

УДК 577.152.3

©Коллектив авторов

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ЦИТОХРОМ Р450 ЗА4 И ЗА5 СИСТЕМАХ

О.В. Гнеденко^{1}, А.С. Иванов¹, Е.О. Яблоков^{1,3}, С.А. Усанов²,
Д.В. Муха², Г.В. Сергеев², А.В. Кузиков¹, Н.Е. Москалева¹, Т.В. Булко¹,
В.В. Шумянцева¹, А.И. Арчаков¹*

¹ФГБУ “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича” Российской академии медицинских наук (ФГБУ “ИБМХ” РАМН) 119121 Москва, ул. Погодинская, 10; факс: 7(495)245-0857; эл. почта: oksana_gnedenko@pochta.ru

²Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

³Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Исследованы межмолекулярные взаимодействия между белками-партнерами монооксигеназной системы биотрансформации лекарственных препаратов: цитохромами Р450 ЗА4 и Р450 ЗА5 и цитохромом b_5 . Цитохромы Р450 ЗА4 и Р450 ЗА5 образуют комплексы с каждой из форм цитохрома b_5 (микросомальная и митохондриальная формы – b_5mc и b_5om и две “химерные” конструкции $b_5(om-mc)$, $b_5(mc-om)$), причем существенное различие наблюдалось только во взаимодействии с b_5om . Определены электроаналитические характеристики электродов с иммобилизованными гемопротеинами: цитохромом Р450 ЗА4, Р450 ЗА5, b_5mc , b_5om , $b_5(om-mc)$ и $b_5(mc-om)$. Электрохимический анализ показал, что все эти белки обладают очень близкими редокс-потенциалами $-0,435$ - $-0,350$ (отн. Ag/AgCl). В то же время, наблюдалось стимулирующее влияние цитохрома b_5mc на электрокаталитические свойства цитохрома Р450 ЗА4.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс (SPR), белок-белковые взаимодействия, цитохромы Р450, цитохром b_5 , электрохимия, электрокатализ, перенос электронов.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохромы Р450, открытые в конце 1950-х [1], являются ключевыми ферментами метаболизма ксенобиотиков (различные экзогенные химические соединения, включая лекарственные препараты и пищевые добавки). Они участвуют в метаболизме ряда эндогенных соединений (жирные кислоты, эйкозаноиды, стероидные гормоны, витамин D, ретиноиды, желчные кислоты). Метаболизм чужеродных соединений, катализируемый цитохромами Р450, в ряде случаев приводит к образованию токсичных метаболитов, влияющих на генетические процессы и канцерогенез [2], что обуславливает их медицинскую значимость.

* - адресат для переписки

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ЦИТОХРОМ P450 3A4 И 3A5 СИСТЕМАХ

Цитохром P450 3A4 является наиболее функционально важным: в настоящее время показано его участие в метаболических превращениях 637 субстратов и не менее 50% применяемых лекарственных препаратов [3]. Цитохром P450 3A5 – близкий гомолог цитохрома P450 3A4. Известно, что цитохром b_5 является физиологически важным эффектором, влияющим на метаболизм лекарственных соединений, протекающий с участием цитохромов P450 семейства 3A [4, 5], поэтому представляет интерес изучение взаимодействий между этими белками с целью получения данных о кинетике образования комплексов и о влиянии цитохрома b_5 на электрокаталитические свойства цитохромов P450.

В последнее время для исследования белок-белковых взаимодействий в системах цитохромов P450 успешно используются оптические биосенсоры [6, 7], которые позволяют определять равновесные, кинетические и термодинамические параметры межмолекулярных взаимодействий. Однако данные о кинетических параметрах взаимодействия цитохромов P450 3A4 и P450 3A5 с цитохромами b_5 в литературе отсутствуют.

Ранее было показано, что цитохромы P450 могут функционировать *in vitro* без белков-партнеров в электрохимической ячейке, где в качестве донора электронов выступает электрод [8, 9]. Такие электрохимические системы на основе рекомбинантных форм цитохромов P450 позволяют стандартизировать формат анализа, так как в них используются только гемопротеины без белков-партнеров и дополнительных соединений-меток, и регистрируется прямой перенос электронов между белком и электродом [10-13].

Перенос электронов в биохимических системах контролирует множество процессов: при регуляции фотосинтеза, при дыхании [14], в ферментативных реакциях [15], при контроле уровня экспрессии генов [16], конформационных изменениях в белок-белковых комплексах [17, 18], регуляции сигнальных путей [19]. Электрохимические методы могут быть применены для исследования образования продуктивных комплексов с реализацией каталитической функции [12, 20, 21].

