

УДК: 577.152.3

©Коллектив авторов

ПРОДУКТИВНЫЕ И НЕПРОДУКТИВНЫЕ КОМПЛЕКСЫ В ЦИТОХРОМ P450-СОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМАХ

Ю.Д. Иванов^{1}, А.В. Иванов¹, А.Л. Кайшева¹, В.Г. Згода¹, С.А. Усанов²,
Уа Г. Уи Бон³, А.И. Арчаков¹*

¹Институт Биомедицинской химии РАМН, ул. Погодинская, 10, Москва, Россия; тел.: +7 495 2463761; факс: +7 495 2450857; эл. почта: Yuri.Ivanov@ibmc.msk.ru

²Институт Биоорганической химии, Минск, Беларусь

³French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), Lyon, France

Измерены равновесные константы диссоциации K_D , кинетические константы скоростей образования (k_{on}), распада (k_{off}) и времена жизни (τ_{IT}) комплексов редокс-партнеров трёх цитохром P450 - содержащих монооксигеназных систем (P450cam, P450scc и P450 2B4) в условиях гидроксирования. Для определения продуктивности комплексов исследуемых систем введен параметр (Q) – как отношение времени жизни комплексов белков-партнеров (τ_{IT}) ко времени полного цикла гидроксирования ($\tau_{turnover}$). Показано, что при переходе от окисления к гидроксированию параметр Q изменяется несущественно. Времена жизни (τ_{IT}) бинарных комплексов белков-партнёров, относящихся к цитохром P450cam и P450scc – содержащим системам, где обязательно требуется промежуточный электрон-транспортный белок между редуктазой и цитохромом P450, не позволяют реализовать реакции гидроксирования субстратов с известными $\tau_{turnover}$, т.е. такие комплексы являются непродуктивными, в то время как бинарные комплексы в мембранной P450 2B4-системе, не требующей такого промежуточного электронно-транспортного белка, являются продуктивными.

Зарегистрировано образование тройных комплексов редокс-партнеров во всех рассматриваемых системах. Анализ значений Q позволил определить, что тройные комплексы, формирующиеся в цитохром P450cam- и P450scc-содержащих системах, являются продуктивными. В случае цитохром P450 2B4 - содержащей системы больше половины (около 60%) образующихся в ней тройных комплексов также являются продуктивными.

Ключевые слова: цитохром P450 2B4, цитохром P450scc, цитохром P450cam, оптический биосенсор.

ВВЕДЕНИЕ. Как известно, ферментативные системы условно можно разделить на два класса: (А) однокомпонентные системы, для функционирования которых не требуется участия других белков-партнеров (например, лизоцим [1], эстераза [2], трипсин [3] и т.д.), и (В) более сложные системы на основе нескольких белков, в которых продукт нарабатывается в активном центре фермента только при обязательном его взаимодействии с белками-партнерами. Ко второму классу ферментативных систем относятся цитохром P450-содержащие монооксигеназные системы [4], система гликолиза [5], система окисления жирных кислот [6] и т.д. Интерес к изучению цитохром P450-содержащих монооксигеназных систем обусловлен их участием в метаболизме широкого класса эндогенных и экзогенных субстратов: камфоры (P450cam), холестерина (P450scc), токсинов, лекарств (P450 2B4) [4]. Анализируемые в данной работе ферментные системы являются представителями трех типов цитохром P450-содержащих монооксигеназных систем [4]. Белки цитохром P450cam-содержащей системы являются водорастворимыми, цитохром P450 2B4-содержащей системы - мембранными (встроенными в фосфолипидную мембрану с помощью гидрофобного фрагмента).

* - адресат для переписки

И, наконец, цитохром P450_{scc}–содержащая система относится к смешанной системе, в которой два белка-партнера являются водорастворимыми, а сам P450_{scc} – мембраносвязанным белком. В процессе функционирования этих систем происходит окисление субстрата в активном центре цитохромов P450 при последовательном переносе на него двух электронов от редуктазы, причём перенос электронов на активный центр P450_{cam} и P450_{scc} систем осуществляется соответственно с путидаредоксинредуктазы (PdR) при участии промежуточного белка путидаредоксина (Pd), и с адренодоксин редуктазы (AdR) через промежуточный белок - адренодоксин (Ad). В случае цитохрома P450 2B4 (d-2B4), возможно 2 варианта переноса на него двух электронов: а) непосредственно с NADPH-цитохром P450-редуктазы (d-Fp) к активному центру d-2B4 и б) перенос одного электрона с NADPH цитохром P450 редуктазы, а второго электрона - с цитохрома b_5 (d-b₅) [4].

Механизм межбелкового переноса электрона может реализовываться разными способами. В ряде случаев формируются долгоживущие комплексы редокс-партнеров, например, в случае цитохром P450 2B4 формируются двойные комплексы d-2B4/ d-Fp и d-2B4/ d-b₅ для переноса электрона между этими белками, в других случаях перенос электронов происходит при случайных столкновениях партнеров, например, между партнерами d-Fp/ -b₅ [7, 8]. Очевидно, что исследование механизма функционирования многобелковых ферментативных систем представляет сложную задачу, которая включает в себя определение структуры белков и комплексов белков-партнеров, а также параметров реакций комплексообразования: константы скорости образования (k_{on}) и распада комплексов (k_{off}), константы диссоциации и другие параметры.

В настоящее время появились новые технологии на основе атомно-силовой микроскопии, позволяющие определять структуру отдельных белков и их комплексов в условиях близких к нативным. Эти технологии позволили визуализировать изолированные молекулы белков, их комплексы с редокс-партнерами из цитохром P450-монооксигеназных систем [9-11]. Что касается констант, описывающих комплексообразования белков цитохром P450-содержащих систем, то раньше для этого использовались константы диссоциации (K_D) [12]. Измерение других важных параметров, определяющих кинетику образования и распада комплексов - k_{on} и k_{off} - представляло сложную задачу. В настоящее время появилась технология измерения k_{off} , k_{on} методом оптического биосенсора. Данная технология подробно описана и широко используется в исследовании белок-белковых взаимодействий [13-44]. Это очень важно, так как знание значений k_{off} позволяет вычислить время жизни комплексов $\tau_{IT} = (k_{off})^{-1}$ и провести сравнение этого времени со временем полного цикла реакции гидроксирования $\tau_{turnover}$ для определения такого параметра как продуктивность комплексов. Продуктивными являются комплексы, в течение времени жизни которых нарабатывается продукт реакции, непродуктивные – те комплексы, время жизни которых не достаточно для одного монооксигеназного цикла. Такой сравнительный анализ необходим для создания модели, адекватно описывающей функционирование цитохром P450-содержащей системы

В литературе обсуждается влияние степени окисления редокс-партнеров, которое происходит циклично в процессе функционирования цитохром P450-содержащих систем, на константы их комплексообразования [45]. Так, например, предполагается, что Pd в восстановленном состоянии связывается с окисленной формой P450_{cam}, по меньшей мере, в 100 раз прочнее, чем Pd в окисленном состоянии [45]. Это означает, что для выяснения продуктивности комплексов редокс-партнеров в P450-содержащих системах необходимо знание констант k_{on} , k_{off} и K_D , характеризующих реакции комплексообразования белков-партнеров не только в окисленных формах, но и в условиях гидроксирования. Ранее нами были измерены константы комплексообразования (k_{on} , k_{off} и K_D) для окисленных форм редокс-партнеров, относящихся к цитохром

P450cam-, P450scc- и P450 2B4 - содержащим системам [7, 14, 17]. Данная работа посвящена измерению соответствующих констант с помощью оптического биосенсора и сравнительному анализу времен жизни комплексов редокс-партнеров (τ_{IT}) со временами каталитических циклов ($\tau_{turnover}$) для изучаемых в данной работе систем, находящихся в условиях гидроксирования, что позволило выявить продуктивность комплексов редокс-партнеров в этих системах.

В настоящей работе показано, что времена жизни (τ_{IT}) бинарных комплексов белков-партнёров, относящихся к цитохром P450cam и P450scc-содержащим системам, где обязательно требуется промежуточный электрон-транспортный белок между редуктазой и цитохромом P450, не позволяют реализовать реакции гидроксирования субстратов с известными $\tau_{turnover}$, т.е. являются непродуктивными, в то время как бинарные комплексы в мембранной P450 2B4-системе, не требующей такого промежуточного электронно-транспортного белка, являются продуктивными. Было зарегистрировано образование тройных комплексов редокс-партнеров во всех рассматриваемых системах. Анализ значений Q позволил определить, что тройные комплексы, формирующиеся в цитохром P450cam- и P450scc- содержащих системах, являются продуктивными. В случае цитохром P4502B4 - содержащей системы больше половины (около 60%) образующихся в ней тройных комплексов также являются продуктивными.

МЕТОДИКА.

Химические реактивы.

В работе использованы следующие реактивы “Affinity sensors” (Великобритания): 0,4 М раствор 1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимида (EDC), 0,1 М раствор N-гидроксисукцинимид (NHS) и 1 М раствор этаноламина. Эмульген 913 был получен от “Као Atlas” (Япония), Твин-20 - от “Ferak” (Германия). Остальные химические реактивы были производства “Реахим” (Россия).

Приготовление белков.

P450cam, Pd и PdR экспрессированы в *Escherichia coli*, штамм ТВ, выделены и очищены до гомогенного состояния, как описано ранее [46, 47]. Цитохром P450scc, аденодоксин и аденодоксин-редуктаза выделены из митохондрий надпочечников быка [38, 39]. Мембранные полноразмерные белки d-2B4, d-Fp и d-b₅ выделены из микросом печени кролика, как описано ранее [50, 52]. Удельное содержание d-Fp составляло 13-13,5 нмоль Fp на 1 мг белка, а его удельная активность при 30°C – 40 мкмоль цитохрома с в 1 минуту на 1 мг белка. Удельное содержание d-2B4 составляло 16-18 нмоль на 1 мг белка, $A_{418/276} = 1,5$. В работе использован препарат b₅ с удельным содержанием 48-50 нмоль на 1 мг белка и $A_{413/276} = 1,6$. Диссоциацию агрегатов Fp, b₅ и 2B4 до мономеров проводили в 500 мМ калий-фосфатном буфере, содержащем 0,25 г/л Эмульгена 913 (КР/Е буфер) по схеме, описанной ранее [7].

Определение кинетических и равновесных констант белок-белковых взаимодействий с помощью оптического биосенсора.

