



УДК 577.152.1.03 : 543.42

**РОЛЬ ГИДРОФОБНОГО ФРАГМЕНТА ЦИТОХРОМА b_5
ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ЦИТОХРОМОМ P-450****Усанов С. А.***Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск***Бендзко П., Ифайль В., Ениг Г.-Р., Рукнауль К.***Центральный институт молекулярной биологии
Академии наук ГДР, Берлин-Бух, ГДР*

Взаимодействие высокоочищенного цитохрома P-450 с нативным цитохромом b_5 исследовано методами разностной спектроскопии, кругового дихроизма и с помощью второй производной ультрафиолетовых спектров поглощения. Добавление цитохрома b_5 к цитохрому P-450 вызывает переход железа гема цитохрома P-450 из низкоспинового состояния в высокоспиновое. Комплексообразование сопровождается изменениями во второй производной спектра цитохрома P-450, что связано с участием в этом процессе остатков триптофана. Цитохром b_5 , лишенный гидрофобной части молекулы, не способен образовывать комплекс с цитохромом P-450. Полученные данные указывают на то, что гидрофобный фрагмент цитохрома b_5 , ответственный за связывание с мембраной, необходим для образования функционального комплекса с цитохромом P-450.

Электронно-транспортные системы мембран эндоплазматического ретикулума представлены двумя цепями: NADPH-специфичной цепью, которая состоит из NADPH-цитохром-P-450-редуктазы и цитохрома P-450, и NADH-специфичной, состоящей из NADH-цитохром- b_5 -редуктазы и цитохрома b_5 . Участие компонентов NADH-зависимой цепи переноса электронов в реакциях окисления микросомными ферментами [1–10] и в реконструированной системе [11–23] исследовалось с помощью кинетических [1–3, 7] и иммунохимических [4, 24, 25] методов. Основываясь на синергическом воздействии NADH на NADPH-зависимое окисление, Эстабрук впервые предположил, что цитохром b_5 непосредственно вовлекается в процесс микросомного окисления, участвуя в транспорте второго электрона на тройной комплекс: цитохром P-450—субстрат—кислород [26]. Согласно другой точке зрения, роль цитохрома b_5 в синергизме двух электронно-транспортных цепей заключается в транспорте электронов с NADH на активированные формы кислорода, возникающие в результате разобщения в микросомном окислении. Это способствует более продуктивному использованию электронов NADPH-зависимой цепи [27, 28]. Сведения о влиянии цитохрома b_5 на окисление различных субстратов противоречивы: цитохром b_5 ускоряет окисление в микросомах и в реконструированных системах одних субстратов [14, 15, 17–20, 25, 28–32] и не влияет на скорость окисления других [13, 15]. В некоторых реконструированных системах цитохром b_5 заметно замедляет окисление при участии нескольких форм цитохрома P-450 из микросом печени кролика [29] и окислительное деметилирование диметиланILINE [28]. Причина столь противоречивых данных о влиянии цитохрома b_5 на окисление различных субстратов окончательно не выяснена.

Участие цитохрома P-450 в реакциях окисления определенных субстратов предполагает наличие взаимодействия между этими двумя гемопротеидами.

Целью настоящей работы является исследование процесса взаимодействия высокоочищенной формы цитохрома P-450 из микросом печени кроликов, обработанных фенobarбиталом, с цитохромом b_5 и выяснение природы сил, обеспечивающих это взаимодействие.

Цитохром P-450, образующийся после введения животным фенobarбитала (форма LM_2), в отсутствие субстратов и других эффекторов находится в спиновом равновесии между высоко- и низкоспиновыми формами. В обычных условиях окисленный цитохром P-450 LM_2 находится преимущественно в низкоспиновой форме.

При добавлении цитохрома b_5 к окисленному цитохрому P-450 LM_2 и равной аликвоты в контрольную кювету наблюдается изменение абсолютного спектра окисленного цитохрома P-450, выражающееся в увеличении поглощения в области 390 нм. Наиболее ярко эти спектральные изменения проявляются при записи разностных спектров поглощения (рис. 1). В основном эти изменения являются следствием перехода в координационной сфере атома железа из низко- в высокоспиновое состояние. Этот переход сопровождается уменьшением поглощения в области 424 нм и увеличением поглощения при 390 нм. Таким образом, спектральные изменения, наблюдаемые при взаимодействии цитохрома P-450 LM_2 и нативного цитохрома b_5 , являются типичными спектральными изменениями первого типа, отражающими изменение в равновесии между низко- и высокоспиновыми формами при взаимодействии гемопротеидов в пользу высокоспиновой.

Из наблюдаемых спектральных изменений также следует, что они полностью связаны с изменением оптических характеристик только цитохрома P-450 и не затрагивают цитохром b_5 . Этот вывод основывается на том, что спиновый переход в железе гема цитохрома P-450 — хорошо известный факт, в то время как цитохром b_5 существует преимущественно в низкоспиновом состоянии вплоть до 45° С. Только дальнейшее повышение температуры в диапазоне 45—63° С сопровождается переходом в высокоспиновое состояние. Такой переход приводит к частичной потере нативной конформации с выходом гемовой группы на поверхность глобулы: понижение температуры приводит к восстановлению нативной конформации [33]. Вместе с тем остается непонятным механизм, приводящий к изменению спинового состояния железа гема цитохрома P-450: реализуется ли спиновый сдвиг при непосредственном взаимодействии гемовой группы цитохрома P-450 с определенными участками на молекуле цитохрома b_5 , либо взаимодействие происходит отдаленно от активного центра, а спиновый переход является результатом конформационных изменений, возникающих в молекуле цитохрома P-450 в результате комплексообразования.

Увеличение концентрации добавляемого цитохрома b_5 вызывает увеличение амплитуды спектральных изменений, достигая предела при концентрациях цитохрома b_5 , близких к концентрации цитохрома P-450 (рис. 1а). Из зависимости спектральных изменений от концентрации цитохрома b_5 в обратных координатах была определена константа диссоциации комплекса цитохрома P-450 LM_2 — цитохром b_5 , равная 8,0 мкМ, а также величина максимальных спектральных изменений — 0,0625 Å.

