

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК: 577.152.3

©Коллектив авторов

ОПТИКО-БИОСЕНСОРНЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ РЕДОКС-ПАРТНЕРОВ ЦИТОХРОМ Р450 2В4 – СОДЕРЖАЩЕЙ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ГИДРОКСИЛИРОВАНИЯ

*Ю.Д. Иванов**, *А.В. Иванов*, *Н.А. Петушкова*, *О.Г. Гара*, *В.Ю. Кузнецов*,
А.В. Подоппелов, *А.И. Арчаков*

Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва,
ул. Погодинская, 10, тел.: (7)(495)2463761, факс: (7)(495) 2450857;
эл. почта: Yuri.Ivanov@ibmc.msk.ru

Взаимодействия между цитохром Р450 2В4 (d-2В4), NADPH-цитохром Р450 редуктазой (d-Fp) и цитохромом b5 (d-b5) в мономерной реконструированной Р450 2В4–содержащей монооксигеназной системе были исследованы с помощью оптического биосенсора в присутствии NADPH и 7-пентоксирезорфуфина (т.е. в гидроксيليрующих условиях). Для этого каждый из партнеров был иммобилизован по аминокетильным группам на карбоксиметилдекстрановую поверхность биочипа оптического биосенсора IAsys+. Такая иммобилизация белков не приводила к потере их активности в биочипе. Зарегистрировано формирование бинарных d-Fp/d-2В4 комплексов. Константы скоростей ассоциации/диссоциации реакции комплексообразования составляли $(k_{on}/k_{off}) = (0,013 \pm 0,005) \cdot 10^6 \cdot M^{-1} \cdot c^{-1} / 0,05 \pm 0,02 c^{-1}$, а константа диссоциации $K_D = (0,26 \pm 0,13) \cdot 10^{-6} M$. Сравнение k_{on} , k_{off} и K_D для d-Fp/d-2В4 комплексов, формирующихся в условиях гидрокселирования (О-деалкилирования), с соответствующими константами для окисленных форм белков - $(0,10 \pm 0,03) \cdot 10^6 \cdot M^{-1} \cdot c^{-1} / (0,14 \pm 0,06) c^{-1}$, $(0,71 \pm 0,37) \cdot 10^{-6} M$ - показывает снижение k_{on} и в незначительной степени K_D за счёт увеличения времени жизни комплексов при переходе от окисленного состояния к условиям гидрокселирования. Формирование комплексов между d-Fp и d-b5 не было зарегистрировано как в условиях гидрокселирования, так и для окисленных форм белков. В обоих случаях показано формирование тройных комплексов d-Fp/d-2В4/d-b5.

Ключевые слова: цитохром Р450 2В4, цитохром b5, NADPH:цитохром Р450 редуктаза, оптический биосенсор, белок-белковые взаимодействия.

Список сокращений: d-2В4 – цитохром Р450 2В4, d-Fp - NADPH-цитохром Р450 редуктаза, d-b5 – цитохром b5, КР/Е – калий-фосфатный буфер с содержанием Эмульгена-913 0,25 г/л, k_{on} , k_{off} – константы скоростей образования и распада, K_D – константа диссоциации.

* - адресат для переписки

ВВЕДЕНИЕ. Цитохром P450 2B4–содержащая микросомальная монооксигеназная система является одной из ключевых ферментативных систем, вовлеченных в окисление широкого класса эндогенных и экзогенных субстратов [1, 2]. Она включает 3 мембранных белка: цитохром P450 2B4 (d-2B4), NADPH-цитохром P450 редуктазу (d-Fp) и цитохром b5 (d-b5). Монооксигеназный цикл реакции этой системой реализуется при последовательном переносе двух электронов на d-2B4 с d-Fp или 1-го электрона с d-Fp, а второго электрона с d-b5 [3-5]. Как известно, d-2B4, d-Fp и d-b5 характеризуются наличием гидрофобного мембранного фрагмента, посредством которого они заякорены на фосфолипидной мембране. Исследование механизма действия цитохром P450 2B4-содержащей системы осложняется присутствием фосфолипидной мембраны. Ранее было показано, что цитохром P450 2B4-систему можно реконструировать в растворе в отсутствии фосфолипидов, используя в качестве детергента для мономеризации белков Эмульген-913 [6]. Все три белка могут быть мономеризованы в 500 мМ калий фосфатном буфере, содержащем 0,25 г/л Эмульгена 913 (500 мМ КР/Е) [7]. Такая реконструированная система моделирует электрон-транспортную цепь P450 2B4-монооксигеназной системы [6, 7]. Каталитическая активность такой мономерной реконструированной системы наблюдается и остается практически неизменной в диапазоне концентраций калий-фосфатного буфера 50-500 мМ [7]. В настоящее время имеется значительное количество работ, посвященных определению параметров реакции комплексообразования редокс-партнеров в цитохром P450 2B4-содержащей системе, таких как константы скорости образования (k_{on}) и распада комплексов (k_{off}) d-2B4/d-Fp, d-2B4/d-b5, а также константам диссоциации K_D для этих пар [7-12]. Пара d-Fp/d-b5 не образует комплексов [7] и в этой системе формируются тройные комплексы [8]. Используя метод атомно-силовой микроскопии, были визуализированы как бинарные (d-Fp/d-2B4 и d-2B4/d-b5), так и тройные d-Fp/d-2B4/d-b5 комплексы и определены их размеры [13, 14]. Однако, данные о значениях этих констант, полученные в условиях гидроксирования, т.е. собственно ферментативного катализа, отсутствуют. В настоящей работе был проведен оптико-биосенсорный анализ взаимодействий редокс-партнеров в мономерной реконструированной P450 2B4–содержащей системе в условиях гидроксирования (O-деалкилирования 7-пентоксирезорурфина) в 500 мМ калий-фосфатном буфере, содержащем детергент Эмульген 913, когда все три белка d-Fp, d-2B4 и d-b5 были в мономерном состоянии. Было показано отсутствие комплексообразования d-Fp/d-b5 в этих условиях, так же как и в окисленных условиях. Взаимодействие d-Fp/d-2B4 в условиях гидроксирования в 500 мМ КР/Е приводило к формированию комплексов с $k_{on} = (0,013 \pm 0,005) \cdot 10^6 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ и $k_{off} = 0,05 \pm 0,03 \text{ c}^{-1}$ и $K_D = (0,26 \pm 0,13) \cdot 10^6 \text{ M}$. Сравнение этих констант с соответствующими значениями $(0,10 \pm 0,03) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ / $(0,14 \pm 0,06) \text{ c}^{-1}$, $(0,71 \pm 0,37) \cdot 10^6 \text{ M}$, полученными для пар окисленных форм белков показывает снижение значений констант k_{on} и, в существенно меньшей степени k_{off} и K_D при переходе от окисленных к гидрокслирующим условиям. Было обнаружено формирование тройных d-Fp/d-2B4/d-b5 комплексов как в условиях гидроксирования, так и для окисленных форм белков.