Целью данной работы являлось определение кинетических констант и равновесных констант диссоциации комплексов цитохромов P450 3A4 и P450 3A5 с цитохромами b_5 с помощью оптического биосенсора, исследование окислительно-восстановительных потенциалов гемопротеинов электрохимическими методами, а также анализ влияния белков редокс-партнёров на каталитическую активность цитохрома P450 3A4.

МЕТОДИКА.

Рекомбинантные белки. Микросомальный цитохром b_5 (b_5mc) (256 мкМ), цитохром b_5 внешней мембраны митохондрий (b_5om) (239 мкМ), “химерные” конструкции $b_5(om-mc)$ (180 мкМ) и $b_5(mc-om)$ (573 мкМ), цитохром P450 3A4 (165 мкМ) и цитохром P450 3A5 (161 мкМ) были экспрессированы и выделены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. $b_5(om-mc)$ – химерный белок, состоящий из N-гидрофильного домена цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий и C-гидрофобного домена микросомального цитохрома b_5 . $b_5(mc-om)$ – химерный белок, состоящий из N-гидрофильного домена микросомального цитохрома b_5 и C-гидрофобного домена цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий.

Химические реактивы. Следующие реагенты были получены от фирмы “GE Healthcare” (США): HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% детергента P20, 10 мМ HEPES, pH 7,4); 10 мМ ацетатный буфер, pH 4,0; набор

реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминокгруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl, N-гидроксисукцинимид, 1 М этаноламин-HCl, pH 8,5). Остальные реактивы аналитической чистоты, в том числе бромид дидодецилдиметиламмония (DDAB), были получены от фирмы "Sigma-Aldrich" (США).

Оборудование. Эксперименты по исследованию белок-белковых взаимодействий выполняли на оптическом SPR-биосенсоре Biacore T200 ("GE Healthcare"). Все измерения были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5 ("GE Healthcare"), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана.

Анализ белок-белковых взаимодействий с помощью оптического биосенсора. Иммобилизацию b_5 mc, b_5 от, b_5 (от-mc) и b_5 (mc-от) выполняли по стандартной методике [22].

Взаимодействие цитохромов P450 3A4 и P450 3A5 с иммобилизованными цитохромами b_5 исследовали в диапазонах концентраций от 0,1 мкМ до 10 мкМ и от 0,05 мкМ до 10 мкМ, соответственно. В качестве рабочего буфера использовали HBS-буфер. После пропускания каждого образца цитохромов в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин поверхность чипа регенерировали буфером, содержащим 0,2% CHAPS, 1 М NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7,4, в течение 0,5-1 мин при скорости потока 50 мкл/мин. Канал без иммобилизованного белка использовали в качестве контрольного.

Расчёт кинетических констант и равновесных констант диссоциации (K_D) белковых комплексов выполняли с помощью программы BIAevaluation Version 4.1 ("GE Healthcare").

Электрохимические измерения выполняли с помощью потенциостата AUTOLAB PGSTAT12 ("Eco Chemie", Нидерланды), снабжённого программным обеспечением GPES. Все измерения выполняли при комнатной температуре, в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,4. В работе использовали трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП "АВТОКОМ", Россия, <http://www.avtocom-moscow.ru>); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами (графит фирмы "Achison", США), и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы приведены относительно хлорсеребряного Ag/AgCl электрода сравнения.

Цикловольтамперограммы (ЦВА) регистрировали при скорости развёртки от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА) – восстановление: начальный потенциал +100 мВ, конечный потенциал -600 мВ; окисление: начальный потенциал -600 мВ, конечный потенциал +100 мВ; шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц.

Для приготовления электродов на поверхность рабочего графитового электрода наносили 1 мкл 0,1 М DDAB в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин) наносили 1 мкл исследуемого гемопротейна соответствующей концентрации. Электроды оставляли на 12 ч при +4°C во влажной камере, предотвращающей полное высушивание электродов.

HPLC/MS анализ. HPLC анализ проводили на колонке Zorbax SB C18 ("Agilent Technologies, Inc.", США). Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью масс-спектрометра с тройным квадруполем с электроспейной ионизацией 6410 triple-quadrupole mass spectrometer ("Agilent Technologies, Inc.")

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ЦИТОХРОМ Р450 3А4 И 3А5 СИСТЕМАХ

Для калибровки был использован стандартный раствор 6 β -гидрокситестостерона (1 мкг/мл. Количественная оценка проводилась SRM методом: m/z 289,2 \rightarrow 109,1 для тестостерона, (CE 30); m/z 305,2 \rightarrow 269,2 для 6 β -гидрокситестостерона (CE 20).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

1.1. Исследование белок-белковых взаимодействий методом поверхностного плазмонного резонанса.

