

©Коллектив авторов

АДРЕНОДОКСИНЫ И ИХ РОЛЬ В СИСТЕМАХ ЦИТОХРОМА P450

В.В. Шумянцева^{1,2}, Т.В. Булко¹, О.В. Гнеденко^{1}, Е.О. Яблоков¹, С.А. Усанов³, А.С. Иванов¹*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,

119121, Москва, Погодинская ул. 10; *эл. почта: gnedenko.oksana@gmail.com

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

³Институт биоорганической химии, Беларусь, Минск

Для исследования роли белков-партнеров в образовании функциональных комплексов в системах цитохрома P450 с помощью оптического биосенсора определены кинетические константы и равновесные константы диссоциации комплексов цитохрома CYP11A1 (P450_{scs}) с адренодоксидом дикого типа Adx WT и мутантными формами адренодоксина R106D и D109R. Аденодоксин дикого типа Adx WT ($K_d = 1,23 \pm 0,09 \cdot 10^{-6}$ М) и мутантная форма D109R ($K_d = (2,37 \pm 0,09) \cdot 10^{-8}$ М) образовывали комплексы с цитохромом P450_{scs}. Для мутантной формы R106D связывание не было зарегистрировано. Для анализа возможного участия аденодоксидов и их мутантных вариантов в процессе переноса электронов в митохондриальных цитохром P450 системах были исследованы электрохимические свойства этих железосерных белков. Аденодоксин дикого типа Adx WT и мутантные формы аденодоксидов R106D и D109R имеют окислительно-восстановительные потенциалы $E_{1/2}$ в катодной отрицательной области потенциалов, причём значительно более отрицательные, чем цитохромы P450 (-579 ± 10 мВ, -590 ± 15 мВ, и -528 ± 10 мВ соответственно). Такие результаты указывают на возможность участия этих белков в качестве доноров электронов.

Ключевые слова: аденодоксин; мутантные формы; цитохром P450; поверхностный плазмонный резонанс (SPR); электроанализ; окислительно-восстановительный потенциал

DOI: 10.18097/PBMC20226801047

ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы P450 — гемопротеины, участвующие в 90% реакций I фазы биотрансформации ксенобиотиков, в том числе более чем 75% лекарственных препаратов, а также в биосинтезе и метаболизме эндогенных соединений, таких как холестерин, стероидные гормоны, жирные кислоты, эйкозаноиды [1-5]. С момента открытия цитохромов P450 в 1958 г. [6] в микросомах печени крыс идентифицировано более 370000 аминокислотных последовательностей цитохромов P450 (UniProt), которые содержатся в организме человека, животных, растений, микробов и даже вирусов, демонстрируя свое невероятное разнообразие в природе [1].

В геноме человека идентифицировано 57 форм цитохрома P450, 15 из которых участвуют в метаболизме ксенобиотиков [7-9]. Особенностью для проявления каталитической активности цитохромов P450 является образование комплексов с белками-партнёрами. Цитохром P450-содержащие системы объединены в 10 классов в зависимости от субклеточной локализации, состава комплексов и организации электрон-транспортной цепи [7, 8].

Основными являются классы I и II, в которых NADPH выполняет роль источника электронов для инициирования каталитической реакции. Класс I включает митохондриальные и бактериальные цитохром P450-зависимые системы, содержащие железосерные белки — ферредоксин или аденодоксин — и флавопротеин — редуктазу ферредоксина или аденодоксина в качестве редокс-партнёров цитохрома P450 [1, 8, 9]. Семейство CYP11 (изоферменты CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2)

является представителем класса I цитохром P450-зависимой системы стероидогенеза, локализованным во внутренней мембране митохондрий клеток коры надпочечников млекопитающих. К классу II принадлежат изоферменты цитохрома P450 микросомальной монооксигеназной системы, локализованной в мембране эндоплазматического ретикулула клетки и использующей в качестве редокс-партнёра флавопротеин — NADPH-цитохром P450 редуктазу (CPR). Для функционирования некоторых микросомальных изоферментов цитохрома P450 необходимо участие гемопротеина цитохрома b_5 (сyt b_5) [10, 11]. Белки редокс-партнёры последовательно переносят электроны от донора электронов NAD(P)H к активному центру гемопротеина, где происходит активация молекулярного кислорода с последующей реакцией включения атома кислорода в субстрат, это стадия является лимитирующей в каталитическом цикле [1, 6].

