



УДК 577.152.1'136.088.5

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СУБСТРАТОВ
С ЦИТОХРОМОМ Р-450 МЕТОДОМ УФ-
И ¹H-ЯМР-СПЕКТРОСКОПИИ

Вольдман Я. Ю., Гуляева Л. Ф., Вайнер Л. М.*, Ляхович В. В

Институт клинической и экспериментальной медицины
Сибирского отделения Академии медицинских наук СССР, Новосибирск;* Институт химической кинетики и горения Сибирского отделения
Академии наук СССР, Новосибирск

Для изучения комплексов цитохрома Р-450 с аминопирином (субстрат типа I) и 4-метоксапиридином (субстрат типа II) использовано ускорение продольной релаксации протонов субстратов в присутствии Р-450. Показано, что константа диссоциации комплекса, величина T_1 в комплексе и/или время его жизни могут быть определены из зависимостей T_1 протонов субстрата от концентрации субстрата. Полученные времена релаксации в комплексе (T_{1M}) использованы для вычисления расстояний от разных групп протонов до иона Fe^{3+} в активном центре Р-450. Для аминопирина расстояние от всех групп ~ 8 Å. Для 4-метоксипиридина не удалось подтвердить гипотезу о прямой координации пиридинового азота с ионом железа. Проведено сравнение Р-450 с энзиматически неактивной формой — цитохромом Р-420 и метмиоглобином.

Под термином «цитохром Р-450» в настоящее время понимается семейство ферментов, локализованных преимущественно в печени животных [1]. Цитохром Р-450 активирован молекулярный кислород и окисляет большое количество чужеродных веществ, поступающих в организм. Реакция связывания субстратов является первой в последовательности реакций цитохрома Р-450 и, возможно, представляет собой ключ к пониманию «универсальности» этого фермента, выражающейся в том, что каждая его изоформа способна с большей или меньшей эффективностью окислять широкий круг субстратов. Комплексы цитохрома Р-450 с субстратами легко регистрировать по УФ-спектрам в области полосы Soret, отличным от спектра свободного Р-450; это позволяет разделить все соединения, влияющие на спектр Р-450, на две группы [2]. Связывание субстратов типа I сопровождается сдвигом полосы Soret в коротковолновую область или, что то же самое, появлением в дифференциальном спектре поглощения [(Р-450+субстрат) — Р-450] (так называемый спектр связывания) максимума в области 385—390 нм; при связывании субстратов типа II в дифференциальном спектре наблюдается максимум при 420—425 нм. Соответственно различают спектры связывания типа I и II. Зависимость амплитуды спектра связывания от концентрации субстрата имеет гиперболический характер. Из такой зависимости может быть рассчитана так называемая «спектральная константа связывания» (K_S), имеющая смысл константы нестойкости фермент-субстратного комплекса. Спектрофотометрическому изучению комплексов Р-450 с субстратами посвящено большое количество работ [3, 4]. Информация о взаимном расположении различных групп окисляемого субстрата и иона Fe^{3+} в активном центре цитохрома Р-450 необходима для понимания механизма катализа и субстратной специфичности различных форм Р-450. Однако спектрофотометрические методы не могут дать такую информацию. Наличие естественной парамагнитной метки — иона Fe^{3+} в активном центре позволяет исследовать геометрию комплекса Р-450 — субстрат также методами ЭПР [5] и ЯМР [6, 7].

Сокращения: Р-450_{сам} — цитохром Р-450 из *Pseudomonas putida*, гидроксигирующей камфору.

Применение метода ЯМР в данном случае основано на ускорении релаксации протонов субстрата (T_1 и T_2) вблизи быстро релаксирующего электронного спина иона Fe^{3+} . Наблюдая ускорение релаксации протонов субстрата в присутствии парамагнитного белка, можно в принципе вычислить расстояния от каждой группы магнитно-эквивалентных протонов субстрата до иона Fe^{3+} , т. е. определить геометрию фермент-субстратного комплекса.

Особый интерес в связи с выделением в последние годы множества индивидуальных изоформ цитохрома Р-450 представляет анализ взаимодействия субстратов с различными формами этого фермента как возможный ключ, во-первых, к пониманию природы каталитической специфичности этих форм и, во-вторых, к изучению различий в координационной структуре иона Fe^{3+} , вызывающих эту специфичность. В данной работе мы использовали метод ЯМР и оптическую УФ-спектроскопию для изучения взаимодействия ряда субстратов с суммарными фракциями и электрофотетически гомогенными формами цитохрома Р-450, с цитохромом Р-420 — энзиматически неактивной формой фермента, а также с миоглобином, используя последний в качестве модели гем-белка.

Теория

Релаксация ядра вблизи парамагнитного иона описывается уравнением Соломона — Бломбергена [8, 9]

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2S(S+1)\gamma_I^2 g^2 \beta^2}{15r^6} \left[\frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{7\tau_c}{1 + \omega_S^2 \tau_c^2} \right] + \frac{2S(S+1)A^2}{3\hbar^2} \left[\frac{\tau_e}{1 + \omega_S^2 \tau_e^2} \right]. \quad (1)$$

Здесь T_{1M} — время релаксации ядра вблизи иона; r — расстояние от ядра до иона; τ_c , τ_e — времена корреляции соответственно диполь-дипольного и сверхтонкого электрон-ядерного взаимодействий; ω_I , ω_S — ларморовские частоты для ядра и электрона; A — константа СТВ данного ядра с электроном; S — спин парамагнитного иона; γ_I — гиромангнитное отношение ядра; g — средний g -фактор иона; \hbar — постоянная Планка, деленная на 2π .

