

УДК 577.152.3

©Коллектив авторов

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ САЙТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА P450 2B4 С NADPH:ЦИТОХРОМ P450 РЕДУКТАЗОЙ

*А.В. Иванов, А.Т. Копылов, В.Г. Згода, И.Ю. Торопыгин,
Е.В. Хряпова, Ю.Д. Иванов**

¹Учреждение российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН имени В.Н. Ореховича РАМН, Москва, 119121, ул. Погодинская, 10; тел.: (7)(095)2463761; факс: (7)(095) 2450857; эл. почта: Yuri.Ivanov@ibmc.msk.ru

В работе были определены сайты взаимодействия белков-партнеров цитохрома P450 2B4 (d-2B4) и NADPH:цитохром P450 редуктазы (d-Fp). Эти белки образуют комплексы в процессе их функционирования. В работе был использован сшивающий агент 4-4'-дитио(бисфенил)азид для неспецифического ковалентного сшивания комплексов d-2B4 с d-Fp в мономеризованной с помощью Эмульгена-913 системе. Ковалентно сшитые пептиды в этом комплексе идентифицировали с помощью ESI-MS/MS. Было выявлено несколько мест связывания этих белков друг с другом. На их основе создана модель межмолекулярных взаимодействий белков. Эта модель включает 5 мест контактов d-2B4 с d-Fp, стабилизированных кросслинкером в которые вовлечены следующие пептиды d-2B4 и d-Fp (перечислены попарно): 1) d-2B4₄₂₃₋₄₃₃ и d-Fp₁₀₂₋₁₀₉; 2) d-2B4₃₂₄₋₃₃₆ и d-Fp₅₇₀₋₅₈₅; 3) d-2B4₃₂₇₋₃₃₆ и d-Fp₄₅₂₋₄₆₄; 4) d-2B4₁₉₂₋₁₉₇ и d-Fp₄₅₆₋₄₆₄; 5) d-2B4₁₃₄₋₁₃₉ и d-Fp₄₀₆₋₄₂₅. Притом, в двух последних случаях пептиды d-Fp располагаются в междоменной щели и стабилизируют белок-белковый комплекс через нанозонд-кросслинкер, поэтому образование комплексов d-2B4/d-Fp по этим сайтам может включать а.о. окружающих междоменную щель пептиды d-Fp₄₅₆₋₄₆₄ и d-Fp₄₀₆₋₄₂₅.

Ключевые слова: Цитохром P450 2B4, NADPH:цитохром P450 оксидоредуктаза, масс-спектрометрия, сайты взаимодействия.

ВВЕДЕНИЕ. Белковое суперсемейство цитохромов P450 (P450) включает большое число гемопротеинов b-типа, объединённых по структурным и функциональным признакам и участвующих в метаболизме различных физиологических соединений и ксенобиотиков [1-3]. Актуальность изучения этого суперсемейства обусловлена его важной ролью в окислении как эндогенных, так и экзогенных соединений [4]. Цитохром P450 2B4 функционирует в составе электронпереносящей системы, которая локализована в мембране эндоплазматического ретикулула и состоит из трёх амфифильных белков-партнёров – цитохрома P450 2B4 (d-2B4), NADPH:цитохром P450 оксидоредуктазы (или флавопротеинредуктазы – d-Fp) и цитохрома b5 (d-b5). Моноксигеназный цикл d-2B4 включает последовательную передачу на его протетическую группу (гем) двух электронов. Первый электрон d-2B4 получает от d-Fp, а второй электрон – от d-Fp или от d-b5 [5-8]. В структуре d-Fp выделяют несколько доменов: NADPH-, FAD-, FMN-связывающие и связующий (connecting) домен [9].

Список сокращений: d-2B4 – цитохром P450 2B4, d-Fp - NADPH-цитохром P450 редуктаза, d-b5 – цитохром b5, КР/Е – калий-фосфатный буфер с содержанием Эмульгена-913 0,25 г/л, ДТВРА - 4-4'-дитио(бисфенил)азид, а.о. - аминокислотный остаток или остатки.

* - адресат для переписки

Фосфолипидная мембрана является важным компонентом нативного окружения d-2B4 и d-Fp, однако моделирование электрон-транспортной цепи P450 2B4 монооксигеназной системы в её присутствии представляет сложную задачу. В работах [10-12] была показана возможность моделирования электрон-транспортных цепей цитохром P450 – содержащих систем в отсутствии фосфолипидов с использованием различных детергентов, в том числе эмульгена-913 (Э-913) в концентрации 0.25 г/л [13, 14].

Одной из основных задач в изучении функционирования данных систем является определение сайтов связывания белков-партнёров друг с другом, посредством которых осуществляется взаимодействие белков. Различные методы и их комбинации были использованы для решения этой задачи: гомологичное моделирование [15], PCA [9,16], сайт-направленный мутагенез [17-19], химические модификации [20, 21], оптико-биосенсорный анализ [22, 23] и проч., однако до сих пор их результаты остаются предметом дискуссий.

В последнее время развиваются подходы по анализу мест взаимодействий белков на основе ковалентной стабилизации комплексов с последующим их трипсинолизом и масс-спектрометрической идентификацией связанных пептидов [24, 25]. Обычно при этом используются линкеры, связывающие сульфо-, amino- и карбоксильные группы белков, однако их использование не позволяет выявлять сайты взаимодействия, не содержащие эти группы. В нашей работе нами был использован для ковалентной стабилизации комплексов 4-4'-дитио(бисфенил)азид (DTBPA). Он является гомобифункциональным фотоактивируемым соединением и может реагировать с широким спектром химических групп, т.е. является неспецифическим универсальным линкером. Ранее реагенты этого типа показали способность сшивать цитоплазматические, поверхностные и интегральные белки клеток и вирусов [26-29].

В настоящей работе с помощью этого кросслинкера были ковалентно стабилизированы комплексы d-2B4/d-Fp, после чего пептиды, принимавшие участие в комплексообразовании были идентифицированы посредством ESI-MS/MS.

МЕТОДИКА.

Реактивы. Эмульген-913 (полиоксиэтиленнонилфениловый эфир) был получен от “Као Atlas” (Осака, Япония), DTBPA и NH_4HCO_3 были от “Sigma-Aldrich” (США), ацетонитрил, муравьиная, трифторуксусная кислоты - от “Merck” (Германия), трипсин - от “Promega” (США), прочие реактивы - от “Реахим” (Россия).

Выделение белков проводили как описано в [30-32]. Содержание d-Fp в препарате - 13-13.5 нмоль d-Fp на 1 мг белка и её активность при 30°C - 40 мкмоль цитохрома с/мин на 1 мг белка. Содержание d-2B4 - 16-18 нмоль на 1 мг белка, $A_{418/276} = 1,5$. Специфическое содержание d-b5 (цитохром b5) было 48-52 нмоль на 1 мг общего белка, $A_{413/276} = 1,6$. Препараты белков были электрофоретически гомогенными.

Мономеризация агрегатов изолированных d-Fp и d-2B4 проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере с концентрацией эмульгена-913 0,25 г/л (КФБ/Э), pH 7,4 как описано в [13]. Мономеризацию препаратов, содержащих d-b5 проводили в 0,5 М калий-фосфатном буфере с концентрацией эмульгена-913 0,25 г/л, pH 7,4, по той же процедуре. Выбор 0,5 М КФБ/Э был обусловлен тем, что d-b5 может быть мономеризован в присутствии Эмульгена-913 только в буфере с высокой ионной силой.

