

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.152.3.

© Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМОВ b5 С P450CAM С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ОПТИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА И КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

*Н.И. Раченкова¹, Ю.Д. Иванов¹, В.С. Скворцов¹, А.С. Иванов¹, А.А. Молнар¹,
Г. Уи Бон Уа², А.И. Арчаков¹*

¹ ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН,
119121, Москва, Погодинская ул. 10; факс: (095) 245-0857;
эл. почта: Yuri.Ivanov@ibmc.msk.ru

² Institut de Biologie Physico Chimique, Paris, 75005 Paris, France

С помощью оптического биосенсора исследовано в режиме реального времени образование и распад комплексов цитохрома P450cam (P450cam) с полноразмерным цитохромом b5 (d-b5) и его трипсиновым водорастворимым фрагментом (t-b5). Показано, что t-b5 может образовывать комплекс с P450cam, в то время как d-b5 комплексов с P450cam не образует. Показано участие аминокислотных групп P450cam в комплексообразовании с t-b5. Измерена температурная зависимость образования комплексов t-b5_{imm}/P450cam в диапазоне 15-40°C. Константа скорости образования (k_{on}) комплексов t-b5/P450cam растет с ростом температуры, а константа скорости распада комплексов не меняется. Сделан вывод о том, что гидрофобные взаимодействия играют ведущую роль в комплексообразовании на стадии их образования, а электростатические взаимодействия вносят существенный вклад в стабилизацию комплексов. Из полученных температурных зависимостей рассчитаны энергии активации реакций образования и распада комплексов, энтальпия и энтропия комплексообразования. Показан решающий вклад энтропийной составляющей в реакцию комплексообразования. Выполнено компьютерное моделирование белок-белковых взаимодействий в системах P450cam/t-b5 и P450cam/d-b5. С помощью метода молекулярного докинга получены гипотезы белок-белковых комплексов и отобраны лучшие с точки зрения геометрической комплиментарности, расчетной энергии взаимодействия и вероятности переноса электронов между белками. Компьютерное молекулярное моделирование показало, что стабильный комплекс может образовываться только в случае пары P450cam/t-b5, но не P450cam/d-b5. Согласно этим расчетам в образовании виртуального комплекса участвуют следующие аминокислотные остатки P450cam: Q69, R72, E73, E76, R79, H80, P106, Q108, R109, R112, A113, N116, Q117, M121, P122, D125, A283, Y305, R330, Q343, K344, H347, H352, G353, S354, L356, Q360, H361, R364. Результаты моделирования хорошо согласуются с экспериментальными данными, полученными с помощью оптического биосенсора.

Ключевые слова: цитохром P450cam, цитохром b5, оптический биосенсор, трехмерная структура белка, белок-белковое взаимодействие, молекулярное моделирование, молекулярный докинг.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохром P450 (P450) играет важную роль в метаболизме лекарств, канцерогенов, токсинов и других ксенобиотиков [1, 2]. Цитохром b5 (b5) является редокс-партнером цитохрома P450 2B4 (d-2B4) в микросомальной системе окисления в печени и состоит из двух доменов: каталитического водорастворимого и мембранного. С помощью трипсина молекула b5 может быть расщеплена на эти два домена [3]. Кристаллическая структура водорастворимого

фрагмента b5 (так называемый трипсиновый фрагмент, t-b5) из печени крысы и быка известна [4-6] и доступна в белковом банке данных PDB (1B5A и 1CYO соответственно) [7]. Трехмерная структура полноразмерной молекулы b5 (d-b5) до сих пор не определена. Ранее нами была построена трехмерная компьютерная модель d-b5 [8-10] как комбинация кристаллической структуры t-b5 и модели мембранного домена. Водорастворимый цитохром P450_{cam} (P450_{cam}) из *Pseudomonas putida* (CYP101), также как и P450 2B4 (CYP 2B4), может образовывать стабильный комплекс с t-b5 быка. Предложена компьютерная молекулярная модель данного комплекса [11-13]. Однако в реальной ситуации b5 является мембранным белком и его партнером является также мембранный P450. Поэтому остается невыясненным вопрос – может ли водорастворимый P450_{cam} взаимодействовать с полноразмерным d-b5 и какова роль мембранного фрагмента b5.

В данной работе мы сконцентрировали внимание на роли мембранного фрагмента b5 во взаимодействии с P450_{cam}. Были исследованы процессы образования и распада комплексов P450_{cam} с двумя формами b5 – без мембранного фрагмента и полноразмерной формой (t-b5 и d-b5) в реальном времени с помощью метода оптического биосенсора, который в последнее время широко используется для изучения белок-белковых взаимодействий [14-16]. Были измерены кинетические характеристики комплексообразования k_{on} и k_{off} для пары P450_{cam}/t-b5 и их температурные зависимости. Из этих зависимостей рассчитаны термодинамические барьеры реакции образования и распада комплексов и выявлена ведущая роль энтропийного фактора в реакции комплексообразования P450_{cam}/t-b5. В случае пары P450_{cam}/d-b5 комплексообразования белков не наблюдалось. Показана ведущая роль гидрофобных взаимодействий на стадии образования комплексов и роль электростатических взаимодействий в стабилизации этих комплексов. Было также выполнено компьютерное моделирование образования межмолекулярных комплексов P450_{cam}/t-b5 и P450_{cam}/d-b5. Полученные варианты моделей комплексов были оценены по геометрической комплиментарности контактирующих участков, расчетной величине энергии взаимодействия и вероятности туннелирования электронов. Было показано, что только в случае P450_{cam}/t-b5 возможно образование прочного электрон-транспортного комплекса, что хорошо согласуется с полученными экспериментальными данными. В список аминокислотных остатков, формирующих участок связывания b5 на поверхности P450_{cam}, среди других входят и остатки R72, R112, K344, R364, роль которых во взаимодействии P450_{cam}/t-b5 была предсказана ранее [11-13].