Аденодоксин (Adx) относится к железосеросодержащим [2Fe-2S] белкам, он является одноэлектронным переносчиком в электрон-транспортной цепи митохондриальных цитохромов P450 [12, 13]. Adx играет важную роль в биосинтезе стероидных гормонов у млекопитающих. Он переносит электроны от NADPH-зависимой аденодоксинредуктазы (AdR) к CYP11A1 (P450_{scs}) и ферментам семейства CYP11B. CYP11A1 катализирует три последовательных реакции гидроксирования, приводящие к удалению боковой цепи холестерина. Образующийся в результате прегненолон является предшественником всех стероидных гормонов у млекопитающих. Цитохром P45011b (CYP11B1) участвует в биосинтезе кортизола и альдостерона.

АДРЕНДОКСИНЫ И ИХ РОЛЬ В СИСТЕМАХ ЦИТОХРОМА P450

Цитохром P45018 (CYP11B2) катализирует последние две реакции синтеза альдостерона. Adx экспрессируется в надпочечниках [14-16], в плаценте [17], печени [18, 19], почках [20-22], где он участвует в цитохром P450-зависимом метаболизме стероидных гормонов, витамина D3 и жирных кислот [23-31]. Для того, чтобы передавать электроны между AdR и P450sc, Adx должен взаимодействовать с обоими редокс-партнерами — цитохромом P450 и редуктазой. Установлена кристаллическая структура комплекса Adx и CYP11A1 человека [30]. При этом, предполагается, что Adx может функционировать в виде димера. Для понимания механизма белок-белковых взаимодействий и возможности их регулирования представляет интерес изучение взаимодействия адренодоксинов, содержащих аминокислотные замены, и функционально значимых цитохромов P450, таких как CYP11A1, являющегося основным ферментом в метаболизме стероидных гормонов.

Оптические биосенсоры ранее использовались для исследований белок-белковых взаимодействий в цитохром P450sc-зависимой монооксигеназной системе [32-36].

Целью данной работы было определение кинетических констант и равновесных констант диссоциации комплексов цитохрома CYP11A1 (P450sc) с адренодоксином дикого типа Adx WT и мутантными формами адренодоксина R106D и D109R с помощью оптического биосенсора и исследование окислительно-восстановительных потенциалов адренодоксинов электрохимическими методами.

МЕТОДИКА

Adx быка (дикий тип и мутантные формы) экспрессирован и очищен как описано в [37]. Концентрацию адренодоксинов определяли спектрально с использованием $\epsilon = 11000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 414 нм [38]. Концентрации адренодоксинов, используемые для электрохимических экспериментов, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Характеристики адренодоксинов дикого типа и мутантных форм

Adx WT	R106D	D109R
500 мкМ	384 мкМ	751 мкМ

Спектральные исследования проводили с помощью спектрофотометра Cary 100 Scan UV-Vis ("Agilent Technologies", США). Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата AUTOLAB ("Eco Chemie", Нидерланды), снабжённого программным обеспечением GPES (версия 4.9.7). Все измерения проводили при комнатной температуре. Электрохимические исследования проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,4 в аэробных и анаэробных (аргон) условиях. В работе использовали трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати ("КолорЭлектроник", Россия) с графитовыми рабочим и вспомогательным

электродами и хлорид-серебряным электродом сравнения Ag/AgCl. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Цикловольтамперограммы (CV) регистрировали при скорости сканирования от 10 мВ/с до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии (SWV): начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал -600 мВ (для восстановительных процессов), шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 Гц до 100 Гц. Параметры, используемые при дифференциально-импульсной вольтамперометрии (DPV): амплитуда импульса 25 мВ, начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал -600 мВ, шаг потенциала 1 мВ, продолжительность импульса 50 мс. Все потенциалы приведены относительно хлорид-серебряного электрода сравнения Ag/AgCl.

Эксперименты по исследованию белок-белковых взаимодействий выполняли на оптическом SPR-биосенсоре Biacore 3000 ("GE Healthcare", США). Все измерения были выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5 ("GE Healthcare"), покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана.