Если все другие механизмы релаксации, за исключением парамагнитной, несущественны, то наблюдаемая скорость релаксации $1/T_{1M}$ будет [10]

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{\alpha}{T_{1M} + \tau}, \quad (2)$$

где α — мольная доля комплекса (отношение концентрации комплекса к общей концентрации субстрата в растворе), τ — время жизни комплекса. Уравнение (2) предполагает, что $\alpha \ll 1$, и, следовательно, наблюдается релаксация сигнала свободного субстрата, обменивающегося с субстратом в комплексе. Подставляя в уравнение (2) выражение для мольной доли, а также учитывая вклад других механизмов в скорость релаксации субстрата, получаем

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{1}{T_{1d}} + \frac{P}{T_{1M} + \tau} \frac{1}{K_D + S'}, \quad (3)$$

где $1/T_{1d}$ — скорость релаксации, не зависящая от концентрации субстрата; P — концентрация парамагнитных центров (белка); K_D — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса; S' — концентрация субстрата. Видно, что уравнение (3) позволяет из зависимости T_{1M} от S' при постоянной концентрации белка получить в качестве параметров $\frac{1}{T_{1d}}$,

$\frac{P}{T_{1M} + \tau} K_D$. При определенных условиях вклад величин T_{1M} и τ в их сумму можно определить, используя их различную температурную зависимость. Скорость обмена $1/\tau$ следует обычной аррениусовской зависимости:

$$1/\tau = K \cdot \exp(-E_{ex}/kT). \quad (4)$$

T_{1M} зависит от температуры через τ_c (уравнение 1), которое в данном случае равно τ_s — времени спиновой релаксации иона Fe^{3+} (см., например, [6]). Температурную зависимость τ_s также можно записать в экспоненциальном виде:

$$1/\tau_s = K' (\exp(-E_s/kT)). \quad (5)$$

$E_s \approx 1,5$ ккал/моль [19]. В результате (поскольку при $\omega_I^2 \tau_c^2 \ll 1$ T_{1M} приближенно пропорционально $1/\tau_c$, уравнение 1) зависимость T_{1M} и τ от температуры оказывается противоположной. А именно: при повышении температуры T_{1M} увеличивается, а τ уменьшается. Таким образом, можно экспериментально отличить область быстрого ($T_{1M} \gg \tau$) и медленного ($T_{1M} \ll \tau$) обмена [10].

Результаты

При взаимодействии аминопирина (который N-деметируется цитохромом P-450) с ω -аминооктил-фракцией цитохрома P-450, выделенного из печени крыс, индуцированных фенобарбиталом, в УФ-видимой области наблюдается спектр связывания типа I, K_S равна 5 мМ. 1H -ЯМР-спектр аминопирина и его структурная формула приведены на рис. 1. При добавлении цитохрома P-450 скорость релаксации всех групп субстрата увеличивается (рис. 2), причем примерно в равной степени. (Для фенильного мультиплета использовали средневзвешенное значение T_{1c} .) Зависимость скорости релаксации протонов от концентрации аминопирина (рис. 3) позволяет по формуле (3) найти K_D и $(T_{1M} + \tau)^{-1}$ (табл. 1). Из температурной зависимости времен спин-решеточной релаксации протонов аминопирина (табл. 1) следует, что все группы (за исключением NCH_3) находятся в области быстрого либо промежуточного обмена. Противоположное поведение группы NCH_3 объясняется, по-видимому, погрешностью эксперимента. На такую возможность указывает большое ($>70\%$ величины) среднеквадратичное отклонение данного значения. Таким образом, можно считать величины $(T_{1M} + \tau)$ примерно равными T_{1M} .

При взаимодействии аминопирина с электрофоретически гомогенной формой P-450_b (основная фенобарбиталиндуцируемая форма в печени крыс) и аналогичной ей формой LM₂ из печени кролика спектр связывания типа I отсутствовал, а влияние фермента на T_1 различных групп аминопирина было весьма незначительно ($(T_{1M} \pm \tau)^{-1} \ll 20$ Гц).

При связывании 4-метоксипиридина с ω -аминооктил-фракцией цитохрома P-450 наблюдается спектр связывания типа II, $K_S = 4,5$ мМ. Зависимость скорости релаксации протонов 4-метоксипиридина от концентрации P-450 (рис. 4) указывает на более быструю релаксацию α -протонов в присутствии P-450. Зависимости скорости релаксации протонов от концентрации 4-метоксипиридина (рис. 5) позволяют вычислить $(T_{1M} + \tau)$ в комплексе, а температурные зависимости T_{1H} — определить, что $\tau \gg T_{1M}$ для α -протонов («медленный обмен»). Это позволяет считать для α -протонов $(T_{1M} + \tau) \approx \tau$. Учитывая, что время жизни в комплексе (τ) должно быть

Таблица 1

Параметры связывания аминопирина с цитохромом P-450 *

Температура, К	Параметры	CCH_3	$N(CH_3)_2$	NCH_3	Ph
287,2	T_{1d}^{-1} , Гц	1,38±0,013	1,55±0,17	1,38±0,05	1,02±0,03
	$(T_{1M} + \tau)^{-1}$, Гц	123±13	230±170	70±52	168±30
	K_D , М	0,020			
294,2	T_{1d}^{-1} , Гц	1,28±0,014	1,37±0,013	1,08±0,02	0,93±0,03
	$(T_{1M} + \tau)^{-1}$, Гц	62±10	128±10	131±14	136±25
	K_D , М	0,013			

* В табл. 1, 2 приведены значения величин \pm среднеквадратичная ошибка.

