

## ОБЗОРЫ

УДК 577.151.62

©Давыдов

### МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СИСТЕМЫ МИКРОСОМАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ: НОВЫЕ СМЫСЛЫ СТАРОГО ПОНЯТИЯ

Д.Р. Давыдов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, ул. Погодинская, 10

<sup>2</sup>Университет Штата Вашингтон, Пуллман, Вашингтон, США;  
Department of Chemistry, Washington State University, Fulmer building, room 477,  
Pullman, WA 99164-4630; эл. почта: d.davydov@wsu.edu

Центральная роль цитохромов P450 в метаболизме лекарств и других ксенобиотиков делает эти ферменты основным предметом исследований механизмов выведения лекарств, нежелательных эффектов лекарственных средств и межлекарственных взаимодействий. Несмотря на огромные успехи в исследовании структуры и механизмов функционирования цитохромов P450, концепция ансамбля метаболизирующих лекарства ферментов как функционально интегрированной системы остается неразработанной. В то же время, эукариотические клетки, как правило, содержат множество различных цитохромов P450, колокализированных в мембране эндоплазматического ретикулума и взаимодействующих друг с другом с формированием динамических гетеромерных комплексов (смешанных олигомеров). Осознание важности разработки системного подхода к ансамблю цитохромов P450 как единой мультиферментной системы вызвало новую волну интереса к принципам молекулярной организации микросомальной системы метаболизма лекарств, в начальных этапах исследований которой работы академика Арчакова и его сотрудников сыграли основополагающую роль. Дальнейшее изучение молекулярной организации системы микросомальной монооксигеназы как мультиферментной, многофункциональной системы имеют решающее значение для глубинного понимания ключевых факторов, определяющих изменения в метаболизме лекарств и других функциях цитохромов P450 в процессах развития и старения, равно как и под влиянием различных патологий и факторов окружающей среды.

**Ключевые слова:** цитохром P450, эндоплазматический ретикулум, мультиферментная система, аллостерия, белок-белковые взаимодействия, олигомеризация.

**DOI:** 10.18097/PBMC20156102176

#### ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы P450, гем-тиолатные ферменты найденные у представителей всех царств живого мира, от *Eubacteria* и *Archaea* до *Eukarya*, являются одними из древнейших гем-содержащих белков. Первые цитохромы P450, вероятно, появились около 3,5 миллиардов лет назад [1], когда содержание кислорода в атмосфере земли было ещё незначительным. Предполагается, что изначально цитохромы P450 были восстановительными ферментами и могли играть роль NO-редуктаз [2, 3]. Однако, интенсивное эволюционное развитие семьи цитохромов P450 началось около 2-х миллиардов лет назад, вскоре после того как зеленые растения стали выделять кислород в атмосферу, когда цитохромы P450, как предполагается [4-6], приобрели способность связывать кислород. Есть предположение, что функцией первых цитохромов P450, связывающих кислород, была его

“детоксикация” и защита клетки от неконтролируемой окислительной деструкции [7]. Вскоре, однако, цитохромы P450 приобрели важную новую функцию – функцию монооксигеназ. Появление первых P450-содержащих монооксигеназ, участвующих в синтезе и окислительном метаболизме жирных кислот и стероидов, сыграло важную роль в появлении эукариотов [8]. В дальнейшем катализ реакций окисления гидрофобных соединений стал главной функцией цитохромов P450.

В результате эволюции семейство цитохромов P450 стало самым большим семейством ферментов с высококонсервативной укладкой полипептидной цепи и общим каталитическим механизмом, что, однако, не мешает этим белкам играть самые разные физиологические роли. Природа использовала конструкцию цитохрома P450 в самых разных целях: цитохромы P450 служат в качестве терминальных оксидаз в монооксигеназных

системах, окисляющих разнообразные экзогенные и эндогенные соединения. Известные функции цитохромов P450 простираются от синтеза пигментов, гормонов, вторичных мессенджеров, антибиотиков и токсинов до окислительного превращения и детоксикации чужеродных низкомолекулярных соединений (ксенобиотиков).

Современные цитохромы P450 – это белки, содержащие одну полипептидную цепь длиной в 400-550 аминокислотных остатков. Все известные эукариотические цитохромы P450, равно как и большинство их бактериальных аналогов, не являются самодостаточными в их каталитической функциональности. Моноксигеназная реакция требует поступления двух электронов, источником которых которых, как правило, является белок-партнёр. В качестве белка-донора электронов чаще всего выступают либо негемовые железосодержащие белки – ферредоксины (в так называемых моноксигеназных системах типа I), либо флавопротеины (в системах типа II) [9]. Хотя все цитохромы P450 имеют сходную укладку полипептидной цепи и общий каталитический механизм, существенным отличием цитохромов P450 эукариотов от их прокариотических аналогов является их клеточная локализация: прокариотические цитохромы P450 являются водорастворимыми, протоплазматическими ферментами, а эукариотические цитохромы P450 в подавляющем большинстве случаев связаны с биологическими мембранами. Хотя митохондрии эукариотических клеток обладают своей системой цитохромов P450, наиболее значительная часть цитохромов P450 локализуется в мембранах эндоплазматического ретикула (ЭР).

Находящаяся в ЭР система цитохромов P450 и их партнёров, которую также называют микросомальной моноксигеназой (ММО), вот уже в течение 40 лет находится в центре научных интересов академика А.И. Арчакова. Под его руководством были осуществлены исследования, ставшие важными вехами на пути к пониманию механизмов функционирования этой системы как единого целого. Рассмотрению современного представлений об этих механизмах и посвящён настоящий обзор.

## 1. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МИКРОСОМАЛЬНОЙ МОНООКСИГЕНАЗЫ: ИСТОРИЯ ПРОБЛЕМЫ И ЕЕ СОВРЕМЕННОЕ ПОНИМАНИЕ

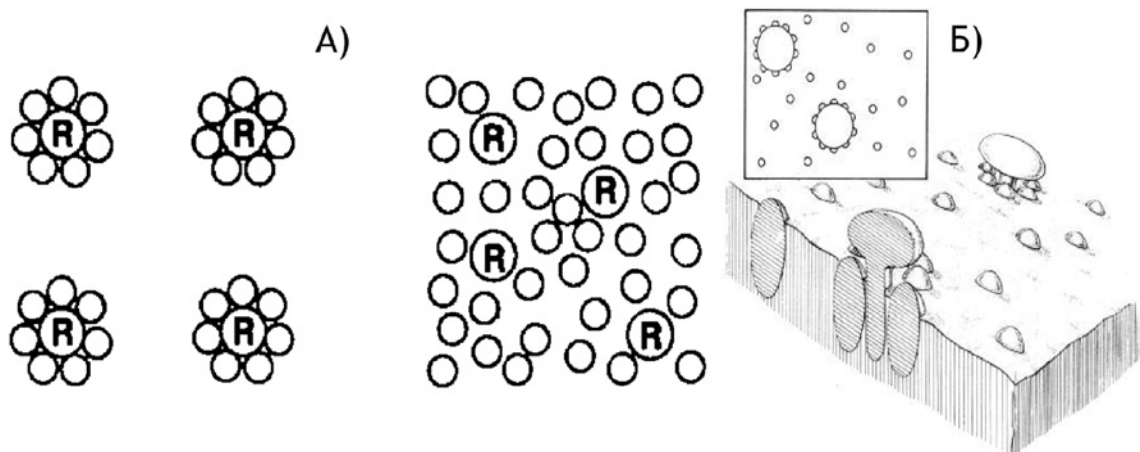
Система микросомальной моноксигеназы (ММО) найдена в ЭР большинства тканей животных. Хотя самое высокое содержание микросомальных цитохромов P450 характерно для клеток печени, они также присутствуют в клетках лёгких, почек, мозга, гладких мышц кровеносных сосудов, в эпителии кишечника, слизистой оболочке носа, молочной железе других тканях. ММО катализирует окисление чужеродных соединений (лекарств, канцерогенных веществ и других ксенобиотиков), равно как и ряда эндогенных субстратов (гормонов,

стероидов, жирных кислот, простагландинов, и т.д.). Микросомальные цитохромы P450 играют ведущую роль в метаболизме лекарств в организме человека, и потому являются главным объектом исследований механизмов выведения лекарственных средств, их нежелательных эффектов и межлекарственных взаимодействий. ММО может метаболизировать большое количество разнообразных субстратов, благодаря наличию множественных форм цитохрома P450 с различной субстратной специфичностью. Так, геном человека кодирует 57 функциональных цитохромов P450, и, помимо того имеет 58 нефункциональных псевдогенов этих ферментов [10].

