

## ОБЗОРЫ

УДК 612. 015. 1:577.152.162).08

### ПРИРОДНЫЕ И ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ МОНОКОМПОНЕНТНЫЕ ФЛАВОЦИТОХРОМЫ КАК КАТАЛИТИЧЕСКИ САМОДОСТАТОЧНЫЕ МОНООКСИГЕНАЗЫ

В. В. ШУМЯНЦЕВА,\* Ю. Л. АВДЕЕНКО, Т. Л. МОСКВИТИВА, А. И. АРЧАКОВ

Институт биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул., 10  
Факс 245-08-57, E. mail inst@ibmh. msk.su

В обзоре обсуждены свойства цитохрома P450 BM3 (CYP 102, EC. 1.14.14.1) и нитрооксидсинтазы (EC. 1.14.13.39), которые представляют собой ферменты, содержащие на одной полипептидной цепи флавины (FAD и FMN) и гем. Особенностью функционирования таких однокомпонентных окислительно-восстановительных систем является высокая скорость метаболизма субстратов по сравнению с двух- и трехкомпонентными системами, в которых флавины и гем связаны с разными белками. В нашей лаборатории были получены полусинтетические монокомпонентные системы на основе цитохрома P450 2B4, обладающие монооксигеназной и редуктазной активностью. В обзоре приведены данные авторов относительно полусинтетических флавоцитохромов 2B4, моделирующих структурные особенности строения однокомпонентных систем и функциональные свойства двухкомпонентных систем (микросомальной монооксигеназной системы). Такие монокомпонентные гидроксилирующие системы могут быть использованы как биосенсоры при мониторинге лекарств, пестицидов, а также как тест-системы.

**Ключевые слова:** цитохром P450 BM3 (EC. 1.14.14.1), нитрооксидсинтаза (EC. 1.14.13.39) флавоцитохромы, монооксигеназные реакции, моделирование, полусинтетические ферменты.

**ВЕДЕНИЕ.** Цитохромы P450 представляют собой большую надсемью гемтиолатных монооксигеназ. Цитохромы P450 играют важную роль в окислении неполярных низкомолекулярных химических соединений, как попадающих в организм извне (лекарственные вещества, яды, пищевые добавки, атмосферные загрязнения и др.), так и образующихся в клетке (холестерин, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, стероидные гормоны, простагландины и др.) [1]

Продукты окисления этих субстратов, число которых достигает десятков тысяч, в дальнейшем или используются в качестве регуляторов в системах метаболизма клеток, или выводятся из организма.

Митохондриальные и большинство бактериальных P450 систем (тип I) состоят из трех компонентов: FAD-содержащего флавопротеина (NADPH- или NADH-зависимой редуктазы), железо-серосодержащего белка, который переносит электроны от FAD-содержащей редуктазы к цитохрому P450 и гемопротеина цитохрома P450. Микросомальные цитохром P450-содержащие системы состоят из двух компонентов: NADPH-цитохром P450 редуктазы, содержащей FAD и FMN и P450 (тип II). Редуктаза представляет собой белок, состоящий из доменов, гомологичных ферредоксин: NADP<sup>+</sup>-редуктазе (FAD-домен) и флаводоксину (FMN-домен) [2,3]. Редуктаза и P450 связаны с митохондриальной мембраной, а другие составляющие микросомальной монооксигеназной системы (митохондриальный желе-

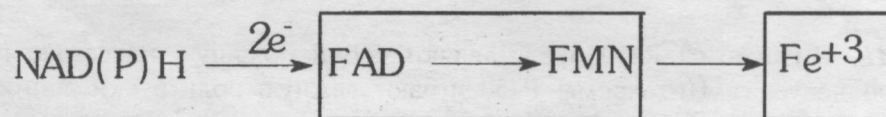
зо-серный редоксин и бактериальные компоненты) - водорастворимы. В системах 2-го класса и цитохром P450, и редуктаза включены в мембрану.

Недавно был обнаружен ряд ферментов, осуществляющих монооксигеназные реакции, в которых и редуктазный (флаavin-связывающий), и гем-связывающий домены находятся на одной полипептидной цепи. Такие системы могут быть названы однокомпонентными самодостаточными монооксигеназами (тип III). К ним относятся цитохром P450 BM3 (CYP 102, EC. 1.14.13.1), выделенный из клеток *Bacillus megaterium* [4] и синтазы оксида азота (EC 1.14.13.39), [5,6].

Цитохром  $b_{558}$  (компонент фагоцитарной NADPH оксидазы) состоит из 2 субъединиц, но тоже может быть отнесен к этой группе. Одним из древнейших представителей семейства флавогемосодержащих белков является флавогемоглобин дрожжей, который можно отнести и к глобинам и к редуктазам [7]. Цитохром P450 BM3 катализирует окисление жирных кислот (w-n ( $n=1-3$ )). Синтаза окиси азота катализирует 5-ти электронное окисление L-аргинина в цитруллин и оксид азота (II). Нитрооксидсинтаза (NOS) содержит FAD, FMN и гем и представляет собой эукариотическую каталитически самодостаточную систему P450 типа [5]. С-концевой домен NOS гомологичен NADPH: P450-редуктазе (CPR), флавопротеину, содержащему FAD и FMN, N-концевой домен функционально подобен цитохрому P450, но имеет с ним низкую гомологию. Бактериальная NOS - система, функционально сходная с NOS млекопитающих, найдена в *Nocardia s* [8].

Гидроксилаза жирных кислот, обнаруженная в *Fusarium oxysporum* представляет собой "белок слияния" (fusion protein [9]) P450 и редуктазного домена, аналогичного P450 BM3.

По одной из классификаций, предложенной в работе [2], NOS млекопитающих и гидроксилазу *Fusarium oxysporum* можно рассматривать как эукариотические однокомпонентные системы P450 типа. Общим для этих каталитически самодостаточных ферментов является схема переноса электронов при активации кислорода.

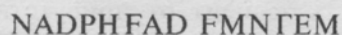


Данный обзор посвящен особенностям функционирования природных однокомпонентных систем P450 типа и полученных синтетическим путем аналогов микросомальной монооксигеназной системы, содержащей на одной полипептидной цепи гем и остаток изоаллоксазинового кольца (FAD, FMN или рибофлавин) как в качестве промежуточного переносчика электронов.