МЕТОДИКА.

Реагенты: Эмульген-913 был получен от “Као Atlas” (Япония), 7-пентоксирезорурфин и NADPH от “Sigma” (США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS) и этаноламин - от “Affinity Sensors” (Англия). Остальные реактивы - от “Реахим” (Россия).

Выделение и очистка белков. Изолированные мембранные белки d-2B4, d-Fp и d-b5 были получены как описано в [15-17]. Специфическое содержание d-Fp было 13-13,5 нмоль Fp/мг общего белка, её специфическая активность при 30°C была 40 мкМ цитохрома с в мин на 1 мг белка. Специфическое содержание d-2B4 было 16-18 нмоль на 1 мг общего белка, $A_{418/276}=1,5$. Специфическое содержание

d-b5 было 48-52 нмоль на 1 мг общего белка, $A_{413/276}=1,6$. Белки, по данным SDS-электрофореза, представляли одну полосу. Мономеризацию агрегатов изолированных d-Fp, d-2B4 и d-b5 проводили в 500 мМ калий-фосфатном буфере КР с 0,25 г/л Эмульгеном-913 как описано ранее [7].

Опτικο-биосенсорное определение параметров связывания белков.

Использование оптического биосенсора типа “резонансное зеркало” позволяет напрямую в реальном времени выявлять все комплексы, образующиеся в системе, регистрируя изменение показателя преломления в чувствительном поверхностном слое биочипа биосенсора при комплексообразовании. Принципы работы такого прибора описаны в [18]. Определение параметров связывания редокс-партнеров цитохром Р450 2В4–содержащей системы было выполнено на двухканальном биосенсоре IAsys+ (Affinity Sensors). Биочип к оптическому биосенсору - это двухканальная кювета объёмом 100 мкл и с чувствительной поверхностью 10 мм², рабочий канал которой был модифицирован белком, а контрольный не содержал белка. Модификацию рабочего канала проводили путём поверхностной иммобилизации одного из партнеров на покрытую карбоксиметилдекстраном поверхность рабочего канала биосенсорной кюветы, которую предварительно активировали смесью NHS/EDC, согласно стандартной процедуре, описанной в [19, 20]. Иммобилизацию d-2B4 проводили в 10 мМ КР рН 6,7, d-Fp - в 10 мМ малеатном буфере рН 5,9, d-b5 – в 10 мМ малеатном буфере рН 5,0 в течение 15 мин. Не связавшийся избыток белков удаляли промывкой кюветы буфером PBS/t (10 мМ Na-фосфатный буфер, рН 7.4, 138 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,05% Tween 20). Не прореагировавшие карбоксильные группы карбоксиметилдекстрана были деактивированы 1 М этаноламином, рН 8,5, с последующей промывкой кюветы PBS/t.

