

УДК 577.152.3

©Коллектив авторов

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

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
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 P450 3A4 и P450 3A5 и цитохромом b_5 . Цитохромы P450 3A4 и P450 3A5 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 P450 3A4, P450 3A5, 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 $-0,435 \div -0,350$ (отн. Ag/AgCl). В то же время, наблюдалось стимулирующее влияние цитохрома b_5mc на электрокаталитические свойства цитохрома P450 3A4.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс (SPR), белок-белковые взаимодействия, цитохромы P450, цитохром b_5 , электрохимия, электрокатализ, перенос электронов.

DOI: 10.18097/PBMC20156104468

ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы P450, 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 P450, в ряде случаев приводит к образованию токсичных метаболитов, влияющих на генетические процессы и канцерогенез [2], что обуславливает их медицинскую значимость.

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.

* - адресат для переписки

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-партнеров 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 реактивы были получены от фирмы “GE Healthcare” (США): HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% детергент P20, 10 мМ HEPES, pH 7,4); 10 мМ ацетатный буфер, pH 4,0; набор реактивов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид-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_5mc , b_5om , $b_5(om-mc)$ и $b_5(mc-om)$ 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 гемопротеина соответствующей концентрации. Электроды оставляли на 12 ч при +4°C

во влажной камере, предотвращающей полное высыхание 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 квадруполом с электростатической ионизацией (6410 triple-quadrupole mass spectrometer (“Agilent Technologies, Inc.”))

Для калибровки был использован стандартный раствор 6 β -гидрокситестостерона (1 мкг/мл). Количественную оценку проводили 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

Исследование взаимодействия цитохромов P450 3A4 и P450 3A5 с иммобилизованными в разных каналах оптического биосенсора b_5mc , b_5om , $b_5(om-mc)$ и $b_5(mc-om)$, показало, что цитохромы P450 3A4 и P450 3A5 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).

Выявлены различия во взаимодействии b_5om с цитохромами P450 3A4 и P450 3A5: комплексы с цитохромом P450 3A4 образуются в 3,5 раза быстрее, а диссоциируют в 3 раза медленнее. В результате K_D комплексов цитохрома P450 3A4 с b_5om на порядок ниже, чем комплексов цитохрома P450 3A5 с этим же белком. Цитохром P450 3A4 образует наименее

прочные комплексы с химерным белком $b_5(om-mc)$, тогда как в случае цитохрома P450 3A5 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 бромид 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 плёнке дидодецилдиметиламмоний бромид 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).

Таблица 1. Константы скоростей образования (k_{on}), диссоциации (k_{off}) и равновесные константы диссоциации (K_D) комплексов цитохрома P450 3A4 с различными формами цитохрома b_5 .

Иммобилизованный белок	k_{on} , $M^{-1} \cdot c^{-1}$	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 P450 3A5 с различными формами цитохрома b_5 .

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

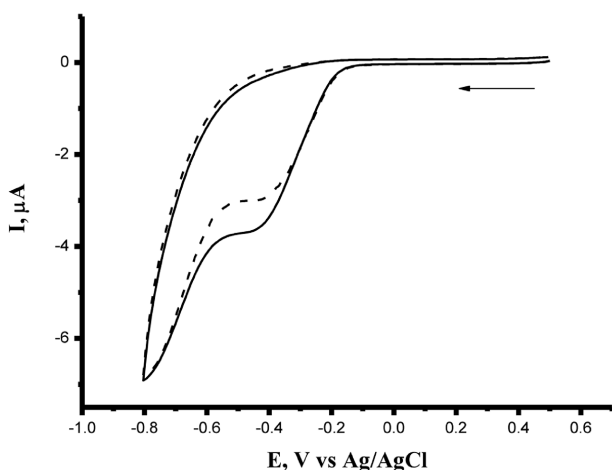


Рисунок 1. Цикловольтамперограммы (ЦВА) DDAB/P450 3A4 (—) и DDAB/цитохром b_{5om} (- -). Измерения проводились в горизонтальном режиме. Инкубационная смесь: 100 мкл электролитного буфера pH 7,4. Диапазон сканирования от +0,5 до -0,8 В, скорость развёртки потенциала 0,05 В/с.

По данным циклической вольтамперометрии было рассчитано количество электроактивного гемопroteина 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]:

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

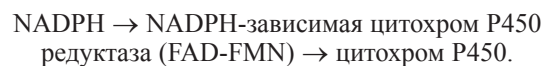
где: v – скорость сканирования, A – площадь электрода, Γ – поверхностная концентрация электроактивного белка, F – константа Фарадея (96485 Кл/моль).

Результаты расчётов приведены в таблице 3.

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 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 гемопroteинов 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 3. Количественные характеристики ЦВА электродов с иммобилизованными гемопroteинами.

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

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

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 трёх измерений ± ошибка среднего. Скорость развёртки потенциала 0,05 В/с.

