

УДК 612.015.1:577.152.08

© Коллектив авторов

ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ЦИТОХРОМА P450 И ДРУГИХ МАКРОМОЛЕКУЛ В ПРОЦЕССЕ ИХ ОБНОВЛЕНИЯ

А.И.АРЧАКОВ, В.Г.ЗГОДА, И.И.КАРУЗИНА

Институт Биомедицинской химии РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул., 10;
факс (095) 245-08-57

В обзоре обсуждаются механизмы реакций окислительной самоинактивации и модификации цитохрома P450 и других макромолекул в процессе их обновления.

Важной особенностью цитохрома P450 является то, что он не только генерирует в процессе катализа перекись водорода и другие активные формы кислорода, но и сам инактивируется под их действием. Механизм самоинактивации и модификации цитохрома P450 исследован в частично сопряженных монооксигеназных реакциях, где активные формы кислорода образуются наряду с основным продуктом реакции. Обнаружено, что цитохром P450 инактивируется в основном перекисью водорода, образующейся при распаде пероксикомплекса, и эта реакция характеризуется высокой специфичностью. Детально исследован механизм окислительной модификации цитохрома P450_{2B4} в монооксигеназной реконструированной системе, состоящей из высокоочищенных белков-переносчиков: цитохрома P450_{2B4}, НАДФН-специфичного флавопротеина и цитохрома b₅. Обнаружено, что окислительная инактивация цитохрома P450 сопровождается деструкцией гема и модификацией апофермента. Окислительная деградация гема может служить начальной стадией распада белка. Модификация апофермента сопровождается изменением агрегатного состояния цитохрома P450 и образованием межмолекулярных сшивок. Обнаружено, что перекись водорода участвует в окислении SH-групп белка и в образовании карбонильных групп на его молекуле. Самоинактивация и модификация цитохрома P450 и других ферментов под действием активных форм кислорода может лежать в основе механизма, благодаря которому эндогенные протеазы узнают белки, модифицированные в процессе катализа, и быстро удаляют их из клетки.

Ключевые слова: цитохром P450 самоинактивация, активные формы кислорода, монооксигеназные реакции, модификация, гем, апофермент монооксигеназная реконструированная система.

ВВЕДЕНИЕ. Реакции окислительной модификации макромолекул широко распространены в аэробных организмах и играют важную роль в механизмах регуляции распада белков, в процессах старения и возникновения ряда патологических состояний организма, таких как мутагенез, канцерогенез и аллергия. Особый интерес представляет исследование механизма реакции внутриклеточной окислительной модификации, так как они непосредственно связаны с цитохромом - P450-содержащей оксигеназной системой эндоплазматической сети - основной ферментной системой, генерирующей активные формы кислорода внутриклеточно. При этом выявляются характерные отличия в окислительной

модификации нуклеиновых кислот и ненасыщенных жирных кислот фосфолипидов, с одной стороны, и белков - с другой. В первом случае реакции не отличаются выраженной специфичностью и протекают, как правило, по свободнорадикальному механизму, сопровождающемуся окислением и разрывом нуклеотидных цепей и образованием гидроперекиси альдегидов и кетонв жирных кислот. Эти реакции играют важную роль при канцерогенезе, мутагенезе и других токсических процессах [1-4]. В случае реакции окислительной модификации белков, напротив, специфически затрагиваются лишь определенные аминокислоты, что может служить своего рода сигналом для ускорения протеолитической атаки этого белка нейтральными протеазами [5-9].

В работах Stadtman показано, что высокая специфичность модификации обеспечивается наличием определенного места связывания ионов железа в молекуле белков, разлагающих перекись водорода в реакции Фентона с образованием гидроксильных радикалов, модифицирующих близлежащие аминокислотные остатки [10-12].

Рассмотрение реакций внутриклеточной модификации белков кислородом мы начнем с модификации цитохрома P450, важной особенностью которого является то, что он не только генерирует перекись водорода и другие активные формы кислорода, но и сам инактивируется под их действием [13-15].

1. Окислительная инактивация цитохрома P450 в процессе катализа и при автоокислении.

В ходе оксигеназных реакций цитохром P450 может самоинактивироваться под действием реакционно-способных метаболитов двух типов. Первый тип - это реакционно-способные интермедиаты окисляемых веществ, такие как эпокиси, N-окиси, S-окиси, а также свободнорадикальные состояния субстрата. В основе механизма такого типа инактивации лежит ковалентная модификация гема активными метаболитами [1,14].

Второй тип - это продукты неполного восстановления кислорода, образующиеся в активном центре цитохрома P450 в ходе катализа вследствие разобщенности монооксигеназного цикла. Цитохром P450 микросом печени, в отличие от других монооксигеназ и бактериального цитохрома P450, не окисляет ни один из известных субстратов с полным сопряжением и часть редокс-эквивалентов расходуется в побочных оксидазных реакциях [1]. Активные формы кислорода, такие как $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , гидроксильные радикалы, как правило, появляются при распаде окси- и пероксикомплексов цитохрома P450 и могут быть вовлечены в модификацию цитохрома P450 в процессе катализа [16]. Механизм окислительной инактивации цитохрома P450 и роль этой реакции в физиологии и патологии клетки до конца не исследован.

Генерация активных форм кислорода цитохромом P450. Цитохром P450-содержащая монооксигеназная система является одной из главных систем, продуцирующих активные формы кислорода в клетке. Существует ряд доказательств, показывающих, что такие активные формы кислорода, как $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, могут образовываться в каталитическом цикле цитохрома P450. Образование $O_2^{\cdot-}$ обнаруживается при распаде оксикомплекса P450 [17,18]. Формирование H_2O_2 в каталитическом цикле P450-зависимых монооксигеназных систем возможно за счет двух путей: протонирования и распада пероксикомплекса P450 (прямой путь образования H_2O_2) [19,20] и в результате дисмутации $O_2^{\cdot-}$, полученных при распаде оксикомплекса P450 [21]. Перекись водорода и супероксидный радикал могут претерпевать превращения в реакциях Фентона и Хабер-Вейса и служить, таким образом, источником более реакционноспособных гидроксильных радикалов [22,23].

Генерация супероксидного аниона. P450-зависимая монооксигеназная система микросом состоит из нескольких компонентов: собственно цитохрома P450, NADPH-

специфичного флавопротеина и цитохрома b5. Существует ряд доказательств, полученных как на микросомальных препаратах, так и в реконструированных цитохром P450 - содержащих системах, что $O_2^{\cdot -}$ генерируется главным образом на цитохроме P450 [24-26]. Так, Kuthan и Ullrich показали, что формирование $O_2^{\cdot -}$ в микросомах ингибируется CO [19]. Реакция образования супероксидного аниона и дезэтилирования 7-этоксикумарина в равной степени чувствительны к ингибирующему действию CO, что указывает на главную роль цитохрома P450 в формировании $O_2^{\cdot -}$ [27]. Скорость образования супероксидного радикала в реконструированных системах при отсутствии P450 ничтожно мала, в то время как добавление гемопротейна в систему, содержащую НАДФН и НАДФН-зависимый флавопротеин, вызывает значительное ускорение формирования $O_2^{\cdot -}$ [28].

Добавление антител, специфичных к микросомальному цитохрому b5, вызывает резкое увеличение НАДФН-зависимой продукции супероксидного аниона, в то время как НАДФН ингибирует эту реакцию [29]. Уменьшение генерации $O_2^{\cdot -}$ происходит также при добавлении цитохрома b5 в реконструированную систему, содержащую НАДФН-зависимый флавопротеин, цитохром P450, НАДФН и р-нитроанизол [30]. Учитывая, что один из основных эффектов цитохрома b5 - это ускорение восстановления оксикомплекса в пероксикомплекс, эти данные свидетельствуют о том, что образование $O_2^{\cdot -}$ происходит в результате диссоциации оксикомплекса P450[31].

Генерация перекиси водорода. Впервые возможность образования перекиси водорода в микросомальных препаратах была продемонстрирована в 1957 году Gillette и др. [32]. В дальнейшем эти данные были подтверждены другими исследователями, а также была показана возможность образования H_2O_2 в микросомах как при окислении различных субстратов, так и в их отсутствии. Как и в случае генерации $O_2^{\cdot -}$, большинство исследователей отмечают, что основным продуцентом перекиси водорода в P450-зависимых монооксигеназных системах является цитохром P450. Доказательством тому служат одинаковые энергии активации и сродство к NADPH для реакций образования H_2O_2 и окисления этилморфина [33], а также одинаковая чувствительность этих процессов к ингибирующему действию CO [19]. Кроме того, генерация H_2O_2 ингибируется метирапоном - типичным ингибитором цитохрома P450 [34]. Субстраты по-разному влияют на генерацию перекиси водорода цитохромом P450 [35]. Эффект зависит от природы субстрата и вида цитохрома P450, участвующего в его окислении [36]). Так, амидопирин не влияет на начальную скорость генерации H_2O_2 в интактных и фенobarбитал-индуцированных микросомах, но уменьшает продукцию H_2O_2 в случае использования метилхолантрен индуцированных микросом и увеличивает ее при инкубации микросом с прегненолон-16α-карбонитрилом [34,37]. К увеличению образования перекиси водорода приводит не только добавление некоторых субстратов, но и продуктов их окисления, например, пропанола [38] или продукта окисления бензфетамина - бензиламфетамина [35].

Существует два пути образования перекиси водорода при функционировании P450-зависимых монооксигеназных систем. Первый, непрямой путь образования перекиси через дисмутацию $O_2^{\cdot -}$ был рассмотрен ранее. Возможность прямого пути генерации перекиси водорода цитохромом P450 была показана благодаря стехиометрическим исследованиям. Впервые стехиометрия образования $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 была исследована Kuthan и др. [18]. Не получив линейной зависимости между концентрацией микросомального белка и скоростью образования $O_2^{\cdot -}$, авторы экстраполировали полученную зависимость к нулевой концентрации белка, где отношение скоростей равнялось двум, что указывает на непрямой путь генерации перекиси водорода. Учитывая некорректность такой экстраполяции, Жуков и Арчаков использовали несколько иной метод расчета, с помощью которого была получена линейная

зависимость между концентрацией микросомального белка и скоростью образования $O_2^{\cdot-}$, а также удалось показать, что соотношение концентраций $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ в фенобарбитал-индуцированных микросомах меньше двух, что указывает на возможность образования прямой перекиси в активном центре цитохрома P450 параллельно с образованием не прямой перекиси через дисмутацию $O_2^{\cdot-}$ [39]. Эти данные были подтверждены Ristau и др., которые показали возможность образования прямой перекиси через распад пероксикомплекса P450 [20], а также Imai и др. при исследовании окисления камфоры в монооксигеназной системе *P. putida*, содержащей мутантный цитохром P450 [40].

