

©Коллектив авторов

SPR АНАЛИЗ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ С УЧАСТИЕМ ЦИТОХРОМОВ P450 И ЦИТОХРОМА b_5 , ВСТРОЕННЫХ В БИСЛОЙНУЮ ЛИПИДНУЮ МЕМБРАНУ

Л.А. Калужский¹, П.В. Еришов^{1*}, К.С. Курпединов², Д.С. Сонина², Е.О. Яблоков¹,
Т.В. Шкель³, И.В. Гайдукевич³, Г.В. Сергеев³, С.А. Усанов³, А.С. Иванов¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8; *эл. почта: pavel79@inbox.ru

²Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, 125047, Москва, Миусская пл., 9

³Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Беларусь, 220141, Минск, ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5, корп. 2

Выявление новых белок-белковых взаимодействий (ББВ) и характеристика количественных параметров комплексообразования представляет собой одну из центральных задач белковой интерактомики. Данная работа является логическим продолжением цикла наших работ, посвященных исследованию ББВ среди белков цитохром P450-зависимой монооксигеназной системы. С помощью оптического биосенсора поверхностного плазмонного резонанса (SPR биосенсор) был выполнен сравнительный анализ кинетических и равновесных параметров комплексообразования мембрано-связанного гемопротейна цитохрома b_5 с цитохромами P450 в двух разных вариантах иммобилизации белков: 1) ковалентная неориентированная иммобилизация на чипе с карбоксилированным декстраном; 2) нековалентная ориентированная иммобилизация в липидном окружении. Было показано, что во втором случае ББВ характеризовались более высокой аффинностью (в среднем в 2,5 раза) вследствие уменьшения скорости распада комплексов.

Ключевые слова: цитохром b_5 ; цитохром P450; липосомы; белок-белковые взаимодействия; поверхностный плазмонный резонанс; биосенсор; оптический чип CM5 и L1

DOI: 10.18097/PBMC20196505374

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время оптические биосенсоры, работающие на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR биосенсоры), широко применяются для анализа самых различных межмолекулярных взаимодействий, в том числе белок-белковых взаимодействий. При этом самым распространённым и простым способом иммобилизации белка-лиганда является ковалентная неориентированная иммобилизация на оптическом чипе с карбоксилированной декстрановой поверхностью за свободные аминогруппы белка с образованием амидной связи [1, 2]. Менее распространена ориентированная иммобилизация белка-лиганда с помощью специальных меток (биотин, гистидиновый таг) или определённых сайтов вторичной структуры (например, трансмембранный домен). Исследование ББВ с участием мембранных или мембрано-связанных белков, содержащих один или несколько трансмембранных доменов, представляет собой не совсем тривиальную задачу, при решении которой часто требуется создание модели мембранного окружения (липидного бислоя) со встроенным в неё белком. Так, мембранные белки иммобилизовали в сформированные модельные

липидные мембраны, помещённые на твёрдый носитель, например, на поверхность оптического чипа с химической модификацией или без неё [3, 4]. В ряде работ использовали технологию осаждения липидных монослоев Langmuir-Blodgett и Langmuir-Schaefer [5, 6], а также адсорбцию и слияние однослойных липосом [5-7]. При этом многие факторы могут оказывать влияние на формирование бислоя: качество поверхности чипа; состав, pH и ионная сила буфера; температура; липидный состав; размер, гомогенность и концентрация липосом; присутствие двухвалентных ионов [7, 8]. В серии SPR исследований взаимодействий мембранных белков в липидном окружении (в том числе и в составе модельных протеолипосом) [9-14] отмечается влияние слабо контролируемых факторов, которые приводят к значительной вариации получаемых результатов. К таким факторам можно отнести особенности получения суспензии липосом, применяемые детергенты и способы очистки (что влияет на гетерогенность липосом по размерам); неориентированное встраивание белков в липосомы; влияние липидного состава на стабильность протеолипосом; необходимость дополнительных подходов для контроля встраивания белков в липосомы.