Ковалентная стабилизация белковых (d-2B4/d-2B4, d-Fp/d-Fp и d-2B4/d-Fp) комплексов. К растворам мономеризованных 2 мкМ d-2B4, 2мкМ d-Fp или к их смеси (2 мкМ d-2B4+2 мкМ d-Fp) в 0,1 М КФБ/Э, pH 7,4, в темноте добавляли фотолинкер DTBPA в DMSO до концентрации DTBPA – 100 мкМ и DMSO - 1%. Далее растворы инкубировали в темноте при 25°C 30 мин и затем их облучали ртутной лампой ДРШ-3 (250 Вт), снабжённой УФ фильтром (>310 нм) на расстоянии 15 см от неё в течение 10 мин на льду. Сразу после облучения образцы замораживали при -85°C.

ПААГ одномерный электрофорез (Т-7,5%, С-2,8%) в денатурирующих условиях проводили согласно [33], но без применения восстанавливающих агентов и температурной обработки образцов. Пробы, представленные на треках II и III (рис. 1) перед нанесением в электрофоретические лунки были восстановлены 50 мМ дитиотреитолом в 0,06 М Трис-НСl с 2% SDS и 10% глицерином, pH 6,8, при 37°C в течение 30 мин. Окрашивание гелей проводили азотнокислым серебром (0,3 г/л).

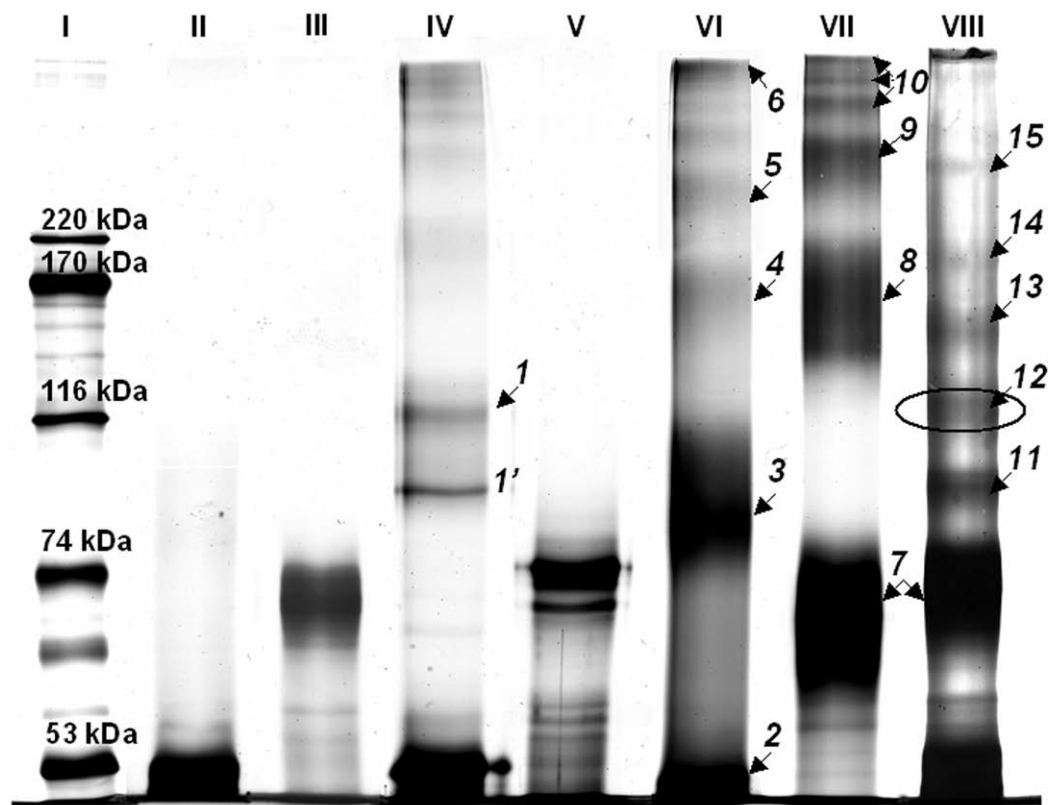


Рисунок 1.

ПААГ (Т-7,5%, С-2,8%) электрофореграмма образцов d-2B4 и d-Fr (окраска азотнокислым серебром). Трек I – молекулярные маркеры; треки II и III – d-2B4 и d-Fr, соответственно; треки IV и V – d-2B4 и d-Fr, соответственно, после облучения с ДТВРА и восстановления 50 мМ дитиотреитолом в 0,06 М трис-НСl с 2% SDS и 10% глицеролом, pH 6,8 согласно процедуре, описанной в разделе “Методика”.

Трипсинолиз. Полосы, соответствующие d-2B4, d-Fr и их комплексам вырезали из геля, обесцвечивали раствором феррицианида калия (0,2 г/л в 0,2 М NH_4HCO_3) и дальнейший трипсинолиз белков проводили согласно [34] с небольшими модификациями: полосы из геля промывали дважды 50 мМ гидрокарбонатом аммония в 50% ацетонитриле, затем их дегидратировали ацетонитрилом и высушили на воздухе. После чего к ним был добавлен раствор трипсина (25 мкг/мл) в 50 мМ гидрокарбонате аммония, pH 8,2. Трипсинолиз проводился 18 часов при 37°C с последующей его остановкой раствором 0,45% ТФУ. Кроме того, по описанной выше процедуре проводили трипсинолиз раствора d-Fr и раствора d-2B4 в, содержащих по 100 пмоль белка.

MS ИДЕНТИФИКАЦИЯ САЙТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ d-2B4 с d-Fp

MALDI MS анализ выполнили на спектрометре Bruker Ultraflex ("Bruker Daltonics", Германия) оснащённом 337 нм азотным лазером. Измерение проводили в позитивном ионном режиме с ускоряющим напряжением 25 кВ. Раствор трипсинолизированных проб из геля смешивали с раствором матрицы (2,5-дигидроксibenзойная кислота в 50% ацетонитриле с 0,3% ТФУ) и полученную смесь нанесли на мишень AnchorChiptm. Полученные спектры обрабатывали программой MASCOT (www.matrixscience.com) для идентификации белков по базе данных MSDB со следующими параметрами: вид (таксономия) – кролик, максимальное число пропущенных сайтов расщепления – 1, возможные модификации – пропионамидирование C, оксидирование M, точность измерения моноизотопных масс $60 \leq \text{ppm}$.

ESI Ion Trap-MS/MS. Масс-спектрометрический тандемный анализ для идентификации контактных сайтов белков из их трипсинолизированных растворов проводили на хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 1100 Series с использованием электроспрейного интерфейса nanoESI-online и хроматографической колонки (150×0,075 мм) с наполнителем Zorbax 300SB-C18. Перед анализом образцов их высушивали, используя вакуумный концентратор 5301 (Eppendorf, Германия) и растворяли в 10% ацетонитриле с 0,1% HCOOH. Затем, после нанесения 1 мкл предварительно трипсинолизированных образцов на обогащающую колонку (5,0×0,3 мм, диаметр гранул наполнителя Zorbax 300SB-C18 5,0 мкм) хромато масс-спектрометрической системы, она была промыта 3% ацетонитрилом с 0,1% HCOOH в течение 5 мин. Затем обогащающая колонка была соединена с хроматографической и элюцию и хроматографическое разделение пептидов проводили в 0,1% растворе HCOOH с градиентом ацетонитрила 0-80% в течение часа по следующей схеме: 0 мин – 0%, 5 мин – 2,4%, 45 мин – 36%, 55 мин – 80% ацетонитрила. Масс-спектрометрический анализ проводили в автоматическом режиме выбора положительно заряженных ионов со следующими параметрами ионной ловушки: температура осушающего газа (N₂) - 150°C, скорость потока осушающего газа - 6 л/мин, напряжение на источнике – 1,5 кВ, мишень – 50000, время аккумуляции спектра – 50 мс, диапазон m/z – 200-1700, заданная масса - 800 m/z. MS/MS фрагментацию проводили в автоматическом режиме со следующими параметрами: ширина изоляции и фрагментации – 4 и 10 m/z соответственно, амплитуда фрагментации – 1 В.