Эксперименты проводили на двухканальном оптическом биосенсоре “резонансное зеркало” IAsys+ “Affinity Sensor”. Устройство оптического биосенсора и принципы его работы подробно описаны [53]. В этом методе один из редокс-партнеров ковалентно иммобилизуется на поверхности карбоксиметилдекстрановой кюветы, образуя биочип, а второй партнер добавляется в этот же биочип для регистрации комплексообразования партнеров. Метод основан на мониторинге в реальном времени увеличения коэффициента преломления чувствительного поверхностного слоя при формировании комплексов редокс-партнеров. Модификацию рабочего канала биочипа проводили по процедуре, аналогичной [54, 55], путём иммобилизации одного из партнеров на карбоксиметилдекстрановую поверхность, которую предварительно активировали раствором, содержащим 0,05 М NHS и 0,2 М EDC. Иммобилизация белков проводилась посредством их инкубации в биочипе в 10 мМ ацетатом буфере течение 15 минут при pH от 4,0 до 6,0, кроме экспериментов по иммобилизации при pH 7,0, в которых использовали К-фосфатный буфер (КР). Значения pH в

КОМПЛЕКСЫ В ЦИТОХРОМ P450-СОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМАХ

кювете были: 6,6, 5,3 и 6,1 для PdR, Pd и P450cam, соответственно; значения pH для AdR, Ad и P450scc составили: 7,2, 5,9 и 7,2, соответственно; для d-2B4, d-Fp, d-b5 составили: 7,0, 6,1, 5,0, соответственно. Наши исследования показали, что в экспериментальных условиях значений pH цитохром с-редуктазная активность PdR, AdR, d-b5, а также спектры поглощения P450s, Pd, Ad и d-b5 оставались неизменными, т.е. нативная структура данных белков сохранялась. Несвязавшийся избыток белков удаляли промывкой кюветы буфером PBS/t (10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,4, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,05% Твин-20). Не прореагировавшие карбоксильные группы карбоксиметилдекстрана дезактивировали 1 M этаноламином (pH 8,5) с последующей промывкой кюветы PBS/t.

Поверхностные концентрации белков (молекул/мм²) рассчитывали по формуле $= R \cdot 3 \cdot 10^{12} / M_r$ [26], где R – показание оптического биосенсора и M_r – молекулярный вес белка. Для P450cam, Pd и PdR они составили: соответственно $(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{11}$, $(5,5 \pm 0,5) \cdot 10^{10}$ и $(3,4 \pm 0,3) \cdot 10^{10}$ молекул/мм²; для P450scc, Ad и AdR: $(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{11}$, $(4,2 \pm 0,4) \cdot 10^{10}$ и $(7,2 \pm 0,7) \cdot 10^{10}$ молекул/мм²; для d-2B4, t-2B4, d-Fp, t-Fp, d-b5 и t-b5: $(5,4 \pm 0,5) \cdot 10^{10}$, $(3,6 \pm 0,4) \cdot 10^{10}$, $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^{10}$, $(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{10}$, $(25 \pm 3) \cdot 10^{10}$ и $(6,0 \pm 0,6) \cdot 10^{10}$ молекул/мм².

Чтобы выяснить роль положительно заряженных групп редокс-партнеров в комплексообразовании, каждый из партнеров был альтернативно иммобилизован через аминокислотные группы на карбоксиметилдекстрановую поверхность кюветы оптического биосенсора.

Для учёта вклада неспецифического связывания белков с биосенсорной подложкой использовался второй – контрольный канал биосенсорной кюветы. Контрольный канал (без иммобилизованного белка) биочипа был модифицирован по той же процедуре, что и рабочий, за исключением того, что в иммобилизационный буфер белок не добавлялся.

Связывание редокс-партнеров с иммобилизованными белками в инкубационной среде наблюдали при добавлении лиганда при разных концентрациях в биочип с иммобилизованным белком.

Регистрация связывания редокс-партнеров цитохром P450 2B4 системы с помощью оптического биосенсора.

Состав инкубационной смеси для окисленных форм белков (ОБ). Регистрацию связывания окисленных форм редокс-партнеров цитохром P450 2B4 системы проводили в инкубационной смеси, содержащей 0,5 M KP, pH 7,4, 0,25 г/л Эмульгена-913 (KP/E) и 5 мкМ 7-пентоксирезорурфина.

Состав инкубационной смеси для исследования связанных белков при условиях гидроксирования (УГ). Регистрацию связывания редокс-партнеров цитохром P450 2B4 системы в гидрокслирующих условиях проводили в инкубационной смеси, содержащей 0,5 M KP, pH 7,4, 0,25 г/л Эмульгена-913 (KP/E), 0,2 mM NADPH и 5 мкМ 7-пентоксирезорурфина.

Регистрация связывания редокс-партнеров цитохром P450cam системы с помощью оптического биосенсора

Состав инкубационной смеси для ОБ. Регистрацию комплексообразования между окисленными формами белков – партнеров цитохром P450cam – содержащей системы проводили в инкубационном буфере, содержащий 50 mM трис-HCl, 0,2 mM KCl, 0,4 mM камфоры, pH 7,4.

Состав инкубационной смеси для исследования связанных белков при УГ. Регистрация связывания иммобилизованных белков с их редокс-партнерами для пар Pd/PdR и PdR/P450cam в гидрокслирующих условиях проводилась в инкубационной смеси, содержащей 50 mM трис-HCl, 0,2 mM KCl, 4 mM камфоры и 0,25 mM NADH, pH 7,4.

Регистрация связывания Pd/P450cam в условиях гидроксирования была проведена по следующей процедуре. Мы принимали во внимание то, что Pd может восстанавливаться с помощью NADH только через промежуточный белок PdR, а не напрямую [4]. Поэтому, в Pd_{imm}-биочипе (биочип на базе иммобилизованного Pd)

Pd вначале восстанавливали в анаэробных условиях с помощью PdR, а затем PdR удаляли из биочипа и заменяли на P450cam для наблюдения реакции комплексообразования Pd/P450cam. Процедура, проводимая в анаэробных условиях, включала 2 шага: (1 шаг) инкубационный раствор, содержащий PdR в 50 mM трис-HCl, 0,2 mM KCl, 0,4 mM камфоры и 0,25 mM NADH, pH 7,4, продувался азотом в течение 4 мин, после чего его вносили в Pd_{im} – биочип для восстановления Pd_{im}. Затем раствор в биочипе заменяли на буферный раствор 50 mM трис-HCl, 0,2 mM KCl, 0,4 mM камфоры и 0,25 mM NADH, pH 7,4, не содержащий PdR. Это вызывало диссоциацию Pd/PdR комплексов. Для полной диссоциации этих комплексов, Pd_{im} биочип инкубировали в регенерационном буфере 50 mM трис-HCl, pH 7,4, содержащем 1 M NaCl и 0,15% холат натрия (который продували азотом в течение 4 мин); (2 шаг) в Pd_{im} - биочип добавляли P450cam в 50 mM трис-HCl, 0,2 mM KCl, 0,4 mM камфоры и 0,25 mM NADH, pH 7,4 (смесь предварительно была продута азотом в течение 4 мин) и проводили регистрацию Pd/P450cam комплексов.

Регистрация связывания редокс-партнеров цитохром P450scс-системы с помощью оптического биосенсора.

Состав инкубационной смеси для ОБ. Регистрацию бинарных комплексов белков – партнеров цитохром P450scс–содержащей системы в их окисленных формах проводили в 50 mM КР буфере, содержащем 10 мкМ холестерина, pH 7,4.

Состав инкубационной смеси для исследования связанных белков при УГ. Регистрацию связывания иммобилизованных белков с их редокс-партнерами для пар Ad/AdR и AdR/P450scс в гидроксилирующих условиях проводили в 50 mM КР буфере, содержащем 10 мкМ холестерина, 5 mM NADPH, pH 7,4.

Регистрацию тройных комплексов AdR_{im}/P450scс/Ad в условиях гидроксирования проводили в 50 mM КР с 150 mM KCl, 5 mM NADPH и 10 мкМ холестерином, pH 7,4.

Регистрацию Ad/P450scс комплексов в условиях гидроксирования проводили по схеме, аналогичной описанной выше для Pd/P450cam, с разницей в том, что использовался 50 mM КР буфер, содержащий 10 мкМ холестерин, 5 mM NADPH, pH 7,4, а в качестве восстановителя железосерного белка использовали AdR (вместо PdR).

Ad, как и Pd, может восстанавливаться с помощью NADPH только через промежуточный белок AdR, но не напрямую [4]. Для этого в Ad_{im}-биочипе (биочип на основе иммобилизованного Ad) Ad вначале восстанавливали в анаэробных условиях с помощью AdR, а затем раствор AdR удаляли из биочипа и заменяли на раствор P450scс для наблюдения реакции комплексообразования Ad/P450scс. Данная процедура, проводимая в анаэробных условиях, включала 2 шага: (1 шаг) инкубационный раствор AdR в 50 mM КР буфере, содержащий 10 мкМ холестерин, 5 mM NADPH, pH 7,4, продували азотом в течение 4 мин, после чего добавляли этот раствор в Ad_{im} – биочип для восстановления Ad_{im}. Затем раствор в биочипе заменяли на буферный раствор 50 mM КР буфер, содержащий 10 мкМ холестерин, 5 mM NADPH, pH 7,4, не содержащий AdR. Это вызывало диссоциацию Ad/AdR комплексов. Для полной диссоциации этих комплексов, Ad_{im}-биочип инкубировали в регенерационном буфере 50 mM КР, pH 7,4, содержащем 1 M NaCl и 0,15% холат натрия (который продували азотом в течение 4 мин); (2 шаг) в Ad_{im}-биочип добавляли раствор P450scс в 50 mM КР буфере, содержащий 10 мкМ холестерина, 5 mM NADPH, pH 7,4 (смесь предварительно продували азотом в течение 4 мин) и проводили регистрацию образования комплексов Ad/P450scс.

Расчет кинетических и равновесных констант комплексообразования редокс-партнеров цитохром P450-содержащих монооксигеназных систем.

Константы скоростей ассоциации и диссоциации определяли с помощью программы Fastfit [27], которая описывает экспериментальную кривую экспоненциальным уравнением:

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

где R – отклик прибора, t – время, R_0 – начальный уровень сигнала (R при $t=0$), C – концентрация лигата, R_f – уровень сигнала в состоянии равновесия (при $t=\infty$) – 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 [23]:

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

где R_d – разность сигналов в начале диссоциации и после её завершения.

Время жизни комплекса было определено согласно уравнению:

$$\tau_{1T} = 1/k_{off}$$

Константы диссоциации были вычислены из уравнения:

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

Аналитические измерения.

Определение концентрации белков.

Концентрацию P450_{cam} (окисленной субстрат-связанной формы) определяли спектрофотометрическим методом, используя коэффициент экстинкции $102 \text{ mM}_{-1} \cdot \text{см}_{-1}$ при 391 нм [56]. Концентрацию PdR и Pd определяли спектрофотометрическим методом, используя коэффициенты экстинкции $10 \text{ mM}_{-1} \cdot \text{см}_{-1}$ при 454 нм и $10,4 \text{ mM}_{-1} \cdot \text{см}_{-1}$ при 455 нм, соответственно [18]. Концентрацию P450_{scc}, AdR и Ad вычисляли, как описано ранее [57, 58]. Концентрации 2B4, b₅ определяли методом Omura и Sato [57]. Концентрацию очищенного Gr вычисляли из спектра поглощения, коэффициент экстинкции белка $A_{456} = 21,4 \text{ mM}_{-1} \cdot \text{см}_{-1}$ [59].