Принятые сокращения: ББВ – белок-белковые взаимодействия; БСА – бычий сывороточный альбумин; k_{on} – константа скорости ассоциации комплекса; k_{off} – константа скорости диссоциации комплекса; K_d – константа диссоциации комплекса; RU – (от англ. resonance units) резонансные единицы, 1 RU соответствует связыванию 1 пг материала на 1 мм² поверхности чипа; SPR – (от англ. surface plasmon resonance) поверхностный плазмонный резонанс; pAb – поликлональные антитела; CYB5A – микросомальный цитохром b_5 ; CYP – цитохром P450; SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

Цель настоящей работы – сравнительное SPR исследование ББВ с участием белков P450-зависимой монооксигеназной системы (цитохромы P450 (CYP3A4 и CYP3A5) и цитохром b_5 (CYP5A)) в условиях бислойной липидной мембраны. Для этого использовали разные способы иммобилизации белков на стандартных оптических чипах фирмы “GE Healthcare” (США): ковалентная иммобилизация на чипах типа CM с поверхностью, покрытой карбоксиметилированным декстраном, и нековалентная ориентированная иммобилизация в бислойную липидную мембрану на чипе типа L1. Было использовано основное преимущество SPR биосенсора – работа в режиме реального времени (real-time) для мониторинга всех этапов экспериментов: связывание липосом, фрагментация липосом и формирование из них планарной бислойной липидной мембраны, оценка однородности липидного бислоя (внутренний SPR контроль) и нековалентная ориентированная иммобилизация (встраивание) в бислой CYP5A, имеющего один C-концевой мембранный домен.

МЕТОДИКА

Рекомбинантные белки

В работе были использованы препараты белков CYP3A4, CYP3A5, CYP5A (чистота >95% по данным SDS-PAGE), полученные методом гетерологической экспрессии в *E. coli* и аффинно очищенные на хроматографической колонке с Ni-NTA агарозой за гексагистидиновый таг, согласно методикам, описанным ранее [15, 16]. CYP5A был получен в виде полноразмерной молекулы, а CYP3A4 и CYP3A5 были укорочены по мембранному домену [17]. БСА был получен от “AppliChem” (Германия), а поликлональные антитела к БСА (pAb к БСА) – от фирмы “Sigma” (США).

Реактивы

Буферные растворы и реактивы для оптико-биосенсорного анализа были получены от фирмы “GE Healthcare”: буфер HBS-N (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4), 10 mM ацетатный буфер (pH 5,0), водный раствор 0,1 M NHS (N-гидрокси-сукцинимид) и 0,4 M EDC (1-этил-3-(3-диметил-аминопропил) карбодиимид гидрохлорид). В работе также были использованы: CHAPS (3-[(3-холамилопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат) (“Merck”, США) и общая фракция липидов сои (“Merck”). Остальные реактивы аналитической чистоты были получены от российских поставщиков.

Пробоподготовка препарата липосом

Фосфолипиды выделяли из общей фракции липидов сои путём осаждения холодным ацетоном. Для этого 5 г общей фракции липидов сои растворяли в минимальном количестве гексана при комнатной температуре, после чего к раствору добавляли избыток ацетона, охлаждённого в морозильной камере (-18°C). После осаждения фракции фосфолипидов надосадочную жидкость

сливали и следы ацетона удаляли на роторном испарителе. Процедуру растворения и осаждения повторяли 3 раза. Полученную фракцию фосфолипидов сои растворяли в хлороформе и хранили при -40°C. Для приготовления липосом аликвоту раствора фосфолипидов в хлороформе высушивали на роторном испарителе в круглодонной колбе. Полученную массу фосфолипидов взвешивали. Далее фосфолипиды диспергировали в HBS-N буфере в концентрации 100 мг/мл путём встряхивания со стеклянными шариками. Затем суспензию липосом диспергировали на льду на ультразвуковом гомогенизаторе Sonoplus hd 3110 (“Bandelin”, Германия) в течение 2 мин при мощности излучателя 20% от максимальной. Для получения гомогенных по размеру липосом суспензию многократно пропускали через поликарбонатный фильтр (диаметр пор 100 нм) с использованием набора “липосомная фабрика” LipoFast-Basic (“Avestin”, Канада).

