

САМОИНАКТИВАЦИЯ ЦИТОХРОМА P450 2B4 В ХОДЕ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ЦИКЛА В МОНООКСИГЕНАЗНОЙ РЕКОНСТРУИРОВАННОЙ СИСТЕМЕ.

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

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

Изучен механизм самоинактивации цитохрома P450 в ходе каталитического цикла. Исследования проводились в мономерной реконструированной системе, состоящей из очищенных белков: цитохрома P450 2B4, НАДФН-цитохром P450 редуктазы и цитохрома b5 в присутствии детергента эмульген 913.

Показано, что цитохром P450 самоинактивируется с высокой скоростью в процессе окисления бензфетамина под действием перекиси водорода, которая образуется в результате разобщения монооксигеназного цикла.

Исследование механизма обесцвечивания цитохрома P450 показало, что окислительная самоинактивация гемопroteина сопровождается потерей гема с последующим его разрушением под действием перекиси водорода, накопленной в инкубационной среде.

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

Введение. Микросомальная монооксигеназная система, локализованная в эндоплазматической сети клеток печени выполняет в организме важную функцию по окислительной модификации неполярных физиологически активных веществ, как поступающих в организм извне — ксенобиотиков, так и образующихся в клетке: холестерина, стероидные гормоны, жирные кислоты, простагландины и т. д. [1]. В процессе некоторых из этих реакций цитохром P450 может самоинактивироваться как реакционноспособными метаболитами субстратов, так и продуктами неполного восстановления кислорода (O_2^- , H_2O_2 , *OH), которые, как правило, появляются в результате неполного сопряжения основного каталитического цикла цитохрома P450 [2, 3].

Механизм инактивации цитохрома P450 активными интермедиатами, которые образуются в реакциях окисления суицидных субстратов, исследован в достаточной мере подробно. В его основе лежит модификация гема, реже апофермента [4, 5].

Второй путь, являющийся следствием разобщенности монооксигеназных реакций, исследован в гораздо меньшей степени. Ранние исследования, проведенные Loosemore и соавт. и Guengrich показали, что инактивация цитохрома P450 является НАДФН- и кислород-зависимой реакцией и сопровождается обесцвечиванием гемопroteина [6, 7]. Известно, что в инактивацию цитохрома P450 вовлечены продукты неполного восстановления кислорода, которые образуются при распаде окси- и пероксикомплексов цитохрома P450 [8]. Основным продуктом разобщения монооксигеназных реакций является перекись водорода, которая может образовываться при распаде пероксикомплекса (прямой путь образования H_2O_2), а также в результате дисмутации супероксидных радикалов, образующихся при распаде оксикомплекса цитохрома P450 (непрямой путь образования H_2O_2) [9, 2].

Настоящая работа посвящена исследованию механизмов самоинактивации цитохрома P450 2И4 в процессе его функционирования. Исследования проводились в монооксигеназной реконструированной системе, состоящей из мономеров цитохрома P450 2В4, НАДФН-специфичного флавопротеина и цитохрома b5 в присутствии детергента эмульгена 913 [10]. В работе показано, что самоинаktivация цитохрома P450 происходит под действием перекиси водорода и сопровождается модификацией гема.

Методика. Выделение цитохрома P450 2В4. Высокоочищенный препарат цитохрома P450 2В4 получали по методу Карузиной и соавт. [11] с некоторыми модификациями аффинной хроматографии, предложенной Imai и Sato [12].

НАДФН-цитохром P450 редуктазу выделяли по методу Yasukuchi и Masters [13].

Мономеризацию цитохрома P450 2В4 и НАДФН-цитохром P450 редуктазы проводили по методу Бачмановой и соавт. [10].

Концентрацию цитохромов P450 и b5 измеряли на спектрофотометре "Hewlett Packard" 8451A (США) по дифференциальному спектру поглощения его восстановленного СО-комплекса при длинах волн 450 и 490 нм [14]. При расчетах использовали коэффициенты молярной экстинкции 91 и 165 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, соответственно.

