

Лекция №5

Механизмы окислительного повреждения аминокислот, пептидов, белков, нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Дисфункция клеточных и тканевых процессов как результат

окислительного

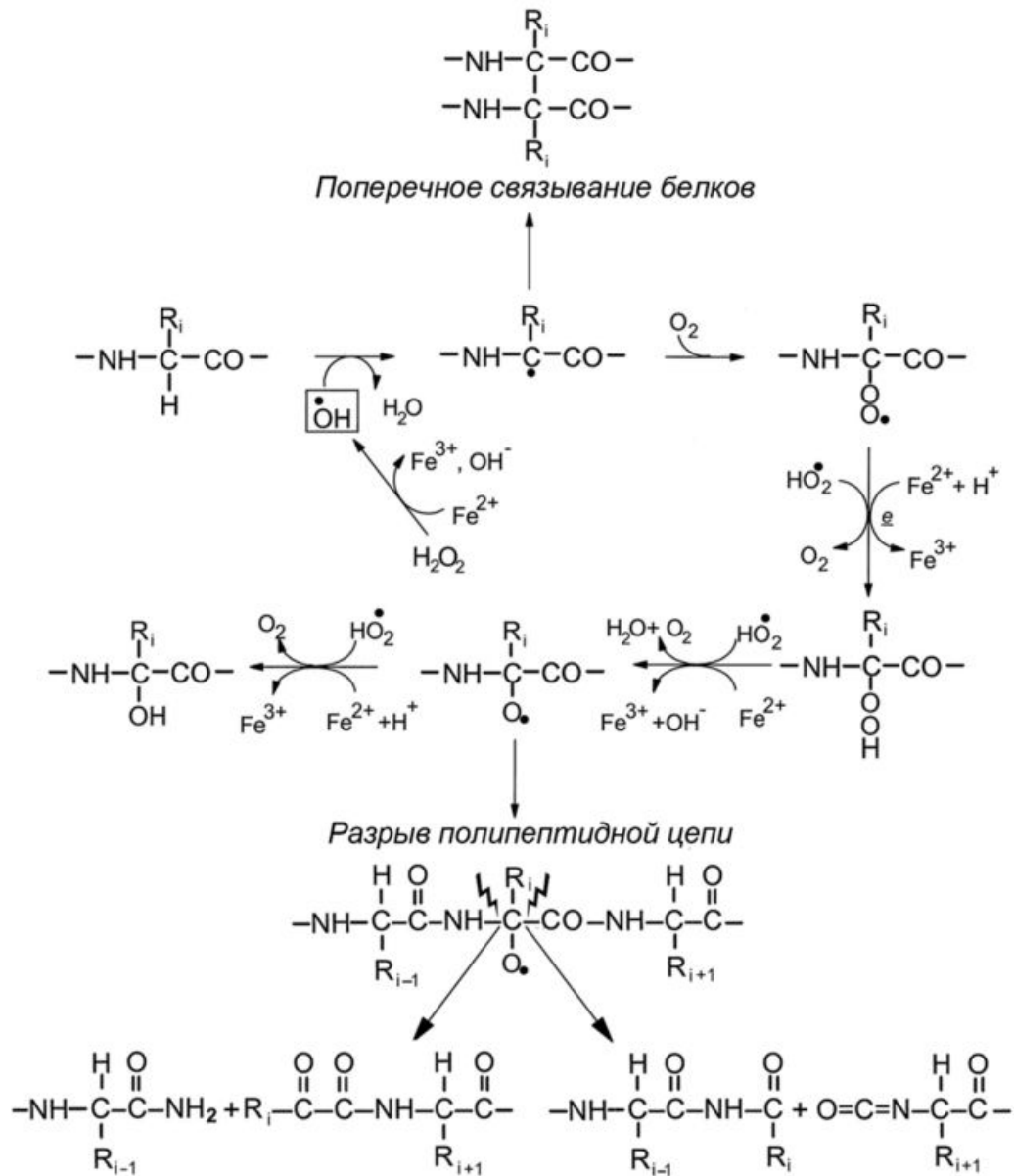
повреждения белков. Роль окисленных белков в формировании липофусциновых гранул. Мутации и транскрипционные нарушения как результат окислительного повреждения ДНК.

Механизмы окислительной модификации белков

(ОМБ)

В качестве основных индукторов ОМБ, в первую очередь, рассматриваются активные формы кислорода (АФК), увеличение свободного железа, продукты перекисного окисления липидов при снижении антиоксидантной защиты. При действии АФК происходит нарушение нативной конформации белков с образованием крупных белковых агрегатов или фрагментация белковой молекулы. Гидроксильный радикал чаще всего вызывает агрегацию белков, а в комбинации с супероксиданионом - фрагментацию с образованием низкомолекулярных фрагментов. Радикалы липидов могут также вызывать фрагментацию белковых молекул. Механизм формирования агрегатов следующий: при действии оксидантов происходит нарушение нативной конформации ряда доменов белков. В результате увеличивается число гидрофобных остатков на поверхности глобул, что и обуславливает формирование крупных белковых конгломератов.