Идентификацию пептидов проводили с использованием программы MASCOT (www.matrixscience.com) по базе данных MSDB со следующими параметрами: таксономия – кролик, максимальное число пропущенных сайтов расщепления – 1, возможные модификации – пропионамидирование цистеина, оксидирование метионина, точность измерения моноизотопных масс $300 \leq \text{ppm}$, заряд пептидов – 1+, 2+, 3+, допустимое отклонение m/z MS/MS-ионов – 0,2 Da, прибор – ионная ловушка с электроспрейным распылением (ESI-TRAP).

Поиск и идентификацию ковалентно связанных пептидов d-2B4 с d-Fp проводили по алгоритму, состоящему из процедуры поиска массо-зарядовых величин (m/z), соответствующих массам трипсинолизированных фрагментов белков, связанных фотокросслинкером DTBPA, по MS-ионам и функции идентификации по MS/MS-ионам пептидных фрагментов, участвующих в комплексообразовании.

Более подробно алгоритм процедуры был следующий. Вначале генерировался массив данных, содержащий последовательности и молекулярные массы связанных фотокросслинкером DTBPA пептидов 2B4 и Fp. Среди MS-ионов отбирали совпавшие с элементами данного массива по m/z с погрешностью в 300 ppm. При этом предполагалось, что заряд MS-иона мог быть 1+, 2+, 3+.

Затем, используя соответствующие выбранным MS-ионам тандемные спектры, производили идентификацию ковалентно связанных пептидов по их осколочным фрагментам, как не модифицированным DTBPA (y-, y-H₂O, y-NH₃, b-, b-H₂O, b-NH₃ типов), так и ковалентно связанных DTBPA (тех же типов). Кроме того, учитывалась возможность разрыва линкера по дисульфидной связи.

Соответствующие фрагменты обозначены далее как yS^- , $y-H_2O S^-$, $y-NH_3 S^-$, bS^- , $b-H_2O S^-$, $b-NH_3 S^-$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Стехиометрия комплексов d-2B4/d-Fp, d-Fp/d-Fp и d-2B4/d-2B4.

Так как при облучении смеси растворов белков d-Fp с d-2B4 в присутствии DTBPA не исключена возможность формирования гомоолигомеров белков, нами были проведены контрольные эксперименты по анализу растворов изолированных белков.

На рисунке 1 представлена электрофореграмма изолированных d-2B4 (трек II, кажущаяся M_r 49 кДа), d-Fp (трек III, кажущаяся M_r 74 кДа). Для того, чтобы оценить вклад образования гомоолигомеров, не стабилизируемых DTBPA, перед электрофорезом раствор d-2B4 и раствор d-Fp восстанавливали 50 мМ дитиотреитолом в 0,06 М трис-HCl с 2% SDS и 10% глицерином, pH 6,8, в течение 30 мин при 37°C (треки IV и V, соответственно). И если дисульфидные связи в комплексах d-Fp в данных условиях восстанавливаются практически полностью, то для d-2B4 такой процесс проходит лишь частично и характеризуется появлением двух полос (рис. 1, трек IV, полосы 1 и 1') с M_r ~120 и ~100 кДа соответственно, которые, соответствуют гомодимерам d-2B4.

На треках VI и VII рисунка 1 представлены электрофореграммы изолированных d-2B4 и d-Fp, а также их смеси (трек VIII) которые были подвергнуты облучению в присутствии DTBPA. Как видно из трека VI, d-2B4 образует в 0,025% растворе Э-913 не только мономеры (22%, полоса 2), но и гомодимеры (51%, полоса 3), а также небольшое количество тетрамеров (12%, полоса 4), гексамеров (~5%, полоса 5) и более крупных агрегатов (~10%, полоса 6), стабилизируемых DTBPA при облучении.

Из сравнения трека VII с треком V видно, что d-Fp также, кроме мономерной формы (63%, полоса 7), образует гомодимеры (29%, полоса 8), тетрамеры (~5%, полоса 9) и незначительное количество комплексов более высокого порядка (~3%, полоса 10), которые практически полностью стабилизируются фотосшивающим агентом DTBPA.

Проба, содержащая смесь d-2B4 с d-Fp и DTBPA представлена на треке VIII рисунка 1. При сравнении её с контрольными треками выявляется новая полоса, соответствующая гетеродимеру d-2B4/d-Fp (~ 120 кДа, полоса 12). Кроме того, относительная интенсивность полос (11, 13-15), соответствующих гомодимерам белков d-2B4 или d-Fp и гомокомплексам более высокого порядка, существенно ниже аналогичных, которые представлены на треках VI и VII.

Мы также проводили облучение смеси, содержащей d-Fp, d-b5 и DTBPA. На электрофореграмме этой пробы не было выявлено полос, относящихся к сформированным комплексам d-Fp/d-b5, стабилизируемым DTBPA (данные не показаны). Это указывает на то, что комплексы между d-Fp и d-b5 не образуются, что согласуется с полученными ранее результатами в работах [22, 35, 36].

Для определения белкового состава полос, их вырезали из геля, провели трипсинолиз находившихся в них белков с последующим масс-спектрометрическим анализом трипсинолизата. Для полосы 12 (трек VIII) геля удалось идентифицировать 32% и 22 % первичной последовательности d-2B4 и d-Fp соответственно.

Сайты взаимодействия гомодимеров d-2B4/d-2B4 и d-Fp/d-Fp.

Полосы геля (№3 и №8, рис. 1), соответствующие гомодимерам d-2B4 и d-Fp вырезали и проводили их трипсинолиз с последующим ESI-MS/MS анализом для определения ковалентно стабилизированных пептидов. Известно, что трюнктурированные формы этих белков могут быть кристаллизованы в виде димеров [9, 16], поэтому сравнение полученных в настоящей работе результатов с данными PCA этих белков интересно для выявления специфичности стабилизированных линкером комплексов.

MS ИДЕНТИФИКАЦИЯ САЙТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ d-2B4 с d-Fp

Масс-спектрометрический анализ полосы 3 (гомодимеры d-2B4) не позволил выявить связанных линкером пептидных пар. Это может быть обусловлено неэффективной ионизацией ковалентно связанных DTBPA пептидов d-2B4, многообразием вариантов закрепления линкера на белке и т.д., что делает концентрацию ионов с соответствующими m/z ниже концентрационного предела чувствительности прибора.