Скорость реакции N-деметилирования бензфетамина в мономерной реконструированной системе измеряли по накоплению конечного продукта реакции — формальдегида [15].

Концентрацию перекиси водорода измеряли тиоцианатным методом [16].

Содержание общего гема определяли пиридингемохромогеновым методом [14].

Содержание гема, связанного с цитохромом P450, измеряли методом гель-проникающей высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке BioSil Sec250 фирмы "BioRad", США. Содержание гема в элюате регистрировали с помощью спектрофотометра с проточной кюветой фирмы Waters при 418 нм.

Содержание белка измеряли по методу Lowry и соавт., используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [17].

Данные по инаktivации цитохрома P450 2В4 — результат типичного эксперимента, который проводили не менее 3 раз на различных препаратах гемопротеина и НАДФН-цитохром P450 редуктазы.

Результаты и обсуждение. 1. *Инаktivация цитохрома P450 2В4 в монооксигеназной реконструированной системе.*

В работе исследовалась роль перекиси водорода в самоинаktivации цитохрома P450 2В4 в монооксигеназной реконструированной системе (МРС), состоящей из мономеров цитохрома P450 2В4 и НАДФН-специфичного флавопротеина в присутствии детергента эмульгена 913. Как видно из данных, приведенных на рис. 1, скорость инаktivации цитохрома P450 2В4 в МРС зависит от соотношения белков-переносчиков. Цитохром P450 инаktivировался с более высокой скоростью в системе, где соотношение гемопротеина и флавопротеина было равно 1:1. В этом случае уже после 20 минут инкубации при 30 °C цитохром P450 инаktivировался на 70%.

Уменьшение концентрации НАДФН-зависимого флавопротеина в 20 раз, при которой соотношение белков-переносчиков становилось приблизительно таким же, как в микросомальной мембране, приводило к замедлению инаktivации фермента. В этом случае содержание цитохрома P450 снижалось на 85% лишь через 8 часов после начала реакции. Содержание цитохрома P450 в отсутствие НАДФН уменьшалось через 8 часов инкубации не более чем на 10% (рис. 1, кривая 1), что свидетель-