Эти спектральные изменения не связаны с превращением цитохрома P-450 в неактивную форму (цитохром P-420) за счет влияния остаточных количеств дезоксиголата натрия, используемого при выделении и очистке цитохрома b_5 , так как карбонильные комплексы восстановленного цитохрома P-450 до и после титрования цитохромом b_5 практически свободны от цитохрома P-420 (рис. 2а). Кроме того, исследование влияния температуры на стабильность цитохрома P-450 в свободном состоянии и в присутствии цитохрома b_5 показало, что цитохром b_5 оказывает стабилизирующее воздействие на цитохром P-450 по отношению к температуре, что, на наш взгляд, свидетельствует о комплексообразовании этих гемопротеидов, сопровождающемся повышением стабильности цитохрома P-450 (рис. 2б).

Ранее было показано [34], что взаимодействие цитохрома P-450 с NADPH-цитохром-P-450-редуктазой облегчается в присутствии субстрата. Поэтому нами было исследовано влияние субстратов цитохрома P-450 на процесс его взаимодействия с цитохромом b_5 . Присутствие в инкуба-

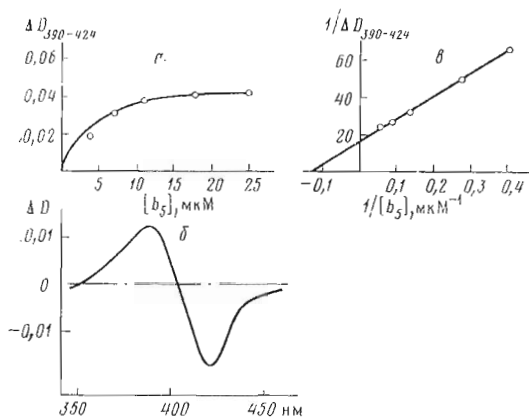


Рис. 1

Рис. 1. Разностные спектры взаимодействия цитохрома Р-450 и b_5 : а — изменение поглощения в зависимости от концентрации цитохрома b_5 (6,7 мкМ цитохром Р-450 в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4); б — спектр, возникающий при добавлении цитохрома b_5 (3,68 мкМ) к цитохрому Р-450 (7,0 мкМ); в — зависимость поглощения от концентрации цитохрома b_5 в обратных координатах

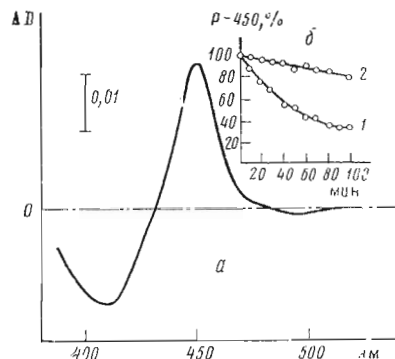


Рис. 2

Рис. 2. Спектр карбонильного комплекса цитохрома Р-450, снятый в присутствии цитохрома b_5 (а); б — инактивация цитохрома Р-450 при 42° С в свободном виде (1) и в комплексе с цитохромом b_5 (2)

ционной среде субстрата первого типа гексабарбитала (1 мМ) [32] способствует образованию комплекса между цитохромом Р-450 и нативным цитохромом b_5 , что проявляется в увеличении амплитуды спектральных изменений и в лучшей воспроизводимости результатов титрования. Напротив, субстрат второго типа, анилин [32], не оказывает влияния на процесс комплексообразования. Полученные результаты свидетельствуют о том, что факторы, способствующие изменению спинового состояния цитохрома Р-450 в пользу высокоспиновой формы, благоприятствуют и взаимодействию с цитохромом b_5 , по-видимому, за счет изменения конформации молекулы цитохрома Р-450 и его окислительно-восстановительного потенциала.

Исследование взаимодействия цитохрома Р-450 с цитохромом b_5 методом кругового дихроизма

В данной работе мы использовали метод КД для исследования взаимодействия цитохрома Р-450 с нативным цитохромом b_5 . Отличительной чертой спектров КД цитохромов Р-450 и b_5 является наличие значительной отрицательной эллиптичности в области полосы Соре, более выраженной для цитохрома Р-450. Сопоставление спектров цитохрома Р-450 и цитохрома b_5 до смешения и после него (рис. 3) свидетельствует о том, что при смешении происходит значительный сдвиг в коротковолновую область, сопровождающийся изменениями в спектре КД в области 300—400 нм. Спектральный сдвиг, наблюдаемый при взаимодействии гемопротеидов, сопровождается смещением минимума отрицательного пика с 422 до 418 нм в спектре КД. Это согласуется с изменением спинового равновесия цитохрома Р-450 в пользу высокоспиновой формы. Изменения в спектрах КД отражают изменения, происходящие в обоих хромофорах гемопротеидов. Однако в силу того, что отрицательная молярная эллиптичность цитохрома Р-450 в области полосы Соре значительно выше, чем для цитохрома b_5 , можно предположить, что основной вклад в изменения в спектрах КД вносят конформационные сдвиги, происходящие в молекуле цитохрома Р-450 при взаимодействии с цитохромом b_5 . Исследование спектров КД в ультрафиолетовой области спектра (рис. 3) показывает, что взаимодействие гемопротеидов сопровождается изменениями во вторичной структуре одного или обоих гемопротеидов. Полученные результаты подтверждают

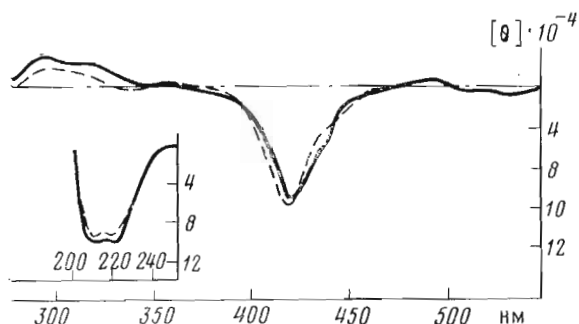


Рис. 3. Спектр КД смеси цитохрома Р-450 (24,5 мкМ) и цитохрома b_5 (28,6 мкМ) (сплошная линия) и комплекса этих цитохромов (пунктир). На врезке те же спектры в УФ-области