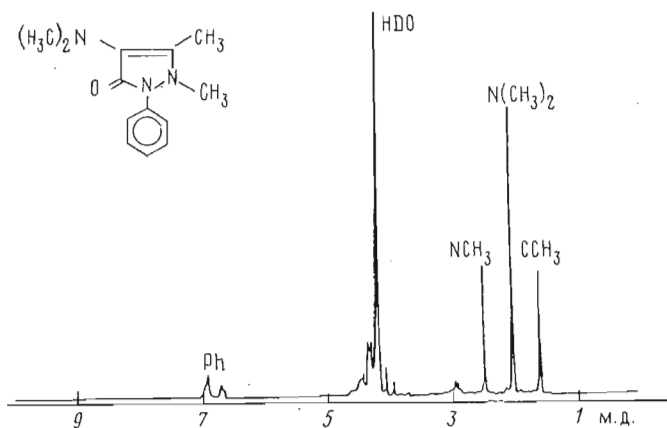


Рис. 1. Спектр ^1H -ЯМР 0,1 М раствора аминопиридина; К-фосфатный D_2O -буфер, $\text{pH}_{\text{obs}} 7,5$

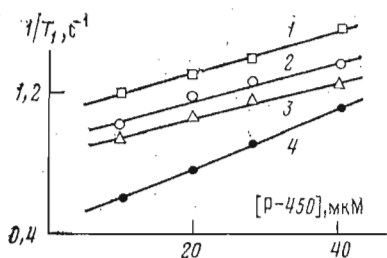


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость скоростей релаксации протонов $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ - (1), CCH_3 - (2), NCH_3 - (3) и C_6H_5 -групп (4) от концентрации цитохрома Р-450

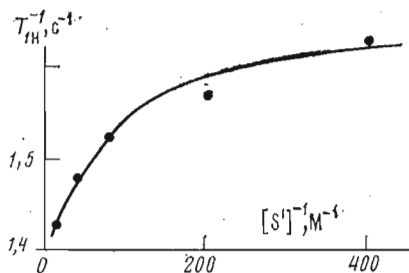


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость скорости релаксации протонов $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ -группы аминопиридина от его концентрации. 0,1 М К-фосфатный буфер, $\text{pH}_{\text{obs}} 7,5$; 294 К, $[\text{P-450}] = 3 \cdot 10^{-5}$ М. Кривая рассчитана по параметрам, приведенным в табл. 1

одинаковым для всех групп одной молекулы, T_{1M} для β - и OCH_3 -групп может быть вычислено путем вычитания полученной величины τ из суммарного значения $(T_{1M} + \tau)$ (рис. 6, табл. 2).

В результате анализа спектров связывания этого же субстрата с электрофоретически гомогенными формами Р-450_b и LM₂ было установлено, что K_s зависит от концентрации субстрата (табл. 3). Зависимости T_{1M} от концентрации Р-450, 4-метоксипиридина и температуры качественно остаются такими же, как для ω -аминооктил-фракции, но величины $(T_{1M} + \tau)^{-1}$ значительно меньше (табл. 4) и близки для Р-450_b и LM₂. Было изучено взаимодействие 4-метоксипиридина с неактивной формой Р-450 — цитохромом Р-420, полученным при обработке цитохрома Р-450 концентриро-

Таблица 2

Скорость релаксации в комплексе и расстояния от иона Fe^{3+} до различных групп 4-метоксипиридина для суммарной фракции фенобарбиталового Р-450

Группа	$(T_{1M} + \tau)^{-1}$, Гц	$r(\text{H}-\text{Fe}^{3+})$, Å	
		эксперимент	модель *
OCH_3	830 ± 80	$5,3 \pm 0,2$	6,4
$\beta\text{-CH}$	1100 ± 350	$5,0 \pm 0,5$	5,1
$\alpha\text{-CH}$	2800 ± 600	$< 4,6$	3,0

* Прямая координация 4-метоксипиридин(N)— Fe^{3+} , ось симметрии 2-го порядка молекулы пиридина перпендикулярна плоскости гема.

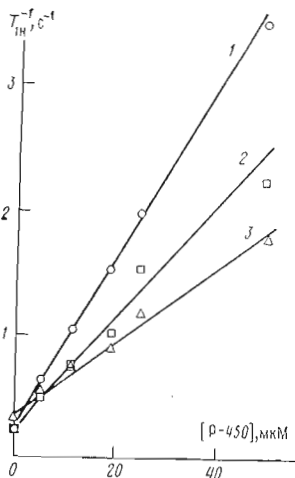


Рис. 4

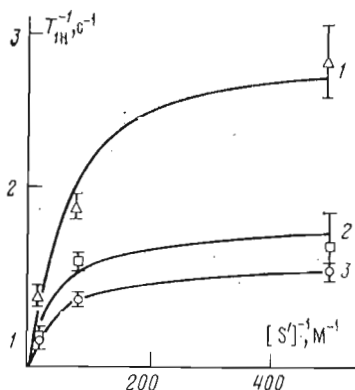


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость скорости релаксации протонов α -CH- (1), β -CH- (2) и OCH_3 - групп (3) 4-метоксипиридина от концентрации цитохрома P-450. 0,1 М К-фосфатный D_2O -буфер, $\text{pH}_{\text{obs}} 7,5$, 294 К, [4-метоксипиридин] = 4,3 мМ

Рис. 5. Зависимость скорости релаксации протонов 4-метоксипиридина (обозначения как на рис. 4) от его концентрации (294 К, [P-450] = $2,3 \cdot 10^{-5}$ М). Кривые рассчитаны по параметрам, приведенным в табл. 2

