

©Коллектив авторов

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИЗАТИНА С ЦИТОХРОМАМИ P450

П.В. Еришов^{1}, Ю.В. Мезенцев¹, Е.О. Яблоков¹, Л.А. Калужский¹, А.В. Флоринская¹,
А.В. Свиридов², А.А. Гилеп², С.А. Усанов², А.Е. Медведев¹, А.С. Иванов¹*

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

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси (ИБОХ), Минск, Беларусь,

Цитохром P450-зависимые монооксигеназные системы присутствуют практически во всех живых организмах и выполняют ряд крайне важных функций. В обеспечение работы таких систем вовлечены различные белки, участвующие в разнообразных белок-белковых взаимодействиях (ББВ). Ранее нами было обнаружено, что эндогенный неперепитидный биорегулятор изатин (индолдион-2,3), синтезируемый из индола при участии ряда цитохромов P450 (P450 2E1, P450 2C19, P450 2A6), влияет на аффинность некоторых ББВ. В данной работе была сделана попытка зарегистрировать прямое взаимодействие изатина с набором различных белков, имеющих отношение к функционированию цитохром-зависимых монооксигеназных систем: пять изоформ цитохромов P450, две изоформы цитохрома b5, цитохром P450 редуктаза, аденодоксин, аденодоксинредуктаза и феррохелатаза. В результате было показано, что с высокой аффинностью изатин специфически связывается только с цитохромами P450 (величина равновесной константы диссоциации (K_d) составляет порядка 10^{-8} М).

Ключевые слова: цитохром P450, белок-лигандные взаимодействия, изатин, поверхностный плазмонный резонанс, изатин-связывающие белки

DOI: 10.18097/PBMC20186401061

ВВЕДЕНИЕ

Практически во всех живых организмах присутствуют цитохром P450-зависимые системы монооксигеназного окисления, выполняющие ряд крайне важных функций, таких как метаболизм различных ксенобиотиков (включая канцерогены, проканцерогены и лекарства) [1-3], синтез стероидов (в том числе стероидные гормоны, а также холестерин и его производные) [3, 4], синтез желчных кислот и различных биорегуляторов (в том числе изатин) [5-7]. В обеспечение работы цитохром P450-зависимых монооксигеназных систем вовлечены различные белки, участвующие в разнообразных белок-белковых взаимодействиях (ББВ). К ним относятся белки суперсемейства цитохромов P450 (P450), цитохромы b5 (CYB), NADH-цитохром P450 оксидоредуктазы (CPR) [1, 8-10], аденодоксин (ADX) [11], NADPH-зависимая аденодоксинредуктаза (ADR) [12] и феррохелатаза, участвующая в биосинтезе гема [13], являющегося структурным элементом P450 и CYB. Ранее нами было обнаружено, что эндогенный неперепитидный биорегулятор изатин (индолдион-2,3) [14], синтезируемый из индола рядом цитохромов P450 (CYP2E1, CYP2C19, CYP2A6) [15], влияет на аффинность некоторых ББВ: взаимодействие цитохрома P450 3A4 с цитохромом CYB5A [16], цитохромов P450 5A1 и P450 2E1 [17], а также аденодоксинредуктазы (ADR) с феррохелатазой (FECN) [18].

Целью данной работы было выполнение с помощью технологии поверхностного плазмонного резонанса (ППР) сравнительного анализа взаимодействий изатина с различными белками,

которые участвуют в обеспечении работы P450-зависимых монооксигеназных систем. В результате было показано, что из всей тестовой выборки белков (пять изоформ P450, две изоформы CYB, CPR, ADX, ADR и FECN) изатин специфически связывается только с цитохромами P450. Значение равновесной константы диссоциации (K_d) комплексов P450 с иммобилизованным на поверхности оптического чипа 5-аминоизатином составляет порядка 10^{-8} М. Кроме того, было установлено, что взаимодействие 5-аминоизатина с изоформами P450 2E1 и 5A1 согласуется с полученными нами ранее данными о влиянии изатина на взаимодействие этих двух белков друг с другом [17].

