

## МОДИФИКАЦИЯ АПОФЕРМЕНТА ЦИТОХРОМА P450 В ПРОЦЕССЕ ЕГО ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ САМОИНАКТИВАЦИИ В МОНООКСИГЕНАЗНОЙ РЕКОНСТРУИРОВАННОЙ СИСТЕМЕ.

В. Г. ЗГОДА, И. И. КАРУЗИНА, О. В. НИКИТЮК, А. И. АРЧАКОВ.

Институт биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул., 10; факс (095) 245-08-57.

Ключевые слова: цитохром P450, апофермент, самоинактивация, перекись водорода, монооксигеназные реакции.

Исследован механизм окислительной модификации апофермента цитохрома P450 в ходе каталитического цикла в монооксигеназной реконструированной системе.

Показано, что окислительная самоинактивация цитохрома P450 сопровождается снижением содержания SH-групп и образованием карбонильных групп на молекуле белка, изменением агрегатного состояния цитохрома P450 и полимеризацией гемопротейна под действием перекиси водорода.

Предполагается, что окислительная модификация гема и апофермента цитохрома P450 в ходе каталитического цикла является важным этапом в регуляции распада фермента в клетке.

Одним из основных направлений исследований в биохимии является изучение процессов метаболизма белков в организме. И если в вопросах синтеза белков мы обладаем значительным объемом информации, то другая сторона проблемы — катаболизм белков — остается пока недостаточно изученной. Среди многочисленных проблем деградации белков в клетке вопросы распознавания поврежденных белков эндогенными протеазами остаются на настоящий момент практически невыясненными.

Для некоторых белков установлено, что модификация их первичной, а следовательно и пространственной структуры под действием активных форм кислорода сопровождается повышением доступности молекул протеолитическим ферментам [1]. Структурные изменения в молекуле белка, повышая его гидрофобность, ведут к ускорению протеолитической деградации [2]. Однако до сих пор не ясна роль реакций окислительной модификации в регуляции распада гемсодержащих белков и, в частности, цитохромов P450, которые не только генерируют в каталитическом цикле активные формы кислорода, но и инактивируются под их действием [3].

Учитывая, что монооксигеназная система эндоплазматического ретикулула клеток печени выполняет в организме важную функцию по окислительной модификации низкомолекулярных соединений, самоинактивация цитохрома P450 может приводить к нарушению функции гидроксилирующих систем печени и, как следствие, вызывать изменения скорости и путей метаболизма ксенобиотиков, нарушения обмена холестерина, стероидных гормонов, жирорастворимых витаминов и других эндогенных субстратов, что может быть важным звеном в патогенезе различных заболеваний [4].

Настоящая работа посвящена исследованию механизмов модификации апофермента цитохрома P450 2B4 в процессе его окислительной самоинактивации в монооксигеназной реконструированной системе. В работе показано, что самоинактивация гемопротейна сопровождается окислительной модификацией апофермента цитохрома P450.

**Методика.** Высокоочищенный препарат цитохрома P450 2B4 получали по методу Карузиной и соавт. [5] с некоторыми модификациями аффинной хроматографии, предложенной Imai и Sato [6].

НАДФН-цитохром P450 редуктазу выделяли по методу Yasukuchj и Masters [7].

Мономеризацию цитохрома P450 2B4 и НАДФН-цитохром P450 редуктазы проводили по методу Бачмановой и соавт. [8].

Концентрацию цитохромов P450 измеряли на спектрофотометре "Hewlett Packard" 8451A (США) по дифференциальному спектру поглощения его восстановленного СО-комплекса при длинах волн 450 и 490 нм [9]. При расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции  $91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ .

Содержание белка измеряли по методу Lowry [10], используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

### Определение агрегатного состояния цитохрома P450

Молекулярную массу цитохрома P450 измеряли в процессе проведения гель-фильтрации на колонке Biosil Sec250 (0,75x60 см) фирмы "BioRad" (США). Колонку уравни-

вешивали 100 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0.025% эмульген 913 и наносили на колонку 50 мкл инкубационной смеси, содержащей 3,3 мкМ цитохром Р450. Элюцию проводили при постоянной скорости тока 0,5 мл/мин. Содержание белка в элюате регистрировали методом постколоночной модификации с ортофталевым альдегидом, с последующим измерением флюоресценции: смешивание элюента ортофталеевого альдегида (реактив "Fluor" фирмы "Beckman") происходило в постколоночном реакторе (диаметр 0614 мм, общий объем 0,3 мл) в соотношении 5:1, соответственно. Через 30 сек после смешивания флюоресценцию регистрировали на флюориметре "Shumadzu" (Япония) с проточной кюветой при длине волны возбуждения 340 нм и испускания 455 нм.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) проводили в присутствии SDS по методу Laemmli [11]. Окраску гелей азотнокислым серебром проводили по методу Blum и соавт. [12].

#### **Определение содержания карбонильных групп**

Образование карбонильных групп регистрировали по методу Levine и Federici. [13].

Определение содержания групп проводили с использованием пиренмалеимида в качестве флюоресцирующей метки с последующим применением метода пептидного картирования [14].

Данные по инаktivации цитохрома Р450 2В4 — результат типичного эксперимента, который проводили не менее 3 раз на различных препаратах гемопroteина и НАДФН-цитохром Р450 редуктазы.

### **1. Изменение агрегатного состояния цитохрома Р450 2В4 при его инаktivации в монооксигеназной реконструированной системе.**

Согласно данным литературы, при концентрации эмульгена 913, равной 0.25 г/л, цитохром Р450 присутствует в растворе в виде мономеров и сохраняет свои каталитические свойства [8]. Однако присутствие детергента в элюирующем буфере затрудняет регистрацию поглощения белка в области 200-280 нм вследствие большого фонового значения поглощения буфера. Поэтому для регистрации профиля разделения компонентов монооксигеназной системы был использован метод постколоночной модификации  $\text{NH}_2$ -групп белка ортофталевым альдегидом с последующей регистрацией флюоресценции.

Как видно из рис. 1, в процессе инаktivации цитохром Р450 изменяет свое агрегатное состояние. При этом уменьшение площади пика, соответствующего нативному мономерному цитохрому Р450, сопровождалось образованием агрегатов белка с молекулярными массами 95 — 300 и более кДа, общая площадь пиков хроматограммы в процессе инаktivации Р450 не изменялась. На рис. 2 показана зависимость между инаktivацией цитохрома Р450 в монооксигеназной системе в процессе окисления бензфетамина и агрегацией цитохрома Р450. Как видно из графика, процессы инаktivации и уменьшение содержания белка в области 50 кДа проходили параллельно. Введение в инкубационную среду каталазы в одинаковой степени замедляло как инаktivацию, так и агрегацию цитохрома Р450 (рис.2). Корреляция между процессами самоинаktivации цитохрома Р450 и его агрегации, а также одинаковое ингибирующее действие каталазы на эти процессы указывает на единый механизм их возникновения.

Исходя из приведенных выше результатов, можно предположить два механизма образования агрегатов в результате инаktivации цитохрома Р450. Первый — за счет изменения физико-химических свойств апофермента, как следствие окислительной модификации аминокислот, которая может вести к изменению поверхностного заряда фермента, увеличению гидрофобности при денатурации белка. Второй механизм — это образование межмолекулярных ковалентных сшивок [15].

Подтверждением изменения физико-химических свойств белка являются данные, полученные при хроматографическом разделении компонентов монооксигеназной системы на ионнообменной DEAE колонке. Как видно из рис. 3, при хроматографии компонентов монооксигеназной реконструированной системы в начальный момент инкубации цитохром Р450 не связывался с носителем и элюировался в свободном объеме колонки. В процессе инаktivации цитохрома Р450 наблюдалось появление новой белковой фракции. Скорость образования новой фракции коррелировала со скоростью инаktivации цитохрома Р450.