При анализе полосы 8 (гомодимер d-Fp) было выявлено соединение 7, соответствующее связанным пептидам d-Fp₂₉₁₋₂₉₈ с d-Fp₅₇₀₋₅₇₇. Время выхода этого соединения – 36,3 мин, m/z – 729,8. Недостаточное разрешение изотопного распределения не позволило определить заряд данного пика. Анализ тандемного (MS/MS) спектра этого соединения позволил идентифицировать его как пептидную пару d-Fp (291-KLNQGTER-298) и d-Fp (570-AAEDYLYR-577), связанную DTBPA. Программой Mascot в этой полосе был идентифицирован пептид d-Fp₅₇₀₋₅₈₅, что свидетельствует о том, что были реализованы ещё и другие варианты положения линкера, но их не удалось идентифицировать. Анализ MS/MS спектра этого соединения позволил идентифицировать а.о. (T296 и E572), которые ковалентно стабилизируют эту пептидную пару посредством DTBPA. Согласно модели [9] минимальное расстояние между этими T296 одной молекулы редуктазы и E572 другой молекулы составляет 1,58 нм (рис. 2), что близко к длине линкера DTBPA после его фотоактивации (1,62 нм). Таким образом, использование DTBPA позволяет осуществлять специфическую стабилизацию белковых комплексов d-Fp/d-Fp, образование которых подтверждено данными PCA.

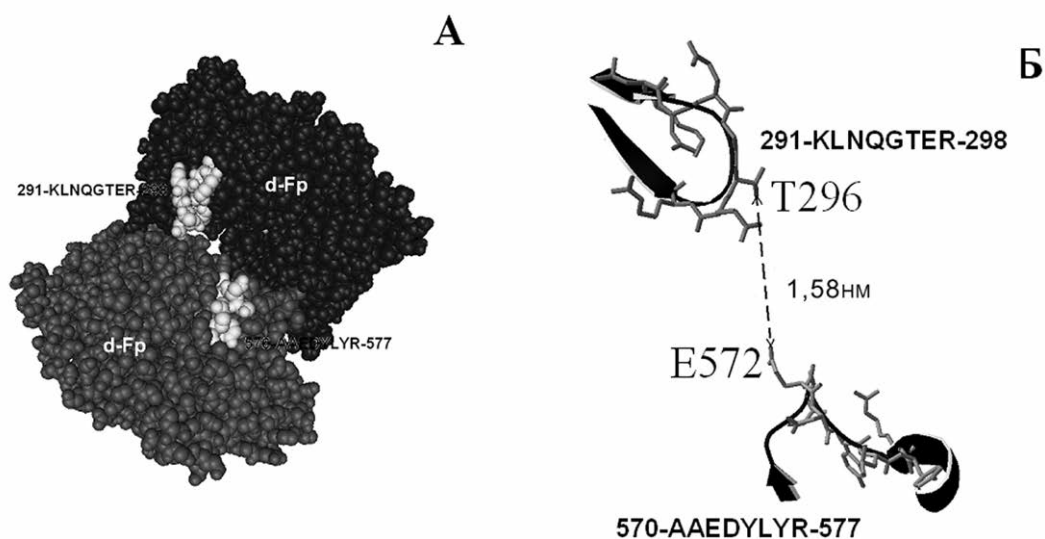


Рисунок 2.

(А) - модель комплекса d-Fp/d-Fp ([9]). На структуре отмечены пептиды, которые связаны друг с другом через DTBPA. (Б) – детальное расположение связанных пептидов d-Fp₂₉₁₋₂₉₈ и d-Fp₅₇₀₋₅₇₇.

Сайты взаимодействия P450 2B4 с Fp.

Для выявления сайтов взаимодействия P450 2B4 с Fp с помощью ESI-MS/MS мы провели поиск и идентификацию пептидных пар этих белков, ковалентно стабилизированных DTBPA. В результате MS/MS - анализа 12-ой полосы (рис. 1), представляющей гетеродимер d-2B4/d-Fp, было идентифицировано 5 соединений с различными m/z . Эти соединения, соответствующие взаимодействующим фрагментам d-2B4 и d-Fp представлены в таблице 1.

Таблица 1. Пептиды d-2B4 и d-Fp, ковалентно связанные DTBPA.

№	m/z , Да	z	Пептид d-2B4	Пептид d-Fp	Порядок, мин	Соединение DTBPA пары п.о. (d-2B4-d-Fp)
1	997,6	3	192-DPVFLR-197	456-YYSIASSSK-464	24	P193-S458 V194-S461 R197-461-SS-462 F195-S463
2	997,6	2	423-NEGFMPTSLGK-433	102-DAHRYGMR-109	218	E424-D102 M427-D102
3	962,3	3	327-EIEQVIGSHR-336	452-LQARYYSIASSSK-464	59	I328-L452
4	1223,4	3	324-VQKEIEQVIGSHR-336	570-AAEDYLYREELAGFQK-585	147	E327-Y574 I332-A570 H335-Y574
5	1032,3	3	134-DFGMGK-139	406-MASSGEGKEL YLSWVVEAR-425	239	G136-S408 D134-V421

Соединение 1 имеет m/z 997,6 Да, $z=2$, время выхода 44 мин. MS/MS спектр этого соединения приведен на рисунке 3, а список его идентифицированных фрагментов – в таблице 2. На примере этого соединения будет проиллюстрирован анализ тандемного спектра, позволивший идентифицировать это соединение как пептидную пару d-2B4 (192-DPVFLR-197) и d-Fp (456-YYSIASSSK-464), связанную DTBPA.

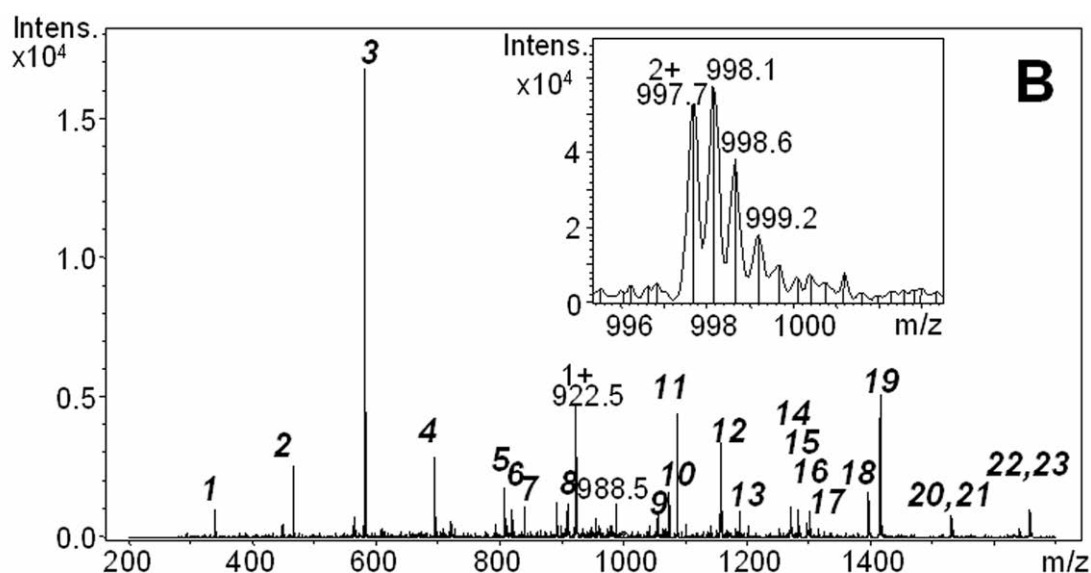


Рисунок 3.

Ms/Ms спектр соединения 1 (192-DPVFLR-197 (d-2B4) и 456-YYSIASSSK-464 (d-Fp) химически связанные DTBPA). Во вставке – Ms спектр этого соединения. Цифрами обозначены номера пиков из табл. 2.

MS ИДЕНТИФИКАЦИЯ САЙТОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ d-2B4 с d-Fp

Таблица 2. Список идентифицированных фрагментов Ms/Ms спектра соединения 1.