Поверхностную концентрацию белка (молекул/мм²) рассчитали по формуле $I = R \cdot 3 \cdot 10^{12} / M_r$, где R – показание оптического биосенсора и M_r - молекулярная масса белка [20]. Поверхностная концентрация иммобилизованных d-2B4, d-Fp и d-b5 в экспериментах с бинарными комплексами составляла $(3,6 \pm 0,5) \cdot 10^{11}$ молекул/мм² (0,06 пмоль/мм²), $(0,5 \pm 0,2) \cdot 10^{11}$ (8,3 фмоль/мм²) и $(2,9 \pm 0,3) \cdot 10^{10}$ молекул/мм² (0,048 пмоль/мм²) соответственно; в экспериментах с тройными комплексами поверхностная концентрация иммобилизованного d-2B4 составляла $(1,8 \pm 0,5) \cdot 10^{11}$ молекул/мм² (0,03 пмоль/мм²). Для учёта вклада неспецифического связывания белков с биосенсорной подложкой использовали контрольный канал биочипа. Контрольный канал (без иммобилизованного белка) был модифицирован по той же процедуре, что и рабочий, за исключением того, что в иммобилизационный буфер белок не добавляли.

Связывание редокс-партнеров с иммобилизованными белками в инкубационной смеси, содержащей 0,5 М КР, рН 7,4, 0,25 г/л Эмульгена-913 (КР/Е), 0,2 мМ NADPH и 5 мкМ 7-пентоксирезорурфина было выполнено путём добавления большого избытка лиганда относительно иммобилизованного белка. Константы скоростей ассоциации и диссоциации определяли, используя программу Fastfit [20] описания экспериментальной кривой экспоненциальным уравнением:

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

где R- отклик прибора, t – время, R_0 – начальный уровень сигнала (R при t=0), C – концентрация лиганда, R_f – уровень сигнала в состоянии равновесия (при t стремящимся к бесконечности) – относительно начального сигнала, k_{on} и k_{off} – константы скоростей ассоциации и диссоциации соответственно.

Для более точного определения констант скоростей диссоциации k_{off} рассчитывали из экспериментальной кривой процесса диссоциации комплекса, который представлялся в виде [20]:

$$R = R_d \exp(-k_{off} t) \quad (2),$$

где R_d – разность сигналов в начале диссоциации и после её завершения. Время жизни комплекса было определено согласно следующему уравнению:

$$\tau = 1/k_{off}$$

Константа диссоциации была вычислена из уравнения

$$K_D = k_{off} / k_{on} \quad (3)$$

Измерение продукта гидроксирования (О-деалкилирования) в биосенсорной кювете. Гидрокслирующие условия в биосенсорных кюветах (биочипах) воспроизводили следующим образом. Были изготовлены 3 биочипа к оптическому биосенсору: с иммобилизованным d-2B4 (d-2B4_{im}), d-Fp_{im} и d-b5_{im}. В каждом из этих биочипов проводили реакцию О-деалкилирования в инкубационной смеси, содержащей 0,5 М КР/Е, 0,2 мМ NADPH, 5 мкМ 7-пентоксирезорурфин и редокс-партнеры. Для О-деалкилирования в d-2B4_{im} биочип в качестве редокс-партнера был добавлен 1 мкМ d-Fp, аналогично в биочип с d-Fp_{im} был добавлен 1 мкМ d-2B4. В случае d-b5_{im} в ячейку добавляли 0,1 мкМ d-Fp и 0,1 мкМ d-2B4. Контроль О-деалкилирования проводили по измерению флуоресценции продукта (резорурфин). Для построения кинетических кривых образования резорурфина реакцию проводили с временами инкубации (0-15 мин.), после чего раствор, содержащий продукт реакции, собрали из кюветы оптического биосенсора и помещали в кювету спектрофлуориметра с последующим анализом содержания резорурфина.

Аналитические измерения.

Измерение спектров поглощения. Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре HP8452A (Hewlett Packard). Концентрацию d-2B4 определяли, исходя из значения коэффициента экстинкции $A_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для разностного спектра восстановленного d-2B4-CO комплекса минус спектр его восстановленной формы [21]. Концентрация d-b5 была определена, используя $A_{424-408} = 165 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для разностного спектра восстановленной дитионитом натрия формы минус его окисленной формы [21]. Концентрацию очищенного d-Fp определяли из абсолютного спектра поглощения, используя коэффициент экстинкции $A_{456} = 21,4 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [22].

Измерение спектров флуоресценции. Эксперименты по измерению флуоресценции были выполнены на спектрофлуориметре LS500B (Perkin Elmer, Англия). Концентрацию резорурфина определили по спектру эмиссии при длине волны 585 нм при длине возбуждения 545 нм [23]. Калибровочную кривую резорурфина была получали основываясь на концентрационной зависимости эмиссии резорурфина.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Важной проблемой, возникающей при использовании оптического биосенсора в исследовании белок-белковых взаимодействий, является сохранение активности белка при его иммобилизации на поверхности кюветы оптического биосенсора. Для того чтобы проверить сохранение каталитической активности белков цитохром P450 2B4-содержащей системы после их иммобилизации, использовался подход, основанный на регистрации образования продукта гидроксирования в цитохром P450 2B4-содержащей системе, реконструированной в биочипах при альтернативной иммобилизации белков-партнеров на подложке биосенсорной кюветы. Ранее мы показали, что цитохром P450 2B4-содержащая система может быть реконструирована из мономерных белков d-2B4, d-Fp и d-b5 в 500 мМ КР/Е в растворе в отсутствие фосфолипидной мембраны [7]. Такая система хорошо моделирует электрон-транспортную цепь этой системы. Выбор 500 мМ КР/Е был продиктован тем, что в этом буфере проходит эффективно реакция гидроксирования и все три белка представляют мономеры; при понижении концентраций КР до 100 и 50 мМ цитохром b5 агрегирует, что не позволяет адекватно моделировать электрон-транспортную цепь цитохром P450 2B4-содержащей системы [7].