Динамическое светорассеяние

Размер полученных липосом оценивали с помощью метода динамического светорассеяния на дзета-сайзере ZetaSizer MicroV (“Malvern”, США) при температуре 25°C (частота измерений 333,6 тыс/с, длительность измерения 60 с, количество повторов 18). В качестве среды использовали стандартный 1X фосфатный буфер (PBS буфер). Суспензию липосом разбавляли в 1000 раз PBS буфером. Измерения проводили в 2 мкл кварцевой кювете zmv 1002 (“Malvern”). На рисунке 1 приведён пример выходных данных при оценке размеров суспензии липосом на дзета-сайзере MicroV.

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

Регистрацию ББВ выполняли на оптическом биосенсоре Biacore X100 (“GE Healthcare”). Для анализа использовали стандартные оптические чипы типа CM5 и L1 (“GE Healthcare”). Все процедуры по иммобилизации цитохрома b_5 (CYP5A) на чипе CM5 и регистрации его комплексообразования с цитохромами P450 выполняли согласно методикам, описанным ранее [17, 18], используя в качестве контроля канал биосенсора без иммобилизованного белка.

Общая схема эксперимента показана на рисунке 2. Один из каналов биосенсора использовали как контрольный (без встраивания CYP5A в липидный бислой). Чип L1 промывали 50 mM NaOH в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин, а затем 2 M NaCl с добавлением 0,5% (w/w) CHAPS. Затем суспензию липосом (2 мг фосфолипидов/мл) инжестировали в канал биосенсора в течение 18 мин при скорости потока жидкости 5 мкл/мин с последующей инъекцией 50 mM NaOH в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Внутренним SPR контролем однородности покрытия липосомами поверхности чипа L1, как и оценкой наличия непокрытых липосомами участков, был тест по неспецифической сорбции БСА (0,5 мг/мл в HBS-N буфере в течение 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин) и инъекции в тех же условиях pAb к БСА (“Sigma”) в концентрации 10 мкг/мл в HBS-N буфере.