МЕТОДИКА. Реактивы. Были использованы следующие реактивы от “Affinity sensors” (Division of LabSystem, Англия): 0,4 М раствор 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимида (EDC), 0,1 М раствор N-гидроксисукцинимид (NHS) и 1 М раствор этаноламина. Остальные химические реактивы были приобретены у фирмы “Реахим” (Москва, Россия).

Приготовление белков. Мембранный полноразмерный белок b5 (d-b5) был выделен как описано ранее [17]. В работе использовался препарат d-b5 с удельным содержанием 50 нмоль/мг белка и соотношением $A_{413}/A_{276} = 0,6$. Трипсиновый фрагмент b5 (t-b5) был получен из микросом печени кролика с помощью обработки трипсином как описано ранее [18]. P450_{cam} был экспрессирован в *Escherichia coli*, штам ТВ, выделен и очищен до гомогенного состояния, как описано ранее [19, 20].

Определение термодинамических характеристик взаимодействия P450_{cam} с t-b5 и d-b5 с помощью оптического биосенсора. В работе был использован двухканальный оптический биосенсор IAsys⁺ с измерительными кюветами, дно которых представляет из себя волновод, сопряженный с призмой. Поверхность волновода покрыта карбоксиметилдекстрановым слоем (“CM-dextran”) [21]. Для проведения измерений с помощью этого прибора один из белков-партнеров ковалентно иммобилизуется к карбоксиметилдекстрановому слою измерительной

кюветы. Второй партнер добавляется в измерительную кювету. При комплексообразовании возрастает коэффициент преломления в чувствительном слое, что регистрируется в реальном времени по изменению положения резонансного угла монохроматического поляризованного луча лазера, распространяющегося в системе призма-волновод [22, 23].

Каждый из белков был ковалентно иммобилизован через его аминокислотные и карбоксильные группы декстрана соответствующих кювет с помощью EDC и NHS, согласно методике, описанной в [16]. Использование такой иммобилизации позволяет альтернативно модифицировать аминокислотные группы каждого из белков-партнеров и выяснить влияние такой модификации на белок-белковое взаимодействие, то есть сделать вывод об участии аминокислотных групп в комплексообразовании.

Иммобилизацию t-b5 и d-b5 проводили в 10 мМ Na-ацетатном иммобилизационном буфере (pH 4,5) в течение 25 минут и 40 минут соответственно. Иммобилизацию P450cam выполняли в течение 15 минут в 10 мМ Na-ацетатном иммобилизационном буфере (pH 5,0). Несвязанный белок отмывали буфером PBS/T (138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,05% твин-20, 10 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4). Непрореагировавшие карбоксильные группы на декстрановой поверхности были блокированы 1 М этаноламином (pH 8,5) с последующей промывкой PBS/T. Поверхностная концентрация белка (Γ , молекул/мм²) была рассчитана по формуле $\Gamma = R \cdot 3 \cdot 10^{12} / M_r$, где R – показание оптического биосенсора и M_r – молекулярная масса белка [24]. Значение Γ для иммобилизованных t-b5 ($\Gamma_{t-b5_{im}}$), d-b5 ($\Gamma_{d-b5_{im}}$) и P450cam ($\Gamma_{P450cam_{im}}$) составило $(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{11}$, $(7,5 \pm 0,2) \cdot 10^{10}$ и $(4,2 \pm 0,2) \cdot 10^{10}$ молекул/мм² соответственно.

Контрольный канал (без иммобилизованного белка) был модифицирован по той же процедуре, что и рабочий, за исключением того, что в иммобилизационный буфер белок не добавляли.

Измерения белок-белковых взаимодействий выполняли при добавлении в измерительную кювету лиганда-партнера в диапазоне концентраций 0,25 - 0,75 мкМ. При этих значениях концентраций кинетика связывания может быть описана уравнением псевдопервого порядка [21]. Константу скорости ассоциации рассчитывали по экспоненциальному уравнению, аппроксимирующему кривую связывания:

$$R_t = R_0 + \Delta R \{1 - \exp(-(k_{on} C + k_{off}) t)\} \quad (1),$$

где R_t – сигнал прибора в момент времени t , R_0 – сигнал при $t = 0$, C – концентрация лиганда, ΔR – разница между сигналами R_∞ (при $t = \infty$, в равновесном состоянии) и R_0 . Анализ зависимости константы скорости образования комплексов от температуры выполнялся по зависимости начального наклона кривых связывания от температуры. Температурную зависимость взаимодействия P450cam и t-b5 исследовали в диапазоне температур 15-40°C. Зависимости измеренных констант скорости ассоциации k_{on} от температуры были аппроксимированы уравнением Аррениуса:

$$k_{on} = A \exp(-\Delta G_{on}^\# / RT) \quad (2),$$

где A – константа, T – абсолютная температура (°K), $\Delta G_{on}^\#$ – энергия активации реакции образования комплексов, R – газовая постоянная.

Отсюда был вычислен активационный барьер реакции образования комплексов $\Delta G_{on}^\#$.

Константу диссоциации рассчитывали по уравнению:

$$R = R_d \exp(-k_{off} \cdot t) \quad (3),$$

где R_d – разница между величиной сигнала R_∞ и сигналом в конце диссоциации.

Из соответствующих значений k_{off} была рассчитана величина энергии активации реакции диссоциации комплексов ($\Delta G_{off}^\#$) с использованием уравнения Эйринга:

$$k_{off} = (k_B T/h) \exp(-\Delta G_{off}^\# / RT) \quad (4),$$

где k_B – константа Больцмана, h – постоянная Планка.

Время жизни комплексов определяли как

$$\tau = 1/k_{off} \quad (5).$$

Константу равновесия вычисляли (K_p) как

$$K_p = k_{on}/k_{off} \quad (6).$$

Расчет изменения энергии Гиббса (G) для реакции комплексообразования выполняли по уравнению [24]:

$$\Delta G = -RT \ln K_p, \quad (7),$$

где K_p – константа равновесия.