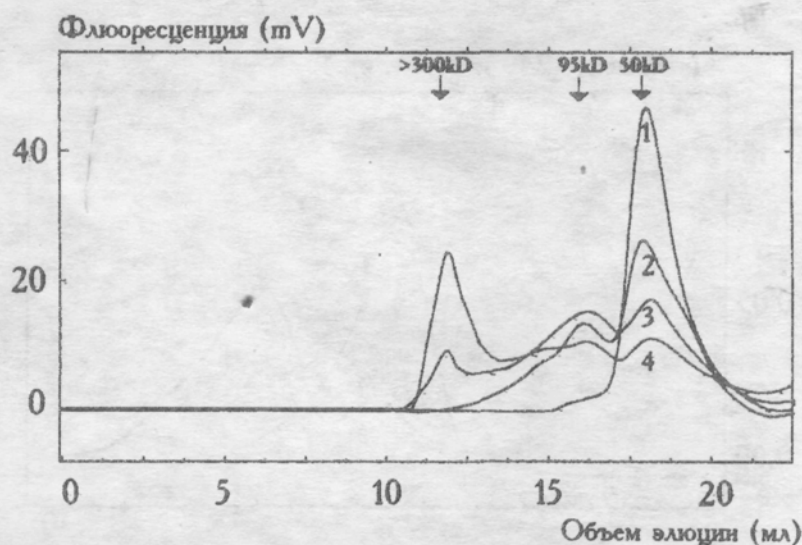


Рис. 1. Гель-проникающая ВЭЖХ нативного (1) и инактивированного в МРС цитохрома P450 в течение четырех (2), восьми (3) и двадцати четырех (4) часов. Хроматографию проводили на колонке BioSil Sec250 уравновешенную 100 мМ натрий-фосфатным буфером, pH 7,4, содержащим 0,25% эмульген 913, при скорости элюции 1 мл/мин. Регистрацию профиля разделения проводили с использованием метода постколоночной модификации  $\text{NH}_2$ -групп с ортофталевым альдегидом и последующей регистрацией флюоресценции.

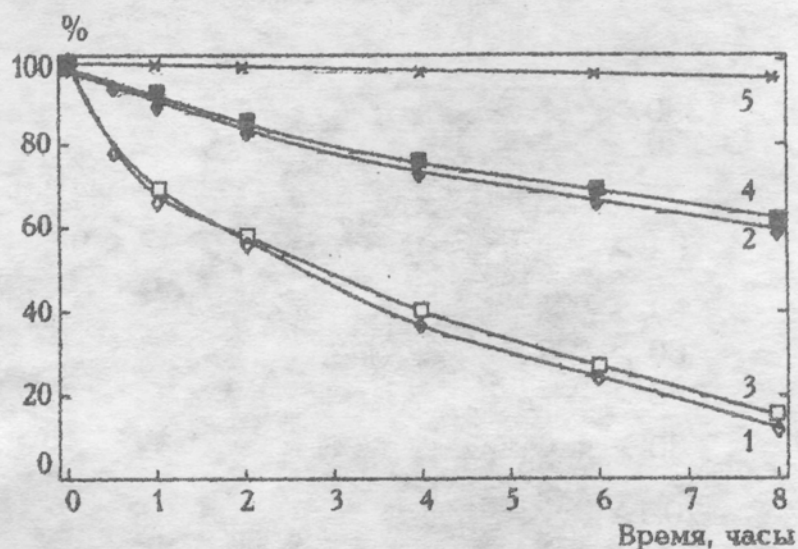


Рис. 2. Корреляция между агрегацией цитохрома P450 2B4 и его инактивацией в МРС.  
1 — Изменение содержания цитохрома P450 2B4 регистрируемое по CO— дифференциальному спектру поглощения ( $\diamond$ ); 2 — то же в присутствии каталазы ( $\blacklozenge$ );  
3 — Уменьшение площади пика в области 50 кДа. ( $\square$ ); 4 — то же в присутствии каталазы ( $\blacksquare$ ); 5 — Суммарная площадь пиков с молекулярными массами более 5 кДа ( $\times$ ).

С целью выяснения возможности образования ковалентных межмолекулярных сшивок были проведены исследования с использованием SDS-PAGE. Как видно из рис. 4, истощение полосы, соответствующей цитохрому P450 2B4, сопровождается образованием белковых полимеров с молекулярными массами 94 и 178 кДа. Сравнение скоростей образования полимеров со скоростью инактивации цитохрома P450 показало отсутствие корреляции между этими процессами (рис. 5). Так, к восьми часам работы монооксигеназной системы инактивировалось 85% цитохрома P450, в то время как уменьшение площади пика в области 50 кДа не превышало 40%.