Реагенты

В работе использовали реактивы фирмы "Sigma-Aldrich" (США): дидодецилдиметиламмоний бромид (DDAB), $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ боргидрид натрия. От фирмы "GE Healthcare" были получены следующие реагенты: HBS-буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,005% детергента P20, 10 мМ HEPES, pH 7,4); 10 мМ ацетатный буфер, pH 5,0; набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминокислоты (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид-HCl, N-гидроксисукцинимид, 1 М этаноламин-HCl, pH 8,5).

Синтез коллоидного раствора золота (наночастиц золота), стабилизированного DDAB, проводили, как описано ранее [39, 40].

Приготовление электродов

На поверхность рабочего графитового электрода наносили 1 мкл 10 мМ коллоидного раствора золота в 0,1 М DDAB в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин) наносили 1 мкл исследуемого Adx. Электроды оставляли на 12 ч при 4°C во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов.

Для экспериментов в анаэробных условиях аргон пропускали в буферный раствор электролита в течение 30 мин. Все потенциалы приведены относительно хлорид-серебряного электрода сравнения Ag/AgCl.

Анализ белок-белковых взаимодействий с помощью оптического биосенсора

Иммобилизацию Adx WT, D109R, R106D выполняли по стандартной методике [41]. Взаимодействие цитохрома P450sc с иммобилизованными препаратами Adx исследовали в диапазонах

концентраций от 0,01 мкМ до 10 мкМ. В качестве рабочего буфера использовали HBS-буфер. После пропускания каждого образца цитохрома CYP11A1 в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин поверхность чипа регенерировали буфером, содержащим 1 М NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7,4, в течение 0,5 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”).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование белок-белковых взаимодействий методом поверхностного плазмонного резонанса

Adx функционирует как окислительно-восстановительный белок, доставляя электроны к митохондриальным цитохромам P450 [42, 43]. Для исследования механизма белок-белковых взаимодействий между электрон-транспортным Adx, его мутантными формами и цитохромом P450scc наиболее информативным является метод поверхностного плазмонного резонанса, позволяющий количественно оценить взаимодействия и рассчитать кинетические параметры образования комплексов [32-36]. Было исследовано взаимодействие цитохрома P450scc (CYP11A1) как важнейшего фермента в стероидогенезе, с иммобилизованными в разных каналах чипа оптического биосенсора аденодоксинами. Обнаружено, что цитохром P450scc образует комплексы с Adx WT и D109R, но не с R106D, причём комплексы с D109R являются более прочными (табл. 2).

Замена отрицательно заряженной при физиологических значениях pH аспарагиновой кислоты D на положительно заряженный аргинин R в положении 109 приводит к более прочному связыванию ($K_d = (2,37 \pm 0,09) \cdot 10^{-8}$ М), в то время как дикий тип Adx WT связывается с $K_d = (1,23 \pm 0,09) \cdot 10^{-6}$ М.

Мутантный R106D Adx не проявляет комплексообразующих свойств с цитохромом P450scc. По-видимому, отрицательный заряд аспарагиновой кислоты не способствует образованию комплекса с регистрируемой K_d . Исходя из полученных данных по анализу комплексообразования мутантных форм Adx, можно предположить, что замена D109R приводит к образованию связи с отрицательно заряженными остатками на поверхности P450scc.

Так как поверхность взаимодействия P450scc с Adx представлена преимущественно положительно заряженными аминокислотными остатками [44-46], то наиболее вероятным аминокислотным остатком, который взаимодействует со стороны P450scc с R109 мутантной формы Adx D109R, является E429 P450scc. Ранее было показано, что нейтрализация заряда на E429 P450scc приводит к трёхкратному уменьшению значения K_d для комплекса P450scc-Adx [47].

Электроанализ аденодоксинов

Белки, содержащие железосерные кластеры Fe-S, были впервые обнаружены в 1960-х гг. на основе их уникального сигнала ЭПР с $g=1,9$, возникающего при восстановлении этих металлопротеинов [13, 16].

Для анализа возможного участия аденодоксинов и их мутантных вариантов в процессе переноса электронов в митохондриальных цитохром P450 содержащих системах были исследованы электрохимические свойства этих железосерных белков. Кофакторный кластер [2Fe-2S] может принимать и отдавать электроны, что может быть зарегистрировано с помощью электрохимических методов [43]. Изоэлектрическая точка Adx WT $pI=4,4$; при физиологических значениях pH этот железосеросодержащий белок имеет отрицательный заряд. Для нековалентной адсорбционной иммобилизации Adx WT и мутантных форм на электроде был использован дидодецилдиметиламмоний бромид (DDAB) как мембраноподобное соединение, поддерживающее нативную структуру белков и несущее положительный заряд, способствующий встраиванию аденодоксина на модифицированном электроде. Наночастицы золота являются активными системами наноэлектродов, способствующих электронному транспорту между белком и электродом. Adx проявляет свойства активного мобильного переносчика электронов между его природными редокс-партнёрами NADPH-зависимой аденодоксин редуктазой и цитохромами P450 (P450 11A1 и ферментами семейства CYP11B) [8, 29, 31].

