. 12, № 2. — P. 406–409.

11. *Jackson C.J., Lamb D.C., Marczylo T., Warrilow A.G., Manning N.J., Lowe D.J., Kelly D.E., Kelly S.L.* A novel sterol 14 $\alpha$ -demethylase/ferredoxin fusion protein (MCCYP51FX) from *Methylococcus cupsulutus* represents a new class of the cytochrome P450 superfamily // *J. Biol. Chem.* — 2002. — V. 277, № 45. — P. 46959–46965.

12. *Janssen D.B., Dinkla J.T., Terpstra P.* Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities // *Environ. Microbiol.* — 2005. — V. 7, № 12. — P. 1868–1882.

13. *Ke N., Baudry J., Makris T.M., Schuler M.A., Sligar S.G.* A retinoic acid binding cytochrome P450: CYP120A1 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2005. — V. 36, № 1. — P. 110–120.

14. *Kelly S.L., Lamb D., Jackson C.J., Warrilow A.G., Kelly D.E.* The Biodiversity of Microbial Cytochromes P450 // *Advan. Microbiol. Physiol.* — 2003. — V. 47, № 1. — P. 131–186.

15. *Kim D-H., Kim K-H., Jung H-C., Pan J-G., Yun Ch-H.* Generation of Human Metabolites of 7-Ethoxycoumarin by Bacterial Cytochrome P450 BM3 // *Drug Metabol. and Disposition* . — 2008. — V. 36, № 11 . — P. 2166–2170.

16. *McLean M.A., Maves S.A., Weiss K.E., Krepich Sc., Sligar1 St.G.* Characterization of a Cytochrome P450 from the Acidothermophilic Archaea *Sulfolobus solfataricus* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* — 1998. — V. 252, N 1. — P. 166–172.

17. *Miles J.S., Munro A.W., Rospendowski B.N., Smith W.E., McKnight J., Thomson A.J.* Domains of the catalytically self-sufficient cytochrome P-450 BM-3. Genetic construction, overexpression, purification and spectroscopic characterization // *Biochem. J.* — 1992. — V. 288, № 2. — P. 503–509.

18. *Munro A.W., Lindsay J.G., Coggins J.R.* Alkane metabolism by cytochrome P450 BM3 // *Biochem. Soc. Trans.* — 1993. — V. 21, № 4. — P. 412S.

19. *Munro A.W., Malarkey K., McKnight J., Thomson A.J., Kelly S.M., Price N.C., Lindsay J.G., Coggins J.R., Miles J.S.* The role of tryptophan 97 of cytochrome P450 BM3 from *Bacillus megaterium* in catalytic function. Evidence against the 'covalent switching' hypothesis of P-450 electron transfer // *Biochem. J.* — 1994. — V. 303, № 2. — P. 423–428.

20. *Munro J., Lindsay J.G.* Bacterial cytochromes P-450 // *Mol. Microbiol.* — 1996. — V. 20, № 6. — P. 1115–1125.

21. *Narhi L.O., Fulco A.J.* Characterization of a catalytically self-sufficient 1 19 000-Dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium* // *J. Biol. Chem.* — 1986. — V. 261, № 16. — P. 7160–7169.