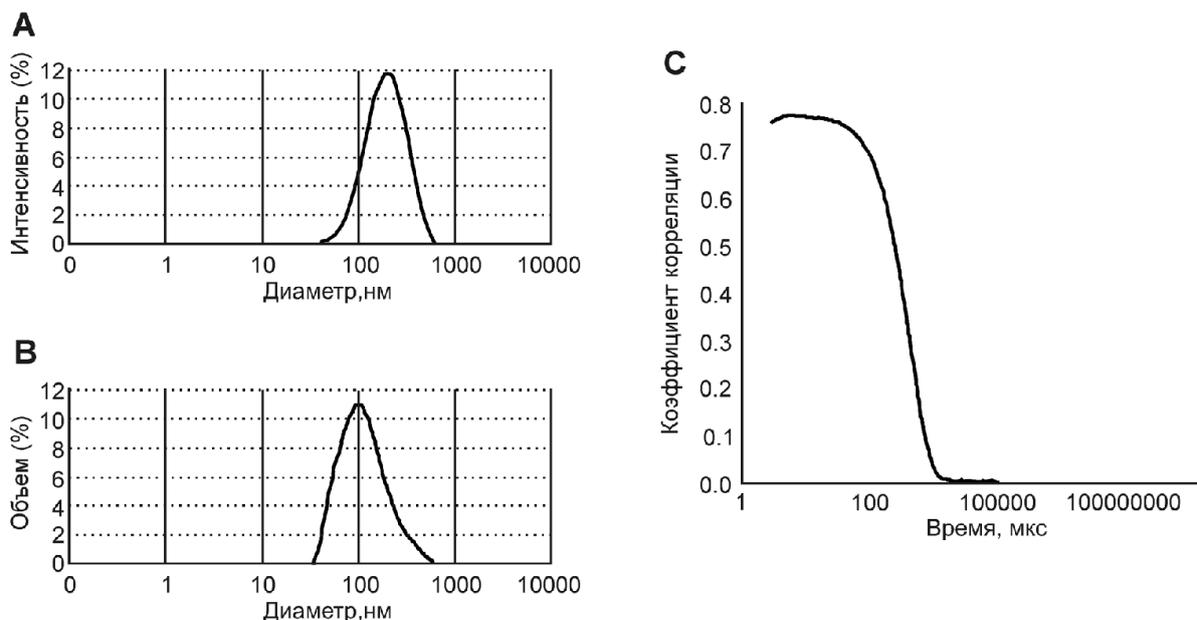


Рисунок 1. Распределение диаметров липосом по данным динамического светорассеяния: (А) распределение размеров диаметров по интенсивности; (В) распределение диаметров по объёму; (С) корреляционная функция. Дополнительные данные измерений: максимальный пик при расчёте распределения по объёму: 127 нм, ширина пика 82 нм; максимальный пик при расчёте распределения по интенсивности: 215 нм, ширина пика 98 нм; среднее значение диаметра при расчёте Z-коэффициента: 174 нм, PdI 0,173, сдвиг по оси ординат по данным коррелограммы 0,88.

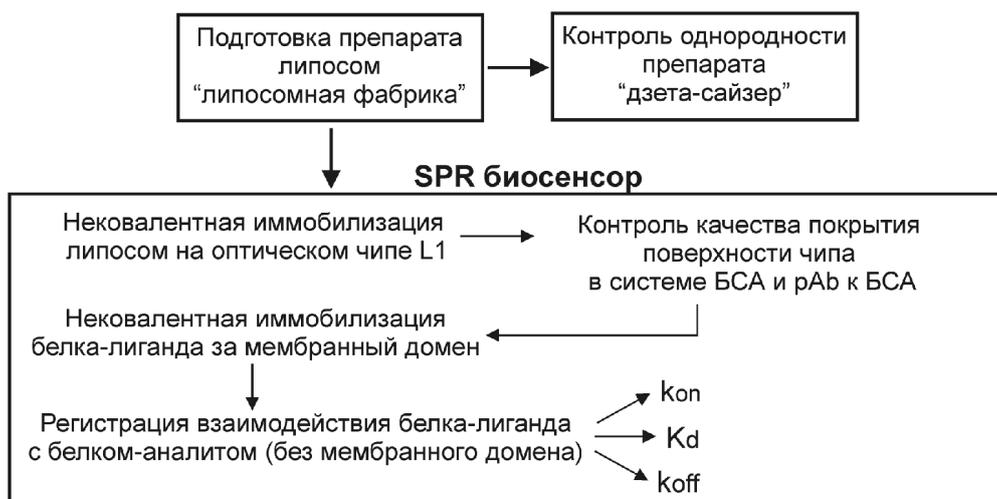


Рисунок 2. Общая схема экспериментов по исследованию взаимодействия белка-аналита с мембранным белком-лигандом, встроенным в липидный бислой на поверхности оптического чипа L1 в биосенсоре Biacore X-100.

Иммобилизацию СУВ5А выполняли путём инъекции 12,56 мкМ СУВ5А в HBS-N буфере в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Для анализа ББВ образцы аналитов СУР3А4 (в концентрациях 0,5 мкМ; 0,75 мкМ; 1 мкМ) и СУР3А5 (в концентрациях 0,1 мкМ; 0,25 мкМ; 0,5 мкМ) в рабочем буфере последовательно инжестрировали через контрольный канал биосенсора с чистым липидным бислоем и через рабочий канал со встроенным в липидный бислой СУВ5А в течение 10 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Диссоциацию белковых комплексов регистрировали не менее 15 мин после окончания инъекции раствора аналита. Удаление липосом и белков с поверхности чипа L1 после каждого

измерительного цикла выполняли путём 4-х кратной инъекции 2 М раствора NaCl с добавлением 0,5% CHAPS (w/w) в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин и затем однократной инъекции 50 мМ раствора NaOH в тех же условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный SPR анализ взаимодействия белка-лиганда цитохрома b_5 с белками-аналитами (цитохромы P450) был выполнен при двух разных способах его иммобилизации: 1) ковалентно иммобилизованный (в водном окружении); 2) встроенный в бислоюную липидную мембрану,