Основным донором электронов для цитохромов P450 в ММО является флавопротеин – NADPH-зависимая цитохром P450 редуктаза (CPR). Хотя пара P450 и CPR является полностью функциональной, полная система также содержит цитохром  $b_5$ , который увеличивает каталитическую эффективность системы и служит альтернативным донором электронов. Важнейшая особенность ММО – это свойственный всем известным эукариотическим системам большой избыток цитохромов P450 по отношению к редуктазе. Так, среднее молярное соотношение цитохромов P450 к CPR в печени человека составляет 7,1:1 (диапазон колебаний – от 2:1 до 27:1) [11].

Избыток цитохрома P450 по отношению к его редуктазе, а также присутствие в системе альтернативного донора электронов – цитохрома  $b_5$  – были главными причинами, побудившими исследователей ММО в начале 70-х годов прошлого века поставить вопрос о “молекулярной организации” моноксигеназы. Наличие множественных форм цитохрома P450 в мембране на тот момент ещё не было твёрдо установлено, и проблема “молекулярной организации” прежде всего сводилась к вопросу о наличии устойчивых, недиссоциирующих комплексов цитохрома P450 с донорами электронов [12]. Так называемая “кластерная гипотеза”, предполагавшая что каталитической единицей ММО является недиссоциирующий кластер, где на одну молекулу редуктазы приходится несколько молекул цитохрома P450 [13-16], стала предметом обсуждения и активных исследований на рубеже 70-х и 80-х годов прошлого века. Ранние представления о “молекулярной организации” микросомальной моноксигеназы” иллюстрирует рисунок 1, который воспроизводит иллюстрации к двум наиболее цитируемым статьям того периода, посвящённым этой проблеме [12, 16].

Дальнейшие исследования не подтвердили наличия кластеров переносчиков электронов в мембране ЭР и показали, что взаимодействия цитохрома P450 с его партнёрами осуществляются путём латеральной диффузии и равновесного образования их диссоциирующих комплексов. Важную роль в доказательстве этого факта сыграла работа Арчакова и его коллег, показавших, что кинетика переноса электронов на цитохром P450 подчиняется закону действующих масс [17].



**Рисунок 1.** Ранние представления о молекулярной организации микросомальной монооксигеназы. А) Противопоставление “жёсткой” или “кластерной” (слева) и “не жёсткой” (справа) моделей организации ММО. Иллюстрация адаптирована из статьи Yang [12]; Б) Модель организации ММО из статьи Peterson и соавторов с изменениями [16]. Эта модель предполагала распределение пула цитохрома Р450 (погружённые в мембрану эллипсоиды) на две фракции: быстро восстанавливаемую редуктазой (молекулы с погружённым в мембрану якорем) фракцию кластеров и медленно восстанавливаемую фракцию диффундирующих в мембране свободных молекул гемопroteина.

Однако, обнаружение того, что пул цитохрома Р450 в мембране включает в себя множество изоформ фермента с разной субстратной специфичностью и различными физиологическими функциями вновь сделало проблему молекулярной организации ММО актуальной. Продемонстрированная многими исследователями [18-23] конкуренция различных цитохромов Р450 за взаимодействие с CPR может существенно влиять на активность каждого отдельного цитохрома Р450 и являться важным элементом механизмов регуляции. Однако интеграционные взаимосвязи в ММО этим не ограничиваются. Имеются многочисленные указания на то, что множественные формы цитохрома Р450 в мембране ЭР взаимодействуют друг с другом с формированием смешанных олигомеров. Совокупность данных о влиянии этих взаимодействий на функциональные свойства отдельных форм цитохрома Р450 продолжает быстро увеличиваться [24-25]. Растёт и осознание того факта, что механизмы, регулирующие ансамбль цитохромов Р450 в микросомальной мембране, не могут быть поняты только из результатов изучения свойств каждой из форм Р450 взятой по отдельности [26]. Напротив, такое понимание требует рассмотрения ансамбля цитохромов Р450 в его совокупности, принимая во внимание как конкуренцию различных цитохромов Р450 за взаимодействия с белками-партнёрами, так и их межмолекулярные взаимодействия с образованием смешанных олигомеров.

Благодаря сложной сети этих взаимодействий, каталитические свойства ансамбля цитохромов Р450 не могут быть предсказаны путём простого суммирования свойств отдельных форм Р450 составляющих этот ансамбль. Любые изменения в профиле экспрессии цитохромов Р450, включая и те, что наблюдаются в процессах развития и старения

организма, должны приводить к разительной перестройке пейзажа белок-белковых взаимодействий в ММО и вытекающим отсюда трудно предсказуемым изменениям её функциональных свойств.

Таким образом, термин “молекулярная организация микросомальной монооксигеназы” приобретает новое значение. Дальнейшее изучение молекулярной организации ММО, в исследованиях которого важное место заняли работы академика Арчакова и его сотрудников – Г.И. Бачмановой, И.П. Канаевой, И.И. Карузиной, А.В. Карякина, А.А. Жукова, Ю.Д. Иванова и других, – является необходимым условием для становления системного подхода к ансамблю цитохромов Р450 в ЭР. Разработка такого подхода является неперенным условием для глубинного понимания механизмов функционирования цитохромов Р450 как в системе метаболизма лекарств, так и в цепях передачи сигналов управляющих клеточной пролиферацией, дифференцировкой, апоптозом и другими процессами.

В современных исследованиях молекулярной организации ММО центральное место занимает изучение механизмов и функциональных последствий взаимодействий между цитохромами Р450 (Р450-Р450 взаимодействий). Ниже мы остановимся на накопленных в этой области данных и рассмотрим современные представления о возможной физиологической роли этих взаимодействий.

## 2. ОЛИГОМЕРНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИТОХРОМОВ Р450 В РАСТВОРЕ И В МЕМБРАНЕ

Тенденция микросомальных цитохромов Р450 к образованию надмолекулярных комплексов (олигомеров) в растворе хорошо известна [27-33]. Главная роль в ассоциации цитохромов Р450



в растворе приписывается взаимодействиям их гидрофобных N-концевых фрагментов [34-38]. Однако, хотя удаление этих трансмембранных фрагментов и уменьшает степень агрегации микросомальных цитохромов P450 в растворе, его, в большинстве случаев, недостаточно для превращения микросомальных цитохромов P450 в мономерные растворимые белки [34-42].

Олигомеризация цитохромов P450 имеет место не только в растворах очищенных белков. Формирование олигомеров цитохромов P450 в модельных мембранах, микросомах и живых клетках было продемонстрировано различными методами – от измерения скорости вращательной диффузии [43-50], перешивок бифункциональными реагентами [44, 51-53], и электронной микроскопии замораживания-скалывания [50], до подходов с использованием резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) [54-55], бимолекулярной комплементации флуоресценции (bimolecular fluorescence complementation analysis) [56] и переноса энергии биолюминесценции (BRET) [57].

Помимо указаний на олигомеризацию отдельных форм P450 в мембранах [46, 50, 52, 55, 57-62], имеются также и убедительные свидетельства межмолекулярных взаимодействий между различными цитохромами P450. Образование их гетероолигомеров было продемонстрировано как в мембранах протеолипосом [53] и микросом [51], так и в живых клетках [56].

Имеются многочисленные свидетельства масштабных функциональных последствий, к которым приводят взаимодействия между различными цитохромами P450 (подробное рассмотрение этих данных можно найти в обзорах [24-25]). Чаще всего наблюдается активация одного из двух взаимодействующих ферментов, в то время как активность его партнёра по взаимодействию либо остаётся неизменной, либо ингибируется. Такой тип взаимоотношений показан для пар CYP3A4/CYP1A2 [63], CYP2C19/CYP2C9 [64], CYP2D6/CYP2C9 [65] и CYP3A4/CYP2C9 [66].

Наиболее изученной является пара цитохромов P450 1A2 (CYP1A2) и 2B4 (CYP2B4) кролика [20, 23, 53, 67-71]. Совместное присутствие CYP2B4 в смешанных системах с CYP1A2 ведёт к активации последнего [23, 67], в то время как активность CYP2B4 оказывается сниженной [20]. Подобные взаимоотношения были также продемонстрированы для пары CYP1A2 и CYP2E1 кролика [71].