Компьютерное моделирование белок-белковых комплексов. Кристаллические структуры P450_{cam} [25] и t-b5 [3] были получены из PDB (индексы 1PHS и 1CYO соответственно). Модель трехмерной структуры d-b5 была нами построена ранее [8-10] (файл с координатами данной модели может быть получен через Интернет адрес [26] или от авторов). Молекулярное моделирование и энергетическую оптимизацию выполняли с помощью пакета программ молекулярного моделирования Sybyl 6.7 [27] на сервере SGI Origin200 (R10000x2) и рабочей графической станции SGI O2 (R5000). Моделирование белок-белковых комплексов выполняли с помощью оригинальной программы молекулярного докинга DockSearch [28]. Она работает на основе геометрического докинга и фактически представляет собой генератор гипотез межмолекулярных комплексов с последующей их оценкой с точки зрения геометрической комплиментарности контактирующих участков молекул. Были использованы следующие параметры настройки программы: число точек на поверхности атома – 42; угловой инкремент вращения подвижной молекулы – 20 градусов; размер ячейки трехмерной решетки – 0,2Å; радиус молекулы растворителя – 1,4Å; уровень отсечения гипотез $\geq 65\%$ от максимальной величины площади контакта молекул, уровень отсечения для кластеризации гипотез – 80% и RMS – 2Å. Отобранные наилучшие гипотезы далее передавались в пакет Sybyl для выполнения энергетической оптимизации по методу Powell [29].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. *Изучение межмолекулярных взаимодействий цитохромов P450_{cam} и b5 с помощью оптического биосенсора.*

Образования комплексов P450_{cam}/d-, t-b5 исследовали в калий-фосфатном (KP) буфере (pH 7,4) при концентрациях последнего 50 мМ, 100 мМ и 500 мМ и диапазоне температур от 15 до 40°C. Было установлено, что в случае пары P450_{cam}/d-b5 при иммобилизации как d-b5, так и P450_{cam}, не наблюдалось образование комплексов в диапазоне 50-500 мМ KP и диапазоне температур 15-40°C (данные не приведены). В то же время для пары P450_{cam}/t-b5 отмечено образование комплексов в 500 мМ KP при иммобилизации t-b5 и не наблюдалось при альтернативной иммобилизации P450_{cam_{im}} (рис. 1). Так как при иммобилизации белка блокируются аминокислотные остатки лизина, это означает, что аминокислотные группы P450_{cam} необходимы для образования комплексов P450_{cam}/t-b5. Этот вывод согласуется с данными о том, что Lys 344, Lys 392 на поверхности P450_{cam} принимают участие в комплексообразовании [11-13].

Как видно из температурной зависимости взаимодействия t-b5_{im}/P450_{cam} в 500 мМ KP (рис. 1), при повышении температуры от 15°C до 40°C происходит рост амплитуды сигнала, связанного с количеством образованных комплексов. Такая зависимость k_{on} от температуры (при том, что комплексообразование наблюдается только в условиях повышенной ионной силы буфера) указывает на то, что на стадии образования комплексов движущей силой являются гидрофобные взаимодействия, а электростатические взаимодействия препятствуют этому. С увеличением температуры наблюдается повышение тангенса начального угла наклона кривой связывания t-b5/P450_{cam}, что указывает на рост константы скорости образования комплексов. В таблице 1 и на рисунке 2А и 2Б представлены рассчитанные значения кинетических параметров комплексообразования. Видно, что наблюдается рост на два порядка скорости образования комплексов в

диапазоне температур 15-40°C. Константы k_{on} имеют порядок $10^2 - 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, что указывает на существование термодинамического барьера на стадии образования комплекса P450cam/t-b5. Аппроксимация с помощью уравнения 2 зависимости этой константы от температуры дает следующее выражение:

$$k_{on} = 1,1 \cdot 10^{2,5} \exp(-29,4/RT) \quad (8)$$

Рассчитанное из уравнения (2) значение энергии активации реакции ассоциации $\Delta G_{on}^\#$ составляет -29,4 ккал/моль.

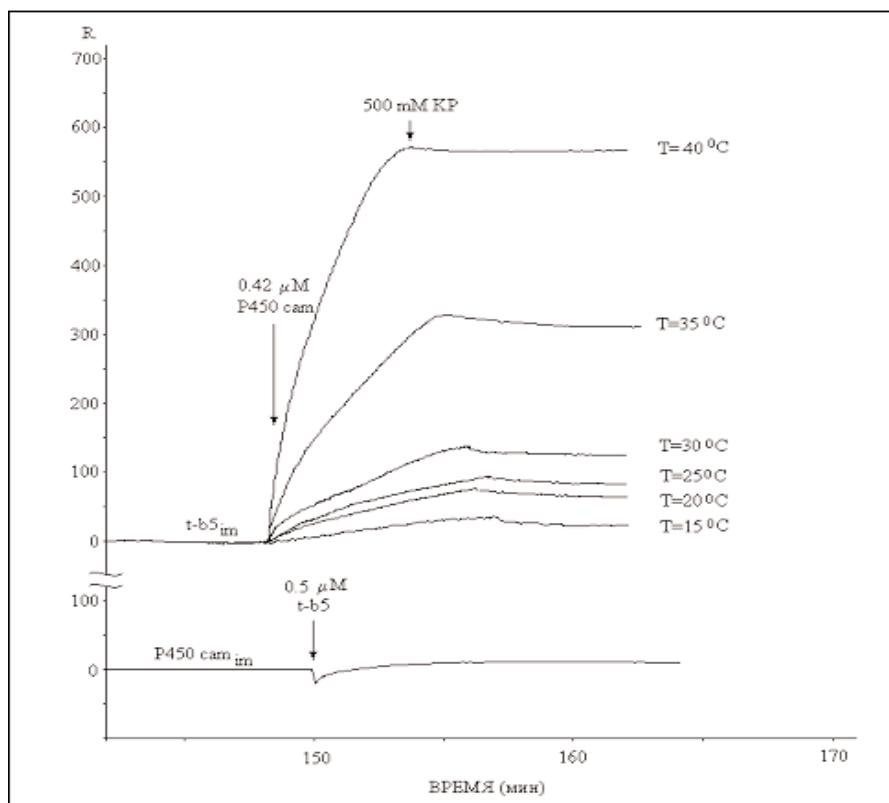


Рисунок 1.

