



Doctoral Thesis

Rotation and interaction with epoxide hydrase of cytochrome P-450 in proteoliposomes

Author(s):

Etter, Hansueli

Publication Date:

1992

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000692255> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH No. 9822

**ROTATION AND INTERACTION WITH EPOXIDE HYDRASE OF
CYTOCHROME P-450 IN PROTEOLIPOSOMES**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
Hansueli Etter
Dipl. Biochem.
born 12th January 1956
citizen of Birwinken, Happerswil-Buch and Langrickenbach (TG)

accepted on the recommendation of
Prof. K. H. Winterhalter, examiner
PD Dr. C. Richter, co-examiner
PD Dr. J. Brunner, co-examiner

Zurich, 1992

ZUSAMMENFASSUNG

Mittels Rotationsdiffusionsmessung wurde das Verhalten von P450MC in Proteoliposomen in Abwesenheit und Gegenwart von Epoxid Hydrase untersucht. Die Proteoliposomen, die ein Lipid zu Proteinverhältnis von 5 (w/w) hatten, setzten sich aus Phosphatidylcholin, -ethanolamin und -serin im Verhältnis von 10:5:1 zusammen. Enthielten diese Vesikel nur P450MC (P450IA1 und P450IA2), waren 78% der Cytochrome mobil. Wenn auch Epoxid Hydrase eingebaut war - bei einem Epoxid Hydrase zu P450-Verhältnis von 1:1 (w/w) -, stieg der Wert auf 84%. Waren die Epoxid Hydrase Moleküle nach Zugabe von Anti-Epoxid Hydrase IgG durch Vernetzung immobilisiert, fiel der Anteil der freien Cytochrome auf 49%.

Enthielten die Proteoliposomen P450PB (P450IIB1 und P450IIB2) anstelle von P450MC, fand sich das gleiche Bild: Ohne Epoxid Hydrase waren 92% der Cytochrome mobil, während in seiner Gegenwart der Wert auf 96% stieg. Die Zugabe von Anti-Epoxid Hydrase IgG senkte ihn auf 60%. Die zeigt, dass sowohl P450MC als auch P450PB mit Epoxid Hydrase in Wechselwirkung treten.

Untersuchungen bezüglich des Winkels des Häms relativ zur Normalen der Lipidmembran ergaben unterschiedliche Werte für beide Cytochrome. Während P450PB einen Winkel von 55 ° hat, weist P450MC einen von 48 oder 62 ° auf.

Als die Wechselwirkung von P450 mit Epoxid Hydrase an Mikrosomen untersucht wurde, war ein gegensätzliches Verhalten zu beobachten. Während die Zugabe von Anti-Epoxid Hydrase IgG zu PB-Mikrosomen den Anteil an mobilem P450 von 45 auf 38% senkte, stieg er in MC-Mikrosomen von 50 auf 57%. Trotzdem wird deutlich, dass in beiden Fällen eine Wechselwirkung mit der Epoxid Hydrase vorliegt, wobei diese von P450PB stärker zu sein scheint als jene von P450MC.

Untersuchungen zur Topologie der Epoxid Hydrase zeigten, dass das N-terminale Ende des Proteins auf der Innenseite der Proteoliposomen liegt. Die Topologie der Epoxid Hydrase scheint im weiteren jener von P450 zu gleichen, wobei der Hauptteil des Proteins gegen das Zytosol gerichtet ist und nur die erste Domäne (Anker) die Membran durchspannt. Wenn Epoxid Hydrase und P450PB in Lösung mit Pyridoxalphosphat behandelt wurden, wiesen beide Proteine eine ähnliche Anzahl von Markierungen auf. Waren diese Proteine jedoch in Vesikel eingebaut, fanden sich an P450PB 50-100% mehr Markierungen. Dies deutet an, dass Epoxid Hydrase tiefer in der Membran eingebettet ist als P450.

SUMMARY

The mobility of P450MC (P450IA1 and P450IA2) in proteoliposomes in the absence and presence of epoxide hydrase was examined by rotational diffusion measurement. These proteoliposomes had a lipid to protein ratio of 5 (w/w) and were composed of phosphatidylcholine, -ethanolamine and -serine with a ratio of 10:5:1. In vesicles containing only P450MC 78% of the cytochromes were mobile. In proteoliposomes in which epoxide hydrase was also incorporated (P450 : epoxide hydrase = 1:1; w/w) 84% of the P450s were mobile. When epoxide hydrase was immobilized through cross-linking by the addition of anti-epoxide hydrase IgG the percentage of freely rotating P450 dropped to 49%.

Proteoliposomes containing P450PB (P450IIB1 and P450IIB2) instead of P450MC showed similar results. In the absence of epoxide hydrase 92% of the cytochromes were mobile whereas in its presence the value increased to 96%. After the addition of anti-epoxide hydrase IgG the value dropped to 60%. This indicates that both P450MC and P450PB interact with epoxide hydrase.

When the orientation of the heme plane relative to the normal of the membrane was examined it turned out that P450PB and P450MC have different values. While the former has an angle of 55 ° the latter has one of either 48 or 62 °.

When the interactions of P450 with epoxide hydrase were investigated in microsomes opposite effects were found. While the addition of anti-epoxide hydrase IgG to PB-microsomes decreased the mobile population of P450 from 45 to 38% an increase in this value was observed in MC-microsomes from 50 to 57%. Despite these differences it is obvious that in both cases P450 interacts with epoxide hydrase. Yet, it seems that P450PB has a stronger interaction with epoxide hydrase than P450MC.

Examinations of the topology of epoxide hydrase showed that the N-terminus of the protein lies inside the proteoliposomes. Our results suggest that the topology of epoxide hydrase is similar to that of P450. This means that the main part of the protein is directed towards the cytosol and only one domain, the anchor, spans the membrane. When epoxide hydrase and P450PB in solution were treated with pyridoxal phosphate both proteins had about the same number of labels. Yet, when both proteins were incorporated in membranes 50-100% more labels were found on P450PB after this treatment. This indicates that epoxide hydrase is, most likely, deeper embedded in the bilayer than P450PB.