Было исследовано взаимодействие цитохромов Р450 3А4 и Р450 3А5 с иммобилизованными в разных каналах оптического биосенсора b_5mc , b_5om , $b_5(om-mc)$ и $b_5(mc-om)$. Обнаружено, что цитохромы Р450 3А4 и Р450 3А5 образуют комплексы с каждым из иммобилизованных белков и наиболее прочными являются их комплексы с b_5mc и химерным белком $b_5(mc-om)$ (табл. 1 и 2).

Таблица 1. Константы скоростей образования (k_{on}), диссоциации (k_{off}) и равновесные константы диссоциации (K_D) комплексов цитохрома Р450 3А4 с различными формами цитохрома b_5 .

Иммобилизованный белок	$k_{on}, M^{-1} c^{-1}$	k_{off}, c^{-1}	K_D, M
b_5mc	$(7,7 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(2,32 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$(3,04 \pm 0,05) \cdot 10^{-7}$
b_5om	$(2,62 \pm 0,06) \cdot 10^3$	$(1,43 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	$(5,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$
$b_5(om-mc)$	$(1,84 \pm 0,05) \cdot 10^3$	$(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(1,74 \pm 0,07) \cdot 10^{-6}$
$b_5(mc-om)$	$(7,16 \pm 0,06) \cdot 10^3$	$(2,28 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	$(3,18 \pm 0,05) \cdot 10^{-7}$

Таблица 2. Константы скоростей образования, диссоциации и равновесные константы диссоциации комплексов цитохрома Р450 3А5 с различными формами цитохрома b_5 .

Иммобилизованный белок	$k_{on}, M^{-1} c^{-1}$	k_{off}, c^{-1}	K_D, M
b_5mc	$(1,89 \pm 0,05) \cdot 10^4$	$(2,61 \pm 0,02) \cdot 10^{-3}$	$(1,38 \pm 0,04) \cdot 10^{-7}$
b_5om	$(0,71 \pm 0,03) \cdot 10^3$	$(4,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(6,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$
$b_5(om-mc)$	$(1,44 \pm 0,03) \cdot 10^3$	$(3,39 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$	$(2,35 \pm 0,07) \cdot 10^{-6}$
$b_5(mc-om)$	$(1,72 \pm 0,04) \cdot 10^4$	$(2,79 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	$(1,62 \pm 0,04) \cdot 10^{-7}$

Наблюдалось различие во взаимодействии b_5om с цитохромами Р450 3А4 и Р450 3А5: комплексы с цитохромом Р450 3А4 образуются в 3,5 раза быстрее, а диссоциируют в 3 раза медленнее. В результате K_D комплексов цитохрома Р450 3А4 с b_5om на порядок ниже, чем комплексов цитохрома Р450 3А5 с этим же белком. Цитохром Р450 3А4 образует наименее прочные комплексы с химерным белком $b_5(om-mc)$, тогда как в случае цитохрома Р450 3А5 такими являются комплексы с b_5om .

1.2. Исследование окислительно-восстановительных потенциалов гемопротеинов электрохимическими методами.

Так как одним из основных свойств цитохром P450-содержащей системы является перенос электронов, были исследованы окислительно-восстановительные потенциалы белков – участников биотрансформации лекарственных препаратов, а также двух “химерных” белков $b_5(om-mc)$ и $b_5(mc-om)$. Редокс активность железа гема служит своего рода маркером гемопротеинов и даёт возможность, как для их непосредственного определения, так и для регистрации процессов воздействия извне на активный центр фермента.

Мембрана бромида дидодецилдиметиламмония (DDAB) содержит достаточное количество воды для поддержания структуры гемопротеинов и обеспечивает фиксацию ферментов на графитовом печатном электроде. DDAB является биосовместимым материалом и не вызывает инактивацию гемопротеинов [23]. Кроме того, было отмечено, что при иммобилизации в мембраноподобной жидкокристаллической пленке дидодецилдиметиламмоний бромида константа скорости переноса электрона (K_s) в 1000 раз больше по сравнению с водным раствором гемопротеинов [24].

Для исследования электроаналитических характеристик использовали вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью цикловольтамперометрии ЦВА (рис. 1).