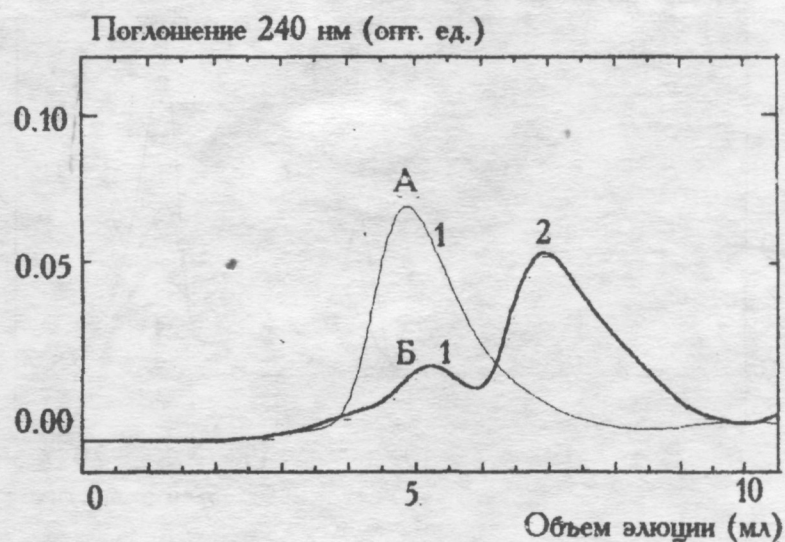


Рис. 3. Ионнообменная DEAE-ВЭЖХ нативного (А) и инактивированного (Б) в МРС цитохрома Р450 2В4. Фракции 1 и 2 содержали нативный и инактивированный цитохромы Р450 соответственно. Хроматографию проводили на колонке TSK DEAE, уравновешенную 100 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 7,4, содержащим 0,25% эмульген 913, при скорости элюции 0,5 мл/мин.

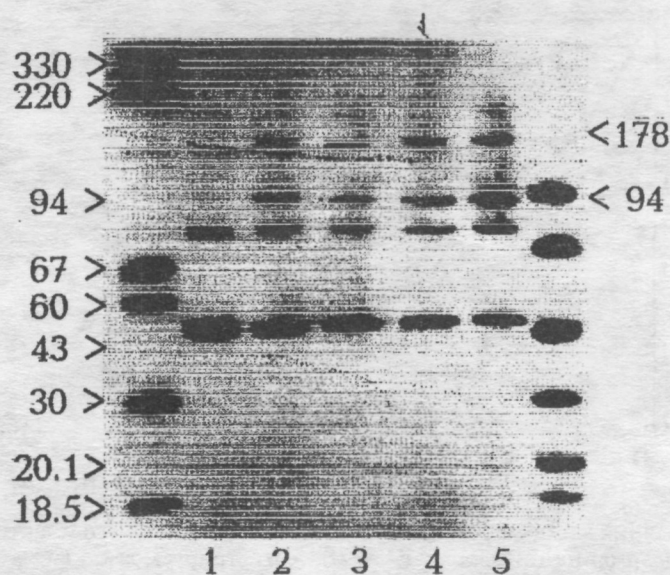


Рис. 4. ДСН-ПААГ электрофорез нативного (1) и инактивированного в течение двух (2), четырех (3), шести (4) и восьми (5) часов цитохрома Р450.

Низкая скорость образования межмолекулярных ковалентных сшивок между агрегатами свидетельствует в пользу вторичности этого процесса и предполагает, что в модификацию апофермента цитохрома Р450 вовлечены неспецифические радикальные процессы. Данные, полученные в присутствии каталазы, которая замедляла процесс образования межмолекулярных ковалентных слинков на 75% (рис. 5, кривая 4), указывают на то, что  $H_2O_2$  участвует в полимеризации гемопротеина.