Окислительная самоинактивация цитохрома P450 в каталитическом цикле. В 1978 году Guengerich показал, что инкубация цитохрома P450, изолированного из фенобарбитал-индуцированных микросом печени крыс, с НАДФН-специфичным флавопротеином и НАДФН в присутствии кислорода приводит к разрушению гема цитохрома P450 [41]. Loosemore и др. также показали, что гемопротеин инактивируется с высокой скоростью в системе, содержащей P450, флавопротеин, НАДФН и фосфатидилхолин. При отсутствии субстрата инактивация одной молекулы цитохрома происходила после 800 каталитических актов. При введении в инкубационную среду диметиланилина число каталитических актов увеличивалось до 2300 [42].

Инактивация в ходе каталитического цикла также наблюдалась для тромбоксан-синтетазы [43] и цитохрома P450, обладающего высокой специфичностью к 7-алкоксикумарину в экспериментах на фенобарбитал-индуцированных микросомах печени крыс [44]. В последнем случае авторы связывали инактивацию с образованием высокореактивного метаболита при окислении 7-этоксикумарина. Но факты, показывающие, что при окислении меченого субстрата не происходит ковалентного связывания метки, говорят против этого предположения.

Возможность окислительной инактивации цитохрома P450 показана и в экспериментах *in vivo*. Так, в работе Deloria и др. показано уменьшение активности P450-зависимой системы при введении интерферона или интерферон-индуцирующих агентов. Уменьшение содержания цитохрома P450 сопровождалось 3-10 кратным увеличением ксантиноксидазной активности в микросомах животных, получавших интерферон. Авторы связывают уменьшение содержания цитохрома P450 с окислительным действием активных форм кислорода, источником которых является ксантиноксидазная система [45].

Исследование механизма окислительной инактивации цитохрома P450. Относительно природы агента, инактивирующего цитохром P450, и его источников существуют различные мнения. Guengerich и др. придерживаются мнения, что источником перекиси водорода, которая, окисляя гем, инактивирует цитохром P450, является НАДФН-специфичный флавопротеин. Это предположение основывалось на том, что в реконструированной системе, содержащей флавопротеин, НАДФН и свободный протопорфирин IX наблюдалось разрушение протопорфирина с образованием определенных продуктов его распада. Те же продукты распада гема были получены в системе, содержащей флавопротеин, цитохром P450 и НАДФН, в аэробных условиях. Инактивация цитохрома P450 и разрушение протопорфирина IX ингибировалось введением в систему каталазы [41].

В 1980 году Loosemore и др. показали возможность инактивации цитохрома P450 в каталитическом цикле в экспериментах, проведенных на реконструированной системе. По мнению авторов, инактивация происходила под действием перекиси водорода, образующейся на цитохроме P450 [42]. Исследования, проведенные в нашей лаборатории Карузиной и др., также показали участие перекиси водорода, генерируемой цитохромом P450, в окислительной самоинактивации гемопротеина [13-15]. В работах, которые

проводились на фенотал-индуцированных микросомах печени кроликов, было показано, что цитохром P450 инактивируется в процессе окисления субстратов обоих типов: I-го - диметиланилина, безнфетамин, амидопирин, р-нитроанизола, и II-го типа - анилина. При окислении субстратов снижение содержания цитохрома P450 происходило без образования неактивной формы P450 - цитохрома P420, что говорит о разрушении или потере гема при инактивации цитохрома. При этом добавление ингибиторов каталазы в инкубационную среду значительно увеличивало скорость обесцвечивания цитохрома P450, что указывает на участие H_2O_2 в инактивации [46].

Как было показано ранее, перекись водорода в цитохром P450-зависимых монооксигеназных реакциях может генерироваться либо путем дисмутации супероксидных радикалов, либо прямым путем в активном центре фермента при распаде пероксикомплекса. С целью выяснения роли прямой и не прямой перекиси водорода в инактивации цитохрома P450 были исследованы скорости обесцвечивания гемопротейна при различных pH среды и в условиях присутствия или отсутствия ионов Mg^{2+} . Как было показано ранее, низкие значения pH и отсутствие ионов Mg^{2+} являются условиями, при которых увеличивается скорость образования прямой перекиси водорода [47]. Полученные Карузиной и др. данные об увеличении скорости инактивации цитохрома P450 в этих условиях и уменьшении скорости инактивации в присутствии Mg^{2+} и щелочных pH, говорит в пользу прямой перекиси водорода, как основного агента, разрушающего цитохром P450 [14].

С целью выяснения роли не прямой перекиси водорода было проведено сравнительное исследование скоростей инактивации в условиях образования перекиси водорода на цитохроме P450 и в других ферментных системах. В качестве P450-независимого источника H_2O_2 использовалась глюкозооксидазная ферментная система [48]. Исследования показали, что в P450 зависимой системе скорость инактивации была в 3-5 раз выше, чем в генерирующей перекись водорода глюкозооксидазной системе, хотя скорость образования H_2O_2 в обоих случаях была одинаковой [46].

При изучении инактивации на микросомах была выявлена потеря активности исключительно для цитохрома P450. Другие ферменты, например глюкозо-6-фосфатаза, а также переносчик электронов - цитохром b5 не были подвержены инактивирующему действию H_2O_2 . При этом активность НАДФН-феррицианид и НАДФН-цитохром с редуктаз даже увеличивалась [49]. Высокая специфичность окислительной инактивации цитохрома P450, заключающаяся в том, что в процессе катализа модифицируется только фермент, генерирующий активные формы кислорода, позволяет говорить о суицидном механизме инактивации. Можно предположить, что в отличие от неспецифической модификации белков, наблюдаемой в системах, генерирующих активные формы кислорода, окислительная самоинактивация цитохрома P450 в монооксигеназных реакциях может специфически регулировать распад только функционирующего фермента. В соответствии с данными других авторов, генерируя активные формы кислорода, цитохром P450 монооксигеназная система может участвовать в окислительной инактивации других внутриклеточных ферментов, регулируя тем самым и их распад в клетке [50].

Инактивация восстановленной формы цитохрома P450 в процессе автоокисления. Ранее в нашей лаборатории было показано, что изолированный цитохром P450 2B4 в растворе после восстановления дитионитом переходит в неактивную форму цитохром P420 [51,52]. Считается, что инактивация происходит под действием активных форм кислорода, которые образуются при самоокислении цитохрома P450. Доказательством участия активных форм кислорода в этом процессе является замедление перехода цитохрома P450 в форму P420 в анаэробных условиях, а также замедление инактивации в присутствии CO [53].

На скорость инактивации восстановленных форм цитохромов оказывают влияние различные факторы. Включенный в липосомы или микросомальный цитохром P450 более стабилен как в восстановленном, так и в окисленном состоянии [54]. Imai и др. показали, что стабильность цитохромов в восстановленном состоянии зависит в первую очередь от вида самого цитохрома [55]. Наибольшей лабильностью обладают такие формы цитохромов, как P450 2C5 и P450 2B4. Цитохром P450 1A2, выделенный из фенobarбитал-индуцированных микросом, инактивировался с небольшой скоростью, в то время как та же форма цитохрома, выделенная из метилхолантрен-индуцированных микросом, не инактивировалась вовсе. Предполагается, что стабильность цитохрому в данном случае придает прочно связанный с ферментом метилхолантрен. Все формы цитохромов P450 стабильны в присутствии дитиотреитола и глицерина.

В нашей лаборатории было проведено сравнительное исследование инактивации восстановленных форм цитохромов - бактериального (P450 линолульный- P450лин) и микросомального, выделенного из печени животных, индуцированных фенobarбиталом (P450 2B4). Было показано различие в механизмах их инактивации [56]. Так, если для P450 2B4 формы наблюдалось замедление инактивации в условиях отсутствия кислорода, то на скорость инактивации P450лин анаэробизм не оказывал влияния. Также было выявлено различное влияние добавок аминокислот на скорость перехода цитохрома P450 в неактивную P420 форму. Для P450 2B4 наибольший защитный эффект оказывали цистеин и метионин, в то время как P450лин защищали главным образом ароматические аминокислоты - триптофан, тирозин, фенилаланин. Серосодержащие соединения (дитиотреитол и восстановленный глутатион) оказывали защитный эффект для обеих форм цитохрома.

Из этих данных авторы делают предположение, что переход цитохрома P450 2B4 в P420 сопровождается модификацией серосодержащих аминокислот, а в инактивации P450лин кроме этого важную роль играет и модификация ароматических аминокислот [56].

Учитывая тот факт, что неактивная P420 форма цитохрома P450 нестабильна и в присутствии кислорода быстро теряет гем, можно предположить, что образование P420 является одним из этапов деградации цитохрома P450 в клетке [57].

2. Исследование окислительной модификации гема и апофермента цитохрома P450 в монооксигеназной реконструированной системе.

Как было показано ранее, инактивация цитохрома P450 в монооксигеназных реакциях сопровождается обесцвечиванием гемопroteина. Эти данные говорят о возможной потере или деструкции гема цитохрома P450. Guengerich в своих работах показал, что в P450 содержащей реконструированной системе происходит разрушение гема, сопровождающееся образованием дипиррольных пропентдиопентов, которые способны модифицировать апофермент [41]. В дальнейшем Schaefer и др. идентифицировали шесть основных продуктов разрушения гема. Ими оказались гематиновая кислота, метилвинилмалеимид и четыре типа пропентдиопентов [58].

Исследования, проведенные в нашей лаборатории по изучению влияния перекиси водорода на активность цитохрома P450, показали, что в процессе инкубации гемопroteина с H_2O_2 происходит потеря гема цитохромом. Однако, в данном случае не происходило каких либо критических изменений в первичной и пространственной структуре белка, так как авторам удалось почти полностью восстановить активность фермента путем его инкубации с геминном [59].

В отличие от H_2O_2 , инкубация с гидроперекисью кумола приводила к быстрой, необратимой инактивации цитохрома P450, которая сопровождалась модификацией апофермента продуктами распада гема. Это обстоятельство, а также короткое время жизни

образованных гемовых фрагментов позволили исследователям провести структурный анализ инактивированного цитохрома и использовать эти данные для идентификации аминокислот, входящих в активный центр цитохрома P450 2B1 [60].

Исследования, проведенные Mukhopadhyay и Chatterjee на микросомах в условиях свободного окисления НАДФН, показали, что в ходе инактивации цитохрома P450 происходит образование карбонильных групп, в результате окисления аминокислотных остатков образуются битирозины и наблюдается снижение содержания триптофанов. Модифицированный белок был в большей степени подвержен протеолизу, чем интактный [61].