Для контроля мы, во-первых, проводили реакцию О-деалкилирования в стандартной спектрофлуориметрической кювете, содержащей 0,5 М КР/Е pH 7,4 включающего 5 мкМ 7-пентоксирезорурфина и 0,2 мМ NADPH; реакцию проводили в двух режимах: (1) режим, когда инкубационная смесь содержала два белка - d-Fp и d-2B4, (2) режим, когда инкубационная смесь содержала

три белка - d-Fp, d-2B4 и d-b5. В обоих случаях после 30-минутной преинкубации белков с 7-пентоксирезорудином реакция инициировалась добавлением NADPH. На рисунке 1А представлены кинетические кривые образования продукта – резорурфина в реакции O-деалкилирования 7-пентоксирезорудина для этих двух условий. Видно, что как в присутствии, так и в отсутствии d-b5 наблюдается лаг-период продолжительностью 4-5 минут от начала реакции, когда реакция протекает очень медленно; после чего скорость реакции возрастает. Следует отметить, что после лаг-периода в реакционной смеси, содержащей d-b5, скорость образования резорурфина выше, чем в отсутствие d-b5, т.е. в мономеризованной Эмульгеном-913 системе цитохром b5 активирует каталитическую реакцию, как было показано ранее [7]. Лаг-период обусловлен, вероятно, тем, что каталитическая реакция O-деалкилирования описывается сложным многостадийным процессом.

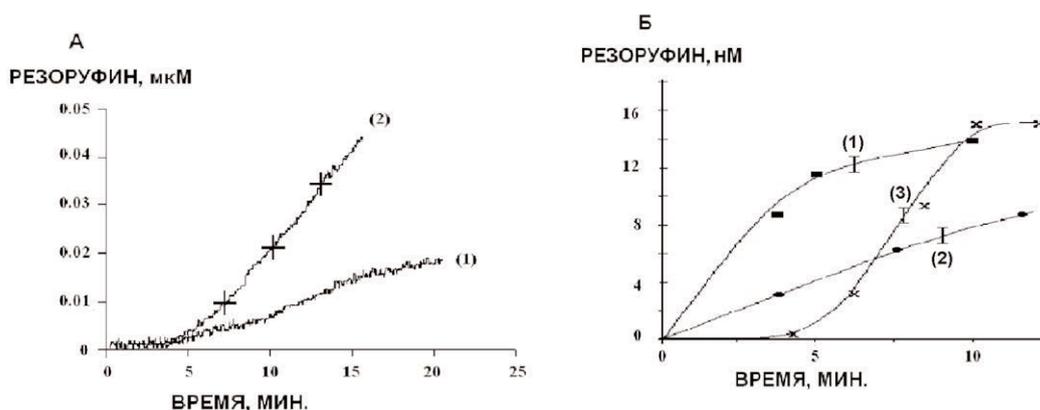


Рисунок 1.

Кинетическая кривая образования резорурфина.

(А). Реакцию проводили в кювете спектрофлуориметра при $t=30^{\circ}\text{C}$. Инкубационная смесь содержала:

(1) (—) 500 мМ КР/Е, 0,2 мкМ d-Fp, 0,1 мкМ d-2B4, 5 мкМ 7-пентоксирезорудина, 200 мкМ NADPH, pH 7,4; (2) (---x---) – 500 мМ КР/Е, 0,2 мкМ d-Fp, 0,1 мкМ d-2B4, 0,15 мкМ d-b5, 5 мкМ 7-пентоксирезорудин, 200 мкМ NADPH, pH 7,4.

(Б). Реакцию проводили в биосенсорной кювете при $t=25^{\circ}\text{C}$. Инкубационная смесь содержала:

500 мМ КР/Е, 5 мкМ 7-пентоксирезорудин, 200 мкМ NADPH, pH 7,4. (1) (---) – в биочип с d-2B4_{im} был добавлен 1 мкМ d-Fp; (2) (---•---) – в биочип с d-Fp_{im} был добавлен 1 мкМ d-2B4; (3) (---x---) – в биочип с d-b5_{im} были добавлены 0,1 мкМ d-Fp и 0,1 мкМ d-2B4.