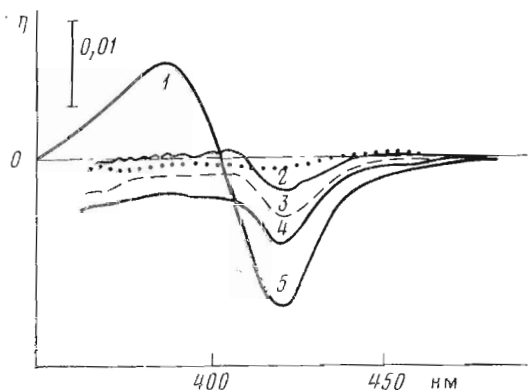


Рис. 4. Разностные спектры взаимодействия нативного ($d-b_5$) (1) и обработанного трипсином цитохрома b_5 ($\tau-b_5$) с цитохромом Р-450: [Р-450] 7 мкМ, [$d-b_5$] 1,38, [$\tau-b_5$] 3,7 (2) 5,6 (3), 7,7 (4), 9,6 мкМ (5)

выводы, сделанные исходя из данных по спектральному титрованию, и свидетельствуют о том, что комплексообразование гемопротеидов сопровождается значительными изменениями в области полосы Соре и ультрафиолетовой части спектра.

Исследование взаимодействия цитохрома Р-450 с триптическим фрагментом цитохрома b_5

Цитохром b_5 является мембраносвязанным гемопротеидом. Молекула нативного цитохрома b_5 , выделяемого посредством солиubilизации микросомных мембран детергентами, имеет минимальную молекулярную массу, равную 16 700. Цитохром b_5 , выделенный из мембран эндоплазматического ретикулума с использованием обработки их протеолитическими ферментами, имеет минимальную молекулярную массу 11 000 [23]. Таким образом, молекула цитохрома b_5 состоит из двух, относительно независимых доменов: функционально важного, гемсодержащего домена, идентичного триптическому фрагменту, и гидрофобного, ответственного за связывание с мембраной и состоящего из 30–40 гидрофобных аминокислот с С-концевой части молекулы цитохрома b_5 . Только нативный, т. е. содержащий гидрофобный фрагмент, цитохром b_5 способен встраиваться в мембранные структуры. Для того чтобы оценить роль гидрофобного фрагмента молекулы цитохрома b_5 , ответственного за связывание с мембраной, во взаимодействии с цитохромом Р-450, нами было исследовано взаимодействие цитохрома Р-450 с триптическим фрагментом цитохрома b_5 ($\tau-b_5$) (рис. 4). Оказалось, что прибавление возрастающих количеств последнего не приводит к изменению спинового равновесия цитохрома Р-450 в пользу высокоспи-

новой формы, как это имеет место в случае нативного цитохрома b_5 ($d-b_5$). Полученные данные указывают на то, что триптический фрагмент цитохрома b_5 не способен образовывать функциональный комплекс с цитохромом P-450. Таким образом, во взаимодействии цитохрома b_5 с цитохромом P-450 ЛМ₂ значительную роль играет гидрофобный фрагмент молекулы цитохрома b_5 , указывая на гидрофобный характер сил, реализующихся при комплексобразовании. Это, однако, не исключает участия электростатических взаимодействий между гемопротейдами.

Роль фосфолипидов во взаимодействии цитохрома P-450 с нативным цитохромом b_5

Фосфолипиды имеют существенное значение в процессе функционирования цитохрома P-450, способствуя взаимодействию с субстратами и NADPH-цитохромом P-450—редуктазой, а также влияя на спиновое равновесие между низко- и высокоспиновой формами и конформацию цитохрома P-450 [32, 34—37]. В этой связи нами было исследовано взаимодействие цитохрома P-450, встроенного в липосомы (приготовлены из яичного фосфатидилхолина, димиристоилфосфатидилхолина и общих микросомных фосфолипидов), с нативным цитохромом b_5 . Встраивание цитохрома P-450 в липосомы, приготовленные из яичного фосфатидилхолина и суммарных микросомных фосфолипидов, сопровождается значительным сдвигом равновесия между низко- и высокоспиновой формами цитохрома P-450 в пользу высокоспиновой. Вместе с тем встраивание цитохрома P-450 в липосомы, приготовленные с участием димиристоилфосфатидилхолина, не приводит к существенному сдвигу в спиновом равновесии.

Добавление нативного цитохрома b_5 к цитохрому P-450, встроенному в липосомы, приготовленные из разных фосфолипидов, вызывает появление дифференциального спектра первого типа, что указывает на комплексобразование гемопротейдов. Как следует из данных, приведенных в табл. 1, фосфатидилхолин и суммарные микросомные фосфолипиды способствуют комплексобразованию, что проявляется в увеличении сродства этих гемопротейдов после включения одного из них в фосфолипидные везикулы, а также в увеличении амплитуды спектральных изменений. Димиристоилфосфатидилхолин, однако, несколько уменьшая константу диссоциации комплекса цитохром P-450 — цитохром b_5 , практически не влияет на амплитуду спектральных изменений. Эти результаты согласуются с полученными нами экспериментальными данными, свидетельствующими о неспособности димиристоилфосфатидилхолина существенно изменять равновесие между высоко- и низкоспиновой формами в пользу высокоспиновой. Последняя гораздо легче образует функциональный комплекс с цитохромом b_5 . Наши результаты по взаимодействию гемопротейдов согласуются с данными [38], свидетельствующими о существовании стехиометрического комплекса 1 : 1 между мицеллярным цитохромом P-450 и нативным цитохромом b_5 . Однако, как следует из работы [38], взаимодействия между цитохромом P-450 и цитохромом b_5 в отсутствие фосфолипидов не про-

Таблица 1
Кажущиеся константы взаимодействия цитохрома b_5 с цитохромом P-450 ЛМ₂ в растворимой и мицеллярной формах

Форма цитохрома b_5	Фосфолипиды для приготовления липосом *	$K_{дис}$ мкМ	$A_{(396-421)}$
Нативный	—	8,0	0,0625
»	ФХ	5,1	0,0769
»	СМФ	5,0	0,0714
»	ДФХ	7,5	0,0630
Триптический фрагмент	—	—	—
»	ДФХ	—	—

* ФХ — фосфатидилхолин, СМФ — суммарные микросомные фосфолипиды, ДФХ — димиристоилфосфатидилхолин.