Измерение концентрации резорруфина, как продукта окисления 7-пентоксирезорруфина в биосенсорном биочипе.

Измерение концентрации резорруфина, образованного в кювете оптического биосенсора, проводили с использованием флуоресцентного анализа. Эксперименты по измерению флуоресценции были выполнены на спектрофлуориметре LS500B (Perkin Elmer, Великобритания). Концентрация резорруфина была определена по спектру его флуоресценции на длине волны 585 нм при длине волны возбуждения 545 нм [26]. Калибровочная кривая резорруфина была получена на основе концентрационной зависимости флуоресценции резорруфина.

Измерение концентрации гидроксикамфоры и прегненолона, как продуктов окисления камфоры и холестерина, в биосенсорном биочипе.

Концентрации гидроксикамфоры и прегненолона, образованных в процессе окисления камфоры и холестерина в биочипе для оптического биосенсора, определяли с помощью масс-спектрометрии электроспрейного типа ионизации (ESI-MS). Для этого мы вводили в анализируемую смесь внутренний калибратор. В качестве последнего для гидроксикамфоры был выбран бетаин с молекулярной массой 117,2, для прегненолона – гексаметоксифосфазен с молекулярной массой 321. Выбранные нами калибраторы близки по молекулярной массе к исследуемым продуктам монооксигеназных систем, кроме того, они обладают низкой реакционной способностью и химически не взаимодействуют с гидроксикамфорой, прегненолоном и их производными. После чего определяли корреляционную зависимость концентрации гидроксикамфоры и прегненолона в модельных растворах к отношению интенсивностей сигналов гидроксикамфоры и прегненолона к соответствующему калибратору. Далее к экстрагированной смеси – гидроксикамфоры и прегненолона – добавляли внутренний калибратор с постоянной концентрацией в 150 нМ, сравнимой с концентрациями гидроксикамфоры и прегненолона, образующимися в оптическом биочипе и рассчитывали концентрации продуктов монооксигеназных систем исходя из нормированного значения по калибратору интенсивности сигнала соответствующего продукта.

Экстракцию гидроксикамфоры и прегненолона проводили по схеме, описанной в [60]. Для этого отбирали 2 мкл раствора из инкубационной смеси биосенсорного биочипа, рН отобранной смеси доводили до 3,0 и добавляли в неё

20 мкл гексана. Затем данный раствор центрифугировали при 10000 g в течение 10 минут и отбирали верхнюю фракцию, содержащую камфору и ее производные, либо холестерол с прегненолоном. Отобранный раствор выпаривали с помощью вакуумного испарителя Speedvac ("Eppendorf", Германия) при комнатной температуре, после чего к высушенным пробам добавляли 20 мкл смеси ацетонитрил/вода (1:9 v/v), содержащей 0,1% муравьиной кислоты и снова тщательно перемешивали, затем центрифугировали в течение 1 минуты при 3000 g. Полученный таким образом раствор использовали для дальнейшего масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрический анализ (ESI-MS) проб.

ESI-MS идентификацию гидроксикамфоры и прегненолона проводили на масс-спектрометре Agilent 1100 серии LC-MSD Trap SL с off-line нано-электроспрейным источником ("Agilent", Германия). Ввод образцов в масс-спектрометр осуществляли с помощью капилляров с металлическим напылением ("Protana", Дания). Регистрировали спектр положительных ионов в диапазоне $m/z \sim 100-400$, скорость сканирования составляла 1650 Th/c. В качестве осушающего газа использовали азот со скоростью потока 6 л/мин и температурой 250°C. ESI масс-спектр снимали при напряжении на капилляре $U=1200$ В.

Для получения характерных спектров камфоры и гидроксикамфоры, а также холестерина и прегненолона нами были сняты "референтные" спектры вышеперечисленных очищенных веществ в инкубационной смеси, содержащей 50% ацетонитрил в 0,1% муравьиной кислоте. Были получены спектры как MS ($m/z = 152,9$ – для камфоры и $m/z = 168,9$ – для гидроксикамфоры; $m/z = 387,1$ – для холестерина и $m/z = 317,1$ – для прегненолона), так и MS/MS ($m/z = 134,9, 108,9$ и $94,9$ – для камфоры и $m/z = 150,9$ и $108,9$ – для гидроксикамфоры; $m/z = 317,5$ и $299,5$ – для холестерина и $m/z = 281,1, 255,0$ и $299,0$ – для прегненолона). В анализе MS/MS (CID) в качестве MS/MS ионов гидроксикамфоры рассматривали - $m/z = 150,9$ и $108,9$, для прегненолона - $m/z = 281,1, 255,0$ и $299,0$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Определение монооксигеназной активности белков, иммобилизованных на поверхности оптико-биосенсорных биочипов.

Важной проблемой в исследовании белок-белковых взаимодействий с помощью оптического биосенсора является сохранение активности белка при его иммобилизации на поверхности кюветы. Поэтому исследования кинетических характеристик комплексов белков-партнеров в P450cam, P450scс и P4502B4 системах проводили после проверки сохранения активности этих белков при иммобилизации.

Проверка активности иммобилизованных белков из P450 2B4-содержащей системы.

Активность цитохром P4502B4-системы после иммобилизации на подложке биосенсорной кюветы одного из ее белков-партнеров оценивали по образованию продукта (резорифина) в реакции О-дезалкилирования 7-пентоксирезорифина.

Ранее мы показали, что мембранная цитохром P4502B4-система может быть реконструирована в отсутствие фосфолипида из мономеризованных белков d-Fp, d-b₅ и d-2B4 в 500 мМ в КР буфере, содержащем детергент 0,25 г/л Эмульген 913 [7]. Выбор 500 мМ КР/Е продиктован тем, что в этом буфере, белки, входящие в состав цитохром P4502B4-системы, являются мономерами, и реакция гидроксирования проходит эффективно [7]. При пониженных концентрациях КР 100 и 50 мМ цитохром b₅ агрегирует [7].

Для контроля функционирования реконструированной в растворе мономеризованной P4502B4-системы вначале была проведена реакция О-дезалкилирования 7-пентоксирезорифина в стандартной спектрофлуориметрической кювете, содержащей 7-пентоксирезорифин (5 мкМ) и NADPH (200 мкМ) в 500 мМ КР/Е (рН 7.4) в следующих условиях:

- (1) в растворе этой кюветы присутствовали два белка - d-2B4 and d-Fp;
- (2) в растворе присутствовали три белка - d-2B4, d-Fp и d-b₅.

КОМПЛЕКСЫ В ЦИТОХРОМ P450-СОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМАХ

На рисунке 1А представлены кинетические кривые образования продукта реакции О-дезалкилирования резорифина в этих условиях. Как видно, в обоих случаях наблюдается лаг-период в течение 4-5 минут, когда скорость реакции очень медленная; после чего реакция ускоряется. В то же время, в реакционной смеси, содержащей d-b₅, наблюдается повышенная скорость наработки резорифина по сравнению со смесью, не содержащей d-b₅.

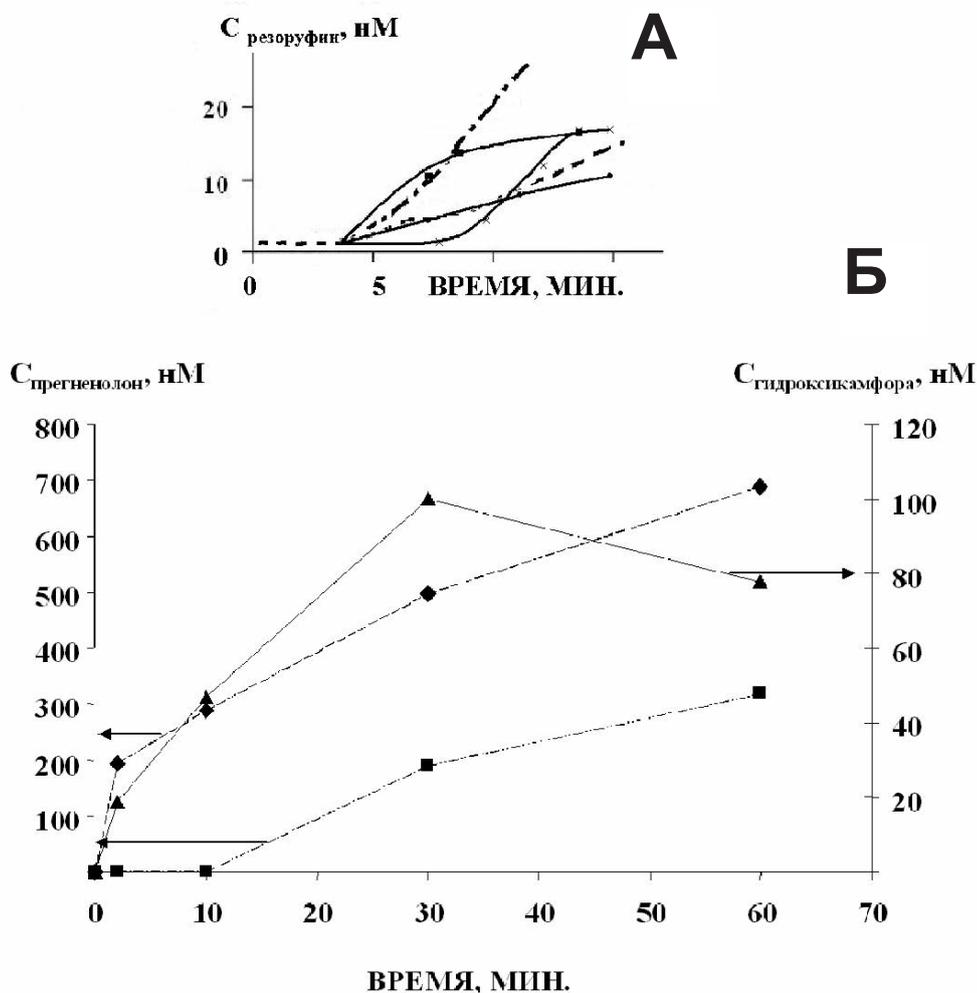


Рисунок 1.