Способность цитохрома P450 инактивироваться в каталитическом цикле также была показана в исследованиях, проведенных в монооксигеназной реконструированной системе, состоящей из мономеров цитохрома P450 и НАДФН-специфичного флавопротеина в присутствии эмульгена 913 [62,63]. При этом наибольшая скорость инактивации была получена при соотношении флавопротеин:цитохром P450, равном 1:2. Инактивация цитохрома в реконструированной системе сопровождалась образованием новой фракции P450, которая была обнаружена при ионообменной хроматографии на ДЕАЕ колонке. Авторы связывают увеличение времени удержания инактивированного цитохрома P450 с изменением его физико-химических свойств и поверхностного заряда белка, в частности. Последующая гель-проникающая хроматография фракции, соответствующей инактивированному цитохрому, выявила наличие нескольких пептидных фрагментов с молекулярными массами от 15 до 40 кДа [64]. Основываясь на этих результатах, авторы предполагают, что цитохром P450 в процессе инактивации может частично расщепляться неэнзиматическим путем или вследствие присутствия в препаратах изолированного из микросом цитохрома P450 следовых количеств протеаз.

Окислительная самоинактивация цитохрома P450 2B4 в монооксигеназной реконструированной системе (МРС). С целью более детального выяснения структурных изменений в молекуле цитохрома P450 2B4 в процессе катализа исследовалась самоинактивация гемопротеина в МРС при различном соотношении мономеров цитохрома P450 2B4 и НАДФН-специфичного флавопротеина в присутствии детергента эмульгена 913 [65,66]. Как видно из данных, приведенных на рис. 1, скорость инактивации цитохрома P450 2B4 в МРС зависит от соотношения белков-переносчиков. Цитохром P450 инактивировался с более высокой скоростью в системе, где соотношение гемопротеина и флавопротеина было равно 1:1. В этом случае уже после двадцати минут инкубации при 30°C цитохром P450 инактивировался на 70%. Уменьшение концентрации NADPH-зависимого флавопротеина в 20 раз, при которой концентрация белков-переносчиков становилась приблизительно такой же, как в микросомальной мембране, приводило к замедлению инактивации фермента. В этом случае содержание цитохрома P450 снижалось на 85% через 8 часов после начала реакции. Содержание цитохрома P450 в отсутствие НАДФН уменьшалось через 8 часов инкубации не более чем на 10%, что свидетельствовало о том, что инактивация гемопротеина в монооксигеназных реконструированных системах является НАДФН-зависимой реакцией. Инактивация цитохрома P450 коррелировала со скоростью образования перекиси водорода и сопровождалась снижением бензфетамин гидроксилазной активности.

Несмотря на значительные различия в скоростях инактивации цитохрома P450 в монооксигеназных системах, содержащих гемопротеин и флавопротеин в соотношениях 1:1 и 1:20, расчет количества инактивированных молекул P450 на 1000 молекул перекиси водорода показывает одинаковые значения этих параметров (табл.1). При этом более высокая скорость инактивации P450 в системе с содержанием переносчиков, равной 1:1, коррелировала с более

быстрым образованием перекиси водорода. Эти данные указывают на участие H_2O_2 в процессе инактивации гемопротеина. Ранее это было показано для цитохрома P450, находящегося в составе микросомальной мембраны [67]

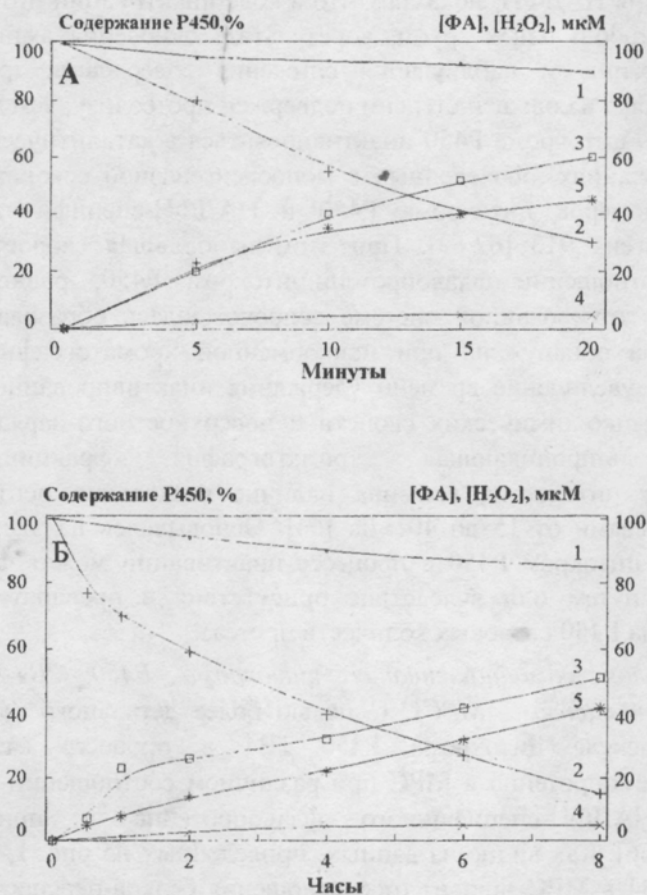


Рисунок 1.

Инактивация цитохрома P450 в МРС при соотношении цитохрома P450 и НАДФН-специфичного флавопротеина 1:1 (А) и 1:0.05 (Б): (—■—) P450(-НАДФН) (1); + P450(+НАДФН) (2); (—□—) H_2O_2 (+НАДФН) (3); (—×—) H_2O_2 (-НАДФН) (4); (—*—) Формальдегид (ФА) (5).

При исследовании влияния цитохрома b5 на скорость инактивации P450 было обнаружено замедление скорости обесцвечивания P450 на 30%, которое коррелировало с замедлением скорости генерации перекиси водорода на начальном участке реакции (рис. 2). При этом коэффициент инактивации, рассчитанный для монооксигеназной системы в присутствии b5, приближался к таковому, полученному в экспериментах с микросомами (табл. 1). Очевидно, замедление скорости инактивации цитохрома P450 в присутствии цитохрома b5 связано с уменьшением генерации прямой перекиси водорода, так как известно, что цитохром b5, являясь донором второго электрона, снижает концентрацию оксикомплекса и способствует более быстрому распаду пероксикомплекса P450 с образованием продукта, а не H_2O_2 [68,69].

Результаты исследования каталазы на инактивацию цитохрома P450 2B4 в МРС в процессе окисления бензфетамина представлены на рис. 3. Добавление каталазы в систему в концентрации 50 ед/мл защищало цитохром P450 от инактивации в среднем на 40%.

Увеличение концентрации каталазы до 100 ед/мл и более не вызывало дальнейшего снижения скорости инактивации цитохрома P450. Тот факт, что каталаза имеет ограниченное ингибирующее действие, предполагает наличие недоступного для ее действия пула

Таблица 1. Коэффициенты инактивации цитохрома P450 2B4 для НАДФН – зависимых оксигеназной и оксидазной реакций (количество инаktivированных молекул цитохрома P450 в расчете на 1000 молекул образовавшейся H_2O_2).

Цитохром P450	Коэффициент инактивации	
	При окислении бензфетамина	Без субстрата
В составе микросом	5.2 ± 0.5	7.0 ± 0.5
В составе МРС		
Соотношение P450 : ФП : b5		
1 1 0	11.0 ± 0.4	13.0 ± 0.3
1 0.05 0	12.2 ± 0.2	13.0 ± 0.1
1 0.05 1	6.4 ± 0.1	-

перекиси водорода, то-есть прямой перекиси, генерируемой в активном центре цитохрома P450. Ингибирующее действие каталазы, очевидно, связано с изменением градиента концентрации перекиси водорода между активным центром фермента и окружающей средой. В присутствии каталазы в инкубационной среде происходит разрушение перекиси водорода, которое увеличивает градиент концентрации и тем самым ускоряет диффузию перекиси водорода из активного центра в окружающую среду. Уменьшение концентрации перекиси водорода в активном центре приводит к снижению скорости инактивации цитохрома P450[70].

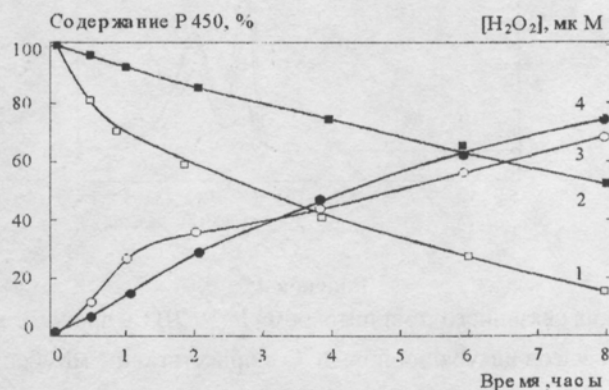


Рисунок 2.

Изменение содержания цитохрома P450 2B4 и накопления перекиси водорода в МРС в присутствии и отсутствии b5.

- содержание P450 без b5 (1); —■— то же в присутствии b5 (2);
 —○— концентрация H_2O_2 без b5 (3); —●— то же в присутствии b5 (4);

Исследование модификации гема в процессе инактивации цитохрома P450 2B4 в МРС. Исследование механизма окислительной модификации гема цитохрома P450 в МРС показало, что инактивация цитохрома P450 сопровождается снижением содержания связанного с белком гема. При этом площадь пика, соответствующая по объему элюции

нативному цитохрому P450 2B4, использовалась как количественный параметр для

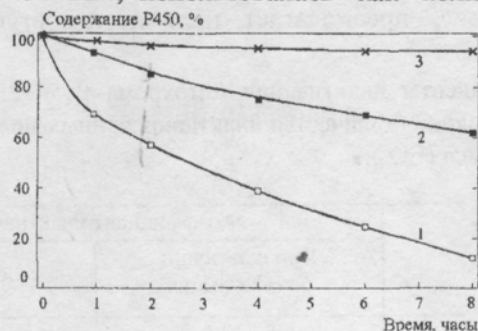


Рисунок 3.

Влияние каталазы на инактивацию цитохрома P450 2B4 в МРС в процессе окисления бензфетамина.

1 - P450 (+НАДФН) (\square); 2 - P450 (+НАДФН; +каталаза 50 и более ед/мл) (\blacksquare); 3 - P450 (-НАДФН) (\times);

определения содержания связанного с белком гема. Как видно из рис. 4, в процессе инактивации наблюдается уменьшение площади этого пика, что указывает на уменьшение содержания связанного с цитохромом P450 гема. В контрольных экспериментах, при инкубации реконструированной системы в отсутствие НАДФН в течение восьми часов снижение количества связанного гема не превышало 5% от исходного уровня.