#### 1. ЦИТОХРОМ P450 BM3 (CYP 102)

Цитохром P450 BM3, выделенный из *Bacillus megaterium* - растворимая каталитически самодостаточная монооксигеназа жирных кислот. Полипептидная цепь цитохрома P450 BM3 ( $M_r=119$  кДа) состоит из гемсодержащего домена ( $M_r=119$  кДа) и флавопротеинового домена ( $M_r=66$  кДа), включающего нековалентно связанные FAD и FMN. Каждый из доменов имеет слабую гомологию с микросомальными аналогами. Полипептид содержит 1 моль FAD и 1 моль FMN на моль гема. "P450" домен, содержащий гем, связывает субстрат, а "редуктазный" домен, содержащий флавины, может восстанавливать искусственные электронные акцеп-

торы [10]. Перенос электронов в цитохроме P450 BM3 идет последовательно от NADPH через FAD, затем через FMN на железо гема по следующей схеме:



Аналогичный перенос осуществляется в системе, содержащей NADPH-цитохром P450 редуктазу и цитохром P450 в микросомальной монооксигеназной системе [1].

Методом направленного мутагенеза Klein & Fulco [12] заменили Asp 570 на Gly 570 в аминокислотной последовательности P450 BM3, что привело к потере связывания FMN, и, как следствие, к потере каталитической активности фермента. Эта аминокислота (Asp 570) высоко консервативна и присутствует в составе эукариотической NADPH-цитохром P450 редуктазы, NO-синтазы, флаводоксина, NADPH-сульфитредуктазы и других FMN связывающих белков [11].

Mungo *et al* [13] показали, что Trp 97 может играть важную роль в связывании и стабилизации гема в цитохроме P450 BM3. Замена Trp 97 как на ароматические (Phe, Tyr), так и на алифатические (Ala) аминокислоты приводит к снижению уровня включения гема в цитохром и изменяет спиновое состояние остаточного гема. Однако, кинетический анализ показал, что мутантные ферменты обладают достаточно высокой каталитической активностью в реакциях гидроксирования додекановой кислоты (таблица I).

Таблица 1

Кинетические параметры гидроксирования додекановой кислоты цитохромом P450 BM3 и мутантными ферментами [12]

фермент	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ ( $\text{mM s}^{-1}$ )
P450 BM3	115	33
W 97F	125	5
W 97Y	85	15
W 97A	110	15

Спектры кругового дихроизма и данные электронного парамагнитного резонанса также демонстрируют незначительные изменения вторичной структуры и лигандирования гема. На основании этих данных авторы делают вывод: Trp 97 не играет существенной роли в переносе электронов между флавиновым и гемовым доменом. Однако, гипотеза “ковалентного включения”, предложенная в [14], предполагает, что остаток Trp является медиатором переноса электронов между флавинами и гемом. Замены триптофана на ароматические (W 97F, W 97Y) и не ароматические аминокислоты (W 97A) в P450 BM3 приводят к низкому уровню включения гема, очевидно, ароматический характер триптофана не существенен для поддержания окружения гема. Прямой контакт Trp 97 и гема не обнаружен и в работе, посвященной рентгеноструктурному анализу P450 BM3 [15]. Возможно, что существует водородная связь между Trp 97 и пропионатной группой гема, стабилизирующая это взаимодействие.

Важнейшие характеристики P450 редуктазы - способность использовать NADPH в качестве донора электронов и восстанавливать широкое разнообразие искусст-



венных акцепторов электронов (цитохром с, феррицианид калия и др.). В редуктазе млекопитающих цитохром с редуктазная активность зависит от присутствия как FAD, так и FMN. Oster и коллеги [16] обнаружили, что удалив FMN-содержащий триптический пептид из клонированного "редуктазного" домена цитохрома P450 BM3 можно получить пептид, который способен восстанавливать феррицианид, но не может восстанавливать цитохром с. Цитохром с редуктазная активность цитохрома P450 BM3, зависит от количества связанного FMN. В опытах с цитохромом P450 BM3, в аминокислотной последовательности которого произвели замену триптофана 574\* на тирозин или фенилаланин (W574Y/и W574F) была показана зависимость между количеством связанного FMN в мутантах и их цитохром с редуктазной активностью [11].

Исследуя NADPH-цитохром P450 редуктазу, выделенную из печени крысы, Shen *et al* [12] показали, что феррицианид редуктазная активность зависит в основном от содержания FAD. Однако, в опытах на мутантном цитохроме P450 BM3, было показано отсутствие корреляции между содержанием FAD и феррицианид редуктазной активностью. Это происходит из-за того, что отсутствие связывания FMN ведет к структурным изменениям в цитохроме P450 BM3 и, вследствие этого, к снижению FAD опосредованной активности приблизительно на 60% (связывание FAD снижается на 50%). Если в вышеописанную систему добавляли свободный FMN, феррицианид редуктазная активность повышалась. Это объясняется, во-первых, тем, что FMN, связываясь с соответствующим участком, способствует конформационным изменениям в FAD связывающем локусе. Во-вторых, FMN может служить дополнительным переносчиком электронов к феррицианиду. Таким образом, цитохром с редуктазная активность цитохрома P450 BM3 зависит от содержания FMN, а феррицианид редуктазная активность обусловлена содержанием FAD [11,12].

Исследуя монооксигеназные реакции цитохрома P450 BM3 на примере изучения миристетатгидроксилазной активности данного фермента, было установлено, что замена Trp 574 ведет к конформационным изменениям в цитохроме. Эти изменения, в свою очередь, влияют на процесс переноса электронов к железу гема, но не влияют на перенос электронов к искусственному акцептору - цитохрому с. Мутантные цитохромы, в которых полностью отсутствовал FMN, были неактивны в качестве миристетатгидроксилазы. При замене триптофана Trp (W) 574 на ароматические аминокислоты сохраняется 0,85 моль FMN на моль фермента и сохраняется цитохром с редуктазная активность и только 20 % миристетатгидроксилазной активности. При замене на аспартат или глицин (W 574D или W 574G) не происходит связывания FMN с белком. Эти данные подтверждают существенную роль Trp 574 в переносе электронов между доменом, содержащим гем и редуктазным доменом. Замещение Trp 536 на аспартат (Y 536D) дает фермент с содержанием 0,44 моля FMN на моль фермента. Такой фермент был неактивен в качестве гидроксилазы жирных кислот и проявлял только 2 % цитохром с редуктазной активности.

Исследования линкерного участка [14], связывающего гемсодержащий и "редуктазный" домен, показали, что мутанты с делецией 468-473 (D - мутанты), почти не проявляют гидроксилазной активности, хотя каждый из доменов сохраняет присущие ему функции.