№ пика	m/z, Да	тип(ы) фрагмента (ов)			
		Вариант 1 P193- <u>S458</u>	Вариант 2 V194- <u>S461</u>	Вариант 3 197R- <u>461-SS-462</u>	Вариант 4 F195- <u>S463</u>
1	338,1				<u>y2-H2O</u> S
2	466,2		b3-NB- <u>y4-NB</u> ++		
3	581,2	b4S			b4S
4	694,3	b5S			b5S
5	807,4			<u>b6S</u>	
6	820,4	b5-H2O- <u>y8</u> ++			b5-H2O- <u>y8</u> ++
7	838,4	b2-NB- <u>b3-NB</u>			
8	909,4			<u>y2-H2O-b3-H2O</u>	
9	1054,5	b2- <u>b5</u>		<u>y3-NB-y4-NB</u>	
10	1072,5			<u>y5-H2O-y2-H2O</u>	
11	1085,6			<u>y1-H2O-b6</u>	
12	1156,6			<u>y1-NB-b7-H2O</u>	
13	1187,6				b5-H2O- <u>y4-H2O</u>
14	1269,7			<u>y2-NB-b7-H2O</u>	
15	1270,7	<u>y5-H2O-b3</u>			
16	1282,6	b2-NB- <u>y8</u> , b4-H2O- <u>b5</u> ,	<u>y5-y4</u>	<u>y5-y4</u>	
17	1300,7	b4- <u>b5</u> ,			
18	1395,7	b5-H2O- <u>b5</u>			
19	1413,8	b5- <u>b5</u>			
20	1528,8	b4-NB- <u>y8</u>			b4-NB- <u>y8</u>
21	1531,8		<u>y4-H2O-b7</u>		
22	1656,9	b5-H2O- <u>b8</u> , DPVFLR- <u>b6-H2O</u>			
23	1657,8	b5- <u>y8</u>			b5- <u>y8</u>

Примечание: курсивом с подчёркиванием обозначены фрагменты пептида d-Fp, остальные относятся к d-2B4.

Среди MS/MS-ионов этого соединения обнаружено присутствие фрагментов, соответствующих различным положениям фотолинкера между а.о. пептидов. Это может быть обусловлено неспецифической активностью ДТВРА, малым временем жизни активированного линкера, высокой энергией его нитрен-радикала. В связи с этим, анализ tandemного спектра не позволяет однозначно указать положение фотолинкера и сводится к минимизации вариантов его положений относительно а.о. ковалентно связанных пептидов. Для всех найденных соединений эти варианты приведены в таблице 1, а для соединения 1 еще и в таблице 2. Для обозначения найденных фрагментов пептидов нами были использованы следующие обозначения: прямым шрифтом обозначены фрагменты, относящиеся к d-2B4, а наклонным с курсивом – фрагменты, относящиеся к d-Fp. Например, взятый из таблицы 2 фрагмент b4S указывает на то, что один из четырёх а.о. пептида d-2B4₁₉₂₋₁₉₅ модифицирован линкером, а фрагмент b4-NH₃-y4-NH₃ соответствует положениям линкера между а.о. 192-DPVF-195 d-2B4 и а.о. 461-SSSK-464 d-Fp. Приняв допущение о существовании нескольких альтернативных вариантов положений линкерной группы относительно пептидной пары, имеющих одно m/z и время выхода с хроматографической колонки, мы также предположили, что линкерная группа в каждом из вариантов располагается между теми а.о., которые являются конечными в ряду фрагментации ковалентно связанных пептидов d-2B4 и d-Fp, т.е. для ряда фрагментов {n_i-m_j}, где n_i – b- или y- ионы d-2B4, а m_j b- или y-ионы d-Fp, соответствующих одному варианту положения линкера, это положение определяется минимальными i и j.

Ниже приведены варианты положения сшивки в соединении 1. Варианту 1 соответствуют пики 2-4, 6, 7, 9, 15-20, 22 и 23 (табл. 2, рис. 3) и расположение линкера между P193 (d-2B4) и S458 (d-Fp), так как в этом ряду фрагментация пептида d-2B4₁₉₂₋₁₉₇ останавливается на а.о. P193 (фрагменты **b2-NH₃-b3-NH₃** (пик 7), **b2-b5** (пик 9) и **b2-NH₃-y8** (пик 16), а фрагментация d-Fp₄₅₆₋₄₆₄ – на S458 судя по фрагментам b2-NH₃-**b3-NH₃** (пик 7) и y5-H₂O-**b3** (пик 15). Вариант 2 (пики 2, 5, 6, 16, 21-23) соответствует положению линкерной группы между V194(d-2B4) (пики 2 (**b3-NH₃-y4-NH₃**⁺⁺), 21 (**y4-H₂O-b7**)) и S461(d-Fp) (пики 2 (**b3-NH₃-y4-NH₃**⁺⁺), 16 (**y5-y4**) и 22 (DPVFLR-**b6-H₂O**)). Вариант 3 (пики 5, 8-12, 14-16) – между R197 (d-2B4) и 461-SS-462(d-Fp). Здесь фрагменты **y1-H₂O-b6** (пик 11) и **y1-NH₃-b7-H₂O** (пик 12) указывают на вовлечённость R197 со стороны пептида d-2B4₁₉₂₋₁₉₇ и со стороны d-Fp₄₅₆₋₄₆₄ а.о. 461S и 462S соответственно. Так как два последних а.о. расположены друг за другом и являются идентичными, то они были объединены в одну группу. Наконец, согласно четвёртому варианту, включающему пики 1, 3, 4, 6, 13, 20, 23), линкерная группа располагается между F195(d-2B4) и S463(d-Fp). На это указывает то, что фрагментация пептида d-2B4₁₉₂₋₁₉₇ оканчивается именно на F195 (фрагменты **b4S** (пик 3) и **b4-NH₃-y8** (пик 20)), а фрагментация d-Fp₄₅₆₋₄₆₄ на S463 (**y2-H₂O-S** (пик 1)).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Известно, что d-Fp и d-b5 взаимодействуют посредством случайных столкновений, а не через образование биоспецифических комплексов [22]. В нашей работе облучение смеси этих белков в присутствии ДТВРА не приводило к появлению комплексов d-Fp/d-b5, что согласуется с вышеизложенным и свидетельствует о биологической специфичности комплексов d-2B4/d-Fp, стабилизированных этим фотокросслинкером.

Для того, чтобы, представить пространственную организацию взаимодействующих участков белковых поверхностей, мы применили полученные выше результаты к трехмерным моделям цитохрома P450 2B4 [16] и NADPH:цитохром P450редуктазы [9], полученным с помощью PCA. На рисунках 4 и 5 приведены эти модели и обозначены ключевые а.о. сайтов взаимодействия d-2B4 с d-Fp, взятые из таблицы 1, соответственно. Основываясь на них, рассмотрим топологию, роль гидрофобных и электростатических сил в комплексообразовании для каждого найденного сайта взаимодействия d-2B4 с d-Fp в отдельности.