На основании этих данных Backes и соавторы пришли к заключению, что влияние CYP2B4 и CYP2E1 на активность CYP1A2 обусловлено образованием смешанных олигомеров, в которых взаимодействия CPR с CYP1A2 являются предпочтительными, в то время как связывание редуктазы со вторым цитохромом P450 (CYP2B4 или CYP2E1) оказывается затруднённым [53, 67, 72].

Этот вывод также подтверждается нашими исследованиями взаимодействий CPR со смешанными олигомерами CYP1A2 и CYP2B4 в разработанной

под руководством академика Арчакова растворимой реконструированной системе [73], где мы исследовали формирование комплексов P450-CPR при помощи резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) с флуоресцентной метки ковалентно связанной с CPR на гем P450 [23]. Мы показали, что CYP1A2 и CYP2B4 практически не отличаются друг от друга по величине константы диссоциации ( $K_d$ ) их комплексов с CPR; однако, титрование редуктазы смесями этих двух белков в присутствии субстрата CYP1A2 7-этоксирезорфуина (7-ER) выявляет многократное снижение их эффективного сродства к редуктазе в смесях с высоким относительным содержанием CYP2B4 [23]. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что ассоциация CYP2B4 с CYP1A2 в присутствии 7-ER “маскирует” CYP2B4 от взаимодействий с CPR [23].

Ярко выраженный эффект P450-P450 взаимодействий был продемонстрирован на примере вызванных давлением переходов в смешанных олигомерах CYP1A2 и CYP2B4 [69]. Исследованные по отдельности, эти ферменты давали различный ответ на повышение гидростатического давления. Комплекс CYP2B4( $Fe^{2+}$ ) с CO подвергается переходу в неактивную форму P420 при довольно низких давлениях, комплекс CYP1A2( $Fe^{2+}$ ) с CO является чрезвычайно устойчивым к такой инактивации. Однако, после совместной инкубации с CYP1A2, CYP2B4 становится защищённым от инактивации высокими давлением, и кроме того, демонстрирует значительное уменьшение сжимаемости гемового кармана [69].

Хотя рассмотренные выше результаты указывают на существенное влияние P450-P450 взаимодействий на свойства взаимодействующих ферментов, большинство этих исследований было проведено в немембранном системах *in vitro*. Этот факт затрудняет оценку физиологической значимости наблюдаемых эффектов и побуждает к поиску новых подходов для систематического исследования P450-P450 взаимодействий и их последствий в микросомальных мембранных системах, где состав монооксигеназы и свойства её мембранного окружения максимально приближены к тем, что наблюдаются в ЭР в физиологических условиях.

### 3. ИССЛЕДОВАНИЯ P450-P450 ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МИКРОСОМАЛЬНОЙ МЕМБРАНЕ

#### 3.1 Новая микросомальная система для исследований P450-P450 взаимодействий

Разработка подходящей модельной системы для исследований белок-белковых взаимодействий в мембранах ЭР является непростой задачей. Такая система должна воспроизводить нативное мембранное окружение, где белки взаимодействуют путём латеральной диффузии и равновесного образования их комплексов. Она также должна “предоставлять возможность” изменения состава мультиферментного ансамбля и его концентрации

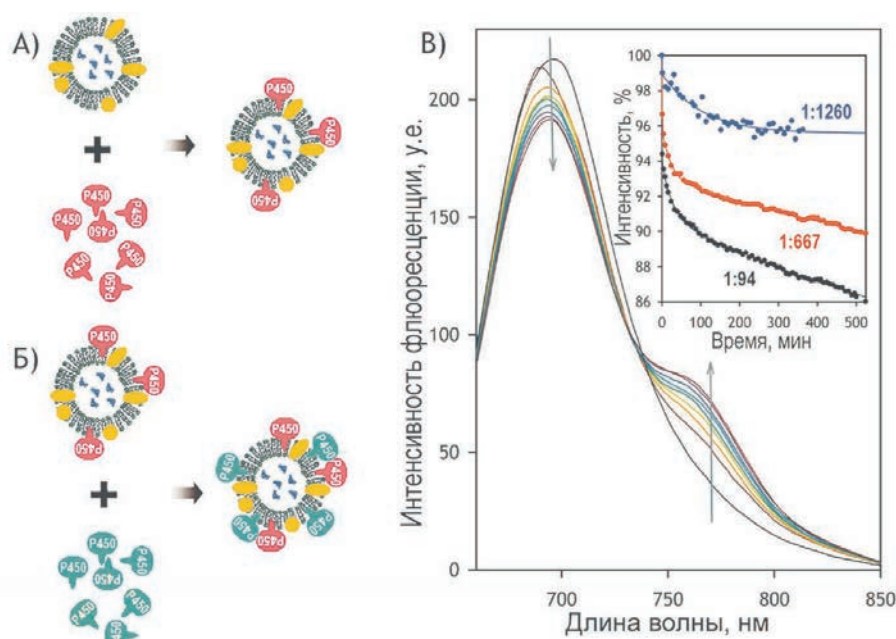
в мембране. В поиске подобной модели нами разработан подход, основанный на встраивании очищенных ферментов в микросомы клеток насекомых, содержащих рекомбинантную CPR, но не имеющих цитохромов P450 (рис. 2а). Такие микросомы производятся Corning Life Sciences (США) и коммерчески доступны как “контрольные” суперсомы (control Supersomes™). Инкубация таких препаратов, которые в контексте данного обзора названы SS(R), с очищенными CYP3A4, CYP3A5 или CYP2E1 человека приводит к эффективному встраиванию этих белков в мембрану и позволяет получить каталитически компетентные микросомы с заданной концентрацией и составом различных изоформ цитохрома P450 [62, 74].

### 3.2. Новые методы регистрации P450-P450 взаимодействий

В исследованиях P450-P450 взаимодействий используются методы, основанные на резонансном переносе энергии флуоресценции и люминесценции (FRET и LRET, соответственно) между метками, ковалентно присоединёнными к остаткам цистеина взаимодействующих белков. Недавно мы разработали новый чувствительный и специфичный метод для регистрации P450-P450 взаимодействий, применимый как к гомоолигомерам одного фермента, так и к смешанным олигомерам двух различных

цитохромов P450 [62, 74]. Он основан на резонансном переносе энергии люминесценции (LRET), где в качестве донора используется флуоресцентный люминофор с длительным временем жизни возбуждённого состояния. Тиол-реактивной меткой-донором служит эритрозин иодоацетамид (ERIA), а акцептором – излучающая в дальней красной области метка DY-731 малеимид (DYM). Фёрстеровское расстояние ( $R_0$ ) для этой пары составляет около 34 Å, что обеспечивает высокую эффективность LRET между пробами находящимися в соседних субъединицах олигомера. Расположение полос возбуждения и эмиссии меток в дальнем красном диапазоне обеспечивает отсутствие перекрытия с полосами поглощения гема, что придаёт методу высокую надёжность и селективность.

Эта новая донор-акцепторная пара позволяет следить за процессом олигомеризации P450 по появлению LRET в результате формирования смешанных олигомеров, которое наблюдается после добавления белка, содержащего метку-акцептор к микросомам SS(R), содержащим белок помеченный донором (рис. 2б) [62]. Амплитуда LRET, наблюдаемая в таких экспериментах, пропорциональна концентрации смешанных олигомеров, и, согласно закону действующих масс, увеличивается при высоких поверхностных концентрациях белков (то есть при низких молярных соотношениях липид:P450) (вставка на рис. 2в). Проведя серию экспериментов



**Рисунок 2.** Исследования P450-P450 взаимодействий в мембране модельных микросом. А) Рисунок, иллюстрирующий процесс получения каталитически-компетентной системы путём встраивания очищенного рекомбинантного цитохрома P450 в мембраны микросом, содержащих рекомбинантную NADPH-цитохром P450 редуктазу; Б) Схема постановки эксперимента по определению степени олигомеризации P450 в мембране микросом при помощи LRET, где регистрируется процесс образования смешанных олигомеров по мере встраивания цитохрома P450 содержащего метку-акцептор (DYM) в мембрану микросом, содержащих белок несущий на себе метку-донор (ERIA); В) Изменения в спектре задержанной флуоресценции, наблюдаемые в процессе встраивания CYP3A4(C166)ERIA в микросомы, содержащие CYP3A4(C468)DYM [74]. Направления изменений показаны серыми стрелками. На вставке показаны кинетические кривые изменения интенсивности эмиссии донора зарегистрированные при различных молярных соотношениях P450:липид (P/L).