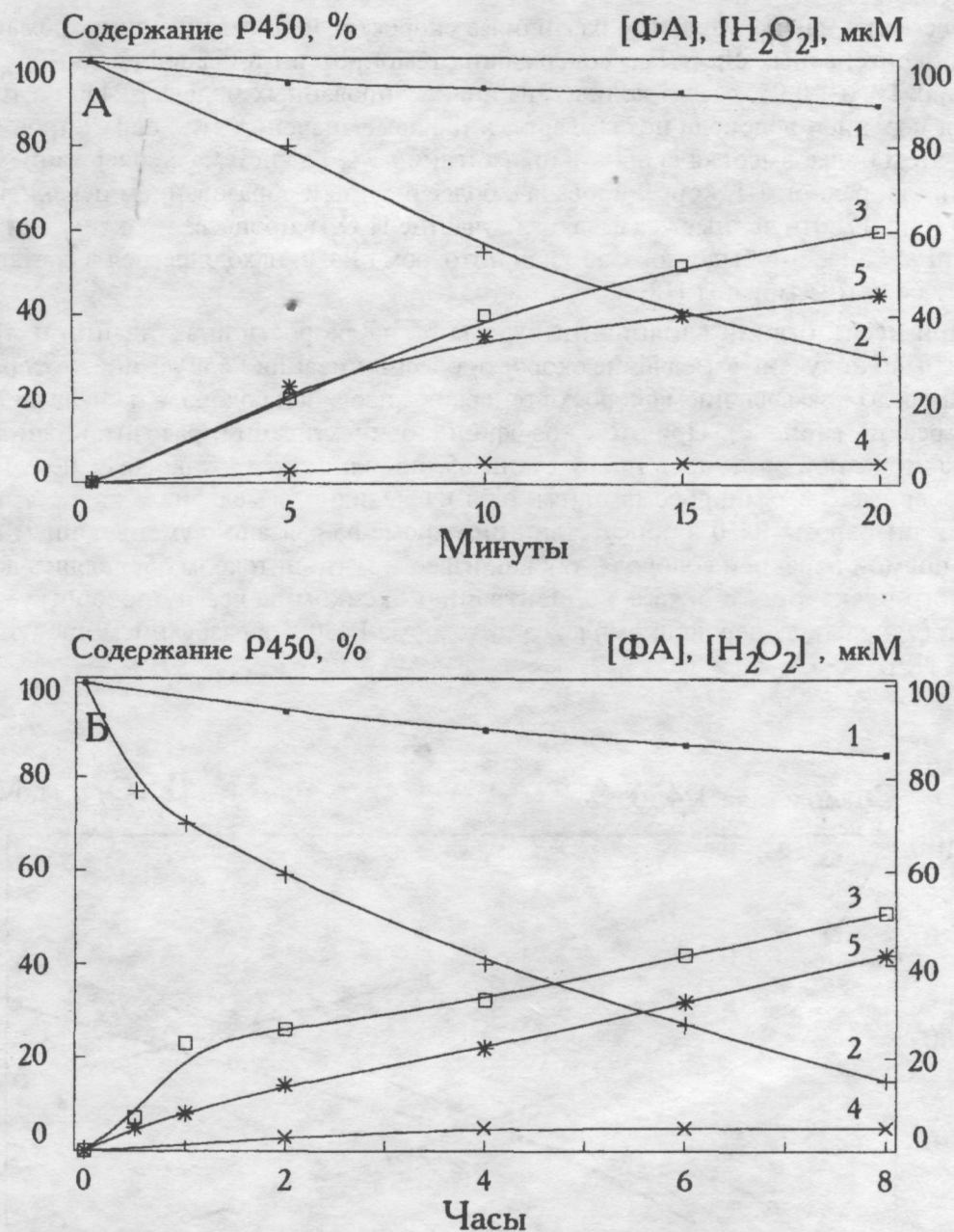


Рис. 1. Инактивация цитохрома Р450 2В4 в монооксигеназной реконструированной системе при соотношении цитохрома Р450 и НАДФН-специфичного флавопротеина 1:1 (А) и 1:0.05 (Б).

Р 450 (-НАДФН) (1); Р450 (+НАДФН) (2); Н₂О₂ (+НАДФН) (3); Н₂О₂ (-НАДФН) (4); Формальдегид (ФА).

ствовало о том, что инактивация гемопротеина в МРС является НАДФН-зависимой реакцией. Инактивация цитохрома Р450 коррелировала со скоростью образования перекиси водорода (рис. 1, кривая 3) и сопровождалась снижением бензфетамин гидроксиплазменной активности (рис. 1, кривая 5).

Несмотря на значительные различия в скоростях инактивации цитохрома P450 в монооксигеназных системах, содержащих гемопротейн и флавопротеин в соотношениях 1:1 и 1:0,05, расчет количества инаktivированных молекул P450 на 1000 молекул перекиси водорода показывает одинаковые значения этих параметров (табл.). При этом более высокая скорость инаktivации P450 в системе с содержанием переносчиков, равной 1:1, коррелировала с более быстрым образованием перекиси водорода (рис. 1). Эти данные указывают на участие H_2O_2 в процессе инаktivации гемопротейна. Ранее это было показано для цитохрома P450, находящегося в составе микросомальной мембраны [18].

При исследовании влияния цитохрома b5 на скорость инаktivации цитохрома P450 было получено замедление скорости обесцвечивания P450 на 30%, которое коррелировало с замедлением скорости генерации перекиси водорода на начальном участке реакции (рис. 2). При этом коэффициент инаktivации, рассчитанный для монооксигеназной системы в присутствии b5, приближается к таковому, полученному в экспериментах с микросомами (см. табл.). Очевидно, замедление скорости инаktivации цитохрома P450 в присутствии цитохрома b5 связано с уменьшением генерации прямой перекиси водорода, так как известно, что цитохром b5, являясь донором второго электрона, снижает концентрацию оксикомплекса и способствует более быстрому распаду пероксиомплекса цитохрома P450 с образованием продукта, а не H_2O_2 [19].