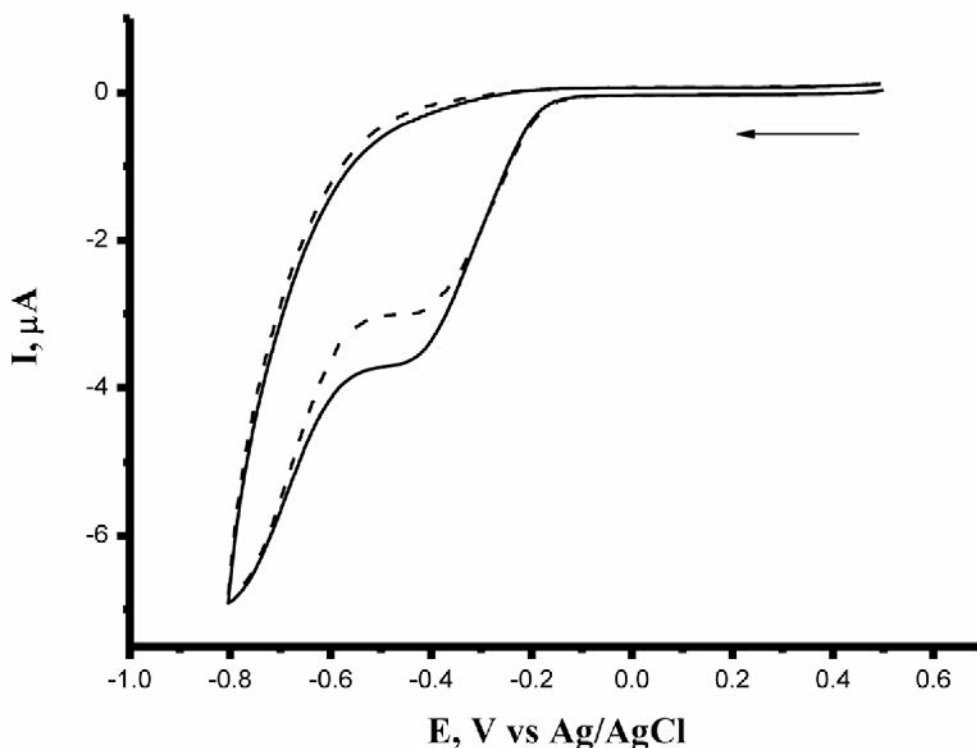


Рисунок 1.

Цикловольтамперограммы (ЦВА) DDAB/P450 3A4 (—) и DDAB/цитохром b_{5om} (- -).

Измерения проводились в горизонтальном режиме.

Инкубационная смесь: 100 мкл электролитного буфера pH 7,4.

Диапазон сканирования от +0,5 до -0,8 В, скорость развёртки потенциала 0,05 В/с.

БЕЛОК-БЕЛКОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ЦИТОХРОМ P450 3A4 И 3A5 СИСТЕМАХ

По данным циклической вольтамперометрии было рассчитано количество электроактивного гемопротейна для электродов с иммобилизованными P450 3A4, P450 3A5, b_5mc , b_5om , $b_5(om-mc)$ и $b_5(mc-om)$ с использованием уравнения (1) [12, 25]:

$$I_{pa} = (n^2 \cdot F^2 / 4RT) \cdot v \cdot A \cdot \Gamma \quad (1),$$

где: v – скорость сканирования, A – площадь электрода, Γ – поверхностная концентрация электроактивного белка, F – константа Фарадея (96485 Кл/моль).

Результаты расчётов приведены в таблице 3.

Таблица 3. Количественные характеристики ЦВА электродов с иммобилизованными гемопротейнами.

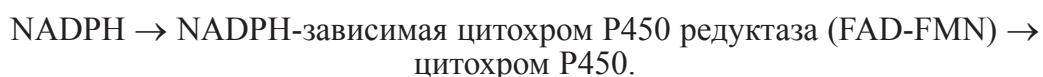
Гемопротейн	Потенциал пика, В	Площадь пика, Кл	Поверхностная концентрация Fe^{+2} - O_2 комплекса, моль/ cm^2
Цитохром b_5om восстановительный пик	-0,340±0,005	(1,80±0,10)×10 ⁻⁷	(5,94±0,20)×10 ⁻¹²
Цитохром b_5mc восстановительный пик	-0,350±0,005	(2,12±0,10)×10 ⁻⁷	(6,99±0,20)×10 ⁻¹²
Цитохром $b_5(om-mc)$ восстановительный пик	-0,405±0,005	(1,78±0,20)×10 ⁻⁷	(5,87±0,10)×10 ⁻¹²
Цитохром $b_5(mc-om)$ восстановительный пик	-0,405±0,005	(2,33±0,10)×10 ⁻⁷	(7,69±0,10)×10 ⁻¹²
Цитохром P450 3A5 восстановительный пик	-0,435±0,005	(3,07±0,10)×10 ⁻⁷	(1,01±0,20)×10 ⁻¹¹
Цитохром P450 3A4 восстановительный пик	-0,403±0,005	(3,23±0,10)×10 ⁻⁷	(1,07±0,30)×10 ⁻¹¹

Примечание. В таблице приведены результаты 3-5 измерений. Скорость развёртки потенциала 0,05 В/с.