При исследовании связывания субстрата - лаурата натрия и 12-бромлаурата натрия с P450 BM3 методом  $^1\text{H}$  ЯМР было показано, что гуанидиновая группа Arg 47 (R47) образует ионную пару с карбоксильной группой субстрата [18], а Phe 87



(F87) вовлечен во взаимодействие с w-концом субстрата, по которому происходит гидроксирование. В активации кислорода важная роль принадлежит остатку треонина Thr 268 [19].

Изучая цитохром P450 BM3, Miles *et al* [20] получали генетические конструкции, в которых гемсодержащий и “редуктазный” домен проявляли свою активность независимо друг от друга. Простым смешением отдельных доменов P450 BM3 была реконструирована гидроксильная активность [16]. Только в смеси, содержащей 720 нмоль “P450” домена и 3600 нмоль “редуктазного” домена, было зарегистрировано восстановление активности на уровне 1/1000 от активности интактного фермента.

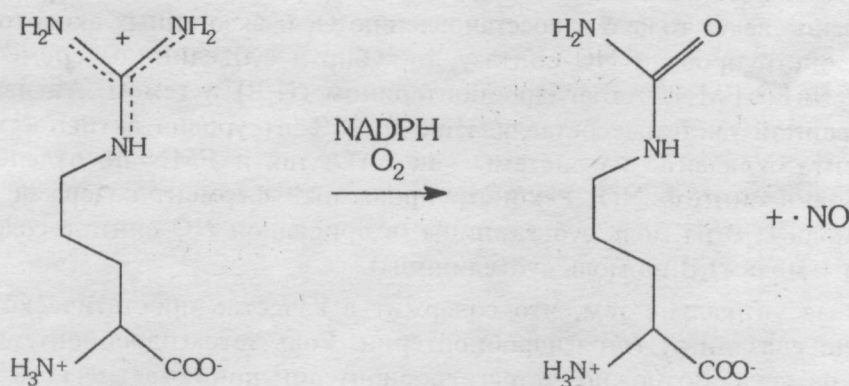
Однако, в работе Gonvindaraj *et al* [21] показано, что в присутствии FMN и NADPH, гемсодержащий домен цитохрома P450 BM3 способен проявлять себя в качестве миристангидроксилазы. Причем, нет необходимости в присутствии “редуктазного” домена в реакционной смеси. Авторы этой работы показали, что возможен перенос электронов от NADPH к железу гема в присутствии экзогенного FMN, причем соотношение “медиатора” (FMN) и акцептора (железа гема) - 1:1.

Таким образом, анализ мутантных цитохромов P450 BM3 выявил важность в функционировании аминокислот: Trp 574, Trp 536, Trp 97, Phe 87, Arg 47, линейного участка 468-473, и кислородсвязывающего Thr 268.

## 2. СИНТАЗА ОКСИДА АЗОТА (II).

Если цитохром P450 BM3 является примером самодостаточной системы у прокариот, то NO-синтаза - каталитически самодостаточная система, найденная у эукариот [5]. С-концевой домен NO-синтазы гомологичен NADPH-редуктазе, тогда как N-концевой гем-содержащий домен гомологичен цитохрому P450 BM3 (CYP102) лишь на 13,9% [2].

NO-синтаза - флавогемопrotein, катализирующий окисление L-аргинина в NO и цитруллин с участием кофактора NADPH.



Все семейство NO-синтаз можно подразделить на 2 группы: а) конститутивная форма, регулируемая  $\text{Ca}^{2+}$  и кальмодулином; б) цитокининдуцированная форма, механизмов ее посттрансляционной регуляции не выявлено. Примерами конститутивной NO-синтазы являются: NO-синтаза, выделенная из мозжечка крысы ( $M_r=150\text{-}160$  кДа, димер, локализована в цитоплазме [22]) и NO-синтаза, вы-

деленная из бычьего эндотелия ( $M_r=135$  кДа, мембраносвязанный фермент) [23]. Цитокининдуцированная изоформа - NO-синтаза макрофагов мыши, проявляет свою активность в форме димера. Макрофагальная NO-синтаза ( $M_r=130$  кДа) состоит из 2 идентичных субъединиц и содержит гем, тетрагидробиоптерин ( $H_4B$ ), FAD, FMN и кальмодулин в соотношении -  $1FAD_2 : 1FMN : 1 \text{ гем} : 0.4-1 H_4B$  и разное количество кальмодулина. Все кофакторы нековалентно связаны с полипептидной цепью NO-синтазы [6]. Субъединица NO-синтазы - это NADPH зависимая редуктаза, приобретающая способность к синтезу оксида азота (II) только после димеризации и связывания гема. Гем и  $H_4B$  с отдельными субъединицами не связываются. Субъединицы NO-синтазы проявляют цитохром с редуктазную и феррицианид редуктазную активности со скоростями, сравнимыми со скоростями для NADPH-цитохром P450 редуктазы и цитохрома P450 BM3 [24,25].

Таким образом, субъединица NO-синтазы, во-первых, содержит нековалентно связанные FAD, FMN и кальмодулин. Во-вторых, субъединица NO-синтазы, восстанавливаясь под действием NADPH, может генерировать стабильный семихиноновый радикал. И, в-третьих, субъединица может катализировать перенос электронов на искусственные акцепторы электронов (цитохром с, феррицианид калия и др.). Все факты указывают на то, что субъединица NO-синтазы похожа на ряд известных флавопротеинов: NADPH-цитохром P450 редуктазу, а субъединицу сульфитредуктазы.

Также, как в цитохроме P450 BM3, перенос электронов в NO-синтазе идет по следующей схеме от NADPH последовательно через FAD, FMN на железо гема:

NADPH                      FAD                      FMN                      ГЕМ

Электронный перенос между FAD и FMN необходим для генерации стабильного флавинсемихинонового радикала или для восстановления гемопротеина, подобного цитохрому с. В димерной NO-синтазе подобный флавин-зависимый перенос электронов идет так же, как и в субъединицах. Он ведет к восстановлению связанного гема и сопряженному синтезу NO. В субъединице NO-синтазы электронный перенос ведет только к восстановлению  $O_2$  и экзогенных акцепторов. Baek *et al* [6] реконструировали NO-синтазу, инкубируя субъединицы совместно с L-аргинином, FAD, FMN, тетрагидробиоптерин ( $H_4B$ ) и гемом. Активность реконструированной системы составляла около 45% от уровня активности интактного фермента. Удаление из системы как FAD, так и FMN по отдельности не снижало уровня синтеза NO. Реконструированный фермент содержал: 0,9 моль гема и 0,4 моль  $H_4B$  на моль субъединицы (в природной NO-синтазе содержится 1 моль гема и 1 моль  $H_4B$  на моль субъединицы).

