

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК [577.151.53 + 577.151.54 + 577.112]
© Коллектив авторов

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЦИТОХРОМОВ P450 МИКРОСОМ КЛЕТОК ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Н.А. Петушкова^{1}, А.В. Лисица¹, И.И. Карузина¹, В.Г. Згода¹,
Г.Ф. Шереметьева², Н.Ф. Саменкова¹, И.П. Никитин¹, Т.А. Сахарова¹,
А.Т. Копылов¹, А.И. Арчаков¹*

¹ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН, 119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10;
тел: (495) 247-3960; факс: (495) 245-0857;
эл. почта: Natalia.Petushkova@ibmc.msk.ru

²Российский научный центр хирургии РАМН, 119992 Москва,
Абрикосовский переулок, д.2

Для выявления и идентификации форм цитохрома P450 высокоочищенных мембран микросом печени человека были использованы методы протеомного анализа, которые включали разделение белков с помощью одномерного и двумерного электрофореза (1D и 2D) и молекулярное сканирование методом масс-спектрометрии участка геля в диапазоне 45-66 кДа (область, соответствующая молекулярной массе цитохромов P450). Анализ содержания белков проводили по оригинальной технологии 1D-ZOOMER, которая позволяла осуществлять обработку массива масс-спектров, а не единичных масс-спектров, как принято в стандартных методиках. В области 45-66 кДа было идентифицировано 13 микросомальных мембранных белков, в том числе такие формы цитохрома P450, как 1A2, 1B1, 2A6, 2E1, 2C8, 2C9, 2C10, 2D6, 3A4, 4A11, 4F2. Исследование ферментной активности цитохромов P450 семейств 1A, 2B, 2C, 3A и 2E в микросомах клеток печени человека выявило снижение скоростей О-деалкилирования и N-деметилирования цитохромов P450 1A1/1A2 и 3A4 при патологии, в то время как активности 7-бензоксирезорифин-О-дебензилазы (характеризует суммарную активность CYP2B и CYP2C), цитохрома P450 2E1 (окисление метанола), 7-пентоксирезорифин-О-деалкилазы (CYP 2B), 7-этокси- и 7-метоксикумарин-О-деалкилаз (CYP 2B1) практически не изменялись. На основании полученных результатов показана эффективность использования комбинации протеомного и биохимического анализов для инвентаризации цитохромов P450 и выявления уровня их экспрессии, обсуждаются возможности масс-спектрометрии для количественной оценки белков.

Ключевые слова: микросомы, печень, цитохромы P450, микросомальное окисление, одномерный (1D) и двумерный (2D) электрофорез, масс-спектрометрия.

ВВЕДЕНИЕ. Современные протеомные технологии позволяют идентифицировать компоненты сложных белковых смесей, содержащих более тысячи белков. Большая часть работ в области протеомики выполняется с использованием двумерного электрофореза (2D-ЭФ) и касается, главным образом, растворимых белков [1]. Однако треть всех белков организма составляют мембранные белки, которые имеют большое значение в сигнальных системах, транспортных процессах и окислительных реакциях. Особое значение среди них принадлежит надсемейству цитохромов P450 [2-4]. Уникальная природа цитохромов P450 и их значимость в метаболизме широкого спектра эндогенных и

* - адресат для переписки

экзогенных субстратов, существование множественных форм с перекрещивающейся субстратной специфичностью делает их важным объектом как фундаментальных, так и прикладных исследований [5, 6].

Одной из задач протеомики является выявление клеточных белков и сравнение белковых наборов в клетках тканей в норме и при различных патологиях. Было показано, что уровень индукции цитохромов P450, а так же специфическая активность этих гемопротеинов зависят не только от воздействия на организм человека различных ксенобиотиков, но и от наличия того или иного патологического процесса [6, 7]. Определение профиля экспрессии цитохромов P450 и их активности дает важную информацию о метаболизме лекарств. В случае цитохромов P450 разработаны биохимические методы определения функциональной активности с помощью модельных субстратов, которые позволяют с достаточно высокой степенью точности определить уровень его индукции [3, 8, 9].

Информацию о физиологическом статусе организма человека, о развитии заболевания и предполагаемом ответе на лекарственную терапию может дать протеомный анализ, занимающийся изучением качественного и количественного состава белков, синтезируемых клеткой в данный момент времени (протеом) [10, 11]. Протеомный анализ основан на электрофоретическом разделении белков и их идентификации с помощью масс-спектрометрии (MALDI-TOF). При этом можно получить лишь данные о молекулярной массе белка, но без информации о количестве и функциях. В последнее время появился ряд работ, в которых MALDI-TOF масс-спектрометрия используется для количественного определения белков [12, 13].

В настоящей работе были исследованы компоненты микросомальной монооксигеназной системы клеток печени человека (цитохромы P450, NADPH-цитохром P450 редуктаза и цитохром *b5*) в норме и патологии с использованием методов протеомного анализа: 2D-электрофореза, молекулярного масс-спектрометрического сканирования белков после разделения их методом одномерного (1D) электрофореза и определения функциональной активности различных форм цитохрома P450. На примере цитохромов P450 клеток печени человека в норме и патологии показана возможность использования MALDI-TOF для количественной характеристики белков.

МЕТОДИКА. В работе использовались HEPES, PMSF, 2,5-дигидроксibenзойная кислота, EDTA, NADPH, алкоксирезорусины, дитионит, трипсин, дезоксихолат натрия ("Sigma-Aldrich", США); ацетонитрил, эритромицин и трифторуксусная кислота ("ICN", США); кумасси бриллиантовый голубой R-250 ("Fluka", Германия). Другие реактивы отечественного производства имели квалификацию "х.ч."

