

Флавинадениндинуклеотид и углеводные остатки в составе эритроцитарного мембранного цитохрома $b_{558}III$, его NADPH-зависимая супероксидпродуцирующая активность и ЭПР-спектральные характеристики

Г.М.Симонян¹, Р.М.Симонян¹, М.А.Бабаян¹, И.Э.Степанян¹, А.В.Карапетян², М.А.Симонян¹

¹Институт биохимии НАН РА

²Легстингтонский университет, Кентукки, США

375014, Ереван, ул.П.Севака, 5/1

Ключевые слова: цитохром $b_{558}III$, FAD, углеводы, супероксидные радикалы

Цитохромы b_{558} различных типов локализованы в мембранах фагоцитирующих лейкоцитов, лимфоцитов [3, 12] и имеют в своем составе флавинадениндинуклеотид (FAD) и углеводные остатки [4]. Цитохромы b_{558} участвуют в иммунной защите организма как продуцирующие супероксидные радикалы (O_2^-) системы, которые совместно с другими формами активного кислорода участвуют в процессе нейтрализации антигенов [7].

Целью работы является выделение характерных групп в составе электрофоретически гомогенного препарата цитохрома $b_{558}III$ из мембран эритроцитов млекопитающих, свойственных цитохромам b_{558} , локализованным в мембранах форменных элементов плазмы крови.

Материал и методы

Цитохром $b_{558}III$ выделяли и очищали до электрофоретически гомогенного состояния биотехнологическим способом [2], исключая использование детергента в качестве солубилизирующего агента, так как детергент (Нонидет Р-40 или Тритон Х-100) заметно снижает не только стабильность этого гемопротейна, но и дает возможность очистить белок и определить его возможную O_2^- -продуцирующую активность. Очистку цитохрома $b_{558}III$ осуществляли ионообменной хроматографией на целлюлозах DE-52 и KM-52 ("Whatman", Англия) и сефадексе DEAE A-50 ("Pharmacia", Швеция), гель-фильтрацией на биогеле Р-100 ("Reanal", Венгрия). Диск-гель электрофорез цитохрома $b_{558}III$ (5мг) проводили на 10% полиакриламидном геле (ПААГ), рН триглицинового электродного буфера составлял 8,3. Для окрашивания гелей на

белок в качестве красителя использовали кумасси бриллиант синий (КБС) марки G-250 ("Sigma"). Наличие углеводных остатков в цитохроме $b_{558}III$ выявляли окрашиванием ПААГ красителем Шиффа [16]. После параллельного проведения электрофореза цитохрома $b_{558}III$ в тех же условиях, что и при определении белка, для окрашивания углеводных остатков гели фиксировали в 12,5% трихлоруксусной кислоте (ТХУ) в течение 20 мин. Затем гели промывали дистиллированной водой и погружали на 50 мин в 1% раствор периодата (HO_3) в ледяной уксусной кислоте. После промывания гели погружали в раствор красителя Шиффа на 50 мин в темноте. Последующая промывка гелей проводилась в 0,5% растворе метабисульфита, а затем – дистиллированной водой [16]. Наличие группы FAD в цитохроме $b_{558}III$ определяли путем денатурирования белка в 10% ТХУ с дальнейшим фракционированием диэтилэфиром и инкубированием в течение двух часов при 20° . В результате такой обработки FAD переходит в гидрофобную фазу раствора [6]. NADPH-зависимую O_2^- -продуцирующую активность цитохрома $b_{558}III$ определяли тремя методами: 1) оптическим спектральным методом путем построения кинетических кривых увеличения плотности максимального оптического поглощения формазана (при 560 нм), который образуется при восстановлении нитротетразолиевого синего (НТС) супероксидными радикалами при 20° (определяется % увеличения поглощения при 560 нм); 2) путем построения кинетических кривых снижения плотности максимального оптического поглощения КБС (при 580 нм) супероксидными радикалами с определением % обесцвечивания КБС; 3) ЭПР-методом после восстановления цитохрома $b_{558}III$ дитионитом натрия с дальнейшей азрацией кислородом в отсутствие и присутствии Cu, Zn -СОД или