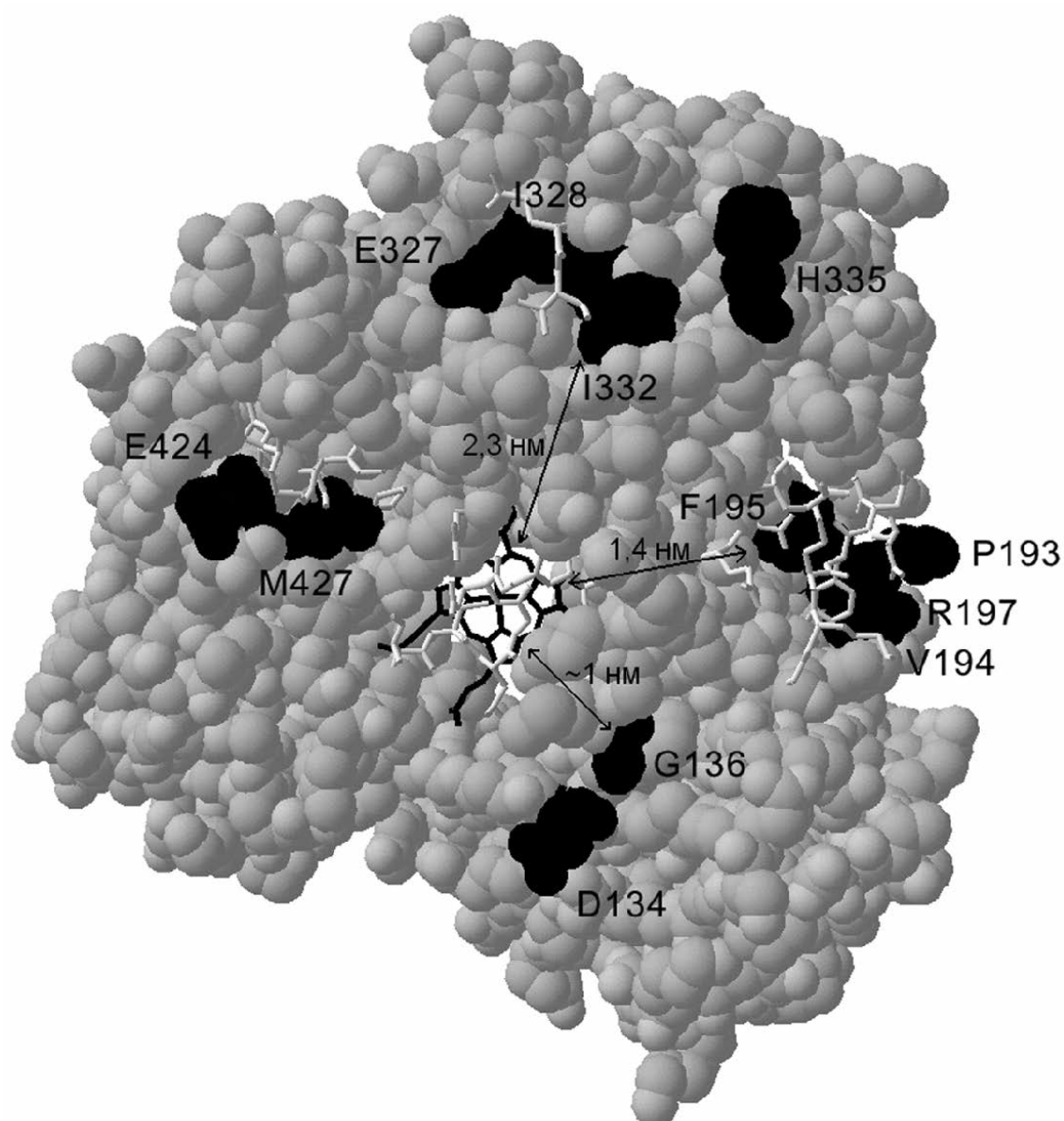


Рисунок 4.
Структурная модель цитохрома P450 2B4 ([16]). Отмечены ключевые а.о. сайтов связывания d-2B4 с d-Fp через ДТВРА.

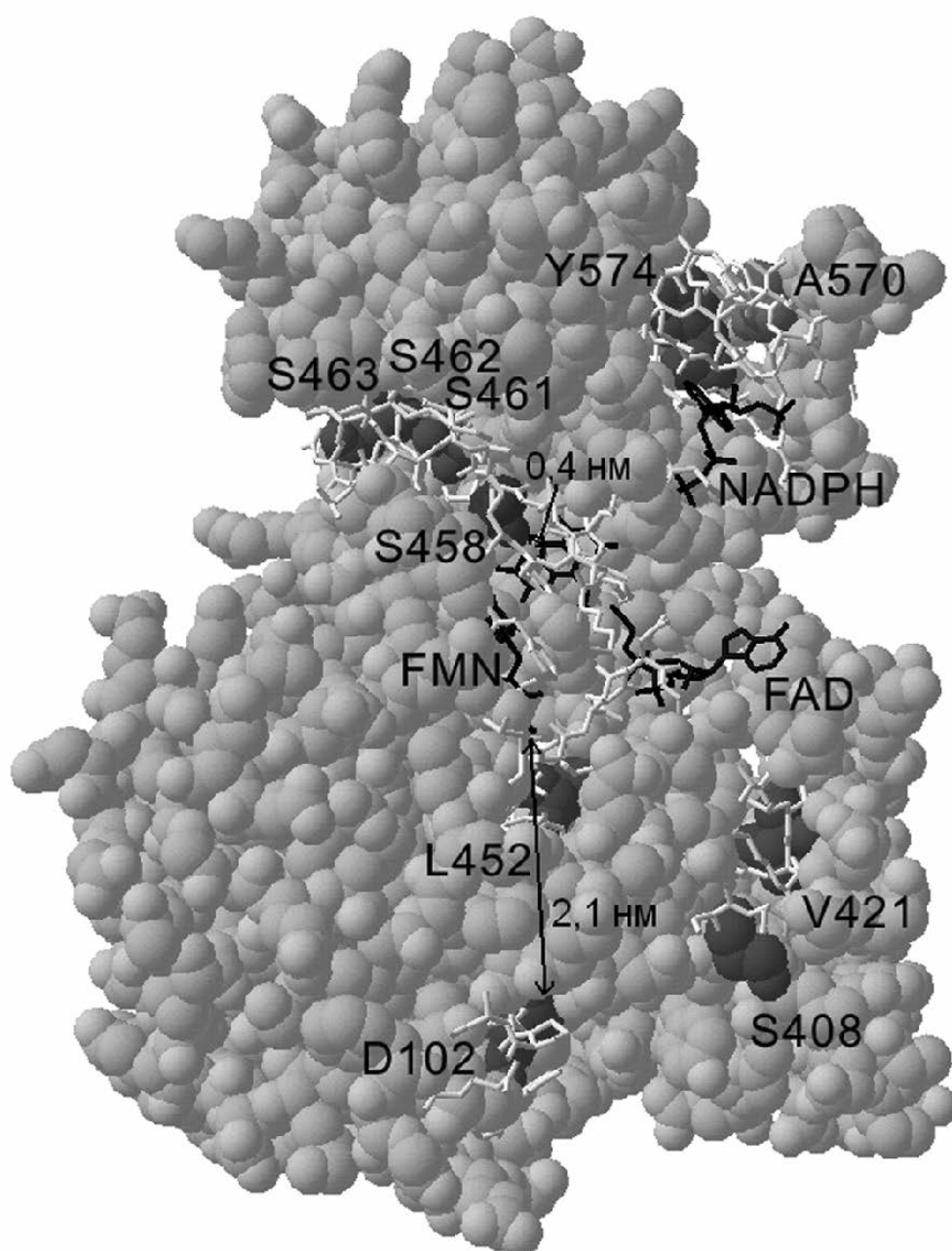


Рисунок 5.

Структурная модель NADPH:цитохром P450 редуктазы ([9]). Отмечены ключевые а.о. сайтов связывания d-Fp с d-2B4 через DTBPA.