В качестве материала для исследования были использованы морфологически неизменные участки печеночной ткани человека (весом 3-10 г), полученные путем резекции при хирургическом лечении гигантской гемангиомы (норма) и метастазов печени при колоректальном раке (патология). Препараты микросом клеток печени выделяли из материала, полученного не позднее, чем через 30 минут после гепатэктомии методом дифференциального центрифугирования [14]. Дополнительно очищенные препараты мембран микросом (тени) получали, как описано ранее [15], а затем разделяли на две порции. Одну часть осадка теней суспендировали в 100 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,4, содержащем 20% глицерин, 1 мМ ЭДТА и 1 мМ дитиотреitol, и использовали для определения цитохром P450-зависимых активностей. Вторую порцию осадка анализировали методами 1D- и 2D-электрофореза и MALDI-TOF масс-спектрометрией. Содержание цитохромов *b5* и P450 определяли по методу Omura и Sato [16] с модификациями, исключающими вклад гемоглобина в поглощение в области 420 нм [17]. Определение NADPH-цитохром *c* редуктазной активности проводили по методу French and Coon [18]. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [19] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта. О-деалкилирование производных резорусина и кумарина определяли, как описано

ранее [8] при 30°C на спектрофлуориметре Perkin-Elmer (Великобритания) ($\lambda_{\text{ex}} = 540$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 585$ нм для производных резорфина; $\lambda_{\text{ex}} = 370$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 450$ нм для производных кумарина). Скорость N-деметиляции эритромицина и окисление метанола определяли по количеству образовавшегося формальдегида [9, 20].

Для разделения белков методом 2D-электрофореза высокоочищенные мембраны микросом клеток печени человека солюбилизировали с добавлением 9 М мочевины, 5%-ного (масса/объем) 3-(3-холамидопропил)-диметиламмоний-1-пропансульфоната (CHAPS), 0,25%-ного (по объему) NP-40, 65 мМ дитиотрейтола, и подвергали ультразвуковой обработке пятью импульсами длительностью 1 с при 4°C на дезинтеграторе Soniprep 150 (Великобритания) (частота 50 кГц, амплитуда 30 мкМ). После этого образец центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин. Полученный супернатант после добавления 0,2%-ного (масса/объем) амфолина pH 3-10 ("Amersham", Швеция) использовали для дальнейшей работы.

Для выявления цитохромов P450 белки разделяли методом 1D-электрофореза в денатурирующих условиях [21], используя Protean II xi Cell ("Bio-Rad", США). 100 мкг белка исследуемого образца смешивали с буфером, содержащим 100 мМ дитиотрейтол, 4% додецилсульфата натрия, 10% глицерин, в соотношении 1:2 (объем/объем), инкубировали в течение 5 мин. при 95°C и наносили на гель. После разделения белков по массе проводили окрашивание гелей кумасси бриллиантовым голубым как описано ранее [22].

Окрашенную кумасси белковую полосу геля (область 45-66 кДа, соответствующая молекулярной массе цитохромов P450) нарезали на тонкие (около 200 мкМ) полоски, каждая из которых в дальнейшем использовалась как отдельная проба. Каждую из вырезанных полосок (всего около 40 полосок для выбранного диапазона масс) подвергали трипсинолизу [23], затем отбирали аликвоту и наносили на мишень времяпролетного масс-спектрометра (пять параллельных проб). Каждый образец (0,2-1,0 мкл) смешивали на мишени с таким же объемом растворителя 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (20 мг/мл) в 20%-ном ацетонитриле, 0,1%-ной трифторуксусной кислоте и высушивали на воздухе. Масс-спектры (общее количество 1200) получали на Ultraflex MALDI-TOF масс-спектрометре (Bruker Daltonics, США) с УФ-лазером (336 нм) в режиме положительных ионов и диапазоне 800-4000 Да. Полученные масс-спектры калибровали, используя известные массы внутренних стандартов (MH^+ 1046.54, 2212.12 Да). Список масс-пептидов получали с применением алгоритма SNAP (FlexAnalysis 2.0, Bruker Daltonics). Идентификацию белков проводили по наборам значений масс трипсинолитических пептидов с использованием программ Mascot и Profound (Matrix Science, США) [24] с точностью определения массы MH^+ , равной 0,01%, допуская возможность модификации цистеинов акриламидом и окисления метионинов. При поиске привлекали базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Обработку всех снятых масс-спектров проводили по технологии 1D-ZOOMER (<http://projects.ibmh.msk.su/oldZOOMER/projects/hlm2004/guest.pl>), которая позволяет совместить масс-спектр с реальной полоской, вырезанной из геля, и таким образом реконструировать исходную электрофореграмму.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Методическая база протеомики включает в себя набор высокопроизводительных методов разделения и анализа, направленных на получение информации о составе, взаимодействии и биохимических свойствах белков в живых системах. Как известно, цитохромы P450 в основной своей массе локализованы в мембранах эндоплазматического ретикулаума клеток печени. Как нами было показано ранее [25], подготовка биологического материала является одним из важных этапов протеомных исследований, поскольку существуют объективные факторы, способные ухудшить разделение белков и, следовательно, затруднить интерпретацию полученных результатов [26]. Поэтому, на первом этапе данного исследования основное внимание было уделено получению высокоочищенных микросомальных мембран, включающее в себя удаление локализованных в матриксе микросомальных

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ P450 ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

пузырьков растворимых белков-ферментов, а также сорбированных белков и рибосом. В таблице 1 представлена характеристика полученных препаратов микросом клеток печени человека в норме и при патологии. Сравнительный анализ показал, что при патологии наблюдалось резкое снижение (в 3 раза) активности NADPH-цитохром *c* редуктазы – первого компонента электрон-транспортной цепи микросомальной монооксигеназной системы печени. Содержание цитохрома *b5* при патологии было увеличено в 2 раза. Содержание общего цитохрома P450 также было увеличено (в 2 раза) по сравнению с нормой; кроме того, наблюдалось появление незначительного количества (10% от содержания P450) цитохрома P420, неактивной формы гемопротейна. Полученные результаты совпадают с опубликованными ранее данными [6] о возможном повышении экспрессии цитохромов P450 при патологии. Таким образом, соотношение цитохром P450:цитохром *b5* осталось равным 1:1, что является характерным соотношением для этих белков в ткани печени в норме [2].