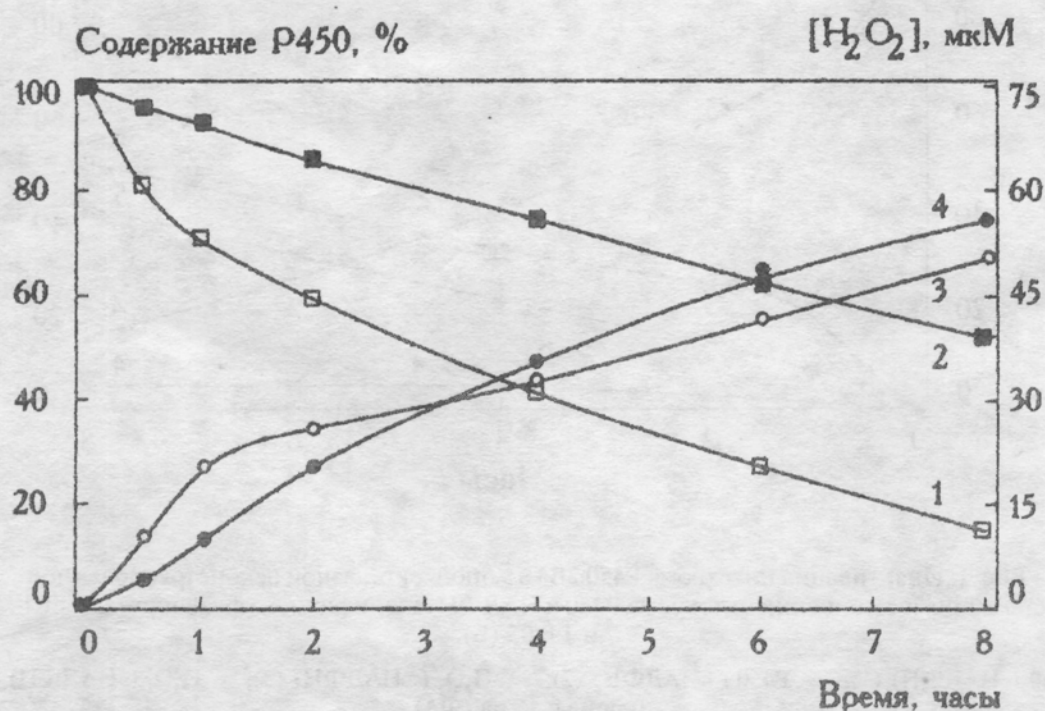


Рис. 2. Изменение содержания цитохрома P450 2B4 и накопления перекиси водорода в монооксигеназной реконструированной системе в присутствии и отсутствии b5.

содержание P450 без b5 (1); то же в присутствии b5 (2).
концентрация H_2O_2 без b5 (3); то же в присутствии b5 (4).

Таблица

Коэффициенты инактивации цитохрома P450 2B4 для НАДФН - зависимых оксигеназной и оксидазной реакций (количество инактивированных молекул цитохрома P450 в расчете на 1000 молекул образовавшейся H_2O_2)

Цитохром P450	Коэффициент инактивации	
	При окислении бензэфетамина	Без субстрата
В составе микросом	5,2±0,5	7,0±0,5
В составе MPC В составе P450 : ФП : b5 1 1 0 1 0,05 0 1 0,05 1	11,0±0,4 12,2±0,2 6,4±0,1	13,0±0,3 13,0±0,1 -

Результаты исследований по влиянию каталазы на инактивацию цитохрома P450 2B4 в монооксигеназной реконструированной системе в процессе окисления бензэфетамина представлены на рис. 3. Добавление каталазы в систему в концентрации 50 ед/мл защищает цитохром P450 от инактивации в среднем на 40%. Увеличение концентрации каталазы до 100 ед/мл и более не вызывало дальнейшего снижения скорости инактивации цитохрома P450.