по встраиванию меченых белков при различных соотношениях липид:P450, можно охарактеризовать зависимость степени олигомеризации от поверхностной концентрации P450 и определить константу диссоциации олигомеров, а также эффективности LRET в сформированном комплексе.

### 3.3. Олигомеризация цитохромов CYP3A4, CYP3A5 и CYP2E1 в модельных микросомах и её функциональные последствия

Используя описанные выше подходы к исследованию встроенных в микросомальную мембрану цитохромов P450 CYP3A4, CYP3A5 и CYP2E1 человека, мы продемонстрировали высокую склонность этих белков к олигомеризации в микросомальной мембране [62, 74]. Весьма существенным является то, что наши исследования показали высокую степень олигомеризации всех трёх исследованных цитохромов P450 при концентрациях сходных с теми, которые наблюдаются в ЭР клеток печени. Согласно нашим измерениям, концентрации (поверхностные удельные плотности), при которых 50% молекул цитохрома P450 находятся в составе олигомеров, варьируют от 0,16 пмоль/см<sup>2</sup> для CYP2E1 до 0,47 пмоль/см<sup>2</sup> для CYP3A4. Соответствующие величины для исследованных нами комбинаций двух различных цитохромов P450 колеблются от 0,07 пмоль/см<sup>2</sup> до 0,30 пмоль/см<sup>2</sup>. Для сравнения, измерения Watanabe и соавторов предполагают, что поверхностная плотность цитохромов P450 в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов находится в диапазоне от 0,6 пмоль/см<sup>2</sup> до 2,8 пмоль/см<sup>2</sup> [75]. Таким образом, мы можем заключить, что при физиологических концентрациях CYP3A4, CYP3A5 и CYP2E1 в мембране ЭР все три гемопротеина в значительной степени олигомеризованы и большая их часть вовлечена в образование гетероолигомеров.

Рассмотренные выше исследования взаимодействий между CYP3A4, CYP3A5 и CYP2E1 мы дополнили исследованием их функциональных эффектов. Наши результаты показывают, что олигомерная организация цитохрома CYP3A4 является центральным элементом механизмов его активации такими лигандами как  $\alpha$ -нафтофлавоны (ANF) или стероидами. В частности, мы продемонстрировали, что стимуляция CYP3A4 его прототипическим активатором ANF наблюдается только в олигомерах этого фермента и исчезает после их диссоциации [62].

Исследование влияния P450-P450 взаимодействий в парах CYP3A4/CYP3A5, CYP3A4/CYP2E1 и CYP3A5/CYP2E1 на каталитические свойства каждого из взаимодействующих ферментов показало, что взаимодействия CYP2E1 с CYP3A4 или CYP3A5 увеличивают  $k_{cat}$  О-деметилирования специфичного для CYP2E1 субстрата 7-метокси-4-(трифторметил)кумарина (7-MFC) более чем в два раза, в то время как существенного эффекта CYP2E1 на активность ферментов CYP3A с их субстратом 7-бензилоксихинолином (7-BQ) обнаружено не было [74].

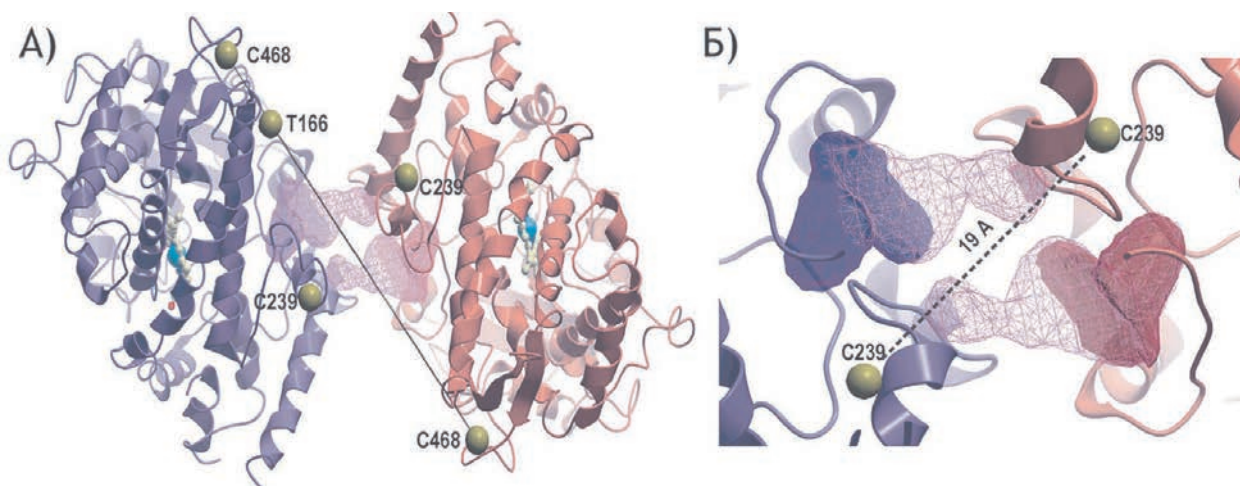
Изучая катализ О-дебензилирования 7-BQ цитохромами CYP3A, мы обнаружили, что величина  $k_{cat}$  реакции, катализируемой CYP3A5, приблизительно в два раза выше величины характерной для CYP3A4. В то же время, добавление ANF значительно (примерно в 1,7 раза) увеличивает скорость реакции катализируемой CYP3A4, но не влияет на активность CYP3A5. Существенным представляется тот факт, что совместное встраивание этих двух ферментов в мембрану приводит к дальнейшему увеличению скорости катализа и полностью устраняет активирующее влияние ANF [74]. Взятые в совокупности, эти данные убедительно демонстрируют широкомасштабную модуляцию каталитических свойств ансамбля метаболизма лекарств в микросомальных мембранах в результате образования смешанных олигомеров различных форм цитохромов P450.

## 4. ИССЛЕДОВАНИЕ АРХИТЕКТУРЫ ОЛИГОМЕРОВ CYP3A4

Недавно мы выдвинули предположение о структурных предпосылках обнаруженной нами взаимосвязи между олигомеризацией CYP3A4 и его способностью к активации аллостерическими лигандами (такими как ANF или тестостерон). Основанием для нашей гипотезы явилось наблюдение о наличии периферийного центра связывания лиганда на интерфейсе между субъединицами кристаллографического димера в рентгеновской структуре комплекса CYP3A4 с прогестероном (PDB 1W0F) [76]. Мы предположили, что межсубъединичный интерфейс в олигомерах CYP3A4 в мембране подобен тому, что наблюдается в этой рентгеновской структуре (рис. 3а). Таким образом, позиция связанных молекул прогестерона в структуре 1W0F может указывать на расположение центра связывания аллостерических лигандов, который, предположительно, существует лишь в димере фермента и исчезает при его диссоциации [62]. Чтобы проверить эту гипотезу мы использовали измерение расстояний между сайт-специфичными метками при помощи LRET и перешивание олигомеров CYP3A4 бифункциональными реагентами.

Исследования олигомеризации CYP3A4 при помощи LRET были проведены с использованием одноцистеиновых мутантов белка для сайт-специфичного введения флуоресцентных меток. В первоначальных экспериментах были использованы мутанты CYP3A4(C64) и CYP3A4(C468). Эффективность LRET в комплексе CYP3A4(C64)ERIA с CYP3A4(C468)DYM составляла  $10 \pm 1\%$ , что предполагает расстояние между метками, равным  $\sim 49$  Å. Принимая во внимание большой размер молекул ERIA и DYM (расстояние от атома серы остатка цистеина до самого удалённого атома метки составляют 15 Å и 18 Å, соответственно), эту величину можно считать соразмерной расстоянию между атомами серы в остатках C468 и C64 в соседних субъединицах димера 1W0F (67,7 Å). В дальнейшем мы создали одноцистеиновую





**Рисунок 3.** Геометрия димера CYP3A4 в структуре комплекса CYP3A4 с прогестероном (PDB 1W0F). А) Общий вид при рассмотрении в направлении, перпендикулярном к плоскости мембраны; Б) Область межмолекулярного интерфейса и сайта связывания лигандов в увеличенном масштабе. Показанные в виде сетчатой поверхности границы области связывания лиганда были определены при помощи программы ICM PocketFinder [104]. Аминокислотные остатки T166, C239 и C468 показаны в виде сфер.