Таблица 1. Характеристика препаратов микросом клеток печени человека.

| Препарат/показатели | *Норма | **Патология |
|--|-------------------------------|-------------------------------|
| NADPH-цитохром <i>c</i> редуктаза, нмоль цит. <i>c</i>/мин/мг белка | 404,9±99,8^a | 149,4±51,7^a |
| Цитохром P450, нмоль/мг белка | 0,39±0,05 | 0,61±0,11 |
| Цитохром P420, нмоль/мг белка | 0 | 0,08±0,02 |
| Цитохром <i>b5</i>, нмоль/мг белка | 0,28±0,02^a | 0,45±0,06^a |

Примечания: Здесь и в таблицах 2 и 3 - * Норма – морфологически неизмененные участки печеночной ткани, полученные при резекции печени по поводу гигантской гемангиомы (n = 3); ** патология – морфологически неизмененные участки печеночной ткани, полученные при хирургическом лечении метастазирующего в печень колоректального рака (n = 5). Результаты представлены как средние значения ± ошибка средней (a - p<0,05).

В таблице 2 представлены данные об активности цитохромов P450 семейств CYP1A, CYP2B, CYP2C, CYP3A и CYP2E в микросомах клеток печени человека в норме и при патологии. 7-Метокси- и 7-этоксирезорифин-О-деалкилазная активности, являющиеся маркерными для цитохромов P450 1A1/1A2, и эритромицин-N-деметилазная активность, маркерная для цитохрома P450 3A4, при патологии снижены по сравнению с активностью этих форм в норме при пересчете как на мг белка, так и нмоль цитохрома P450, несмотря на то, что содержание общего цитохрома P450 при патологии выше (в 2 раза, см. табл. 1). Падение удельной активности указанных выше форм может быть связано как со снижением содержания CYPs 1A1/1A2 и 3A4 в общем количестве гемопротейнов, так и с возможной их инактивацией. Кроме того, снижение скоростей О-деалкилирования и N-деметиления цитохромов P450 1A1/1A2 и 3A при данной патологии, по-видимому, не является следствием уменьшения активности NADPH-цитохром *c* редуктазы в микросомах клеток печени пациента, так как наличие метастазов в печени практически не оказывает влияния на активность 7-бензоксирезорифин-О-дебензилазы (характеризует суммарную активность CYP2B и CYP2C), цитохрома P450 2E1 (окисление метанола), 7-пентоксирезорифин-О-деалкилазы (CYP 2B), 7-этокси- и 7-метоксикумарин-О-деалкилаз (CYP 2B1). Различия в активности CYPs 1A1/1A2 и 3A4 в норме и при патологии может иметь существенное значение для создания лекарственных препаратов для индивидуальной химиотерапии.

Таблица 2. Активность цитохрома P450 в микросомах клеток печени человека в норме и патологии.

| Показатель/образец | *Норма | Образец № 1 | Образец № 2 | Образец № 3 | Образец № 4 |
|---|-----------------------------|------------------|------------------|----------------|-----------------|
| 7-метоксипрезорупин О-деакинказа (CYP 1A1/1A2) пиктомоп/мин/мг белка пиктомоп/мин/мгаль P450 | 61,0±11,60 156,70±29,34 | 6,80 16,30 | 20,90 33,70 | 5,06 7,32 | 6,70 21,50 |
| 7-этоксипрезорупин О-деакинказа (CYP 1A1/1A2) пиктомоп/мин/мг белка пиктомоп/мин/мгаль P450 | 42,9±8,70 110,0±21,00 | 8,80 21,00 | 18,70 30,20 | 5,39 7,80 | 8,60 27,70 |
| 7-бензоксипрезорупин О-деакинказа (CYP 2B + 2C) пиктомоп/мин/мг белка пиктомоп/мин/мгаль P450 | 7,30±1,83 18,60±4,78 | 7,50 17,80 | 12,90 20,90 | 5,67 8,20 | 7,50 17,80 |
| 7-пентоксипрезорупин О-деакинказа (CYP 2B) пиктомоп/мин/мг белка пиктомоп/мин/мгаль P450 | 0,76 1,95 | - | - | 0,87 2,80 | - |
| 7-этоксикумарин О-деакинказа (CYPs 1A1/1A2 + 2E1) пиктомоп/мин/мг белка пиктомоп/мин/мгаль P450 | 26,50±6,73 67,80±16,40 | 26,00 42,60 | 24,50 39,50 | 14,10 59,00 | 63,20 203,90 |
| 7-метоксикумарин О-деакинказа (CYP 2B) пиктомоп/мин/мг белка пиктомоп/мин/мгаль P450 | 103,70±8,30 265,90±23,02 | 120,90 194,90 | 103,40 166,60 | 40,85 59,00 | 98,70 318,40 |
| Эритромицин-N-деакинказа (CYP 3A4) пиктомоп/мин/мг белка пиктомоп/мин/мгаль P450 | 1,20±0,33 3,10±0,97 | - | следы | 0,29 0,93 | 0,63 1,50 |
| Оксисление метанола (CYP 2E1) пиктомоп/мин/мг белка пиктомоп/мин/мгаль P450 | 3,4±0,60 8,80±1,87 | 1,15 2,87 | - | 3,36 4,86 | 3,40 11,00 |

Примечание: * - Результаты представлены как средние значения ± ошибка средней (n = 3).