Окисление полипептидной цепи, приводящее к поперечному связыванию или разрыву белков

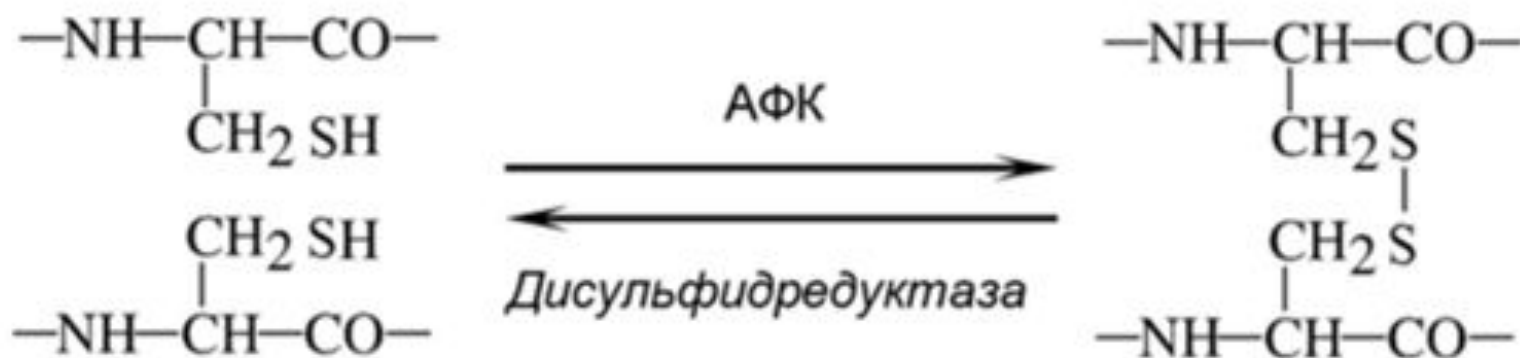
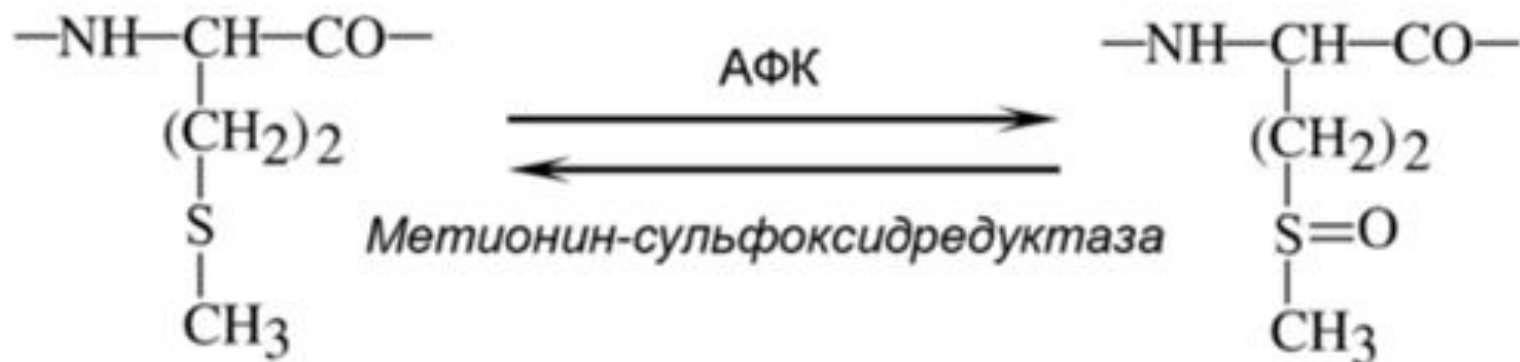


- Основной агент, вызывающий окислительное повреждение белков, — гидроксил-радикал. Окислительная атака на белок начинается с удаления электрона от α -С- атома. Образовавшийся радикал может прореагировать с себе подобным, в результате произойдет димеризация белка.
- Алкил-радикал легко присоединяет молекулярный кислород. В результате образуется алкил-пероксил-радикал, который преобразуется в гидропероксид белка, а затем — в алкоксил-радикал и в гидроксильную производную белка. Алкил-радикалы, алкил-пероксил-радикалы и алкоксил-радикалы могут отнимать электроны от других α -С-атомов той же или другой полипептидной цепи. Таким образом, происходит цепная реакция, механизм которой, как видим, аналогичен механизму цепной реакции пероксидации липидов. Возникновение алкоксил-радикала ведет к разрыву полипептидной цепи. Разрываться может связь окисленного α -С с азотом либо с углеродом карбонильной группы.

- Все боковые остатки аминокислот подвержены окислению, но в разной степени. Наиболее уязвимы цистеин и метионин, однако их окисление репарируется. Репарация окисленного метионина происходит с помощью протеин-метионин-сульфоксидредуктазы. Донором электронов в этой реакции выступает белок тиоредоксин, который затем восстанавливается при участии тиоредоксинредуктазы. Восстановление дисульфидных мостиков в белках происходит с помощью протеин-дисульфидредуктазы, а также в результате окисления редокс-белков. Если в клетках возникает сильный окислительный стресс, то происходит более глубокое окисление остатков цистеина, вплоть до образования цистеин-сульфоновой кислоты. Такие повреждения репарируются при участии системы пептидных антиоксидантов.