На рисунке 1Б представлены кривые образования резорурфина в биочипах с иммобилизованными d-2B4 или d-Fp. Добавление d-Fp в кювету с иммобилизованным d-2B4 (кривая 1 рис. 1Б), содержащий 5 мкМ 7-пентоксирезорудин и 0,2 мМ NADPH в 0,5 М КР/Е, pH 7,4, приводит к монотонному возрастанию концентрации резорурфина, которая достигает 14 ± 2 нМ за 10 минут протекания реакции. В этих условиях мы наблюдали протекание реакции O-деалкилирования при иммобилизации d-2B4, при которой имеет место частичная блокировка аминокислотных групп белка за счёт его связывания с карбоксиметилдекстраном. При добавлении d-2B4 в кювету с иммобилизованным d-Fp также наблюдается возрастание концентрации резорурфина до уровня 8 ± 3 нМ за 10 мин. Результаты, полученные в этих экспериментах, показывают, что реакция O-деалкилирования происходит при иммобилизации как d-2B4, так и d-Fp, несмотря на модификацию их аминокислотных групп. Образование резорурфина было также зарегистрировано в присутствии в инкубационной смеси d-Fp и d-2B4 в биочипе с d-b5_{im}. В данном случае кинетическая кривая имела сигмоидную форму, отличную от вида кривых образования резорурфина, полученных в случае d-Fp_{im} и d-2B4_{im}, что, по всей видимости, определяется многостадийностью реакции и ее зависимостью от иммобилизации этих белков на карбоксиметилдекстрановой подложке. Таким

образом, иммобилизация редокс-партнеров цитохром P450 2B4–содержащей монооксигеназной системы не приводит к потере активности белков при иммобилизации, что позволяет реконструировать в кювете оптического биосенсора цитохром P450 2B4–содержащую монооксигеназную систему и проводить изучение кинетики взаимодействий редокс-партнеров в условиях гидроксирования.

Как было показано в нашей ранней работе [7], при альтернативной иммобилизации d-Fp и d-2B4, связывание между окисленными формами этих белков-партнеров происходит независимо от того, какой партнер иммобилизован. В настоящей работе кинетические измерения взаимодействий между этими партнерами были проведены в условиях гидроксирования. На рисунке 2 приведены экспериментальные кривые кинетики связывания d-2B4 с d-Fp для окисленных форм белков и в гидрокслирующих условиях. Видно, что формирование комплексов d-Fp/d-2B4 происходит как в отсутствие субстрата и NADPH, так и в их присутствии. Так как ассоциация и диссоциация белковых комплексов в условиях гидроксирования является сложным процессом, они могут характеризоваться на основе т.н. эффективных констант, вычисляемых в соответствии с уравнениями (1-2); они отражают процесс формирования и распада комплексов в целом. Константы скорости ассоциации и диссоциации для d-Fp/d-2B4 пары в условиях гидроксирования были вычислены в соответствии с уравнениями (1-2). Полученные значения k_{on} и k_{off} не зависели от порядка иммобилизации и составляли соответственно $k_{on} = (0,013 \pm 0,005) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ и $k_{off} = 0,05 \pm 0,02 \text{ c}^{-1}$. Время жизни комплексов (τ) составило $20 \pm 8 \text{ c}$. Вычисленная константа равновесия K_D равнялась $(0,26 \pm 0,13) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Сравнение этих констант с соответствующими величинами для окисленных форм белков ($k_{on} = (0,10 \pm 0,03) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, $k_{off} = (0,14 \pm 0,06) \text{ c}^{-1}$, $\tau = 7 \pm 3 \text{ c}$ и $K_D = (0,71 \pm 0,37) \cdot 10^6 \text{ M}$) показывает, что в условиях гидроксирования k_{on} снижается более чем в 7 раз, k_{off} почти в 3 раза, а τ соответственно возрастает. Константы k_{on} имеют порядок $10^4 - 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, что указывает на существование термодинамического барьера на стадии образования комплекса d-Fp/d-2B4. K_D для d-Fp/d-2B4 комплексов, формирующихся в условиях гидроксирования и окисленных, различаются незначительно с учетом их погрешностей.

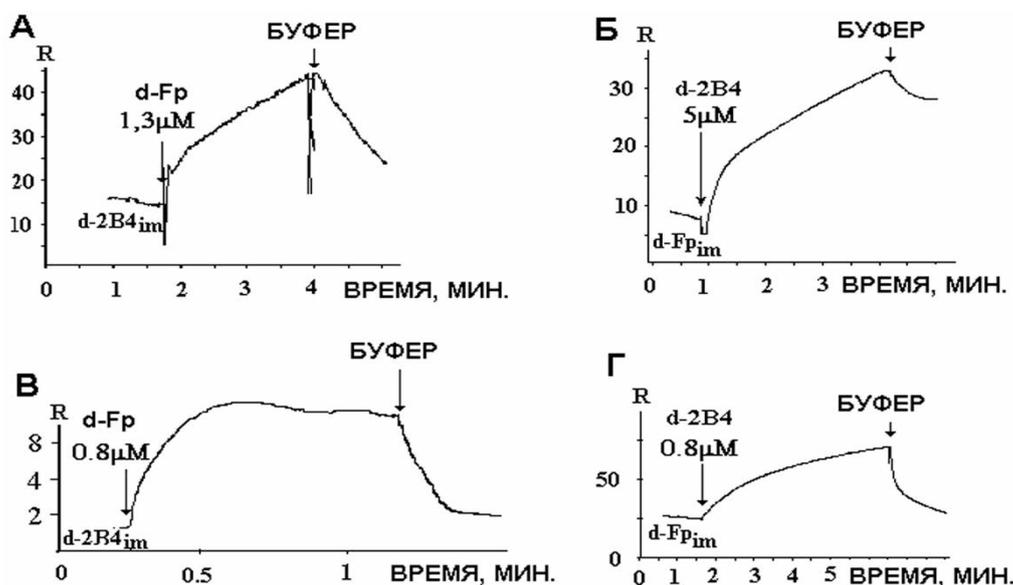


Рисунок 2.