МЕТОДИКА

Препараты рекомбинантных белков

В работе были использованы высоко очищенные (>95% по данным гель-электрофореза в денатурирующих условиях) препараты рекомбинантных белков человека: пять изоформ цитохромов P450 (CYP3A5, CYP3A4, CYP2C19, CYP2E1, CYP5A1), две изоформы цитохрома b5 (микросомальный CYB5A и митохондриальный CYB5B), цитохром P450 редуктаза (CPR), аденодоксин (ADX), NADPH-зависимая аденодоксинредуктаза (ADR) и феррохелатаза (FECN). Все белковые препараты были получены в ИБОХ НАН Беларуси. Рекомбинантные белки были синтезированы в *E. coli* и аффинно очищены на хроматографической колонке с Ni-NTA агарозой за гексагистидиновый таг, согласно методикам описанным ранее [19, 20].

* - адресат для переписки

Реактивы

Следующие буферные растворы и реактивы для оптико-биосенсорного анализа были получены от “GE Healthcare” (США): буфер HBS-N (150 мМ NaCl, 10 мМ Hepes, pH 7,4), 10 мМ ацетатный буфер (pH 4,5), водный раствор 0,1 М NHS (N-гидроксисукцинимид) и 0,4 М EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимид гидрохлорид). Диметилсульфооксид (ДМСО) был получен от “Panreac” (Испания), CHAPS – от фирмы “Sigma” (США). Лиофилизат бычьего сывороточного альбумина (БСА) был получен от фирмы “Serva” (США). Остальные реактивы аналитической чистоты были получены от отечественных производителей. 5-аминоизатин был синтезирован с использованием стандартных методов [21].

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР)

Все измерения были выполнены при 25°C в двухканальном оптическом биосенсоре Biacore X-100 (“GE Healthcare”), работающем под управлением программы Biacore X-100 Control Software. В работе были использованы стандартные оптические чипы CM4, покрытые карбоксиметилированным декстраном. Межмолекулярные взаимодействия регистрировались в виде сенсограмм, представляющих собой графики зависимости сигнала биосенсора в резонансных единицах (RU, 1 RU соответствует связыванию 1 пг белка на поверхности чипа) от времени.

Процедура ковалентной иммобилизации 5-аминоизатина в рабочем канале биосенсора выполнялась согласно модифицированному протоколу, описанному в работе [22]. Последовательность процедур: (1) активация карбоксильных групп на поверхности чипа инъекцией смеси 0,05 М NHS и 0,2 М EDC в течение 5 мин при скорости потока 5 мкл/мин; (2) инъекция 30 мМ раствора 5-аминоизатина в 20 мМ боратном буфере (pH 8,5), содержащем 30% ДМСО, в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин; (3) блокирование оставшихся активированных групп на поверхности оптического чипа инъекцией 25 мкМ раствора БСА в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5) при скорости потока 10 мкл/мин до достижения выхода сигнала биосенсора на плато. Уровень иммобилизации для 5-аминоизатина составил около 1250 RU. В другом канале биосенсора, использованном в качестве контрольного, был иммобилизован только БСА. После завершения всех процедур иммобилизации была выполнена инъекция 10 мМ NaOH в течение 15 с при скорости потока 30 мкл/мин через оба канала биосенсора для отмывки поверхности чипа от нековалентно связавшихся молекул БСА.

SPR анализ взаимодействия тестовых белков с иммобилизованным 5-аминоизатином выполняли путем последовательных инъекций растворов белков в диапазоне концентраций от 12 нМ до 1000 нМ в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин через оба канала биосенсора. На рисунке 1 приведено схематическое представление об относительных размерах и распределении молекул, участвующих во взаимодействии. Так, 5-аминоизатин ковалентно

иммобилизован на гибких “нитях” линейного карбоксиметилированного декстрана, равномерно экспонирован в пространстве и способен взаимодействовать с белковыми молекулами. Регенерация поверхности оптического чипа выполнялась путём инъекции буфера А (2 М NaCl, 0,4% CHAPS) в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Все измерения проводились с трёхкратным повтором и с регистрацией разности сигналов между рабочим и контрольным каналами. Вычисление значений равновесной константы диссоциации (K_d) комплексов белков с 5-аминоизатином выполняли путем анализа зависимостей равновесных сигналов связывания (Req) от концентрации белков с использованием процедуры расчёта “Steady state affinity” лицензионной программы BiaEvaluation software v.4.1.1.