Как следует из таблицы 3, восстановительные потенциалы цитохромов P450 3A4 и 3A5 смещены в катодную область по сравнению с потенциалами цитохромов b_5 (митохондриального, микросомального): восстановительный потенциал цитохрома P450 3A4 $E_{red} = -0,403 \pm 0,005$ В, а цитохрома P450 3A5 $E_{red} = -0,435 \pm 0,005$ В, соответственно. “Химерные”, то есть неприродные цитохромы $b_5(om-mc)$ и $b_5(mc-om)$ имеют близкий

к цитохрому P450 3A4 редокс-потенциал: $E_{red} = -0,405 \pm 0,005$ В. Полученные данные свидетельствуют о невозможности прямого переноса электронов с цитохромов b_5 на цитохромы P450. Таким образом, несмотря на регистрацию комплексов методом плазмонного резонанса (табл. 1 и 2), электрохимический анализ редокс-потенциалов исследуемых гемопротеинов выявил отсутствие электронодонорных свойств у цитохромов b_5 в качестве прямых восстановителей цитохромов P450.

В природной системе перенос электронов осуществляется в соответствии со схемой:



В электрохимических системах и донором электронов и медиатором служит электрод в соответствии со схемой:



Роль цитохрома b_5 в цитохром P450-содержащих системах обсуждается с различных позиций [26-33]. Цитохром b_5 образует специфические белковые комплексы, в которых осуществляется перенос электронов, с цитохромом c [34] и своими физиологическими партнерами – NADH-цитохром b_5 редуктазой, NADPH-цитохром P450 редуктазой и различными формами цитохрома P450 [33].

Электрохимические методы позволяют исследовать не только редокс-потенциалы исследуемых белков, но и электрокаталитические процессы, а также влияние различных регуляторов, медиаторов или ингибиторов на такие процессы [11, 12, 20, 21, 35]. В наших экспериментах было исследовано влияние цитохрома b_5mc и цитохрома b_5om на электрокатализ в присутствии субстрата цитохрома P450 3A4 – тестостерона.

Соотношение каталитического тока (в присутствии субстрата тестостерона) и диффузионного тока в системе CYP3A4 + b_5mc (1:1) составляет $3,99 \pm 0,15$ (рис. 2). Аналогичное соотношение для системы без цитохрома b_5mc (рис. 3) или в присутствии цитохрома b_5om (CYP3A4: b_5om = 1:1) составляет только $2,0 \pm 0,12$ (табл. 4). Это может свидетельствовать о стимулирующем влиянии цитохрома b_5mc на электрокаталитические свойства цитохрома P450 3A4.

Таблица 4. Соотношение каталитического тока I_c и диффузионного I_d тока ЦВА в присутствии 2 мМ тестостерона (Ts) для систем цитохром P450 3A4, цитохром b_5mc или цитохром b_5om .

I_c (CYP3A4+ b_5mc)+Ts/ I_d (CYP3A4+ b_5mc)	I_c (CYP3A4+ b_5om)+Ts/ I_d (CYP3A4+ b_5om)	I_c (CYP3A4)+Ts/ I_d (CYP3A4)
3,99±0,15	2,0±0,12	2,0±0,12

Примечание. В таблице приведены результаты 3 измерений \pm ошибка среднего. Скорость развёртки потенциала 0,05 В/с.