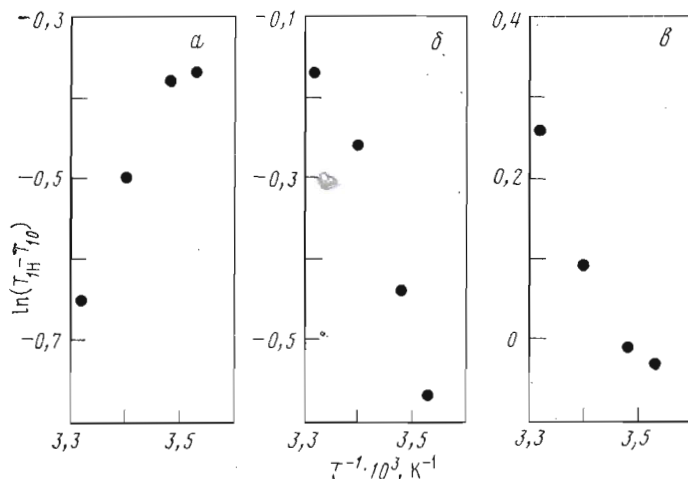


Рис. 6. Зависимость скорости релаксации протонов OCH_3 - (а), β -CH- (б) и α -CH- групп (в) 4-метоксипиридина от температуры в аррениусовских координатах. $1/T_{10}$ — скорость релаксации в отсутствие белка. [4-метоксипиридин] = 0,05 М; [P-450] = $2,3 \cdot 10^{-5}$ М; 0,1 М К-фосфатной D_2O -буфер, $\text{pH}_{\text{obs}} 7,5$

ванным раствором мочевины. При добавлении к этому препарату 4-метоксипиридина до концентрации 50 мМ мы не обнаружили спектров связывания, свидетельствующих об образовании комплексов. Для этого препарата отсутствует также и зависимость T_{1H} от концентрации субстрата в интервале 0,8–30 мМ. Для сравнения с P-450 и P-420 мы использовали метмиоглобин, дающий спектры связывания с 4-метоксипиридином ($K_S = 0,35$ М). Концентрационная зависимость скорости релаксации протонов 4-метоксипиридина в присутствии метмиоглобина линейна (рис. 7), как и должно быть при $K_D \gg S'$ (уравнение 3). При повышении температуры скорость релаксации α -протонов резко возрастает, что свидетельствует о медленном обмене при 296 К. При добавлении лиганда метмиоглобина — F^- в концентрациях, обеспечивающих насыщение, наибольшей становится скорость релаксации OCH_3 -группы, на которую температура практически не влияет (рис. 8).

Значения констант связывания (K_S) 4-метоксипиридина с изоформами цитохрома Р-450 в зависимости от концентрации 4-метоксипиридина (по данным спектрофотометрии)

LM ₂		P-450 _b	
Диапазон концентраций субстрата, мМ	K_S , мМ	Диапазон концентраций субстрата, мМ	K_S , мМ
0,1–0,8	0,2	0,01–0,5	0,05
5–20	1,5	3–20	0,1

Таблица 4

Параметры, полученные из анализа зависимости времени релаксации (T_1) протонов 4-метоксипиридина от его концентрации в присутствии P-450_b и LM₂

Параметры *	P-450 _b			LM ₂		
	α -СН	β -СН	ОСН ₃	α -СН	β -СН	ОСН ₃
K_D , М		2,8±0,8			2,2±0,6	
$(T_{1M} + \tau)^{-1}$, Гц	215	96	60	390	150	64
τ , мс		2,9±0,5			2,6	
T_{1M} , мс		4,1	9,0		4,2	13,1
r , Å	>6,5	7,0	8,0	>6,4	6,9	8,4
$r_{\text{модель}}$, Å	3,1	5,1	6,4			

* Для T_{1M} среднеквадратичная ошибка <20% величины, для r — <0,5 Å.

Чтобы определить специфичность эффекта ускорения релаксации протонов субстрата в присутствии P-450, проводили специальные эксперименты. Для этого к образцу, содержащему P-450 и 3,5-диметилпиридин (лутидин), добавляли раствор метирапона (2-метил-1,2-ди-3-пиридил-1-пропанон) — ингибитора реакций гидроксирования, имеющего высокое сродство к P-450. В результате величина T_1 протонов 3,5-лутидина возросла, что говорит о вытеснении молекулы замещенного пиридина метирапоном из комплекса с P-450 (рис. 9).

Обсуждение

При изучении взаимодействия парамагнитных белков с низкомолекулярными субстратами наиболее проблематично, как правило, выделение парамагнитного вклада в наблюдаемую скорость релаксации. Эта проблема обычно решается проведением дополнительных измерений с белком в диамагнитном состоянии — соответствующая разность считается парамагнитным вкладом в величины T_1 и T_2 [6]. Однако в нашем случае такой подход затруднен из-за нестабильности диамагнитного комплекса P-450²⁺ — СО (переходит в P-420²⁺ — СО). Кроме того, метод требует независимого определения мольной доли комплекса, предполагает крайне малую скорость релаксации субстрата в диамагнитном комплексе и пренебрежение внешней релаксацией, которая может играть существенную роль, например, вследствие спиновой диффузии по белковой глобуле [11].