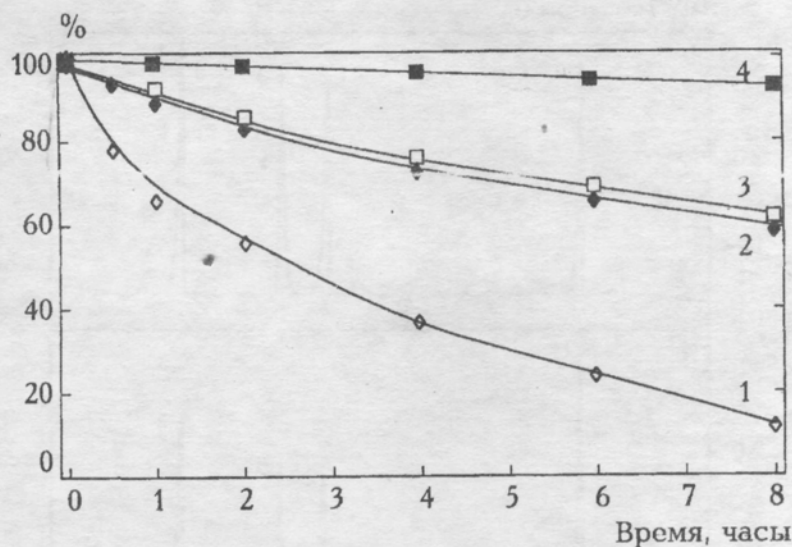


Рис. 5. Зависимость между скоростью образования ковалентных межмолекулярных сшивок и инактивацией цитохрома P450 2B4 в МРС. 1 — Изменение содержания цитохрома P450 2B4 регистрируемое по CO — дифференциальному спектру поглощения (—◇—), 2 — то же в присутствии каталазы (—◆—); 3 — Уменьшение площади пика в области 50 кДа. (—□—); 4 — то же в присутствии каталазы (—■—);

Изменение агрегатного состояния, поверхностного заряда и явление полимеризации указывают, что, в процессе окислительной самоинактивации цитохрома P450 2B4 изменяется его пространственная организация. Конформационные изменения белка могут быть вызваны различными причинами, в том числе и в результате модификации аминокислот. Поэтому с целью определения возможных изменений в первичной структуре гемопroteина были проведены исследования содержания SH- и карбонильных групп в процессе инактивации P450.

## 2. Изменения в первичной структуре цитохрома P450 2B4 при его инактивации в МРС

Исследование возможности модификации SH-групп проводилось с использованием комбинации методов пептидного картирования и измерения уровня флюоресценции SH-групп, меченых пиренмалеимидом [14]. Несколько усложненная схема измерения содержания SH-групп обусловлена присутствием в исходных препаратах цитохрома P450 дитиотреитола (ДДТ), который используется при выделении гемопroteина.

Обработка компонентов монооксигеназной системы 10-кратным избытком пиренмалеимида в расчете на SH-группу с последующим гидролизом белка лизилэндопептидазой и разделением пептидов с использованием RP-ВЭЖХ позволила не только измерить содержание SH-групп, но и локализовать их.

Как видно из рис. 6, при разделении гидролизата цитохрома P450 было получено четыре флюоресцирующих пика. В процессе инактивации цитохрома P450 наблюдается снижение содержания SH-групп белка в этих фракциях. Общая площадь флюоресцирующих пиков уменьшалась за 3 часа на 38% и за 6 часов на 60% от их исходного содержания. При этом уровень флюоресценции 1-го пика в течение всего срока инактивации оставался постоянным, а флюоресценция трех остальных убывала со скоростью, равной скорости инактивации цитохрома P450. Так, через 3 и 6 часов инактивации суммарная площадь 2, 3 и 4-го пиков уменьшалась до 50% и 20%, соответственно. Исследования инактивации, проведенные в отсутствие бензфетаминa, не показали принципиальных различий с экспериментальными, проведенными в присутствии субстрата. Как и в этом случае, свободное окисление НАДФН сопровождалось снижением уровня флюоресценции тех же трех пептидов, при этом большая скорость инактивации цитохрома P450 сопровождалась более быстрым уменьшением площади пиков.