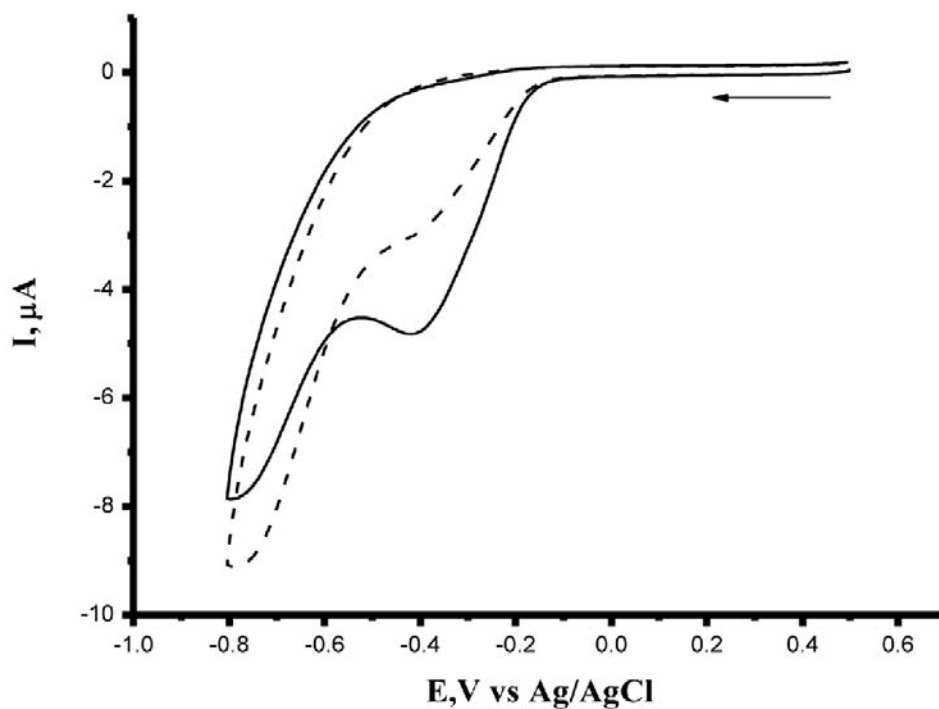


Рисунок 2.

Цикловольтамперограммы DDAB/P450 3A4/*b₅mc* (- -) и DDAB/P450 3A4/*b₅mc* + 2 мМ тестостерон (—). Измерения проводились в горизонтальном режиме.

Инкубационная смесь: 100 мкл электролитного буфера pH 7,4.

Диапазон сканирования от +0,5 до -0,8 В, скорость развёртки потенциала 0,05 В/с.

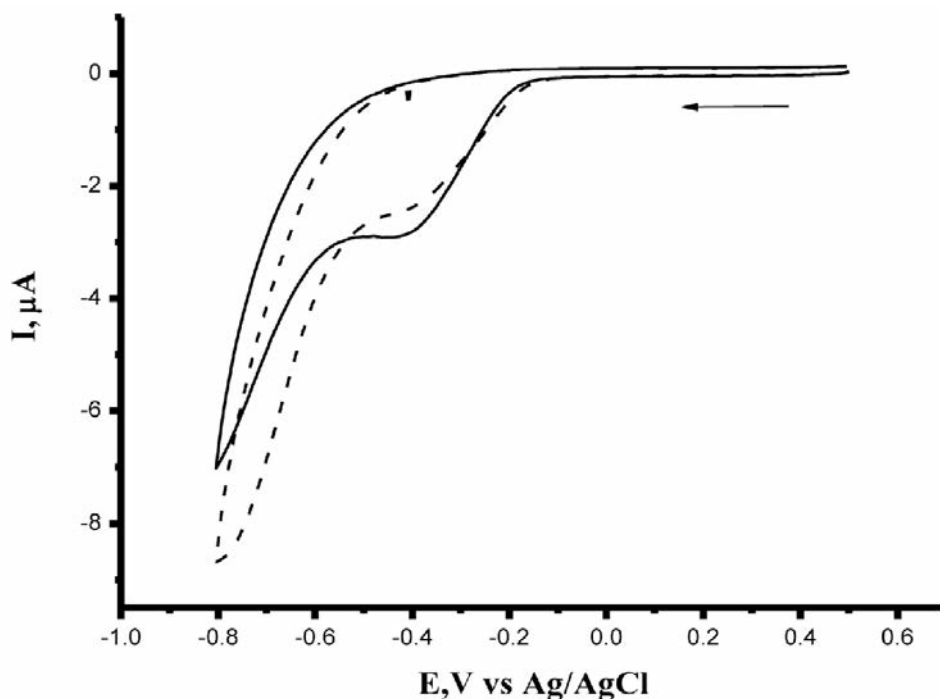


Рисунок 3.

Цикловольтамперограммы DDAB/P450 3A4 (- -) и DDAB/P450 3A4 + 2 мМ тестостерон (—).

Измерения проводились в горизонтальном режиме.

Инкубационная смесь: 100 мкл электролитного буфера pH 7,4.

Диапазон сканирования от +0,5 до -0,8 В, скорость развёртки потенциала 0,05 В/с.