В данной работе и мольная доля, и парамагнитный вклад определяются одновременно из концентрационных зависимостей T_{1H} . В настоящее время неясно, чем объясняется различие констант, полученных из анализа спектров поглощения и ЯМР. Можно предположить, например, последовательность равновесных стадий при образовании фермент-субстратного комплекса



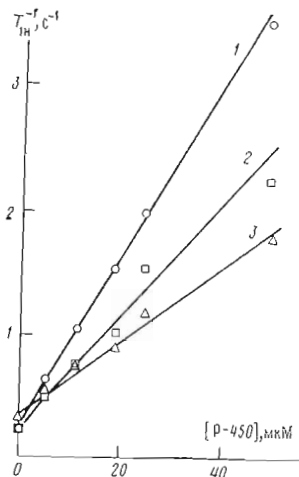


Рис. 4

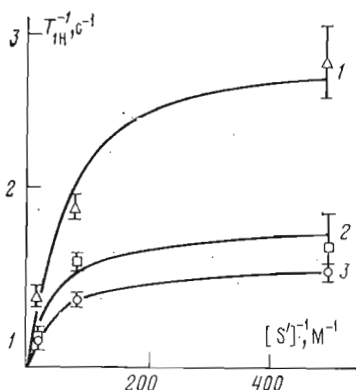


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость скорости релаксации протонов α -CH- (1), β -CH- (2) и OCH₃- групп (3) 4-метоксипиридина от концентрации цитохрома P-450. 0,1 М К-фосфатный D₂O-буфер, pH_{obs} 7,5, 294 К, [4-метоксипиридин]=4,3 мМ

Рис. 5. Зависимость скорости релаксации протонов 4-метоксипиридина (обозначения как на рис. 4) от его концентрации (294 К, [P-450]=2,3·10⁻⁵ М). Кривые рассчитаны по параметрам, приведенным в табл. 2

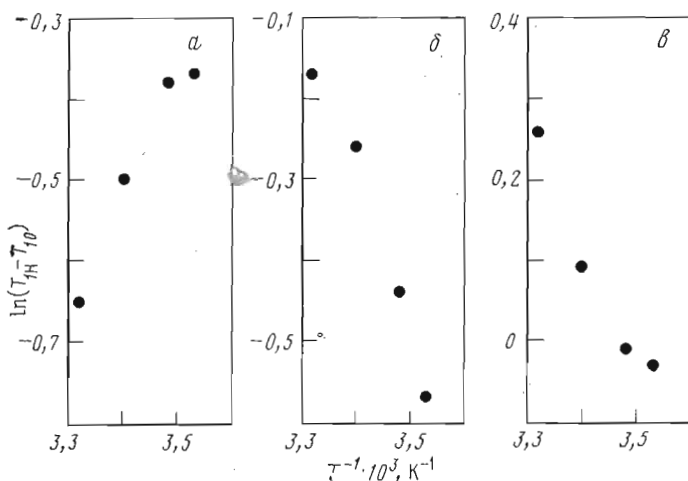


Рис. 6. Зависимость скорости релаксации протонов OCH₃- (а), β -CH- (б) и α -CH- групп (в) 4-метоксипиридина от температуры в арениусовских координатах. $1/T_{10}$ — скорость релаксации в отсутствие белка. [4-метоксипиридин]=0,05 М; [P-450]=2,3·10⁻⁵ М; 0,1 М К-фосфатной D₂O-буфер, pH_{obs} 7,5

ванном раствором мочевины. При добавлении к этому препарату 4-метоксипиридина до концентрации 50 мМ мы не обнаружили спектров связывания, свидетельствующих об образовании комплексов. Для этого препарата отсутствует также и зависимость T_{CH} от концентрации субстрата в интервале 0,8–30 мМ. Для сравнения с P-450 и P-420 мы использовали метмиоглобин, дающий спектры связывания с 4-метоксипиридином ($K_S = 0,35$ М). Концентрационная зависимость скорости релаксации протонов 4-метоксипиридина в присутствии метмиоглобина линейна (рис. 7), как и должно быть при $K_D \gg S'$ (уравнение 3). При повышении температуры скорость релаксации α -протонов резко возрастает, что свидетельствует о медленном обмене при 296 К. При добавлении лиганда метмиоглобина — F⁻ в концентрациях, обеспечивающих насыщение, наибольшей становится скорость релаксации OCH₃-группы, на которую температура практически не влияет (рис. 8).

где спектрофотометрически можно зарегистрировать комплекс ES' (более прочный, больше $\Delta\epsilon$), который в ЯМР наблюдать невозможно из-за слишком большого времени жизни (τ), и поэтому уменьшение величины T_1 обусловлено в основном образованием комплекса ES^* с более коротким временем жизни. Для дополнительной проверки специфичности наблюдаемого в ЯМР эффекта ускорения релаксации концентрационная зависимость, аналогичная приведенной на рис. 3, была получена для формилфенилаланина, близкого по степени гидрофобности к аминопирину (коэффициент распределения октанол: вода 1,5 для формилфенилаланина и 6,7 для аминопирина). В отличие от аминопирина формилфенилаланин не дает спектров связывания с P-450, при этом в интервале 2–50 мМ отсутствует и концентрационная зависимость T_{1H} . Таким же контролем является отсутствие эффекта ускорения релаксации для аминопирина, а также отсутствие для него спектров связывания с P-450_b и LM₂.