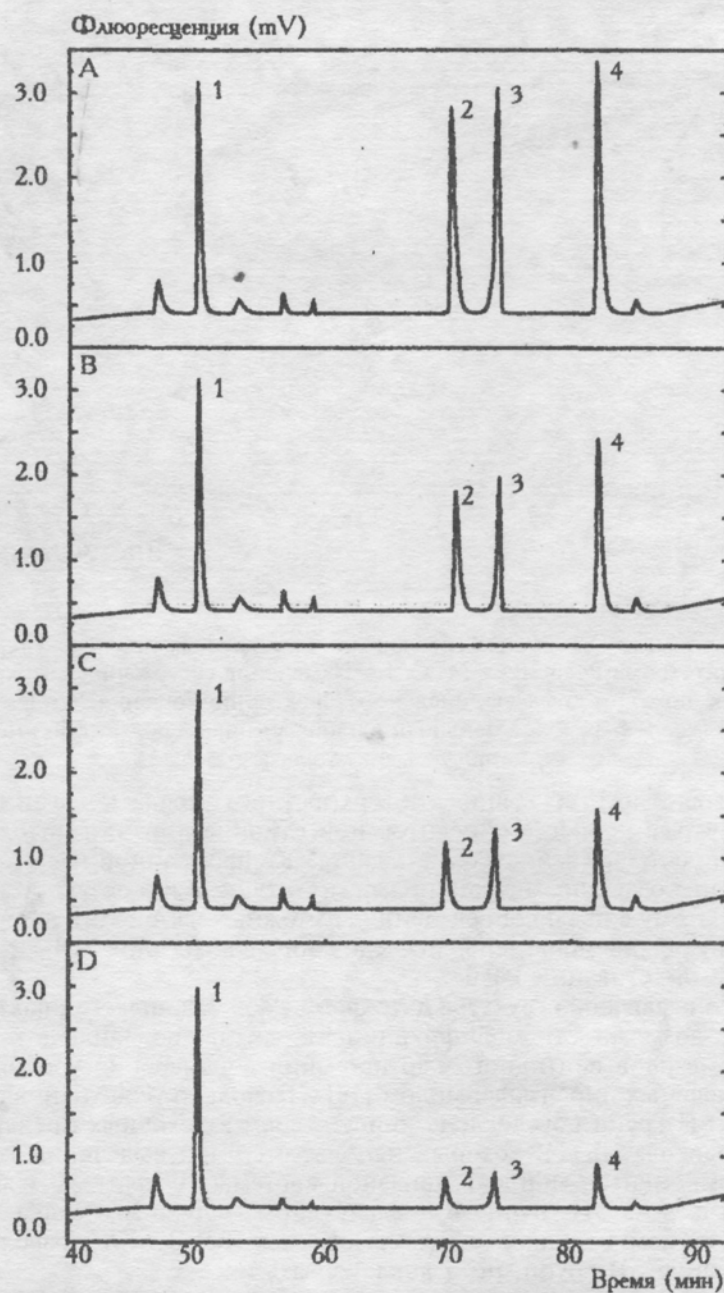


Рисунок 6. Содержание SH-групп в молекуле нативного и инактивированного цитохрома P450, измеренное методом пептидного картирования. А — 0 часов инактивации; Б — после 3 часов инактивации; В — после 6 часов инактивации, Г — 6 часов инактивации в отсутствие бензфетамина.

На рис. 7 представлены результаты измерения содержания карбонильных групп белка, образующихся в процессе инактивации цитохрома P450. Как видно из хроматограмм, через 6 часов инактивации наблюдается значительное увеличение содержания карбонильных групп белка, причем наибольший их прирост происходит за счет высокомолекулярной фракции (100 кДа и более) полимеризованного белка. Каталаза ингибировала процесс образования карбонильных групп на 35%.