Тот факт, что каталаза имеет ограниченное ингибирующее действие, предполагает наличие недоступной для ее действия перекиси водорода, т. е. прямой перекиси, генерируемой в активном центре цитохрома P450. Ингибирующее действие каталазы, очевидно, связано с изменением градиента концентрации перекиси водорода между активным центром фермента и окружающей средой. В присутствии каталазы в инкубационной среде происходит разрушение перекиси водорода, которое увеличивает градиент концентрации и тем самым ускоряет диффузию перекиси водорода из активного центра в окружающую среду. Уменьшение концентрации перекиси водорода в активном центре приводит к снижению скорости инактивации цитохрома P450.

2. Исследование модификации гема в процессе инактивации цитохрома P450 2B4 в монооксигеназной реконструированной системе.

Спектральные исследования инактивации в реконструированной монооксигеназной системе показали, что, так же как и в микросомах, снижение содержания цитохрома P450, регистрируемое по СО-дифференциальному спектру поглощения, сопровождается обесцвечиванием гемопротейна. Это указывает на то, что в процессе самоинактивации фермента происходят структурные изменения в гемовой части цитохрома P450.

В нашей работе исследование механизма окислительной модификации гема цитохрома P450 в монооксигеназной реконструированной системе показало, что инактивация цитохрома P450 сопровождается снижением содержания связанного с белком гема. При этом площадь пика, соответствующая по объему элюции нативному цитохрому P450 2B4, использовалась как количественный параметр для определения содержания связанного с белком гема. Как видно из рис. 4, в процессе инактивации наблюдается уменьшение площади этого пика, что указывает на уменьшение содержания связанного с цитохромом P450 гема. В контрольных экспериментах, при

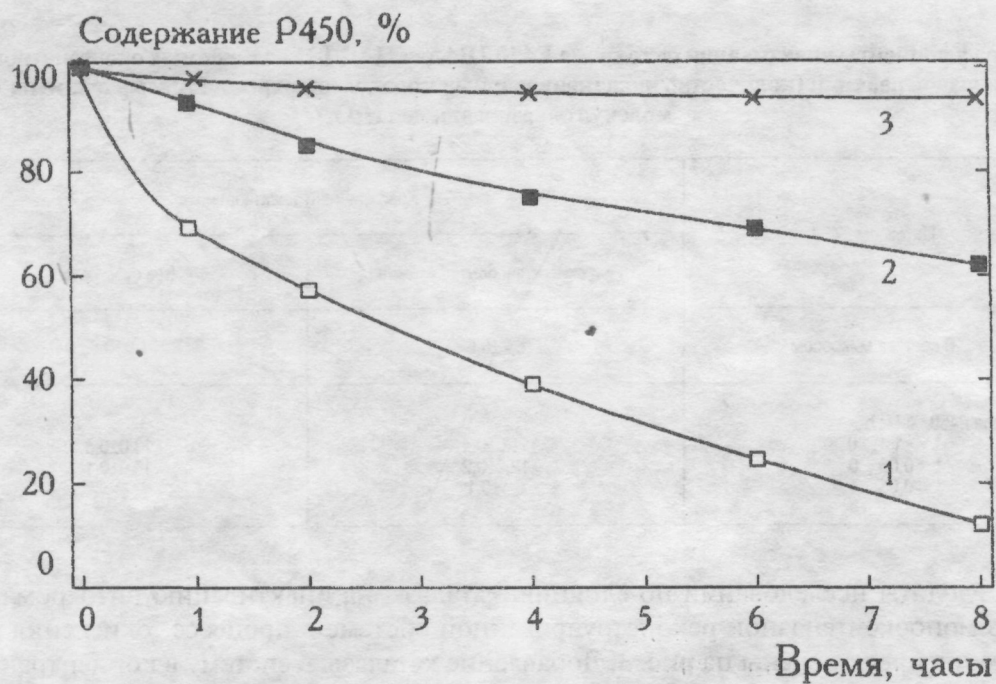


Рис. 3. Влияние каталазы на инактивацию цитохрома P450 2B4 в монооксигеназной реконструированной системе в процессе окисления безфетамин.

