

ПЕРОКСИД-ЗАВИСИМОЕ ОКИСЛЕНИЕ СУБСТРАТОВ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИМ ФЛАВОЦИТОХРОМОМ 2В4.

В. В. ШУМЯНЦЕВА, Ю. Л. АВДЕЕНКО, Т. Л. МОСКВИТИНА, Т. В. БУЛКО, А. Н.
ОСИПОВ *, А. И. АРЧАКОВ

Институт биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул., 10 Факс
(095) 245-08-57, Эл. почта inst@ibmh. msk.su victoria@ibmh. msk.su

*Кафедра биофизики Российского государственного медицинского университета

Полусинтетические флавоцитохромы, полученные путем ковалентного связывания рибофлавина с цитохромом Р450 2В4, катализировали H_2O_2 -зависимые реакции *n*-гидроксилирования анилина, N-деметилирования амидопирина и O-деалкилирования *n*-нитроанизола. Скорости H_2O_2 -зависимых реакций флавоцитохрома существенно превышали скорости соответствующих NADH-зависимых реакций и были сравнимы со скоростями соответствующих пероксид-зависимых реакций, катализируемых цитохромом Р450 2В4. Определены кинетические параметры (K_m и k_{cat}) пероксид-зависимых реакций флавоцитохрома Р450 2В4. Цианид натрия и специфический ингибитор цитохрома Р450 - SKF-525 А (β,β -диэтиламиноэтилдифенилпропилацетат) ингибируют пероксид-зависимые реакции флавоцитохрома. Образование активных форм кислорода, генерируемых флавоцитохромом 2В4, регистрировали по интенсивности хемилюминесцентного ответа в присутствии люминола. Показано, что интенсивность хемилюминесценции систем цитохром Р450 2В4 - пероксид водорода - люминол и флавоцитохром Р450 2В4 - пероксид водорода - люминол уменьшается в присутствии цианид-ионов, образующих комплекс с окисленной формой железа гема, что указывает на участие гема в образовании активных форм кислорода.

Ключевые слова: цитохром Р450, флавоцитохром 2В4, пероксидазная активность, хемилюминесценция.

ВВЕДЕНИЕ. Природные флавоцитохромы (цитохром Р450 ВМЗ, нитрооксидсинтаза) содержат два реакционноспособных домена в составе одной полипептидной цепи: гемсодержащий и флавинсодержащий [1]. Флавины могут генерировать пероксиды в процессе активации кислорода или взаимодействовать с пероксидами с образованием активных форм кислорода [2,3]. Исходя из этого особый интерес представляет изучение процесса пероксид-зависимого окисления субстратов, катализируемого полусинтетическим флавоцитохромом и роли флавинов в этом процессе. Флавоцитохромы, полученные нами ковалентным связыванием рибофлавина с цитохромом Р450 2В4 [4], катализировали реакции NAD(P)H-зависимого *n*-гидроксилирования анилина и N-деметилирования амидопирина и N,N-диметиланилина. Известно, что цитохром Р450 в присутствии пероксида водорода или органических пероксидов катализирует окисление многих субстратов микросомальной системы. В настоящей работе были исследованы H_2O_2 -зависимые реакции *n*-гидроксилирования анилина, N-деметилирования амидопирина и O-деалкилирования

n-нитроанизола, катализируемые флавоцитохромом P450 2B4. В работе использовали флавоцитохромы, содержащие 8-10 молекул рибофлавина на 1 молекулу цитохрома P450 2B4. Ранее было показано, что такие флавоцитохромы наиболее активны в NADH-зависимых реакциях, катализируемых полусинтетическим флавоцитохромом 2B4 [4].

МЕТОДИКА. В работе использовали следующие реактивы: NADH, рибофлавин ("Reanal", Венгрия), Sephadex-G25 ("Pharmacia", Швеция), люминол ("Merck", Германия), каталаза (активность 39000 U/mg, "Serva", Германия), остальные реактивы были отечественного производства.

Спектральные измерения производились на спектрофотометрах "Beckman DU-65" (США), "Hitachi 537" (Япония) и хемилуминометре LKB-1205 (Швеция).