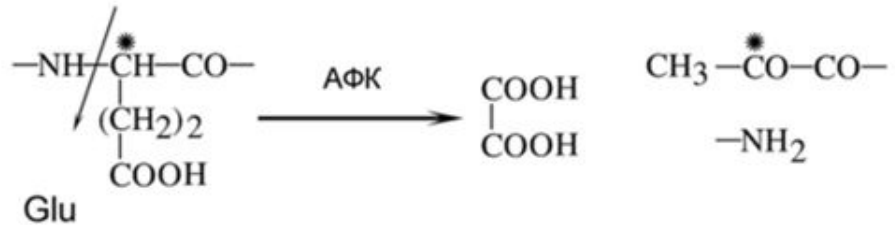
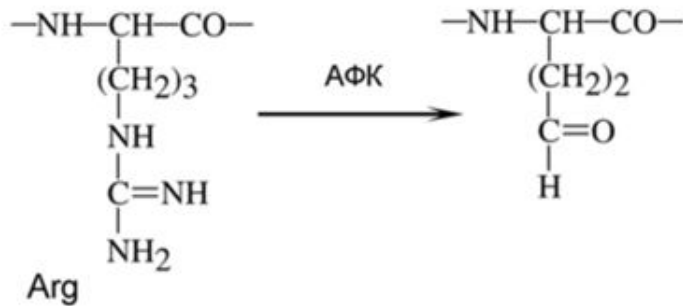
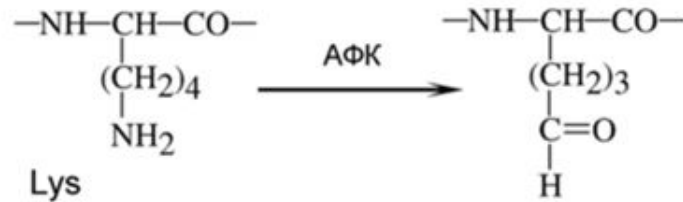
- Присутствующие на поверхности многих белков остатки метионина можно рассматривать как встроенный в белок предохранитель от АФК, своего рода «аварийный сброс». Остатки метионина принимают на себя удар АФК. Окисление метионина менее опасно для белка, чем окисление других аминокислот. Ведь в клетках имеется эффективная система репарации окисленного метионина. Особенно богаты метионином белки митохондрий. Оказалось, что у многих биологических видов в ДНК митохондрий даже произошло изменение генетического кода: кодон АУА (один из трех кодонов, кодирующих изолейцин) стал прочитываться белоксинтезирующим аппаратом как метиониновый кодон. Поэтому белки митохондрий обогащены метионином.

Обратимое окисление остатков серусодержащих аминокислот метионина и цистеина в составе белков



- Нерепарируемому окислению чаще других подвергаются лизин и аргинин. В результате их окисления, а также в результате окисления полипептидной цепи в белках возрастает количество карбонильных групп. Поэтому увеличение содержания карбонильных групп используется как интегральный показатель окислительного повреждения белков. Новые карбонильные группы появляются в белках при их взаимодействии с продуктами окисления липидов и в результате гликирования.

Необратимое окисление остатков лизина, аргинина, глутаминовой кислоты и пролина в



- Окисление глутаминовой кислоты и пролина часто приводит к разрыву полипептидной цепи. Разрыв цепи, обусловленный окислением пролина, вызывает накопление γ -аминомасляной кислоты (γ -aminobutyric acid — GABA). Таким образом, присутствие γ -аминомасляной кислоты в гидролизатах белка является индикатором того, что полипептидные цепи были разорваны по остатку пролина с помощью АФК.

В настоящее время предложены следующие механизмы ОМБ.

Первый механизм ОМБ – конъюгация липидных пероксидов с аминокислотными остатками гистидина, цистеина и лизина в белках.

Второй механизм - окисление при участии АФК с образованием карбонильных производных, а также дисульфидов Cys-S-S-Cys, цистеин-сульфеновой (SO), -сульфиновой (SO₂-) или -сульфоновой (SO₃-) кислот, сульфоксида метионина (MetSO).

В последнее время к ОМБ предложено относить и **гликирование и гликоксидацию** лизиновых и аспарагиновых остатков.