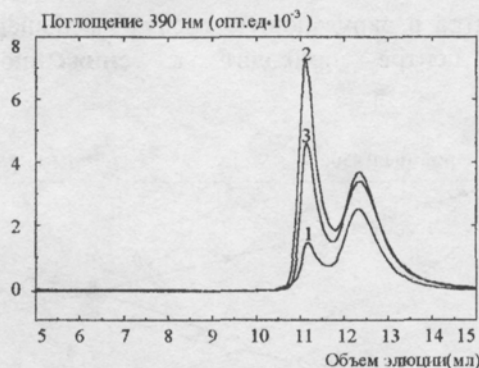


Рисунок 4.

Изменение содержания связанного гема цитохрома P450 2B4 в процессе инактивации в МРС.

1 - контроль; 2 - восемь часов инкубации при 30°C в присутствии 1 мМ бензфетамина. 3 - восемь часов инкубации при 30°C в присутствии 1 мМ бензфетамина и 2 мМ НАДФН.

Для того чтобы решить вопрос, происходит ли в процессе инактивации P450 разрушение гема или только его потеря белком, было измерено содержание общего гема пиридингемохромоновым методом. Этот метод позволяет определять общее содержание гема в среде независимо от того, связан он с белком или находится в растворе.

На рис. 5 представлена корреляционная зависимость между скоростью инактивации цитохрома P450 в МРС в процессе окисления бензфетамина и содержанием связанного и общего гема. Как видно из рисунка, содержание общего гема снижается в процессе инактивации так же, как и содержание связанного гема.

Учитывая полученные нами данные о высокой степени корреляции между скоростью инактивации цитохрома Р450 и уменьшением содержания связанного с ферментом гема, можно предположить, что обесцвечивание цитохрома Р450 в процессе инактивации связано либо с деструкцией, либо с потерей гема цитохромом Р450. Так как содержание общего гема, измеренного пиридингемохромогенным методом, снижалось с той же скоростью, что и содержание связанного гема, можно заключить, что в процессе инактивации цитохрома Р450 происходит деструкция гема. Этот вывод находится в соответствии с данными, полученными в лаборатории Guengerich [41], где было показано, что перекись водорода, образующаяся в оксидазной реконструированной системе, может вызывать деградацию гема

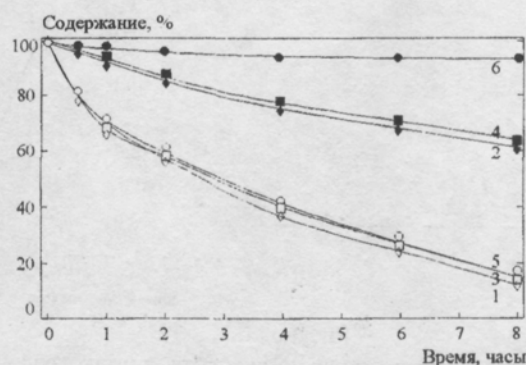


Рисунок 5.

Зависимость между инактивацией цитохрома Р450 2В4 и изменением содержания связанного и общего гема в процессе НАДФН зависимого окисления бензфетамин в МРС

Цитохром Р450: 1 - без каталазы (◇) 2 +каталаза (◆)

Связанный гем: 3 - без каталазы (□) 4 +каталаза (■)

Общий гем: 5 - без каталазы (○) 6 +каталаза (●)

цитохрома Р450, продукты распада которого в дальнейшем способны ковалентно связываться с апоферментом, что может лежать в основе механизма окислительной инактивации цитохрома Р450.

Добавление каталазы в МРС в концентрации 50 ед/мл защищало цитохром Р450 от инактивации на 40% (рис.5) В такой же степени уменьшалась скорость снижения содержания связанного с ферментом гема. В то же время каталаза полностью защищала от разрушения общий гем. Сопоставляя результаты, полученные при исследовании модификации гема в присутствии каталазы и без нее, можно предположить, что в деструкции гемовой части цитохрома Р450 участвует как перекись водорода, локализованная в активном центре цитохрома Р450, так и, частично, перекись водорода, накапливающаяся в инкубационной среде. Однако, по нашему мнению, их роль в деградации гема различна. Вероятно, что сначала под действием перекиси водорода, образующейся в активном центре при распаде пероксикомплекса, нарушается связь между гемом и апоферментом, на что указывают данные о корреляции процессов инактивации и потери связанного гема как в присутствии, так и в отсутствии каталазы. Исходя из наличия защитного эффекта каталазы на содержание общего гема можно предположить, что следующей стадией деградации гема является его разрушение под действием перекиси водорода, накапливающейся в инкубационной среде.

Окислительная модификация апофермента. Хроматографические исследования показали, что в процессе инактивации цитохром Р450 изменяет свое агрегатное состояние (рис. 6). При этом уменьшение площади пика, соответствующего нативному мономерному

цитохрому P450, сопровождалось образованием агрегатов белка с молекулярными массами 95 - 300 и более кДа. Общая площадь пиков хроматограммы в процессе инактивации P450 не изменялась. На рис. 7 показана зависимость между инактивацией цитохрома P450 в монооксигеназной системе в процессе окисления бензфетамина и агрегацией цитохрома P450. Как видно из графика, процессы инактивации и уменьшение содержания белка в области 50 кДа проходили параллельно. Введение в инкубационную среду каталазы в одинаковой степени замедляло как инактивацию, так и агрегацию цитохрома P450.

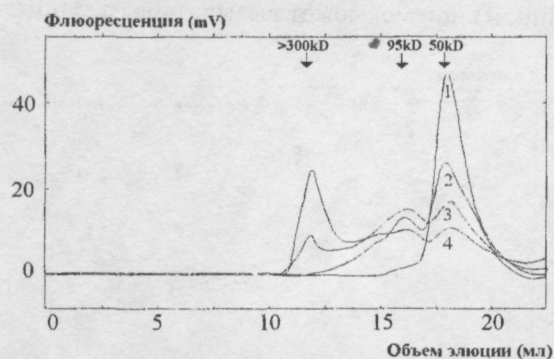


Рисунок 6.

Гель-проникающая высокоэффективная жидкостная хроматография нативного (1) и инактивированного в МРС цитохрома P450 в течение четырех (2), восьми (3) и двадцати четырех (4) часов. Хроматографию проводили на колонке BioSil Sec250 уравновешенной 100 mM натрий-фосфатным буфером, pH 7.4, содержащим 0.25% эмульген 913, при скорости элюции 1 мл/мин. Регистрацию профиля разделения проводили с использованием метода постколоночной модификации NH_2 -групп с ортофталевым альдегидом и последующей регистрацией флюоресценции.

Исходя из приведенных выше результатов, можно предположить два механизма образования агрегатов в результате инактивации P450. Первый - за счет изменения физико-химических свойств апофермента, как следствие окислительной модификации аминокислот, которая может вести к изменению поверхностного заряда фермента, увеличению гидрофобности при денатурации белка. Второй механизм - это образование межмолекулярных ковалентных сшивок [71].

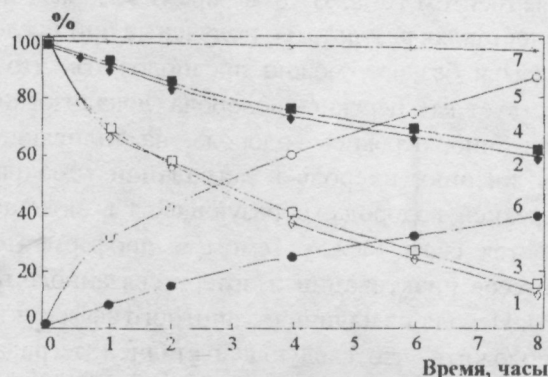


Рисунок 7.

Корреляция между агрегацией цитохрома P450 2B4 и его инактивацией в монооксигеназной реконструированной системе. 1 - Изменение содержания цитохрома P450 2B4 регистрируемое по CO-дифференциальному спектру поглощения (\diamond); 2 - то же в присутствии каталазы (\blacklozenge); 3 - Уменьшение площади пика в области 50 кДа. (\square); 4 - то же в присутствии каталазы (\blacksquare); 5 -

Образование агрегатов (сумма площадей пиков с молекулярной массой более 95 кДа (\ominus); 6 -- то же в присутствии каталазы (\bullet); 7 - Суммарная площадь пиков с молекулярными массами более 5 кДа (\times).

Подтверждением изменения физико-химических свойств белка являются данные, полученные при хроматографическом разделении компонентов монооксигеназной системы на ионнообменной ДЕАЕ колонке. Как видно из рис. 8, при хроматографии компонентов монооксигеназной реконструированной системы в начальный момент инкубации цитохром Р450 не связывался с носителем и элюировался в свободном объеме колонки. В процессе инактивации цитохрома Р450 наблюдалось появление новой белковой фракции. Скорость образования новой фракции коррелировала со скоростью инактивации цитохрома Р450, при этом содержание флавопротеина не изменялось.

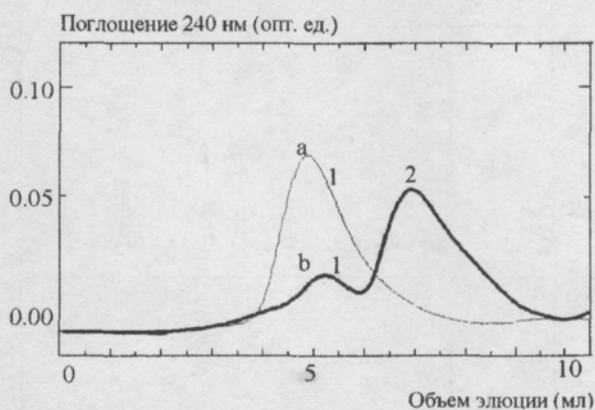


Рисунок 8.