Цитохром P450 2B4 был выделен и очищен как описано ранее [5]. Флавоцитохром 2B4 был получен по [4].

Скорости NADH и H₂O₂-зависимого *n*-гидроксилирования анилина, N-деметилирования амидопирина и O-деалкилирования *n*-нитроанизола определяли по [6].

Инициирование свободнорадикального окисления люминола осуществляли введением H₂O₂ (32mM) в систему, содержащую цитохром P450 2B4 или флавоцитохром 2B4. Концентрацию H₂O₂ определяли спектрофотометрически, используя $\epsilon_{240}=43,6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [7] или калийперманганатным методом [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. *Кинетические параметры H₂O₂-зависимых реакций, катализируемых полусинтетическим флавоцитохромом 2B4*

Цитохром P450 в присутствии органических пероксидов и пероксида водорода катализирует окисление субстратов микросомальной монооксигеназной системы. Целью нашей работы было исследование роли железа гема и флавиновых остатков, ковалентно связанных с цитохромом P450, в H₂O₂-зависимых реакциях. Были проведены реакции *n*-гидроксилирования анилина, N-деметилирования амидопирина и O-деалкилирования *n*-нитроанизола. Реакции начинали добавлением пероксида водорода к флавоцитохрому в присутствии субстратов.

Константу Михаэлиса (K_m) определяли как для субстратов (анилин, амидопирин), так и для ко-субстрата (H₂O₂). Концентрацию пероксида водорода варьировали от 5 до 1200 mM. Концентрацию амидопирина меняли от 0,4 до 9,6 mM, а концентрацию анилина - от 0,75 до 24 mM. Полученные данные представлены в таблице 1. Значения K_m для полусинтетического флавоцитохрома сходны с данными, полученными для микросом, олигомеров цитохрома P450 2B4 и мономерного цитохрома P450 2B4 [5]. Это может свидетельствовать о сходных механизмах пероксидазных реакций, катализируемых цитохромом P450 и полусинтетическим флавоцитохромом.

Полусинтетический флавоцитохром достаточно эффективно метаболизирует в H₂O₂-зависимых реакциях субстраты I и II типа (амидопирин и анилин). Значения каталитических констант (k_{cat}) для реакций *n*-гидроксилирования анилина и N-деметилирования амидопирина близки к значениям k_{cat}, полученным для аналогичных систем (микросом и олигомеров цитохрома P450 2B4 (Табл.2). Значение k_{cat} реакции H₂O₂-зависимого *n*-гидроксилирования анилина, катализируемой флавоцитохромом 2B4, примерно в 2 раза ниже, чем k_{cat} аналогичной реакции в случае микросом и цитохрома P450 2B4 (олигомера). Причиной этого может быть "непродуктивная" активация пероксида водорода на флавиновых остатках, которая не приводит к увеличению скорости метаболизма субстрата. Использование в реакциях, катализируемых полусинтетическим флавоцитохромом 2B4, пероксида водорода с концентрацией > 600 mM, приводит к инаktivации флавоцитохрома. Этот процесс может быть связан с меньшей устойчивостью флавоцитохрома или с генерированием активных форм кислорода (АФК), разрушающих фермент, на флавиновых остатках [2, 3].

Ранее было показано, что полусинтетические флавоцитохромы 2В4, содержащие различные количества ковалентно связанного рибофлавина, не катализировали NADH-зависимые реакции О-деалкилирования *n*-нитроанизола и 7-этоксикумарина [4]. При использовании в качестве донора активных форм кислорода H_2O_2 происходит катализируемое флавоцитохромом О-деалкилирование *n*-нитроанизола, каталитической константы пероксид-зависимого О-деалкилирования k_{cat} $1,3 \pm 0,2 \text{ min}^{-1}$. Близкие значения k_{cat} ($6,9 \text{ min}^{-1}$) для реакции О-деалкилирования *n*-нитроанизола, катализируемой цитохромом Р450 2В4 и гидропероксидом кумила, были получены ранее [9].

Влияние цианида натрия на H_2O_2 -зависимые реакции флавоцитохрома 2В4

Цианид-анион является ингибитором гемопротенинов, взаимодействуя с железом гема в окисленном состоянии (Fe^{3+}). Так как, в пероксид-зависимых реакциях железо гема цитохрома Р450 находится в окисленном состоянии, цианиды являются эффективными ингибиторами этих реакций [10].