Для расчета расстояний по уравнению (1) необходимо знать спиновое состояние Fe^{3+} в комплексе, время корреляции диполь-дипольного электрон-ядерного взаимодействия (τ_c) и относительный вклад дипольного и скалярного членов в скорость релаксации (1-е и 2-е слагаемое уравнения 1). Комплексы P-450 с субстратами типа II, а также с аминопирином являются преимущественно низкоспиновыми [12], поэтому суммарный спин в уравнении (1) равен $1/2$. τ_c , в данном случае равное времени спиновой релаксации иона Fe^{3+} , τ_s (см., например, [6]), определено в [13] для низкоспинового P-450_{сам} и равно $5,4 \cdot 10^{-10}$ с. Для оценки скалярного вклада в скорость релаксации α -протонов 4-метоксипиридина при прямой координации положим $A/h = 1$ МГц [14], $\tau_e = \tau_s$. Расчет дает скалярный вклад около 0,05 Гц. Для более далеких протонов и при отсутствии прямой координации этот вклад будет еще меньше. Таким образом, можно считать, что полученные значения T_{1M} обусловлены только дипольным взаимодействием. Это позволяет использовать их для определения расстояния между ионом Fe^{3+} и группами субстрата. Из данных табл. 1 для аминопирина получаем расстояния ~ 8 Å для всех групп. (При расчете мы предполагали, что весь P-450, определяемый в растворе, способен связывать аминопирин. В противном случае полученное расстояние несколько уменьшится: при уменьшении доли связывающих центров P-450 от 100 до 50% это расстояние уменьшится на 12%.) Возникает вопрос: каким образом происходит реакция между аминопирином и активным центром (Fe) при расстоянии 8 Å между ними?

В настоящее время показано, что реакции цитохрома P-450 идут по механизму отрыва атома водорода и последующей рекомбинации радикала субстрата с $(Fe-OH)^{2+}$ -частицей [15]. В этом случае наблюдавшийся в реакции гидроксирования большой первичный изотопный эффект [16] может объясняться туннельным переносом атома водорода субстрата на 4–5 Å, который не требует непосредственного контакта реагентов. Другой вариант — расстояние в комплексе ES' (уравнение 6), наблюдаемом в ЯМР, больше, нежели в комплексе ES' , который претерпевает превращения при акте гидроксирования.

Для связывания субстратов второго типа общепринятым является предположение об их вхождении в качестве аксиального лиганда в первую сферу иона Fe^{3+} , и эксперимент с ω -аминооктил-фракцией P-450 свидетельствует в пользу этого. Однако расстояния, рассчитанные для комплексов 4-метоксипиридина с P-450_b и LM₂, приведенные в табл. 4, не соответствуют прямой координации 4-метоксипиридина с P-450, а говорят только о такой ориентации субстрата, при которой азот оказывается ближайшим к Fe^{3+} . Рассмотрим критически полученный результат. Возможно, не весь P-450, определяемый спектрально, связывает 4-метоксипиридин полностью, или часть белка связывает его достаточно медленно, например, вследствие стерических препятствий, возникающих из-за агрегации, характерной для мембранных белков в растворе. Оценки показывают, что комплексы, константа распада которых $k_{-1} \leq 50$ с⁻¹, практически не дают вклада в ускорение релаксации протонов субстрата. В этом случае эффективная концентрация белка в уравнении (2) меньше, чем аналити-

Параметры связывания 4-метоксипиридина с метмиоглобином
(см. рис. 8) при 296 и 310 К

Параметры	296 К			310 К		
K_D , М	0,18			0,21		
$(T_{1M} + \tau)$, мс	α -СН	β -СН	ОСН ₃	α -СН	β -СН	ОСН ₃
	1,25	2,0	3,22	0,49	1,25	2,49
T_{1M} , мс	—	0,75	1,97	—	0,73	2,0
r , Å	—	4,2	5,0	—	4,1	5,0
$r_{\text{модель}}$, Å *	2,9	3,9	4,9	2,9	3,9	4,9

* Плоскость пиридинового кольца параллельна плоскости гема, атом азота пиридина расположен над атомом железа на расстоянии 2,0 Å.

ческая, и значения $(T_{1M} + \tau)$ изменятся. Для проверки этой возможности мы изучили связывание СО с восстановленным Р-450 методом остановленной струи. Эта система выбрана из-за высокой кинетической константы указанной реакции ($\sim 10^5 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$), в результате чего образование комплекса Р-450 с СО должно завершиться быстрее, чем за 0,1 с, при концентрации СО порядка 10^{-3} М. Если же часть белка недоступна для быстрого связывания с лигандом, то концентрация комплекса через 0,1 с после смешения будет ниже стационарной. Однако проведенные эксперименты показали быстрое достижение стационарного уровня, что позволяет отбросить предположение о недоступности части белка для связывания. Нельзя исключить, что значение τ_c для комплекса 4-метоксипиридина Р-450 отличается от использованного в расчете. Однако можно заметить, что отношение $T_{1M \text{ СН}_3} / T_{1M \beta} = r_{\text{СН}_3}^6 / r_{\beta}^6$ не зависит от τ_c и равно 3,8 для прямой координации при длине связи Fe—N 2 Å [17].

Экспериментально найденные отношения равны $2,1 \pm 0,6$ (Р-450_б) и 3,1 (LM₂), что указывает на отсутствие прямой координации в комплексах, наблюдаемых методом ЯМР. Об этом же говорит разница между значениями K_D , полученными с помощью методов спектрофотометрии и ЯМР-спектроскопии, если считать, что наименьшая K_S , определенная спектрофотометрически, соответствует комплексу с прямой координацией. Кроме того, оценка времени жизни комплексов с использованием констант, полученных из анализа спектров связывания, дает $\tau = 1/K_S k_1$ от 0,1 до 2 с [18]. Столь долгоживущие комплексы не могут проявлять себя при данных условиях ЯМР-эксперимента.