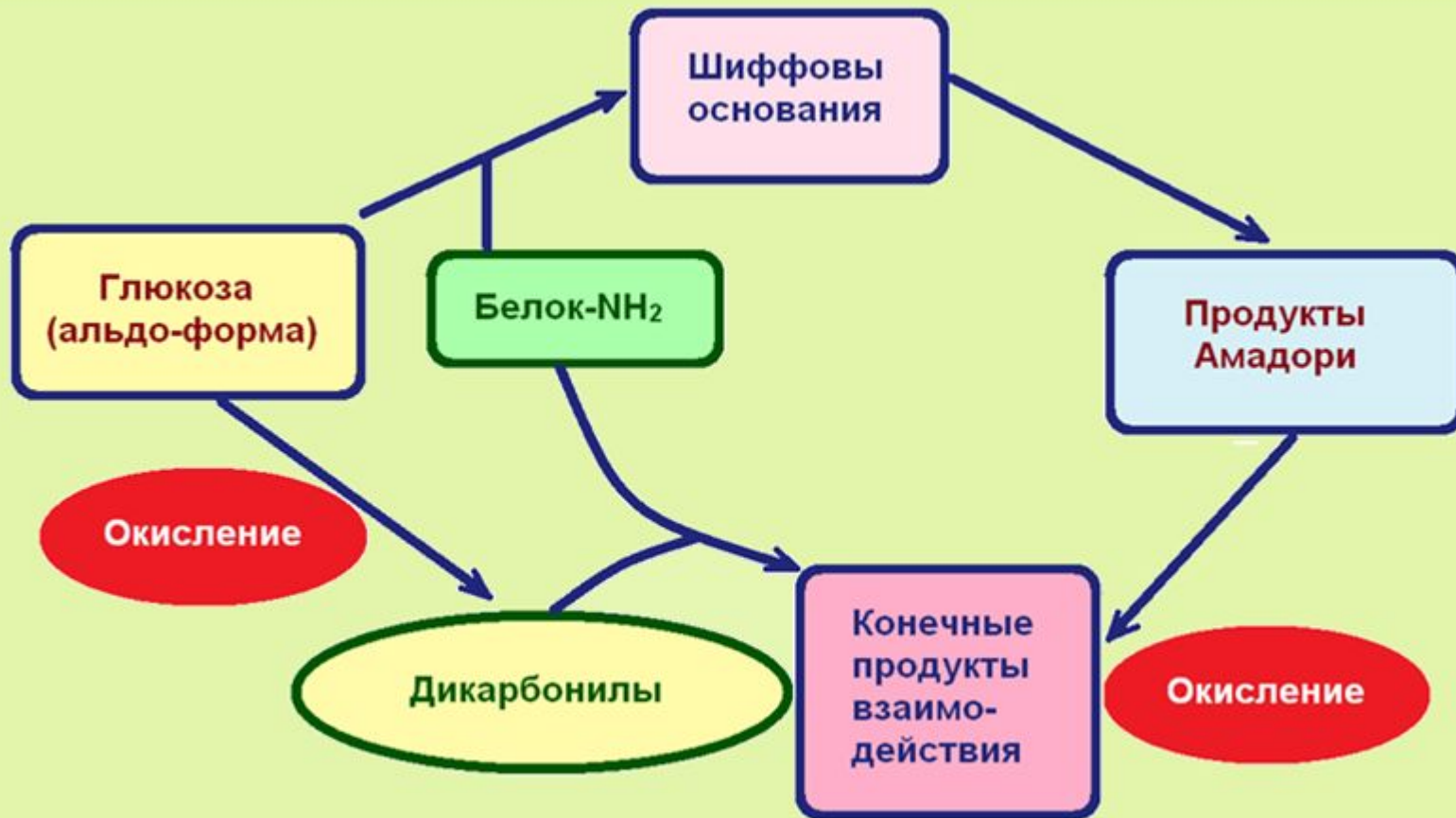
Наиболее важным следствием ОМБ белков является инактивация ферментов. Например, альдегиды вызывают инактивацию мембранных транспортеров, таких, как $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-азы}$, транспортеров глюкозы в головном мозге, что приводит к нейродегенеративным расстройствам. Другим примером является инактивация альдегидами шаперона Hsp90 и протеин-дисульфидизомеразы, осуществляющих контроль фолдинга. Альдегиды чаще всего взаимодействуют с остатками цистеина или гистидина киназ, принимающих участие в сигнальной трансдукции, что приводит к утрате их активности.

Гликирование белков

Гликирование, или неферментативное гликозилирование, — реакция между восстанавливающими углеводами (глюкоза, фруктоза и др.) и свободными аминогруппами белков, липидов и нуклеиновых кислот живого организма, протекающая без участия ферментов. Гликированные белки — это продукты Амадори. Реакция по механизму подобна реакции аминогрупп белков с малоновым диальдегидом. Вначале происходит взаимодействие белка и редуцирующего сахара с образованием основания Шиффа, затем в результате внутримолекулярной перегруппировки возникают продукты Амадори. Особенно активно белки взаимодействуют с сахарами, окисленными АФК. Претерпевшие дальнейшие окислительные изменения продукты гликирования белков обозначаются как AGE (advanced glycation end products). Среди них много димеров белков, так как гликированные белки склонны к димеризации.