исходит. Авторы этой работы не смогли обнаружить комплексообразование между гемопротейдами в отсутствие фосфолипидов, вероятно, из-за того, что проводили титрование при 2° С. Хорошо известно, что с понижением температуры имеет место сдвиг в спиновом равновесии для цитохрома Р-450 в пользу низкоспиновой формы. Низкоспиновая форма цитохрома Р-450 гораздо хуже взаимодействует с цитохромом b_5 . Данные, полученные в работе [38], противоречат и работе [21], в которой показано, что цитохром Р-450 образует комплекс с нативным цитохромом b_5 в отсутствие фосфолипидов.

Комплексообразование между цитохромом Р-450, встроенным в мицеллы фосфолипидов, и триптического фрагментом цитохрома b_5 не происходит независимо от типа используемого фосфолипида (см. табл. 1). Таким образом, удаление гидрофобного фрагмента молекулы цитохрома b_5 не только лишает белок способности встраиваться в искусственные и естественные фосфолипидные мембраны, но и нарушает взаимодействие этого гемопротейда с цитохромом Р-450. Кроме того, наблюдаемое увеличение сродства гемопротейдов после включения цитохрома Р-450 в фосфолипидные везикулы (табл. 1) свидетельствует о том, что кроме конформационных изменений, которые проявляются в изменении спинового равновесия между высоко- и низкоспиновой формами цитохрома Р-450, значительную роль во влиянии фосфолипидов выполняют эффекты ориентации гемопротейдов, что в существенной степени способствует взаимодействию.

*Исследование взаимодействия цитохромов Р-450 ЛМ₂ и b_5
методом второй производной ультрафиолетовых
спектров поглощения*

С помощью второй производной ультрафиолетовых спектров поглощения мы исследовали роль отдельных ароматических аминокислотных остатков во взаимодействии гемопротейдов. Эта роль может быть обусловлена либо их непосредственным участием в образовании неполярных связей, либо конформационными изменениями в молекуле белка в процессе взаимодействия. Оба типа взаимодействия сопровождаются изменениями в микроокружении аминокислот, что должно проявляться во второй производной спектров поглощения. В случае второй производной спектров поглощения ароматических аминокислот наблюдается лучшее разрешение полос, присущих отдельным аминокислотам. Для сравнения и идентификации отдельных полос во второй производной спектров белков были записаны аналогичные спектры отдельных ароматических аминокислот (см. рис. 5, табл. 2). Из табл. 2 следует, что полосы, характерные для триптофана и тирозина (279,8 и 280,5 нм соответственно), перекрываются, тогда как полосы, присущие фенилаланину, находятся в более коротковолновой

Таблица 2

Сравнение полос поглощения (нм) в спектрах второй производной цитохрома Р-450 ЛМ₂, цитохрома b_5 и триптического фрагмента цитохрома b_5 с полосами поглощения во вторых производных спектров ароматических аминокислот и их смеси, имитирующей аминокислотный состав цитохрома Р-450 ЛМ₂ *

Соединение	$\lambda_{\text{макс}}$, нм										
	286,5	279,8	280,5	273	269,5	265	262	255,8	249,8	243	239
Триптофан											
Тирозин											
Фенилаланин						266	262	255,8	249,8	243	239
Смесь аминокислот											
(цитохром Р-450)	287,5	280,5	273,5			266	262	255,5	249,5	244	239
Цитохром Р-450	290,2	283,0	276,2	272,5	267,5	263	257,2	251,2	246		
Цитохром b_5	289,5	282,0	273,5		267	263	256,3	250,0			
(τ - b_5)	288,5	282,5	275,0		266,3	263	257,5	249,4	246		

* Все измерения были выполнены при комнатной температуре в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4.

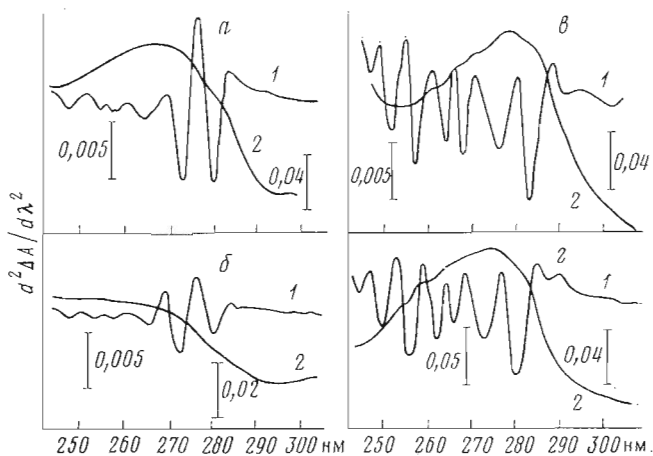


Рис. 5. Спектры поглощения (2) и их вторые производные (1) для нативного цитохрома b_5 (а), триптофического цитохрома b_5 (б), цитохрома Р-450 (в) и смеси аминокислот, имитирующей аминокислотный состав цитохрома Р-450 (г)

области. Полоса, присущая триптофану (286 нм), не перекрывается с полосами поглощения других аминокислот. Для количественной характеристики отдельных аминокислот были использованы характерные минимумы: 286,5 нм для триптофана (290,2 нм в цитохроме Р-450) и 255,8 нм для фенилаланина (257,2 нм в цитохроме Р-450). Для количественной оценки тирозина был использован минимум при 280,5 нм (283 нм для цитохрома Р-450), несмотря на наличие перекрывания с полосой триптофана. Соотношение тирозина и триптофана в цитохроме Р-450 равно 9 : 1, и поэтому минимум на 283 нм обусловлен главным образом остатками тирозина.