Мп-СОД. ЭПР-спектральные измерения осуществляли на спектрометре "Bruker" (США) при следующих условиях регистрирования ЭПР - сигналов: диапазон напряженности центрального магнитного поля - 2500 Гс (гаусс); постоянная времени - 327 мсек; микроволновая мощность - 19.9 мВт; модуляция амплитуды 10 Гс; чувствительность регистрирования ЭПР-спектров - 10^3 ; температура пробы в резонаторе - 77°К. Оптические спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Hitachi" (Япония) при длине оптического пути 1 см. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Совпадение положения слоев электрофоретически гомогенного препарата цитохрома b_{558} на параллельных электрофореграммах (рис.1) при их окрашивании на белок КБС и на выявление углеводных остатков при окрашивании раствором Шиффа свидетельствует, что эритроцитарный мембранный цитохром b_{558} является гликогемопротеином. Гидрофобная часть цитохрома b_{558} , растворенная в эфире, имеет характерные для FAD максимумы оптического поглощения в видимой области спектра (350 и 450 нм) с небольшими различиями (рис.2). Это свидетельствует о наличии FAD в составе цитохрома b_{558} . Таким образом, цитохром b_{558} мембран эритроцитов является фла-

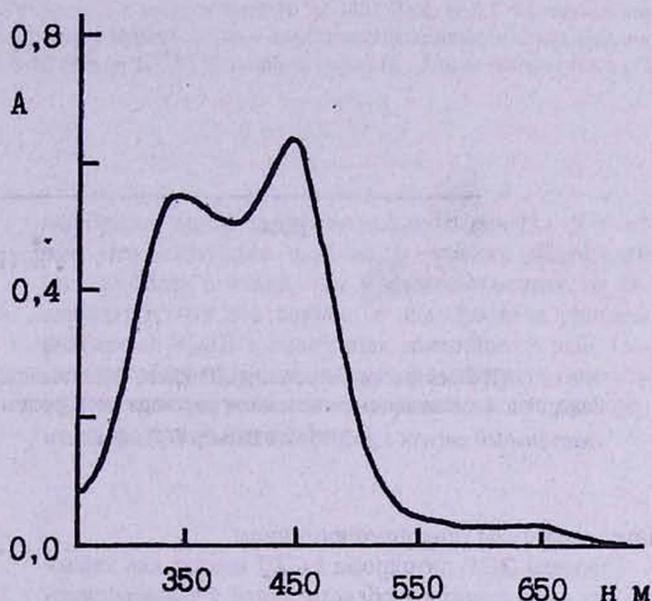
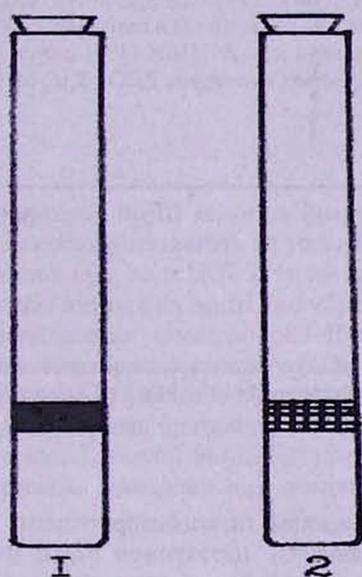


Рис.1. Электрофореграммы электрофоретически гомогенного препарата цитохрома b_{558} мембран эритроцитов млекопитающих (человек, крыса) на ПААГ: после окрашивания ПААГ КБС для обнаружения белковых полос и после промывания от красителя (1); после окрашивания ПААГ красителем Шиффа для выявления углеводных остатков в составе цитохрома b_{558} и после промывания геля от красителя (2). Электрофорез цитохрома b_{558} и промывание ПААГ проведены одновременно в одинаковых условиях.