Формирование комплексов d-2B4 с d-Fp в условиях гидроксирования (А, Б) и в окисленных формах белков (В,Г). Инкубационная смесь содержала: (А, Б) 500 мМ КР/Е, 5 мкМ 7-пентоксирезорурфин, 200 мкМ NADPH, pH 7,4; (В, Г) 500 мМ КР/Е, 5 мкМ 7-пентоксирезорурфин, pH 7,4, $t=25^\circ\text{C}$. Стрелки обозначают момент добавления d-2B4 или d-Fp и соответствующего буфера.

В случае с парой d-Fp/d-b5, формирование комплексов не было зарегистрировано в условиях гидроксирования, независимо от того, какой партнёр был иммобилизован (рис. 3). Принимая во внимание, что между этими белками наблюдается перенос электрона с константой $0,4 \text{ с}^{-1}$, очевидно, что он реализуется за счёт случайных столкновений [7].

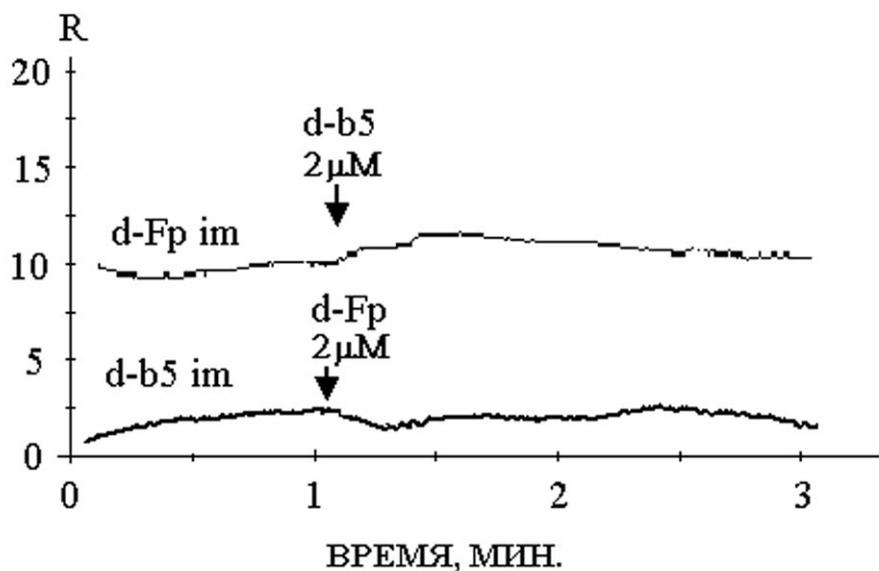
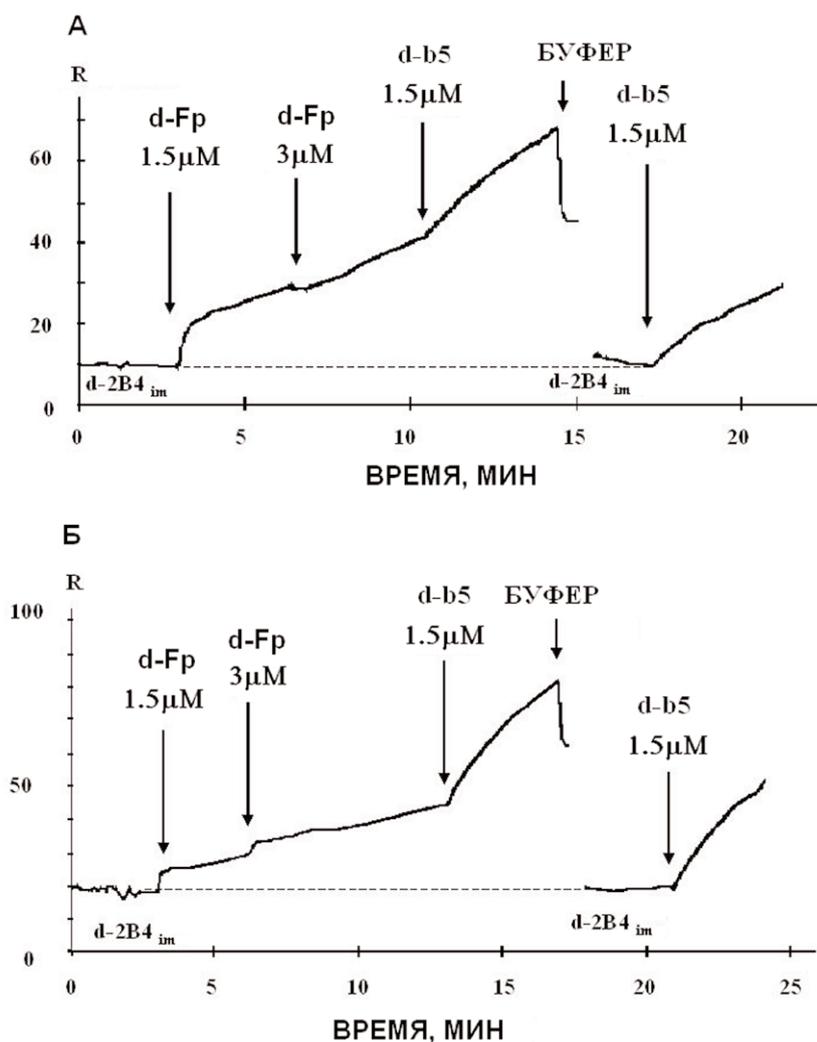