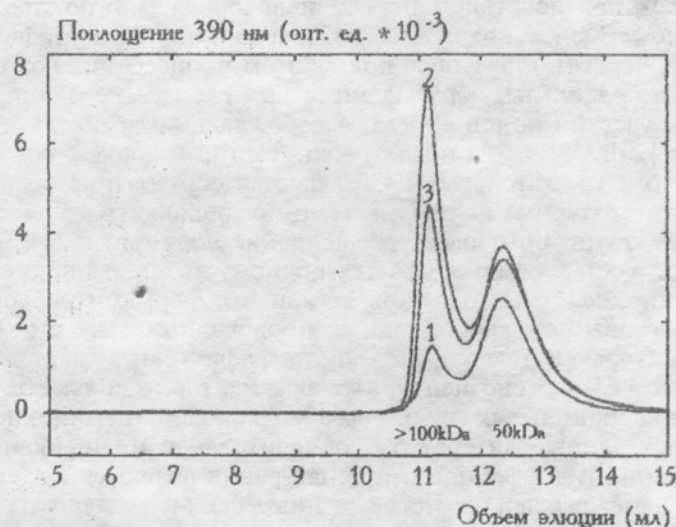


Рисунок 7. Изменение содержания карбонильных групп в процессе окислительной инактивации цитохрома P450 2B4 в МРС регистрируемое методом гель-проникающей хроматографии. 1. Контроль 2. 6 часов инактивации в МРС без каталазы. 3. 6 часов инактивации в МРС в присутствии каталазы

Таким образом, в процессе окислительной самоинактивации цитохрома P450 происходит модификация SH-групп цистеина и появляются карбонильные группы на молекуле гемопротейна.

**Обсуждение результатов.** Высокая степень корреляции между процессами самоинактивации цитохрома P450, агрегации гемопротейна и модификации его SH-групп, а также одинаковое ингибирующее действие каталазы на эти процессы указывает на единый механизм их возникновения. Среди причин, вызывающих агрегацию цитохрома P450, можно предположить окислительное действие перекиси водорода на боковые цепи аминокислот (по крайней мере, на SH-группы цистеинов), которое приводит к изменению физико-химических свойств белка. Как было показано ранее Devies и соавт., окислительное действие активных форм кислорода на различные классы белков выражается в модификации аминокислот, среди которых Cys, Trp, Tyr, His наиболее подвержены действию кислородных радикалов [16]. Окислительная модификация аминокислот, по мнению тех же авторов, ведет к изменению ряда физико-химических показателей белков, а в частности, к увеличению их гидрофобности и образованию агрегатов белков [17]. По нашему мнению, кроме гидрофобных сил, участвующих в образовании агрегатов цитохрома P450, необходимо учитывать также и ионные взаимодействия между поврежденными молекулами. Исходя из наших данных, показывающих увеличение времени выхода инактивированного цитохрома P450 при разделении на DEAE колонке, можно предположить, что происходит изменение поверхностного заряда гемопротейна. В результате изменения заряда белка могут возникать дополнительные ионные взаимодействия, участвующие в агрегации белка.

Кроме непосредственного окислительного действия перекиси водорода на апофермент цитохрома P450, необходимо отметить возможность изменения пространственной структуры белка в результате потери гема. Этот процесс также связан с действием  $H_2O_2$ , однако, по нашему мнению, потеря гема может являться результатом модификации SH-группы цистеина 436, который, согласно литературным данным, является 5-ым аксиальным лигандом гема для цитохромов P450 [18]. Потеря гема цитохромом P450, как показывают данные, полученные Уваровым и соавт., ведет к изменению конформации белка, что также может быть причиной образования агрегатов за счет гидрофобных и ионных взаимодействий [19].

Низкая скорость образования межмолекулярных сшивок между агрегатами указывает на вторичность этого процесса. Данные, полученные нами при исследовании процесса полимеризации в присутствии каталазы, которая в значительной степени ингибировала этот процесс, указывают, что  $H_2O_2$  вовлечена в образование межмолекулярных ковалентных сшивок. Исходя из литературных данных о возможности полимериза-



ции гемопротеинов под действием перекиси водорода, можно предположить, что в модификацию апофермента цитохрома P450 вовлечены неспецифические радикальные реакции [14]. Вероятно, ведущую роль в этом процессе играют высоко реакционные гидроксильные радикалы, образующиеся при распаде перекиси водорода в реакции Фентона при участии ионов железа, освобождающихся при распаде гема, в качестве катализатора [20]. Одним из показателей участия гидроксильных радикалов в модификации апофермента цитохрома P450 является образование карбонильных групп. Основываясь на литературных данных, можно предположить два механизма образования карбонильных групп. Во-первых, расщепление полипептидной цепи под действием гидроксильных радикалов по альфа-углеродному атому аминокислот и, во-вторых, модификация аминокислотных остатков активными формами кислорода, которая сопровождается образованием карбонильных производных этих аминокислот [16, 20]. Поскольку ни электрофоретически, ни хроматографически в ходе инактивации цитохрома P450 не было обнаружено пептидных фрагментов, наиболее вероятным кажется путь образования карбонильных групп через модификацию аминокислотных остатков.