Ионнообменная ДЕАЕ-HPLC нативного (a) и инактивированного (b) в МРС цитохрома Р450 2В4. Фракции 1 и 2 содержали соответственно нативный и инактивированный цитохром Р450. Хроматографию проводили на колонке TSK DEAE, уравновешенной 100 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 7.4, содержащим 0,25% эмульген 913, при скорости элюции 0,5 мл/мин

Высокая степень корреляции между процессами самоинактивации цитохрома Р450 и агрегации гемопroteина, а также одинаковое ингибирующее действие каталазы на эти процессы указывают на единый механизм их возникновения. Среди причин, вызывающих агрегацию цитохрома Р450, можно предположить окислительное действие перекиси водорода на боковые цепи аминокислот, которое приводит к изменению физико-химических свойств белка. Из данных представленных на рис. 9 видно, что инактивация цитохрома Р450 сопровождалась изменением содержания SH-групп белка. Общая площадь флуоресцирующих пиков уменьшалась за 3 часа на 38% и за 6 часов на 60% от их исходного содержания. При этом уровень флуоресценции 1-го пика в течении всего срока инактивации оставался постоянным, а флуоресценция трех остальных убывала со скоростью, равной скорости инактивации цитохрома Р450. Так, через 3 и 6 часов инактивации суммарная площадь 2, 3 и 4-го пиков уменьшалась до 50% и 20%, соответственно. Исследования инактивации, проведенные в отсутствие бензфетамина, не показали принципиальных различий с экспериментами, проведенными в присутствии субстрата. Как и в случае присутствия субстрата, свободное окисление НАДФН сопровождалось снижением уровня флуоресценции тех же трех пептидов, при этом большая скорость инактивации цитохрома Р450 сопровождалась более быстрым уменьшением площади пиков.

Для выяснения возможности образования ковалентных межмолекулярных сшивок были проведены исследования с использованием ДСН-ПААГ и гель-проникающей хроматографии в присутствии 0,1% ДСН в элюирующем буфере. Как видно из рис. 10 в

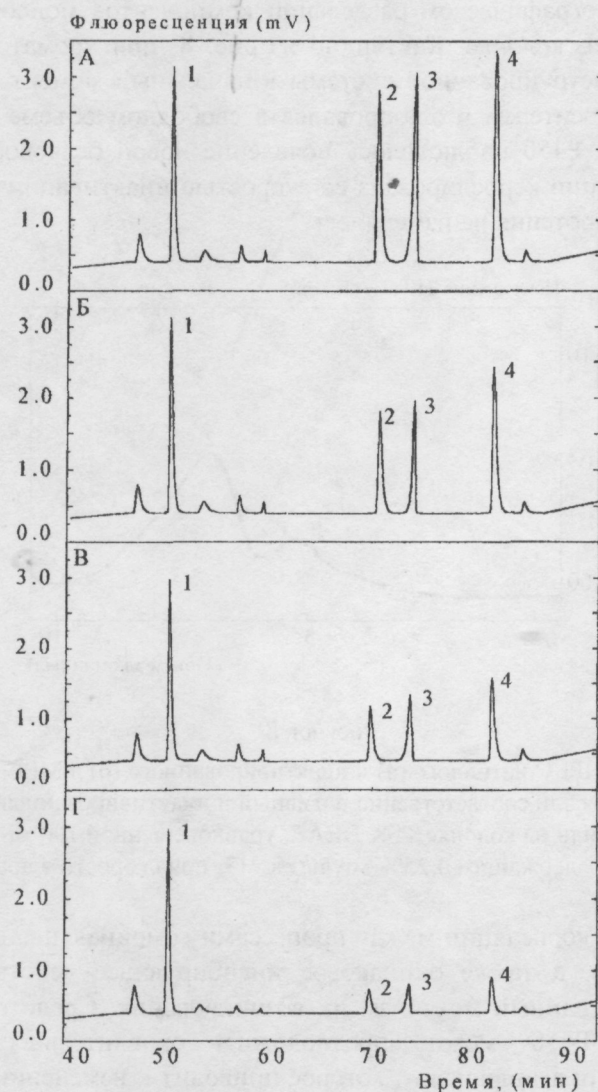


Рисунок 9.

Содержание SH-групп в молекуле нативного и инактивированного цитохрома P450, измеренное методом пептидного картирования. А - 0 часов инактивации; Б - после трех часов инактивации; В - после шести часов инактивации. Г - 6 часов инактивации в отсутствии бензфетамина.

процессе инактивации цитохрома P450 происходит полимеризация гемопротеина с образованием ди-, тримеров и т.д. белка. Использование меркаптоэтанола при подготовке пробы к разделению, а также присутствие его в элюирующем буфере не изменяло профиль разделения белков. Факт образования межмолекулярных сшивок в процессе окислительной инактивации P450 был подтвержден с использованием ДСН-ПААГ. Как видно из рис.11, истощение полосы, соответствующей цитохрому P450_{2B4} сопровождается образованием белковых полимеров с молекулярными массами 94 и 178 кДа. Сравнение скоростей

образования полимеров со скоростью инактивации P450 показало отсутствие корреляции между этими процессами (рис. 12). Так, к восьми часам работы монооксигеназной системы инактивировалось 85% цитохрома P450, в то время как уменьшение площади пика в области 50 кДа не превышало 40%.

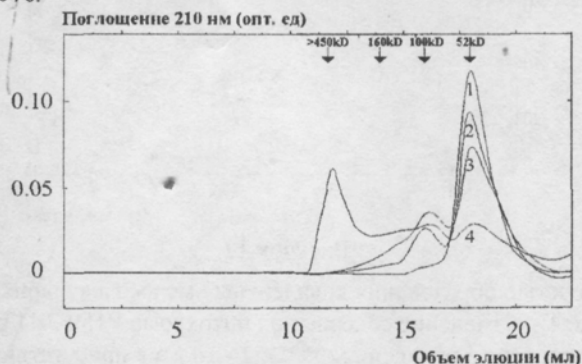


Рисунок 10.

Гель-проникающая высокоэффективная жидкостная хроматография нативного (1) и инактивированного в МРС цитохрома P450 в течение четырех (2), восьми (3) и двадцати четырех (4) часов. Хроматографию проводили на колонке TSK4000 уравновешенную 100 mM натрий-фосфатным буфером, pH 6,9, содержащим 0,1% SDS, при скорости элюции 1 мл/мин. Регистрацию профиля разделения проводили при 210 нм.

Низкая скорость образования межмолекулярных сшивок между агрегатами указывала на вторичность этого процесса. Данные, полученные при исследовании процесса полимеризации в присутствии каталазы, которая замедляла процесс полимеризации в среднем на 75% (рис. 12), указывало на ведущую роль перекиси водорода в образовании межмолекулярных ковалентных сшивок. Исходя из литературных данных о возможности полимеризации гемопротеинов под действием перекиси водорода, можно предположить, что в модификацию апофермента цитохрома P450 вовлечены неспецифические радикальные реакции [72]. Вероятно, ведущую роль в этом процессе могут играть высокореакционные гидроксильные радикалы, образующиеся при распаде перекиси водорода в реакции Фентона при участии железа гема в качестве катализатора. Одним из показателей участия гидроксильных радикалов в модификации апофермента цитохрома P450 является

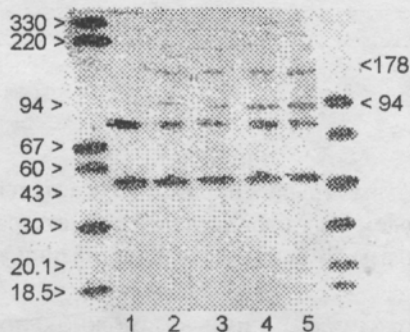


Рисунок 11.

ДСН-ПААГ электрофорез нативного и инактивированного в МРС в течение двух (2), четырех (3), шести (4) и восьми (5) часов цитохрома P450.

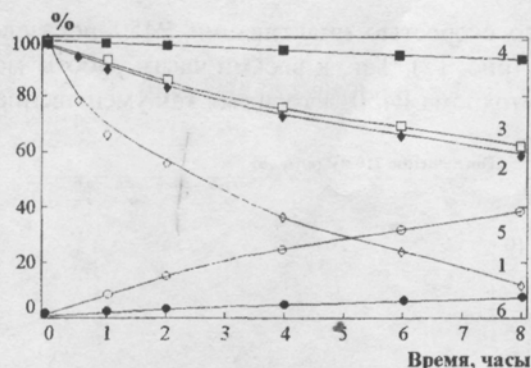


Рисунок 12.

Зависимость между скоростью образования ковалентных межмолекулярных сшивков и инактивацией цитохрома P450 2B4 в. 1 - Изменение содержания цитохрома P450 2B4 регистрируемое по СО - дифференциальному спектру поглощения (\diamond); 2 - то же в присутствии каталазы (\blacklozenge); 3 - Уменьшение площади пика в области 50 кДа. (\square); 4 - то же в присутствии каталазы (\blacksquare); 5 - Образование полимеров (сумма площадей пиков с молекулярной массой более 100 кДа (\ominus); 6 -- то же в присутствии каталазы (\bullet);

образование карбонильных групп. На рис. 13 представлены результаты измерения содержания карбонильных групп белка, образующихся в процессе инактивации P450. Как видно из хроматограмм, через шесть часов инактивации наблюдается значительное увеличение содержания карбонильных групп белка, причем наибольший их прирост происходит за счет высокомолекулярной фракции (100 кДа и более) полимеризованного белка. Каталаза ингибировала процесс образования карбонильных групп на 35%.

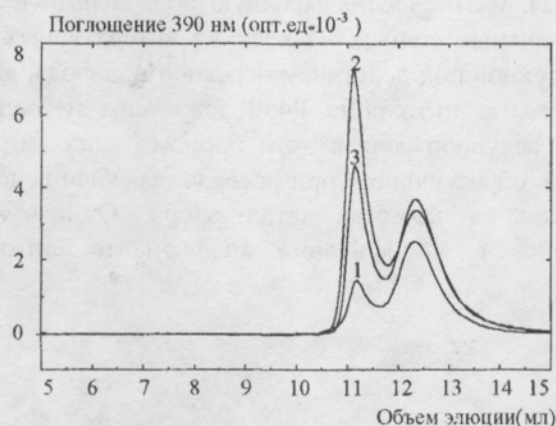


Рисунок 13.

Изменение содержания карбонильных групп в процессе окислительной инактивации цитохрома P450 2B4 в MPC регистрируемое методом гель-проникающей хроматографии. 1- контроль 2- шесть часов инактивации в MPC без каталазы. 3- шесть часов инактивации в MPC присутствии каталазы.