Таблица 1. Кинетические параметры H_2O_2 - зависимых реакций полусинтетического флавоцитохрома 2В4

Реакции	K_m, mM		K_{cat}, min^{-1}	$K_{cat}/K_m, \text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$	
	H_2O_2	субстрат		H_2O_2	субстрат
<i>n</i> -гидроксилирование анилина	124 ± 10	$1,83 \pm 0,1$	11 ± 1	0,089	6,01
N-деметилирование амидопиррина	165 ± 15	$0,83 \pm 0,08$	16 ± 1	0,097	19,3

Примечание: Инкубационная смесь содержала: 1 μM цитохром Р450 2В4 или 1 μM полусинтетический флавоцитохром 2В4, 10 mM NaCN, 3 mM анилин или 8 mM амидопирин. Реакцию начинали прибавлением 0,5 M H_2O_2 .

Таблица 2. Сравнение каталитических констант H_2O_2 - зависимых реакций для разных систем

Реакции	K_{cat}, min^{-1}		
	микросомы	цитохром Р450 2В4, олигомеры	флавоцитохром 2В4
<i>n</i> -гидроксилирование анилина	38 [5]	24 [5]	11
N-деметилирование амидопиррина	-	20 [5]	16

Таблица 3. Влияние цианида натрия на H_2O_2 -зависимые реакции, катализируемые цитохромом Р450 2В4 и флавоцитохромом 2В4 (в таблице указан процент ингибирования соответствующих реакций).

Реакции	Фермент, катализирующий реакцию	
	цитохром Р450 2В4	флавоцитохром 2В4
H_2O_2 -зависимое <i>n</i> -гидроксилирование анилина	75-85%	55-65%
H_2O_2 -зависимое N-деметилирование амидопиррина	85-95%	30-40%

Инкубационная смесь содержала 100 mM калий-фосфатный буфер, pH 7,4, 1 μM флавоцитохром 2В4. При определении K_m для H_2O_2 концентрация амидопиррина или анилина была соответственно 8 mM и 3 mM. При определении K_m и k_{cat} для субстратов, концентрация H_2O_2 была 0,5M. Избыток H_2O_2 разлагали добавлением 16000-48000 U/мл каталазы

При проведении H_2O_2 -зависимых реакций, катализируемых флавоцитохромом 2B4, в присутствии 10 mM NaCN наблюдается ингибирование реакции N-деметилирования амидопирина и *n*-гидроксилирования анилина. В качестве контроля были проведены аналогичные пероксид-зависимые реакции, катализируемые цитохромом P450 2B4 (таблица 3). Как видно из таблицы, реакции H_2O_2 -зависимого *n*-гидроксилирования анилина, катализируемые флавоцитохромом, ингибируются цианидом на 55-65%, в то время как, аналогичные реакции, катализируемые цитохромом P450 2B4, ингибируются более, чем на 75%. Для реакции H_2O_2 -зависимого N-деметилирования амидопирина наблюдается следующий уровень ингибирования цианидом натрия: реакции, катализируемые флавоцитохромом, ингибируются на 30-40%, а реакции, катализируемые цитохромом P450 2B4 - на 85-95%.

При исследовании H_2O_2 -зависимых реакций макрофагальной NO-синтазы, которая является самодостаточной монооксигеназой и содержит в одной полипептидной цепи и гем, и флавины, было показано, что реакция образования NO_2^-/NO_3^- из N^G -гидрокси-L-аргинина ингибируется 10 mM KCN на 55%. [10].

Влияние специфического ингибитора цитохрома P450 2B4-SKF-525 A на H_2O_2 -зависимые реакции, катализируемые флавоцитохромом 2B4.

