

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

© Коллектив авторов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОСТАЦИКЛИНСИНТАЗЫ С ЦИТОХРОМАМИ P450

О.В. Гнеденко^{1}, Е.О. Яблоков¹, П.В. Ершов¹, А.В. Свирид², Т.В. Шкель², И.В. Гайдукевич²,
Н.В. Струшкевич², А.А. Гилеп², С.А. Усанов², А.С. Иванов¹*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул. 10; *эл. почта: gnedenko.oksana@gmail.com

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

Выполнены биосенсорные эксперименты по исследованию взаимодействия простаглицлиносиназы (PGIS) с различными белками цитохром P450-зависимых монооксигеназных систем. Обнаружено взаимодействие PGIS с микросомальными (CYP21A2, CYP2E1) и митохондриальными (CYP27A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP11A1) цитохромами P450. Определены кинетические и равновесные параметры формирования белковых комплексов. Полученные результаты позволяют предположить, что взаимодействие данных гемопротеинов может играть важную роль в регуляции биосинтеза как простаглицлина, так и его физиологического противовеса тромбосана A₂.

Ключевые слова: простаглицлиносиназа (PGIS, CYP8A1); цитохром P450; поверхностный плазмонный резонанс (SPR); оптический биосенсор Biacore

DOI: 10.18097/PBMC20196501063

ВВЕДЕНИЕ

Простаглицлин (PGI₂) относится к классу простагоидов и продуцируется эндотелиальными клетками. За синтез простаглицлина и его физиологического антагониста тромбосана A₂ (TXA₂) отвечают простаглицлиносиназа (PGIS, CYP8A1; КФ 5.3.99.4) и тромбосансиназа (TXAS, CYP5A1; КФ 5.3.99.5), принадлежащие к суперсемейству цитохромов P450 [1]. PGIS катализирует реакцию изомеризации простаглицлина H₂ (PGH₂) в простаглицлин, который является сильнодействующим аутокринным и паракринным вазодилатором и ингибирует агрегацию тромбоцитов [2, 3]. PGIS экспрессируется преимущественно в эндотелиальных и гладкомышечных клетках и ассоциирована с эндоплазматическим ретикуломом и ядерной мембраной [2, 4, 5]. Фермент локализован, главным образом, в аорте и тканях лёгкого. Дисбаланс в синтезе PGI₂ и TXA₂ приводит к сердечно-сосудистым заболеваниям, например артериальной гипертензии, ишемии мозга или инфаркту миокарда [2]. Препараты аналогов PGI₂ успешно применяются в терапии лёгочной артериальной гипертензии. Тот факт, что продукты биосинтеза простагоидов, в частности PGI₂ и TXA₂, являются метастабильными соединениями (время полужизни 42 с и 30 с, соответственно) и реализуют свое действие через взаимодействие с трансмембранными рецепторами, сопряжёнными с G белками [2, 3, 6], позволяет предположить наличие специфических молекул-переносчиков (вероятнее всего, белков), осуществляющих их транспорт к наружной стороне плазматической мембраны. Именно поэтому на сегодняшний день поиск белковых партнеров и их функциональных связей с ферментами синтеза простагоидов является актуальной задачей. Ранее было идентифицировано 12 потенциальных

белков-партнеров CYP5A1 [7], в том числе CYP2E1 (фермент метаболизма простаглицлина H₂ до 12-гидрокси-5,8,10-гептатриеновой кислоты – проантагониста TXA₂).

Целью данной работы было выявление потенциальных белковых партнеров PGIS среди ряда цитохромов P450.

МЕТОДИКА

Высокоочищенные (>95% по данным SDS-PAGE) препараты рекомбинантных белков были получены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси путём молекулярного клонирования и гетерологической экспрессии в бактериальной системе (*E. coli*) с последующей очисткой с помощью металл-аффинной и ионообменной хроматографии [8, 9]. В работе были использованы цитохромы P450 (CYP8A1, CYP5A1, CYP3A5, CYP3A4, CYP17A1, CYP2E1, CYP21A2, CYP2C9, CYP19A1, CYP2C19, CYP11B2, CYP11B1, CYP11A1, CYP27A1), микросомальный цитохром b₅ (CYB5A), NADPH-цитохром P450-редуктаза (CPR), NADPH-аденодоксинредуктаза (AdR) и аденодоксин (Adx).

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 5,0); реагенты для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминогруппы: EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl) и NHS (N-гидроксисукцинимид).

Анализ взаимодействия исследуемых белков с иммобилизованной на поверхности оптического чипа PGIS выполняли на оптическом биосенсоре Biacore 3000 (“GE Healthcare”), работающем на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Сигнал биосенсора регистрировали в резонансных

* - адресат для переписки

единицах RU (1 RU соответствует связыванию 1 пг белка на поверхности оптического чипа). Расчёт значений равновесных констант диссоциации (K_d) и констант скоростей образования (k_{on}) и распада (k_{off}) комплексов производили с помощью программного комплекса BIAevaluation v. 4.1.