Рис.2. Спектрофотометрическое определение FAD в составе цитохрома b_{558} . После денатурирования цитохрома b_{558} (10^{-4} ТХУ, фракционирования в диэтилэфире и центрифугирования смеси супернатант имеет оптический спектр поглощения, характерный для FAD при 350, 450 нм. Супернатант разбавлен в эфире в 5 раз.

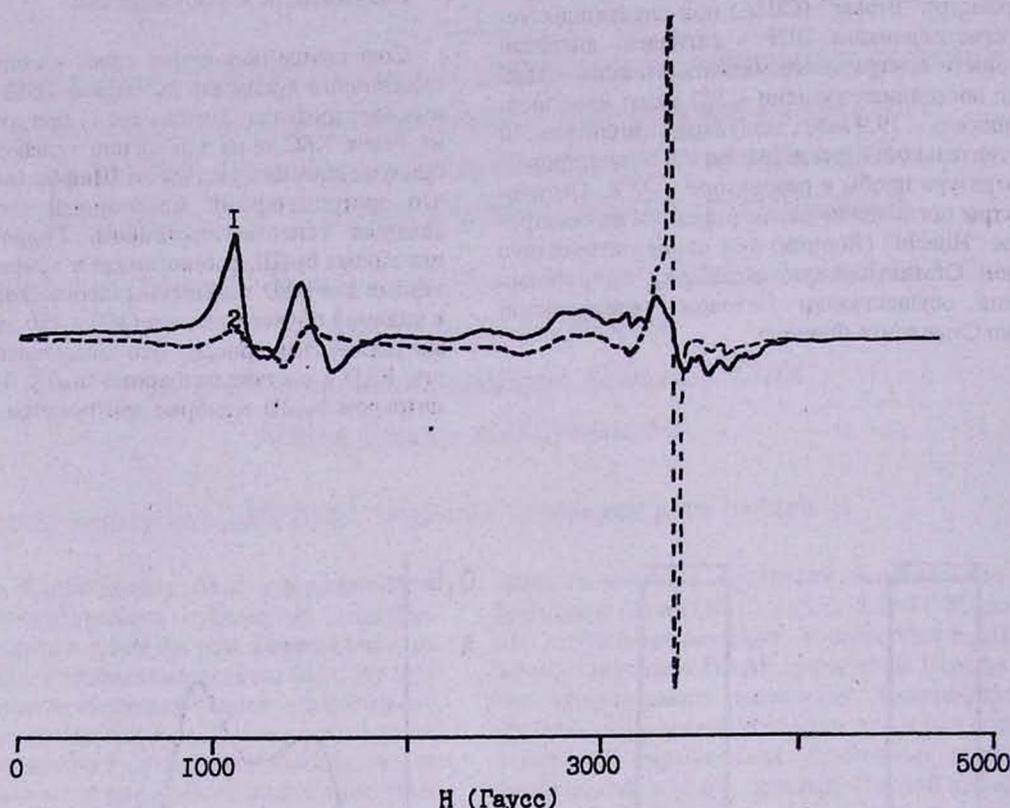
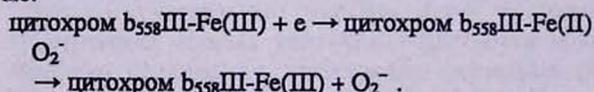


Рис.3. ЭПР-спектры цитохрома $b_{558}III$ ($5 \times 10^{-4}M$) в окисленном состоянии (1) и после восстановления дитионитом натрия с последующим окислением раствора кислородом (2). Под воздействием $5 \times 10^{-8}M$ Cu,Zn -СОД или Mn -СОД аксиальный сигнал с $g=2.02$ (это спектр O_2^-) исчезает.

винсодержащим гликогемопротеином.