Необходимо отметить, что как и гемопротеины цитохромы P450, Adx в восстановленной форме активно взаимодействует с кислородом. Электрохимически это свойство отражается в увеличении катодного восстановительного каталитического тока по сравнению с анодным окислительным током в анаэробных условиях. Плёнки DDAB достаточно сильно окисгенированы, поэтому цикловольтамперограммы (CV) не всегда симметричны (рис. 1А,Б) [42].

Таблица 2. Константы скоростей образования (k_{on}), диссоциации (k_{off}) и равновесные константы диссоциации (K_d) комплексов P450scc с Adx, рассчитанные на основании результатов анализа с помощью поверхностного плазмонного резонанса

Иммобилизованный белок	$k_{on}, M^{-1}c^{-1}$	k_{off}, c^{-1}	K_d, M
Adx WT	$(2,24 \pm 0,06) \cdot 10^3$	$(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$(1,23 \pm 0,09) \cdot 10^{-6}$
D109R	$(2,74 \pm 0,07) \cdot 10^5$	$(6,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$(2,37 \pm 0,09) \cdot 10^{-8}$
R106D*	—	—	—

Примечание: * — взаимодействие не зарегистрировано.

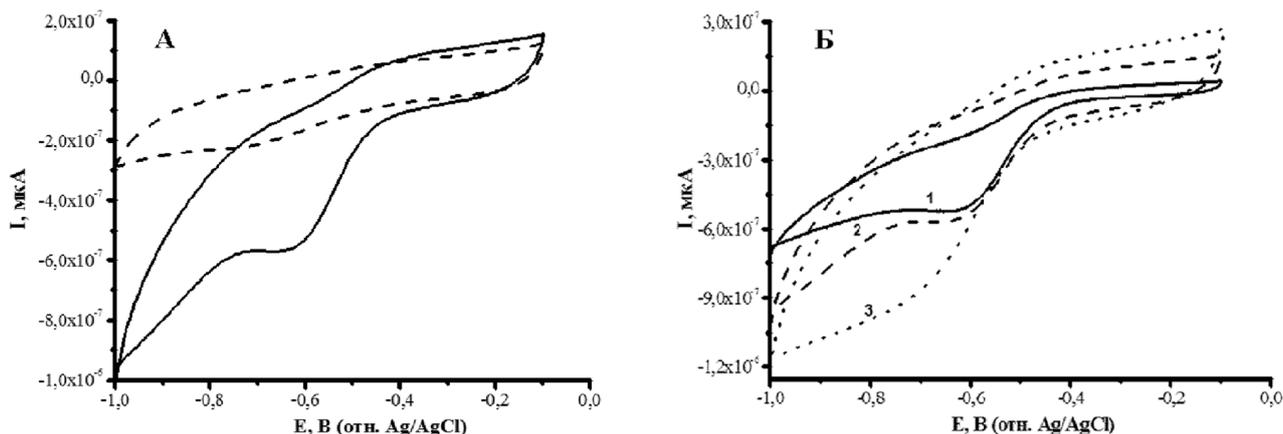


Рисунок 1. (А) Циклическая вольтамперограмма печатных электродов DDAV/Au/Adx WT в анаэробных условиях (пунктиром обозначен электрод DDAV/Au). Скорость сканирования 50 мВ/с. (Б) Циклическая вольтамперограмма печатных электродов DDAV/Au/Adx WT в анаэробных условиях. Скорость сканирования (1) 10 мВ/с, (2) 50 мВ/с, (3) 100 мВ/с. Объём электролита 1 мл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

Как следует из рисунка 1А, Adx WT восстанавливается при потенциале -600 мВ. Цикловольтамперограммы в аргоне также были не полностью симметричны, демонстрируя прочное связывание Adx WT с кислородом [43].