NO-синтаза уникальна тем, что содержит в качестве простетической группы нековалентно связанный тетрагидробиоптерин. Роль тетрагидробиоптерина ( $H_4B$ ) до сих пор не ясна. Возможно, тетрагидробиоптерин принимает участие в восстановлении гема. Есть предположение, что биоптерин участвует в стабилизации димерной NO-синтазы.

В работе Baek *et al* [6] предложена модель NO-синтазы, механизм ее ассоциации и диссоциации (рис. 1). Важная роль в димеризации фермента принадлежит, по мнению авторов, субстрату - аргинину.

Ghosh & Stuehr [26] показали, что при протеолитическом расщеплении NO-синтазы с помощью протеолиза образуются 2 фрагмента с молекулярной массой

56 и 74 кДа. Меньший фрагмент оставался димерным, содержал: гем, тетрагидробиоптерин ( $H_4B$ ), и мог связывать L-аргинин, CO или имидазол. Большой фрагмент был мономерным и содержал FAD, FMN, кальмодулин и связывал NADPH. Оба фрагмента по отдельности не могли катализировать синтез NO. Однако, флавиносодержащий фрагмент катализировал восстановление цитохрома с со скоростью димерной NO-синтазы. Смешение этих фрагментов не приводит к восстановлению способности синтеза NO, причем потеря этой активности не обусловлена отсутствием связывания субстрата.

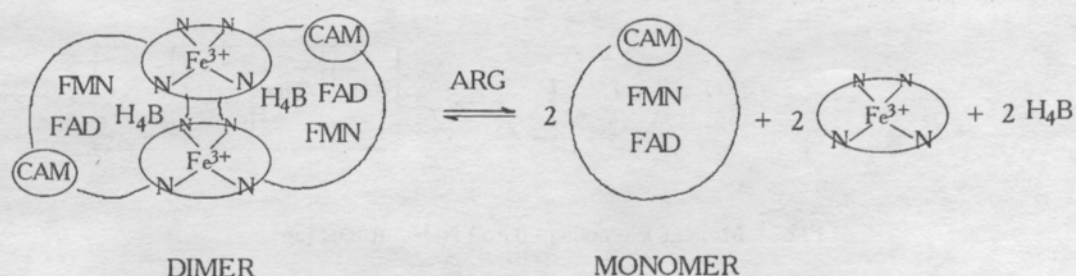


Рис. 1. Механизм ассоциации и диссоциации макрофагальной NO-синтазы [6].

Исследования Xie *et al* [27] показали, что NADPH и флавиносвязывающий участок находятся внутри C - концевой части NO-синтазы. А кальмодулин связывается недалеко от центра полипептида. Renaud *et al* [28], McMilan *et al* [29] определили, что гемсвязывающий участок расположен внутри N - концевой половины, и в связывании гема принимает участие Cys 194. Для NO-синтазы, выделенной из нейронов крысы, в связывании гема принимает участие Cys 415 [29,30,31]. Таким образом, исследуя нитрооксидсинтазы, выделенные из разных источников, разные авторы едины в том, что проксимальным лигандом гема является SH-группа цистеина. Были получены данные, указывающие на то, что гем,  $H_4B$  и субстрат связывающие участки в макрофагальной NO-синтазе локализованы между N - терминальным концом и кальмодулинсвязывающим участком NO-синтазы. В эндотелиальной NO-синтазе Cys 99 принимает участие во включении  $H_4B$ , обеспечивая стабильность и активность фермента [32]. Спектральные данные показали, что L-аргинин связывается рядом с гемом. Ghosh & Stuehr [26] проанализировали эти данные и предложили подробную модель строения NO-синтазы (рис. 2), вполне согласующуюся с более схематичной моделью, которую разработали Baek *et al* [6] (рис. 1). В своей модели Ghosh & Stuehr учли расположение NADPH, FAD, FMN и кальмодулин связывающих участков "редуктазного" домена относительно друг друга, и взаимное расположение тетрагидробиоптерин, L-аргинин и гемсвязывающих участков в "P-450" домене. Причем, связывание субъединиц и образование димерной NO-синтазы идет в результате взаимодействия гемсодержащих доменов, в то время как, "редуктазные" домены остаются несвязанными. Необходимо отметить, что проанализированные последовательности NO-синтазы и цитохромов P450 не имеют гомологии. Однако, анализ спектров магнитного кругового дихроизма приводит к выводу о некоторой схожести строения активных центров нейрональной NO-синтазы и P450<sub>cam</sub>, как тиолат-лигандирующих гемопротеинов, различающихся гидрофобностью или размером полости в окружении гема [31]. Таким образом, в отличие от P450 BM3, в функционировании которого важная роль принадлежит



линкерному участку, обеспечивающему эффективную ориентацию доменов, NO-синтаза активна в виде димера, стабилизированного взаимодействием гемсодержащих доменов.

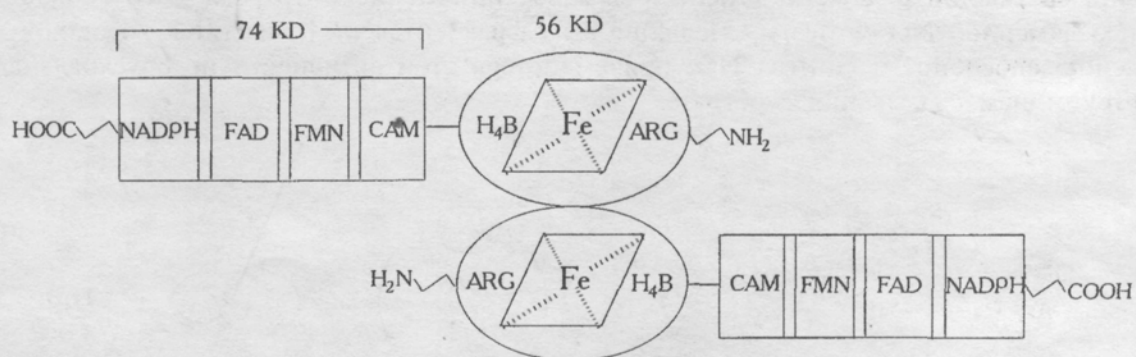


Рис. 2. Модель макрофагальной NO-синтазы [26].