- Кинетические кривые образования резорифина (А), камфоры и прегненолона (Б).
- (А). Реакция проводилась в флуориметрической кювете. $t = 25^\circ\text{C}$. Инкубационная смесь содержала (1) (—) 500 мМ КР/Е, 0,2 мкМ d-Fp, 0,1 мкМ d-2В4, 5 мкМ 7-пентоксирезорифин, 200 мкМ NADPH, pH 7,4; (2) (---) - 500 мМ КР/Е, 0,2 мкМ d-Fp, 0,1 мкМ d-2В4, 0,15 мкМ d-b₅, 5 мкМ 7-пентоксирезорифин, 200 мкМ NADPH, pH 7,4. Реакция проводилась в кювете оптического биосенсора IAsys⁺. $t = 25^\circ\text{C}$. Инкубационная смесь содержала 500 мМ КР/Е, 5 мкМ 7-пентоксирезорифин, 200 мкМ NADPH, pH 7,4, $t = 25^\circ\text{C}$. (—●—) - в биочип с d-Fp_{im} был добавлен 1 мкМ d-2В4; (—■—) - в биочип с d-2В4_{im} был добавлен 1 мкМ d-Fp; (—x—) - в биочип с d-b₅_{im} были добавлены 0,1 мкМ d-Fp и 0,1 мкМ d-2В4.
- (Б) ▲ - реакция образования гидроксикамфоры в P450cam_{im}-биочипе. Реакция проводилась в кювете оптического биосенсора IAsys⁺. $t = 25^\circ\text{C}$. Инкубационная смесь содержала: 1,2 мкМ PdR, 6 мкМ P450cam в 50 мМ трис-НСl, 0,2 мМ КCl, 0,4 мМ камфору, 0,25 мМ NADH, pH 7,4.
- ◆ - реакция образования прегненолона в Ad_{im}-биочипе; реакция проводилась в кювете оптического биосенсора IAsys⁺. $t = 25^\circ\text{C}$. Инкубационная смесь содержала 4 мкМ AdR и 4 мкМ P450scs в 50 мМ КР, содержащем холестерин (10 мкМ) и NADPH (5 мМ), pH 7,4.
- - реакция образования прегненолона в AdR_{im}-биочипе. Реакция проводилась в кювете оптического биосенсора IAsys⁺. $t = 25^\circ\text{C}$. Инкубационная смесь включала 0,5 мкМ P450scs и 5 мкМ Ad в 50 мМ КР, содержащем 100 мМ КCl, холестерин (10 мкМ) и NADPH (5 мМ), pH 7,4.

Далее были проведены эксперименты по определению образования резорруфина в кювете оптического биосенсора с иммобилизованными d-2B4, d-Fp и d-b₅. На рисунке 1А приведены кривые образования резорруфина в биочипах к оптическому биосенсору IAsys⁺ с иммобилизованными d-2B4 и d-Fp. Добавление d-Fp (1,0 мкМ) в биочип с иммобилизованным d-2B4 и инкубация его в 500 мМ КР/Е, содержащем 7-пентоксирезорруфин (5 мкМ) и NADPH (200 мкМ) – вызывает монотонное увеличение концентрации резорруфина в течение 10 минут протекания реакции (8±2 нМ за 10 мин). Другими словами, мы наблюдали протекание реакции О-дезалкилирования при иммобилизации d-2B4, при которой имеет место частичная блокировка его аминогрупп. При добавлении d-2B4 в биочип с иммобилизованным d-Fp наблюдается возрастание концентрации резорруфина примерно до такого же уровня (14±3 нМ за 10 минут) за то же время. Данные результаты показывают, что реакция О-дезалкилирования происходит при иммобилизации как d-2B4, так и d-Fp, несмотря на модификацию их аминогрупп. Образование резорруфина наблюдалось также с иммобилизованным d-b₅ на поверхности биочипа в присутствии d-Fp и d-2B4, однако её кинетическая кривая имела сигмоидальный характер, отличный от вида кривых образования резорруфина, полученных в d-Fp_{im}- и d-2B4_{im}-биочипах. Сигмоидальный характер кривой, по всей видимости, определяется многостадийностью реакции гидроксирования 7-пентоксирезорруфина.

Проверка активности Pd, иммобилизованного на поверхности биочипа к оптическому биосенсору.

Как было показано ранее с помощью одноканального оптического биосенсора IAsys⁺, для окисленных форм белков Pd, PdR и P450cam возможно образование комплексов Pd/PdR и Pd/P450cam только при иммобилизации Pd через его аминогруппы. При альтернативной иммобилизации PdR или P450cam комплексы с Pd данные белки не образуют [17]. Это означает, что аминогруппы PdR и P450cam необходимы для образования Pd/PdR и Pd/P450cam комплексов. Так как связывание редокс-партнеров наблюдалось только в Pd-биочипе, то мы провели проверку активности иммобилизованного Pd на поверхности биочипа, в котором реконструировалась цитохром P450cam-содержащая система.

Для проверки активности Pd_{im} проводили регистрацию образования гидроксикамфоры в Pd_{im} биочипе оптического биосенсора как функции от времени в 50 мМ трис-HCl буфере, pH 7,4, содержащем 0,2 М KCl, 0,4 мМ камфоры, 0,25 мМ NADH, 1,2 мкМ PdR, 6 мкМ P450cam. Измерение временной зависимости образования гидроксикамфоры в Pd-биочипе проводили в реакционной смеси в интервале 2-60 мин, с последующим измерением концентрации гидроксикамфоры с помощью масс-спектрометрии, согласно процедуре, описанной в разделе “Методика”.

На рисунке 1Б приведены временные зависимости образования гидроксикамфоры в Pd_{im}-биочипе MS (m/z = 168,9), с соответствующей идентификацией гидроксикамфоры по MS/MS спектру (m/z = 150,9 и 108,9). Видно, что концентрация гидроксикамфоры в биочипе нарастает в процессе инкубации (60 минут) и достигает 100 нМ. Это указывает на то, что Pd сохраняет свои ферментативные свойства при его иммобилизации на поверхность оптического биочипа.

Проверка активности Ad и AdR, иммобилизованных на поверхности биочипов к оптическому биосенсору.

Для P450scc-системы в случае иммобилизации Ad регистрировали формирование специфических бинарных Ad/AdR и Ad/P450scc комплексов [14, 48]. При альтернативной иммобилизации AdR или P450scc взаимодействие с Ad не приводило к образованию соответствующих комплексов. Также было обнаружено формирование тройных комплексов AdR_{im}/P450scc/Ad при иммобилизованном AdR [14]. Поэтому в данной работе мы проанализировали активность иммобилизованного Ad в биочипе, где регистрировали образование бинарных комплексов и иммобилизованного AdR в биочипе, в котором регистрировали образование тройных комплексов.

Для проверки активности иммобилизованного Ad проводили реакцию расщепления боковой цепи холестерина с образованием прегненолона в реконструированной цитохром P450_{scc}-содержащей системе на основе Ad_{im}-биочипа. Инкубационная смесь содержала: 50 mM KР, рН 7,4, холестерин (10 мкМ), NADPH (5 mM), AdR (4 мкМ) и P450_{scc} (4 мкМ).

Для регистрации образования прегненолона в AdR_{im} биочипе реакцию расщепления боковой цепи холестерина проводили в 50 mM KР, рН 7,4, содержащим 100 mM KCl, холестерин (10 мкМ) и NADPH (5 mM), P450_{scc} (0,5 мкМ) и Ad (5 мкМ). Реакционную смесь в Ad_{im}- и AdR_{im}-биочипах инкубировали в течение 2-60 мин, с дальнейшим количественным определением прегненолона с помощью масс-спектрометрии.

Временные зависимости образования прегненолона (рис. 1Б) показывают, что концентрация прегненолона нарастает в биочипе до 700 нМ за 60 мин в Ad_{im}-биочипе и до 330 нМ в AdR_{im}-биочипе.

Таким образом, показано протекание реакций гидроксирования при участии белков P450-содержащих систем при их иммобилизации на карбоксиметилдекстрановую поверхность оптико-биосенсорных чипов, что позволяет проводить измерение параметров связывания белков-партнеров в этих системах.

Образование бинарных комплексов в цитохром P450-содержащих системах.

Образование бинарных комплексов в цитохром P450 2B4-содержащей системе.

В этой системе, содержащей мономеризованные мембранные белки, было зарегистрировано образование комплексов между d-Fp и d-2B4 при альтернативной иммобилизации каждого из этих белков, как в их окисленных формах, так и в условиях гидроксирования. На рисунке 2 приведены экспериментальные кривые кинетики связывания d-2B4 с d-Fp в условиях гидроксирования (рис. 2, А, Б), а также для окисленных форм d-2B4 и d-Fp (рис. 2, В,Г). Видно, что формирование комплексов d-Fp/d-2B4 происходит во всех перечисленных случаях. Поскольку ассоциация и диссоциация белковых комплексов в условиях гидроксирования является сложным процессом, их характеризовали эффективными константами, вычисленными в соответствии с уравнениями (1-2). Измеренные k_{on} и k_{off} не зависели от порядка иммобилизации партнеров и составляли в условиях гидроксирования (HYD): $k_{on} = (1,3 \pm 0,5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ и $k_{off} = 0,05 \pm 0,02 \text{ c}^{-1}$, а $K_D = (0,26 \pm 0,13) \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. Время жизни комплексов составляло $\tau_{IT} = 20 \pm 8$ секунд (таблица 1). Константы для окисленных форм белков (OX) составили: $k_{on} = (0,10 \pm 0,03) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, $k_{off} = (0,14 \pm 0,06) \text{ c}^{-1}$ и $K_D = (0,71 \pm 0,37) \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. Время жизни комплексов составляло $\tau_{IT} = 7 \pm 3$ с. Таким образом, k_{on} в условиях гидроксирования несколько ниже по сравнению со значением, характерным для окисленных условий, при этом времена жизни комплексов практически не меняются. Отношение времени жизни комплексов (7-20 с) ко времени каталитического цикла N-деметилирования бензфетамина $\tau_{turnover} = 11 \pm 2$ с [17], показывает, что за время жизни комплекса может произойти количество каталитических циклов гидроксирования равное $Q = \tau_{IT} / \tau_{turnover} = (7-20) / 11 = 0,6-1,8$. То есть время жизни комплекса d-Fp/d-2B4 достаточно для реализации полного цикла N-деметилирования субстрата. Это означает что бинарные d-Fp/d-2B4 комплексы продуктивные (см. табл. 2).

Мы показали, что окисленные формы d-Fp и d-b₅ белков не образуют комплексы в случае иммобилизации как d-Fp, так и d-b₅. Такие же результаты были получены в условиях гидроксирования (данные не приведены). В то же время наблюдается межбелковый перенос электронов между d-Fp и d-b₅ с константой скорости $k = 0,4 \pm 0,1 \text{ c}^{-1}$ [7]. Это означает, что межбелковый перенос электронов для этой пары происходит при случайных столкновениях этих партнеров.

Таблица 1. K_D , k_{on} , k_{off} , и времена жизни комплексов редокс-партнеров цитохром P4502B4-, P450cam- и P450scc- содержащих монооксигеназных систем.