22. *Narhi L.O., Wen L.-P., Fulco A.J.* Characterization of the protein expressed in *Escherichia coli* by a recombinant plasmid containing the *Bacillus megaterium* cytochrome P-450 BM-3 gene // *Mol. Cell. Biochem.* — 1988. — V. 79, № 1. — P. 63–71.
23. *O'Keefe D.P., Harder P.A.* Occurrence and biological function of cytochrome P-450 monooxygenases in the actinomycetes. // *Mol. Microbiol.* — 1991. — V. 5, № 8. — P. 2099–2105.
24. *Pike S.F., Shephard E.A., Rabin B.R., Phillips I.R.* Induction of cytochrome P-450 by phenobarbital is mediated at the level of transcription // *Biochem. Pharmacol.* — 1985. — V. 34, № 14. — P. 2489–2494.
25. *Poulos T.L.* Modeling of mammalian P-450s on basis of P-450cam X-ray structure // *Meth. Enzymol.* — 1991. — V. 206, № 1. — P. 11–30.
26. *Poulos T.L., Raag R.* Cytochrome P450cam: crystallography, oxygen activation, and electron transfer // *FASEB J.* — 1992. — V. 6, № 2. — P. 674–679.
27. *Ramachandran G., Gurumurthy P., Narayanan P.R., Mahadevan U.* Cytochrome P-450 in drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* // *J. Infect. Dis.* — 1995. — V. 171, № 10. — P. 954–960.
28. *Sakaki T., Sugimoto H., Hayashi K., Shiro Y.* Bioconversion of vitamin D to its active form by bacterial or mammalian cytochrome P450 // *Biochem. Biophys. Res. Commn.* — 2004. — V. 320, № 1. — P. 156–164.
29. *Sariaslani F.S., Rosazza J.P.* Microbial transformation of natural antitumor agents products of rotenone and dihydrorotenone transformation // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1983. — V. 49, № 2. — P. 451–452.
30. *Sariaslani F.S., Rosazza J.P.* Novel biotransformations of 7-ethoxycoumdrin by *Streptomyces griseus* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 1983. — V. 46, № 2. — P. 468–474.
31. *Sariaslani F.S., Eckenrode F.M., Beale J.M., Rosazza J.P.* Formation of a reactive iminium derivative by enzymatic and chemical oxidations of 16-O- acetylvindoline // *J. Med. Chem.* — 1984. — V. 27, № 6. — P. 749–754.
32. *Sasaki M., Akahira A., Matsumura Y.* Purification of Cytochrome P450 and Ferredoxin, Involved in Bisphenol A Degradation, from *Sphingomonas sp.* Strain AO1 // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2005. — V. 71, № 12. — P. 8024–8030.
33. *Shafiee A., Hutchinson C.R.* Purification and reconstitution of the electron transport components for 6- deoxyerythronolide B hydroxylase, a cytochrome P-450 enzyme of macrolide antibiotic (erythromycin) biosynthesis // *J. Bacteriol.* — 1988. — V. 70, № 4. — P. 1548–1553.
34. *Shaw G.C., Fulco A.J.* Inhibition by barbiturates of the binding of Bm3R1 repressor to its operator site on the barbiturate-inducible cytochrome P450BM-3 gene of *Bacillus megaterium* // *J. Biol. Chem.* — 1993. — V. 268, № 4. — P. 2997–3004.

35. *Sligar S.G., Filipovic D., Stayton P.S.* Mutagenesis of cytochromes P450cam and b5 // *Meth. Enzymol.* — 1991. — V. 206, № 1. — P. 31–49.

36. *Stayton P.S., Sligar S.G.* Cytochrome P-450cam binding surface defined by site-directed mutagenesis and electrostatic modeling // *Biochem.* — 1990. — V. 29, № 32. — P. 7381–7386.

37. *Torres S., Fjetland C.R., Lammers P.J.* Alkane-induced expression, substrate binding profile, and immunolocalization of a cytochrome P450 encoded on the *nifD* excision element of *Anabaena* 7120 // *BMC Microbiol.* — 2005. — V. 5, № 16. — P. 370–382.

38. *Trower M.K., Sariaslani F.S., O'Keefe D.P.* Purification and characterization of a soybean flour-induced cytochrome P-450 from *Streptomyces griseus* // *J. Bacteriol.* 1989. — V. 171, № 4. — P. 1781–1787.

**Б.Н. Галкин, Т.О. Филиппова, В.А. Иваниця**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЦИТОХРОМЫ P-450: II. СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ**

### **Реферат**

В статье представлен обзор современных научных публикаций, в которых приведены данные о молекулярной структуре, механизмах монооксигеназного катализа, генетике, систематике, эволюционном происхождении семейств бактериальных цитохромов P-450 и их биологических функциях. Проведён сравнительный анализ семейств бактериальных цитохромов P-450.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** бактериальные цитохромы P-450, монооксигеназы, гены CYP, НАДФН-цитохром P-450 редуктаза, ферредоксины, НАДН-ферредоксин редуктаза.



**B.M. Galkin, T.O. Filipova, V.O. Ivanytsia**

Odesa National Mechnykov University,  
2, Dvoryanska st., Odesa, 65082, Ukraine, e-mail: bgalkin@ukr.net

## **BACTERIAL CYTOCHROME P-450: II. STRUCTURE AND FUNCTIONS**

### **Summary**

The article presented the review of current scientific publications, which contains the data about the molecular structure, the mechanisms of monooxygenase catalysis, genetics, systematics, evolutionary origins of the families of bacterial cytochrome P-450 and their biological functions. The comparative analysis of the families of bacterial cytochrome P-450.

**Key words:** bacterial cytochrome P-450, monooxygenases, genes CYP, NADPH-cytochrome P-450 reductase, ferredoxine, NADH-ferredoxine reductase.