Как показывают данные литературы, окислительная модификация белков и, как следствие, увеличение гидрофобности и денатурация являются сигналом для эндогенных протеаз, которые, расщепляя поврежденные белки, удаляют их из клетки [21].

Таким образом, окислительная модификация цитохрома P450 в монооксигеназных реакциях может быть начальной стадией в процессе его распада в клетке, и выяснение молекулярных механизмов этой реакции открывает новые возможности для понимания путей обновления белков в клетке.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oliver C. N. // Arch. Biochem. Biophys. 1987. V. 253. P. 62-72.
2. Pacifici R. E., Kono Y., Davies K. J. A. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268, P. 15405-15411.
3. Karuzina I. I., Archakov A. I. // Free Rad. Biol. & Med. 1994. V. 16, P. 73-97.
4. Карузина И., Арчаков А. // Вестник АМН СССР, 1987. Т. 7, С. 60-67.
5. Карузина И., Бачманова Г., Менгазетдинов Д. // Биохимия. 1979. Т. 44. С. 1049-1057.
6. Imai Y., Sato R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. V. 60. P. 8-14.
7. Yasukuchj. Y., Masters B. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 5337-5344.
8. Bachmanova G., Scotselyas E., Kanaeva I., Kuznetsova G., Gordeev S., Korneeva E., Karyakin A., Archakov A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. V. 139. P. 883-888.
9. Omura T., Sato R. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. P. 2379-2385.
10. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
11. Laemmli U. // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.
12. Blum H., Beier H., Gross H. // Electrophoresis. 1987. V. 8. P. 93-99.
13. Levine R. L., Federici M. M. // Biochemistry. 1982. V. 21. P. 2600-2606.
14. Weltman J.K., Szaro R.P., Frackelton A.R., Dowben R.M., Bunting J.R., Cathou R.E. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. P. 3173-3177.
15. Rice R.H., Lee M., Brown W.D. // Arch. Biochem. Biophys. 1983. V. 221. P. 417-427.
16. Davies. K.J.A., Delsignore M.E., Lin S.W. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 9902-9907.
17. Davies K.J.A., Delsignore M. E. // J. Biol. Chem. 1987. V. 262. P. 9908-9913.
18. Black S.D., Coon M.J. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1985. V. 128. P. 82-89.
19. Уваров В.Ю., Третьяков В.Е., Кузнецова Г.П., Арчаков А.И. // Биохимия. 1990. Т. 55, С. 126-133.
20. Zingler J.S., Jernigan H.M., Garland D., Reddy V.N. // Arch. Biochem. Biophys. 1985. V. 241. P. 163-172.
21. Oliver C.N., Wittenberg. M.E., Stadtman E.R. // Cellular Regulation in Malignant Growth / Ed. Ebashi S. Tokyo; Berlin: Japan Scientific Societies Press / Springer-Verland, 1985. P. 320-331.

Авторы выражают благодарность Кoenу Я.М., Кузнецовой Г.П. Саменковой Н.Ф. за предоставленные препараты очищенных белков.

#### MECHANISM OF P450 APOENZYME OXIDATIVE MODIFICATION DURING CATALYTIC TURNOVER HAVE BEEN STUDIED IN MONOOXYGENASE RECONSTITUTED SYSTEM.

B.G.Zgoda, J.J.Karusina. O.W.Nikituk, A.J.Archakov

Institute of Biomedical Chemistry of RAMS, Pogodinskaya st.10 Moscow 119832, Russia

The hemoprotein self-inactivation is accompanied by oxidation of all-groups, carbonyl group formation, changes in aggregate state and apoenzyme polymerization.

It is probable that heme loss and oxidative modification of apoenzyme is an important step in regulation of P450 decay in cell.