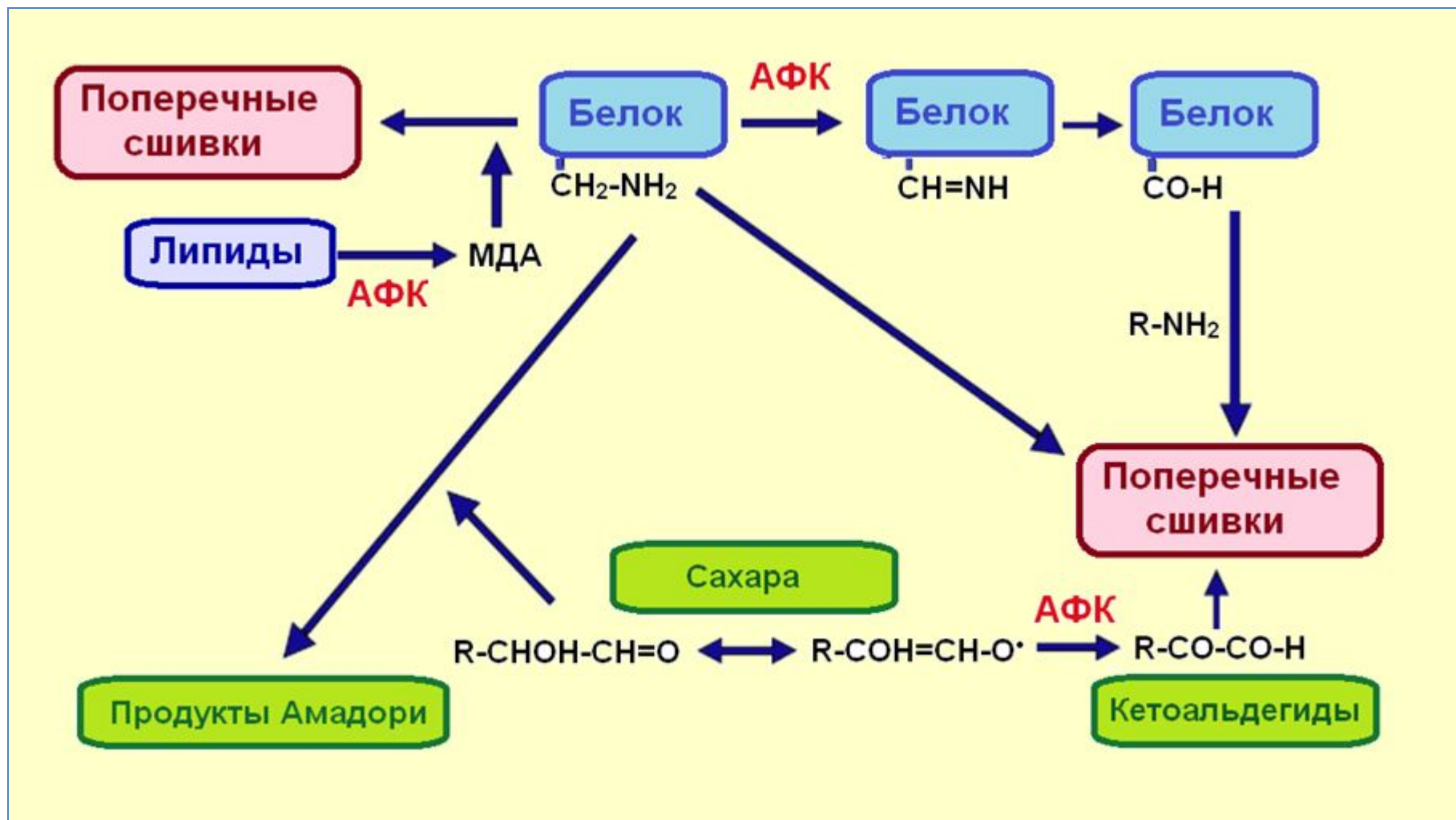
Многие возрастные болезни человека связаны с гликированием белков.

Участие углеводов и белков в оксидативном стрессе



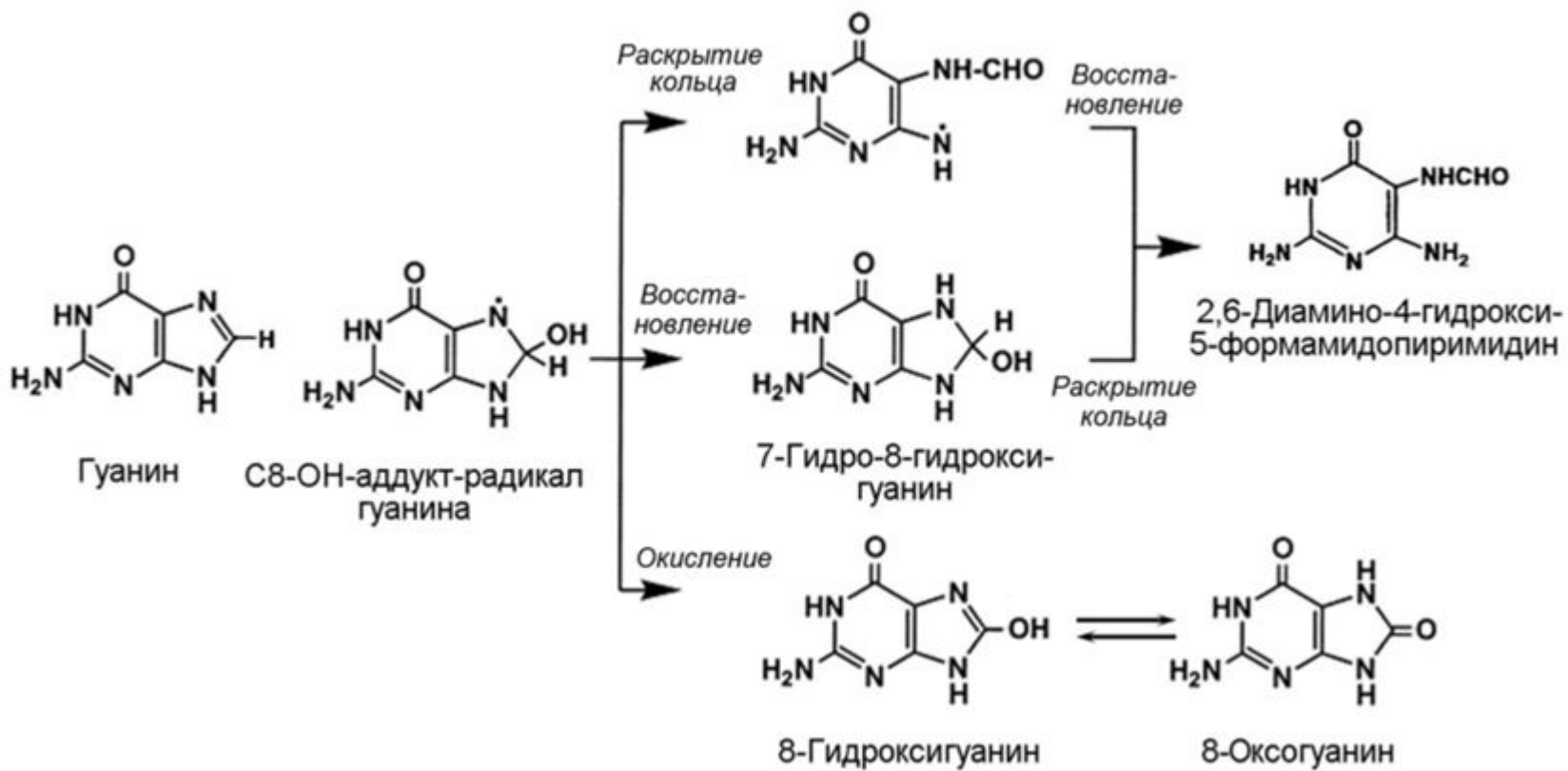
Продукты Амадори – модифицированные белки (при образовании с углеводами оснований Шиффа формируют более стабильные гликозилированные продукты). Образуются также при неферментативном гликозилировании белков.