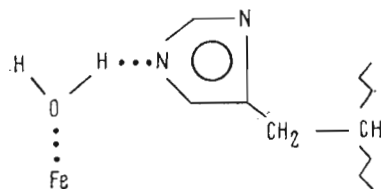
Для метмиоглобина константа диссоциации K_S , определенная спектрофотометрически значительно выше (0,35 М), и мы, таким образом, можем наблюдать в спектрах ЯМР эффект от комплексов с прямой координацией. Для оценки K_D и T_{1M} из данных рис. 3 учитываем, что $K_D \gg S'$, и, разлагая $1/(K_D + S')$ в ряд, а также пренебрегая членами выше первого порядка, получаем из уравнения (3)

$$\frac{1}{T_{1H}} = \frac{1}{T_{1d}} + \frac{P}{K_D (T_{1M} + \tau)} - \frac{PS'}{K_D^2 (T_{1M} + \tau)} \quad (7)$$

Пренебрегая $1/T_{1d}$ для наиболее быстро релаксирующих α -протонов при 310 К, получаем для них K_D и $(T_{1M} + \tau)$ и, используя полученное значение K_D , вычисляем $(T_{1M} + \tau)$ для остальных групп, уже не делая предположения о малости $1/T_{1d}$. Из полученных данных с использованием значений τ_c [19] рассчитываются расстояния для комплекса миоглобин — 4-метоксипиридин (табл. 5). Они хорошо согласуются с моделью прямой координации, если учесть, что плоскость пиридина должна располагаться под малым углом к плоскости гема, так как ориентации, характеризующиеся большими значениями углов стерически затруднены. Таким «неудачным»

расположением, препятствующим максимальному перекрыванию орбиталей азота пиридина и Fe^{3+} , и объясняется, вероятно, высокая константа нестойкости комплекса. При координации фторида в качестве шестого (аксиального) лиганда гема структура комплекса миоглобина с 4-метоксипиридином меняется. Из рис. 8 видно, что наиболее быстро релаксирующей, т. е. ближайшей к Fe^{3+} , становится OCH_3 -группа субстрата. Кроме того, температурная зависимость указывает на быстрый либо промежуточный обмен для всех групп 4-метоксипиридина при комнатной температуре. Это означает, что 4-метоксипиридин вытесняется фторидом из первой координационной сферы Fe^{3+} , тем не менее комплекс 4-метоксипиридин-метмиоглобин- F^- существует. Время жизни такого комплекса, вероятно, меньше, чем для комплекса метмиоглобин-4-метоксипиридин, — это следует из того, что все группы субстрата находятся в области быстрого обмена (рис. 8).

Для кислого метмиоглобина рентгеноструктурными исследованиями показано, что молекула H_2O , выступающая в качестве шестого лиганда Fe^{3+} , соединена водородной связью с имидазолом гистидина:



Если предположить сходную структуру для P-450, видно, что внешний лиганд может вытеснять либо H_2O , либо His из комплекса, причем для разных форм P-450 из-за кинетических особенностей основной вклад в наблюдаемое в ЯМР ускорение релаксации может давать либо тот, либо другой комплекс, либо оба вместе. Можно предположить, что в ω -аминооктил-фракции содержится форма P-450, для которой кинетически возможно наблюдать эффект комплекса с прямой координацией.

Экспериментальная часть

В экспериментах использовали фармакопейный аминопирин, 3,5-Лутидин (Fluka, Швейцария) и 4-метоксипиридин (синтезированный О. П. Шкурко, Институт органической химии СО АН СССР, Новосибирск) перегоняли. Миоглобин из скелетных мышц кашалота, тх 2, и метиралон получены от фирмы Sigma (США). D_2O и остальные реактивы были отечественного производства. Гель-фильтрацию проводили на сефадексе G-50 Fine (Pharmacia, Швеция) и Toyopearl HW-40 Fine (Toyo-Soda, Япония). Для освобождения от примеси парамагнитных ионов использовали хелатирующую смолу Chelex-100 (Bio-Rad, США). Мочевину- d_4 получали трехкратным упариванием раствора мочевины (ос. ч.) в D_2O . Индукцию самцов крыс Вистар (120–150 г) и самцов кроликов Шиншилла (2 кг), а также выделение микросом проводили стандартным методом (см., например, [20, 21]). Цитохром P-450 LM₂ из печени кролика получали по методике, описанной в работе [21], он содержал 14 нмоль/мг белка. Цитохром P-450 из печени крыс (ω -аминооктил-фракция) получали по методу [22], причем использовали фракцию P-450, выделенную после хроматографии на ω -аминооктилсефарозе 4В; затем эту фракцию для освобождения от детергентов пропускали через сефадекс LH-20 (Pharmacia) либо обрабатывали амберлитом XAD-2 (Serva). Препарат содержал 8–11 нмоль P-450 на 1 мг белка. Электрофоретически гомогенный P-450, (по номенклатуре Райана и др. [23]) получали по методу [22] и освобождали от детергентов на колонке с гидроксипатитом [24]. Препарат содержал 13–16 нмоль P-450 на 1 мг белка. Миоглобин переводили в метформу путем окисления феррицианидом калия (1 ч при 20° С), затем переводили в D_2O -буфер и освобождали от феррицианида, пропуская через