Для определения вклада определенных ароматических аминокислот в процессе взаимодействия гемопротейдов мы регистрировали разностные спектры второй производной при взаимодействии цитохрома Р-450 с цитохромом b_5 : спектр взаимодействия обоих гемопротейдов в опытной кювете записывался против спектров разделенных белков с помощью тандемной кюветы (рис. 6). Во всех случаях основные изменения в разностных спектрах, наблюдаемые при взаимодействии цитохромов Р-450 ЛМ₂ и b_5 , расположены в области 290 нм, что говорит об участии остатка триптофана во взаимодействии гемопротейдов. Вместе с тем добавление триптофического фрагмента цитохрома b_5 к цитохрому Р-450 ЛМ₂ не приводит к каким-либо заметным изменениям. Полученные результаты согласуются с данными спектральных исследований взаимодействия гемопротейдов в видимой области спектра. Необходимо отметить, что формы разностных спектров, возникающих при взаимодействии цитохрома b_5 с растворимым и встроенным в фосфолипидные везикулы цитохромом Р-450, существенно различаются. Так, полосы, присущие триптофану в области 290 нм, после взаимодействия с растворимым цитохромом Р-450 становятся положительными. Это указывает на то, что амплитуда полос поглощения, присущих триптофану, в спектре второй производной уменьшается в результате взаимодействия. Наоборот, при взаимодействии цитохрома b_5 с мицеллярным цитохромом Р-450 в разностном спектре наблюдается появление минимума на 290 нм и соответственно увеличивается амплитуда триптофана в спектре второй производной в результате комплексообразования вследствие увеличения неполярности данного аминокислотного остатка. Влияние фосфолипидов на характер спектров второй производной был показан и при взаимодействии цитохрома Р-450 с NADPH-цитохром-Р-450—редуктазой [39].

NADPH-цитохром-Р-450—редуктаза образует стехиометрический комплекс с цитохромом Р-450, о чем свидетельствуют данные спектрофотомет-

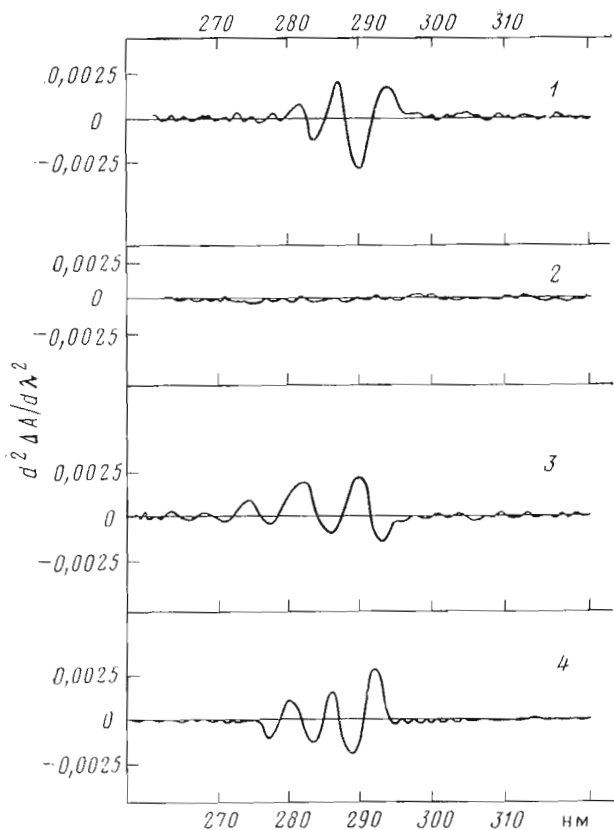


Рис. 6. Разностные спектры взаимодействия цитохрома Р-450 с нативным цитохромом b_5 (1, цитохром Р-450 встроен в фосфатидилхолиновые липосомы), с триптическим цитохромом b_5 (2), с нативным цитохромом b_5 (3) и (4, цитохром Р-450 встроен в липосомы из микросомных фосфолипидов)

рических исследований, измерения кругового дихроизма комплекса и исследования каталитической активности [34]. Удаление с помощью трипсина гидрофобного фрагмента в NADPH-цитохром-Р-450—редуктазе, выделенной с помощью неионных детергентов, лишает данный белок способности ферментативно восстанавливать цитохром Р-450 [40, 41]. Таким образом, как и в случае цитохрома b_5 , удаление фрагмента белка, ответственного за связывание с мембраной, лишает белок способности образовывать функциональный комплекс с терминальной оксидазой — цитохромом Р-450. Тот факт, что аминокислоты, входящие в состав фрагментов цитохрома b_5 и NADPH-цитохром-Р-450—редуктазы, ответственных за связывание с мембраной, имеют главным образом гидрофобный характер, позволяет предположить, что взаимодействие цитохрома Р-450 с этими белками осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий. В этой связи возникает вопрос: однозначны ли места на молекуле цитохрома Р-450, ответственные за связывание с цитохромом b_5 и NADPH-цитохром-Р-450—редуктазой? Если оба белка взаимодействуют с одним и тем же гидрофобным участком молекулы цитохрома Р-450, значит, в процессе гидроксирования оба белка, участвующие в транспорте первого и второго электронов, соответственно взаимодействуют с молекулой цитохрома Р-450 последовательно. Одноэлектронное восстановление связанного с субстратом цитохрома Р-450 в комплексе с редуктазой должно сопровождаться распадом комплекса, взаимодействием с кислородом с последующим комплексообразованием с цитохромом b_5 . Такое последовательное восстановление цитохрома Р-450 в процессе каталитического цикла практически полностью исключает образование тройного комплекса цитохрома Р-450—(NADPH-цитохром-Р-450—редуктаза)—цитохром b_5 . Напротив, при наличии разных участков связывания на молекуле цитохрома Р-450 для редуктазы и

цитохрома b_5 имеется возможность образования такого тройного комплекса. В пользу данного предположения свидетельствуют результаты экспериментов, полученные методом гель-фильтрации. Оказалось, что цитохром P-450, нативный цитохром b_5 и NADPH-цитохром-P-450—редуктаза элюируется с колонки в виде агрегата с молекулярным весом 750 000 [21].