Методы протеомного анализа включают в себя разделение белков и последующую их идентификацию при помощи масс-спектрометрии. Гидрофобная природа мембранно-связанных белков затрудняет их разделение методами электрофореза. В связи с этим для гидрофобных мембранных белков микросом печени следует использовать как 1D-, так и 2D-электрофорез [27]. Каждый из этих методов в отдельности имеет ограничения: 2D-электрофорез обладает низким разрешением при разделении мембранных белков, в то время как 1D-электрофорез имеет ограничения по разделению смеси белков с близкими значениями молекулярной массы и располагающимися в одной полосе на геле. Метод молекулярного сканирования позволяет различить индивидуальный белок в этой смеси [26].

Ранее нами было показано наличие ограничений использования двумерного электрофореза для разделения цитохромов P450 клеток печени мыши [25], поэтому гетерогенные образцы микросом печени человека дополнительно очищали от белков, сорбированных на поверхности мембран. С этой целью

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ P450 ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

мы проводили дополнительную обработку цитрат-пирофосфатным буфером и центрифугирование в градиенте плотности сахарозы. Кроме того, подбирали условия (детергенты для солюбилизации белков, растворы амфолинов с щелочными значениями pH от 7,0 до 9,0) для 2D-электрофореза мембранного материала. Однако методом двумерного электрофореза разделить и затем идентифицировать цитохромы P450 клеток печени человека не удалось. Сравнительный анализ полученных электрофореграмм показал, что при патологии печени наблюдалось увеличение количества белковых пятен (825) по всей области 2D-электрофореграммы по сравнению с нормой (445, рис. 1 и 2). Из компонентов монооксигеназной системы печени удалось идентифицировать только амфипатический белок цитохром *b5*; остальные белки были в основном водорастворимые. Таким образом, полученные результаты подтвердили существование ограничений использования 2D-электрофореза для разделения гидрофобных белков, которые, прежде всего, обусловлены низкой растворимостью белков и трудностью их фракционирования в области $7,0 \leq pI \leq 10,0$. В нашем случае это имело большое значение для разделения в градиенте pH цитохромов P450, которые в основной своей массе являются основными белками, например, для CYPs 3A4, 2E1, 2C8, 1A2 и 2A6 теоретически рассчитанные значения pI находятся в диапазоне от 8,3 до 9,2. Кроме того, существенное значение для разделения этих белков может иметь агрегация гидрофобных молекул в условиях изофокусирования [28].

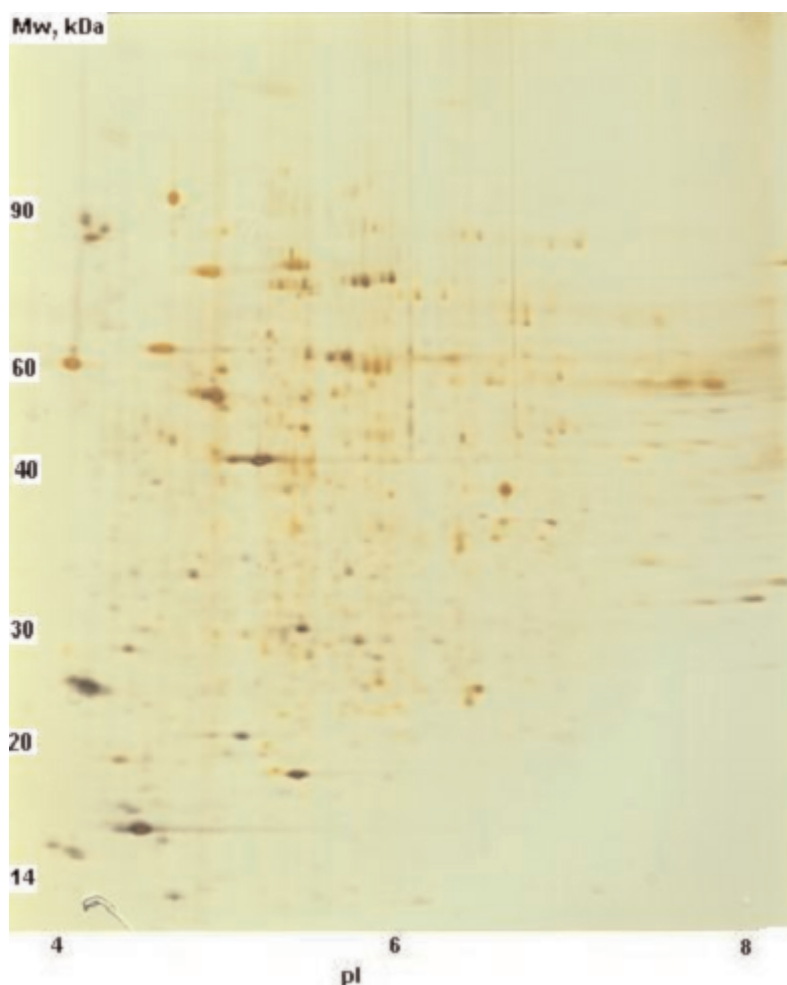


Рисунок 1.

Протеомная карта микросом клеток печени человека (норма, количество белковых пятен - 445).