Исходя из вышеизложенных данных, можно предложить для рассмотрения следующую схему инактивации цитохрома P450 в MPC (рис.14). Как следует из данных, представленных в первой части работы, цитохром P450 самоинактивируется в основном под действием H_2O_2 , образованной прямым путем при распаде пероксикомплекса в реакции окисления бензфетамина. При действии перекиси водорода на апофермент происходит

модификация некоторых аминокислот, в том числе цистеина 436, окисление которого ведет к потере гема цитохромом P450. Следствием потери гема и окислительной модификации аминокислот цитохрома P450 являются конформационные изменения гемопротейна, что выражается в увеличении гидрофобности, денатурации и изменении поверхностного заряда белковой молекулы. Именно эти изменения физико-химических свойств апофермента цитохрома P450, по нашему мнению, являются причиной образования белковых агрегатов. С другой стороны, перекись водорода, накопленная в инкубационной среде, является причиной

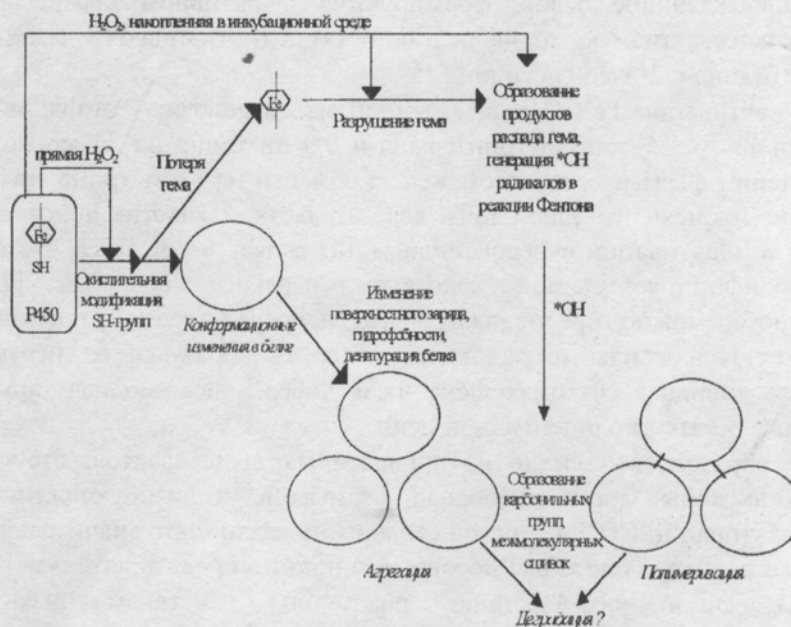


Рисунок 14 .
Общая схема инактивации цитохрома P450 2B4 в МРС.

появления неспецифических свободнорадикальных процессов. Так, при взаимодействии H_2O_2 с гемом происходит разрушение последнего с образованием продуктов распада гема, освобождением ионов железа и генерацией высокореактивных гидроксильных радикалов, которые, в свою очередь, являются причиной полимеризации и вызывают модификацию некоторых аминокислот, которая сопровождается образованием карбонильных групп на молекуле цитохрома P450.

3. Внутриклеточная окислительная модификация других маромолекул и их деградация

Наряду с цитохромом P450 известно много других ферментов, которые инактивируются активными формами кислорода в ходе катализа. Одним из первых ферментов, для которого была установлена возможность окислительной самоинактивации, является супероксиддисмутаза (СОД). Изучая механизм действия СОД, авторы [73] обнаружили инактивацию фермента во время дисмутации супероксидного радикала в течение нескольких минут. Изменение активности фермента сопровождалось изменениями в ЭПР спектрах белка, спектра поглощения в видимой области, а также изменением

аминокислотного состава фермента, которые выражались в модификации одного остатка гистидина на субъединицу белка. Добавление каталазы в инкубационную среду ингибировало процесс самоинактивации СОД. Природа инактивирующего СОД агента была исследована Hays и др. [74], которые показали, что СОД инактивируется под действием одного из продуктов распада перекиси водорода - гидроксильного радикала. В настоящее время процесс инактивации Cu, Zn- супероксиддисмутаза исследован подробно на всех уровнях организации белка. Так, в работе Uchida и Kawakishi показано, что активные формы кислорода, повреждающие белок, формируются в активном центре фермента, что и объясняет высокоселективную модификацию остатка гистидина-118, которая выражалась в окислении гистидина в 2-оксо-гистидин [75].

При инактивации Fe-СОД, выделенной из *Pseudomonas ovalis*, модифицировались наряду с гистидином 1,5 остатка триптофана и 0,9 цистеина на димер молекулы фермента [76]. В неактивном ферменте, где атом железа заменен на атом хрома, такой модификации аминокислот не происходит. Еще одним доказательством участия ионов железа и переходных металлов в инактивации супероксиддисмутаза является тот факт, что Mn - содержащая СОД не модифицируется под действием перекиси водорода [77]. Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что непосредственной причиной повреждения белка являются гидроксильные радикалы, которые, образуясь из перекиси водорода и супероксидного аниона в реакциях Фентона и Хабер-Вайса, модифицируют близлежащие аминокислотные остатки полипептидной цепи.

Таким образом, как видно из приведенных выше фактов, отсутствие в системе, генерирующей активные формы кислорода, ферментов, утилизирующих перекись водорода, приводит к инактивации СОД. С другой стороны, показано, что значительные концентрации супероксидного радикала способны необратимо инактивировать каталазу [10]. Инактивация каталазы, выделенной из *Aspergillus niger*, под действием низких концентраций супероксидного аниона, является обратимой реакцией [78].

Действие активных форм кислорода (АФК) на макромолекулы не ограничивается модификацией апофермента. Например, в работах Blum и Fridovich показано участие H_2O_2 и $O_2^{\cdot -}$ в обратимой инактивации глутатион -SH-пероксидазы [79]. Окислительное действие АФК в данном случае было направлено на простетическую группу фермента. В некоторых случаях АФК вызывают обесцвечивание гем-содержащих белков в результате потери или деструкции гема [80,81].

Инактивация ферментов в процессе катализа - широко распространенное явление. Среди ферментов, для которых H_2O_2 является либо субстратом, либо продуктом реакции, наиболее хорошо изучены D-глюкозооксидаза [82], ксантиноксидаза [83], хлорпероксидаза [84], цитохром с пероксидаза [85], лактопероксидаза [86], глутатионпероксидаза [79]. Более двадцати лет изучается инактивация в каталитическом цикле цитохром с пероксидазы [85]. В настоящее время показано, что наряду с изменениями в УФ и ЭПР спектрах белка происходит модификация некоторых его аминокислот. В частности, Kim и Egtan на основе полного аминокислотного анализа апобелка выявили, что происходит модификация 1,7 остатка метионина на молекулу фермента. В дальнейшем, с использованием метода пептидного картирования были установлены участки преимущественного их окисления.

Особый механизм инактивации был обнаружен при исследовании миелопероксидазы, которая теряла активность под действием H_2O_2 (косубстрата) и гипохлорной кислоты (продукта реакции). Причем механизм инактивации под действием продукта и косубстрата реакции был различным [87]. Восемь остатков метионина и один триптофан окислялись при воздействии гипохлорной кислоты, в отличие от окисления шести остатков метионина при инкубировании фермента с перекисью водорода. Также

различаются пути инактивации фермента в присутствии азиды натрия и без него [88]. Потеря активности фермента сопровождалась потерей или разрушением гема [89].

Вторую группу ферментов, которые инактивируются под действием активных форм кислорода, составляют ферменты, для которых АФК не являются ни субстратом, ни продуктом реакции. Действительно, многие энзимы, включая папаин [90], карбоксипептидазу А, алкогольдегидрогеназу [91], глутаминсинтетазу [50], аспарагинсинтетазу [92], ацетилдегидролазу [93] и другие могут быть инактивированы под действием активных форм кислорода.

Некоторые исследователи полагают, что универсальность повреждающего действия АФК на макромолекулы является подтверждением гипотезы о регулирующей роли активных форм кислорода в деградации белковых молекул в организме [12,94].

В последнее время обнаружены ферменты, инаktivация которых служит сигналом о повреждении клетки. Так, при исследовании влияния перекиси водорода на состояние ферментных систем эритроцитов было показано, что из всего спектра энзимов только гексокиназа была подвержена инаktivирующему действию кислородных радикалов. При этом скорость инаktivации гексокиназы коррелировала со скоростью разрушения эритроцитов. Гексокиназа, отвечающая за энергетический баланс клетки, является одним из ключевых ферментов. Учитывая, с одной стороны, неспособность эритроцитов синтезировать этот белок, а также отсутствие каких бы то ни было значительных повреждений мембраны эритроцитов, с другой, авторы делают вывод, что инаktivация именно гексокиназы является первым сигналом о повреждении клетки, который вызывает последовательность событий, приводящих к ее разрушению [95].

Исследование действия определенного вида АФК на макромолекулы является сложной задачей вследствие короткого времени их жизни и способности к взаимопревращениям. Поэтому о действии АФК судят по косвенным данным, полученным с использованием их ловушек или ферментов, утилизирующих активные формы кислорода. Так, ингибирующее действие каталазы позволяет судить о причастности к процессу перекиси водорода, ингибирование супероксиддисмутазой указывает на участие $O_2^{\cdot-}$, защитное действие маннитола, тиомочевины, ионола связывают с участием гидроксильных радикалов.

Активные формы кислорода способны оказывать различный модифицирующий эффект на белки. В работах Davies и др. подробно исследован механизм действия АФК на аминокислотный состав белков [96]. Как показывают результаты, полученные при исследовании семнадцати белков, принадлежащих к различным классам, все аминокислоты в той или иной мере подвержены действию активных форм кислорода, хотя такие аминокислоты, как триптофан, тирозин, гистидин и цистеин наиболее чувствительны к окислению. При соотношении OH радикал/белок, равном 10, наблюдалась потеря в среднем 10% аминокислот, при увеличении этого соотношения до 100 модификация аминокислот была около 45% от их содержания в контрольных экспериментах. Исследования, выполненные с использованием радикальных ловушек, показали, что именно OH вызывает модификацию аминокислот, в то время как $O_2^{\cdot-}$ является лишь потенциатором его действия [96].

Наиболее подробно авторы исследовали механизм модификации триптофана. Так, было показано, что инкубация БСА с гидроксильными радикалами приводит к образованию битирозинов. Совместное действие OH и $O_2^{\cdot-}$ также приводило к потере триптофанов, но образования битирозинов при этом не происходило [97].

Кроме модификации аминокислотных остатков, кислородные радикалы способны вызывать фрагментацию полипептидной цепи белков. Некоторые авторы обнаружили возможность расщепления пептидной связи, которое сопровождалось высвобождением

NH₂-групп [98,99]. Показана также возможность разрыва полипептидной цепи по альфа-углеродному атому аминокислот, которая ведет к образованию карбонильных групп [100]. Как следствие изменений в первичной структуре, изменяется и пространственная организация белка.

Гидроксильный радикал сам по себе или в комбинации с супероксидным анионом вызывает изменение вторичной и третичной структур сывороточного бычьего альбумина, повышая его гидрофобность [100]. Увеличение гидрофобности ведет к образованию агрегатов, которые в случае экспонирования белка с гидроксильным радикалом полимеризовались путем образования битирозиновых межмолекулярных сшивок. При совместном действии гидроксильных и супероксидных радикалов образование агрегатов происходило, по видимому, за счет ионных и гидрофобных взаимодействий между молекулами БСА.