1 - P 450 (+НАДФН); 2 - P450 (+НАДФН + каталаза 50 и более ед/мл);
3 - P450 (-НАДФН)

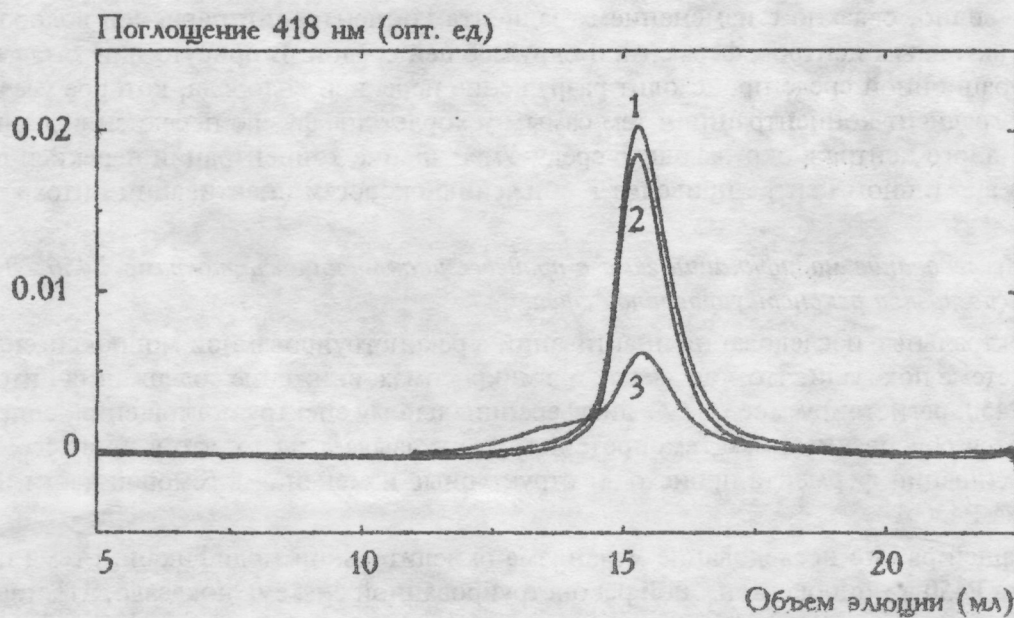


Рисунок 4. Изменение содержания связанного гема цитохрома P450 2B4 в процессе инактивации в монооксигеназной реконструированной системе.

1 — нативный P450; 2 — 8 часов инкубации при 30°C в присутствии 1 mM бензфетамин (контроль); 3 — 8 часов инкубации при 30°C в присутствии 1 mM бензфетамин и 2 mM НАДФН.

инкубации реконструированной системы в отсутствие НАДФН в течение 8 часов снижение количества связанного гема не превышало 5% от исходного уровня.

Для того чтобы решить вопрос, происходит ли в процессе инактивации Р450 разрушение гема или только его потеря, было измерено содержание общего гема пиридингемохромоновым методом [14]. Этот метод позволяет определить общее содержание гема в среде независимо от того, связан он с белком или находится в растворе.

На рис. 6 представлена корреляционная зависимость между скоростью инактивации цитохрома Р450 в монооксигеназной реконструированной системе в процессе окисления бензфетамина и содержанием связанного и общего гема. Как видно из рисунка, содержание общего гема снижается в процессе инактивации так же, как и содержание связанного гема. Корреляция между скоростями инактивации цитохрома Р450 и уменьшением содержания связанного с ферментом гема указывает, что в процессе инактивации происходят структурные изменения в гемовой части цитохрома Р450. При этом тот факт, что уменьшение содержания общего гема, которое снижается с такой же скоростью, как и содержание связанного гема позволяет заключить, что в процессе инактивации происходит деструкция гема. Этот вывод находится в соответствии с данными, полученными в лаборатории Guengerich [7], где