Интересным примером флавогемосодержащего белка является флавоцитохром  $b_2$ . Флавоцитохром  $b_2$  расположен в митохондриальном матриксе *Saccharomyces Cerevisiae*. Фермент катализирует перенос электронов с L-лактата на цитохром с.

L-лактат + 2 феррицитохром с = пируват + 2 ферроцитохром с

Флавоцитохром  $b_2$  является тетрамером. Каждая из субъединиц ( $M_r=58$  кДа) содержит 2 домена: один связывает гем, а другой FMN. Тетрамер состоит из двух ассиметричных объединений, каждое из которых содержит неэквивалентные друг другу субъединицы I и II. В субъединице I содержится и гем- и FMN-связывающие области. В то время, как в субъединице II только FMN-связывающий участок виден на карте электронной плотности [33]. Возможно, гем-содержащий домен расположен в субъединице беспорядочно или находится в субъединице в другой конформации. Более того, на карте электронной плотности флавоцитохрома  $b_2$  молекула пирувата (продукта реакции) видна только в FMN-связывающей области субъединицы II [33]. FMN- и гем-связывающие домены флавоцитохрома  $b_2$  связаны между собой линкерным участком. Гем-содержащий домен имеет значительную гомологию с гем-содержащим доменом цитохрома  $b_5$ . Была показана роль междоменного участка в переносе электронов [33]. Sharp *et al* [33] удалили 3 аминокислоты из междоменного участка (Ala 98, Pro 99, Glu 100), в результате чего практически не снижалась лактатдегидрогеназная активность фермента, в то время как, скорость восстановления гема снижалась в 5 раз из-за плохого междоменного переноса электронов с флавина на гем. По-видимому, укороченный линкерный участок влияет на подвижность гем- и FMN-содержащего домена друг относительно друга, и тем самым мешает правильной взаимной ориентации доменов. В опытах с мутантом флавоцитохрома  $b_2$  (Y143F) была показана важная роль Туг 143 в ориентации субстрата на поверхности флавоцитохрома с помощью водородной связи с карбоксильной группой субстрата в субъединице II. В субъединице I, где нет пирувата, гидроксильная группа Туг 143 расположена на поверхности между FMN- и гемсвязывающими участками и связана с пропионовой кислотой гема, что позволяет Туг 143 быть вовлеченным в перенос электронов между FMN и гемом. В мутанте флавоцитохрома  $b_2$  (Y143F) существенно ухудшается способность к связыванию субстрата и снижается более чем в 20 раз скорость междоменного переноса электронов [35].

Аналогично цитохрому P450 BM3 и NO-синтазе, флавоцитохром  $b_2$  содержит в единой полипептидной цепи флавин- и гем-связывающие домены. Причем перенос электронов идет с лактата на FMN и далее на цитохром с.:

L-лактат  $\rightarrow$  FMN  $\rightarrow$  ГЕМ  $\rightarrow$  цитохром с

Еще одним примером флавогемосодержащего фермента является цитохром  $b_{558}$  [36]. Цитохром  $b_{558}$  - мембранный компонент фагоцитарной NADPH оксидазы, катализирующей восстановление молекулярного кислорода и образование супероксиданион радикала ( $O_2^-$ ), сопряженного с окислением NADPH. Покоящаяся NADPH оксидаза состоит как из цитозольного, так и из мембранного компонента, и может быть активирована во время респираторной вспышки. Цитохром  $b_{558}$  состоит из двух субъединиц: гликопротеиновой ( $M_r=91$  кДа) и белковой ( $M_r=22$  кДа), которая связывает гем.

Sumimoto *et al* [36] измеряли активность оксидазы, используя цитохром  $b_{558}$ , выделенный на агарозной колонке. Активность цитохрома целиком зависела от добавления FAD. Исходя из полученных данных, авторы сделали вывод, что цитохром  $b_{558}$  - это флавопротеин, содержащий нековалентно связанный FAD. Для проверки этого предположения, была проанализирована аминокислотная последовательность большой и малой субъединицы цитохрома  $b_{558}$  в сравнении с различными флавопротеинами (ферредоксин редуктазой, цитохромом P450 BM3, NO-синтазой, NADPH-цитохром P450 редуктазой). Исследования показали, что большая субъединица цитохрома  $b_{558}$  - это флавопротеин с NADPH связывающим участком. Причем как FAD, так и NADPH связывающий участок находится в C - концевой части большой субъединицы. Большую субъединицу можно разделить на 3 различных функциональных домена. N-концевая часть большой субъединицы необходима для связывания гема или для образования стабильного комплекса с малой субъединицей. FAD и NADPH связывающие участки локализованы в середине и в C - концевой части цитохрома соответственно. FAD связывающий участок гомологичен FAD связывающему участку глутатионредуктазы. NADPH связывающий участок цитохрома имеет сходство с NADPH связывающим участком семейства ферредоксин редуктаз, NO-синтазы, NADPH-цитохром P450 редуктазы. Возможно, ген, кодирующий большую субъединицу образовался в результате слияния двух генов, кодирующих образование двух различных типов флавопротеинов.

Сравнив все вышеописанные флавогемосодержащие белки, можно сделать ряд общих выводов:

1). Все флавогемосодержащие белки имеют схожую структуру и содержат на одной белковой молекуле центры связывания как гема, так и флавинов (цитохром P450 BM3, NO-синтаза, флавоцитохром  $b_2$ ). Гемсодержащий домен проявляет себя в качестве акцептора, а флавинсодержащий домен - в качестве переносчика или донора электронов (цитохром P450 BM3, NO-синтаза, флавоцитохром  $b_2$ , цитохром  $b_{558}$ ).

2). Флавины - FAD (цитохром  $b_{558}$ ), FMN (флавоцитохром  $b_2$ ) или FAD и FMN (NO-синтаза, цитохром P450 BM3) - нековалентно связаны с белком.

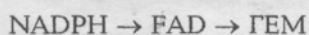
3) Несмотря на то, что разные ферменты используют в качестве субстратов разные соединения, их FAD, FMN, гем и NADPH связывающие участки имеют сходное строение.

4) Перенос электронов в флавоцитохромах идет по следующей схеме:

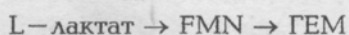
NADPH  $\rightarrow$  FAD  $\rightarrow$  FMN  $\rightarrow$  ГЕМ

(NO-синтаза, цитохром P450 BM3).

Или схема переноса электронов может быть несколько укорочена:



(цитохром  $b_{558}$ ) или



(флавоцитохром  $b_2$ )

Данные ферменты являются примерами каталитически самодостаточных окислительно-восстановительных систем (цитохром P450 BM3, NO-синтаза, флавоцитохром  $b_2$ ).