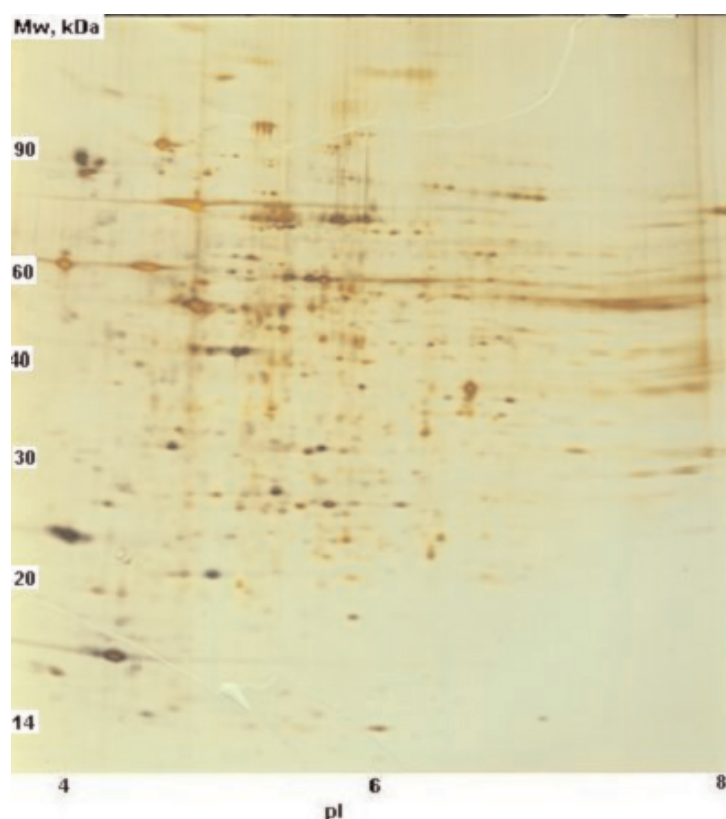


Рисунок 2.

Протеомная карта микросом клеток печени человека при патологии (количество белковых пятен – 825).

Поэтому в последующем для разделения мембранных белков нами был использован метод 1D-электрофореза (рис. 3). В зависимости от образца и электрофоретических условий после окрашивания гелей в контроле выявлялось 16-20 полос (рис. 3а) и 19-24 полосы при патологии (рис. 3б). Наиболее интенсивно прокрашивалась область 45-66 кДа, где наблюдалось приблизительно 2-3 основных широких полосы и несколько минорных. Методом времяпролетной масс-спектрометрии была проанализирована область 45-66 кДа на 1D-электрофореграмме, соответствующая молекулярным массам различных форм цитохрома P450. С этой целью данная область геля была последовательно разрезана на 40 узких полосок-срезов, для каждого образца был проведен трипсинолиз и MALDI-TOF масс-спектрометрия. Результаты инвентаризации белков микросом в норме и при патологии в области 45–66 кДа представлены в виде одномерных белковых профилей (рис. 3 с и d). Верхняя граница цитохром P450-содержащей области определялась по положению карбоксилэстеразы (62,5 кДа), а нижняя – по положению актина (41,0 кДа). Каждый из этих белков обладал легко детектируемыми массами пептидных фрагментов и, таким образом, способствовал определению местоположения цитохром P450-содержащих срезов. Профили белков представлены в виде масс-спектрометрических денситограмм, в которых удельный вес был определен путем измерения количества триптических пептидов, соответствующих каждому белку на масс-спектре данного гелевого среза. Каждый профиль был обозначен в соответствии с названием белка (см. подпись рис. 3). Белковый профиль формировался на основе 28 или 7 наиболее интенсивных пептидов в случае контроля (норма, рис. 3с) и при патологии (рис. 3d), соответственно. При этом за пороговый уровень отсечения “шума” принималось значение одного стандартного отклонения выше средней величины интенсивности массы соответствующего пептида. На основании анализа рисунка

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ P450 ПЕЧЕНИ ЧЕЛОВЕКА

3 можно отметить несколько важных моментов. Во-первых, для большинства белков значительное количество соответствующих пептидов располагалось на определенном отрезке геля, т.е. идентифицированный белок выявлялся в нескольких соседних срезах. Из этого следует, что белковому профилю соответствует определенная позиция в геле [27]. Во-вторых, полученные данные свидетельствуют о том, что микросомальные белки слабо разделяются при SDS-электрофорезе. Например, в тридцатой полоске была выявлена смесь из нескольких белков (CYPs 2C, 2E, 3A и УДФ-глюкозилтрансфераза, рис. 3d). Кроме того, расчетные величины молекулярных масс идентифицированных белков, как правило, уменьшались к нижней части геля, что соответствовало положению белков при электрофоретическом разделении. Исключением из этого правила стали цитохромы P450 2C. Молекулярная масса белков, входящих в это подсемейство (CYPs 2C9/10/19), составляет в среднем 55,5 кДа, однако, как видно из рисунка 3, пик соответствующего белкового профиля наблюдался в области 60 кДа (рис. 3 с и d). Похожая ситуация наблюдалась при сравнении относительной позиции CYP2E и его средней молекулярной массы. В случае контрольного образца (рис. 3с), пик CYP2E располагался в нижней части рисунка в соответствии с его теоретическим значением молекулярной массы 56,8 кДа и находился рядом с пиком CYP 2A (56,6 кДа) и эпоксидгидролазы (52,9 кДа). Однако при патологии (рис. 3d) относительная позиция CYP2E изменилась, он стал располагаться выше CYP3A, у которого средняя молекулярная масса равна 57,3 кДа.