Электрокатализ был подтверждён масс-спектрометрическим анализом продукта ферментативной реакции при контролируемом напряжении ($E = -0,55$ В, 60 мин). В присутствии цитохрома b_5mc система СУР3А4 + b_5mc (1:1) концентрация продукта ферментативной реакции 6 β -тестостерона составляет $9,4 \pm 0,5$ нМ, а без цитохрома b_5mc $7,5 \pm 0,3$ нМ ($n=3$).

Проявление цитохромом b_5mc модулирующих свойств, свойств аллостерического регулятора цитохромов P450, а также влияние на конформацию активного центра обсуждалось многими авторами [27, 29-31, 36]. Цитохром b_5om не оказывает влияния на электрокатализ цитохрома P450 3А4 в присутствии тестостерона. По-видимому, это связано с тем, что b_5om не является физиологическим партнером цитохрома P450 3А4, хотя и образует комплекс, регистрируемый с помощью SPR (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Определены кинетические константы и равновесные константы диссоциации комплексов цитохромов P450 3А4 и P450 3А5 с цитохромами b_5 ; существенное различие наблюдалось только во взаимодействии с b_5om . Электроанализ цитохрома P450 3А4 выявил стимулирующее влияние цитохрома b_5mc на каталитическую активность цитохрома P450 3А4 по отношению к субстрату тестостерону. Такой эффект цитохрома b_5mc может быть связан с эффекторной ролью по типу аллостерической регуляции.

Работа поддержана РФФИ (гранты 13-04-92695, 13-04-40109-Н, 14-04-31816).

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Lewis D.F.V.* (2001) Guide to Cytochrome P450. Structure and function. Taylor and Francis Eds., London and New York.
2. *Archakov A.I., Bachmanova G.I.* (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen. Taylor and Francis, London. UK.
3. *Akiyama I., Tomiyama K., Sakaguchi M., Takaishi M., Mori M., Hosok M., Nagamori S., Shimizu N., Huh N., Miyazaki M.* (2004) Int. J. Mol. Med., **14**, 663-668.
4. *Guengerich F.P.* (1999) Annu Rev. Pharmacol. Toxicol., **39**, 1-17.
5. *Furster C., Wikvall K.* (1999) Biochim. Biophys. Acta., **1437**(1), 46-52.
6. *Ivanov Yu.D., Kanaeva I.P., Karuzina I.I., Usanov S.A., Hui Bon Hoa G., Sligar S.G., Archakov A.I.* (2001) J. Inorg. Biochem., **87**, 175-184.
7. *Раченкова Н.И., Иванов Ю.Д., Скворцов В.С., Иванов А.С., Мольнар А.А., Уи Бон Ва Г., Арчаков А.И.* (2005) Биомед. хим., **51**, 501-512.
8. *Schneider E., Clark D.S.* (2013) Biosens. Bioelectron., **39**, 1-13.
9. *Sadeghi S.A., Fantuzzi A., Gilardi G.* (2011) Biochem. Biophys. Acta. Proteins and Proteomics, **1814**, 237-248.
10. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Rudakov Yu.O., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Lisitsa A.V., Karuzina I.I., Archakov A.I.* (2007) J. Inorg. Biochem., **101**, 859-865.
11. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Suprun E.V., Chalenko Y.M., Vagin M.Yu., Rudakov Yu.O., Shatskaya M.A., Archakov A.I.* (2011) Biochem. Biophys. Acta. Proteins and Proteomics, **1814**, 94-101.
12. *Colas H., Ewen K., Hannemann F., Bistolas N., Wollenberger U., Bernhardt R., de Oliveira P.* (2012) Bioelectrochemistry, **87**, 71-77.