Температурная зависимость реакций образования и распада комплексов t-b5_{im}/P450cam и отсутствие взаимодействий для пары t-b5/P450cam_{im} в диапазоне температур 15-40°C. Среда инкубации содержала 500 мМ К-фосфатный буфер (КР), рН 7,4. Стрелками показаны добавка цитохрома P450cam и t-b5 и замена инкубационной среды на буферный раствор (КР).

Таблица 1. Кинетические и термодинамические параметры реакции комплексообразования t-b5_{im}/P450cam

Температура	15°C	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C
$k_{on}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	$(6,0 \pm 0,1) \cdot 10^2$	$(1,7 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(2,5 \pm 0,3) \cdot 10^3$	$(3,6 \pm 0,4) \cdot 10^3$	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(4,3 \pm 0,4) \cdot 10^4$
k_{off}, s^{-1}	$(1,9 \pm 0,3) \cdot 10^4$					
K_p, M^{-1}	$(3,2 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(8,9 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(1,3 \pm 0,4) \cdot 10^7$	$(1,9 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(1,0 \pm 0,6) \cdot 10^8$	$(2,3 \pm 0,6) \cdot 10^8$
$\Delta G, \text{ккал/моль}$	-8,5 ± 0,1	-9,3 ± 0,1	-9,7 ± 0,1	-10 ± 0,1	-11 ± 0,1	-12 ± 0,1
$\Delta H, \text{ккал/моль}$	29,3 ± 0,2					
$\Delta S, \text{ккал/моль}$	0,13 ± 0,1					

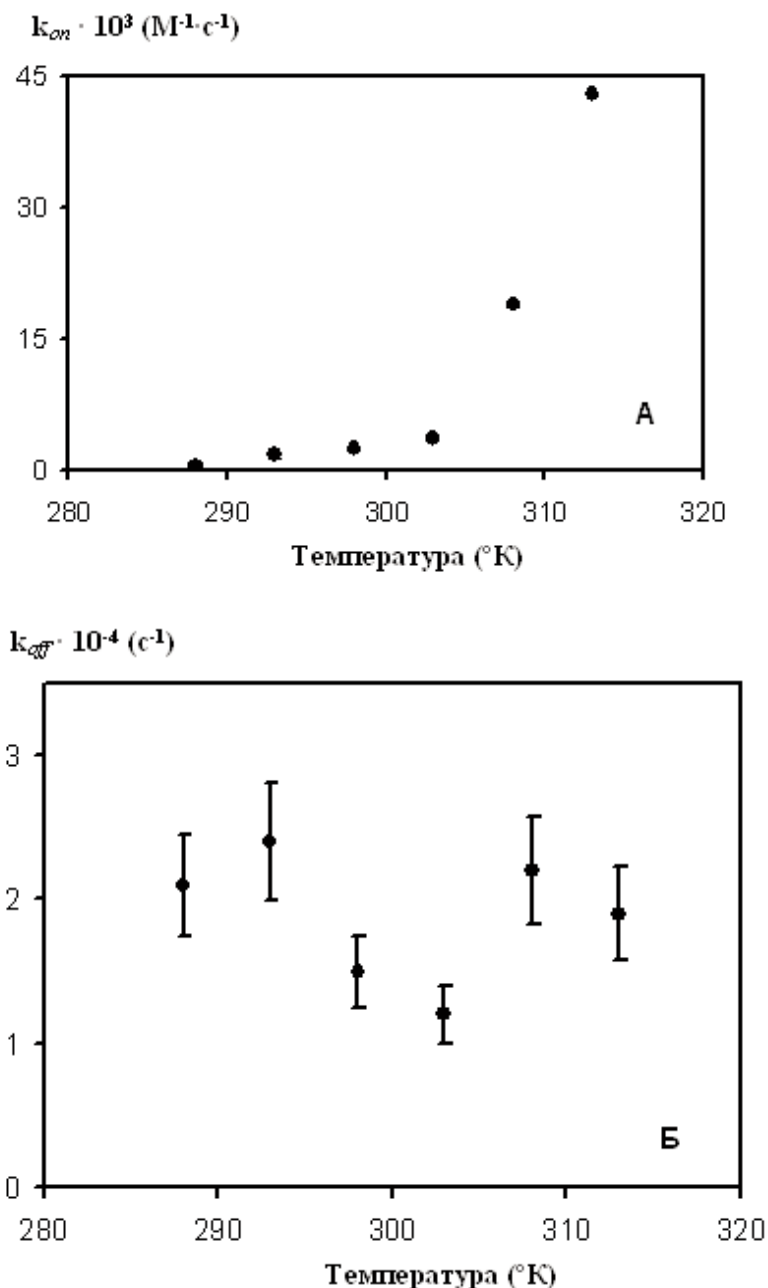


Рисунок 2.

Температурные зависимости константы скорости ассоциации k_{on} (А) и константы скорости диссоциации k_{off} (Б) в системе t-b5_{im}/P450_{cam}. Экспериментальные условия те же, что и на рис. 1.