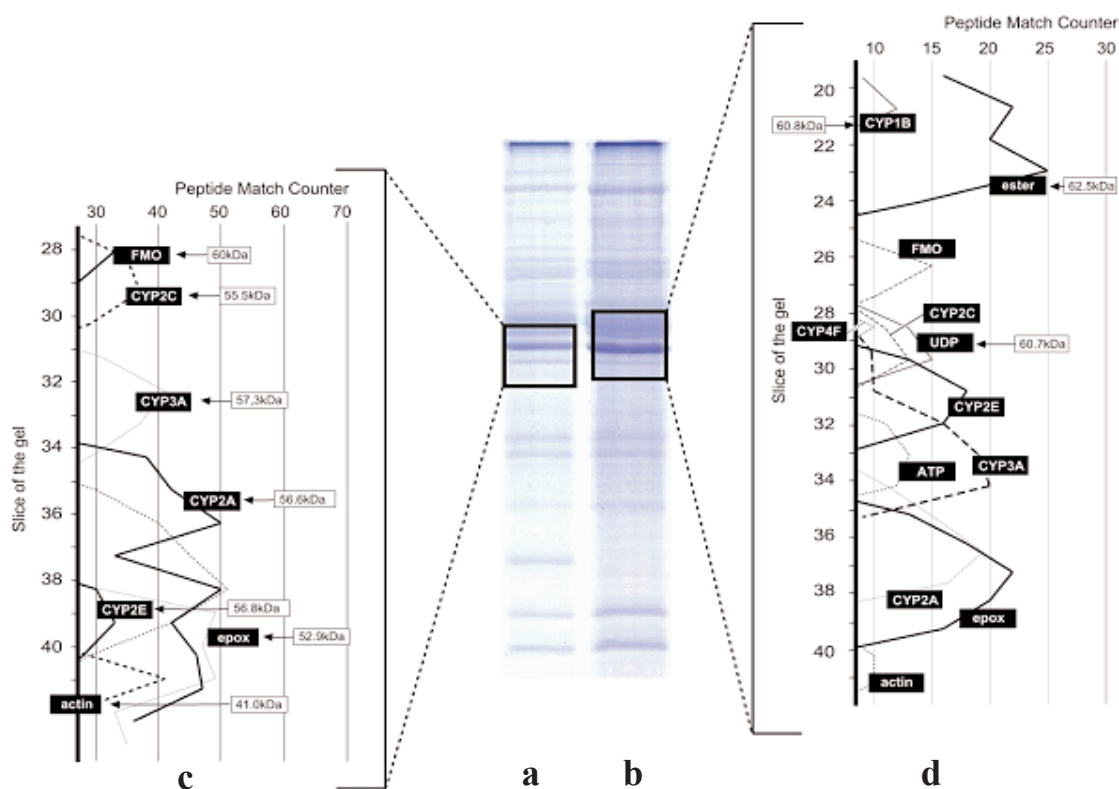


Рисунок 3.

Одномерный электрофорез микросом клеток печени человека (а, б) и масс-спектрометрические денситограммы белков (с, д). а и с – норма, б и д – патология, см. подпись к таблице 1. Электрофореграмма окрашена кумасси бриллиантовым голубым. Квадратом обозначена область масс-спектрометрического анализа (45- 66 кДа). По оси абсцисс – номера протеолитических фрагментов соответствующего белка; по оси ординат – номера срезов геля. Величина среднего молекулярного веса белка представлена в светлых прямоугольниках, название белка – в тёмных прямоугольниках. CYP – цитохром P450, ерох – эпоксидгидролаза, АТР – АТР-синтаза, FMO- флавиномоноксигеназа, ester – карбоксиэстераза, UDP- УДФ-глюкозилтрансфераза.

Как видно из таблицы 3, в контрольных образцах микросом печени человека было идентифицировано одиннадцать различных белков, из них – 9 цитохромов P450. В образцах печени при патологии было обнаружено 10 цитохромов P450. Восемь форм цитохромов P450 – CYPs 2A6, 2C8, 2C9, 2C10, 2D6, 2E1, 3A4 и 4F2 – были обнаружены в обоих случаях. Цитохромы CYPs 1B1 и 4A11 были выявлены только в образцах микросом при патологии, в то время как цитохром P4501A2 – только в норме. Наряду с цитохромами P450 в образцах печени были идентифицированы и другие гидрофобные и амфипатические белки – редокс-партнер цитохром P450-содержащей электрон-транспортной цепи – NADPH-цитохром с редуктаза, а также эпоксидгидролаза, диметиланилинмонооксигеназа и UDP-гликозилтрансфераза 2B7.

Таблица 3. Белки, идентифицированные в области 45-66 кДа на 1D-электрофореграмме микросом клеток печени человека.

| Идентификатор NCBI | Название белка | Молекулярная масса, Da | *Норма | **Патологии |
|--------------------|------------------------------|------------------------|--------|----------------|
| gi 117144 | Цитохром P450 1A2 | 58417 | + | - ^α |
| gi 1082323 | Цитохром P450 1B1 | 60845 | - | + |
| gi 6470139 | Цитохром P450 2A6 | 56736 | + | + |
| gi 87266 | Цитохром P450 2C8 | 55824 | + | + |
| gi 13699818 | Цитохром P450 2C9 | 56515 | + | + |
| gi 3915649 | Цитохром P450 2C10 | 56584 | + | + |
| gi 65661 | Цитохром P450 2D6 | 55801 | + | + |
| gi 4249653 | Цитохром P450 2E1 | 53914 | + | + |
| gi 6470135 | Цитохром P450 3A4 | 57784 | + | + |
| gi 2493371 | Цитохром P450 4A11 | 59255 | - | + |
| gi 3347823 | Цитохром P450 4F2 | 59853 | + | + |
| gi 4503583 | Эпоксидгидролаза | 53199 | + | + |
| gi 6166183 | Флаван-монооксигеназа | 60776 | - | + |
| gi 4507825 | UDP-гликозил-трансфераза 2B7 | 49470 | + | + |

Примечание: α “-” - содержание данной формы цитохрома P450 ниже порога регистрации.