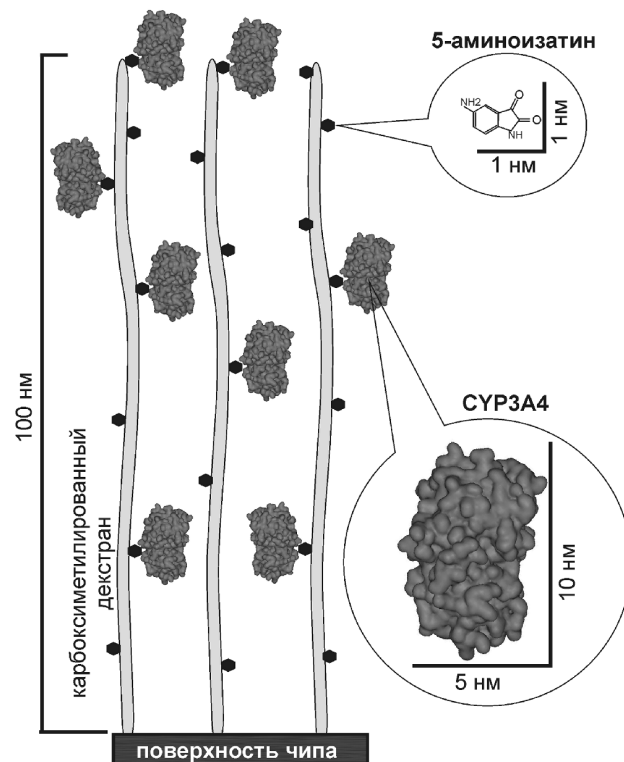


Рисунок 1. Схематическое представление размеров и распределения молекул лиганда (5-аминоизатин) и белка-аналита (P450 3A4) в зоне регистрации поверхностного плазмонного резонанса у поверхности оптического чипа CM4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования был выполнен SPR скрининг влияния набора тестовых белков на взаимодействие с иммобилизованным 5-аминоизатином (рис. 2). Если при инъекции раствора тестового белка наблюдалось возрастание сигнала биосенсора более, чем на 50 RU, то это считалось позитивным результатом скрининга на наличие взаимодействия. Из рисунка 2 можно видеть, что для всех пяти изоформ P450 результат оказался положительным. Остальные тестируемые белковые препараты (FECH, ADR, ADX, CPR, CYB5A,

СУВ5В) практически не взаимодействовали с 5-аминоизатином. Следует заметить, что два Р450 (СУР2Е1 и СУР2С19) являются ферментами, участвующими в синтезе изатина [15], а в отношении двух других Р450 (СУР5А1 и СУР2Е1) нами был обнаружен факт индукции изатином комплексообразования СУР5А1/СУР2Е1 [17]. Таким образом, из всей использованной в работе выборки белков изатин селективно связывается только с Р450.

Для определения аффинности взаимодействия различных изоформ Р450 с иммобилизованным 5-аминоизатином были выполнены измерения при инъекции разных концентраций тестовых белков,

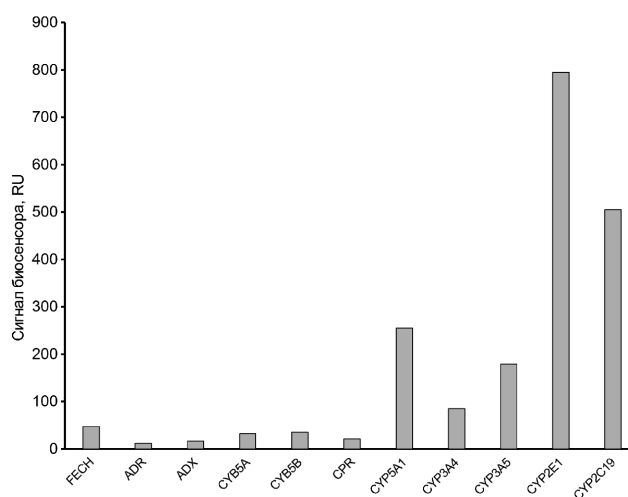


Рисунок 2. Скрининг выборки тестовых белков по взаимодействию с иммобилизованным 5-аминоизатином. На рисунке показаны средние значения равновесного сигнала биосенсора после инъекции растворов белков в концентрации 400 нМ. Стандартное отклонение не превышало 5%, ($n = 3$).