сформированную на поверхности оптического чипа. В качестве белков-аналитов в работе были использованы препараты цитохромов P450, укороченные по мембранному домену. При первом способе применяли неоднократно использованную ранее ковалентную неориентированную иммобилизацию мембранных белков CYB5A, CYB5B и CPR на поверхности чипа типа CM, покрытого карбоксилированным декстраном [17, 19, 20]. Подобный простой способ иммобилизации является предпочтительным для скрининговых исследований и для определения температурной зависимости ББВ для вычисления их термодинамических параметров (ΔG , ΔH , $-\Delta S$) [17, 20]. При втором способе использовали нековалентную ориентированную иммобилизацию белка путём встраивания его мембранного домена в планарный липидный бислоем, что позволяет приблизиться к реальным условиям ББВ с участием мембранных белков. Однако данный подход значительно более сложный, трудоемкий, ресурсо- и времязатратный.

На рисунке 2 показана общая схема экспериментов и взаимосвязь используемых подходов в данной работе. Существенно новыми элементами в представленной схеме, в отличие от традиционных схем экспериментов с протеолипосомами [9-14] и липидоспецифичными оптическими чипами [21-23], является мониторинг в режиме реального времени всех процессов формирования бислоевой липидной мембраны на специальном чипе L1, включая контроль связывания липосом с поверхностью чипа и однородности формируемого липидного бислоя (система БСА – pAb к БСА). В случае наличия дефектных участков в структуре липидного бислоя происходит неспецифическая сорбция БСА на открытой гидрофобной поверхности чипа L1 в этих местах, что регистрируется в виде значительного возрастания сигнала биосенсора.

Пример сенсограммы иммобилизации мембранного белка CYB5A показан на рисунке 3, где получено достаточно однородное распределение липосом и формирование липидного бислоя на поверхности чипа L1, о чём говорит отсутствие заметного роста сигнала биосенсора при инъекции БСА. Следует отметить, что последующая инъекция pAb к БСА необходима для исключения ложноотрицательного результата (отсутствие по данным SPR связывания БСА на чипе с липидным бислоем, обусловленное возможным встраиванием БСА в мембрану путём замещения части липидов). Таким образом, низкие значения сигналов связывания БСА, а также отсутствие усиления сигнала биосенсора при инъекции pAb к БСА подтверждают отсутствие непокрытых липидным бислоем гидрофобных участков поверхности чипа L1. Согласно таблице 1, вариация сигналов биосенсора при повторных инъекциях препаратов липосом и цитохрома b_5 была достаточно низкой (1-4%), что указывало на хорошую воспроизводимость процедуры формирования планарного бислоя и нековалентной ориентированной иммобилизации мембранного белка CYB5A.

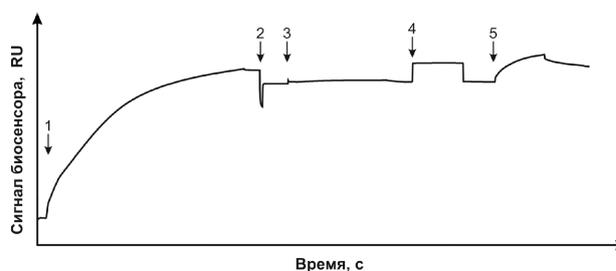


Рисунок 3. Типичная сенсограмма ориентированной иммобилизации мембранного белка CYB5A в плоский липидный бислоем на поверхности оптического чипа L1. Стрелками обозначены инъекции: 1 – препарат липосом, 2 – NaOH, 3 – препарат БСА, 4 – препарат pAb к БСА, 5 – препарат CYB5A.

Таблица 1. Оценка воспроизводимости разных стадий иммобилизации цитохрома b_5 (CYB5A) в бислоевую липидную мембрану, сформированную на поверхности оптического чипа L1

Сигнал биосенсора (RU) при серии инъекций образцов					
Липосомы	Среднее	БСА	Среднее	CYB5A	Среднее
Повтор 1*					
5932	-	5	-	1102	-
6055	-	12	-	1105	-
5870	5952	10	9	1130	1112
Повтор 2					
6382	-	13	-	1128	-
6372	-	6	-	1123	-
6270	6341	15	11	1117	1112
Повтор 3					
6125	-	17	-	1132	-
6290	-	9	-	1140	-
6401	6272	15	13	1145	1139
CV,%	3,4		18,1		1,4

Примечание: * – независимые повторы приготовления препаратов липосом с одинаковой композицией (согласно описанию в методике).