Исследования, выполненные Рукпаулем [39] по изучению комплексообразования NADPH-цитохром-P-450—редуктазы с цитохромом P-450 с помощью метода второй производной ультрафиолетовых спектров поглощения, свидетельствуют о вовлечении в процесс комплексообразования остатков тирозина молекулы цитохрома P-450. Полученные нами результаты по взаимодействию цитохрома P-450 с нативным цитохромом b_5 указывают на участие в процессе комплексообразования также единственного остатка триптофана молекулы цитохрома P-450.

Таким образом, прямо или косвенно в процесс комплексообразования цитохрома P-450 с NADPH-цитохром-P-450—редуктазой и цитохромом b_5 вовлекаются разные аминокислотные остатки. Это позволяет предположить существование разных участков на молекуле цитохрома P-450, ответственных за комплексообразование с другими компонентами электронно-транспортной цепи. Следует отметить также, что гидрофобные фрагменты, участвующие во взаимодействии с цитохромом P-450, по-разному распределены в молекулах цитохрома b_5 и NADPH-цитохром-P-450—редуктазы. Во флавопротеиде данный участок находится на N-концевой части молекулы [42], тогда как в цитохроме b_5 —на C-концевой последовательности [43].

Влияние цитохрома b_5 на реакции окисления с участием цитохрома P-450 в существенной степени зависит от целого ряда факторов, таких, как природа субстрата, наличие или отсутствие в реконструированной системе фосфолипидов, форма цитохрома P-450. В этой связи принципиальная важность гидрофобных взаимодействий, необходимых для образования комплекса цитохрома P-450 и нативного цитохрома b_5 , не позволяет, однако, исключить участие электростатических взаимодействий в процессе комплексообразования гемопротеидов. Известно, что скорость транспорта электронов с цитохрома b_5 на оксикомплекс цитохрома P-450 в существенной степени зависит от pH и ионной силы среды [44], а ингибирующий эффект антител к цитохрому b_5 на реакцию окисления с участием цитохрома P-450 проявляется только при низких значениях pH и ионной силы, т. е. только тогда, когда осуществляется взаимодействие между гемопротеидами. Эти результаты косвенно указывают на участие электростатических взаимодействий при электронном транспорте с цитохрома b_5 на цитохром P-450 в микросомной мембране. Отсутствие спектральных изменений при добавлении гидрофильного фрагмента молекулы цитохрома b_5 к цитохрому P-450 свидетельствует о том, что между гемопротеидами нет каталитического или иного взаимодействия. Цитохром P-450, обладающий сродством к цитохрому b_5 , эффективно взаимодействует с иммобилизованными нативным и триптическим цитохромами b_5 , причем во взаимодействии гемопротеидов участвуют как гидрофобные, так и электростатические силы [30]. Однако тот факт, что иммобилизованный триптический фрагмент молекулы цитохрома b_5 обладает гораздо более высоким сродством к цитохрому P-450, чем растворимый белок, говорит о том, что в ходе иммобилизации изменяются электростатические свойства белка и взаимодействие носит, по-видимому, неспецифический характер. Вместе с тем пока не имеется достаточно оснований для того, чтобы однозначно отрицать участие электростатических взаимодействий при комплексообразовании гемопротеидов. Тот или другой тип взаимодействия может в значительной степени зависеть от формы цитохрома P-450, используемой в эксперименте. Так, например, цитохром P-450 $11M_2$, получаемый из микросом печени кроликов после индукции фенобарбиталом, не взаимодействует ни с нативным, ни с триптическими цитохромами b_5 , иммобилизованными на нерастворимой матрице.

Взаимодействие мембранно-связывающего фрагмента молекулы цитохрома b_5 с молекулой цитохрома P-450 может осуществляться несколько-

ми способами: 1) фрагмент выполняет роль якоря, ориентируя молекулу цитохрома b_5 должным образом относительно молекулы цитохрома P-450, что способствует их взаимодействию; 2) гидрофобный фрагмент цитохрома b_5 взаимодействует со строго определенным участком на молекуле цитохрома P-450. Исследование способа взаимодействия гидрофобного фрагмента NADPH-цитохром-P-450—редуктазы с цитохромом P-450 не позволяет отдать предпочтение тому или другому способу взаимодействия. Так, небольшой гидрофобный фрагмент NADPH-цитохром-P-450—редуктазы, выделенной из микросом печени кроликов, получаемый после обработки нативного белка трипсином, является эффективным ингибитором реакции окисления в реконструированной системе [45]. Это указывает на то, что данный гидрофобный фрагмент и NADPH-цитохром-P-450—редуктаза конкурируют за одно и то же место связывания на молекуле цитохрома P-450. В то же время мембранный фрагмент NADPH-цитохром-P-450—редуктазы, выделенной из микросом печени крыс, не конкурирует с нативной редуктазой за связывание с цитохромом P-450, о чем свидетельствует его неспособность ингибировать гидроксилирование в реконструированной системе [42]. Вероятно, в данном случае гидрофобный фрагмент NADPH-цитохром-P-450—редуктазы микросом печени крыс не вовлекается в специфическое взаимодействие с цитохромом P-450. Разница в эффектах гидрофобных фрагментов NADPH-цитохром-P-450—редуктазы микросом печени кроликов и крыс на окисление в реконструированной системе остается, однако, непонятной. Связано ли это с видовыми отличиями, использованием разных форм цитохрома P-450 или с условиями проведения экспериментов, необходимо выяснить. В случае же цитохрома b_5 роль гидрофобного фрагмента гемопротеида заключается в обеспечении оптимальных условий для взаимодействия гемопротеидов посредством гидрофобных взаимодействий, которое может сопровождаться непосредственным гем-гемовым контактом.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что гидрофобный фрагмент цитохрома b_5 , ответственный за связывание гемопротеида с мембраной, необходим для образования функционального комплекса с цитохромом P-450 ЛМ₂, а остаток триптофана молекулы цитохрома P-450 непосредственно вовлекается в процесс комплексообразования.