Чётко выраженная окислительно-восстановительная волна наблюдается при потенциале -600 мВ при скорости сканирования 50 мВ/с (рис. 1А). При низких скоростях сканирования (10 мВ/с, 50 мВ/с) процесс восстановления был близок к электрохимически обратимым, тогда как при более высоких скоростях сканирования (100 мВ/с) наблюдалась только квазиобратимость (рис. 1Б). Полученные результаты согласуются с результатами электроанализа Adx WT человека с использованием золотого электрода, модифицированного меркаптоундекановой кислотой и полиаллиламином [42] и пиролитического графитового рабочего электрода, модифицированного поли-L-лизинном [43].

Полупотенциал (средний потенциал) пиков определяется уравнением (1):

$$E_{1/2} = E_{pa} + E_{pc} / 2 \quad (1),$$

где E_{pa} — потенциал пика окисления (анодного пика) и E_{pc} — потенциал пика окисления восстановления (катодного пика) в анаэробных условиях.

Электрохимические параметры адренодоксина были исследованы методами вольтамперометрического анализа (квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА, SWV) и дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВА, DPV). КВВА и ДИВА — методы вольтамперометрического анализа, способствующие снижению границы определяемых концентраций. КВВА и ДИВА в анаэробных условиях продемонстрировали два симметричных пика, соответствующих обратимому процессу окисления/восстановления.

Цикловольтамперограммы Adx WT (рис. 1Б) демонстрировали линейную зависимость от скорости сканирования в диапазоне 10-100 мВ/с,

что свидетельствует о процессе, протекающем на поверхности электрода [48-50].

По данным КВВА окислительно-восстановительный полупотенциал Adx WT $E_{1/2} = -550 \pm 10$ мВ (относительно vs. Ag/AgCl) с $\Delta E = 18 \pm 5$ мВ (рис. 2). По данным ДИВА окислительно-восстановительный потенциал $E_{1/2}$ имеет близкое значение и соответствует -579 ± 10 мВ (рис. 3).

В присутствии кислорода происходит смещение восстановительного ($\Delta E = 98 \pm 8$ мВ) и окислительного потенциала ($\Delta E = 200 \pm 10$ мВ) в катодную область (рис. 4А и 4Б).

По данным ДИВА окислительно-восстановительный потенциал адренодоксина D109R в анаэробном буфере $E_{1/2} = -528$ мВ (относительно vs. Ag/AgCl) с $\Delta E = 36$ мВ (рис. 5). Adx R106D имеет полупотенциал $E'' = -590$ мВ (ДИВА), смещённый в более отрицательную область потенциалов (рис. 6). Такое катодное смещение может свидетельствовать о термодинамически невыгодном процессе протекания окислительно-восстановительных реакций мутанта R106D.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведённых экспериментов с использованием графитовых электродов, с модификацией рабочей поверхности мембраноподобными плёнками, содержащими наночастицы золота, стабилизированные дидодецилдиметиламмоний бромидом (DDAV/Au), можно сделать следующий вывод: электрохимическая активность Adx и его мутантных форм зависит от аминокислотных замен в полипептидной цепи. Замена положительно заряженной аминокислоты в положении 106 остаток аспарагиновой кислоты, содержащий ионизированную карбоксильную группу (адренодоксин R106D), приводит к смещению потенциала по сравнению с диким типом в более отрицательную область (табл. 3).

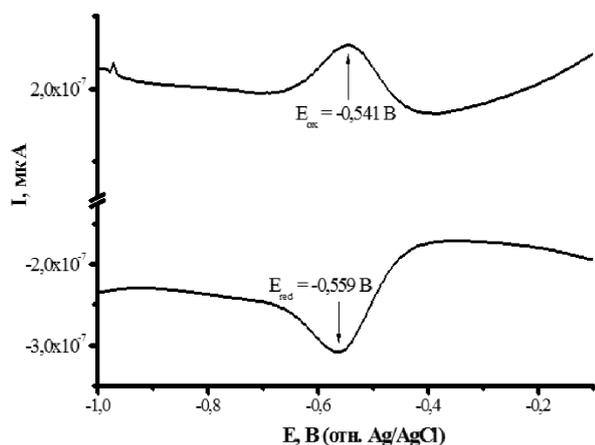


Рисунок 2. Квадратно-волновые вольтамперограммы ПГЭ/DDAB/Au/Adx WT электрода в анаэробных условиях. Объем электролита 1 мл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4. Частота 10 Гц.