SKF-525 A (β,β -диэтиламиноэтилдифенилацетат) - специфический ингибитор цитохромов P450. SKF-525 A в концентрации 0,01 mM ингибировал пероксид-зависимые реакции *n*-гидроксилирования анилина и N-деметилирования амидопирина, катализируемые флавоцитохромом 2B4. Для сравнения в аналогичных условиях были проведены аналогичные реакции, катализируемые цитохромом P450 2B4. Добавление SKF-525 A к реакционной смеси снижало образование продукта в реакциях H_2O_2 -зависимого *n*-гидроксилирования анилина на 85-95% и на 65-75%, в случае реакций, катализируемых цитохромом и флавоцитохромом, соответственно. Реакции H_2O_2 -зависимого N-деметилирования амидопирина ингибировались SKF-525 A на 90-95% для реакций, катализируемых цитохромом P450, и на 70-75% для реакций, катализируемых флавоцитохромом (таблица 4). Как для реакции *n*-гидроксилирования анилина, так и для реакции N-деметилирования амидопирина, катализируемых флавоцитохромом, ингибирование SKF-525A в среднем на 20% меньше, чем для аналогичных реакций, катализируемых цитохромом P450.

В чем же причина того, что реакции, катализируемые флавоцитохромом 2B4, ингибируются цианидом натрия и SKF-525 A слабее, чем пероксид-зависимые реакции цитохрома P450 2B4. Можно предложить два объяснения этого явления. Во-первых, в результате ковалентного связывания молекул рибофлавина может несколько изменяться конформация флавоцитохрома и, вследствие этого, может осложниться доступ к каталитически активному центру фермента и измениться прочность связывания цианид-ионов с железом гема. Молекулы рибофлавина также могут закрывать доступ к гему. Во-вторых, образование активных форм кислорода из H_2O_2 может происходить не только на железе гема, но и на изоаллоксазиновых остатках рибофлавинов [2,3]. Это не исключает возможности участия флавинов в пероксидазных реакциях.

Исследование хемилюминесценции люминола в системе флавоцитохром 2B4-пероксид водорода

Для регистрации образования активных форм кислорода исследовалась люминол-зависимая хемилюминесценция систем: цитохром P450 2B4- H_2O_2 , флавоцитохромом 2B4 - NADH, флавоцитохромом 2B4- H_2O_2 в присутствии люминола.

Люминол взаимодействует с гидроксильным радикалом (OH^\cdot) и в меньшей степени с супероксид-анион радикалом ($O_2^{\cdot-}$). В результате образуется активный радикал люминола, хемилюминесценция которого регистрируется. [8,9, 10]. В отсутствие хотя бы одного из компонентов системы свечение не регистрировалось.

В опытах по регистрации образования активных форм кислорода в системе флавоцитохром 2В4 - NADH методом хемилюминесценции не обнаружено люминесценции люминола, что свидетельствует об отсутствии в реакционном объеме частиц, (OH^\bullet или $\text{O}_2^{\bullet-}$), способных взаимодействовать с люминолом. В то же время, в