Рисунок 3.

Отсутствие комплексообразования d-Fp с d-b5 в гидроксировующих условиях. Инкубационная смесь содержала 500 мМ КР/Е, 5 мкМ 7-пентоксирезорурфин, 200 мкМ NADPH, pH 7,4, $t=25^\circ\text{C}$. Стрелки обозначают момент добавления d-b5 или d-Fp и буфер.

Ранее мы сообщали о формировании тройных d-2B4/d-Fp/d-b5 комплексов, когда все белки находились в окисленном состоянии; d-2B4 был иммобилизован на подложку оптического биосенсора, в то время как остальные два белка-партнёра одновременно добавляли в кювету [7, 8]. В представленной работе мы также регистрировали взаимодействия между тремя редокс-партнёрами в условиях гидроксирования. Для этого d-2B4 был иммобилизован и затем в биочип оптического биосенсора, содержащий 0,5 М КР/Е (pH 7,4) с 0,2 мМ NADPH, 5 мкМ 7-пентоксирезорурфин, добавляли два других партнёра (рис. 4). Вначале d-Fp (1,5 мкМ) добавляли в ячейку с d-2B4_{im} (рис. 4А) и было зарегистрировано формирование комплекса d-2B4/d-Fp. Добавление следующего количества d-Fp до конечной концентрации 3 мкМ не изменяло характер кривой связывания, показывая, что 1,5 мкМ концентрация d-Fp близка к насыщающей. Затем в кювету добавляли d-b5 (1,5 мкМ) в присутствии d-Fp (3 мкМ). Было зарегистрировано возрастание сигнала, т.е. увеличение числа формирующихся комплексов, что может быть объяснено формированием тройных комплексов d-Fp/d-2B4/d-b5. Для контроля мы регистрировали связывание d-b5 с d-2B4_{im} в отсутствие d-Fp. Из значения k_{off} для тройных комплексов, которое составило $0,2 \pm 0,1 \text{ с}^{-1}$, можно вычислить время жизни этих комплексов, которое составило $5 \pm 2 \text{ с}$. Для сравнения подобная схема связывания d-b5 с d-2B4_{im} на фоне насыщающих концентраций d-Fp в окисленных условиях представлена на рисунке 4Б. В этих условиях формирование тройных комплексов также было зарегистрировано с $k_{off} = 0,3 \pm 0,1 \text{ с}^{-1}$, что соответствует времени жизни комплексов $3 \pm 1 \text{ с}$.


Рисунок 4.

Связывание d-b5 с d-2B4_{im} в присутствии d-Fp в условиях гидроксилирования (А) и для окисленных форм белков (Б). Инкубационная смесь содержала: (А) 500 мМ КР/Е, 5 мкМ 7-пентоксирезорурфин, 200 мкМ NADPH, pH 7,4, t=25°C; (Б) 500 мМ КР/Е, 5 мкМ 7-пентоксирезорурфин, pH 7,4, t=25°C. Стрелки обозначают момент добавления d-Fp, d-b5 и соответствующего буфера.

Таким образом, формирование тройных комплексов наблюдается как для окисленных форм белков, так и в условиях гидроксилирования и время жизни этих комплексов в этих условиях практически совпадает. Сравнение k_{off} тройных комплексов (3 с) со временем цикла N-деметилирования бензфетамина в реакционной смеси из всех трех белков (7 с, [7]) показывает, что около половины тройных комплексов могут являться продуктивными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Продемонстрировано формирование комплексов d-Fp/d-2B4 в условиях гидроксилирования (в присутствии NADPH и субстрата 7-пентоксирезорурфина). Были выявлены различия в кинетике взаимодействия этих белков при их окисленном состоянии и в гидроксилирующих условиях, но константы равновесия для этих процессов различаются совсем незначительно. Было зарегистрировано формирование тройных комплексов d-Fp/d-2B4/d-b5 с одинаковым временем жизни как для окисленных форм белков, так и в гидроксилирующих условиях.

Мы выражаем благодарность к.б.н. Г.П. Кузнецовой и к.б.н. Н.Ф. Саменковой за выделение и очистку белков, используемых в работе.

Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ 05-04-48690, 06-04-08057-офи, ФАНИ ГК № 02.512.11.2176, программы “ПРОТЕОМИКА В МЕДИЦИНЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor&Francis, London, New York, Philadelphia.
2. Gotoh O. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 83-90
3. Imai Y. (1981) J. Biochem., **89**, 351-362.
4. Mayuzumi H., Shimizu T., Sambongi C., Hiroya K., Hatano M. (1994) Arch. Biochem. Biophys., **310**, 367-372.
5. Gruenke L.D., Konopka K., Cadieu M., Waskell L. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 24707-24718.
6. Kanaeva I.P., Dedinskii I.R., Skotselyas E.D., Krainev A.G., Guleva I.V., Sevryukova I.F., Koen Y.M., Kuznetsova G.P., Bachmanova G.I., Archakov A.I. (1992) Arch. Biochem. Biophys., **298**, 395-402.
7. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Y., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P., Archakov A.I. (1999) Arch. Biochem. Biophys., **362**, 87-93.
8. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Archakov A.I. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., **273**, 750-752.
9. Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Karuzina I.I., Usanov S.A., Hui Bon Hoa G., Sligar S.G., Archakov A.I. (2001) J. Inorg. Biochem., **87**, 175-184.
10. Voznesensky A.I., Schenkman J.B. (1992) J. Biol. Chem., **267**, 14669-14676.
11. Schenkman J.B., Voznesensky A.I., Jansson I. (1994) Arch. Biochem. Biophys., **314**, 234-241.
12. Davydov D.R., Knyushko T.V., Kanaeva I.P., Koen Y.M., Samenkova N.F., Archakov A.I., Hui Bon Hoa G. (1996) Biochimie, **78**, 734-843.
13. Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Y., Archakov A.I. (1999) Arch. Biochem. Biophys., **371**, 1-7.
14. Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Archakov A.I. (2004) Proteomics, **4**, 2390-2396.
15. Karuzina I.I., Zgoda V.G., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I. (1999) Free Rad. Biol. Med., **26**, 620-632.
16. Канаева И.П., Скоцеляс Е.Д., Кузнецова Г.П., Антонова Г.Н., Бачманова Г.И. (1985) Биохимия, **50**, 1382-1388.
17. Spatz L., Strittmatter P. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 1042-1046.
18. Yeung D., Gill A., C.H. Maule, R.J. Davies (1995) Trends in Anal. Chem., **14**, 49-56.
19. Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., Johnsson B., Karlsson R., Lundh K., Lofas S., Persson B., Roos H., Ronnberg I. (1991) BioTechniques, **11**, 620-627.
20. Way S., Hill B. (1996) Methods Guide for IAsys plus and IAsys Auto+. Affinity Sensors. Human-Computer Interface Limited, Cambridge, England.
21. Omura T., Sato R. (1964) J. Biol.Chem., **239**, 2370-2385.
22. French J.S., Coon M.G. (1979) Arch. Biochem. Biophys., **195**, 565-577.
23. Burke M.D., Mayer R.T. (1983) Chem. Biol. Interact., **45**, 243-258.

Поступила: 30. 10. 2007.

THE OPTICAL BIOSENSOR STUDY OF THE REDOX PARTNERS INTERACTIONS WITHIN THE CYTOCHROME P450 2B4 – CONTAINING MONOOXYGENASE SYSTEM IN HYDROXYLATION CONDITIONS

Yu.D. Ivanov, A.V. Ivanov, N.A. Petushkova, O.G. Gara, V.Yu. Kuznetsov, A.V. Podoplelov, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya Street, 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (7)(495)2463761; fax: (7)(495) 2450857; e-mail: Yurii.Ivanov@ibmc.msk.ru

Interactions between cytochrome P450 2B4, NADPH:cytochrome P450 reductase and cytochrome *b5* have been investigated in the presence of a substrate (7-pentoxoresorufin) and an electron donor, NADPH, in the monomeric reconstituted P450 2B4–contained monooxygenase system. Each partner was immobilized via its amino groups on the carboxymethyl dextran biochip surface of an optical biosensor IAsys+. It was shown that, despite immobilization of any of the partners (via their respective amino groups) onto the carboxymethyl dextran surface of the IAsys+ optical biosensor, its activity didn't loss. The formation of binary d-Fp/d-2B4 complexes was registered. The association/dissociation rate constants (k_{on} / k_{off}) were $(0,013 \pm 0,005) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} / 0,05 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$, equilibrium dissociation constant (K_D) was $(0,26 \pm 0,13) \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Comparison of k_{on} , k_{off} and K_D for d-Fp/d-2B4 complexes in oxidation conditions with corresponding constants for the oxidized protein forms - $(0,10 \pm 0,03) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1} / (0,14 \pm 0,06) \text{ s}^{-1}$, $(0,71 \pm 0,37) \cdot 10^{-6} \text{ M}$ – shows that the decrease in k_{on} and K_D occurs due to the increase in lifetime during transition from oxidized to hydroxylation conditions. Complex formation between d-Fp and d-b5 was not registered in oxidation and hydroxylation conditions. The ternary d-Fp/d-2B4/d-b5 complexes formation was shown in hydroxylation and oxidation conditions.

Key words: cytochrome P450 2B4, cytochrome *b5*, NADPH:cytochrome P450 reductase, optical biosensor, protein-protein interactions.