конструкцию CYP3A4(C166), где мутация T166C позволила ввести единственный доступный для модификации цистеин в позицию 166. Согласно расстоянию между  $\beta$ -углеродным атомом T166 и атомом серы C468 в структуре димера (46 Å), это перемещение метки должно сопровождаться существенным увеличением эффективности LRET. В хорошем соответствии с этими ожиданиями, при использовании CYP3A4(C166)DYM в паре с CYP3A4(C448)ERIA эффективность LRET возросла до  $27,5 \pm 1,7\%$ , что соответствует расстоянию между метками в  $\sim 40$  Å [74]. Этот результат указывает на то, что ориентация субъединиц в олигомере CYP3A4 не противоречит той, которая наблюдается в 1W0F.

Анализируя структуру кристаллографического димера, мы обнаружили, что взаимодействующие поверхности двух молекул CYP3A4 включают в себя остатки цистеинов C239, которые разделены расстоянием в 19,7 Å (рис. 3б). Это относительно близкое расстояние позволяет использовать остатки C239 для перешивания тиол-реактивными бифункциональными реагентами подходящего размера. Используя эту особенность CYP3A4 для картирования взаимодействий, мы устранили остаток C239 при помощи мутации C239S и сравнили полученный мутант с диким типом CYP3A4 в опытах по перешиванию. В этих экспериментах мы использовали дибромбиман (bBBBr, оптимальное для перешивания расстояние равно 5 Å), *o*-дималеимидил бензол (*o*-DMB, 9,6 Å) и *бис*-малеимидофенилметан (bMPM, 15 Å) в качестве тиол-реактивных бифункциональных реагентов. Электрофорез в ПАГ-ДСН показал, что перешивание олигомеров дикого типа белка в растворе любым из этих трех реагентов приводит к появлению двух полос перешитых агрегатов с молекулярными массами около 120 кДа и 190 кДа, что соответствует димеру и тримеру, соответственно. При этом эффективность перешивания возрастает по мере

увеличения оптимальной дистанции перешивания, характерной для каждого из использованных реагентов и достигает максимума в случае bMPM (допустимый диапазон расстояний перешивания 9,4-17,3 Å [77]). Наиболее существенным фактом является то, что мутация C239S устраняет полосу на 190 кДа, в то время как полоса на 120 кДа становится более интенсивной [74]. Сходные результаты были получены и при перешивании CYP3A4 и CYP3A4(C239) встроенных в мембрану протеолипосом [74].

Согласно этим результатам, наиболее вероятным размером минимального блока организации олигомера CYP3A4 является тример, где взаимодействие субъединиц осуществляется с участием двух различных типов межсубъединичных интерфейсов. Один из этих интерфейсов идентичен тому, что наблюдается в структуре 1W0F и включает в себя два остатка C239, расположенные в непосредственной близости друг от друга. Таким образом, периферийный сайт связывания лиганда в области спиралей F' и G' двух взаимодействующих молекул CYP3A4, обнаруженный в структуре 1W0F, вероятно, является физиологически релевантным и представляет собой специфичный для олигомеров центр связывания аллостерических лигандов. Этот центр может участвовать в механизмах модуляции ММО физиологическими лигандами (например стероидами или их производными).

## 5. ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ ОЛИГОМЕРИЗАЦИЕЙ И “УСТОЙЧИВОЙ НЕОДНОРОДНОСТЬЮ” ЦИТОХРОМОВ P450

Важные выводы о механизмах функциональных эффектов P450-P450 взаимодействий могут быть получены из рассмотрения приведённых выше результатов вместе с многочисленными указаниями на “устойчивую конформационную неоднородность”

цитохромов P450 в мембране. Мы используем этот термин для обозначения необычного “неуравновешивающегося” распределения популяции связанного с мембраной цитохрома P450 на различающиеся по своим функциональными свойствам фракции. Такая устойчивая неоднородность была продемонстрирована различными методами как в олигомерах в растворе, так и в исследованиях на мембранах. Обзор таких данных можно найти в [78].

Одно из ранних указаний на устойчивое распределение цитохромов P450 в олигомерах на две не переходящие друг в друга фракциями с отличающимися свойствами было получено при исследовании вызываемых давлением переходов в цитохромах P450. Мы продемонстрировали, что только 65-70% CYP2B4 в олигомерах в растворе являются чувствительными к вызываемому высокими давлениями (>2 кбар) переходу в инактивированную форму P420 [79-81]. Тот факт, что такая неоднородность устраняется мономеризацией белка [79-80, 82], предполагает, что она обусловлена особенностью молекулярной организации олигомеров белка, где образующие олигомер субъединицы могут отличаться по конформации, ориентации и конформационной мобильности. Подобное поведение было продемонстрировано и для цитохрома CYP3A4 человека 3A4 как в растворе, так и в рекомбинантных микросомах [83]. Неоднородность в ответе белка на приложение высоких гидростатических давлений также наблюдалась в CYP2E1 [84] и митохондриальном P450<sub>scs</sub> [85].

Обусловленная олигомеризацией неоднородность была продемонстрирована и в нашем исследовании кинетики дитионит-зависимого восстановления CYP3A4. В олигомерном белке (как в растворе, так и в протеолипосомах) процесс восстановления описывается трёхэкспоненциальной кинетикой, в то время как мономеризация CYP3A4 путём его встраивания в нанодиски (nanodisks) или в липосомы с высоким молярным соотношением липид:белок ( $R_{L/P}$ ) превращает кинетику в моноэкспоненциальную [32]. Самое примечательное наблюдение состоит в том, что восстанавливаемая в быстрой фазе фракция олигомерного P450 практически полностью находится в низкоспиновом состоянии, а вот фракция, восстанавливаемая в медленной фазе, преимущественно представлена высокоспиновой формой фермента [32].

Сходное различие между высоко- и низкоспиновыми состояниями P450 по их кинетическим свойствам были также обнаружены и в исследованиях NADPH-зависимого восстановления. В отличие от того, что наблюдалось в случае с дитионитом, большая часть гемопroteина, восстанавливаемого в быстрой фазе NADPH-зависимого восстановления, находится в высокоспиновой (а не в низкоспиновой) форме. Избирательное восстановление высокоспиновой формы P450 в быстрой фазе NADPH-зависимого процесса было продемонстрировано с CYP2C11 [86], CYP2B4 [87], и, наконец, с CYP3A4 [61, 88].

Контраст между высоко- и низкоспиновыми формами по кинетике их восстановления, очевидно,

противоречит высокой скорости переходов между ними [89-92], которая подразумевает, что положение равновесия между двумя состояниями белка должно остаться неизменным на всём протяжении процесса восстановления. Это противоречие указывает на то, что распределение цитохрома P450 между высоко- и низкоспиновыми формами не описывается простым равновесным переходом, в который была бы вовлечена вся совокупность молекул гемопroteина. Фермент скорее распределен между не переходящими друг в друга фракциями отличающимися друг от друга по положению спинового равновесия, сродству к субстратам и способности образовывать комплексы переноса электрона с белками-партнерами.

Такое неравновесное распределение было убедительно продемонстрировано в наших опытах с использованием растворимого флавино-содержащего домена цитохрома-P450-BM3 (BMR) в качестве суррогатной замены мембраносвязанной редуктазы. В этих исследованиях мы показали, что, как в растворе, так и в мембране, лишь около 50% олигомерного CYP3A4 может быть восстановлено BMR. Мономеризация CYP3A4, также как и в случае с дитионит-зависимым восстановлением, устраняет такую неоднородность и делает весь пул гемопroteина восстанавливаемым в NADPH-зависимой реакции. [61, 88].