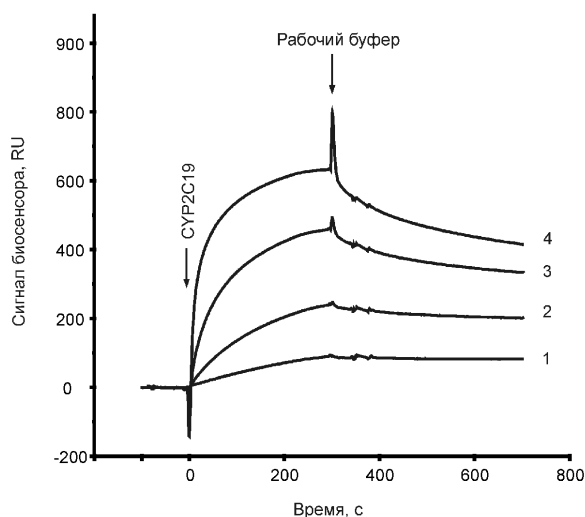


Рисунок 3. Типичные сенсограммы взаимодействия различных концентраций цитохрома Р450 2С19 (СУР2С19) с иммобилизованным 5-аминоизатином. Концентрации СУР2С19: 12 нМ (1); 50 нМ (2); 200 нМ (3); 1000 нМ (4). Сенсограммы взаимодействия представляют собой разницу между сигналами в рабочем (5-аминоизатин) и контрольном каналах биосенсора.

и получены соответствующие наборы сенсограмм. На рисунке 3 приведена серия типичных сенсограмм на примере СУР2С19. Для расчёта величины K_d комплексов Р450 с 5-аминоизатином из наборов сенсограмм были построены зависимости равновесных сигналов биосенсора (Req) от концентраций белков (рис. 4). Обнаруженное различие в величинах амплитуды сигнала биосенсора (при близких молекулярных весах цитохромов Р450), возможно, обусловлено способностью некоторых Р450 образовывать олигомеры [23]. Результаты анализа аффинности по величине K_d и кинетические параметры в виде констант скоростей ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}) комплексов приведены в таблице.

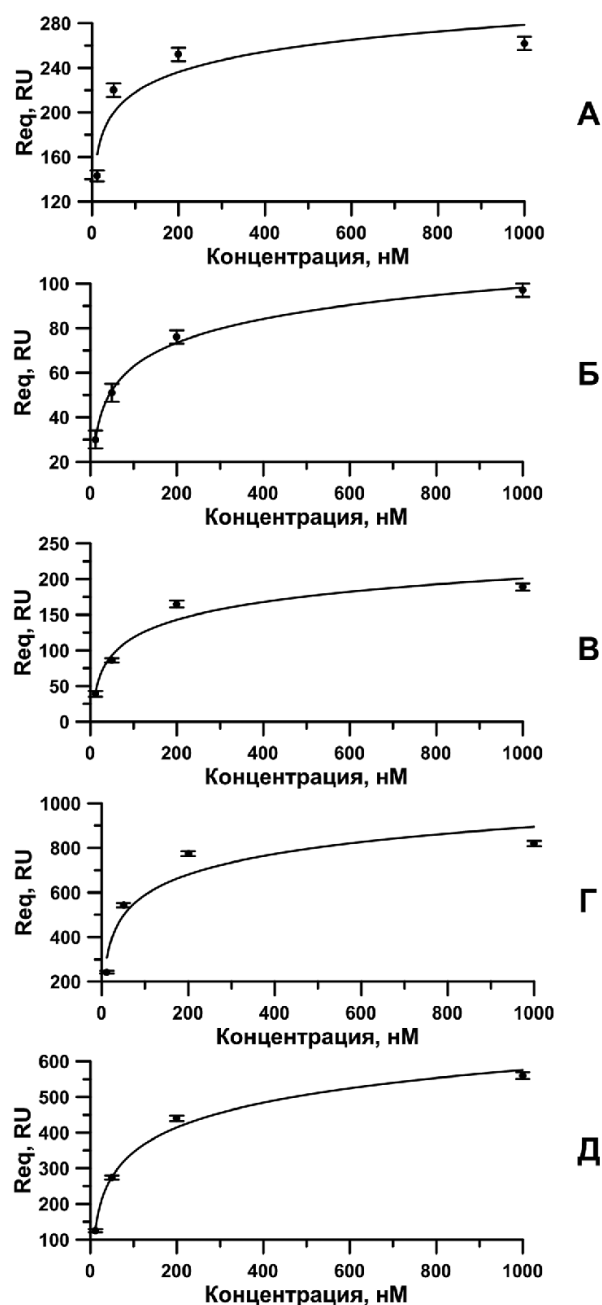


Рисунок 4. Зависимость значений равновесного сигнала связывания (Req) от концентраций цитохромов Р450: СУР5А1 (А), СУР3А4 (Б), СУР3А5 (В), СУР2Е1 (Г), СУР2С19 (Д).