Константы скорости диссоциации комплексов t-b5_{im}/P450_{cam} составляют $\sim 10^{-4}$ с⁻¹, при этом k_{off} с изменением температуры не изменяется. Рассчитанное из уравнения 4 значение ΔG_{off}^\ddagger составляет 22,4 ккал/моль. Таким образом, имеется термодинамический барьер на стадии распада комплексов. Интересно отметить, что при понижении концентрации КР до 100 мМ и 50 мМ наблюдалось исчезновение комплексов t-b5_{im}/P450_{cam} во всем температурном диапазоне. Этот факт можно объяснить возможной комбинацией нескольких причин: снижением гидрофобных взаимодействий между белками при понижении ионной силы буфера [30], препятствием электростатических взаимодействий на стадии образования комплексов, снижением стабильности комплексов на стадии распада

комплексов при понижении ионной силы. Учитывая, что положительно заряженные аминокислоты Р450сам необходимы для комплексообразования t-b5/P450сам и при этом электростатические взаимодействия между этими белками препятствуют комплексообразованию на стадии образования комплексов, можно сделать вывод, что на стадии распада комплексов положительно заряженные аминокислоты лизина Р450сам играют существенную роль в стабилизации комплексов. Из таблицы 1 и рисунка 3А видно, что константа равновесия K_p имеет величину порядка $10^6 - 10^8 \text{ M}^{-1}$ и растет с повышением температуры. Значение K_p , полученное в нашей работе при $t = 25^\circ\text{C}$, составляет $1,7 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, что на порядок ниже, чем измеренное методом флуоресцентного титрования [31]. В таблице 1 представлены величины ΔG реакции комплексообразования t-b5_{im}/P450сам, рассчитанные из уравнения (7). Температурная зависимость ΔG реакции комплексообразования t-b5_{im}/P450сам (рис. 3Б) удовлетворительно аппроксимируется полиномом первого порядка и ее можно представить выражением:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S, \quad (9),$$

где ΔH и ΔS – изменения энтальпии и энтропии соответственно.

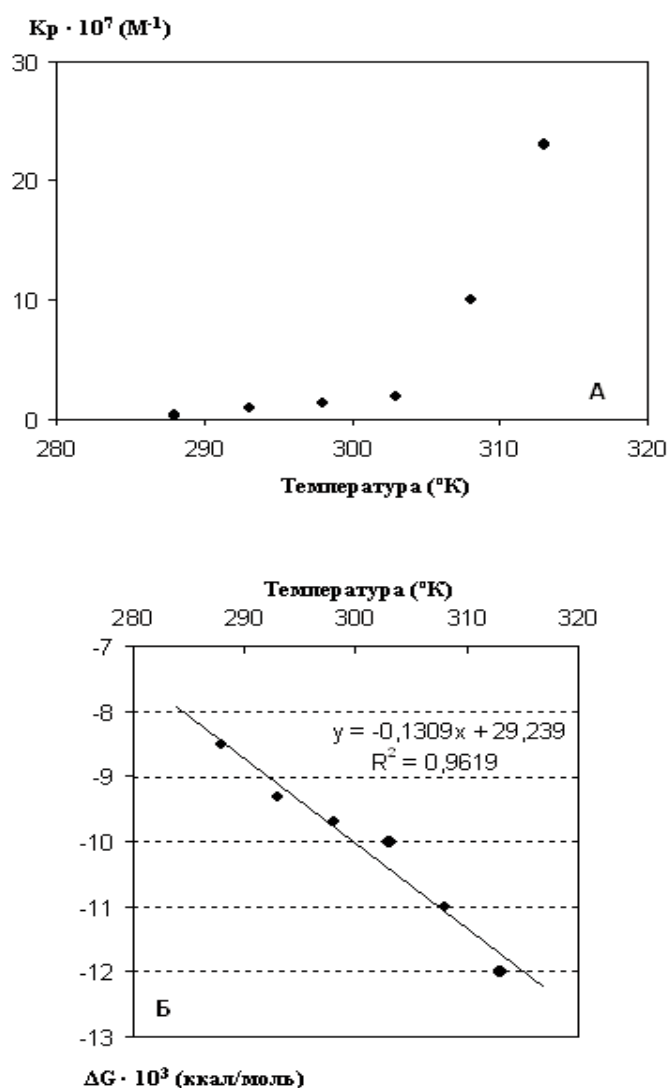


Рисунок 3.

Температурные зависимости константы равновесия (K_p) комплексообразования t-b5_{im}/P450сам (А) и энергии Гиббса (ΔG) реакции комплексообразования t-b5_{im}/P450сам.

Экспериментальные условия те же, что и на рис.1.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ P450_{cam} С ЦИТОХРОМОМ b5

Из уравнения 9 были определены значения ΔH и ΔS в диапазоне температур 15 – 40°C, которые составили $29,3 \pm 0,2$ ккал/моль и $0,13 \pm 0,02$ ккал/(моль • К) соответственно. В этом диапазоне температур основной вклад в реакцию комплексообразования основной вклад вносит энтропийный член, так как его значение превышает по модулю положительную составляющую энтальпии (например, при температуре 25°C (298°K) величина $T \Delta S = 38,74$ ккал/моль, а $\Delta H = 29,3$ ккал/моль).

Компьютерное моделирование межмолекулярных комплексов P450_{cam} и b5.

После выполнения всех этапов моделирования было получено два набора гипотез комплексов: 37 комплексов P450_{cam}/t-b5 и 27 комплексов P450_{cam}/d-b5.