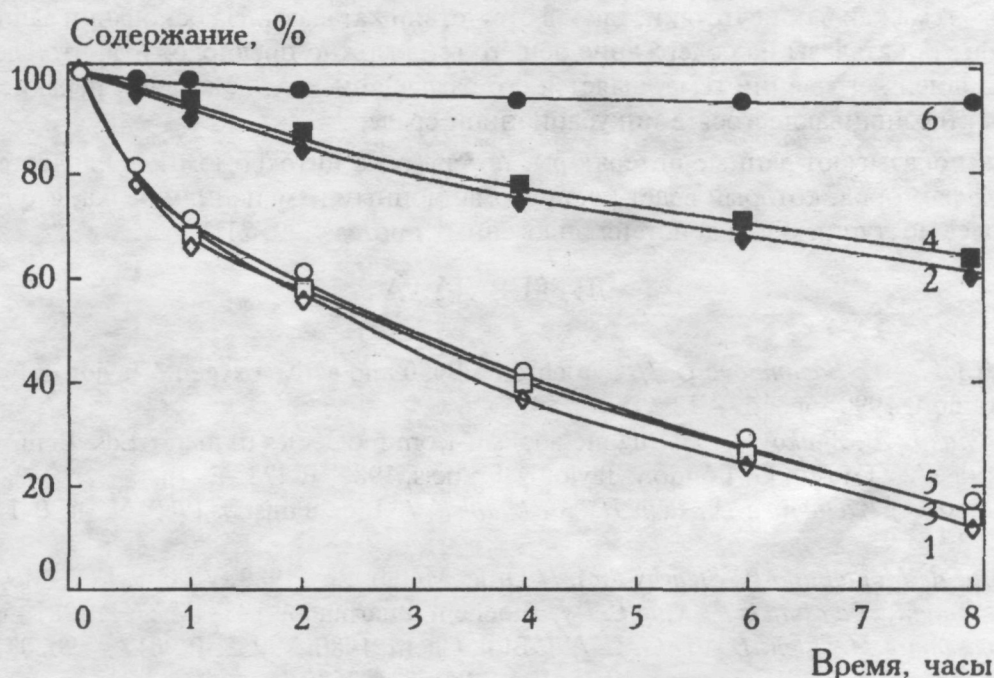


Рисунок 5. Зависимость между инактивацией цитохрома Р450 2В4 и изменением содержания связанного и общего гема в процессе НАДФН зависимого окисления бензфетамин в монооксигеназной реконструированной системе.

Цитохром Р450:
1 — без каталазы
2 + каталаза

Связанный гем
3 — без каталазы
4 + каталаза

Общий гем
5 — без каталазы
6 + каталаза

было показано, что перекись водорода, образующаяся в оксидазной реконструированной системе, может первоначально вызывать деградацию гема цитохрома P450, продукты распада которого в дальнейшем способны ковалентно связываться с апоферментом, что может лежать в основе механизма окислительной инактивации цитохрома P450.

Добавление каталазы в монооксигеназную реконструированную систему в концентрации 50 ед/мл защищало цитохром P450 от инактивации на 40%. В такой же степени уменьшалась скорость снижения содержания связанного с ферментом гема. В то же время каталаза полностью защищала от разрушения общий гем (рис. 5, кривая 6).

Сопоставляя результаты, полученные при исследовании модификации гема в присутствии каталазы и без нее, можно предположить, что в деструкции гемовой части цитохрома P450 участвует как перекись водорода, локализованная в активном центре цитохрома P450, так и, частично, перекись водорода, накапливающаяся в инкубационной среде. Однако, по нашему мнению, их роль в деградации гема различна. Вероятно, что сначала под действием перекиси водорода, образующейся в активном центре при распаде пероксикомплекса, нарушается связь между гемом и апоферментом, на что указывают данные о корреляции процессов инактивации и потери связанного гема как в присутствии, так и в отсутствии каталазы. На основании защитного эффекта каталазы на содержание общего гема можно предположить, что следующей стадией деградации гема является его разрушение под действием перекиси водорода, накапливающегося в инкубационной среде.