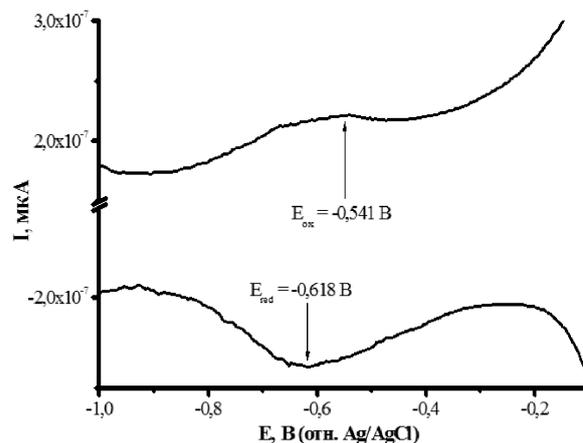


Рисунок 3. Дифференциальные импульсные вольтамперограммы DDAB/Au/Adx WT электрода в анаэробных условиях. Объем электролита 1 мл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

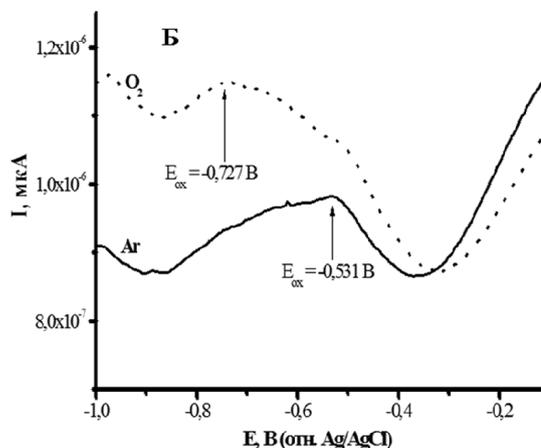
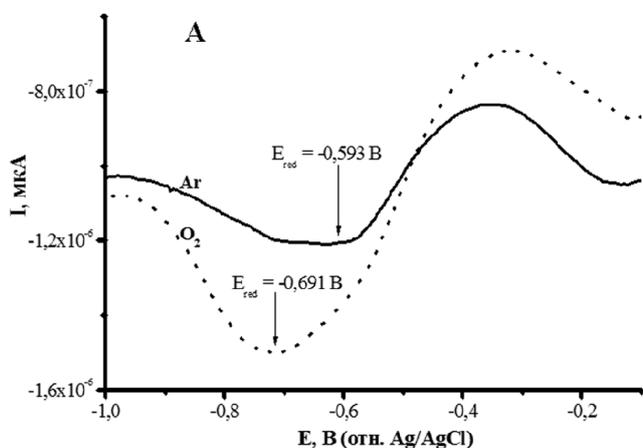


Рисунок 4. Квадратно-волновые вольтамперограммы DDAB/Au/Adx WT электрода в анаэробных (Ar) условиях и аэробных (O₂) условиях. (А) процесс восстановления, (Б) процесс окисления. Объем электролита 1 мл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4. Частота 10 Гц.

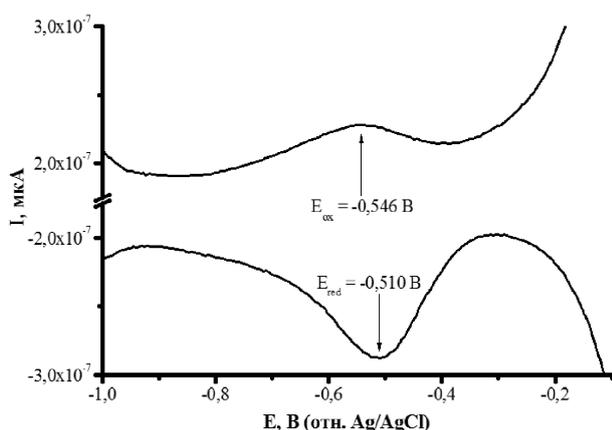


Рисунок 5. Дифференциальные импульсные вольтамперограммы ПГЭ/DDAB/Au/D109R электрода в анаэробных условиях. Объем электролита 1 мл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