Структурный анализ гипотез комплексов показал три возможных участка связывания t-b5 на поверхности P450_{cam} (рис. 4А) и только два таких участка для связывания d-b5 (рис. 4Б). Причиной меньшего числа возможных участков связывания d-b5 являются, по-видимому, стерические ограничения, обусловленные мембранным якорем d-b5. Наилучшие варианты связывания t-b5 и d-b5 на поверхности P450_{cam} (с учетом хорошей геометрической комплиментарности и энергии связывания ΔE) оказались совершенно разными – #3 и #1 соответственно. В таблице 2 приведены результаты анализа аминокислотных остатков P450_{cam}, участвующих в образовании каждого из возможных мест связывания t-b5 и d-b5. При оценке общего количества аминокислот в местах контакта установлено, что участок связывания #3 для комплекса t-b5/P450_{cam} - доминирующий. Он содержит 29 аминокислотных остатков по сравнению с 9 аминокислотными остатками для #1 и 20 для #2 комплекса t-b5/P450_{cam} и 17 для #1 и 16 для #2 для комплекса d-b5/P450_{cam}.

Таблица 2. Аминокислотные остатки P450_{cam}, входящие в возможные участки связывания t-b5 и d-b5.

Участок		Аминокислотные остатки на поверхности P450 _{cam}									
Связывание t-b5 (см. рис. 4А)											
#1	E94	E198	D202	I205	E209	S235	D236	E237	R240		
#2	E152	E156	D182	D188	S190	K266	P268	E269	E273	E276	D339
	S382	A384	G386	A387	Q388	Q400	P403	D407	T410		
#3	Q69	R72	E73	E76	R79	H80	P106	Q108	R109	R112	A113
	N116	Q117	M121	P122	D125	A283	Y305	R330	Q343	K344	H347
	H352	G353	S354	L356	Q360	H361	R364				
Связывание d-b5 (см. рис. 4Б)											
#1	E76	Y78	R79	P106	R109	R112	A113	M121	P122	P282	A283
	Q343	K344	H352	S354	H361	R364					
#2	P13	P16	E20	R57	E84	R90	E91	E94	E195	K197	E198
	D236	K239	D304	K313	K314						

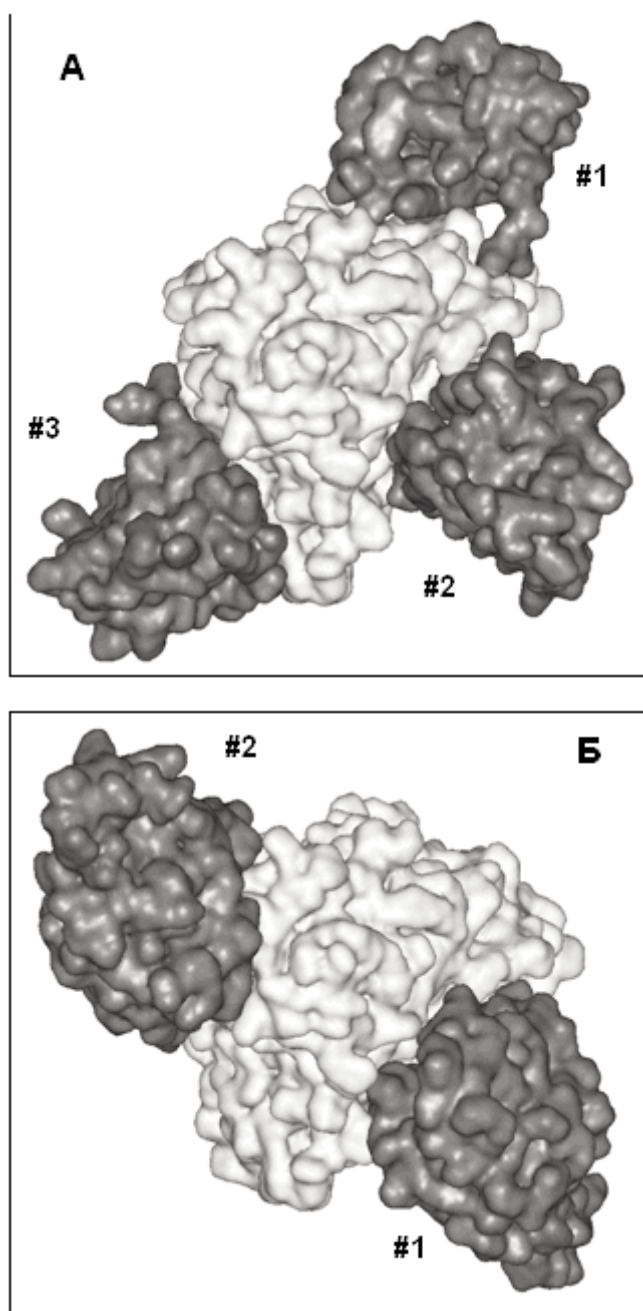


Рисунок 4.

Возможные варианты связывания t-b5 (А) и d-b5 (Б) на поверхности P450cam.

Белым цветом показана молекула P450cam; серым цветом – молекулы t-b5 (рис. 4А) и d-b5 (рис. 4Б).

Номерами обозначены варианты связывания t-b5 и d-b5 (см. обсуждение в тексте и табл. 2).

Известно, что t-b5 полностью ингибирует связывание природного партнера путидаредоксина (PR) с P450cam и перенос электронов [12]. В этой работе авторы построили модель возможного комплекса P450cam/t-b5 и основываясь на вероятных электростатических взаимодействиях определили 4 аминокислотных остатка P450cam, участвующих во взаимодействии с PR или t-b5. Анализ гипотез комплексов P450cam/t-b5 для участка связывания #3 показал их хорошее соответствие данным Stayton и др. [12] (в табл. 2 эти аминокислотные остатки обведены рамкой). Видно, что данный участок связывания t-b5 на поверхности P450cam содержит все четыре описанные ранее аминокислотных остатка. Один из

двух возможных участков для связывания d-b5 (участок #1, см. табл. 2 и рис. 4Б) содержит 3 из четырех остатков. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что теоретически возможно образование комплексов как P450_{cam}/t-b5, так и P450_{cam}/d-b5. Однако, как было отмечено выше, с точки зрения геометрического соответствия и энергии связывания наилучшие гипотезы данных комплексов отличаются по позициям t-b5 и d-b5 на поверхности P450_{cam} (#3 и #1 соответственно).