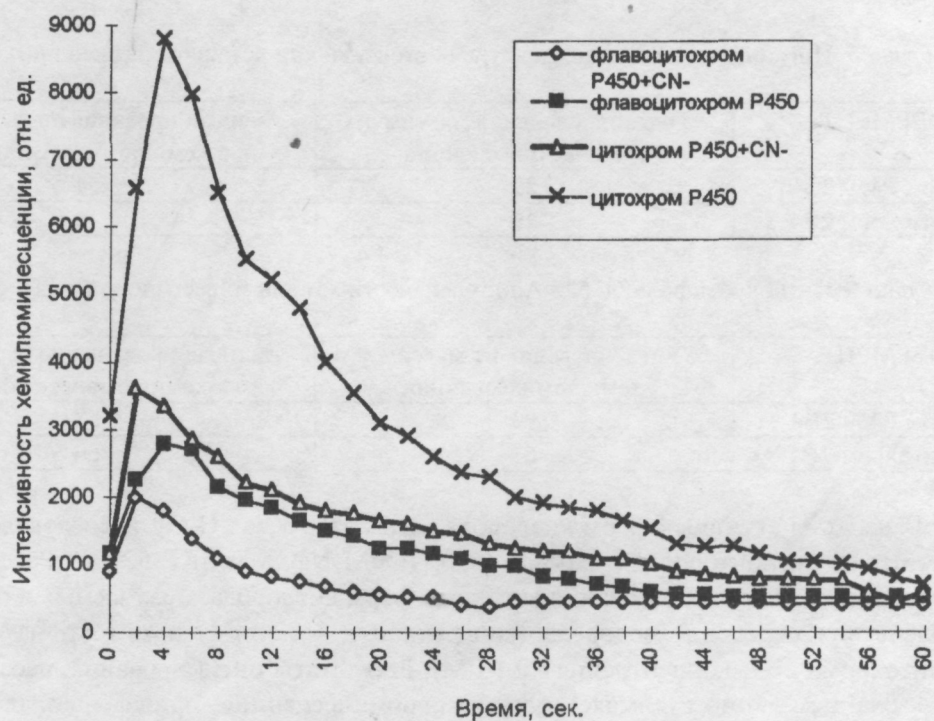


Рисунок.

H_2O_2 -зависимая хемилюминесценция цитохрома Р450 2В4 и флавоцитохрома Р450 2В4 в присутствии люминола. Смесь объемом 1 мл содержала 200 мкМ люминол, 0,1 мкМ цитохром или флавоцитохром, 32 мМ H_2O_2 , 10 мМ NaCN.

Таблица 4. Влияние SKF-525 А на H_2O_2 -зависимые реакции, катализируемые цитохромом Р450 2В4 и флавоцитохромом 2В4 (в таблице указан процент ингибирования соответствующих реакций).

Реакции	Фермент, катализирующий реакцию	
	цитохром Р450 2В4	флавоцитохром 2В4
H_2O_2 -зависимое <i>n</i> -гидроксилирование анилина	85-95%	65-75%
H_2O_2 -зависимое N-деметилование амидопирин	90-95%	70-75%

Примечание: Инкубационная смесь содержала : 1μМ цитохром Р450 2В4 (Р450) или 1μМ полусинтетический флавоцитохром 2В4, 0,01 мМ SKF-525 А, 3 мМ анилин или 8 мМ амидопирин. Реакцию начинали прибавлением 0,5 М H_2O_2 .

системах: цитохром Р450 2В4- H_2O_2 , или флавоцитохром 2В4- H_2O_2 идет генерация активных форм кислорода, регистрируемая по хемилюминесценции люминола.

Хемилюминесценция регистрировалась сразу после добавления H_2O_2 (конечная концентрация в пробе - 32 мМ). Максимум хемилюминесценции наблюдался через 2-3

секунды после добавления пероксида водорода. Затем наблюдалось постепенное снижение интенсивности хемилюминесценции. Кинетические кривые хемилюминесценции приведены на рис. 1. Меньшая интенсивность хемилюминесценции флавоцитохрома по сравнению с цитохромом P450 2B4 может быть связана с тушением хемилюминесценции флавинами или с меньшей активностью флавоцитохрома 2B4 как генератора активных форм кислорода в пероксид-зависимых реакциях.

Таблица 5. Ингибирование цианидом натрия интенсивности хемилюминесценции.

ФЕРМЕНТ	% ингибирования по максимуму хемилюминесценции	% ингибирования по светосумме хемилюминесценции
Цитохром P450 2B4	59	54
флавоцитохром 2B4	29	46

Таблица 6. Ингибирование SKF 525 А интенсивности хемилюминесценции.

ФЕРМЕНТ	% ингибирования по максимуму хемилюминесценции	% ингибирования по светосумме хемилюминесценции
Цитохром P450 2B4	90	83
флавоцитохром 2B4	63	66

Генерация активных форм кислорода, катализируемая H_2O_2 , исследовалась также в присутствии ингибиторов цитохрома P450: 10mM NaCN и SKF-525 А. Рассчитывали процент ингибирования образования активных форм кислорода, получаемых в результате взаимодействия пероксида водорода (концентрация - 32 mM) и цитохрома P450 или флавоцитохрома 2B4 (концентрация - 0,1 μ M). Результаты ингибирования, рассчитанные с использованием данных по максимуму хемилюминесценции, приведены в таблице 5 и 6. Данные по ингибированию люминол-зависимой хемилюминесценции свидетельствуют, как и следовало ожидать, об ингибировании образования активных ингибитором SKF-525 А реакций H_2O_2 -зависимого *p*-гидроксилирования анилина и N-деметилирования амидопирина (таблица 3 и 4).