## 6. ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ МОДЕЛЬ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МИКРОСОМАЛЬНОГО АНСАМБЛЯ ЦИТОХРОМОВ P450

Рассмотренные выше результаты о взаимодействиях цитохромов P450 в модельной микросомальной системе позволяют предложить правдоподобное объяснение “устойчивой неоднородности” и её роли в функциональных эффектах гетероассоциации различных форм P450. Согласно нашим данным по перешиванию, олигомеры CYP3A4 в мембране, по-видимому, организованы как тримеры или кратные тримерам более крупные комплексы. Взаимодействия между субъединицами элементарного тримерного блока осуществляется с участием двух различных типов межсубъединичных интерфейсов. Согласно нашей гипотезе, такая архитектура ведёт к ориентационным и/или конформационным различиям между субъединицами тримера, который, по всей видимости, организован как димер с присоединённой третьей субъединицей. Как следствие, формирование смешанных олигомеров множественных форм P450 может вызывать избирательную активацию одного фермента и/или ингибирование активности его партнёра по олигомеру (рис. 4).

Согласно этой гипотезе, два типа субъединиц в олигомере P450 отличаются друг от друга как по склонности к образованию функциональных комплексов переноса электрона с CPR, так и способности взаимодействовать с субстратами. Из-за этих различий, присутствие субстрата специфичного для одной из взаимодействующих



форм фермента должно вызвать перераспределение цитохромов P450 между активными и “заторможенными” позициями в олигомерах таким образом, что находящийся в комплексе с субстратом P450 оказывается активированным (рис. 4). Физиологически значимым результатом такого механизма регуляции является поддержание функционально допустимого баланса между окислением субстратов P450 и генерации активных форм кислорода (АФК) в результате несопряжения окисления NADPH. Такой механизм должен обеспечивать быструю адаптацию системы микросомального окисления к любым изменениям в экспонированности клетки к различным ксенобиотикам.

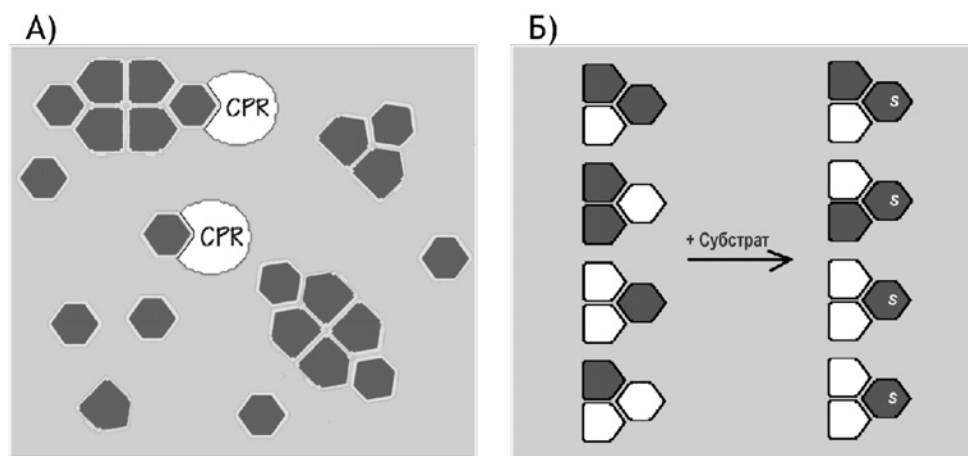
Важная особенность предложенной схемы заключается в том, что степень активации по такому механизму определяется степенью различий взаимодействующих форм P450 в их сродстве к каждому отдельному субстрату. Самым выраженным должен быть эффект, наблюдаемый с субстратами, избирательно специфичными для одной из взаимодействующих изоформ. Такая ситуация имеет место в случае 7-MFC и пары CYP2E1/CYP3A. Предложенная модель субстрат-зависимой перестройки олигомеров (рис. 4) хорошо объясняет активационный эффект взаимодействий CYP2E1 с CYP3A4 и CYP3A5, поскольку сродство CYP2E1 к 7-MFC намного выше чем то, что характерно для CYP3A4 и CYP3A5. Напротив, эффект взаимодействий двух близкородственных форм P450, таких как CYP3A4 и CYP3A5,

может быть слабо выраженным ввиду их сходной субстратной специфичности.

Предложенный механизм может быть осложнён и дополнен различиям между взаимодействующими белками в их предрасположенности к локализации в активных и “заторможенных” позициях в олигомере, которое может иметь место даже в отсутствие субстратов. Кроме того, олигомеризация некоторых изоформ P450 может приводить к формированию сайтов связывания эффекторов в области интерфейса между субъединицами, как это, очевидно, имеет место в случае CYP3A4 [62, 74, 76, 93]. Такие сайты могут быть вовлечены в аллостерическую регуляцию и координацию каталитических свойств ансамбля цитохромов P450 как единой системы. Хотя эта гипотетическая модель требует дальнейшего пристального исследования, она даёт правдоподобное объяснение для всех известных функциональных эффектов взаимодействий P450-P450 взаимодействий.

## 7. ВОЗМОЖНАЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ P450-P450 ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИЗУЧЕНИЯ

Центральная роль, которую цитохромы P450 играют в метаболизме лекарственных средств и других ксенобиотиков, сделала эти ферменты основным объектом исследований механизмов выведения лекарств, нежелательных эффектов лекарственных средств и межлекарственных взаимодействий. Однако функция микросомальных цитохромов P450 в клетке может не ограничиваться



**Рисунок 4.** Рисунок, иллюстрирующий гипотезу о механизмах функциональных эффектов олигомеризации цитохромов P450 в мембране [74]. А) Пул цитохрома P450 (темно-серые многоугольники) находится в равновесии между мономерами и олигомерами. Субъединицы олигомера находятся в двух различных конформациях (шестиугольники и пятиугольники) в зависимости от их позиции в тримере, который является минимальным блоком организации олигомера. Одна из двух конформаций (шестиугольники) предпочтительно образует комплексы передачи электрона с редуктазой (белые углубленные овалы) и взаимодействует с субстратами P450. Таким образом, “пятиугольная” конформация фермента оказывается полностью или частично исключённой из процессов передачи электрона и катализа. Б) Иллюстрация гипотезы о вызванной субстратом перестройке смешанных олигомеров двух цитохромов P450 (белые и серые многоугольники). В отсутствие субстрата (левая сторона) распределение взаимодействующих ферментов между двумя конформациями (шестиугольники и пятиугольники) является случайным. Добавление субстрата, специфичного для одного из двух взаимодействующих белков, вызывает перераспределение субъединиц в олигомерах таким образом, что все позиции, открытые для взаимодействий с субстратом (шестиугольники), становятся заняты белком, для которого в системе имеется субстрат (серые многоугольники).

их ролью в окислении ксенобиотиков и метаболизме эндогенных субстратов. Необычайная сложность и противоречивость функциональных свойств и регуляторных связей этих ферментов свидетельствует о том, что они могут играть важную (и до сих пор неизученную роль) в передаче регуляторных сигналов в клетке. Удивительная особенность эукариотических цитохромов P450, которая разительно отличает их от бактериальных аналогов, заключается в том, что эукариотические ферменты каталитически весьма неэффективны (числа оборотов в катализе обычно ниже  $10 \text{ мин}^{-1}$ ), энергетически расточительны (степень сопряжения потребления NADPH с окислением субстрата обычно ниже 50%) [94-97] и, таким образом, представляют собой потенциальную опасность для клетки из-за непрерывного образования активных форм кислорода (АФК) [98]. Даже в отсутствие субстратов эти ферменты продолжают производить АФК [94-97]. Такие особенности ансамбля P450 наводят на мысль, что он может быть вовлечён в систему передачи регуляторных сигналов в клетке как регулируемый генератор АФК [23, 99-102], и, в частности, может быть вовлечён в каскад цитохром c-зависимой инициации апоптоза [103].

Однако для того, чтобы ансамбль цитохромов P450 мог выполнять такую роль, процессы генерации АФК, которые столь хорошо выражены в опытах *in vitro*, должны быть строго ограничены и находиться под жёстким регуляторным контролем в живой клетке. Мы полагаем, центральным элементом регуляторных механизмов, координирующих функцию микросомальных цитохромов P450, являются строго контролируемые взаимодействия множественных форм цитохрома P450 ко-локализованных в мембране ЭР. В соответствии с предложенной выше гипотезой (рис. 4), эти взаимодействия ведут к блокированию определённой части пула цитохромов P450 от взаимодействий с партнёрами – донорами электрона, и, таким образом, минимизируют непродуктивное потребление NADPH и P450-зависимую генерацию АФК. Предложенный выше гипотетический механизм регуляции обеспечивает избирательную активацию определённых форм цитохрома P450, либо в ответ на появление их специфических субстратов, либо в результате взаимодействий с определёнными аллостерическими эффекторами – регуляторами генерации АФК ансамблем цитохромов P450. Согласно этой гипотезе, взаимодействие аллостерических эффекторов с каким-либо из микросомальных цитохромов P450 способно модулировать каталитические свойства всего ансамбля как единого целого.