Для дальнейшей селекции гипотез комплексов была выполнена оценка возможности туннельного переноса электронов между гемами двух молекул (P450_{cam} и b5). Так как эффект туннелирования электронов нелинейно зависит от расстояния между донорным и акцепторным атомами [31], можно утверждать, что вероятность переноса электрона будет намного выше в случае минимальных расстояний. Были рассмотрены два варианта: (1) перенос между атомами железа гемов P450_{cam} и b5 (расстояние **Fe-Fe**); (2) перенос между любыми ближайшими тяжелыми атомами (все атомы за исключением водорода) двух гемов (расстояние **heme-heme**). Полученные результаты представлены на рисунках 5А и 5Б в виде зависимостей ΔE от **Fe-Fe** и **heme-heme** соответственно. Наилучшие гипотезы комплексов с точки зрения возможности туннелирования электронов должны иметь минимальные расстояния **Fe-Fe** или **heme-heme** при максимальном абсолютном значении $|\Delta E|$. Очевидно, что только одна гипотеза комплекса P450_{cam}/t-b5 (точка 1) является наилучшей с точки зрения как расстояния **Fe-Fe** (или **heme-heme**), так и энергии. Данный вариант комплекса соответствует связыванию t-b5 в области #3 (см. табл. 2).

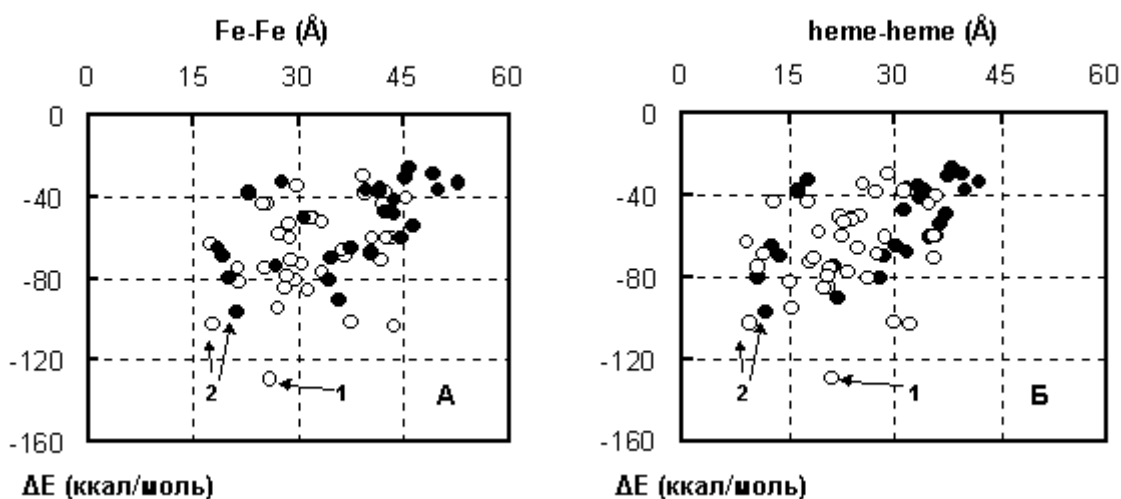


Рисунок 5.

Графики распределений гипотез комплексов P450_{cam}/t-b5 (белые точки) и P450_{cam}/d-b5 (черные точки) в зависимости от величины ΔE и расстояния **Fe-Fe** (А) или **heme-heme** (Б).

Цифрой 1 на графиках обозначен лучший вариант комплекса (см. объяснение в тексте).

ВЫВОДЫ. С помощью оптического биосенсора показано, что для пары b5/P450_{cam} наблюдается комплексообразование только в случае t-b5/P450_{cam}, для пары же d-b5/P450_{cam} взаимодействие не наблюдается. Взаимодействие P450_{cam} с t-b5 существенно зависит от того, какой из белков иммобилизован на поверхности оптического биосенсора. Комплексообразование наблюдалось только в случае иммобилизации t-b5, что указывает на то, что аминокислоты P450_{cam} необходимы для его взаимодействия с b5. Рост при повышении температуры константы скорости образования комплексов t-b5/P450_{cam} при образовании комплексов только в буфере с повышенной ионной силой указывает на ведущую

роль гидрофобных взаимодействий на стадии образования комплексов. Показана важная роль электростатических взаимодействий на стадии распада этих комплексов. Из положительной температурной зависимости Кр сделан вывод о существенном вкладе энтропийной составляющей в реакцию комплексообразования для этой пары. Рассчитана энергия активации образования и распада комплекса t-b5/P450cam из зависимостей констант скорости ассоциации и диссоциации от температуры.

Результаты компьютерного молекулярного моделирования также показали, что с энергетической точки зрения может образовываться стабильный комплекс только в случае пары P450cam/t-b5, но не P450cam/d-b5, что хорошо согласуется с описанными выше экспериментальными данными, полученными с помощью оптического биосенсора.