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИЗАТИНА С ЦИТОХРОМАМИ P450

Таблица. Кинетические и равновесные параметры комплексообразования между иммобилизованным на чипе CM4 5-аминоизатином и цитохромами P450

Комплексообразование	k_{on} , ($M^{-1}c^{-1}$)	k_{off} , (c^{-1})	K_d , (M)
5-аминоизатин/CYP5A1	$(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(5,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-4}$	$(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-8}$
5-аминоизатин/CYP2E1	$(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^4$	$(4,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$	$(2,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-8}$
5-аминоизатин/CYP3A4	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(4,8 \pm 0,5) \cdot 10^{-4}$	$(4,8 \pm 0,6) \cdot 10^{-8}$
5-аминоизатин/CYP3A5	$(0,8 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(5,0 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$	$(5,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-8}$
5-аминоизатин/CYP2C19	$(0,9 \pm 0,2) \cdot 10^4$	$(4,7 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$	$(5,4 \pm 0,7) \cdot 10^{-8}$

Примечание. В таблице показаны средние значения параметров \pm стандартное отклонение.

Для всех цитохромов P450 величина K_d находится в диапазоне 20-60 нМ. В связи с этим следует отметить, что аффинность взаимодействия цитохромов P450 с иммобилизованным 5-аминоизатином значительно выше (на 1-2 порядка) по сравнению с аффинностью ряда обнаруженных ранее изатин-связывающих белков [22]. При этом тестируемые P450 можно условно разделить на две группы (таблица): (I) – CYP5A1 и CYP2E1 ($K_d \sim 2,2 \cdot 10^{-8}$ М) и (II) – CYP2C19, CYP3A5 и CYP3A4 ($K_d \sim 5,5 \cdot 10^{-8}$ М). Из таблицы видно, что значения константы скоростей диссоциации комплексов (k_{off}) для всех P450 фактически одинаковы, и различия в K_d обусловлены только различием констант скорости ассоциации (k_{on}) комплексов.

Таким образом, полученные результаты показывают, что среди тестового набора различных белков, вовлечённых в обеспечение работы P450-зависимых монооксигеназных систем, изатин избирательно взаимодействует только с цитохромами P450. Величина K_d комплексов изатина с P450 составляет порядка 10^{-8} М. Взаимодействие изатина с изоформами P450 2E1 и P450 5A1 согласуется с полученными ранее данными о влиянии изатина на взаимодействие этих двух белков друг с другом [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные позволяют отнести цитохромы P450 (по крайней мере тестированные изоформы) к группе изатин-связывающих белков и дополнить ими перечень уже известных изатин-связывающих белков, идентифицированных ранее протеомными методами [22, 24, 25]. Результаты работы расширяют “сферу компетенции” специфического действия эндогенного неперитидного биорегулятора изатина как на отдельные белки-мишени (изатин-связывающие белки), так и на определённые ББВ, что может отражаться в функционировании белкового интерактома в целом.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 16-14-10327).