SPR АНАЛИЗ БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В МЕМБРАНЕ

Типичные сенсограммы комплексообразования СУВ5А/СУР3А4 и СУВ5А/СУР3А5 в бислойной липидной мембране на чипе L1 приведены на рисунках 4 и 5, соответственно. Полученные в экспериментах значения K_d комплексов СУВ5А/СУР3А4 и СУВ5А/СУР3А5 (табл. 2) с использованием стандартного протокола ковалентной иммобилизации цитохрома b_5 за аминогруппы белка на оптическом чипе CM5 лежат в диапазоне ранее опубликованных значений для этих белковых пар [18, 24]. Из таблицы 2 следует, что в случае нековалентной ориентированной иммобилизации цитохрома b_5 в липидном бислое K_d комплексов СУВ5А/СУР3А4 и СУВ5А/СУР3А5 в среднем были ниже в 2,5 раза по сравнению со значениями, полученными с использованием чипа CM5. Рост аффинности ББВ обусловлен, главным образом, более высокой стабильностью комплексов (снижение значений k_{off} , табл. 2), что может быть следствием следующих факторов: (1) при ковалентной иммобилизации белка на карбоксилированном декстрани происходит химическая модификация белка смесью NHS/EDC; (2) неориентированная иммобилизация за различные аминогруппы на поверхности белка может ограничивать подвижность взаимодействующих белков. Следовательно, молекулы СУВ5А в липидной бислойной мембране могут иметь больше степеней свободы для конформационных изменений при взаимодействии с цитохромами P450, что, в целом, может отражаться на прочности комплексов СУВ5А/СУР. С этим утверждением согласуются результаты оценки стехиометрии ББВ. На чипе CM5 фактически только одна из 7 молекул иммобилизованного СУВ5А доступна для связывания с цитохромами P450, тогда как в случае чипа L1 с липидным бислоем это число увеличивается

до 3-4 из 10. Поэтому возможен совокупный вклад факторов, благоприятствующих образованию более прочных комплексов СУВ5А с СУР3А4 и 3А5 в случае нековалентной ориентированной иммобилизации СУВ5А в бислойной липидной мембране на чипе L1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В сравнительных SPR экспериментах показано, что нековалентная ориентированная иммобилизация цитохрома b_5 путём его встраивания в структуру бислойной липидной мембраны, сформированной на поверхности чипа L1, позволяет получить более качественные данные о ББВ с его участием. Аффинность взаимодействия цитохрома b_5 в мембранном окружении с цитохромами P450 3А4 и 3А5 больше в среднем в 2,5 раза по сравнению с аналогичными взаимодействиями в водной среде. Однако подобную систему пока невозможно использовать для термодинамических исследований ББВ с участием мембранных белков. Поэтому пока рано отказываться от традиционной успешно применяемой схемы ковалентной иммобилизации белка-лиганда за свободные аминогруппы на чипах с карбоксилированным декстраном, при которой отсутствуют побочные эффекты, зависящие от температуры [17, 19, 20].

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа по SPR анализу белок-белковых взаимодействий поддержана Российским Фондом фундаментальных исследований (грант №19-04-00485 “SPR анализ межмолекулярных взаимодействий с участием мембранных белков, встроенных в бислойную липидную мембрану”).

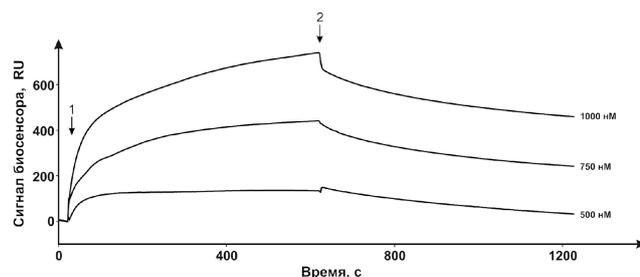


Рисунок 4. Сенсограммы взаимодействия белка-аналита (СУР3А4) с иммобилизованным в липидном бислое белком-лигандом (СУВ5А) на чипе L1. Стрелками на рисунке обозначены следующие инъекции: 1 – СУР3А4, 2 – рабочий буфер.