Экспериментальная часть

Цитохром P-450 ЛМ₂ из микросом печени кроликов, индуцированных фенотбарбиталом, был выделен по методу, описанному ранее [39]. Препаратом гомогенен по данным электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия и характеризуется удельным содержанием цитохрома P-450 15—16 нмоль/мг белка. Препараты цитохрома P-450 практически не содержат примесей фосфолипидов и детергента.

Нативный цитохром b_5 выделяли с помощью неионных детергентов из микросом печени кроликов как описано ранее [23, 43]. Протеолитический фрагмент цитохрома b_5 получали по методу, описанному в работе [43], с некоторыми модификациями. Солубилизацию микросом трипсином и химотрипсином осуществляли при соотношении 10 мг фермента на 1 г микросом при 4°С в течение 14—16 ч. Реакцию останавливали добавлением ингибитора трипсина. Обогащенные цитохромом b_5 фракции собирали с помощью хроматографии на ДЕАЕ-сефадексе А-25 вместо процедуры лиофилизации. Конечный препарат протеолитического цитохрома b_5 мигрирует одной полосой при электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия.

Встраивание цитохрома P-450 в липосомы проводили с помощью метода [46]. Липиды тщательно упаривали для удаления следов органического растворителя, солубилизировали в 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,2) с помощью холата натрия, инкубировали в течение 60 мин и подвергали хроматографии на сефадексе G-50. Цитохром P-450, встроенный в липосомы, элюировали в свободном объеме колонны.

Взаимодействие белков оценивали по изменениям, происходящим в ультрафиолетовой части спектра поглощения, с помощью второй производной этих спектров по методу [39].

Все спектрофотометрические исследования были выполнены на двухлучевом спектрофотометре UV-300 (Shimadzu, Япония) с использованием приставки для записи вторых производных спектров поглощения DES-1. В работе использовали тандемные кюветы с длиной оптического пути 0,874 см или четыре кварцевые кюветы с длиной оптического пути 0,5 см каждая. Стандартные условия для измерения второй производной спектров поглощения в ультрафиолетовой области спектра: скорость сканирования 75 нм/мин, $\Delta\lambda$ 2 нм, время ответа 0,05 с. Разностные спектры второй производной были аккумулированы 10 раз с помощью микропроцессора Sarcos-1.

Влияние цитохрома b_5 на спиновое равновесие цитохрома P-450 LM₂ исследовали с помощью разностной спектрофотометрии. Цитохром P-450, свободный от фосфолипидов или встроенный в липосомы, в 0,1 М калий-фосфатном буфере, pH 7,4, помещали в первый отсек контрольной и опытной кювет. Равный объем буфера помещали во второй отсек обеих кювет. В процессе титрования соответствующие количества концентрированного раствора цитохрома b_5 добавляли в первый отсек опытной и во второй отсек контрольной кювет. Одновременно равные количества буферного раствора добавляли во второй отсек опытной и в первый отсек контрольной кювет. После каждого добавления регистрировали разностные спектры комплекса цитохром P-450 — цитохром b_5 вплоть до достижения равновесия (5–10 мин). Спектральные константы диссоциации комплекса цитохром P-450 — цитохром b_5 определяли из зависимости обратных величин спектральных изменений от обратной концентрации цитохрома b_5 .

Спектры кругового дихроизма цитохрома P-450 и нативного цитохрома b_5 регистрировали при комнатной температуре на спектрополяриметре Jasco-20 (Япония), используя кюветы с длиной оптического пути 5 мм для регистрации спектров в видимой области и 2 мм для записи спектров в ультрафиолетовой части спектра.

Димиристоилфосфатидилхолин был получен от фирмы Calbiochem (США). Общие микросомные фосфолипиды были любезно предоставлены доктором Ю. Бланком (Центральный институт молекулярной биологии АН ГДР, Берлин-Бух), а фосфатидилхолин — М. А. Киселем (Институт биоорганической химии АН БССР, Минск).

Авторы выражают благодарность Г. С. Янковской за помощь в регистрации спектров кругового дихроизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Enomoto K., Sato R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, v. 51, № 1, p. 1–7.
2. Hrycay E. G., Estabrook R. W. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 60, № 2, p. 771–778.
3. Jansson J., Schenkman J. B. Mol. Pharmacol., 1973, v. 9, № 4, p. 840–845.
4. Sasame H. A., Thorgeisson S. S., Mitchell J. R., Gillette J. R. Life Sci., 1974, № 1, p. 35–46.
5. Sasame H. A., Thorgeisson S. S., Menard R. H., Hinson J. A., Mitchell J. J., Gillette J. R. Fed. Proc., 1975, v. 33, № 5, 1437.
6. Sasame H. A., Thorgeisson S. S., Mitchell J. R., Gillette J. R. In: Cytochrome P-450 and b_5 / Eds Cooper D. Y. et al. New York: Plenum Press, 1975, p. 435–445.
7. Strittmatter P., Rogers M. J., Spatz L. J. Biol. Chem., 1972, v. 247, № 15, p. 7188–7194.
8. Hrycay E. G. Fed. Proc., 1974, v. 33, № 4, p. 1288.
9. Cinti D. L., Ozols J. In: Cytochrome P-450 and b_5 / Eds Cooper D. Y. et al. New York: Plenum Press, 1975, p. 467–483.
10. Werringer J., Kawano S. In: Microsomes, Drug Oxidation, and Chemical Carcinogenesis / Eds. Coon M. J. et al. New York: Acad. Press, 1980, v. 1, p. 469–476.
11. Lu A. Y. H., Lewin W., West S. B., Vore M., Ryan D. J. Biol. Chem., 1974, v. 249, № 12, p. 6701–6709.
12. Lu A. Y. H., Lewin W., West S. B., Vore M., Ryan D., Kuntzman R., Conney A. H. In: Cytochrome P-450 and b_5 / Eds Cooper D. Y. et al. New York: Plenum Press, 1975, p. 447–466.
13. West S. B., Lewin W., Ryan D., Vore M., Lu A. Y. H. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 58, № 2, p. 516–522.
14. Ingelman-Sundberg M., Johansson J. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 97, № 2, p. 582–589.
15. Brunström A., Ingelman-Sundberg M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 95, № 2, p. 431–439.