13. Carrara C., Cavallini A., Erokhin V., Albani G., De Micheli G. (2011) Biosens. Bioelectron., **26**, 3914-3919.
14. Neehaul Y., Chen Y., Werner C., Fee J.A., Ludwig B., Hellwig P. (2012) Biochim. Biophys. Acta, **1817**, 1950–1954.
15. Rodrigues J.V., Gomes C.M. (2012) Free Rad. Biol. Med., **53**, 12-19.
16. Yang Y., Xu M., Jun Guo J., Sun G. (2012) Process Biochemistry, in press.
17. Mokdad A., Herrick D.Z., Kahn A.K., Andrews E., Kim M., David S., Cafiso D.S. (2012) J. Mol. Biol. **423**, 818–830.
18. Martin L., Latypova X., Wilson C.M., Magnaudeix A., Perrin M.-L., Yardin C., Terro F. (2013) Ageing Research Reviews, **12**, 289–309.
19. Marozkina N.V., Gaston B. (2012) Biochim. Biophys. Acta, **1820**, 722–729.
20. Scheller F., Wollenberger U., Lei C., Jin W., Ge B., Lehmann C., Lisdat F., Fridman V. (2002) Reviews in Molecular Biotechnology, **82**, 411-424.
21. Schröper F., Baumann A., Offenhäusser A., Mayer D. (2012) Biosens. Bioelectron., **34**, 171–177.
22. Biacore Sensor Surface Handbook (2003) 37.
23. Joseph S., Rusling J.F., Lvov Yu.M., Friedberg T., Fuhr U. (2003) Biochem. Pharmacol., **65**, 1817.
24. Rusling J.F., Nassar A.-E.F. (1993) J. Am. Chem. Soc., **115**, 11891.
25. Instrumental Methods in Electrochemistry, Southampton Electrochemistry Group, Ellis Horwood Limited, 1990.
26. Honkakoski P., Linnala-Kankkunen A., Usanov S.A., Lang M.A. (1992) Biochim. Biophys. Acta, **1122**, 6-14.
27. Im S.-Ch., Waskell L. (2011) Arch. Biochem. Biophys., **507**, 144-153.
28. Yamazaki H., Nakajima M., Nakamura M., Asahi S., Shimada N., Gillami E., Guengerich P., Shimada T., Yokoi T. (1999) Drug Metab. Disposition, **27**, 999-1004.
29. Guryev O.L., Gilep A.A., Usanov S.A., Estabrook R.W. (2001) Biochemistry, **40**, 5018-5031.
30. Hildebrandt A., Estabrook R.W. (1971) Arch. Biochem. Biophys., **143**, 66-79.
31. Hlavica P. (2009) Biotechnology Advances, **27**, 103-121.
32. Schenkman J., Jansson I. (2003) Pharmacol. Ther., **97**, 139-152.
33. Янцевич А.В., Гулеп А.А., Усанов С.А. (2008) Биохимия, **73**, 1368-1381.
34. Seetharaman R., White S., Rivera M. (1999) Biochemistry, **35**, 12455-12463.
35. Morretto L., Bertoncetto P., Vezza F., Ugo P. (2004) Bioelectrochemistry, **66**, 29-34.
36. Lee S.J., Goldstein J.A. Drug Metabolism and Pharmacokinetics (DMPK) Advance Publication by J-STAGE, doi; 10.2133/dmpk.DMPK-12-SH-030.

Поступила: 16. 09. 2013.

PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS OF CYTOCHROMES P450 3A4 AND 3A5 WITH THEIR INTERMEDIATE REDOX PARTNERS CYTOCHROMES b_5

O.V. Gnedenko¹, A.S. Ivanov¹, E.O. Yablokov^{1,3}, S.A. Usanov², D.V. Mukha², G.V. Sergeev², A.V. Kuzikov¹, T.V. Bulko¹, N.E. Moskaleva¹, V.V. Shumyantseva¹, A.I. Archakov¹

¹Orechovich Institute of Biomedical Chemistry of RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; fax: 7(495)245-0857; e-mail: oksana_gnedenko@pochta.ru

²Institute of Bioorganic Chemistry of NAS, Minsk, Belarus

³Engelhardt Institute of Molecular Biology of RAS, Moscow, Russia

Molecular interactions between proteins redox partners (cytochromes P450 3A4, 3A5 and cytochrome b_5) within the monooxygenase system, which is known to be involved in drug biotransformation, were investigated. Human cytochromes P450 3A4 and 3A5 (CYP3A4 and CYP3A5) form complexes with various cytochromes b_5 : the microsomal (b_5mc) and mitochondrial (b_5om) forms of this protein, as well as with 2 “chimeric” proteins, $b_5(om-mc)$, $b_5(mc-om)$. Kinetic constants and equilibrium dissociation constants were determined by the SPR biosensor. Essential distinction between CYP3A4 and CYP3A5 was only observed upon their interactions with cytochrome b_5om . Electroanalytical characteristics of electrodes with immobilized hemoproteins were obtained. The electrochemical analysis of CYP3A4, CYP3A5, b_5mc , b_5om , $b_5(om-mc)$, and $b_5(mc-om)$ immobilized on screen printed graphite electrodes modified with membranous matrix revealed that these proteins have very close reduction potentials -0.435- -0.350 V (vs. Ag/AgCl). Cytochrome b_5mc was shown to be capable of stimulating the electrocatalytic activity of CYP3A4 to testosterone.

Key words: SPR biosensor, protein-protein interactions, cytochromes P450, cytochrome b_5 , electrochemistry, electrocatalysis, electron transfer.