Главная физиологическая функция этого механизма – сохранение равновесия между окислением субстратов P450 и P450-зависимой генерацией АФК, которая может играть важную роль в системе передачи регуляторных сигналов. Кроме того, согласно предложенной модели функционирования этого механизма (рис. 4), он также обеспечивает быструю адаптацию к воздействию изменяющегося спектра ксенобиотиков в клетке.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренные в настоящем обзоре данные демонстрируют решающее значение физических взаимодействий между множественными формами цитохромов P450 как одного из важнейших факторов определяющих функциональные свойства системы метаболизма лекарств в организме человека. Согласно современным представлениям, любые изменения в составе ансамбля P450 должны приводить к существенному изменению регуляторных свойств ММО как единого целого. В свете этих находок вопрос о “молекулярной организации микросомальной монооксигеназы”, в исследовании которой работы академика Арчакова и его сотрудников сыграли столь важную роль, приобретает новый смысл и вновь начинает занимать центральное место в исследованиях роли цитохромов P450 в жизнедеятельности клетки. Подробное исследование функциональных последствий и молекулярных механизмов P450-P450 взаимодействий, а также выявление регулирующих их сигнальных путей имеют решающее значение для разработки методов индивидуализированного предсказания метаболизма лекарственных средств и глубинного понимания изменений в системе окисления ксенобиотиков в организме человека в результате модуляции экспрессии цитохромов P450 под влиянием факторов окружающей среды и процессов развития и старения, равно как и различных патологических процессов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson D.R., Kamataki T., Waxman D.J., Guengerich F.P., Estabrook R.W., Feyereisen R., Gonzalez F.J., Coon M.J., Gunsalus I.C., Gotoh O., Okuda K., Nebert D.W. (1993) DNA and Cell Biology, **12**, 1-51
2. Kahn R.A., Durst F. (2000) in: Evolution of Metabolic Pathways (Romeo J.T., Ibrahim R., Varin L., DeLuca V., eds.), pp. 151-189.
3. Nakahara K., Tanimoto T., Hatano K., Usuda K., Shoun H. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 8350-8355
4. Sezutsu H., Le Goff G., Feyereisen R. (2013) Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, **368**, 20120428.
5. Lewis D.F., Sheridan G. (2001) Scientific World J., **1**, 151-167.
6. Lee D.S., Nioche P., Hamberg M., Raman C.S. (2008) Nature, **455**, 363-368.
7. Nebert D.W., Feyereisen R. (1994) in: Cytochrome P450: Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, 8<sup>th</sup> Int. Conf. (Lechner M.C., ed.), John Libbey Eurotext, Paris, France, pp. 3-13.
8. Omura T. (2013) Biotechnol. Appl. Biochem., **60**, 4-8.
9. Graham S.E., Peterson J.A. (1999) Arch. Biochem. Biophys., **369**, 24-29.
10. Ingelman-Sundberg M. (2005) Toxicol. Appl. Pharmacol., **207**, 52-56.
11. Gomes A.M., Winter S., Klein K., Turpeinen M., Schaeffeler E., Schwab M., Zanger U.M. (2009) Pharmacogenomics, **10**, 579-599.
12. Yang C.S. (1977) Life Sci., **21**, 1047-1057.
13. Franklin M.R., Estabrook R.W. (1971) Arch. Biochem. Biophys., **143**, 318-329.

14. Stier A., Sackmann E. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 400-408.
15. Stier A. (1976) *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 109-113.
16. Peterson J.A., Ebel R.E., O'keeffe D.H., Matsubara T., Estabrook R.W. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 4010-4016.
17. Archakov A.I., Borodin E.A., Davydov D.R., Karyakin A.I., Borovyagin V.L. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 832-840.
18. Kaminsky L.S., Guengerich F.P. (1985) *Eur. J. Biochem.*, **149**, 479-489.
19. Chen G.F., Ronis M.J., Ingelman-Sundberg M., Badger T.M. (1999) *Xenobiotica*, **29**, 437-451.
20. Cawley G.F., Battie C.J., Backes W.L. (1995) *Biochemistry*, **34**, 1244-1247.
21. Yamazaki H., Inoue K., Mimura M., Oda Y., Guengerich F.P., Shimada T. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 313-319.
22. Tan Y., Patten C.J., Smith T., Yang C.S. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 82-91.
23. Davydov D.R., Petushkova N.A., Bobrovnikova E.V., Knyushko T.V., Dansette P. (2001) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **500**, 335-338.
24. Davydov D.R. (2011) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **7**, 543-558.
25. Reed J.R., Backes W.L. (2012) *Pharm. Ther.*, **133**, 299-310.
26. Tralau T., Luch A. (2013) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **9**, 1541-1554.
27. Guengerich F.P., Holladay L.A. (1979) *Biochemistry*, **18**, 5442-5449.
28. French J.S., Guengerich F.P., Coon M.J. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 4112-4119.
29. Wendel I., Behlke J., Janig G.R. (1983) *Biomed. Biochim. Acta*, **42**, 623-631.
30. Dean W.L., Gray R.D. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 265-271.
31. Tsuprun V.L., Myasoedova K.N., Berndt P., Sogra O.N., Orlova E.V., Chernyak V.Ya., Archakov A.I., Skulachev V.P. (1986) *FEBS Lett.*, **205**, 35-40.
32. Davydov D.R., Fernando H., Baas B.J., Sligar S.G., Halpert J.R. (2005) *Biochemistry*, **44**, 13902-13913.
33. Fernando H., Davydov D.R., Chin C.C., Halpert J.R. (2007) *Arch. Biochem. Biophys.*, **460**, 129-140.
34. Pernecky S.J., Olken N.M., Bestervelt L.L., Coon M.J. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **318**, 446-456.
35. Scott E.E., Spatzenegger M., Halpert J.R. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.*, **395**, 57-68.
36. von Wachenfeldt C., Richardson T.H., Cosme J., Johnson E.F. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **339**, 107-114.
37. Gillam E.M.J. (2008) *Chem. Res. Toxicol.*, **21**, 220-231.
38. Shukla A., Huang W., Depaz I.M., Gillam E.M.J. (2009) *Xenobiotica*, **39**, 495-507.
39. Kempf A.C., Zanger U.M., Meyer U.A. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **321**, 277-288.
40. Dong M.S., Yamazaki H., Guo Z., Guengerich F.P. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.*, **327**, 11-19.
41. Cosme J., Johnson E.F. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 2545-2553.
42. Cosme J., Johnson E.F. (2002) *Methods Enzymol.*, **357**, 116-120.
43. Richter C., Winterhalter K.H., Cherry R.J. (1979) *FEBS Letts.*, **102**, 151-154.
44. McIntosh P.R., Kawato S., Freedman R.B., Cherry R.J. (1980) *FEBS Letts.*, **122**, 54-58.
45. Gut J., Richter C., Cherry R.J., Winterhalter K.H., Kawato S. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 8588-8594.
46. Greinert R., Finch S.A., Stier A. (1982) *Xenobiotica*, **12**, 717-726.
47. Hildebrandt P., Garda H., Stier A., Bachmanova G.I., Kanaeva I.P., Archakov A.I. (1989) *Eur. J. Biochem.*, **186**, 383-388.
48. Iwase T., Sakaki T., Yabusaki Y., Ohkawa H., Ohta Y., Kawato S. (1991) *Biochemistry*, **30**, 8347-8351.
49. Schwarz D., Pirrwitz J., Ruckpaul K. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.*, **216**, 322-328.
50. Schwarz D., Pirrwitz J., Meyer H.W., Coon M.J., Ruckpaul K. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171**, 175-181.
51. Alston K., Robinson R.C., Park S.S., Gelboin H.V., Friedman F.K. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 735-739.
52. Myasoedova K.N., Magretova N.N. (2001) *Biosci. Rep.*, **21**, 63-72.
53. Reed J.R., Eyer M., Backes W.L. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 8942-8952.
54. Szczesna-Skorupa E., Mallah B., Kemper B. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 31269-31276.
55. Praporski S., Ng S.M., Nguyen A.D., Corbin C.J., Mechler A., Zheng J., Conley A.J., Martin L.L. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 33224-33232.
56. Ozalp C., Szczesna-Skorupa E., Kemper B. (2005) *Drug Metab. Disp.*, **33**, 1382-1390.
57. Reed J.R., Connick J.P., Cheng D.M., Cawley G.F., Backes W.L. (2012) *Biochem. J.*, **446**, 489-497.
58. Kawato S., Gut J., Cherry R.J., Winterhalter K.H., Richter C. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 7023-7029.
59. Myasoedova K.N., Berndt P. (1990) *FEBS Lett.*, **275**, 235-238.
60. Hu G., Johnson E.F., Kemper B. (2010) *Drug Metab. Dispos.*, **38**, 1976-1983.
61. Davydov D.R., Sineva E.V., Sistla S., Davydova N.Y., Frank D.J., Sligar S.G., Halpert J.R. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 378-90.
62. Davydov D.R., Davydova N.Y., Sineva E.V., Kufareva I., Halpert J.R. (2013) *Biochem. J.*, **453**, 219-230.
63. Yamazaki H., Gillam E.M., Dong M.S., Johnson W.W., Guengerich F.P., Shimada T. (1997) *Arch. Biochem. Biophys.*, **342**, 329-337.
64. Hazai E., Kupfer D. (2005) *Drug Metab. Disp.*, **33**, 157-164.
65. Subramanian M., Low M., Locuson C.W., Tracy T.S. (2009) *Drug Metab. Disp.*, **37**, 1682-1689.
66. Subramanian M., Tam H., Zheng H., Tracy T.S. (2010) *Drug Metab. Disp.*, **38**, 1003-1009.
67. Backes W.L., Battie C.J., Cawley G.F. (1998) *Biochemistry*, **37**, 12852-12859.
68. Cawley G.F., Zhang S.X., Kelley R.W., Backes W.L. (2001) *Drug Metab. Disp.*, **29**, 1529-1534.
69. Davydov D.R., Petushkova N.A., Archakov A.I., Hui Bon Hoa G. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **276**, 1005-1012.
70. Kelley W.K., Reed J.R., Backes W.L. (2005) *Biochemistry*, **44**, 2632-2641.
71. Kelley R.W., Cheng D.M., Backes W.L. (2006) *Biochemistry*, **45**, 15807-15816.
72. Backes W.L., Kelley R.W. (2003) *Pharm. Ther.*, **98**, 221-233.
73. Kanaeva I.P., Dedinskii I.R., Skotselyas E.D., Krainev A.G., Guleva I.V., Sevrjukova I.F., Koen Y.M., Kuznetsova G.P., Bachmanova G.I., Archakov A.I. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**, 395-402.
74. Davydov D.R., Davydova N.Y., Sineva E.V., Halpert J.R. (2015) *J. Biol. Chem.*, **453**, 219-230.
75. Watanabe J., Asaka Y., Kanai K., Kanamura S. (1992) *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 353-357.