Одним из путей распада поврежденных белков является неферментативное расщепление белковых молекул при совместном действии гидроксильных и супероксидных радикалов [101].

Другим, более эффективным путем деградации модифицированных белков является их ферментативное расщепление. В последние несколько лет широко исследуются вопросы энзиматической деградации модифицированных молекул белка. Точка зрения о том, что за расщепление белков ответственны только лизосомальные ферменты, в настоящее время не подтверждается. Лизосомальные ферменты отвечают, в первую очередь, за лизис внутриклеточных органел клетки, в то время как большинство цитозольных белков расщепляются внутриклеточными растворимыми цитозольными протеазами [7].

Ускорение деградации белков, вызванное кислородным стрессом, наблюдалось как для прокариотических [102]), так и для эукариотических клеток [103]. При инкубировании очищенных белков в ферментативных и химических модельных системах, генерирующих АФК, показано ускорение и избирательность деградации поврежденных макромолекул [104]. Причем избирательность оказывается выше, если использовать протеазы, входящие в гидролизат интактных клеток [7]. Данные эксперименты были проведены на различных клетках и их лизатах, включая эритроциты [105], ретикулоциты [106], на клетках скелетной и сердечной мышц [107], гепатоцитах [108], *E. coli* [109].

Как было показано, деградация модифицированных белков в клеточных экстрактах и в самих клетках проходила вплоть до образования свободных аминокислот [110]. Данные наблюдений указывают на совместное действие в этих процессах протеиназ, протеаз и пептидаз. Причем лимитирующим звеном в деградации модифицированных белков является протеиназная активность то-есть распознавание поврежденных молекул и первичное их расщепление [111].

Высокая специфичность действия протеиназ по отношению к поврежденным белкам, а также высокая согласованность действия протеолитических ферментов наводит на мысль о существовании сложных протеазных комплексов, распознающих и утилизирующих поврежденные белковые молекулы. И, действительно, такие системы были обнаружены. Rasifici и др. показали существование таких комплексов в эритроцитах, в которых около 80% белков из общего числа поврежденных кислородными радикалами утилизировались протеиназным комплексом [112]. Авторы определили, что данный комплекс обладает мультипротеолитической активностью и включает в себя SH-, металло и сериновые протеазы. В дальнейшем такой мультипротеазный комплекс был обнаружен во всех исследованных клетках млекопитающих и назван макроксипроотеиназой (МОП) [111].

Как указывалось ранее, влияние активных форм кислорода на физико-химические свойства белков выражалось в повышении гидрофобности и денатурации белка. Именно эти

изменения, как считает ряд авторов, служат сигналом для активации протеолитических ферментов и МОП, в частности [113].

Деградирующая цитохром P450 система, по мнению ряда авторов, состоит из двух ферментных систем: системы, фосфорилирующей цитохром P450, и системы, расщепляющей гемопротеин [114]. Eliasson и др. показали, что все агенты, которые ускоряют деградацию P450, способствуют фосфорилированию Ser-129 цитохрома P450 2E1. С другой стороны, субстраты для 2E1 ингибировали деградацию и фосфорилирование гемопротеина с высокой степенью корреляции между этими процессами ($r=0.93-0.96$) [115]. В той же лаборатории фосфорилирующий агент был выделен и идентифицирован. Им оказалась мембраносвязанная протеинкиназа, которая обладала специфичностью по отношению ко многим белкам и цитохромам P450, в частности [116].

Вторая часть системы, деградирующей цитохрома P450, представлена протеазами. По данным Zhukov и др. расщепляющая цитохром P450 система состоит, по крайней мере, из двух протеаз. Оба энзима имеют молекулярные массы 32 кДа, наиболее активны при pH 8,0 и связывают 3H-диизопропилфторофосфат, что указывает на их принадлежность к классу сериновых протеаз [117].

В исследованиях, проведенных с использованием механизм-активируемых субстратов, обнаружен иной механизм деградации P450 [118]. Так, при инактивации P450 3A1 под действием DDEP гемопротеин с высокой скоростью ($t_{1/2} = 3-4$ часа) расщепляется по убиквитин/АТФ зависимому пути. По мнению авторов, деградация инактивированных молекул цитохрома P450 осуществляется мультипротеазным комплексом с молекулярной массой около 1500 кДа.

В работах Mukhopadhyay и Chatterjee показана возможность деградации инактивированного в процессе окислительной модификации цитохрома P450 по АТФ/убиквитин независимому пути [61].

Таким образом, на основе приведенных литературных данных можно предположить существование нескольких систем деградации P450 в клетке. Во-первых, связанная с эндоплазматическими мембранами клетки АТФ-зависимая система деградации цитохромов P450, которая выполняет функцию по обновлению белкового состава микросом, и, во-вторых, система быстрого удаления белков поврежденных суицидными субстратами и активными формами кислорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A., Bachmanova G. (1990.) Cytochrome P450 and active Oxygen. London: Taylor & Francis.
2. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. (1972). Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. / М. Наука.
3. Demple B., Halbrook (1983.) J. Nature. **304**, 466-468.
4. Sies H. (1987.) Drug metabolism - from molecules to man / Eds. Benford D., Bridges J., Gibson G. London: Taylor & Francis. pp. 709-721.
5. Cooper M.B., Creeth J.M., Donald A.S. (1985.) R. Biochem. J. **228**, 615-628.

6. *Fucci L., Oliver C., Coon M.J., Stadtman E.R.* (1983.) *Proc.Nat.Acad.Sci. USA.* **80**. 1521-1525.
7. *Rivett A.* (1985.) *J. Arch. Biochem. Biophys.* **243**. 624-632.
8. *Stadtman E.R., Wittenberger M.E.* (1985.) *Arch.Biochem.Biophys.* **239**. 379-385.
9. *Wolff S.P., Dean R.T.* (1986.) *Trends Biochem.Sci.* **11**, 27-31.
10. *Halliwell B., Gutteridge J.* (1986.) *Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 501-514.
11. *Jenzer H., Kohler H., Broger C.* (1987.) *Arch. Biochem. Biophys.* **258**. 381-390.
12. *Stadtman E.* (1986.) *R. TIBS.* **11**, 11-12.
13. *Карузина И., Арчаков А.* (1987.) *Вестник АМН СССР.* **7**, 60-67.
14. *Карузина И. И., Бачманова Г. И., Арчаков А. И.* (1995.) *Вестник АМН СССР.* **2**, 17-29.
15. *Karuzina I. I., Archakov A. I.* *Free Rad. Biol. & Med.* **17**, 557-567.
16. *Sasame H., Mitchell J., Gillette J.* (1975.) *Fed. Proc.* **34**, Abstr. 729.
17. *Estabrook R., Kawano S., Werringloer J., Kuthan H., Tsuji H., Graf H., Ullrich V.* (1979.) *Acta. Biol. Med. Germ.* **38**. 423-434.
18. *Kuthan H., Tsuji H., Graf H., Ullrich V., Werringloer J., Estabrook R.* (1978.) *FEBS Lett.* **91**. 343-345.
19. *Kuthan H., Ullrich V.* (1982.) *Eur. J. Biochem.* **126**. 583-588.
20. *Ristau O., Wagnerova D., Rein H., Ruckpaul K.* (1989.) *Biochemistry.* **34**, 1111-1118.
21. *Archakov A., Zhukov A.* (1987.) *Drug Metabolism-From Molecules to Man./ Eds. Benford D., Bridges J., Gibson G.* London: Taylor & Francis. pp.473-476.
22. *Cederbaum A., Dicker E.* (1983.) *Biochem. J.* **210**, 107-113.
23. *Halliwell B., Gutteridge J.* (1984.) *Biochem. J.* **219**, 1-14.
24. *Auclair C., de Prost D., Hakim D.* (1978.) *Biochem. Pharmacol.* **27**, 355-358.
25. *Archakov A., Zhukov A.* (1989.) *Basis And Mechanisms Of Regulation Of Cytochrome P450./Eds. Ruckpaul K., Rein H.* Berlin: Akademie-Verlag. **1**, pp.151-175.
26. *Zhukov A., Blanck J., Ristau O., Ruckpaul K., Archakov A.* (1989.) *Cytochrome P450: Biochemistry and Biophysics / Ed. Schuster I.* London: Taylor & Francis. pp.85-89.
27. *Ullrich V., Kuthan H.* (1980.) *Biochemistry, Biophysics and Regulation of Cytochrome P450/ Eds. Gustafsson J., Carlstadt-Duke J., Mode A., Rafter J.* Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. Pp. 267-272.
28. *Soodaeva S., Skotselyas E., Zhukov A., Archakov A.* (1982.) *Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications./ Eds. Hietanen E., Laitinen M., Hanninen O.* Amsterdam: Elsevier Biomedical Press. pp.615-618.
29. *Dybing E., Nelson S., Mithell J., Sasame H., Gillette J.* (1976.) *Mol. Pharmacol.* **12**, 911-920.
30. *Ingelman-Sundberg M., Johansson I.* (1980.) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **97**, 582-589.
31. *Estabrook R., Hildebrandt A., Baron J., Netter K., Liebman K.* (1971.) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**, 132-139.
32. *Gillette J., Brodie B., La Du B.* (1957.) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **119**, 532-539.
33. *Rivett A. J.* (1985.) *J. Biol. Chem.* **260**. 300-305.
34. *Estabrook R., Werringloer J.* (1994.) *Microsomes and Drug Oxidations/ Eds. Ullrich V., Roots I., Hilderbrandt A., Estabrook R., Conney A.* Pergamon Press: Oxford: pp.748-757.
35. *Nordblom G., Coon M.* (1977.) *Arch. Biochem. Biophys.* **180**, 343-347.
36. *Gorsky L., Koop D., Coon M.* (1984.) *J. Biol. Chem.* **259**, 6812-6818.
37. *Hilderbrandt A., Speck M., Roots I.* (1973.) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 968-975.
38. *Hilderbrandt A., Bergs C., Heinemeyer G., Schlede E., Roots I., Abbas-Ali B., Schmoldt A.* (1982.) *Adv. Exp. Med. Biol.* **132A**. 179-198.