Иммобилизацию PGIS осуществляли путём формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM4 и аминокетонами PGIS. Карбоксильные группы чипа активировали путём инъекции смеси 0,2 М EDC/0,05 М NHS в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Инъекцию раствора PGIS (50 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5,0) выполняли со скоростью 5 мкл/мин в течение 10 мин. Уровень иммобилизации PGIS в рабочем канале оптического биосенсора составлял порядка 4400 RU (4,4 нг).

Регистрацию взаимодействий белков с иммобилизованной PGIS выполняли в режиме реального времени путём последовательных инъекций растворов тестовых белков в диапазоне концентраций от 25 нМ до 5 мкМ через контрольный (без белка) и рабочий каналы оптического биосенсора в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. После каждого измерения поверхность оптического чипа регенерировали инъекцией буфера, содержавшего 1 М NaCl и 0,2% CHAPS, в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин.

Для оценки воздействия 10 мМ ацетатного буфера (pH 5,0) на PGIS белок разводили в 10 мМ ацетате натрия (pH 5,0) до концентрации 50 мкг/мл (конечный объём образца – 1 мл), затем инкубировали при комнатной температуре 10 мин. Нейтрализацию среды проводили добавлением 100 мкл 1 М калий-фосфатного буфера (pH 7,4). Контрольный образец, не подвергавшийся воздействию кислой среды, был разведён в 50 мМ калий-фосфатном буфере (pH 7,4). Регистрацию электронных спектров поглощения проводили на UV-Vis спектрофотометре Cary 5000 (“Agilent Technologies, Inc”, США) в диапазоне длин волн 350-600 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инкубация образца PGIS в ацетатном буфере не изменяла спектральные характеристики белка (рис. 1).

С помощью SPR анализа на взаимодействие с иммобилизованной PGIS было протестировано

17 различных белков, включающих как цитохромы P450, так и их функциональные партнёры: CYP5A1, CYP3A5, CYP3A4, CYP17A1, CYP2E1, CYP21A2, CYP2C9, CYP19A1, CYP2C19, CYP11B2, CYP11B1, CYP11A1, CYP27A1, CYP5A, CPR, Adx, AdR. Было обнаружено, что два микросомальных цитохрома P450 (CYP21A2, CYP2E1) и четыре митохондриальных цитохрома P450 (CYP27A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP11A1) взаимодействовали с PGIS.

Типичные сенсограммы образования белковых комплексов представлены на рисунке 2. Кинетические константы и равновесные константы диссоциации белковых комплексов, рассчитанные из экспериментальных кривых, представлены в таблице.

Полученные данные сопоставимы со значениями K_d комплексов различных цитохромов P450 с их функциональными партнёрами (CPR, CYP5A, Adx) [10-13]. Значения K_d белковых комплексов убывали в следующем порядке $K_d(\text{CYP11B2}) > K_d(\text{CYP11A1}) > K_d(\text{CYP21A2}) > K_d(\text{CYP27A1}) > K_d(\text{CYP11B1}) > K_d(\text{CYP2E1})$. Наиболее высокоаффинным было взаимодействие PGIS с CYP2E1. Наименьшее сродство к PGIS проявлял CYP11B2. Ранее было показано, что CYP2E1 и CYP11B2 образуют комплексы с TXAS ($K_d = 4,3 \times 10^{-7}$ М и $6,9 \times 10^{-7}$ М, соответственно) [7]. Комплексы CYP2E1 с PGIS более прочные, чем с TXAS, тогда как CYP11B2 с простаглицинсинтазой взаимодействовал слабее.

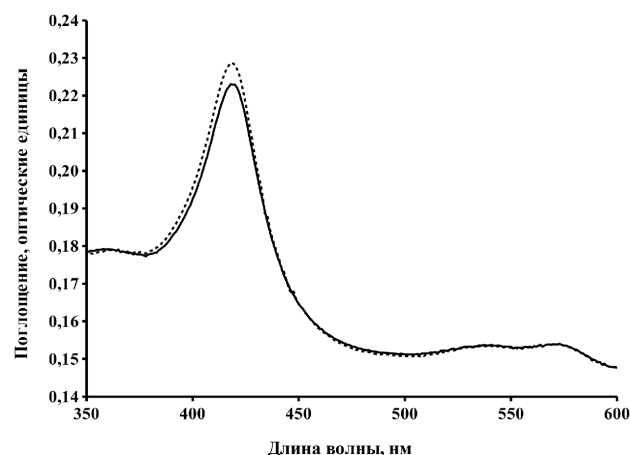


Рисунок 1. Спектры поглощения образца PGIS в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4 (сплошная линия) и образца PGIS после инкубации в течение 10 мин в 10 мМ ацетатном буфере, pH 5,0, и нейтрализации pH до 7,4 фосфатным буфером (пунктир).