Взаимодействие белков, липидов и углеводов при оксидативном стрессе

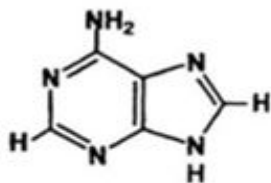


Окислительные повреждения нуклеиновых кислот

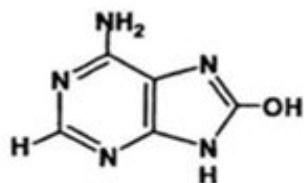
Очень тяжелые последствия имеет окисление нуклеиновых кислот, особенно ДНК. В этом случае повреждается не только ядерная ДНК, но и ДНК митохондрий. Окисление затрагивает преимущественно азотистые основания, в меньшей степени — дезоксирибозу. Гидроксил-радикал присоединяется по двойным связям азотистых оснований. При этом образуется неустойчивый аддукт-радикал. Он может окисляться, восстанавливаться, претерпевать раскрытие кольца.



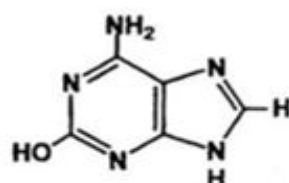
Наиболее распространенные окислительные модификации азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот с образованием производных пириимидина.



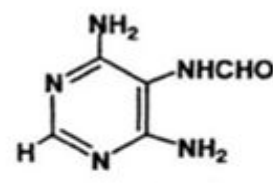
Аденин



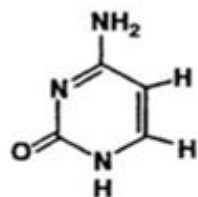
8-Гидроксиаденин



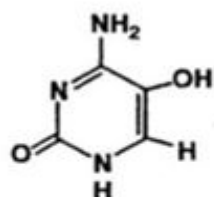
2-Гидроксиаденин



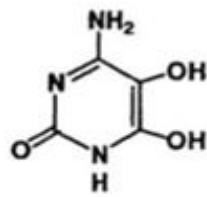
4,6-диамино-5-формамидопириимидин



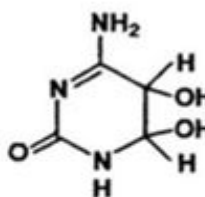
Цитозин



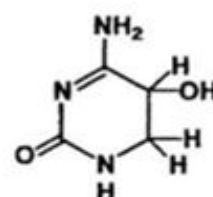
5-Гидроксицитозин



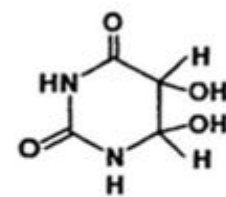
5,6-Дигидроксицитозин



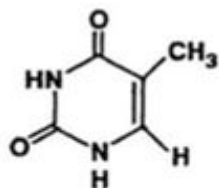
Цитозингликоль



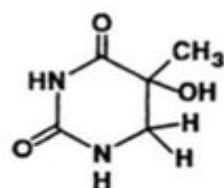
5-Гидрокси-6-гидроцитозин



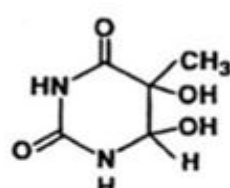
Урацилгликоль



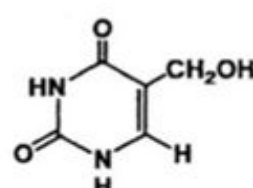
Тимин



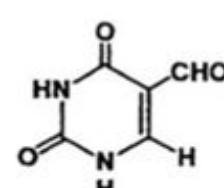
5-Гидрокси-6-гидротимин



Тимингликоль



5-Гидроксиметилурацил



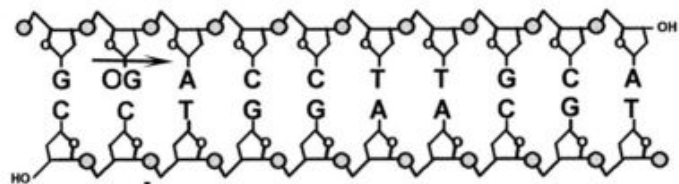
5-Формилурацил

Кроме того, гидроксил-радикал может отнимать атом водорода от метильной группы тимина или от группы восстановленного углерода (С-Н) 2'-дезоксирибозы