Спектры ЭПР цитохрома $b_{558}III$ имеют два характерных расщепления в области полей с высокоспиновым поглощением с факторами Ланде (g), равными 6,1 и 4,5 в окисленном состоянии и низкоспиновым поглощением с $g=2,02$ после восстановления цитохрома $b_{558}III$ дитионитом натрия с дальнейшей азрацией кислородом (рис.3). Этот аксиальный сигнал с $g=2.02$ в основном сходен с ЭПР O_2^- , генерированных при расщеплении перекиси водорода при рН выше 9 [14] и исчезает под воздействием каталитических количеств Cu,Zn -СОД и Mn -СОД. С другой стороны, цитохром $b_{558}III$ стимулирует продуцирование O_2^- в присутствии NADPH (или $NADPNa_2$), как это показано на рис. 4. Продуцируемые O_2^- в свою очередь, стимулируют образование формазана (рис.4, а) или обесцвечивание КБС (рис. 4, б) и дисмутируются супероксиддисмутазой. Итак, цитохром $b_{558}III$ из мембран эритроцитов является NADPH-зависимым O_2^- - продуцирующим

флавиносодержащим гликогемопротеином. Механизм продуцирования O_2^- цитохромом $b_{558}III$ может быть представлен следующим образом: после восстановления $Fe(III)$ до $Fe(II)$ дитионитом натрия или NADPH с дальнейшим окислением $Fe(II)$ образуется O_2^- по схеме:



Наличие сахарных остатков и FAD, а также характерные ЭПР-спектры цитохрома $b_{558}III$ мембран эритроцитов (имеются и небольшие различия) свидетельствуют о том, что этот гемопроtein несколько схож с аналогичными цитохромами b_{558} , мембран фагоцитирующих лейкоцитов, лимфоцитов [4,5, 7, 9-11]. С другой стороны, по величинам g -факторов в высокоспиновой области цитохром $b_{558}III$ ближе к аналогичным факторам NO-синтазы [8, 13, 15]. Можно предполо-