Сайт 1 включает пептиды d-2B4 192-DPVFLR-197 и d-Fp 456-YYSIASSSK-464. Первый пептид находится в составе F-спирали и удален от гема на 1,4 нм. За исключением концевых, его а.о. гидрофобны и не заряжены. Этот пептид окружают ряд диаминомонокарбоновых и моноаминодикарбоновых а.о. (D200, D189, K191, R186, K187, E240 и R236). Пептид d-Fp₄₅₆₋₄₆₄ формирует 13-ый β -тяж и участок с неупорядоченной вторичной структурой в составе FAD-связывающего домена. Его а.о. 456-YYs-458 расположены в непосредственной близости от FAD (0,38-0,46 нм). А.о. 454-458 этого пептида экспонированы в полость междоменной щели, а.о. 459-462 лежат внутри белковой глобулы, а K464 и S463 – на наружную поверхность белка. 13-ый β -тяж d-Fp, также как и d-2B4₁₉₃₋₁₉₆, практически полностью состоит из гидрофобных и незаряженных а.о. Так как мы наблюдали вовлечение а.о. d-Fp S458 в ковалентное связывание с d-2B4, и в то же время S458 находится в глубине междоменной щели d-Fp с высотой 1,1 нм, а длина нанозонда-кросслинкера составляет ~1,6 нм, что достаточно для закоривания d-2B4 этим зондом, то можно сделать следующий вывод: d-2B4 образует комплекс с d-Fp, который стабилизируется кросслинкером и имеет контактную область на доступной поверхности глобулы d-Fp, включающую её а.о., которые в силу ряда причин не могли быть эффективно модифицированы DTBPA.

Сайт 2 включает пептиды d-2B4 423-NEGFMPFSLGK-433 и d-Fp 102-DANRYGMR-109. Первый пептид расположен между β -доменом и L-спиралью цитохрома. В непосредственной близости от гема лежат а.о. F429 и S430 на расстоянии 0,5 и 0,3 нм, соответственно. В составе d-2B4₄₂₃₋₄₃₃ преобладают гидрофобные и незаряженные а.о., которые выстилают небольшую полость на поверхности белка, окружённую преимущественно положительно заряженными а.о. (R85, H354, K421, R422, K433, R434, R443, E424, E439). Ранее было показано, что мутации R422A, K433A и R434A вызывают многократное повышение константы диссоциации комплекса d-2B4/d-Fp [19]. Пептид d-Fp₁₀₂₋₁₀₉ расположен между B-спиралью и 2-ым β -тяжем и входит в состав FMN-связывающего домена, притом на значительном удалении от FMN (2,1 нм). На белковой поверхности в области расположения этого пептида можно выделить кластер диаминомонокарбоновых а.о. (R78, R97, K100, H103, R104 и R108) за счёт которых эта область несёт высокую плотность положительных зарядов.

Сайт 3 включает пептиды d-2B4 327-EIEQVIGSHR-336 и d-Fp 452-LQARYYSIASSSK-464. Первый пептид входит в состав J-спирали (а.о. 327-331), остальная его часть не имеет упорядоченной вторичной структуры. Он расположен на значительном удалении от гема (2,3 нм). В состав d-2B4₃₂₇₋₃₃₆ входят 2 моноаминодикарбоновых, 2 диаминомонокарбоновых и 3 сугубо гидрофобных а.о. Незаряженные и гидрофобные а.о. этого пептида формируют область, окружённую как положительно, так и отрицательно заряженными а.о., причем первые преобладают. Пептид d-Fp₄₅₂₋₄₆₄ входит в состав FAD-связывающего домена, его а.о. 452-458 формируют 13-ый β -тяж. Его а.о. 456-YYs-458 расположены в непосредственной близости от FAD. А.о. 452-458 этого пептида экспонированы в полость междоменной щели d-Fp, а K464 и S463 – на наружную поверхность d-Fp. Так как мы наблюдали вовлечение а.о. d-Fp L452 в ковалентное связывание с d-2B4, то это означает, что в данном случае, при образовании комплекса d-2B4/d-Fp, происходит изменение структуры d-Fp при внедрении цитохрома в её междоменную щель.

Сайт 4 включает пептиды d-2B4 324-VQKEIEQVIGSHR-336 и d-Fp 570-AAEDYLYREELAGFQK-585. Первый пептид входит в состав J-спирали (а.о. 324-331), остальная его не имеет упорядоченной вторичной структуры. Он расположен на значительном удалении от гема (2,3 нм). В состав d-2B4₃₂₇₋₃₃₆ входят 2 моноаминодикарбоновых, 3 диаминомонокарбоновых и 4 сугубо гидрофобных а.о. Незаряженные и гидрофобные а.о. этого пептида

формируют область, окружённую как положительно, так и отрицательно заряженными а.о., причем первые преобладают. Пептид d-Fp₅₇₀₋₅₈₅ входит в состав NADPH-связывающего домена, его а.о. 577-585 формируют Р-петлю. В состав d-Fp₅₇₀₋₅₈₅ входят 4 моноаминодикарбоновых, 2 диаминомонокрбоновых и 3 сугубо гидрофобных а.о., причём последние не экспонированы на поверхность белковой глобулы. Так как анализ гомодимеров d-Fp позволил выявить ковалентно связанную линкером пептидную пару d-Fp₂₉₁₋₂₉₈ - d-Fp₅₇₀₋₅₇₇, то это свидетельствует о том, что пептид d-Fp₅₇₀₋₅₇₇ локализован в области конкурентного связывания редуктазы и P450 2B4.

Сайт 5 включает пептиды d-2B4 134-DFGMGK-139 и d-Fp 406-MASSSGEGKELYLSWVVEAR-425. Первый пептид не имеет упорядоченной вторичной структуры и расположен между спиралями С и D на расстоянии от гема в 0,9 нм. Он участвует в образовании небольшой полости, обращённой к дистальной поверхности гема. Основываясь на различиях открытой конформации цитохрома P450 2B4 и закрытой цитохрома P450 2C5, в работе [16] этот участок полипептидной цепи d-2B4 был охарактеризован как вовлечённый в связывание с редокс-партнёрами, в том числе и с d-Fp. Пептид d-Fp₄₀₆₋₄₂₅ входит в состав связующего (connecting) домена и включает в себя К-спираль, формирующую выступ на белковой поверхности. В непосредственной близости от а.о. d-Fp S409, K414, L418 находится кластер моноаминодикарбоновых аминокислот (213-EED-215), мутагенез которого оказывает существенное влияние на восстановление цитохрома с [17]. R425 находится в непосредственной близости от аденилового кольца FAD, а V421 – напротив кластера 207-DDD-209 на расстоянии 1 нм, мутагенез которого оказывает существенное влияние на N-деметилирование бензфетамина цитохромом P450 [17]. Большинство а.о. этих пептидов относится к гидрофобным и незаряженным. Так как а.о. d-Fp, непосредственно участвующие в ковалентной стабилизации комплекса d-2B4/d-Fp, экспонированы в полость междоменной щели, то в зону межбелкового контакта могут входить поверхностные а.о. d-Fp, окружающие её междоменную щель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. В работе было выявлено несколько мест связывания d-2B4 и d-Fp. Найденные сайты связывания этих партнеров не образуют компактного кластера на их поверхности, что указывает на формирование нескольких типов гетеродимеров d-2B4/d-Fp мономеризованной с помощью Эмульгена-913 цитохром P450 2B4 – содержащей системе, наряду с образованием комплексов d-2B4/d-2B4 и d-Fp/d-Fp. Основную роль в комплексообразовании, судя по аминокислотному составу ковалентно связанных пептидов и их окружения, играют гидрофобные силы для большинства найденных сайтов, однако в ряде случаев есть основания предполагать существенный вклад взаимодействий между заряженными а.о. белков, как отталкивающего, так и притягивающего характера. Так как процент покрытия первичной последовательности исследованных белков в наших экспериментах не достигал и 40%, мы можем полагать, что идентифицировали только часть сайтов их взаимодействия.