39. Zhukov A., Archakov A. (1985.) Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Induction./ Eds. Vereczkey L., Magyar. Budapest: Academiai Kiado. pp.75-78.
40. Imai M., Shimada H., Watanabe Y., Matsushima-Hibida Y., Makino R., Koga H., Horiuchi T., Ishimura Y (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**, 7823-7827.
41. Guengerich F. (1978). Biochemistry. **17**, 3633-3639
42. Loosemore M., Light D., Walsh C. (1980). J. Biol. Chem. **255**, 9017-9020.
43. Hall E., Tuan W., Venton J. (1986). Biochem. J. **233**, 637-641.
44. Komori M., Imai Y., Sato R. (1984). J. Biochem. **95**, 1379-1388.
45. Deloria L., Abbott V., Gooderham N., Mannering G. (1985). Biochem. Biophys. Res. Commun. **131**, 109-114.
46. Менгазетдинов Д., Карузина И., Арчаков А. (1989) Биохимия. **54**, 1102-1107.
47. Жуков А. А., Арчаков А. И. (1985). Биохимия. **50**, 1939-1951.
48. Карпец Л., Адрианов Н., Карузина И., Джусенова Ч., Арчаков А., Менгазетдинов Д. (1988). Бюлл. exper. биол. и мед. **N5**. 547-549.
49. Карузина И., Менгазетдинов Д., Капитанов А., Жуков А., Иванова Л., Кузнецова Т., Гордеев С., Арчаков А. (1987). Биохимия. **52**, 1090-1096.
50. Nakamura K., Oliver C., Stadtman E. R. (1985). Arch. Biochem. Biophys. **240**, 319-329.
51. Bachmanova G., Pogodina O., Kanaeva I., Archakov A. (1980). Biochemistry, Biophysics and Regulation of cytochrome P450./Eds. Gustafson J., Carlstedt-Duke J., Mode A., Rafter J. Elsevier Biomedical Press Amsterdam: pp.599-602.
52. Bachmanova G., Uvarov V., Kanaeva I., Archakov A. (1982). Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications./ Eds. Hietanen E., Laitinen M., Hanninen O. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam: pp. 551-554.
53. Мохосоев И., Кузнецова Г., Альтерман М., Бачманова Г., Арчаков А. (1987). Биохимия. **52**, 1649-1658.
54. Бачманова Г. И., Карузина И. И., Менгазетдинов Д. Э. Тверитинов В. Н., Погодина О. К., Хайтина С. Э., Арчаков А. И., Мясоедова К. Н. (1981). Биохимия. **2**. 46 280-285.
55. Imai Y., Hashimoto-Yutsudo C., Satake H., Girardin A., Sato R. (1980). J. Biochem. **88**. 489-503.
56. Mokhosoev I., Karuzina I. (1992). Cytochrome P450, Biochemistry and Biophysics./ Eds. Bachmanova G., Archakov A. INCO-TCN, Joint Stock Company. Moscow: pp. 142-144.
57. Ingelman-Sundberg M., Paul K. (1986). Acta Chem. Scand. **40**, 233-234.
58. Schaefer W., Harris T., Guengerich F. (1985). Biochemistry. **24**, 3254-3263.
59. Uvarov V., Tretiakov V., Archakov A. (1990). FEBS Letters. **260**, 309-312.
60. Yao K., Falick A., Patel N., Correia M. (1993). Biol. Chem. **268**, 59-65.
61. Mukhopadhyay C., Chatterjee I. (1993). Biol. Chem. **269**, 13390-13397.
62. Bachmanova G., Scotselyas E., Kanaeva I., Kuznetsova G., Gordeev S., Korneeva E., Karyakin A., Archakov A. (1986). Biochem. Biophys. Res. Commun. **139**, 883-888.
63. Третьякова Л., Адрианов Н., Воронин Е., Довгий И., Скоцеляс Е., Арчаков А. (1991). Биохимия. **56**, 1200-1208.
64. Адрианов Н., Довгий А., Хаилов П. (1989). Биохимия. **54**. 1120-1125.
65. Згода В.Г., Карузина И.И., Никитюк О.В., Арчаков А.И. (1996). Вопр. мед. химии. **42**. 203-210.
66. Згода В.Г., Карузина И.И., Арчаков А.И. (1997). Вопр. мед. химии. **43**, 217-225.
67. Karuzina I. I., Archakov A. I. (1994). Free Rad. Biol. & Med. **16**, 73-97.
68. Bonfils C., Banly C., Maurel P. (1981). J. Biol. Chem. **256**, 9457-9465.

69. Jansson I., Tamburini F. P., Favreau L. V., Schenkman J. B. (1985). *Drug Metab. Disp.* **13**, 453-458.
70. Карузина И., Арчаков А. (1985). *Биохимия*. **50**, 1805-1810.
71. Rice R. H., Lee M., Brown W. D. (1983). *Arch. Biochem. Biophys.* **221**, 417-427.
72. Zingler J. S., Jernigan H. M., Garland D., Reddy V. N. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **41**, 163-172.
73. Bray R., Cockle S., Fielden M., Roberts P., Rotilio G., Calabrese L. (1974). *Biochem. J.* **139**, 43-48.
74. Hans J. R., Fuchs and Borcers C. L. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 1107-1113.
75. Uchida K., S Kawakishi S. (1994). *J. Biol. Chem.* **269**, 2405-2410.
76. Yamakura F. (1984). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **122**, 635-641.
77. Stainman H. (1982). *Superoxide Dismutase*. Florida: CRC Press. **1**, 11-68.
78. Lardinois O., Rouxhet P. (1994). *Free Radical Research*. **1**, 29-50.
79. Blum J., Fridovich I. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 500-508.
80. Hodgson E.K., Fridovich I. (1975). *Biochemistry*. **14**, 5294-5299.
81. De Filippi L., Ballou D., Hultquist D. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 6917-6923.
82. Bourdillon C., Thomas D., Thomas V. (1982). *Enzym. Microb. Technol.* **4**, 175-180.
83. Lynch R. E., Fridovich I. (1979). *Biochim. Biophys. Acta*. **571**, 195-200.
84. Shahangian S., Hager L. P. (1981). *J. Biol., Chem.* **256**, 6034-6040.
85. Kim K., Erman J. E. (1988). *Biochim. Biophys. Acta*. **954**, 95-107.
86. Jenzer H., Kohler H., Broger C. (1987). *Arch. Biochem. Biophys.* **258**, 381-390.
87. Matheson N. R., Wong P. S., Travis J. (1981). *Biochemistry*. **20**, 325-330.
88. Ohno Y., Gallin J. I. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 8438-8446.
89. Matheson N., Travis J. (1985). *Biochemistry*. **24**, 1941-1945.
90. Kanazawa H., Fujimoto S., Ohara A. (1994). *Biol. Pharm. Bulletin*. **17**, 476-481.
91. Brunori M., Rotilio J. (1984). *Methods in Enzymology*. **105**, 22-35.
92. Draczynskalusiak B., Brown O. (1994). *Microbios*. **312**, 141-152.
93. Ambrosio G., Oriente A., Napoli C., Palumbo G., Chiariello P., Marone G., Condorelli M., Chiariello M., Triggiani M. (1994). *J. Clinical Invest.* **93**, 2408-2416.
94. Rivett A. J. (1986). *Current Topics in Cellular Regulation*. / Eds. Horecker B. L., Stadtman E. R. Academic Press. Orlando: **28**, 291-336.
95. Strocchi V., Biagiarelli B., Fiorani M., Palma F., Piccoli G., Cucchiari L., Dacha M. (1994). *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 160-167.
96. Davies K. J. A., Delsignore M. E., Lin S. W. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 9902-9907.
97. Davies K. J. A., Delsignore M. E. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 9908-9913.
98. Dean R. T. (1987). *FEBS Lett.* **220**, 278-282.
99. Dean R. T., Roberts C. R., Jessup W. (1985). *Intercellular Protein Catabolism*. / Eds. Khairallah E. A., Bond J. S., Bird J. W. S. N. Y.: Liss. pp. 341-350.
100. Davies K. J. A. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 9895-9901.
101. Kim K., Rhee S. G., Stadtman E. R. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 15394-15397.
102. Levine R. L., Oliver C. N., Fulks R. M., Stadtman E. R. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **78**, 2120-2124.
103. Salo D. C., Pacifici R. E., Lin S. W., Guilivi C., Davies K. J. A. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**, 11919-11927.
104. Fligiel S. E. G., Lee E. C., McCoy J. P., Johnson K. J., Varani J. (1984). *Amer. J. Pathol.* **115**, 418-424.

105. Davies K. J. A., Goldberg A. L. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 8227-8234.
106. Waxman L., Fagan J. M., Goldberg A. L. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**, 2451-2457.
107. Dalhmann B., Kuehn L., Reinauer H. (1984). *FEBS Lett.* **160**, 243-247.
108. DeMartino G. N., Golberg A. L. (1979). *J. Biol. Chem.* **254**, 3712-3715.
109. Davies K. J. A., Lin S. W. (1988). *Free Radic. Biol. & Med.* **5**, 215-223.
110. Pacifici R. E., Davies K. J. A. (1990). *Meth. in Enzymol.* **186**, 485-502.
111. Davies K. J. A. (1993). *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 346-353.
112. Pacifici R. E., Salo D. C., Davies K. J. A. (1989). *Free Radic. Biol. & Med.* **7**, 521-536.
113. Pacifici R. E., Kono Y., Davies K. J. A. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 15405-15411.
114. Ingelman-Sundberg M., Zhukov A., Neve E., Che F., Mkrtchian S., Eliasson E. (1994). 10th International Symposium on Microsomes & Drug Oxidations. pp. 86-88.
115. Eliasson E., Mkrtchian S., Ingelman-Sundberg M. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 15765-15769.
116. Mkrtchian S., Eliasson E. (1994). 10th International Symposium on Microsomes & Drug Oxidations. pp.383.
117. Zhukov A., Werlinder V., Ingelman-Sundberg M. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, pp. 221-228.
118. Correia M., Davoll S., Figueredo-Pereira M. (1994). 10th International Symposium on Microsomes & Drug Oxidations. pp. 91-93.

OXIDATIVE MODIFICATION OF CYTOCHROME P450 AND OTHER MACROMOLECULES DURING TURNOVER

A.I. ARCHAKOV, V.G. ZGODA, I.I. KARUZINA

Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya str. 10, 119832 Moscow; fax: (095) 245-0857

Possible mechanisms of cytochrome P450_{2B4} modification by H₂O₂ formed during catalytic turnover have been studied. Oxidative self-inactivation of cytochrome P450_{2B4} in monooxygenase system, reconstituted from highly purified membrane proteins: cytochrome P450_{2B4}, NADDPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome b₅ in the presence of detergent Emulgen 913, involves the heme destruction and apoenzyme modification. The cytochrome P450 self-inactivation is accompanied by protein aggregation, oxidation of SH-groups and changes of the surface charge. H₂O₂ and non-specific radical reactions may be responsible for the intermolecular cross-linking. Oxidative modification of cytochrome P450_{2B4} may be initial stage of the protein decay in the cell.

Key words: cytochrome P450, monooxygenase reaction, self-inactivation.