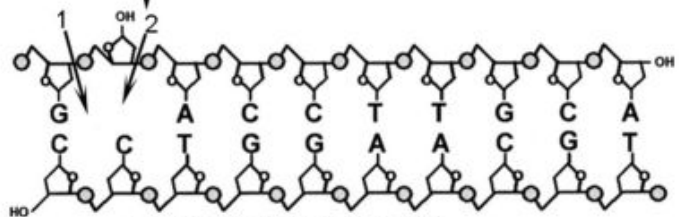
Репарация окислительных

- **повреждений ДНК** Идентифицировано приблизительно 20 окислительных повреждений азотистых оснований. У пуринов присоединение гидроксил-радикала происходит к С4, С5 и С8. Самый распространенный — 8-гидроксигуанин. Часто встречаются 2-гидроксиаденин и 8-гидроксиаденин.
- Присоединение *ОН к С5-С6 двойной связи пиримидинов приводит к образованию С5-ОН аддукт-радикала либо С6-ОН аддукт-радикала. Эти радикалы затем подвергаются окислительно-восстановительным превращениям, преобразуясь в целый ряд окисленных производных цитозина, тимина и

В клетках всех организмов существует многокомпонентная система репарации повреждений ДНК. Окисленные основания ДНК удаляются двумя способами. Первый способ — BER (base excision repair) — заключается в замене отдельных нуклеотидов с окисленными азотистыми основаниями. Эта репарация начинается с удаления азотистого основания посредством гликозилазной активности. Есть специфическая оксо-гуанингликозилаза, удаляющая 8-оксогуанин. Затем особые нуклеазы — AP-эндонуклеаза (apurinic/apyrimidinic endonuclease) и ДНК-фосфодиэстераза — гидролизуют фосфодиэфирную связь и удаляют весь нуклеотид. ДНК-полимераза, используя дезоксиГТФ, заполняет «пробел». Наконец, ДНК-лигаза снова наводит фосфодиэфирную связь. Второй способ репарации ДНК — NER (nucleotide excision repair) — направлен на замену больших поврежденных участков ДНК. Эта репарация начинается с вырезания целого олигонуклеотида.

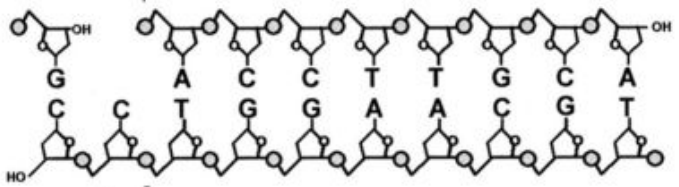


Оксогуанингликозилаза

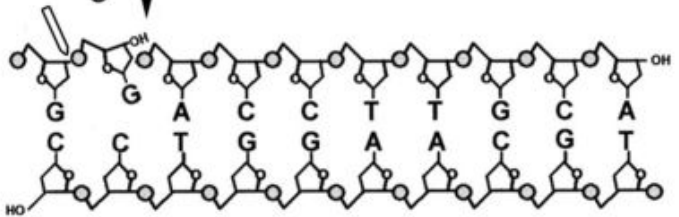


AP-эндонуклеаза (1)

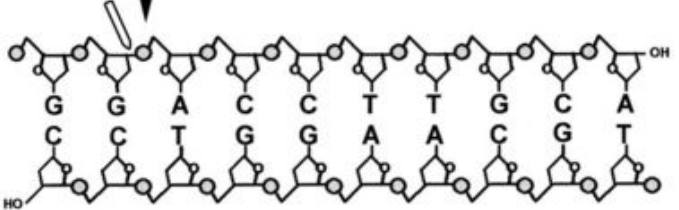
ДНК-диэстераза (2)



ДНК-полимераза



ДНК-лигаза



Липофусцин (*lipofuscinum*; от греч. *lipos* – «жир» и лат. *fuscus* – «темный»);, также известный как «пигмент старения», – жёлто-коричневый аутофлюоресцирующий пигмент, состоящий из гликолипопротеидного матрикса, встречающийся повсеместно во всех тканях и органах человека. В клетках

обычно концентрируется вокруг ядра в лизосомах в виде остаточных, резидуальных, телец. По разным мнениям, липофусцин образуется и накапливается в результате окисления ненасыщенных жиров или в случае повреждения мембран органелл, в особенности — из-за повреждения митохондрий и лизосом.

Наибольшее содержание липофусцина отмечается в митотически неактивных клетках, например, в

Липофусцин – гликопротеид, в состав которого входят:

- Жиры
- Аминокислоты
- Ферменты
- Флавиновые соединения
- Каротиноиды

Ультраструктура липофусцина:

Представляет из себя электронно-плотные гранулы, окруженные двойной мембраной, содержащей миелиноподобные структуры. Эти гранулы называют **цитосомами или каротиносомами**.