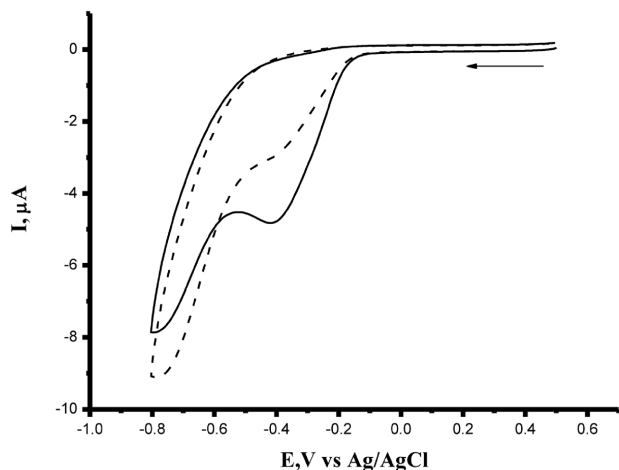


Рисунок 2. Цикловольтамперограммы (ЦВА) DDAB/P450 3A4/ b_5mc (---) и DDAB/P450 3A4/ b_5mc + 2 мМ тестостерон (—). Измерения проводили в горизонтальном режиме. Инкубационная смесь: 100 мкл электролитного буфера pH 7,4. Диапазон сканирования от +0,5 до -0,8 В, скорость развёртки потенциала 0,05 В/с.

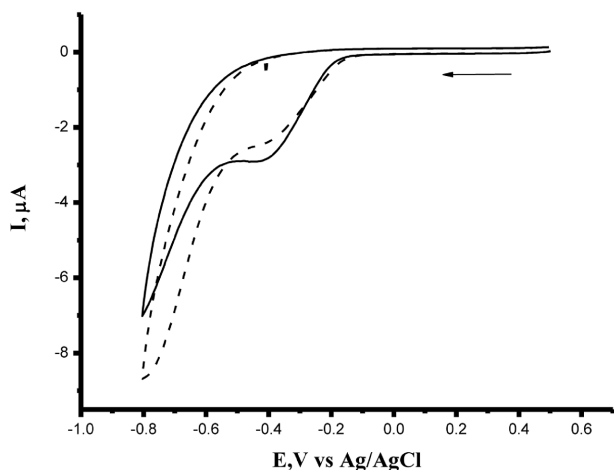


Рисунок 3. Цикловольтамперограммы (ЦВА) DDAB/P450 3A4 (---) и DDAB/P450 3A4 + 2 мМ тестостерон (—). Измерения проводили в горизонтальном режиме. Инкубационная смесь: 100 мкл электролитного буфера pH 7,4. Диапазон сканирования от +0,5 до -0,8 В, скорость развёртки потенциала 0,05 В/с.

Электрокатализ был подтверждён масс-спектрометрическим анализом продукта ферментативной реакции при контролируемом напряжении ($E = -0,55$ В, 60 мин). В присутствии

цитохрома b_5mc (система CYP3A4 + 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 3A4 в присутствии тестостерона. По-видимому, это связано с тем, что b_5om не является физиологическим партнером цитохрома P450 3A4, хотя и образует комплекс, регистрируемый с помощью SPR (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Определены кинетические константы и равновесные константы диссоциации комплексов цитохромов P450 3A4 и P450 3A5 с цитохромами b_5 ; существенное различие наблюдалось только во взаимодействии с b_5om . Электроанализ цитохрома P450 3A4 выявил стимулирующее влияние цитохрома b_5mc на каталитическую активность цитохрома P450 3A4 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

- Lewis D.F.V. (2001) Guide to Cytochrome P450. Structure and function. Taylor and Francis Eds., London and New York.
- Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen. Taylor and Francis, London. UK.
- 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.
- Guengerich F.P. (1999) Annu Rev. Pharmacol. Toxicol., **39**, 1-17.
- Furster C., Wikvall K. (1999) Biochim. Biophys. Acta., **1437**(1), 46-52.
- 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.
- Раченкова Н.И., Иванов Ю.Д., Скворцов В.С., Иванов А.С., Мольнар А.А., Уи Бон Ва Г., Арчаков А.И. (2005) Биомед. химия, **51**, 501-512.
- Schneider E., Clark D.S. (2013) Biosens. Bioelectron., **39**, 1-13.

9. Sadeghi S.A., Fantuzzi A., Gilardi G. (2011) *Biochim. 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) *Biochim. 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*, **47**, 1707-1714.
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 Res. Rev.*, **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. Schrupper F., Baumann A., Offenhäusser A., Mayer D. (2012) *Biosens. Bioelectron.*, **34**, 171-177.
22. *Biacore Sensor Surface Handbook* (2003) p. 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-Kanckunen 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., Гилеп 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., Bertoncello 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

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., 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*₅*mc*) and mitochondrial (*b*₅*om*) 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*₅*om*. Electroanalytical characteristics of electrodes with immobilized hemoproteins were obtained. The electrochemical analysis of CYP3A4, CYP3A5, *b*₅*mc*, *b*₅*om*, *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*₅*mc* was shown to be capable of stimulating the electrocatalytic activity of CYP3A4 in the presence of its substrate testosterone.

Key words: SPR biosensor, protein-protein interactions, cytochromes P450, cytochrome *b*₅, electrochemistry, electrocatalysis, electron transfer.