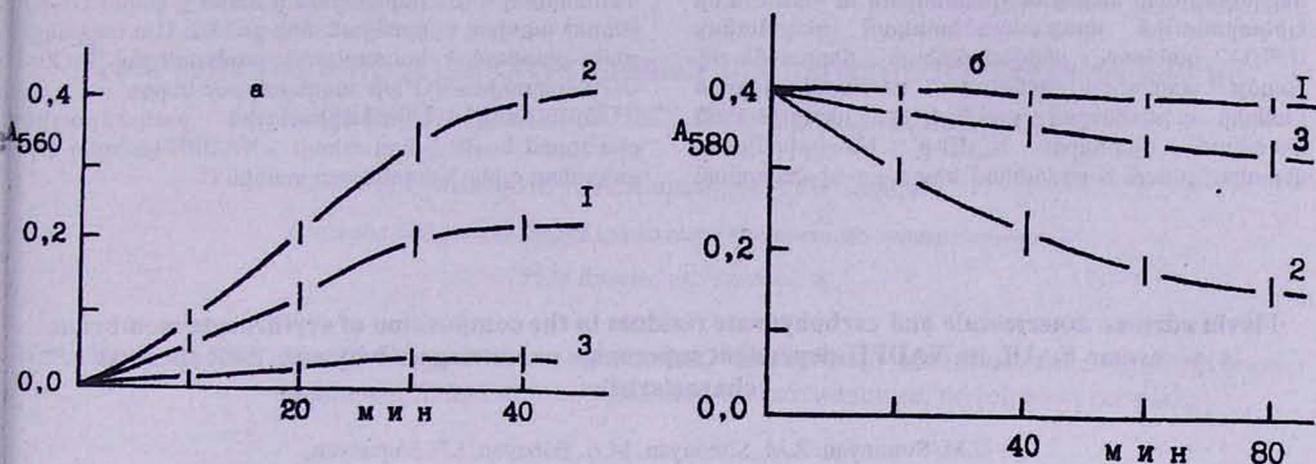


Рис.4. Кинетические кривые образования формазана при восстановлении НТС супероксидными радикалами в реакционной смеси, содержащей: 4×10^{-4} M NADPH или NADPNa_2 ; 6.3×10^{-6} M феназинметасульфат; 3.6×10^{-5} M НТС и 0.2M натрий пирогликофатного буфера, pH 9, при 20° . а – в присутствии 10^{-4} M NADPNa_2 (1); в присутствии 10^{-4} M NADPNa_2 и 10^{-4} M цитохрома $b_{558}\text{III}$ (2). При добавлении к (1) или (2) 5×10^{-8} M Cu,Zn-COD получается кривая (3). б – кинетические кривые обесцвечивания КБС в присутствии 10^{-3} M NADPNa_2 (1); в присутствии 10^{-3} M NADPNa_2 и 10^{-4} M цитохрома $b_{558}\text{III}$ (2). После добавления к (1) или (2) 5×10^{-8} M Cu,Zn-COD получается кривая (3).

жить, что цитохром $b_{558}\text{III}$ является фрагментом NO-синтазы и способен участвовать не только в процессе продуцирования O_2^- , но и NO^\bullet . В то же время удельное содержание цитохрома $b_{558}\text{III}$ в мембранах эритроцитов млекопитающих примерно в 80–100 раз превышает таковое в мембранах фагоцитирующих лейкоцитов и лимфоцитов, а удельное содержание цитохромов $b_{558}\text{III}$ в мембранах эритроцитов рыбы сиг озера Севан (*Coregenus Lavaretus Sevanicus*) превышает в 5–6 раз содержание цитохрома b_{558} , локализованных в

мембранах эритроцитов млекопитающих [1]. Учитывая, что иммунная система у водных обитателей (акула) более активна, чем у млекопитающих, не исключается, что это связано с повышенным уровнем цитохрома $b_{558}\text{III}$ в мембранах эритроцитов рыб. Последнее обстоятельство позволяет выдвинуть гипотезу об участии эритроцитов в иммунной защите организма посредством цитохрома b_{558} .

Поступила 05.09.02

Ֆլավինադենիդրինուկլեոտիդը և ածխաջրային մնացորդները էրիթրոցիտային քաղանթային ցիտոքրոմ $b_{558}\text{III}$ -ի կազմում, նրա NADPH- սիսթեմայի գոյացնելու ակտիվությունը և էՊՈ- սպեկտրային բնութագրերը

Գ.Մ. Միմոնյան, Ռ.Մ. Միմոնյան, Մ.Ա. Բարսյան, Ի.Է. Մրեփանյան,
Ա.Վ. Կարապետյան, Մ.Ա. Միմոնյան

Ֆլավինադենիդրինուկլեոտիդը և ածխաջրային մնացորդներ են հայտնաբերվել կաթնասունների էրիթրոցիտային քաղանթներից անջատված

էլեկտրաֆորետիկորեն համասեռ ցիտոքրոմ $b_{558}\text{III}$ -ի պատրաստուկի կազմում: Վերջինս գոյացնում է սուպերօքսիդ ռադիկալներ (O_2^-) NADPH-ի

ներկայությամբ ախր պայմաններում *in vitro* և ունի էլեկտրոնային պարամագնիսական ռեզոնանսի (ԷՊՌ) սպեկտր, բնութագրական ճեղքումներով՝ բարձր սպինային զոնայում, համապարասխան Լանդեի գործոններով, $g=6.1$ և 4.5 , օքսիդացված վիճակում: Ցիտոքրոմ $b_{558}III$ -ի՝ Na-դիֆիոնիտով վերականգնման և թթվածնով հետագա օքսիդացման