Роль липофусцина:

Ранее его расценивали как «пигмент старения», образующийся при перекисном окислении липидов, входящих в состав клеточных мембранных структур.

В настоящее время липофусцин относят к разряду клеточных органоидов.

Функция липофусцина – **депонирование кислорода. В условиях дефицита кислорода, он**

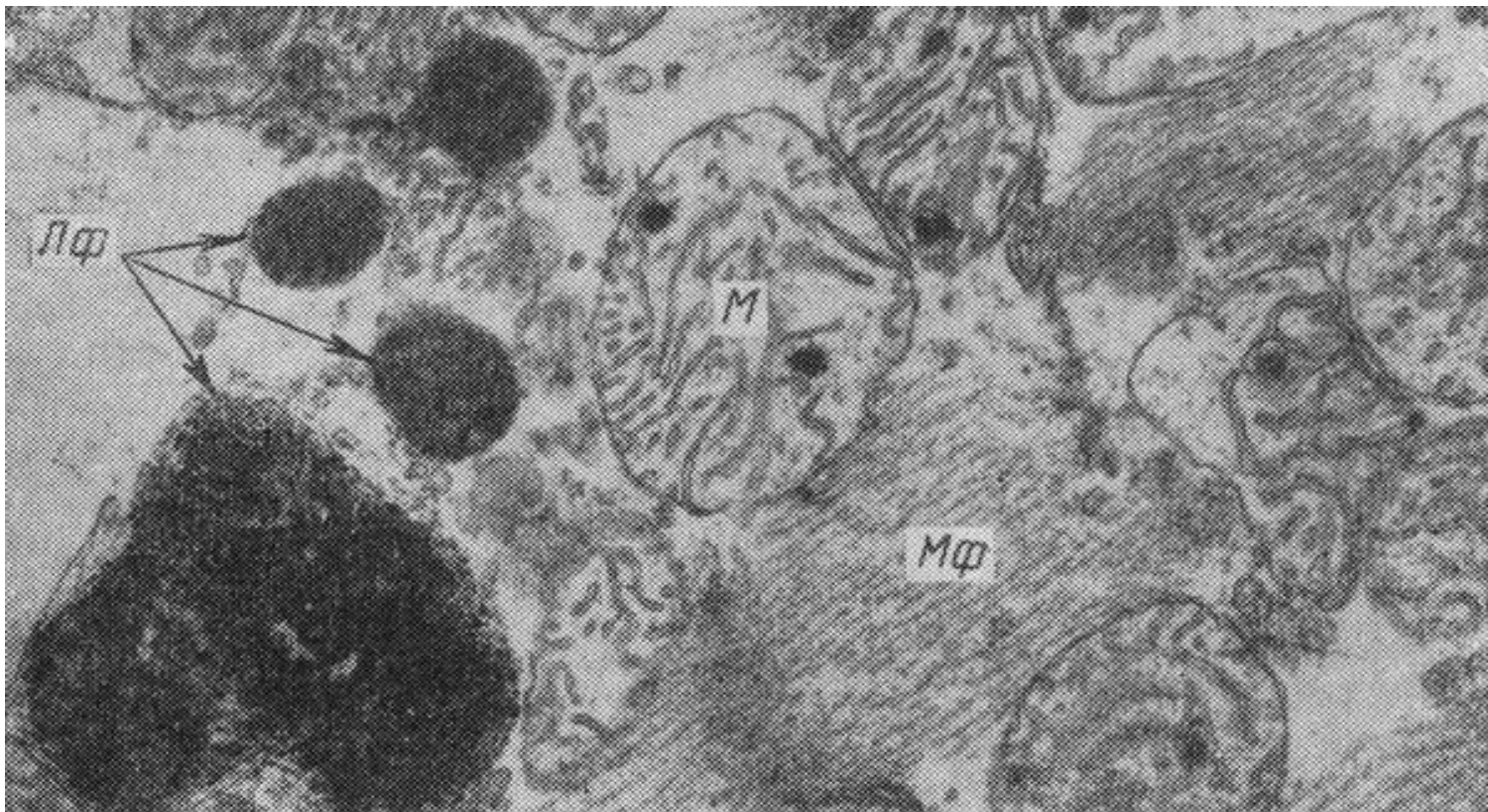
обеспечивает процессы окисления.

Увеличение количества липофусцина в клетке – адаптивный процесс, позволяющий ей нормально

функционировать в условиях нарушения окислительных процессов.

Ультраструктура липофусцина:

Представляет из себя электронно-плотные гранулы, окруженные двойной мембраной, содержащей миелиноподобные структуры. Эти гранулы называют **цитосомами** или **каротиносомами**.



Роль липофусцина:

Ранее его расценивали как «пигмент старения», образующийся при перекисном окислении липидов, входящих в состав клеточных мембранных структур.

В настоящее время липофусцин относят к разряду клеточных органоидов.

Функция липофусцина – **депонирование кислорода. В условиях дефицита кислорода, он обеспечивает процессы окисления.**

Увеличение количества липофусцина в клетке – адаптивный процесс, позволяющий ей нормально функционировать в условиях нарушения окислительных процессов.