76. Williams P.A., Cosme J., Vinkovic D.M., Ward A., Angove H.C., Day P.J., Vonnrhein C., Tickle I.J., Jhoti H. (2004) *Science*, **305**, 683-686.
77. Green N.S., Reisler E., Houk K.N. (2001) *Protein Sci.*, **10**, 1293-1304.
78. Davydov D.R., Halpert J.R. (2008) *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **4**, 1523-1535.
79. Davydov D.R., Knyushko T.V., Hui Bon Hoa G. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 216-221.
80. Davydov D.R., Deprez E., Hui Bon Hoa G., Knyushko T.V., Kuznetsova G.P., Koen Y.M., Archakov A.I. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.*, **320**, 330-344.
81. Davydov D.R., Hui Bon Hoa G. (1997) in: *High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology*, (Heremans K., ed.), Leuven University Press, Leuven, pp. 111-114.
82. Davydov D.R., Baas B.J., Sligar S.G., Halpert J.R. (2007) *Biochemistry*, **46**, 7852-7864.
83. Davydov D.R., Halpert J.R., Renaud J.P., Hui Bon Hoa G. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **312**, 121-130.
84. Anzenbacherova E., Hudecek J., Murgida D., Hildebrandt P., Marchal S., Lange R., Anzenbacher P. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **338**, 477-482.
85. Bancel F., Bec N., Ebel C., Lange R. (1997) *Eur. J. Biochem.*, **250**, 276-285.
86. Backes W.L., Tamburini P.P., Jansson I., Gibson G.G., Sligar S.G., Schenkman J.B. (1985) *Biochemistry*, **24**, 5130-5136.
87. Карякин А.В., Давыдов Д.Р. (1988) *Вестн. АМН СССР*, №1, 53-62.
88. Fernando H., Halpert J.R., Davydov D.R. (2008) *Arch. Biochem. Biophys.*, **471**, 20-31.
89. Tsong T.Y., Yang C.S. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5955-5959.
90. Fisher M.T., Sligar S.G. (1987) *Biochemistry*, **26**, 4797-4803.
91. Brenner S., Hay S., Girvan H.M., Munro A.W., Scrutton N.S. (2007) *J. Phys. Chem. B.*, **111**, 7879-7886.
92. Ziegler M., Blanck J., Ruckpaul K. (1982) *FEBS Lett.*, **150**, 219-222.
93. Sineva E.V., Rumfeldt J.A.O., Halpert J.R., Davydov D.R. (2013) *PLOS One*, **8** e83898/
94. Жуков А.А., Арчаков А.И. (1985) *Биохимия*, **50**, 1939-1952.
95. Gruenke L.D.K., Cadieu M., Waskell L. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 24707-24718.
96. Perret A., Pompon D. (1998) *Biochemistry*, **37**, 11412-11424.
97. Gorsky L.D., Koop D.R., Coon M.J. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 6812-6817.
98. Bondy S.C., Naderi S. (1994) *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 155-159.
99. Zangar R.C., Davydov D.R., Verma S. (2004) *Toxicol. Appl. Pharm.*, **199**, 316-331.
100. Shimamoto N. (2013) *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Japan*, **133**, 435-450.
101. Bae Y.S., Oh H., Rhee S.G., Do Yoo Y. (2011) *Molecules and Cells*, **32**, 491-509.
102. Circu M.L., Aw T.Y. (2010) *Free Radical Biol. Med.*, **48**, 749-762.
103. Davydov D.R. (2001) *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 155-160.
104. Kufareva I., Ilatovskiy A.V., Abagyan R. (2012) *Nucl. Acids Res.*, **40**, D535-D540.

Поступила: 16. 02. 2015.

## MOLECULAR ORGANIZATION OF THE MICROSOMAL OXIDATIVE SYSTEM: A NEW CONNOTATION FOR AN OLD TERM

D.R. Davydov<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia<sup>2</sup>Department of Chemistry, Washington State University, Fulmer building, room 477, Pullman, WA 99164-4630; e-mail: d.davydov@wsu.edu

The central role that cytochromes P450 play in the metabolism of drugs and other xenobiotics makes these enzymes a major subject for studies of drug disposition, adverse drug effects and drug-drug interactions. Although there has been tremendous success in delineating P450 mechanisms, the concept of the drug-metabolizing ensemble as a functionally integrated system remains undeveloped. However, eukaryotic cells typically possess a multitude of different P450 enzymes that are co-localized in the membrane of endoplasmic reticulum (ER) and interact with each other with the formation of dynamic heteromeric complexes (mixed oligomers). Appreciation of the importance of developing an integral, systems approach to the ensemble of cytochromes P450 as an integral system inspired growing interest of researchers to the molecular organization of microsomal monooxygenase, which remained in the focus of research of academician Archakov for over 40 years. Fundamental studies carried out under his guidance have an important impact on our current concepts in this area. Further exploration of the molecular organization of the system of microsomal monooxygenase as an integral multienzyme and multifunctional system will have an essential impact on our understanding of the key factors that determine the changes in human drug metabolism and other P450-related functions in development, aging, and disease, as well as under influence of drugs, food ingredients, and environmental contaminants.

**Key words:** cytochrome P450, endoplasmic reticulum, multienzyme system, allostery, protein-protein interactions, oligomerization.