### 3. ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИЕ ФЛАВОЦИТОХРОМЫ.

Для создания искусственных ферментов, осуществляющий монооксигеназные реакции, характерные для цитохром P450-содержащих систем, были использованы различные приемы: создание химических моделей, содержащие аналоги порфиринов [37,38], включение порфиринов и их аналогов в декстрановые капсулы и матрицы [39], модификация гем-связывающего белка - гемоглобина - производными рибофлавина [40], связывание гема с синтетическими пептидами [41], экспрессия химерных молекул, содержащих флавин- и гем-связывающие домены на одной полипептидной цепи [42,43], получение каталитических антител к металлокомплексам [44,45,46,47].

При конструировании таких систем одним из критериев является уменьшение числа участников (компонентов) с целью создания более эффективного кинетического режима ферментативного процесса.

В таблице 2 приведены значения каталитических констант реакций, катализируемых трехкомпонентными системами (I тип, митохондриальные/бактериальные ферменты), двухкомпонентными системами (II тип, микросомальные ферменты) и монокомпонентными системами (прокариотическим ферментом P450 BM3 и эукариотической NO-синтазой).

*Каталитические константы различных P450-содержащих систем*

Табл. 2

	Фермент	Субстрат	$k_{cat}, \text{min}^{-1}$	
Трехкомпонентная система	Цитохром P450cam (CYP101)	D-камфора	0,33	[48]
Двухкомпонентная система	Микросомы, выделенные из печени кроликов индуцированных фенобарбиталом	диметиланилин	8	[49]
Монокомпонентные системы	Цитохром P450 BM3 (CYP 102)	пентадекановая (лауриновая) кислота	4600	[17]
	Полусинтетический флавоцитохром 2B4	диметиланилин	3	[51]

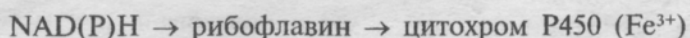
Как следует из таблицы 2, уменьшение компонентов в системах, катализирующих монооксигеназные реакции, приводит к возрастанию  $k_{cat}$ . Для создания искусственных ферментов, обладающих монооксигеназной активностью цитохрома P450, представляющих собой однокомпонентную систему, содержащие на одной белковой молекуле электронодонорный (флавин) и электроноакцепторный (гем) центры, нами были получены флавоцитохромы на основе цитохрома P450 2B4.



Микросомальные системы (ферментативные системы II типа) содержат NADPH-редуктазу и гемопротеин цитохром P450. Перенос электронов в этой системе осуществляется по схеме:



При ковалентном связывании FMN по е-аминогруппам лизиновых остатков с цитохромом P450 2B4 с помощью водорастворимого карбодиимида (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC)) нами были получены монокомпонентные флавоцитохромы. Роль редуктазы выполняли ковалентно связанные молекулы флавинов. Активность полученных флавоцитохромов была сравнима с монооксигеназной активностью микросомальной системы [50]. Однако при ковалентном связывании FMN с помощью EDC происходит также частичная инактивация фермента, связанная с образованием неактивной формы P420. Поэтому нами был разработан более эффективный метод ковалентного связывания изоаллоксазинового кольца с белковой молекулой [47]. При взаимодействии рибофлавина с карбонилдиимидазолом происходит образование активированного по гидроксильным группам производного - имидазилкарбамата рибофлавина, который реагировал с е-аминогруппой лизиновых остатков [52]. Используя различные соотношения активированного рибофлавина по отношению к цитохрому P450, были получены флавоцитохромы, содержащие различные количества ковалентно связанного рибофлавина. Полученные флавоцитохромы образовывали комплекс восстановленной формы с оксидом углерода при восстановлении как дитионитом натрия, так и NADH или NADPH. Это свидетельствует об отсутствии инактивации цитохрома P450, а также о возможности переноса электронов в соответствии со схемой:



Флавоцитохромы 2B4 содержали 2-15 нмоль рибофлавина на 1 нмоль фермента. Полусинтетическая монокомпонентная система проявляла монооксигеназную активность, характерную для двухкомпонентной микросомальной монооксигеназной системы и мономерной реконструированной системы, состоящей из мономеров редуктазы и цитохрома P450 2B4 [49]. Скорости реакции, катализируемых полусинтетическими флавоцитохромами, сравнимы со скоростями реакций, катализируемых двухкомпонентной микросомальной системой [50,51]. Максимальная скорость реакции N-деметилирования амидопирина и диметиланилина наблюдается при соотношении цитохром P450 : рибофлавин (1:11), а п-гидроксилирования анилина 1:14 (рис. 3). Увеличение активности происходит достаточно резко. Это свидетельствует видимо, о том что существует 1-2 аминокислотных остатка на поверхности цитохрома P450 2B4, которые находятся в наибольшей близости к гему или ведущему к гему электронотранспортному пути. При дальнейшем увеличении количества ковалентно связанных рибофлавинов скорости реакции п-гидроксилирования и N-деметилирования уменьшаются. Это может быть связано: 1) с инактивацией гемопротеина при ковалентном связывании большего количества рибофлавинов, 2) с модификацией функционально важных групп белка, 3) с возможными конформационными перестройками фермента, вызываемыми химической модификацией.

Для исследования механизма окисления субстратов полусинтетическими флавоцитохромами были проведены эксперименты в присутствии оксида углерода (II) - ингибитора монооксигеназных реакции цитохрома P450. При образовании карбоксикомплекса реакции N-деметилирования амидопирина и диметиланили-

на ингибируются на 60-73 %, а п-гидроксилирования анилина на 80-93 %. Эти данные свидетельствуют о протекании реакций, в основном, по монооксигеназному, а не пероксидазному пути, несмотря на то, что при восстановлении флавины могут генерировать различные активные формы кислорода, включая  $H_2O_2$  [53].

В присутствии каталазы скорость N-деметилирования амидопирина снижается на 10-30 %, а п-гидроксилирования анилина - на 15-20 %. Эти данные подтверждают монооксигеназный, а не пероксидазный механизм гидроксилирования субстратов полусинтетическим флавоцитохромом 2B4. Супероксиддисмутаза не влияет на скорости процессов, что, вероятно, связано с отсутствием супероксиданион радикала ( $O_2^-$ ) в реакционной среде [51].