16. *Kawahara S.-J., Omura T.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 96, № 4, p. 1562-1568.
17. *Vatsis K., Theoharides A. D., Kupfer D., Coon M. J.* In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450/Eds Gustafsson J. A. et al. Amsterdam: Elsevier/Noth-Holland Biomed. Press, 1980, p. 73-76.
18. *Ingelman-Sundberg M., Johanson A., Brunström A., Ekström G., Haaparanta T., Rydström J.* In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450/Eds Gustafsson J. A. et al. Amsterdam: Elsevier/Noth-Holland Biomed. Press, 1980, p. 299-306.
19. *Vatsis K., Gurka D. P., Hollenberg P. F.* In: Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P-450/Eds Gustafsson J. A. et al. Amsterdam: Elsevier/Noth-Holland Biomed. Press, 1980, p. 347-350.
20. *Imai Y. J.* Biochem., 1981, v. 89, № 2, p. 351-362.
21. *Chiang J. Y. L.* Arch. Biochem. and Biophys., 1981, v. 214, № 2, p. 662-673.
22. *Усанов С. А., Курченко В. П., Мегелица Д. И.* Биоорг. химия, 1982, т. 8, № 5, с. 630-642.
23. *Spatz L., Strittmatter P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1971, v. 68, № 4, p. 1042-1046.
24. *Mannering G. J., Kuwahara S., Omura T.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1974, v. 57, № 2, p. 476-481.
25. *Noshiro M., Harada N., Omura T.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 91, № 1, p. 207-213.
26. *Hilderbrandt A., Estabrook R. W.* Arch. Biochem. and Biophys., 1971, v. 143, № 1, p. 66-79.
27. *Staudt H., Lichtenberger F., Ullrich V.* Eur. J. Biochem., 1974, v. 46, № 1, p. 99-106.
28. *Азрем А. А., Усанов С. А., Мегелица Д. И.* Докл. АН БССР, т. 22, № 3, с. 275-278.
29. *Imai Y. J.* Biochem., 1979, v. 86, № 6, p. 1697-1707.
30. *Miki N., Sugiyama T., Yamano T. J.* Biochem., 1980, v. 88, № 2, p. 307-316.
31. *Курченко В. П., Усанов С. А., Мегелица Д. И.* Изв. АН БССР. Сер. хим. наук, 1982, № 2, с. 71-78.
32. *Schenkman J. B., Sligar S. G., Cinti D. L.* Pharm. Ther., 1981, v. 12, p. 43-71.
33. *Sugiyama T., Miura R., Yamano Y., Shida K., Watari H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980, v. 97, № 1, p. 22-27.
34. *French J. S., Guengerich F. P., Coon M. J.* J. Biol. Chem., 1980, v. 255, № 9, p. 4112.
35. *Shimizu T., Nozawa T., Hatano M., Satake H., Imai Y., Hashimoto C., Sato R.* Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 579, № 1, p. 122-133.
36. *Chiang Y. L., Coon M. J.* Arch. Biochem. and Biophys., 1979, v. 195, № 1, p. 178-187.
37. *Азрем А. А., Усанов С. А., Руселев П. А., Русель М. А., Мегелица Д. И.* Докл. АН СССР, 1979, т. 245, № 1, с. 234-238.
38. *Bonfils C., Bulny C., Maurel P. J.* Biol. Chem., 1981, v. 256, № 18, p. 9457-9465.
39. *Ruckpaul K., Rein H., Ballow D. P., Coon M. J.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 626, № 1, p. 41-56.
40. *Gum J. R., Strobel H. W.* J. Biol. Chem., 1979, v. 254, № 10, p. 4177-4185.
41. *French J. S., Black C. H., Williams I., Coon M. J.* In: Microsomes, Drug Oxidation and Chemical Carcinogenesis/Eds Coon M. J. et al. New York: Acad. Press, 1980, v. 1, p. 387-390.
42. *Gum J. R., Strobel H. W.* J. Biol. Chem., 1981, v. 256, № 14, p. 7478-7486.
43. *Bendzko P., Pfeil W.* Acta biol. med. Germ., 1980, v. 39, № 1, p. 47-53.
44. *Noshiro M., Ullrich V., Omura T.* Eur. J. Biochem., 1981, v. 116, № 3, p. 521-526.
45. *Black S. D., French J. S., Williams C. H., Coon M. J.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1979, v. 91, № 4, p. 1528-1535.
46. *Ingelman-Sundberg M., Glauman H.* Biochim. et biophys. acta, 1980, v. 599, № 3, p. 417-435.

Поступила в редакцию 13.VII.1982
После доработки 26.X.1982

ROLE OF CYTOCHROME b_5 HYDROPHOBIC FRAGMENT IN THE INTERACTION WITH CYTOCHROME P-450

USANOV S. A., BENDZKO P., PFEIL W., JÄNIG G.-R., RUCKPAUL K.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Minsk; Central Institute of Molecular Biology,
Berlin-Buch, GDR*

The interaction of highly purified liver microsomal cytochrome P-450 from phenobarbital-induced rabbits and cytochrome b_5 has been investigated by the difference and second derivative difference spectroscopy. The addition of cytochrome b_5 to cytochrome P-450 results in transition of cytochrome P-450 heme iron from low to high spin state. The interaction is accompanied by the changes in the second derivative spectrum of cytochrome P-450, which point to the participation of tryptophanyl residues in this process. The hydrophilic fragment of cytochrome b_5 is unable to form a complex with cytochrome P-450 as judged by the absence of the difference spectrum and any changes in the second derivative UV-spectrum of cytochrome P-450. The evidence obtained indicates that the hydrophobic tail of the cytochrome b_5 molecule responsible for its binding to membrane is also indispensable for forming a functional cytochrome P-450 - cytochrome b_5 complex.