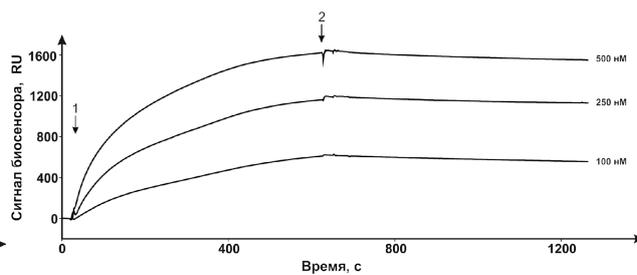


Рисунок 5. Сенсограммы взаимодействия белка-аналита (СУР3А5) с иммобилизованным в липидном бислое белком-лигандом (СУВ5А) на чипе L1. Стрелками на рисунке обозначены следующие инъекции: 1 – СУР3А5, 2 – рабочий буфер.

Таблица 2. Кинетические параметры и константы диссоциации комплексов СУВ5А/СУР3А4 и СУВ5А/СУР3А5

	Чип CM5 (водное окружение)			Чип L1 (мембранное окружение)		
	k_{on} , $M^{-1}c^{-1}$	k_{off} , c^{-1}	K_d , M	k_{on} , $M^{-1}c^{-1}$	k_{off} , c^{-1}	K_d , M
СУВ5А/СУР3А4	$(6,3 \pm 0,2) \cdot 10^3$ *	$(2,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$(3,3 \pm 0,3) \cdot 10^{-7}$	$(5,5 \pm 0,3) \cdot 10^3$	$(5,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$
СУВ5А/СУР3А5	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(2,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(7,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$

Примечание: * \pm стандартная ошибка (n=3).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nguyen H.H., Park J., Kang S., Kim M.* (2015) *Sensors* (Basel), **15**, 10481-10510.
2. *Singh P.* (2016) *Sensors Actuators B: Chemical*, **229**, 110-130.
3. *Galdiero S., Falanga A., Cantisani M., Vitiello M., Morelli G., Galdiero M.* (2013) *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 18758-18789.
4. *Maynard J.A., Lindquist N.C., Sutherland J.N., Lesuffleur A., Warrington A.E., Rodriguez M., Oh S.-H.* (2009) *Biotechnol. J.*, **4**, 1542-1558.
5. *Hardy G.J., Nayak R., Zauscher S.* (2013) *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **18**, 448-458.
6. *Merz C., Knoll W., Textor M., Reimhult E.* (2008) *Biointerphases*, **3**, FA41. DOI:10.1116/1.2896119
7. *Seantier B., Kasemo B.* (2009) *Langmuir*, **25**, 5767-5772.
8. *Mashaghi A., Swann M., Poplewell J., Textor M., Reimhult E.* (2008) *Anal. Chem.*, **80**, 3666-3676.
9. *Bécsi B., Kiss A., Erdödi F.* (2014) *Chem. Phys. Lipids.*, **183**, 68-76.
10. *Lee T.-H., Hirst D.J., Aguilar M.-I.* (2015) *Biochim. Biophys. Acta*, **1848**, 1868-1885.
11. *Olguín Y., Villalobos P., Carrascosa L.G., Young M., Valdez E., Lechuga L., Galindo R.* (2013) *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 1267-1281.
12. *Patching S.G.* (2014) *Biochim. Biophys. Acta*, **1838**, 43-55.
13. *Scalise M., Pochini L., Giangregorio N., Tonazzi A., Indiveri C.* (2013) *Pharmaceutics*, **5**, 472-497.
14. *Seelheim P., Galla H.-J.* (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 519-523.
15. *Gilep A.A., Guryev O.L., Usanov S.A., Estabrook R.W.* (2001) *J. Inorg. Biochem.*, **87**, 237-244.
16. *Sergeev G.V., Gilep A.A., Usanov S.A.* (2014) *Biochemistry* (Moscow), **79**, 406-416.
17. *Yablokov E., Florinskaya A., Medvedev A., Sergeev G., Strushkevich N., Luschik A., Shkel T., Haidukevich I., Gilep A., Usanov S., Ivanov A.* (2017) *Arch. Biochem. Biophys.*, **619**, 10-15.
18. *Gnedenko O.V., Yablokov E.O., Usanov S.A., Mukha D.V., Sergeev G.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Moskaleva N.E., Shumyantseva V.V., Ivanov A.S., Archakov A.I.* (2014) *Chemical Physics Letters*, **593**, 40-44.
19. *Ershov P.V., Yablokov E.O., Florinskaya A.V., Mezentsev Y.V., Kaluzhskiy L.A., Tumilovich A.M., Gilep A.A., Usanov S.A., Ivanov A.S.* (2019) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **187**, 124-129.
20. *Yablokov E.O., Sushko T.A., Ershov P.V., Florinskaya A.V., Gnedenko O.V., Shkel T.V., Grabovec I.P., Strushkevich N.V., Kaluzhskiy L.A., Usanov S.A., Gilep A.A., Ivanov A.S.* (2019) *Biochimie*, **162**, 156-166.
21. *Kamisaka Y., Goto R., Shibakami M., Yoshioka K., Sato Y.* (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1135-1139.
22. *Smith E., Vekaria R., Brown K.A., Longstaff C.* (2013) *Mol. Cell. Biochem.*, **382**, 193-201.
23. *Wikström A., Deinum J.* (2007) *Anal. Biochem.*, **362**, 98-107.
24. *Ivanov A.S., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentsev Y., Yablokov E., Kaluzhskiy L., Gnedenko O., Buneeva O., Haidukevich I., Sergeev G., Lushchik A., Yantsevich A., Medvedeva M., Kozin S., Popov I., Novikova S., Zgoda V., Gilep A., Usanov S., Lisitsa A., Archakov A.* (2014) *Proteomics*, **14**, 2261-2274.