Таблица. Кинетические и равновесные параметры взаимодействия цитохромов P450 с иммобилизованной PGIS

Аналит	$k_{on}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_{off}, s^{-1}	K_d, M
CYP2E1	$(3,89 \pm 0,04) \cdot 10^4$	$(2,44 \pm 0,06) \cdot 10^{-3}$	$6,27 \cdot 10^{-8}$
CYP21A2	$(1,21 \pm 0,01) \cdot 10^4$	$(3,08 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$	$2,55 \cdot 10^{-7}$
CYP11B1	$(4,4 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(6,45 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	$1,47 \cdot 10^{-7}$
CYP11B2	$(1,14 \pm 0,06) \cdot 10^3$	$(5,69 \pm 0,03) \cdot 10^{-3}$	$5,0 \cdot 10^{-6}$
CYP27A1	$(2,83 \pm 0,06) \cdot 10^4$	$(5,80 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	$2,05 \cdot 10^{-7}$
CYP11A1	$(8,66 \pm 0,1) \cdot 10^3$	$(4,93 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$	$5,69 \cdot 10^{-7}$

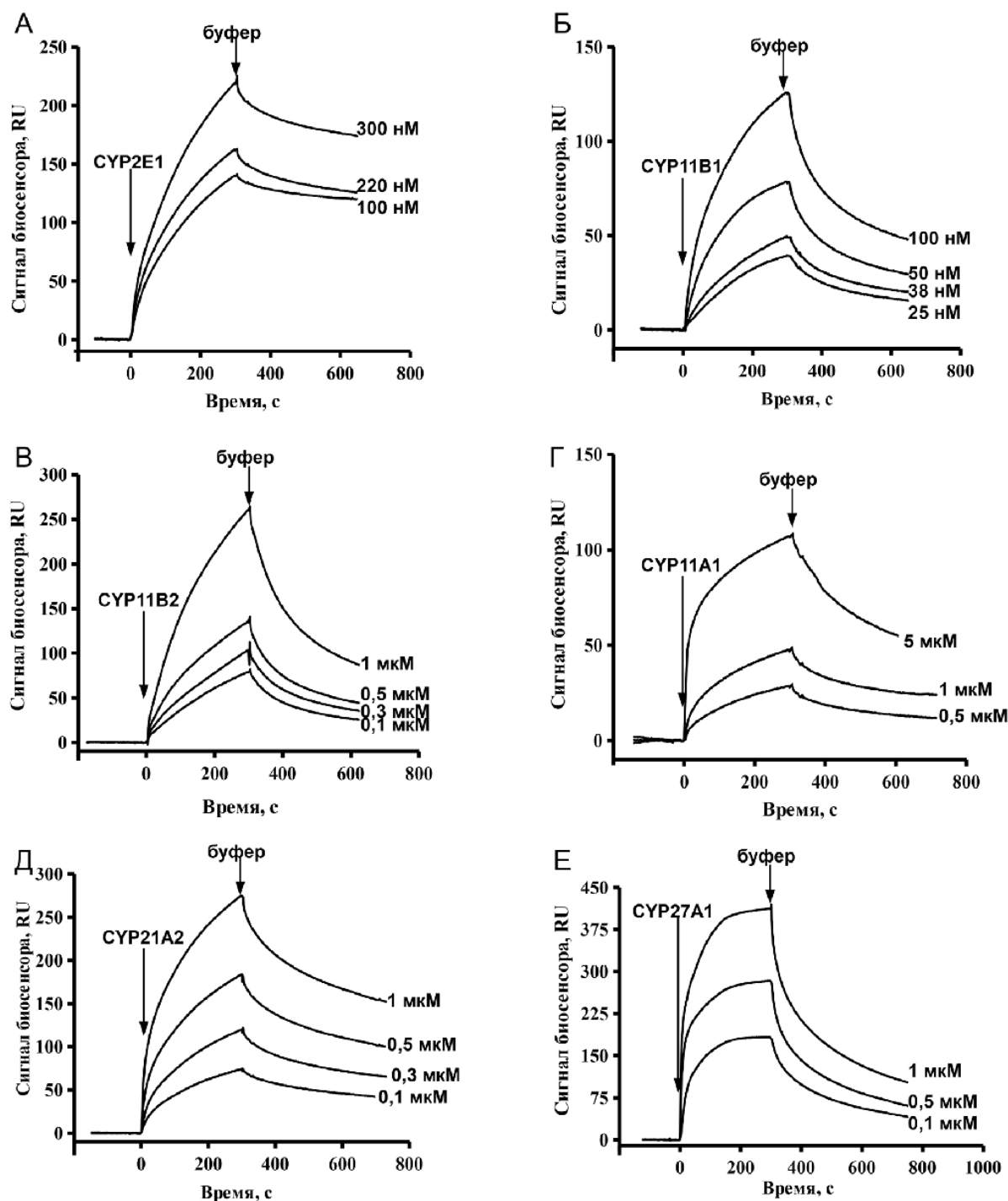


Рисунок 2. Сенсограммы взаимодействия цитохромов P450 с иммобилизованной простаглицинсинтазой. Стрелками указаны инъекции растворов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Продукты биосинтеза простаноидов, подкласса эйкозаноидов, в частности простаглицин (PGI_2), являются метастабильными соединениями и реализуют своё действие через взаимодействие с трансмембранными рецепторами, что позволяет предположить наличие специфических механизмов их транспорта (вероятнее всего, белковой природы).

В данной работе было исследовано взаимодействие простаглицинсинтазы с различными белками

цитохром P450-зависимых монооксигеназных систем. Два микросомальных цитохрома P450 (CYP21A2, CYP2E1) и четыре митохондриальных цитохрома P450 (CYP27A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP11A1) взаимодействовали с PGIS. CYP2E1 и CYP11B2 образуют комплексы как с простаглицинсинтазой, так и с тромбоксансинтазой. Полученные результаты позволяют предположить, что взаимодействие данных гемопротеинов важно для регуляции биосинтеза простаглицина и его физиологического антагониста TXA_2 .

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-54-00015 Бел_а.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Li Y.C., Chiang C.W., Yeh H.C., Hsu P.Y., Whitby F.G., Wang L.H., Chan N.L. (2008) J. Biol. Chem., **283**, 2917-2926. DOI:10.1074/jbc.M707470200
2. Clapp L.H., Gurung R. (2015) Prostaglandins Other Lipid Mediat., **120**, 56-71. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2015.04.007
3. Sasaki Y., Ochiai T., Takamura M., Kondo Y., Yokoyama C., Hara S. (2017) Prostaglandins Other Lipid Mediat., **133**, 49-52. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2017.05.001