В печени человека экспрессируется около 20 цитохромов P450: CYPs 1A2, 2A6, 2B6, 2C8/9/18/19, 2D6, 2E1 и 3A4/5, на долю которых приходится до 70% от общего количества гемопroteина [29]. Среди них представители подсемейств CYP2A и CYP3A наиболее распространенные, на их долю приходится, соответственно, 30% и 20% от общего количества цитохромов P450. Другие формы гемопroteина являются минорными: CYP1A2 (13%), CYP 2E1 (7%), CYP2A6 (4%), CYP2D6 (2%) и CYP 2B6 (0,2%) [29]. Большинство из перечисленных форм цитохромов P450 были нами идентифицированы, за исключением CYP2B6, количество мРНК которого составляет менее 0,2% от общего количества P450 мРНК. Кроме того, были выявлены цитохромы P450 1B1 и 4F2.

Большинство форм цитохрома P450 имеют близкие значения молекулярной массы и при SDS-электрофорезе не могут разделяться на отдельные полосы. Например, смесь различных форм цитохрома P450 микросом печени человека образовали одну широкую полосу в центре исследуемой области 1D-геля (рис. 3 а и б). В то же время масс-спектрометрическое сканирование позволило разделить эти формы и представить их в виде отдельных белковых профилей (рис. 3 с и d).

1D-протеомные карты, полученные методом молекулярного сканирования, можно сравнивать по отсутствию и/или наличию белка и его относительной позиции на геле. Например, позиция CYP2E различается (рис. 3с и 3d). На рисунке 3с CYP2E локализован в области эпоксидгидролазы (52,9 кДа), в то время как на рис. 3d CYP2E был обнаружен в области, характерной для CYP3A (56-57 кДа). Такие различия можно объяснить либо влиянием условий электрофоретического разделения на данную форму цитохрома P450 в норме и при патологии, либо модификацией CYP2E при патологии. При сравнении рисунков 3с и 3d было обнаружено, что CYP4F и UDP-гликозилтрансфераза присутствовали только в микросомах клеток печени при патологии. Кроме того, наблюдалась тенденция увеличения общего количества белка в патологической ткани по сравнению с контролем.

Ранее [25] нами была показана эффективность использования различных методов протеомного и биохимического анализов для инвентаризации цитохромов P450, выявления уровня их экспрессии в ткани печени. Появившиеся в недавнее время экспериментальные данные других авторов подтвердили наш вывод о необходимости комбинации этих методов для определения функционирования патологических клеток по сравнению с нормальными клетками, хотя достоверная корреляция между профилем белка и его ферментной активностью пока не установлена. Однако исследование биохимических функций белков является важным этапом широкомасштабной протеомики, в рамках которой болезнь или физиологическая модель анализируется с помощью различных технологий для выявления изменений протеома [30]. Изменение экспрессии белка и его активности необходимо учитывать при интерпретации данных протеомного анализа [31, 32].

В настоящей работе объектом исследования были выбраны цитохромы P450, для большинства форм которого имеются маркерные синтетические субстраты. На примере этих белков мы предприняли попытку установить корреляцию между количеством белка и его активностью. Основным этапом предлагаемого подхода является поиск соответствия между масс-спектрометрическим профилем белка, его количеством и функцией. В качестве простого способа определения количества белка предложен подсчет количества пептидов, хотя во многих случаях этот способ не давал удовлетворительных результатов. Однако для цитохромов P450, характерной особенностью которых является их способность к индукции, которая может влиять на уровень экспрессии и посттрансляционную модификацию, разработка количественного метода оценки содержания белков является перспективным направлением.

Работа поддержана грантом РФФИ № 04-04-48039 и Государственным контрактом ФЦНТП № 02.445. 11.7276.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lewis D.F.V.* (2001) *Guide to Cytochrome P450. Structure and Function.* Taylor and Francis, London and New York .
2. *Archakov A.I., Bachmanova G.I.* (1990) *Cytochrome P450 and Active Oxygen,* Taylor and Francis, London.
3. *Rozman D., Waterman M.R.* (1998) *Drug Metab. Dispos.*, **26**, 1199-1201.
4. *Whitoclock J.P.J., Denison M.S.* (1995) in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, Biochemistry* (Ortiz de Montellano P.R. ed.) Plenum Press: New York, p. 391.