Комплексы	$k_{on} \cdot 10^4, (M \cdot c)^{-1}$	$k_{off} \cdot 10^3, c^{-1}$	$K_D \cdot 10^4, M$	τ, c
$Pd_{im}/PdR (hyd)$	0,45±0,5	14±3	3,4±1,7	70±15
$Pd_{im}/PdR (ox)$	0,35±0,2	3,9±1,0	1,1±0,9	256±66
$PdR_{im}/Pd (hyd, ox)$	-	-		
$Pd_{im}/P450cam (hyd)$	0,2±0,1	30±15	15±15	33±15
$Pd_{im}/P450cam (ox)$	0,54±0,4	60±30	11±14	17±9
$P450cam_{im}/Pd (hyd, ox)$	-	-		
$P450cam_{im}/PdR (hyd)$	0,72±0,12	1,4±0,2	1,9±0,6	700±100
$P450cam_{im}/PdR (ox)$	0,014±0,002	40±10	2,9±1,1	25±6
$PdR_{im}/P450cam (hyd, ox)$	-	-		
Тройные комплексы $PdR/Pd_{im}/P450cam$ (hyd, ox)		500±200		2±1
Адониновые комплексы				
$Ad_{im}/AdR (hyd)$	0,18±0,04	2,0±0,7	1,2±0,6	500±175
$Ad_{im}/AdR (ox)$	0,06±0,02	3,5±1,5	6±4	286±123
$AdR_{im}/Ad (hyd, ox)$	-	-	-	
$Ad_{im}/P450scc (hyd)$	0,7±0,3	8,0±2,0	1,1±0,8	125±30
$Ad_{im}/P450scc (ox)$	5±0,5	1,1±0,1	0,022± 0,004	900±80
$P450scc_{im}/Ad (ox)$	-	-	-	
$AdR_{im}/P450scc (hyd)$	2,2±0,4	10±2	0,5±0,2	100±20
$AdR_{im}/P450scc (ox)$	3,5±0,7	11±2	0,3±0,15	90±16
$P450scc_{im}/AdR (hyd)$	0,3±0,1	40±10	13±8	25±6
$P450scc_{im}/AdR (ox)$	0,3±0,1	25±5	8±4	40±8
Тройные комплексы $AdR/Ad/P450scc$ (hyd, ox)		40±20		25±13
Д-ферритиновые комплексы				
$d-Fp/d-2B4 (hyd)$	1,3±0,5	50±20	0,26±0,13	20±8
$d-Fp/d-2B4 (ox)$	10±3	140±60	0,71±0,37	7±3
$d-Fp/d-b5$	-	-		
Тройные комплексы $d-Fp/d-b5/d-2B4 (hyd)$		200±80		5±2
$d-Fp/d-b5/d-2B4 (ox)$		333±111		3±1

КОМПЛЕКСЫ В ЦИТОХРОМ P450-СОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМАХ

Таблица 2. Взаимосвязь между временем жизни бинарного или тройного комплексов (τ_T) и $\tau_{turnover}$ в P450 cam, P450scc и P4502B4-содержащих системах.

Комплексы	Время жизни комплекса, τ_T (с)	$\tau_{turnover} = 1/k_{cat}$ (с)	Число каталитических циклов за время τ_T	Продуктивность комплекса
Pd/PdR	70-256	0,03	2333-8533	Непродуктивен
Pd/P450cam	17-33		566-1100	Непродуктивен
PdR/Pd/P450cam	2±1		~70	Продуктивен
Ad/AdR	286-500	25	11-20	Непродуктивен
Ad/P450scc	125-900		5-36	Непродуктивен
AdR/Ad/P450scc	25±3		~1 (100%)	Продуктивен
dFp/d-2B4	7-20	11	~1 (100%)	Продуктивен
d-Fp/2B4/d-b5	3-5		~0,6 (60%)	Продуктивен

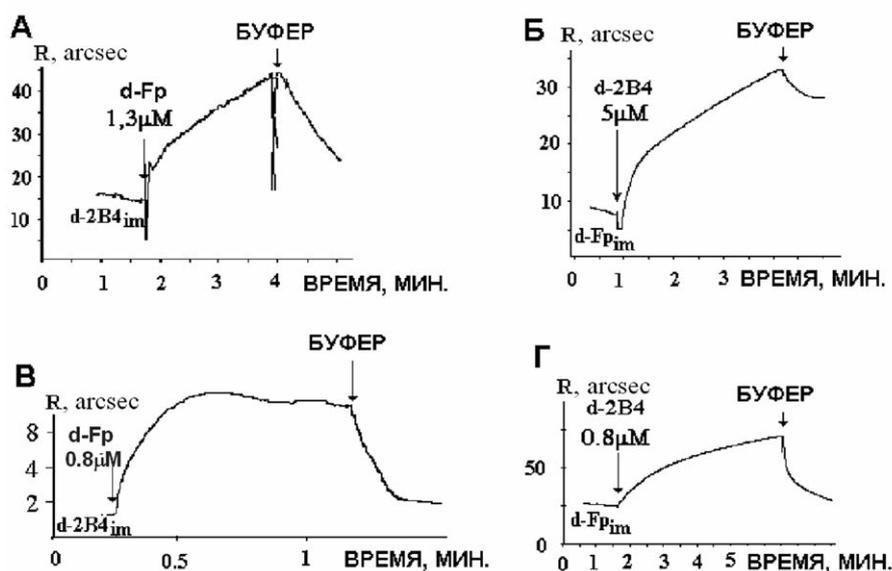


Рисунок 2.

Формирование комплексов d-2B4/d-Fp в условиях гидроксирования (А, Б) и между окисленными формами 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°C. Стрелки обозначают момент добавления редокс-партнеров и соответствующего буфера.

Образование тройных комплексов в цитохром P450 2B4-содержащей системе.

Известно, что для окисления субстрата цитохром P450 2B4-содержащей системой достаточно взаимодействия всего двух её белков - d-Fp и d-2B4 [51]. Ранее было показано, что присутствие третьего белка d-b₅ в этой системе может повышать скорость N-деметилирования бензфетамина [7]. Также ранее нами было показано, что окисленные формы белков d-Fp, d-2B4 и d-b₅ формируют тройные комплексы [7]. В настоящей работе мы обнаружили формирование тройных комплексов не только между окисленными формами белков, но и в условиях гидроксирования. Схема эксперимента, проведённого в условиях гидроксирования, представлена на рисунке 3. Вначале регистрировали формирование бинарных комплексов d-Fp/d-2B4 в биочипе с иммобилизованным d-2B4 при добавлении d-Fp (1,5 мкМ). Добавление следующей порции d-Fp до концентрации 3 мкМ не изменяло паттерн кривой связывания, что указывало на близость концентрации d-Fp (1,5 мкМ) к насыщению. Следующее добавление d-b₅ (1,5 мкМ) в биочип в присутствии насыщающей концентрации d-Fp (3 мкМ) приводило к увеличению сигнала, что может объясняться образованием тройных комплексов d-Fp/d-2B4/d-b₅. Для контроля мы регистрировали формирование комплексов d-b₅ с d-2B4_{im} в отсутствие d-Fp. Тройные комплексы характеризовались $\tau_{IT} = 5 \pm 2 \text{ с}^{-1}$. Время жизни тройных комплексов окисленных форм белков характеризовалось сходной величиной $\tau_{IT} = 3 \pm 1 \text{ с}^{-1}$. Согласно работе [7], время цикла N-деметилирования бензфетамина в реакционной смеси из трёх белков (d-Fp+d-2B4+d-b₅) в 50 мМ КР/Е составляет $\tau_{turnover} = 7 \pm 1 \text{ с}$. Отношение $Q = \tau_{IT} / \tau_{turnover} = (3-5)/7 = 0,4 - 0,7$. Это означает, что время жизни 6 тройных комплексов из 10 образовавшихся достаточно для протекания в них полного цикла гидроксирования. То есть, отношение $\tau_{IT} / \tau_{turnover} \sim 0,6$ указывает на то, что около 60% тройных комплексов является продуктивным (это отражено в табл. 2).

Образование бинарных комплексов в P450cam системе.

Как известно, между Pd и PdR, а также Pd и P450cam наблюдается межбелковый перенос электронов [4]. В нашей работе было зарегистрировано образование бинарных комплексов как между окисленными формами Pd/P450cam и Pd/PdR, так и в условиях гидроксирования при иммобилизации Pd (рис. 4). При иммобилизации P450cam или PdR комплексообразования с Pd не наблюдалось (рис. 4). Зависимость комплексообразования от того, какой из партнёров иммобилизован указывает на то, что положительно заряженные аминогруппы P450cam и PdR необходимы для комплексообразования этих белков с Pd, что согласуется с данными [17]. В таблице 1 представлены данные для реакций комплексообразования этих пар, рассчитанные из кинетических кривых k_{on} , k_{off} и K_D как для окисленных форм белков, так и в условиях гидроксирования. Сравнение этих констант показывает незначительное отличие их величин (менее одного порядка) при переходе от окисленных форм белков к условиям гидроксирования. Времена жизни комплексов Pd/PdR составляют $\tau_{IT} = 70 \pm 15 \text{ с}$ для условий гидроксирования (HYD), и $\tau_{IT} = 256 \pm 66 \text{ с}$ для их окисленных форм (OX), а времена жизни комплексов Pd/P450cam $\tau_{IT} = 33 \pm 15 \text{ с}$ (HYD) и $\tau_{IT} = 17 \pm 9 \text{ с}$ (OX). Принимая во внимание, что $\tau_{turnover} = 0,03 \text{ с}$ [61], можно рассчитать значение $Q = (70-256)/0,03 = 2333-8533$ для Pd/PdR комплексов. Для Pd/P450cam комплексов $Q = (33-17)/0,03 = 1100-566$ (см. табл. 2). Таким образом, время жизни каждого бинарного Pd/PdR или Pd/P450cam комплекса на два-три порядка превышает время каталитического цикла. Как известно, для реализации полного цикла гидроксирования необходима передача последовательно двух электронов с PdR на Pd и с Pd на P450cam. Если, механизм последовательного образования и распада соответствующих бинарных комплексов справедлив [62], то каждый бинарный комплекс должен по два раза образовываться и диссоциировать. В отличие от P4502B4-содержащей системы, где для реализации цикла гидроксирования достаточно двух белков (d-2B4 и d-Fp), в P450cam-содержащей системе требуется 3 белка. Поэтому продуктивность бинарных комплексов в P450cam-содержащей системе рассчитывается по-другому, чем в случае P4502B4-содержащей системы с использованием значения не Q, а обратного

КОМПЛЕКСЫ В ЦИТОХРОМ P450-СОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМАХ

значения ($1/Q$). Если предположить, что схема гидроксирования реализуется по шаттл-механизму [63], то продуктивность бинарных комплексов составляет:

$$1/2Q = (\tau_{\text{turnover}}/2\tau_{IT} \text{Pd/PdR}) = (2,1-0,5) \times 10^{-4} \text{ и}$$

$$(\tau_{\text{turnover}}/2\tau_{IT} \text{Pd/P450sam}) = (4,5-8,8) \times 10^{-4}$$

Множитель 2 в знаменателе отношения $\tau_{\text{turnover}}/2\tau_{IT} \text{Pd/PdR}$ указывает на то, что бинарный комплекс должен два раза образоваться и диссоциировать, чтобы реализовался шаттл-механизм.