ЛИТЕРАТУРА

- Shen A.L., O'Leary K.A., Kasper C.B. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 6536-6541.
- Ortiz de Montellano P.R. (2014) in: Handbook of Metabolic Pathways of Xenobiotics, 1 (Lee P.W., Aizawa H., Gan L.L., Prakash C., Zhong D., eds.), John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 1-18.
- Nebert D.W., Wikvall K., Miller W.L. (2013) Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci., **368**(1612), 20120431.
- Niwa T., Murayama N., Imagawa Y., Yamazaki H. (2015) Drug Metab., **47**(2), 89-110.
- Nebert D.W., Russell D.W. (2002) Lancet, **360**, 1155-1162.
- Lorbek G., Lewinska M., Rozman D. (2012) FEBS J., **279**, 1516-1533.
- Hafner M., Rezen T., Rozman D. (2011) Curr. Drug Metab., **12**(2), 173-185.
- Guengerich F.P., Wu Z.L., Bartleson C.J. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., **338**, 465-469.
- 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) Chem. Phys. Lett., **593**, 40-44.
- Yamazaki H., Shimada T., Martin M.V., Guengerich F.P. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 30885-30891.
- Wada A., Waterman M.R. (1992) J. Biol. Chem., **267**(32), 22877-22882.
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. (2007) Biochim. Biophys. Acta., **1770**(3), 330-344.
- Ferreira G.C., Franco R., Lloyd S.G., Moura I., Moura J.J., Huynh B.H. (1995) J. Bioenerg. Biomembr., **27**(2), 221-229.
- Medvedev A., Buneeva O., Glover V. (2007) Biologics, **1**(2), 151-162.
- Gillam E.M., Notley L.M., Cai H., De Voss J.J., Guengerich F.P. (2000) Biochemistry, **39**(45), 13817-13824.
- Еришов П.В., Яблоков Е.О., Мезенцев Ю.В., Калужский Л.А., Флоринская А.В., Веселовский А.В., Гнеденко О.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Медведев А.Е., Иванов А.С. (2017) Биомед. химия, **63**, 170-175. DOI:10.18097/PBMC20176302170
- Свирид А.В., Еришов П.В., Яблоков Е.О., Калужский Л.А., Мезенцев Ю.В., Флоринская А.В., Сушко Т.А., Струшкевич Н.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Медведев А.Е., Иванов А.С. (2017) Acta Naturae, **9**(4), 56-65.
- Ershov P., Mezentssev Y., Gilep A., Usanov S., Buneeva O., Medvedev A., Ivanov A. (2017) Protein Sci., Epub ahead of print. DOI: 10.1002/pro.3300
- Сергеев Г.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. (2014) Биохимия, **79**, 520-531.

20. Gilep A.A., Guryev O.L., Usanov S.A., Estabrook R.W. (2001) J. Inorg. Biochem., **87**, 237-244.
21. Medvedev A.E., Goodwin D.L., Sandler M., Glover V. (1999) Biochem. Pharmacol., **57**, 913-915.
22. Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A. (2010) Proteomics, **10**(1), 23-37.
23. Давыдов Д.Р. (2015) Биомед. химия, **61**, 176-187. DOI: 10.18097/PBMC20156102176
24. Buneeva O.A., Kopylov A.T., Tikhonova O.V., Zgoda V.G., Medvedev A.E., Archakov A.I. (2012) Biochemistry Moscow, **77**(11), 1326-1338.
25. Crumeyrolle-Arias M., Buneeva O., Zgoda V., Kopylov A., Cardona A., Tournaire M.C., Pozdnev V., Glover V., Medvedev A. (2009) J. Neurosci. Res., **87**(12), 2763-2772. DOI: 10.1002/jnr.22104

Поступила: 16. 11. 2017.
Принята к печати: 18. 12. 2017.

STUDY SPECIFICITY OF ISATIN INTERACTIONS WITH P450 CYTOCHROMES

P.V. Ershov¹, Yu.V. Mezentsev¹, E.O. Yablokov¹, L.A. Kalushskiy¹, A.V. Florinskaya¹, A.V. Svirid², A.A. Gilep², S.A. Usanov², A.E. Medvedev¹, A.S. Ivanov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry,

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

²Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Cytochrome P450-dependent monooxygenase systems exist basically in all living organisms, where they perform various important functions. The coordinated functioning of these systems involves many proteins participating in different protein-protein interactions (PPI). Previously, we have found that the endogenous non-peptide bioregulator isatin (indole-2,3-dione), synthesized from indole by means of certain cytochromes P450 (e.g. P450 2E1, P450 2C19, P450 2A6) regulates affinity of some PPI. In this work, an attempt has been undertaken to register a direct interaction of isatin with a set of different proteins related to the functioning of cytochrome P450-dependent monooxygenase: five isoforms of cytochromes P450, two isoforms of cytochrome *b5*, cytochrome P450 reductase, adrenodoxin, adrenodoxin reductase and ferrochelatase. The study has shown that isatin binds specifically only to cytochromes P450 with high affinity (the equilibrium dissociation constant (K_d) is about 10^{-8} M).

Key words: cytochrome P450, protein-ligand interaction, isatin, surface plasmon resonance, optic biosensor, isatin binding proteins