Как показывают данные литературы, потеря гема цитохромом P450 является одним из факторов, который ведет к конформационным изменениям белка, что делает его более доступным для действия эндогенных протеаз [20, 21].

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A., Bachmnova G. // Cytochrome P450 and active oxygen / Taylor & Francis, London, 1990, pp. 15 — 18.
2. Archakov A., Zhukov A. // Drug metabolism—from molecules to man / Eds. Benford D., Bridges J., Gibson G. London: Taylor & Francis, 1987, P. 473 — 476.
3. Ristau O., Wagnerova D., Rein H., Ruckpaul K. // Biochemistry. 1989. V. 34. P. 1111 — 1118.
4. Ortiz de Montellano P., Stearns R. A. // Drug. Metab. Rev. 1989. V. 20. P. 183 — 191.
5. Manno M., De Matteis F., King L. J. // Biochem. Pharmacol. 1988. V. 37. P. 1981 — 1990.
6. Loosemore M., Light D., Walsh C. // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. P. 9017 — 9020.
7. Guengerich F. // Biochemistry. 1978. V. 17. P. 3633 — 3639.
8. Karuzina T. T., Archakov A. T. // Free Rad. Biol. & Med. 1994. V. 16. P. 73 — 97.
9. Zhukov A. A., Archakov A. T. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1982. V. 109. P. 813 — 818.
10. Bachmanova G., Scotselyas E., Kanaeva T., Kuznetsova G., Gordeev S., Korneeva E., Karyakin A., Archakov A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. V. 139. P. 883 — 888.
11. Карузина И. И., Бачманова Г. И., Менгазетдинов Д. Е., Мясоедова К. Н. Б. Жихарева В. О., Кузнецова Г. П. // Биохимия. 1979. Т. 44. С. 1049 — 1057.
12. Imai Y., Sato R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. V. 60. P. 8 — 14.
13. Yasukuchi Y., Masters B. // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 5337 — 5344.
14. Omura T., Sato R. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. P. 2379 — 2385.

15. Nash T. // Biochem. J., 1953. V. 55. P. 416 — 421.
16. Thurman R., Ley H., Scholz R. // Europ. J. Biochem. 1972. V. 25. P. 420 — 430.
17. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265 — 275.
18. Karuzina I. I., Archakov A. I. // Free Rad. Biol. & Med. 1994. V. 17. P. 557 — 567.
19. Bonfils C., Banly C., Maurel P. // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. P. 9457 — 9465.
20. Ingelman-Sundberg M., Zhukov A., Neve E., Che F., Mkrtchian S., Eliasson E. // 10th international symposium on microsomes & drug oxidations. 1994. P. 86 — 88.
21. Uvarov V., Tretiakov V., Archakov A. // FEBS Letters. 1990. V. 260. P. 309 — 312.

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

SELF-INACTIVATION OF CYTOCHROME P450 2B4 DURING CATALYTIC TURNOVER IN MONOOXYGENASE RECONSTITUTED SYSTEM

V.G. Zgoda, I.I. Karuzina, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya str. 10, 119832 Moscow; fax: (095) 245-0857

The mechanism of cytochrome P450 2B4 self-inactivation during catalytic turnover has been studied in monooxygenase reconstituted system containing from monomers of the membrane proteins: NADPH-cytochrome P450 reductase, cytochrome P450 2B4 and cytochrome b5 in presence of detergent emulgen 913.

It was shown that P450 is inactivated at a high rate during benzphetamine oxidation. Hydrogen peroxide formed at the cytochrome P450 active center plays the key role in hemoprotein inactivation during uncoupling of monooxygenase reactions.

The mechanism oxidative heme modification has been studied in monooxygenase reconstituted system also. It was demonstrated that formed at the active center is responsible for the loss of P450 heme and localized outside of active hemoprotein center is responsible for the heme destruction.

Key words: cytochrome P450, self inactivation, Hydrogen peroxide, monooxygenase reaction.