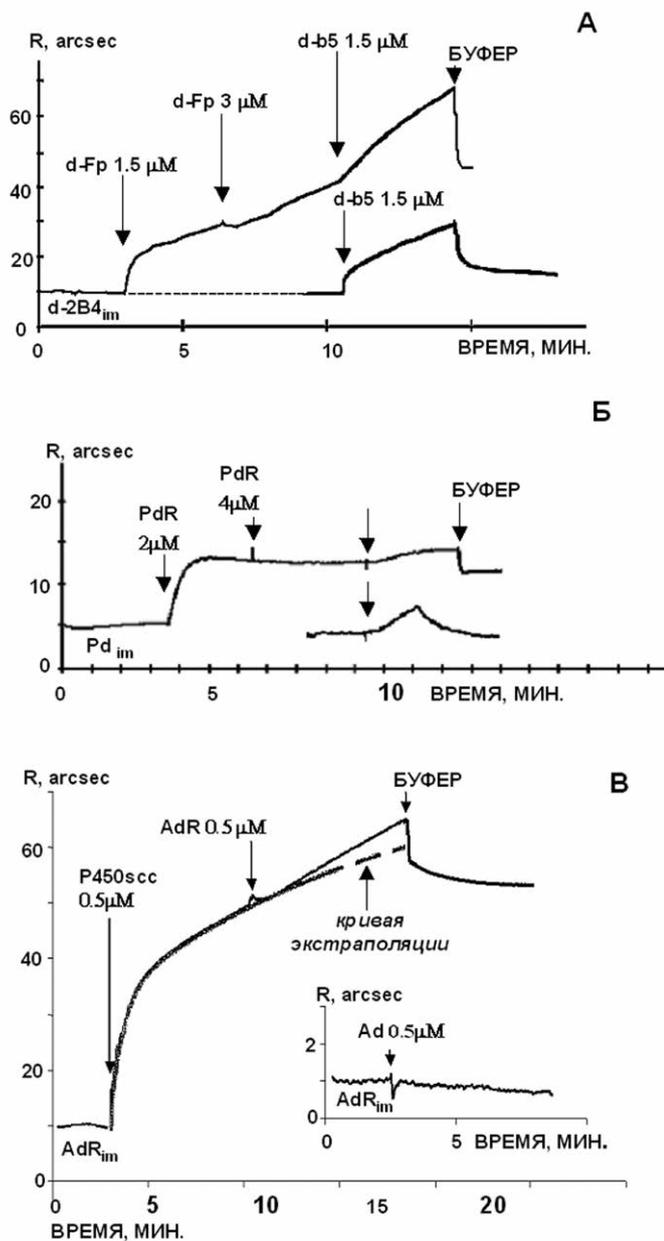


Рисунок 3.

Регистрация тройных комплексов в цитохром P450_{2B4}-, P450_{sam}- и P450_{scc}-содержащих системах в условиях гидроксирования. $t = 25^\circ\text{C}$. (А) Связывание d-b5 с d-2B4_{im} в присутствии d-Fp в условиях гидроксирования. Инкубационная смесь содержала: 500 мМ КР/Е, 5 мкМ 7-пентоксирезорурфин, 200 мкМ NADPH, pH 7,4; (Б) Связывание P450_{sam} с Pd_{im} в присутствии PdR в условиях гидроксирования. Инкубационная смесь содержала: 50 мМ трис-HCl, 0,2 мМ KCl, 0,4 мМ камфоры, 0,25 мМ NADH, pH 7,4; (В) Связывание Ad с AdR_{im} в присутствии P450_{scc} в условиях гидроксирования. Инкубационная смесь содержала: 50 мМ КР с 150 мМ KCl, 5 мМ NADPH и 10 мкМ холестерина, pH 7,4.

Стрелки обозначают момент добавления редокс-партнеров и соответствующего буфера.

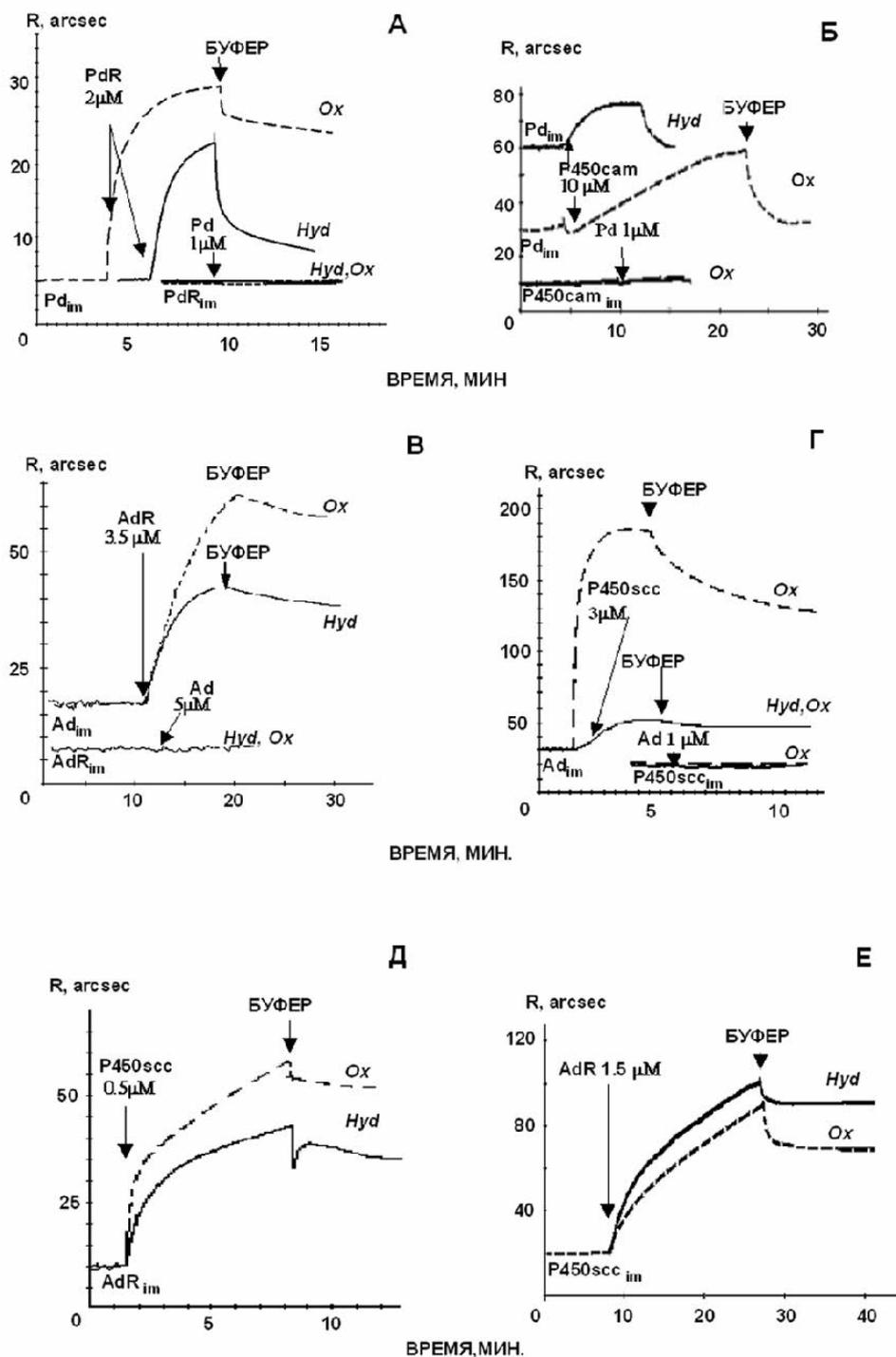


Рисунок 4.

Образование бинарных комплексов между редокс-партнерами цитохром P450cam- и P450scc-содержащих систем в условиях гидроксирования (HYD) и в окисленных формах белков (Ox).

(А) - Pd/PdR, (Б) - Pd/P450cam, (В) - Ad/AdR, (Г) - Ad/P450scc (Д) - AdR_{im}/P450scc, (Е) - P450scc_{im}/AdR. $t=25^{\circ}\text{C}$. Инкубационная смесь содержала: (А-Б) 50 мМ Tris-HCl, 0,2 М KCl, 0,4 мМ камфоры, 0,25 мМ NADH, pH 7,4 (HYD) и 50 мМ трис-HCl, 0,2 мМ KCl, 4 мМ камфоры, pH 7,4 (Ox); (В-Е) 50 мМ КР, 5 мМ NADPH и 10 мкМ холестерина, pH 7,4 (HYD) и 50 мМ КР, 10 мкМ холестерина, pH 7,4 (Ox).

Стрелки обозначают момент добавления редокс-партнеров и соответствующего буфера.

КОМПЛЕКСЫ В ЦИТОХРОМ P450-СОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМАХ

Таким образом, доля продуктивных бинарных комплексов составляет менее 0,1%, т.е. бинарные комплексы практически непродуктивны (что отражено в табл. 2).

Как известно, для пары PdR/P450cam не наблюдается межбелкового электронного транспорта [4]. Кроме бинарных Pd/PdR и Pd/P450cam комплексов, было зарегистрировано образование PdR/P450cam бинарных неэлектрон-транспортных комплексов при иммобилизации P450cam как для окисленных форм белков (OX), так и в случае восстановленной формы PdR с окисленной формой P450cam (HYD, кривые связывания не показаны). Значения k_{on} , k_{off} и K_D для данных условий приведены в таблице 1.

Образование бинарных комплексов в цитохром P450scc-содержащей системе.

В этой системе формируются бинарные электрон-транспортные комплексы (Ad/AdR и Ad/P450scc) как между окисленными их формами, так и в условиях гидроксирования, причем только в случае иммобилизации Ad (рис. 4). В случае альтернативной иммобилизации AdR или P450scc комплексообразования с Ad не наблюдалось [49]. Такая зависимость комплексообразования от партнера иммобилизации сходна с полученной выше для цитохром P450cam-содержащей системы. Определяющее значение партнера иммобилизации показывает необходимость положительно заряженных аминокрупп AdR и P450scc для формирования комплексов этих белков с Ad, что согласуется с данными [14].

В таблице 1 представлены кинетические параметры (k_{on} , k_{off} , τ_{IT} и K_D) реакций комплексообразования для этих пар. Как видно, различия этих констант составляет менее одного порядка при переходе от окисленных форм белков (OX) к условиям гидроксирования (HYD). Времена жизни комплексов Ad/AdR составляют $\tau_{IT} = 500 \pm 175$ с (HYD) и $\tau_{IT} = 286 \pm 123$ с (OX), а времена жизни комплексов Ad/P450scc $\tau_{IT} = 125 \pm 30$ с (HYD) и $\tau_{IT} = 900 \pm 80$ с (OX). Анализ литературных данных показывает разброс в значениях $\tau_{turnover}$ для P450scc от 0,9-3 с [31, 32] до 250 с [14] в зависимости от экспериментальных условий. В условиях реконструкции, реализованных в нашей работе $\tau_{turnover} \sim 25$ с. Таким образом, время жизни каждого бинарного Ad/AdR или Ad/P450scc комплекса значительно превышает время каталитического цикла. Как известно, для реализации полного цикла гидроксирования необходима передача последовательно 6 электронов с AdR на Ad и с Ad на P450scc. Если рассматривать схему расщепления боковой цепи холестерина по шаттл-механизму [63, 64], то продуктивность бинарных комплексов, рассчитанная по схеме, аналогичной представленной выше для P450-системы, составляет:

$$1/6Q = (\tau_{turnover}/6\tau_{IT} Ad/AdR) = (8,3-6,6) \cdot 10^{-3} \text{ и} \\ (\tau_{turnover}/6\tau_{IT} Ad/P450scc) = (3,3-0,5) \cdot 10^{-2}.$$

Отсюда доля продуктивных бинарных комплексов не превышает 1%, бинарные комплексы практически непродуктивные (см. табл. 2). Множитель в знаменателе отношения $\tau_{turnover}/6\tau_{IT}$ указывает на то, что в реализации шаттл-механизма бинарный комплекс должен образовываться и диссоциировать 6 раз.