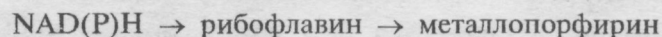
Активация кислорода цитохромом P450 состоит из ряда стадий, отличительной особенностью является изменение соотношения между высокоспиновым и низкоспиновым состоянием железа в сторону высокоспинового состояния и изменения степени окисления железа гема [1]. При ковалентном связывании рибофлавина с цитохромом P450 2B4 происходит увеличение доли высокоспиновой формы с 6-8 % в немодифицированном белке до 15-20 % в флавоцитохроме 2B4 [51]. Возрастание доли высокоспинового состояния в полусинтетическом флавоцитохроме по сравнению с немодифицированным белком представляет собой преодоление первого энергетического барьера в цепи переходных состояний, ведущих к продукту реакции.

Кроме полусинтетических флавоцитохромов в нашей лаборатории сконструированы искусственные ферменты с гидроксилазной активностью [54,55]. В качестве белковой каркасной матрицы мы использовали альбумин из человеческой сыворотки, рибофлавин как электронный медиатор и гемин как центр активации кислорода. В качестве центров активации кислорода мы использовали ряд металлокомплексов: этан-бис-порфирин кобальта, октапиридинометилфталоцианин кобальта и дифталоцианин лютеция. Аналогично гемину эти координационные соединения образуют комплексы с сывороточным альбумином человека.

Порфириноальбуминовые комплексы проявляют каталитическую активность в реакциях п-гидроксирования анилина и N-деметилирования амидопирина. Скорости NAD(P)H зависимых реакций, катализируемых искусственными системами примерно на порядок ниже аналогичных реакций в полусинтетических системах.

Каталитическая активность исследуемых порфирино-альбуминовых комплексов можно представить следующей последовательностью: [этан-бис-порфирин кобальта] > [гемоальбумин] » [октапиридинометилфталоцианин кобальта] » [дифталоцианин лютеция].

Цепь переноса электронов в искусственном гемоальбумине и порфиринальбуминовых комплексах аналогична микросомальной:



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данном обзоре сделана попытка обобщить данные о монокомпонентных ферментах с P450-активностью - цитохроме P450 BM3 и NO-синтазе. Полученные нами полусинтетические флавоцитохромы и искусственные гемопротейны достаточно стабильны в гидроксилазных реакциях и могут найти применение в качестве тест-систем, биосенсоров, окислителей веществ различной природы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1). Archakov A.I., Bachmanova G.I. Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis Eds., London, 1990, p.105.
- 2). Degtyarenko K.N., Archakov A.I., FEBS Letters, 1993, Vol. 332, N. 1, 2, pp. 1-8.
- 3). Degtyarenko K.N. Protein Engineering, 1995, Vol. 8, N. 8, pp. 737-747.
- 4). Narhi L.O., Fulco A.J., J. Biol. Chem., 1986, Vol. 261, N. 16, pp. 7160-7169.
- 5). White K. A., Marletta M.A., Biochemistry, 1992, Vol. 31, N. 29, pp. 6627-6631.
- 6). Baek K.J., Thiel B. A., Lucas S., Stuehr D.J., J. Biol. Chem., 1993, Vol. 268, N. 28, pp. 21120-21129.
- 7) Zhu H., Austen F.R., Proc. Nat. Acad. USA, 1992, Vol. 89, N. 11, pp. 5015-5019.
- 8). Chen Y., Rosazza Y.P.N., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1994, Vol. 203, N. 2, pp. 1251-1258.
- 9). Nakayama N., Shoun H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1994, Vol 202, N. 1, pp. 586-590.
- 10). Narhi L.O., Fulco A.J., J. Biol. Chem., 1987, Vol. 262, N. 5, pp. 2370-2379.
- 11). Klein M.L. and Fulco A.J. J. Biol. Chem., 1993, Vol 268, N. 17, pp. 12231-12234
- 12). Shen A.L., Porter T.D., Wilson T.E. and Kasper C.B., J. Biol. Chem., 1989, Vol. 264, N. 13, pp. 7584-7589..
- 13). Munro A.W., Malarkey K., McKnight J., Thomson A.J., Kelly S.M., Price N.C., Lindsay J.G., Coggins J.R., Miles J.S., Biochem. J., 1994, Vol. 303, 22718-22725.
- 14). Balwin J.E., Morris G.M. and Richards W.G., Proc. R. Soc. London B, 1994, Vol. 245, N. 1322, pp. 43-51.
- 15). Ravichandran K.D., Boddupalli S.S., Hastmann C.A., Peterson J.A., Deisenhofer J., Science, 1993, Vol. 261, pp. 731-736.
- 16). Oster T., Boddupalli S.S., Peterson J.A., J. Biol. Chem., 1991, Vol. 266, N. 33, pp. 22718-22725.
- 17). Govindaraj Sh., Poulos Th.L., Biochemistry, Vol. 34, N.35, pp. 11221-11226.
- 18). Modi S., Primose W.U., Boyle J.M.B., Gibson C.F., Lian Lu-Yun., Roberts G.C.K., Biochemistry, 1995, Vol. 34, N. 28, pp. 8982-8988.
- 19). Yeom H., Sliger S.G., Li H., Poulos Th.L., Biochemistry, 1995, Vol. 34, N. 45, pp. 14733-14740
- 20). Miles J.S., Munro A.W., Rospendowski B.W., Smith W.E., McKnight J., Thomson A.J., Biochem. J., 1992, Vol. 288, N. 2, pp. 503-509.
- 21). Govindaraj Sh., Li H., Poulos T.L., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1994, Vol. 203, N. 3, pp. 1745-1749.
- 22). Leone A.M., Palmer R.M.j., Knowles R.G., Francis P.L., Ashton D.S., Moncada S.; J. Biol. Chem., 1991, Vol. 266, N. 35, pp. 23790-23795.
- 23). Kiechle F.L., Malinski T., Amer J. Clin. Path., 1993, Vol. 100, pp. 567-575.
- 24). Hevel J.M., White A.K., Marletta M.A., J. Biol. Chem., 1991, Vol. 266, N. 34, pp. 22789-22791.
- 25). Marletta M.A., J. Biol. Chem., 1993, Vol. 268, N. 17, pp. 12231-12234.
- 26). Ghosh D.K., Stuehr D.J., Biochemistry, 1995, Vol. 34, N. 3, pp. 801-807.
- 27). Xie Q.W., Cho H.J., Calaycay J., Mamford R.A., Swiderek K.M., Lee T.D., Ding A., Troso T., Nathan C.F., Science, 1992, Vol. 256, pp. 225-228.
- 28). Renaud J.P., Boucher J.L., Vaclon S., Delaforge M. and Mansuy D., Biochem. Biophys. Res. Comm., 1993, Vol. 192, N. 1, pp. 53-60.
- 29). McMillan K., Bredt D.S., Hirsch D.J., Snyder S.H., Clark J.E., Masters B.S.S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, Vol. 89, N. 23, pp. 11141-11145.
- 30). McMillan K., Masters B.S.S., Biochemistry, 1995, Vol. 34, N. 38, pp. 3686-3693.
- 31). Sono M., Stuehr D.J., Saito M.I., Dawson J.N., J. Biol. Chem., 1995, Vol. 270, N. 34, pp. 19943-19948.
- 32). Chen P.-F., Tsai Ah.-Lim, Wu K.K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, Vol. 215, N. 3, pp. 1119-1129.