Таким образом, исследованы H_2O_2 -зависимые реакции *p*-гидроксилирования анилина, N-деметилирования амидопирина и O-деалкилирования *p*-нитроанизола, катализируемые полусинтетическим флавоцитохромом.

Скорости H_2O_2 -зависимых реакций флавоцитохрома были сопоставимы со скоростями соответствующих пероксид-зависимых реакций, катализируемых цитохромом P450 2B4

ЛИТЕРАТУРА :

1. Шумянцева В.В., Авдеенко Ю.Л., Москвитина Т.Л., Арчаков А.И., (1997) *Вопр. мед. химии*, **43**, 67-81.
2. Bruice T. C., (1980) *Acc. Chem. Res*, **13**, 256-262.
3. Massey V., (1994) *J.Biol. Chem.*, **269**, N.36, 22459-22462.
4. Shumyantseva V.V., Uvarov V.Yu., Byakova O.E., Archakov A.I., (1996) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **38**, 829-838.
5. Канаева И.П., Скотцеляс Е.Д., Кузнецова Г.П., Антонова Г.И., Бачманова Г.И., Арчаков А.И. (1985) *Биохимия*, **50**, 1382-1388.

6. Kanaeva I.P., Dedinskii I.R., Skotselyas E.D., Krainev A.G., Guleva I.V., Sevrukova I.F. (1992) Arch. Biochem. Biophys., **298**, N.2, 395-402.
7. Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Любичкий О.Б., Клебанов Г.И., Владимиров Ю.А. (1997) Вопр. мед. химии, **43**, 87-93.
8. Дроздов Н.С., Матеранская Н.П. (1970) Практикум по биологической химии, М., Высшая школа, 73.
9. Uvarov V.Yu., Tretiakov V. E., Leschenko A.V., Dzuzenova C. S., Tretiakova L.Z., Rukavishnikov I.G., Archakov A.I., (1989) Eur.J. Biochem., **181**, 391-396.
10. Pufalt R., Wishnak J.S., Martella M.A., (1995), Biochemistry, **34**, 1930-1941.
11. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев, (1991) Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники. Серия "Биофизика", **29**, 14-18; 28-31. Изд-во ВИНТИ.
12. Русь О.Б., Пучкаев А.В., Метелица Д.И. (1996) Биохимия, **61**, 1813-1824.
13. Vladimirov Yu.A., (1986) Free Radicals, Ageing and Degenerative Diseases. New York, London: Alan R. Liss Inc., 141-195.

HYDROGEN PEROXIDE- SUPPORTED OXIDATION OF SUBSTRATES BY FLAVOCYTOCHROME 2B4.

V.V. SHUMYANTSEVA, T. L. MOSKVITINA, L. YU. AVDEENKO, T. V. BULKO,
A.N. OSIPOV[#], A. I. ARCHAKOV.

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya st., 10, 119832 Moscow, Russia,
Fax (95) 245-08-57. E.mail: inst@ibmh.msk.su, [#]Department of Biophysics,
Russian State Medical University

Semisynthetic flavocytochromes, obtained by covalent binding of riboflavins with cytochrome P450 2B4, were able to catalyse H₂O₂ -supported aniline *p*-hydroxylation, amidopyrine N-demethylation and *p*-nitroanisole O-dealkylation. Rates of these reactions were considerably higher than the rates of corresponding NAD(P)H-dependent reactions and comparable with H₂O₂ -dependent reactions, catalysed by cytochrome P450. Kinetic parameters (*K_m* and *k_{cat}*) of hydrogen peroxide-supported oxidation of aniline, amidopyrine and *p*-nitroanisole in the presence of flavocytochrome 2B4 were determined. Cyanide and SKF-525 A inhibited H₂O₂ -dependent reactions of flavocytochrome 2B4. The intensity of luminol chemiluminescence in the presence of hydrogen peroxide was studied. Chemiluminescent response was shown to be influenced by cyanide ions and SKF 525 A. The difference in chemiluminescence intensity of cytochrome P450 2B4 and semisynthetic flavocytochrome 2B4 was found.

Key words: cytochrome P450 2B4, flavocytochrome 2B4, hydrogen peroxide-supported reactions, chemiluminescence