Также было зарегистрировано образование бинарных комплексов AdR/P450scc при иммобилизации любого из них как в окисленных формах, так и в условиях гидроксирования. В случае пары P450scc_{im}/AdR наблюдается на порядок более низкое значение k_{on} и более высокое K_D по сравнению с AdR_{im}/P450scc при обоих условиях (табл. 1).

Образование продуктивных тройных комплексов в цитохром P450cam- и P450scc-содержащих системах.

Как отмечалось выше, в отличие от бинарных комплексов в цитохром P450 2B4-содержащей системе бинарные комплексы Pd/PdR, Pd/P450cam и Ad/AdR, Ad/P450scc практически все непродуктивные. Поэтому они не могут эффективно функционировать. Это дает основание полагать существование другого, отличного от шаттл-механизма, функционирования этих систем. Ранее нами было показано, что в этих системах возможно формирование тройных комплексов окисленных форм белков [18]. В нашей работе мы показали

формирование тройных комплексов в этих системах в окисленных условиях и в условиях гидроксирования.

Обнаружение тройных комплексов в цитохром P450cam - содержащей системе в условиях гидроксирования проводилось с использованием биочипа с Pd_{im}. В условиях гидроксирования инкубационная смесь включала: буфер 50 мМ триси-HCl, 0,2 М KCl, pH 7,4, содержащий камфору (0,4 мМ) и NADH (0,25 мМ) (рис. 3). На первом шаге (рис. 3Б) в биочип Pd_{im} добавляли PdR (2,0 мкМ), и регистрировали образование бинарных Pd_{im}/PdR комплексов. Следующая добавка PdR до 4 мкМ не изменяла характер кривой связывания, указывая, что 2 мкМ PdR концентрация была близка к насыщающей. Затем добавляли P450cam (10 мкМ) в биочип, содержащий PdR (4 мкМ). При этом наблюдали увеличение сигнала, что может быть интерпретировано, как образование PdR/Pd/P450cam комплексов. Время жизни комплексов было $\tau_{IT} = 2 \pm 1$ с. Аналогично, по той же схеме было получено образование тройных комплексов для окисленных форм белков (при отсутствии в инкубационном буфере NADH). Время жизни тройных комплексов в окисленных условиях составляло то же самое значение $\tau_{IT} = 2 \pm 1$ с. Принимая во внимание, что время каталитического цикла гидроксирования камфоры составляет $\tau_{turnover} = 0,03$ с, можно рассчитать продуктивность тройных комплексов, выражаемая величиной $Q = \tau_{IT} / \tau_{turnover}$, которая составила 70 и за время жизни тройных комплексов может реализоваться порядка 70 циклов гидроксирования в одном тройном комплексе. Таким образом, все тройные комплексы – продуктивные (табл. 2). Принимая во внимание, что время жизни бинарных Pd/PdR и Pd/P450cam комплексов на несколько порядков больше времени, необходимого для гидроксирования субстрата, можно предположить, что механизм гидроксирования субстрата может реализоваться через тройные комплексы.

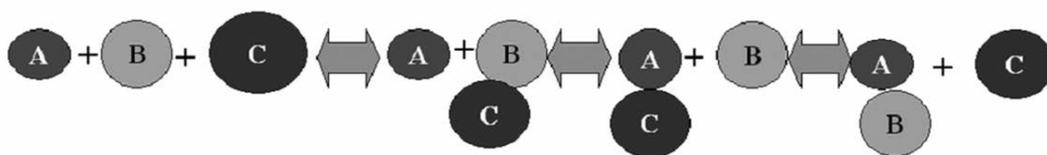
Обнаружение тройных комплексов в цитохром P450scc-содержащей системе в гидрокслирующих условиях проводили с использованием AdR_{im}-биочипа и инкубационного буфера 50 мМ КР, pH 7,4, содержащим 150 мМ KCl, 5 мМ NADPH и 10 мкМ холестерол. Добавление в буфер 150 мМ KCl было обусловлено тем, что при этом достигается наивысшая скорость восстановления AdR с помощью восстановленного Ad [14]. Как было показано выше, AdR_{im} не может образовывать комплексы с Ad напрямую. В то же время наблюдается связывание Ad с AdR_{im} в присутствии предварительно добавленного P450scc (рис. 3С). Эти данные указывают на образование тройного (AdR_{im}/P450scc/Ad) комплекса. Время жизни такого комплекса составляет $\tau_{IT} = 25 \pm 13$ с. Аналогичная ситуация наблюдается для окисленных форм белков. Время жизни тройных комплексов окисленных форм белков составляет ту же самую величину $\tau_{IT} = 25 \pm 13$ с. Сравнение времени жизни тройных AdR/Ad/P450scc комплексов $\tau_{IT} = 25 \pm 13$ с со временем цикла расщепления боковой цепи холестерина $\tau_{turnover} \sim 25$ с показывает, что величина Q составляет 1 и за время жизни тройных комплексов может реализоваться порядка 1 цикла в одном тройном комплексе. То есть все AdR/Ad/P450scc тройные комплексы – продуктивные (табл. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, подводя итог для трёх исследованных цитохром P450-содержащих систем, можно сделать следующие заключения. Как известно, имеются две модели функционирования трёхкомпонентных цитохром P450cam- и P450scc - содержащих систем: шаттл-механизм и модель через образование тройных комплексов. Формально эти схемы можно представить на рисунке 5, где А, В и С – белки. При реализации шаттл-механизма бинарный комплекс является продуктивным (т. е. эффективно участвует в реализации наработки продукта реакции), если выполняются правило $\tau_{IT} < \tau_{turnover}$. Если $\tau_{IT} > \tau_{turnover}$, бинарный комплекс непродуктивен, как это нами обсуждалось выше для цитохром P450cam- и P450scc-содержащих систем, и такой бинарный комплекс не может эффективно функционировать. За время жизни бинарных комплексов Pd/PdR и Pd/P450cam должно реализоваться 2333-8533 и 566-1100 циклов гидроксирования соответственно (табл. 2). За время жизни

КОМПЛЕКСЫ В ЦИТОХРОМ P450-СОДЕРЖАЩИХ СИСТЕМАХ

бинарных комплексов Ad/AdR и Ad/P450scс должно реализоваться 11-20 и 5-36 циклов расщепления боковой цепи холестерина соответственно. А этого не может быть, поскольку τ_{IT} бинарных комплексов гораздо больше времени каталитического цикла, и поэтому такие бинарные комплексы не продуктивны. При описании механизма функционирования этих систем через образование тройных комплексов имеют место иные отношения времен жизни комплексов и каталитических циклов. В этом случае если $\tau_{IT} \geq \tau_{turnover}$ эти комплексы продуктивны (их доля 100%), что и наблюдается в цитохром P450cam- и P450scс-содержащих системах. Время жизни тройных комплексов PdR/Pd/P450cam и AdR/Ad/P450scс достаточно для реализации 70 и 1 циклов гидроксирования камфоры и расщепления боковой цепи холестерина, соответственно. Если $\tau_{IT} \leq \tau_{turnover}$, тогда только часть комплексов продуктивна (их доля < 100%), как в случае d-2B4/d-Fp/d-b₅. В сводной таблице 2 приведено такое сравнение времени жизни комплексов и времени циклов гидроксирования для трех систем. Как видно, в цитохром P450cam- и P450scс-содержащих системах, которые функционируют при обязательном наличии трех белков, все бинарные комплексы непродуктивные. В то время как тройные комплексы в этих системах являются продуктивными. Таким образом, механизм функционирования этих двух систем, очевидно, реализуется в тройных комплексах, а не по шаттл-механизму. В случае цитохром P4502B4-содержащей системы, где реализация гидроксирования возможна в рамках бинарного комплекса d-Fp/d-2B4, последний является продуктивным, так как за его время жизни может реализоваться 1 полный цикл гидроксирования. В то же время больше половины тройных комплексов (порядка 60%) в этой системе также продуктивны и в них также может реализоваться полный цикл гидроксирования.

I



II

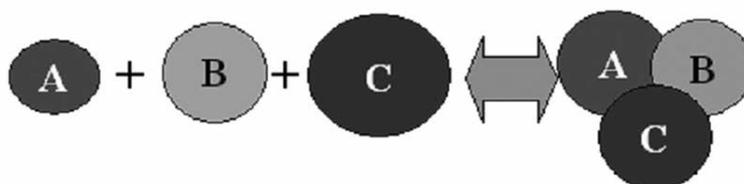


Рисунок 5.

Две модели работы трехкомпонентных белковых систем:

I: "ШАТТЛ"-модель для бинарных комплексов. Время оборота - $\tau_{turnover} = 1/k_{cat}$, время жизни комплекса - $\tau_{IT} = 1/k_{off}$. Если $\tau_{IT} < \tau_{turnover}$, тогда комплекс может быть продуктивен, если $\tau_{IT} > \tau_{turnover}$, тогда комплекс непродуктивен.

II: Кластерная модель для тройных комплексов:

Если $\tau_{IT} \geq \tau_{turnover}$, тогда комплекс продуктивен (эффективность = 100%);

Если время жизни комплекса $\tau_{IT} < \tau_{turnover}$, тогда продуктивность комплекса < 100%.