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке гранта “Медицинские диагностические системы будущего”, в рамках работы: “создание нового поколения биоиммуносенсоров и биочипов”, грантов РФФИ (№ 01-04-48245, № 05-04-48690 и научной школы № 325.2003.4), INTAS № 01-470, а также Janssen Research Foundation, Федеральной целевой программы: “Протеомика в медицине и биотехнологии (государственная поддержка протеомных исследований: нанобиотехнология и компьютерное конструирование лекарств)”, контрактами с Федеральным агентством по науке и инновациям по теме лотов ЖС-13.5/002), ЖС-КП.6/003, ФЦНТП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития науки и техники на 2002-2006 годы”, а также грантом 1.2.29 ОАО МКНТ (2005 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov, A.I., Bachmanova, G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor & Francis, London.
2. Poulos T.L. (1995) Current Opin. Struct. Biol., **5**, 767-774.
3. Tajima S., Enomoto K., Sato R. (1978) J. Biochem. (Tokyo), **84**, 1573-1586.
4. Durley R.C.E., Mathews F.S. (1996) Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. **52**, 65-76. (PDB индекс 1CYO).
5. Altuve A., Silchenko S., Lee K.-H., Kuczera K., Terzyan S., Zhang X., Benson D.R., Rivera M. (2001) Biochemistry **40**, 9469-9483. (PDB индекс 1ICC).
6. Wu J., Gan J.-H., Xia Z.-X., Wang Y.-H., Wang W.-H., Xue L.-L., Xie Y., Huang Z.-X. (2000) Proteins: Structure, Function, and Genetics, **40**, 249–257. (PDB индекс 1EHB).
7. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. (2000) Nucleic Acids Research, **28**, 235-242. (<http://www.rcsb.org/pdb>)
8. Ivanov A., Skvortsov V., Rumjantsev A., Archakov A. (1995) Karadeniz J. Med. Sci., **8**, 210-211.
9. Ivanov A.S., Skvortsov V.S., Rumjantsev A.B., Archakov A.I. (1995) Proc. Int. Conf. Mol. Str. Biol., Vienna, 272/P65.
10. Иванов А.С., Скворцов В.С., Арчаков А.И. (2000) Вопр. мед. химии, **46**, 615-625.
11. Stayton P.S., Fisher M.T., Sligar S.G. (1988) J. Biol. Chem., **263**, 13544-13548.
12. Stayton P.S., Poulos T.L., Sligar S.G. (1989) Biochemistry, **28**, 8201-8205.
13. Stayton P.S., Sligar S.G. (1990) Biochemistry, **29**, 7381-7386.
14. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Karuzina I.I., Archakov A.I., Hoa G.H., Sligar S.G. (2001) Arch. Biochem. Biophys., **391**, 255-264.
15. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Gnedenko O.V., Pozdnev V.F., Shumyantseva V.V., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Tereza A.M., Schmid R.D., Archakov A.I. (2001) J. Mol. Recognit., **14**, 185-196.
16. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Archakov A.I. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. **273**, 750-752.
17. Spartz L., Striunmatter P. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 1042-1046.
18. Omura T., Takesue S. (1970) J. Biochem. (Tokyo), **67**, 249-257.

19. *Gunsalus I. C., Wagner G.C.* (1978) *Methods Enzymol.*, **52**, 166-188.
20. *Jung C., Hui Bon Hoa G., Schroeder K.-L., Simon M., Doucet J.P.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 12855-12862.
21. IAsys manual (1993).
22. *Schuck P.* (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **26**, 541-566.
23. *Bowles M.R., Hall D.R., Pond S.M., Winzor D.J.* (1997) *Analytical Biochemistry*, **244**, 133-143.
24. *Мецлер Д.* (1980) *Биохимия*, Мир, М.
25. *Poulos T.L., Finzel B.C., Howard A.J.* (1986) *Biochemistry*, **25**, 5314-5322.
26. (<http://imgdd.ibmh.msk.su/P450&partners/b5/b5-model.htm>) координаты модели d-b5.
27. SYBYL 6.7, Tripos Inc., 1699 South Hanley Road, St. Louis, Missouri, 63144, USA. (<http://www.tripos.com>)
28. Программа молекулярного докинга DockSearch (<http://imgdd.ibmh.msk.su/lab/originalsoftware/DS/DS.htm>)
29. *Powell M.J.D.* (1977) *Mathematical Programming*, **12**, 241-254.
30. *Mancera R.L.* (1999) *Proc. 3 Int. Conf. Mol. Str. Biology*, Vienna, Austria, p. 92.
31. *Marcus R.A., Sutin N.* (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **811**, 232-265.

Поступила: 20. 12. 2003

OPTICAL BIOSENSOR STUDY AND MOLECULAR MODELING OF INTERACTIONS BETWEEN CYTOCHROME P450_{cam} AND CYTOCHROME b5

*N.I. Rachenkova¹, Yu.D. Ivanov¹, V.S. Skvortsov¹, A.S. Ivanov¹, A.A. Molnar¹,
G. Hui Bon Hoa², A.I. Archakov¹*

¹ Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya st. 10, Moscow, 119121 Russia; fax: (095)245-0857;
e-mail: Yuri.Ivanov@ibmc.msk.ru

² Institut de Biologie Physico Chimique, Paris, 75005, France

The formation of complexes of cytochrome P450_{cam} (P450_{cam}) with full-length cytochrome b5 (d-b5) and its tryptic water-soluble fragment (t-b5) was analyzed using a two-channel IAsys⁺ optical biosensor. It was found that t-b5 can form complexes with P450_{cam}, while d-b5 does not interact with P450_{cam}. The involvement of amine groups of P450_{cam} in the complex formation was demonstrated. The temperature dependence of t-b5_{im}/P450_{cam} complex formation was measured. The association rate constant (k_{on}) increased with temperature, while the dissociation rate constant (k_{off}) practically remained unchanged. It was concluded that hydrophobic interactions play a key role in the complex formation, while electrostatic interactions are significant for complex stabilization. Based on temperature dependence the activation energy, enthalpy and entropy of complex formation were calculated. It was shown that the entropy component plays a key role in t-b5_{im}/P450_{cam} interaction. Computer modeling of P450_{cam}/t-b5 and P450_{cam}/d-b5 interactions was carried out. Using the method of molecular docking some hypotheses of protein-protein complexes were advanced and the best ones were selected based on geometric complementarity, calculated binding energy and probability of electron tunneling between proteins. The computer modeling has shown that only P450_{cam} and t-b5 can form the stable complex. These results are in good agreement with the experimental data obtained with the optical biosensor.

Key words: cytochrome P450_{cam}, cytochrome b5, optical biosensor, 3D protein structure, protein-protein interaction, molecular modeling, molecular docking.