5. *Patterson L.H., Murray G.J.* (2002) *Curr. Pharm. Des.*, **8**, 1335-1347.
6. *McFadyen M.C., Melvin W.T., Murray G.I.* (2004) *Mol. Cancer Ther.*, **3**, 363-371.
7. *Maurice M., Emiliani S., Dalet-Beluche I., Derancourt J., Lange R.* (1991) *Eur. J. Biochem.*, **200**, 511-517.
8. *Burke M.D., Mayer R.T.* (1983) *Chem. Biol. Interact.*, **45**, 243-258.
9. *Hover C.G., Kulkarni A.P.* (2000) *Chem. Biol. Interact.*, **124**, 191-203.
10. *Wasinger V.C., Cordwell S.J., Cerpa-Poljak A., Yan J.X., Gooley A.A., Wilkins M.R., Duncan M.W., Harris R., Williams K.L., Humphery-Smith I.* (1995) *Electrophoresis*, **16**, 1090-1094.
11. *Humphery-Smith I., Cordwell S.J., Blackstock W.P.* (1997) *Electrophoresis*, **18**, 1217-1242.
12. *Gerber S.A., Rush J., Stemman O., Kirschner M.W., Gygi S.P.* (2003) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **100**, 6940-6945.
13. *Gygi S.P., Rist B., Gerber S.A., Turecek F., Gelb M.H., Aebersold R.* (1999) *Nat. Biotechnol.*, **17**, 994-999.
14. *Vlasuk G.P., Walz F.G.J.* (1982) *Arch. Biochem. Biophys.*, **214**, 248-259.
15. *Арчаков А.И., Бачманова Г.И., Блиндер Л.В., Канаева И.П.* (1977) *Биохимия*, **42**, 100-112.
16. *Omura T., Sato R.* (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2379-2385.
17. *Pearce R.E., McIntyre C.J., Madan A., Sanzgiri U., Draper A.J., Bullock P.L., Cook D.C., Burton A., Latham J., Nevins C., Parkinson A.* (1996) *Arch. Biochem. Biophys.*, **331**, 145-169.
18. *French J.S., Coon M.G.* (1979) *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 565-577.
19. *Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.L., Randall R.I.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
20. *Yin H., Tran P., Grenberg G.E., Fischer V.* (2001) *Drug Metabolism Disposition*, **29**, 185-193.
21. *Говорун В.М., Мошковский С.А., Тихонова О.В., Гоуфман Е.И., Серебрякова М.В., Момыналиев К.Т., Лохов П.Г., Хряпова Е.В., Кудрявцева Л.В., Смирнова О.В., Торопыгин И.Ю., Максимов Б.И., Арчаков А.И.* (2003) *Биохимия*, **68**, 52-60.
22. *Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W.* (1988) *Electrophoresis*, **9**, 255-262.
23. *Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M.* (1996) *Anal. Chem.*, **68**, 850-858.
24. *Perkins D.N., Pappin D.D.J., Creasy D.M., Cottrell J.M.* (1999) *Electrophoresis*, **20**, 3551-3567.
25. *Канаева И.П., Петушкова Н.А., Лохов П.Г., Згода В.Г., Карузина И.И., Лисица А.В., Арчаков А.И.* (2004) *Биомед. химия*, **50**, 367-375.
26. *Binz P.A., Muller M., Hoogland C.* (2004) *Curr. Opin. Biotechnol.*, **15**, 17-23.
27. *Parent R., Beretta L.* (2005) *J. Hepatology*, **43**, 177-183.
28. *Santoni V., Molloy M., Rabilloud T.* (2000) *Electrophoresis*, **21**, 1054-1070.
29. *Anzenbacher P., Anzenbacherova E.* (2001) *Cell. Moll. Life Sci.*, **58**, 737-747.
30. *Graham D.R.M., Elliott S.T., Van Eyk J.E.* (2005) *J. Physiol.*, **563.1**, 1-9.
31. *Fridman E., Pichersky E.* (2005) *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 242-248.
32. *Lafaye A., Junot C., Pereira Y., Lagniel G., Tabet J-C., Ezan E., Labarre J.* (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 24723-24730.

Поступила: 31. 10. 2006.

IDENTIFICATION OF HUMAN LIVER CYTOCHROMES P450 BY USING MALDI-TOF
MASS SPECTROMETRY

*N.A. Petushkova¹, A.V. Lisitsa¹, I.I. Karuzina¹, V.G. Zgoda¹, G.F. Sheremetyeva², N.F. Samenkova¹,
I.P. Nikitin¹, T.A. Sakharova¹, A.T. Kopylov¹, A.I. Archakov¹*

¹V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul., 10, Moscow 119121, Russia;

²National Research Center of Surgery, Russian Academy of Medical Sciences, Abrikosovsky per., 2,
Moscow, 119992 Russia; e-mail: Natalia.Petushkova@ibmc.msk.ru

Proteomic approaches have been used for detection and identification of cytochromes P450 from highly-purified membrane preparations of human liver. These included the protein separation by 2D- and/or 1D-electrophoresis and molecular scanning of a SDS-PAGE gel fragment in the range of 45-66 kD (this area corresponds molecular weights of cytochromes P450). The analysis of protein content was statistically evaluated by means of original 1D-ZOOMER software package which allowed to carry out processing of mass spectra mixture instead of individual mass spectra used by standard techniques. In the range of 45-66 kDa we identified 13 microsomal membrane proteins including 11 cytochromes P450, namely CYPs 1A2, 1B1, 2A6, 2E1, 2C8, 2C9, 2C10, 2D6, 3A4, 4A11, 4F2. The microsomal samples were characterized by the enzymatic assays using the marker substrates for CYP1A, 2B, 3A4, 2C and 2E1. The 7-methoxy- and 7-ethoxyresorufin-O-dealkylase activities (i.e. the marker activities for cytochromes P450 1A1/1A2, respectively) and the erythromycin-N-demethylase activity (i.e. the marker activity for cytochrome P450 3A4) are lowered in pathology compared to these activities in norm. At the same time the benzyloxyresorufin-O-debenzylase activity (which characterizes the total activity of CYP2B and CYP2C), the activities of CYP2E1 (methanol), 7-pentoxeresorufin-O-dealkylation (CYP2B), 7-ethoxy- and 7-methoxycoumarin-O-dealkylases (CYP2B1) did not change. On the basis of the results obtained efficiency of a combination proteomic and biochemical analyses for inventory cytochromes P450 and revealing of their level expression is shown, and opportunities of mass spectrometry for a quantitative estimation of proteins are discussed.

Key words: Liver microsomes, cytochromes P450, microsomal oxidation, one-dimensional electrophoresis (1-DE), two-dimensional electrophoresis (2-DE), mass spectrometry.