Авторы благодарят И.И. Карузину, Г.И. Кузнецову и Н.Ф. Саменкову за любезно предоставленные белки цитохром P450B4-содержащей системы, С.А. Козина за обсуждение масс-спектрометрической методики измерения

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. *Blake C.C.F., Johnson L.N., Mair G.A., North A.C.T., Phillips D.C., Sarma V.R.* (1967) *Proceeding of the Royal Society of London. Series B. Biol. Sci.*, **167**, 378-388.
2. *Lush M.J., Li Y., Read D.J., Willis A.C., Glynn P.* (1998) *Biochem. J.* **332**, 1-4.
3. *Mares-Guia M., Shaw E.* (1965) *J. Biol. Chem.*, **240**, 1579-1585.
4. *Archakov A.I., Bachmanova G.I.* (1990) *Cytochrome P450 and Active Oxygen*. Taylor&Francis, London, New York, Philadelphia, p.275.
5. *Srere P.A.* (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 89-124.
6. *Harwood J.L.* (1988) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**, 101-138.
7. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., 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. Comm.*, **273**, 750-752.
9. *Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Archakov A.I.* (2004) *Proteomics*, **4**, 2390-2396.
10. *Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Bykov V.A., Saunin S.A., Fedorov I.A., Lemeshko S.V., Hui Bon Hoa, Archakov A.I.* (2002) *Proteomics*, **2**, 1699-1705.
11. *Kiselyova O.I., Yaminsky I.V., Ivanov Yu. D., Kanaeva I.P., Kuznetsov V.Yu., Archakov A.I.* (1999) *Arch. Biochem. Biophys.*, **371**, 1-7.
12. *Hanukoglu I., Spitsberg V., Bumpus J.A., Dus K.M., Jefcoate C.R.* (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 4321-4328.
13. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Eldarov M.A., Skryabin K.G., Lehnerer M., Schulze J., Hlavica P., Archakov A. I.* (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **42**, 731-737.
14. *Ivanov Yu.D., Usanov S.A., Archakov A.I.* (1999) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **47**, 327-336.
15. *Archakov A.I., Ivanov Yu.D.* (1999) in: *Book Biophysics of Electron Transfer and Molecular Bioelectronics: The optical biosensor study of the protein-protein interactions within cytochrome P450s* (Nicolini C., ред.) Plenum Publication Corporation, pp.173-194.
16. *Koval V.V., Gnedenko O.V., Ivanov Yu.D., Fedorova O.S., Archakov A.I., Knorre D.G.* (1999) *IUBMB LIFE.*, **48**, 317-320.
17. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Karuzina I.P., Archakov A.I., Hui Bon Hoa G., Sligar S.G.* (2001) *Arch. Biochem. Biophys.*, **391**, 255-264.
18. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Karyzina I.I., Usanov S.A., Hui Bon Hoa G., Sligar S.G., Archakov A.I.* (2001) *J. Inorg. Biochem.*, **87**, 175-184.
19. *Иванов Ю.Д., Панова Н.Г., Гнеденко О.В., Бунеева О.А., Медведев А.Е., Арчаков А.И.* (2002) *Вопр. мед. химии*, **48**, 73-83.
20. *Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Конев В.А., Ковалёв О.Б., Николаева Л.И., Семёнова Н.В., Учайкин В.Ф., Арчаков А.И.* (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 419-425.
21. *Дмитриев Д.А., Массино Ю.С., Сегал О.Л., Смирнова М.В., Павлова Е.В., Коляскина Г.И., Гуревич К.Г., Гнеденко О.В., Иванов Ю.Д., Арчаков А.И., Осипов А.П., Дмитриев А.Д., Егоров А.М.* (2002) *Биохимия*, **67**, 1356-1365.
22. *Dmitriev D.A., Massino Y.S., Segal O.L., Smirnova M.B., Pavlova E.V., Gurevich K.G., Gnedenko O.V., Ivanov Y.D., Kolyaskina G.I., Archakov A.I., Osipov A.P., Dmitriev A.D., Egorov A.M.* (2002) *J. Immunol. Methods*, **261**, 103-118.

23. Archakov A.I., Ivanov Y.D. (2002) *Methods Enzymol.*, **357**, 94-103.
24. Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Николаева Л.И., Конев В.А., Ковалёв О.Б., Учайкин В.Ф., Говорун В.М., Покровский В.И., Арчаков А.И. (2003) *Журн. микробиол.*, **2**, 58-62.
25. Бунеева О.А., Гнеденко О.В., Панова Н.Г., Медведева М.В., Иванов Ю.Д., Медведев А.Е. (2003) *Биомед. химия*, **49**, 627-631.
26. Veselovsky A.V., Ivanov Yu.D., Ivanov A.S., Archakov A.I., Lewi P., Janssen P. (2002) *J. Mol. Recogn.*, **15**, 405-422.
27. Archakov A.I., Govorun V.M., Dubanov A.V., Ivanov Y.D., Veselovsky A.V., Lewi P., Janssen P. (2003) *Proteomics*, **3**, 380-391.
28. Раченкова Н.И., Иванов Ю.Д., Скворцов В.С., Иванов А.С., Молнар А.А., Уи Бон Ва Г., Арчаков А.И. (2005) *Биомед. химия*, **51**, 501-512.
29. Ivanov Y.D., Govorun V.M., Vukov V.A., Archakov A.I. (2006) *Proteomics*, **5**, 1399-1414.
30. Archakov A.I., Ivanov Yu.D. (2005) in: *Proceedings of EuroNanoForum Nanotechnology and the Health of the EU Citizen in 2020: Nano(Bio)Technology for Medicine in Russia. (Session 8 – What Can We Do at International Level)*, Edinburg, UK www.euronanoforum2005.org / www.nano.org.uk Page 201-208.
31. Раченкова Н.И., Иванов Ю.Д., Арчаков А.И. (2005) *Биомед. химия*, **51**, 614-623.
32. Медведева Н.В., Ипатова О.М., Иванов Ю.Д., Дрожжин А.И., Арчаков А.И. (2006) *Биомед. хим.*, **52**, 529-546.
33. Medvedev A., Buneeva O., Gnedenko O., Fedchenko V., Medvedeva M., Ivanov Y., Glover V., Sandler M. (2006) *J. Neural. Transm.*, **71**, 97-103.
34. Archakov A.I., Ivanov Yu.D. (2007) *Mol. Biosystems*, **3**, 336-342.
35. Schiffler B., Zöllner A., Bernhardt R. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 34269-34276.
36. Edwards P.R., Gill A., Pollard-Knight D.V., Hoare M., Buckle P.E., Lowe P.A., Leatherbarrow R. (1995) *J. Anal. Biochem.*, **231**, 210-217.
37. Edwards P.R., Leatherbarrow R.J. (1997) *Anal. Biochem.*, **246**, 1-6.
38. Edwards P.R., Lowe P.A., Leatherbarrow R.J. (1997) *J. Mol. Recogn.*, **10**, 128-134.
39. Edwards P.R., Maule C.H., Leatherbarrow R.J., Winzor D. (1998) *J. Anal. Biochem.*, **263**, 1-12.
40. O'Shannessy D.J., Brigham-Burke M., Sonesson K.K., Hensley P., Brooks I. (1993) *Anal. Biochem.*, **212**, 457-468.
41. Schuck P., Boyd L.F., Andersen P.S. (2004) *Curr. Protoc. Cell Biol.*, **17**, Unit 17.6.
42. George A.J. (2001) *Curr. Protoc. Immunol.*, **18**, Unit 18.5.
43. Svitel J., Balbo A., Mariuzza R.A., Gonzales N.R., Schuck P. (2003) *Biophys. J.*, **84**, 4062-4077.
44. Hutchinson A.M. (1995) *Mol. Biotechnol.*, **3**, 47-54
45. Hintz M.J., Mock D.M., Peterson L.L., Tuttle K., Peterson J.A. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 14324-14332.
46. Gunsalus L.C., Wagner G.C. (1978) *Methods Enzymol.*, **52**, 166-188.
47. Jung C.G., Hui Bon Hoa G., Schroeder K.L., Simon M., Doucer J.P. (1992) *Biochemistry*, **31**, 12855-12862.
48. Усанов С.А., Пикулева И.А., Чащин В.Л., Акхрем А.А. (1984) *Биоорг. химии*, **10**, 32-45.
49. Усанов С.А., Чащин В.Л., Акхрем А.А. (1989) *Биохимия*, **54**, 472-486.
50. Karuzina I.I., Zgoda V.G., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I. (1999) *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 620-632.
51. Канаева И.П., Скоцелас Е.Д., Кузнецова Г.П., Антонова Г.Н., Бачманова Г.И. (1985) *Биохимия*, **50**, 1382-1388.
52. Spatz L., Strittmatter P. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **68**, 1042-1046.
53. Yeung D., Gill A., Maule C.H., Davies R.J. (1995) *Trends in Anal. Chem.*, **14**, 49-56.
54. Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B., Johnsson B. et al. (1991) *BioTechniques*, **11**, 620-627.
55. Way S., Hill B. (1996) *Methods Guide for IAsys plus and IAsys Auto+. Affinity Sensors*. Human-Computer Interface Limited, Cambridge, England.

56. Nakamura K., Horiuchi T., Yasukochi T., Sekimizu K., Hara T., Sagara Y. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, **1207**, 40-48.
57. Omura T., Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2385.
58. Chu J.-W., Kimura T. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2089-2094.
59. French J. S., Coon M.G. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.*, **195**, 565-577.
60. Vermeulen G.J., Lambert J.G.D., Lenczowski M.J.P., Goos H.J.Th. (1993) *Fish Physiol. Biochem.*, **12**, 21-30.
61. Müller J. (1995) *Steroids*, **60**, 2-9.
62. Lambeth J.D., Geren L.M., Millett F. (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 10025-10029.
63. Hintz M.J., Mock D.M., Peterson L.L., Tuttle K., Peterson J.A. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 14324-14332.
64. Geren K., Tuls J., O'Brien P., Millett F., Peterson J.A. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 15491-15495.

Поступила: 17. 04. 2008.

PRODUCTIVE AND NON-PRODUCTIVE COMPLEXES IN CYTOCHROME P450-CONTAINING SYSTEM

Yu.D. Ivanov¹, A.V. Ivanov¹, A.L. Kaysheva¹, V.G. Zgoda¹, G. Hui-Bon-Hoa², S.A. Usanov³, A.I. Archakov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (7)(495)2463761; fax: (7)(095) 2450857, e-mail: Yurii.Ivanov@ibmc.msk.ru

²INSERM U779, France or Unité 473 Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), 94276 Le Kremlin Bicêtre Cedex, France

³Institute of Bioorganic Chemistry, Belarus

The equilibrium dissociation constants K_D , the complex association / dissociation rate constants (k_{on} / k_{off}) and the lifetimes of redox partners' complexes were measured for three cytochrome P450-containing monooxygenase systems (P450cam, P450 2B4 and P450scc). To estimate the productivity of complexes formed within the systems studied, the Q parameter – i.e. the ratio of protein-protein complex lifetime (τ_{LT}) to the time required for a single hydroxylation cycle (τ_{cat}) – was determined. It was shown that Q was changed (albeit insignificantly) upon transition from the oxidation to hydroxylation conditions in all the three P450 – monooxygenase systems studied. It was shown that the binary complexes formed within the P450cam and the P450scc systems requiring an intermediate electron-transfer protein between the reductase and cytochrome P450 were non-productive while the binary complexes formed within the P450 2B4 system, not requiring such an intermediate electron-transfer protein, proved to be productive. Formation of ternary complexes within the three systems was demonstrated under hydroxylation conditions. Analysis of Q values led to the conclusion that the ternary complexes formed within the P450cam and the P450scc systems were virtually 100% productive. Within the P450 2B4 system, more than half (about 60%) ternary complexes were also found to be productive.

Key words: cytochrome P450 2B4, cytochrome P450scc, cytochrome P450cam, optical biosensor.