- 33). Xia Z.X., Mathews F.S., J. Mol. Biol., 1990, Vol. 212, N. 4, pp. 837-863.
- 34). Sharp R.E., White P., Chapman S.K., Reid G.A., Biochemistry, 1994, Vol. 33, N. 17, pp. 5115-5120.
- 35). Tegoni M., Begotti S., Cambillau C., Biochemistry, 1995, Vol. 34, N. 31, pp. 9840-9850.
- 36). Sumimoto H., Sakamoto N., Nozaki M., Sakaki Y., Takeshige K., Minakami S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1992, Vol. 186, N. 3, pp. 1368-1375.
- 37). Meunier B., Chem. Rev., 1992, Vol. 92, pp. 1411-1456.
- 38). Woggon W. D., Patzel H., Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics, INCO-TNC, Joint Stock Company, Moscow, 1992, p. 78..
- 39). Dick D., Rao V., Sukumaran D., Lawrence D. . J. Amer. Chem. Soc., Vol. 114, N. 7, pp. 2664-2669.
- 40). Kukubo T., Sassa S & Kaiser E.T., J. Amer. Chem. Soc., 1987, Vol. 109, N. 2, pp. 606-607.
- 41). Choma Ch.T., Lear J.D., Nelson M.J., Dutton L.P., Robertson D.E., DeGrado W.F., J. Amer. Chem. Soc., 1994, Vol. 116, N.3, pp. 856-865.
- 42). Fisher Ch.W., Shet M.D., Caude D.L., Martin-Wistrom C.A., Estabrook R.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, Vol. 89, N. 22, pp. 10817-10821.
- 43). Sasaki T., Shibata M., Yabusaki Y., Murakami H. & Ohkava H., DNA and Cell Biology, 1990, Vol. 9, pp. 603-614.
- 44). Schwabacher A.W., Weinhouse M.I., Auditor M.-T., Lerner R.A. . J. Amer. Chem. Soc, 1989, Vol. 111, N 6, pp 2344-2346.
- 45). Cochran A.G., Schultz P.G. . Science, 1990, Vol. 249, pp 781-783.
- 46). Barbas C.F. III, Rosenblum J.S., Lerner R.A. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, Vol. 90, N.14, pp 6385-6389.
- 47). Hsich L., Stephans J.C., Schultz P.G. . J. Amer. Chem. Soc., 1994, Vol. 116, N. 5, pp 2167-2168.
- 48). Imai M., Shimada H., Watanabe Y., Matsushima-Hibiya Y., Makino R., Koga H., Horiuchi T., Ishimura Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, Vol. 86, N. 20. pp. 7823-7827.
- 49). Kanaeva I.P., Dedinskii I.R., Skotselyas E.D., Krainev A.G., Guleva I.V., Sevryukova I.F., Koen Ya.M., Kuznetsova G.P., Bachmanova G.I., Archakov A.I., Arch. Biochem. Biophys., 1992, Vol. 298, N 2, pp. 395-412.
- 50). Uvarov V.Yu., Shumyantseva V.V., Bykhovskaya E.A., Kolyada L.N. & Archakov A.I. . Biochem. Biophys. Res. Comm., 1994, Vol. 200, N. 2, 722-725.
- 51). Shumyantseva V.V., Byakova O.E., Uvarov V.Yu, Archakov A.I.,. Biochem. Mol. Biol. Int., 1996, Vol. 38, N 4, pp. 829-838.
- 52). Bethell G.S., Ayers J. S., Hancock W.C., Hearn M.T.W., J. Biol. Chem., 1979, Vol. 254, N. 8, pp. 2572-2574.
- 53). Bruice Th. C., Acc. Chem. Res., 1980, Vol. 13, pp. 256-262.
- 54). Shumyantseva V.V., Zimin A.G., Uvarov V.Yu., Karadeniz Journal of Medical Sciences, 1995, Vol. 8, N 4, pp. 230-231.
- 55). Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Zimin A.G., Uvarov V.Yu., Archakov A.I., Biochem. Mol. Biol. Int., 1996, Vol. 39, N 3, pp. 503-510
- 56). Shumyantseva V.V., Moskvitina T.L., Tomilova L.G., Novodarova G.N., Uvarov V.Yu., Ponomarev G.V., Archakov A.I., XI International Symposium on microsomes and drug oxidation, Los Angeles, 1996, p.198

NATURALLY OCCURRING AND SEMISYNTHETIC MONOCOMPONENT  
FLAVOCYTOCHROMES AS CATALYTICALLY SELF-SUFFICIENT  
MONOOXYGENASES.

*V. V. Shumyantseva\*, Yu. L. Avdeenko, T.L. Moskvitina, A.I. Archakov*

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya st. 10, 119832 Moscow, Russia,  
FAX 245-0857

In this review article the properties of cytochrome P450 BM3 (CYB 102 E.C. 1.14.14.1) and nitric oxide synthase (E.C. 1.14.13.39) have been considered. These enzymes are catalytically self-sufficient P450-like systems, with flavins (FAD and FMN) and heme on one polypeptide molecule. Two- and three component cytochrome P450 systems have flavins and heme on the different protein molecules. The rates of substrate metabolism catalyzed by monocomponent cytochrome P450 BM3 and nitric oxide synthase are substantially higher in comparison with two- and three-component P450 monooxygenase system. In this manuscript authors have been discussed the properties of semisynthetic flavocytochromes based on cytochrome P450 2B4, with monooxygenase and reductase activities. These semi-artificial flavocytochromes obtained by authors serve as structural models of one-component systems and have the functional properties of two-component system (microsomal monooxygenase system).

**Key words:** cytochrome P450 BM3 (E.C. 1.14.14.1), nitric oxide synthase (E.C. 1.14.13.39), flavocytochromes, monooxygenase reactions, modelling, semisynthetic enzymes,.