4. Klumpp G., Schildknecht S., Nastainczyk W., Ullrich V., Bachschmid M. (2005) Pharmacol. Rep., **57**, 120-126.
5. Wu K.K., Liou J.-Y. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., **338**, 45-52.
6. Serhan C.N., Chiang N., Van Dyke T.E. (2008) Nat. Rev. Immunol., **8**, 349-361. DOI:10.1038/nri2294
7. Свиридов А.В., Еришов П.В., Яблоков Е.О., Калужский Л.А., Мезенцев Ю.В., Флоринская А.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Медведев А.Е., Иванов А.С. (2017) Acta Naturae, **9**(4), 96-105.
8. Сергеев Г.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. (2014) Биохимия, **79**, 520-531.
9. Дормешкин Д.О., Свиридов А.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. (2015) Доклады Национальной академии наук Беларуси, **59**(2), 53-61.
10. Bridges A., Gruenke L., Chang Y.T., Vakser I.A., Loew G., Waskell L. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 17036-17049.
11. Lewis D.F., Hlavica P. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1460**, 353-374.
12. 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 Physical Letters, **593**, 40-44. DOI: 10.1016/j.cplett.2013.12.041
13. 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. DOI: 10.1016/j.abb.2017.02.006

Поступила в редакцию: 09. 11. 2018.
После доработки: 01. 02. 2019.
Принята к печати: 05. 02. 2019.

INTERACTION OF PROSTACYCLIN SYNTHASE WITH CYTOCHROMES P450

**O.V. Gnedenko^{1*}, E.O. Yablokov¹, P.V. Ershov¹, A.V. Svirid², T.V. Shkef², I.V. Haidukevich²,
N.V. Strushkevich², A.A. Gilep², S.A. Usanov², A.S. Ivanov¹**

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com
²Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Science of Belarus,
5/2 Kuprevicha str., Minsk, 220141 Republic of Belarus

Biosensor experiments on investigation of interaction between prostacyclin synthase (PGIS) and different proteins of the cytochrome P450 monooxygenase systems were performed. Interaction of PGIS with microsomal (CYP21A2, CYP2E1) and mitochondrial (CYP27A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP11A1) cytochrome P450s was detected. Kinetic and equilibrium parameters of protein complexes formation were determined. Data obtained suggest an essential role of these hemoproteins interaction in regulation of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis.

Key words: prostacyclin synthase (PGIS, CYP8A1); cytochrome P450; surface plasmon resonance (SPR); optical biosensor Biacore