Авторы выражают благодарность д.б.н. И.И. Карузиной, к.б.н. Г.П. Кузнецовой и к.б.н. Н.Ф. Саменковой за выделение и очистку белков, используемых в работе, а также С.А. Гусеву за помощь при создании алгоритма обработки данных.

Работа была выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (Роснауки) в рамках ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2012 годы. ГК № 02.552.11.7060; 06-04-08057-ОФИ, программы "ПРОТЕОМИКА В МЕДИЦИНЕ И БИОТЕХНОЛОГИИ", Федерального агентства по науке и инновациям (Роснауки) в рамках ФЦНТП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" ГК № 02.512.11.2334, от 1 июня 2009 г., РФФИ № 09-04-12113-офи_м.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Porter T.D., Coon M.J.* (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 13469-13472.
2. *Gotoh O.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 83-90.
3. *Guengerich F.P.* (2001) in: *Cytochrome P450. Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics* (Ioannides C. ed.), John Wiley Sons Ltd.
4. *Archakov A.I., Bachmanova G.P.* (1990) *Cytochrome P450 and active oxygen*. Taylor and Francis, N.Y.
5. *Imai Y.* (1981) *J. Biochem.*, **89**, 351-362.
6. *Mayuzumi H., Shimizu T., Sambongi C., Hiroya K., Hatano M.* (1994) *Arch. Biochem. Biophys.*, **310**, 367-372.
7. *Gruenke L.D., Konopka K., Cadieu M., Waskell L.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 24707-24718.
8. *Vergeres G., Waskell L.* (1995) *Biochimie (Paris)*, **77**, 604-620.
9. *Wang M., Roberts D.L., Paschke R., Shea T.M., Masters B.S.S., Kim J.-J.P.* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **94**, 8411-8416.
10. *Dean W.L., Gray R.D.* (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 14679-14685.
11. *Wagner S.L., Dean W.L., Gray R.D.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 2390-2395.
12. *Lu A.Y., Levin W., Kuntzman R.* (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 266-272.
13. *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.
14. *Kanaeva I.P., Nikityuk O.V., Davydov D.R., Dedinskii I.R., Koen Y.M., Kuznetsova G.P., Skotselyas E.D., Bachmanova G.I., Archakov A.I.* (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**, 403-412.
15. *Chang Y.-T., Stiffelman O.B., Vakser I.A., Loew G.H., Bridges A., Waskell L.* (1997) *Protein Engineering*, **10**, 119-129.
16. *Scott E.E., He Y.A., Wester M.R., White M.A., Chin C.C., Halpert J.R., Johnson E.F., Stout C.D.* (2003) *PNAS*, **100**, 13196-13201.
17. *Shen A.L., Kasper C.B.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 27475-27480.
18. *Lehnerer M., Schulze J., Achterhold K., Lewis D.F., Hlavica P.* (2000) *J. Biochem. (Tokyo)*, **127**, 163-169.
19. *Bridges A., Gruenke L., Chang Y.-T., Vakser I.A., Loew G., Waskell L.* (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 17036-17049.
20. *Tamburini P.P., Schenkman J.B.* (1986) *Mol. Pharmacol.*, **30**, 178-185.
21. *Voznesensky A.I., Schenkman J.B.* (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 14669-14676.
22. *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.
23. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Gnedenko O.V., Pozdnev V.F., Shumyantseva V.V., Samenkova N.F., Kuznetsova G.P., Tereza A.M., Schmid R.D., Archakov A.I.* (2001) *J. Mol. Recognit.*, **14**, 185-196.
24. *Muller E.-C., Lapko A., Otto A., Muller J.J., Ruckpaul K., Heinemann U.* (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 1837-1843.
25. *Gao Q., Doneanu C.E., Shaffer S.A., Adman E.T., Goodlett D.R., Nelson S.D.* (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 20404-20417.
26. *Mikkelsen R.B., Wallach D.F.* (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7413-7416.
27. *Dentler W.L., Pratt M.M., Stephens R.E.* (1980) *J. Cell. Biol.*, **84**, 381-403.
28. *Zakowski J.J., Wagner R.R.* (1980) *J. Virol.*, **36**, 93-102.
29. *Meisenheimer K.M., Koch T.H.* (1997) *Critical Reviews in Biochem. and Mol. Biol.*, **32**(2), 101-140.
30. *Karuzina I.I., Zgoda V.G., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I.* (1999) *Free Rad. Biol. Med.*, **26**, 620-632.
31. *Канаева И.П., Скоцеляс Е.Д., Кузнецова Г.П., Антонова Г.Н., Бачманова Г.И.* (1985) *Биохимия*, **50**, 1382-1388.

32. Spatz L., Strittmatter P. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **68**, 1042-1046.
33. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, 680-685.
34. Shevchenko A., Keller P., Scheiffele P., Mann M., Simons K. (1997) Electrophoresis, **18**, 2591-2600.
35. Kuznetsov V.Yu., Ivanov Yu.D., Archakov A.I. (2004) Proteomics, **4**, 2390-2396
36. Иванов Ю.Д., Иванов А.В., Петушкова Н.А., Гара О.Г., Кузнецов В.Ю., Подоплелов А.В., Арчаков А.И. (2008) Биомед. химия, **54**, 435-444.

Поступила: 09. 07. 2008.

**MASS-SPECTROMETRIC IDENTIFICATION OF INTERACTION SITES FOR
CYTOCHROME P450 2B4/NADPH CYTOCHROME P450 REDUCTASE**

A.V. Ivanov, A.T. Kopylov, V.G. Zgoda, I.Yu. Toropygin, E.V. Khrjapova, Yu.D. Ivanov

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

We determined the interaction sites of the cytochrome P450's protein-partners: 2B4 (d-2B4) and NADPH-cytochrome P450 of reductase (d-Fp).

While in operation, these proteins are forming the complexes. We used 4-4'-dithio(bisphenyl)azide linker for non-specific covalent coupling of d-2B4 complexes with d-Fp in Emulgen-913 - monomerized system. Covalently-linked peptides in this complex were identified with ESI-MS/MS. Several sites of these proteins' binding with each other were revealed. Based on them, a model of intermolecular protein interactions was created. The model includes 5 cross-linker-stabilized contact sites of d-2B4 with d-Fp involving the following peptides of d-2B4 and d-Fp: 1) d-2B4423-433 и d-Fp 102-109; 2) d-2B4324-336 и d-Fp570-585; 3) d-2B4327-336 и d-Fp452-464; 4) d-2B4 192-197 и d-Fp456-464; 5) d-2B4 134-139 и d-Fp406-425.

Herein, in the latter two cases, the peptides of d-Fp are located in their inter-domain slit and stabilize protein-protein complex via nanoprobe cross-linker; therefore, the formation of d-2B4/d-Fp complexes in these sites may involve aminoacid residues d-Fp456-464 and d-Fp406-425 surrounding inter-domain slit.

Key words: cytochrome P450 2B4, NADPH cytochrome P450 reductase, mass-spectrometry.