колонку с Toyopearl HW-40, уравновешенную калий-фосфатным буфером, $pH_{obs}=7,0$. Остальные белковые препараты аналогично переводили в D_2O -калий-фосфатный буфер, pH 7,5. Все растворы готовили на D_2O и пропускали (так же как и растворы белков) через Chelex-100 для удаления примеси парамагнитных ионов. СО-комплекс восстановленного цитохрома Р-450 готовили по следующей методике. В ампуле с образцом (d 5 мм) пропускали СО над поверхностью раствора во избежание вспенивания. Затем герметично закрытую ампулу раскручивали в турбинке (200 об/с) для уравновешивания жидкой и газовой фазы; всю процедуру повторяли дважды. После этого в токе СО добавляли несколько кристаллов ($\sim 0,1$ мг) $Na_2S_2O_4$, ампулу закрывали и содержимое перемешивали. Оптические измерения проводили на спектрофотометрах Hitachi-557 (Япония) и Beckman DB-GD (Австрия). Эксперименты по методу остановленной струи проводили, используя приставку к спектрофотометру Hitachi-557. Спектры ЯМР записывали на спектрометрах XL-200 (Varian) и AM-250 (Bruker). Величину T_1 определяли, используя модифицированную последовательность инверсии-восстановления [25, 26]. Данные анализировали на ЭВМ «Электроника-60», используя метод наименьших квадратов, обобщенный для нелинейной зависимости от параметров [27].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mammalian Cytochromes P-450/Ed. Guengerich F. P. Boca Raton: CRC Press. 1987. V. 1, 2.
2. Schenkman J. B., Remmer H., Estabrook R. W. // Mol. Pharmacol. 1967. V. 3. № 1. P. 113-123.
3. Jefcoate C. R. // Meth. Enzymol. 1978. V. 52. P. 258-279.
4. Gibson G. G., Tamburini P. P. // Xenobiotica. 1984. V. 14. № 1. P. 27-48.
5. Weiner L. M. // CRC Crit. Rev. Biochem. 1986. V. 20. № 2. P. 139-200.
6. Novak R. F., Kapetanovic I. M., Mieczal J. J. // Mol. Pharmacol. 1977. V. 13. № 1. P. 15-30.
7. Sotokava H., Shimizu T., Hatano M. // Inorg. chim. acta. 1985. V. 108. № 1. P. 67-70.
8. Solomon I. // Phys. Rev. 1955. V. 99. № 2. P. 559-565.
9. Bloembergen N. // J. Chem. Phys. 1957. V. 27. № 3. P. 572-573.
10. Swift T. J., Connick R. E. // J. Chem. Phys. 1962. V. 37. № 2. P. 307-320.
11. Edzes T. H., Samulski E. T. // J. Magn. Res. 1978. V. 31. № 2. P. 207-229.
12. Guengerich F. P. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 10. P. 2811-2820.
13. Philson S. B., Debrunner P. G., Schmidt P. G., Gunsalus I. C. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 20. P. 10173-10179.
14. Chacko V. P., LaMar G. N. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 25. P. 7002-7007.
15. White R. E., Miller J. P., Favreau L. V., Bhattacharyya A. // J. Amer. Chem. Soc. 1986. V. 108. № 19. P. 6024-6031.
16. Jones J. P., Trager W. F. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 7. P. 2174-2173.
17. Collins D. M., Countryman R., Hoard J. L. // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 94. № 6. P. 2067-2072.
18. Woldman Ya. Yu., Weiner L. M., Gulyaeva L. F., Lyakhovich V. V. // FEBS Lett. 1987. V. 212. № 1. P. 53-57.
19. Sheridan R. P., Gupta R. K. // Int. J. Quant. Chem. 1981. V. 8. № 1. P. 257-263.
20. Guengerich F. P., Dannan G. A., Wright S. T., Martin M. V., Kaminsky L. S. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 22. P. 6019-6030.
21. Ymai Y., Sato R. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1974. V. 60. № 1. P. 8-14.
22. Guengerich F. P., Martin M. V. // Arch. Biochem. and Biophys. 1980. V. 205. № 2. P. 365-379.
23. Ryan D. E., Thomas P. E., Reik L. M., Lewin W. // Xenobiotica. 1982. V. 12. № 6. P. 727-744.
24. Wolf C. R., Slaughter S. R., Marciszyn J. P., Philpot R. M. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 624. № 3. P. 409-419.
25. Freeman R., Kempell S. P., Levitt M. H. // J. Magn. Res. 1980. V. 38. № 3. P. 453-480.
26. Gupta R., Ferretti J. A., Becker E. D., Weiss G. H. // J. Magn. Res. 1980. V. 38. № 3. P. 447-452.
27. Худсон Д. Статистика для физиков: Пер. с англ. М.: Мир, 1970. С. 233.

Поступила в редакцию
17.V.1988

После доработки
17.XI.1988

INTERACTION OF CYTOCHROME P-450 WITH SUBSTRATES
BY MEANS OF UV AND ^1H NMR SPECTRA

WOLDMAN Ya. Yu., GULYAEVA L. F., WEINER L. M.*, LYAKHOVICH V. V.

*Institute of Clinical and Experimental Medicine, Siberian Division,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk;*

** Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Division,
Academy of Sciences of the USSR, Novosibirsk*

Acceleration of substrate longitudinal relaxation (T_1) was used to study cytochrome P-450—aminopyrine (1st type substrate) and P-450—4-methoxypyridine (2nd type substrate) complexes. Dissociation constant, T_1 and/or residence time of substrate in the complex can be obtained from the dependence of T_1 of substrate protons on substrate concentration. Basing on the relaxation times, distances between Fe^{3+} ion in the active site and protons of the substrate moiety were determined. For aminopyrine all the distances proved to be about 8 Å. In the P-450—4-methoxypyridine complex the pyridine nitrogen is directed towards Fe^{3+} ion. Cytochrome P-450 is compared with its denaturated form, cytochrome P-420, and metmyoglobin.