հետևանքով ԷՊՌ- սպեկտրում ի հայտ է գալիս O_2^- -ին բնորոշ արսիալ ազդանշան, որի $g=2.02$: Այս ազդանշանը չքանում է կատալիտիկ քանակներով Cu,Zn-ՍՕԴ-ի կամ Mn-ՍՕԴ-ի ազդեցության ներքո:

Այսպիսով, էրիթրոցիտային թաղանթային ցիտոքրոմ $b_{558}III$ -ը նոր տիպի NADPH-կախյալ O_2^- -գոյացնող գլիկոֆլավոնոնոպրոտեին է:

Flavin adenine dinucleotide and carbohydrate residues in the composition of erythrocyte membrane cytochrome $b_{558}III$, its NADPH-dependent superoxide producing activity and EPR spectral characteristics

G.M. Simonyan, R.M. Simonyan, M.A. Babayan, I.E. Stepanyan,
A.V. Karapetyan, M.A. Simonyan

Flavin adenine dinucleotide and carbohydrate residues are detected in the composition of the electrophoretically homogeneous preparation of mammal erythrocyte membrane cytochrome $b_{558}III$. The latter generates superoxide radicals (O_2^-) in the presence of NADPH under aerobic conditions *in vitro* and has an electron paramagnetic resonance (EPR) spectrum with the characteristic shifts in the region of high spin with the factor of Lande: $g=6.1$ and 4.5 in the oxidized state.

After reduction of cytochrome $b_{558}III$ by the ditionite of sodium and further aeration, the axial signal with $g=2.02$ on the EPR spectrum of O_2^- , appears, disappearing under the influence of catalytic amounts of Cu,Zn-SOD or Mn-SOD.

Thus, erythrocyte membrane cytochrome $b_{558}III$ is a new type of NADPH-dependent O_2^- -producing flavoglycohemoprotein.

Литература

1. Симосян Г.М., Серосян М.А., Симосян М.А. и др. ДНАН РА, 2001, 101, с.183.
2. Симосян М.А., Симосян Г.М., Григорян Г.Г., Симосян Р.М. Способ получения цитохромов типа b из мембран эритроцитов. Лицензия изобр. N 908, Арм-патент, 2001.
3. Batoj G., Paclat M.H., Doussier J., Vergnaud S. et al. Biochim.Biophys.Acta, 1998, 1406, p. 188.
4. Hettmann T., Schmidt C.L., Anemuller S. et al. J.Biol.Chem., 1998, 273, p.12032.
5. Izogai Y., Lizuka T., Makino R., Lianagi T., Oriti Y. J.Biol.Chem., 1993, 268, p.4025.
6. Kearney E.B. J.Biol.Chem., 1960, 255, p.865.
7. Kobayashi S., Imajoh-Ohmi S., Kuribayashi F. et al. J.Biochem., Tokyo, 1995, 117, p.758.
8. Lutter R., Van Schaik M.L.J., Zwieter R.V. et al. Superoxide, Superoxide Dismutase in Chemistry, Biol., Med.Elsevier, Sci., Oxford, 1986, p.228.
9. Miki T., Fujii H., Kakinuma K. J.Biol.Chem., 1992, 267, p.19673.
10. Ravel P., Lederer F. Biochem.Biophys.Res.Comm., 1993, 196, p.543.
11. Rotrosen D., Yeung C.L., Leto T.L., Malech H.L., Knowng C.H. Science, 1992, 256, p.1459.
12. Shiota M., Mori S., Imajoh-Ohmi S., Nakamura M. Pathol.Res.Pract., 1993, 189, p.985.
13. Salerno J.C., Frey C., McMillan K., Williams R.F. et al. J.Biol.Chem., 1995, 270, p.27423.
14. Simonyan M.A., Nalbandyan R.M. Biochim.Biophys.Acta, 1979, 583, p.279.
15. Stuehr D.J., Ikeda-Saito M. J.Biol.Chem., 1992, 267, p.20547.