Поступила в редакцию: 15. 08. 2019.
 После доработки: 09. 10. 2019.
 Принята к печати: 11. 10. 2019.

SPR ANALYSIS OF PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS WITH P450 CYTOCHROMES AND CYTOCHROME *b*₅ INTEGRATED INTO LIPID MEMBRANE

L.A. Kaluzhskiy¹, P.V. Ershov^{1}, K.S. Kurpedinov², D.S. Sonina², E.O. Yablokov¹, T.V. Shkel¹, I.V. Haidukevich³, G.V. Sergeev³, S.A. Usanov³, A.S. Ivanov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: pavel79@inbox.ru

²Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9 Miusskaya sq., Moscow, 125047 Russia

³Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,

5/2 Acad. Kuprevicha str., Minsk, 220141 Belarus

Identification of new protein-protein interactions (PPI) and characterization of quantitative parameters of complex formation represent one of central tasks of protein interactomics. This work is a logical continuation of the cycle of our previous works devoted to the study of PPIs among the components of cytochrome P450-dependent monooxygenase system. Using an optical biosensor of Surface Plasmon Resonance (SPR biosensor), a comparative analysis on the determination of kinetic and equilibrium parameters of complex formation between the membrane-bound hemoprotein cytochrome *b*₅ with cytochrome P450s was performed using two different protocols for protein immobilization: 1) covalent non-oriented one on to the carboxymethyl dextran chip type CM and 2) non-covalent oriented immobilization in the lipid environment on the chip type L1 with internal control of liposomes surface distribution. In the second protocol it was shown that the complex formation was characterized by 2.5 times higher affinity due to an decrease in rate dissociation constants. The appropriateness of using both experimental models is discussed.

Key words: cytochrome *b*₅; cytochrome P450; liposomes; protein-protein interactions; surface plasmon resonance; biosensor; optical chip CM5 and L1

Funding. Protein-protein interaction SPR analysis was supported by the Russian Foundation for Basic Research (project №19-04-00485 “SPR analysis of intermolecular interactions involving membrane proteins embedded in the bilayer lipid membrane”).

Received: 15.08.2019, revised: 09.10.2019, accepted: 11.10.2019.