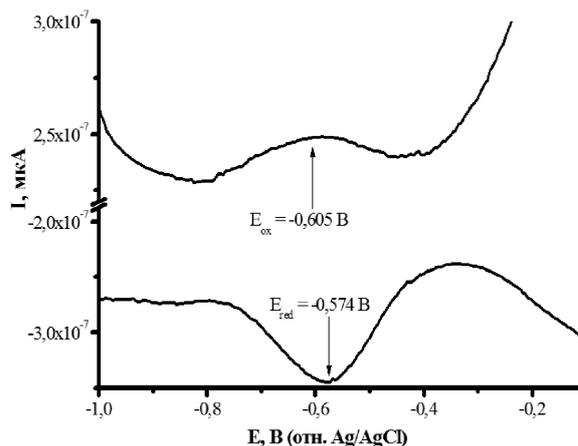


Рисунок 6. Дифференциальные импульсные вольтамперограммы DDAB/Au/R106D электрода в анаэробных условиях. Объем электролита 1 мл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, pH 7,4.

Таблица 3. Значения окислительно-восстановительных потенциалов $E_{1/2}$ Adx по данным квадратно-волновой вольтамперометрии

Металлопротеин	R106D	Adx WT	D109R
$E_{1/2}$, мВ	-590±15	-579±10	-528±10

Adx WT и его мутантные формы R106D и D109R имеют окислительно-восстановительные потенциалы в катодной отрицательной области потенциалов, причём значительно более отрицательные, чем цитохромы P450 [33, 34]. Аденодоксин R106D, содержащий аминокислотную замену аргинина106 на аспарагиновую кислоту106 и имеющий наиболее отрицательным потенциалом ($E_{1/2} = -590 \pm 15$ мВ), в экспериментах на оптическом биосенсоре не взаимодействует с P450_{scs}, а аденодоксин D109R (с наименее отрицательным потенциалом $E_{1/2} = -528 \pm 10$ мВ) показал большую аффинность, чем Adx WT. Такое значение потенциалов может способствовать участию аденодоксина в электрон-транспортных путях как редокс-партнёров и прямых доноров электронов в цитохром P450-системах.

Необходимо отметить, что окислительно-восстановительный статус белков, содержащих такие простетические группы, как гем, влияя на конформацию белков [16]. Можно предположить, что и для белков, содержащих железосерные редокс-центры ([2Fe-2S] кластер для аденодоксина) могут происходить конформационные перестройки; отсутствие взаимодействия Adx R106D с цитохромом P450_{scs} (CYP11A1) может их отражать. Для Adx D109R такие конформационные перестройки могут быть менее существенными и не влиять на аффинность по отношению к цитохрому P450_{scs}.

Таким образом, рассчитаны кинетические константы и равновесные константы диссоциации комплексов цитохрома CYP11A1 (P450_{scs}) с Adx WT и его мутантными формами Adx R106D и D109R с помощью оптического биосенсора. С помощью методов циклической вольтамперометрии и вольтамперометрического анализа определены окислительно-восстановительные потенциалы аденодоксина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность И.Н. Гарнастаю за получение мутантных форм Adx и Н.В. Струшкевич за получение P450_{scs}.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 гг.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Li Z., Jiang Y., Guengerich F.P., Ma L., Li S., Zhang W. (2020) Engineering cytochrome P450 enzyme systems for biomedical and biotechnological applications. *J. Biol. Chem.*, **295**(3), 833-849. DOI: 10.1074/jbc.REV119.008758
- Hrycaj E.G., Bandiera S.M. (2015) Monooxygenase, peroxygenase and peroxidase properties and reaction mechanism of cytochrome P450 enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **851**, 1-61. DOI: 10.1007/978-3-319-16009-2_1
- Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. (2018) Методы определения функциональной активности изоферментов цитохрома P450. *Биомедицинская химия*, **64**(2), 149-168. [Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. (2018) Methods for determination of functional activity of cytochrome P450 isoenzymes. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **64**(2), 149-168.] DOI: 10.18097/PBMC20186402149
- Guengerich F.P. (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 611-650. DOI: 10.1021/tx0002583
- Bernhardt R. (2006) Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J. Biotechnol.*, **124**, 128-145. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.026
- Klingenberg M. (1958) Pigments of rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **75**, 376-386. DOI: 10.1016/0003-9861(58)90436-3
- Hannemann F., Bichet A., Ewen K.M., Bernhardt R. (2007) Cytochrome P450 systems — biological variations of electron transport chains. *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**(3), 330-344. DOI: 10.1016/j.bbagen.2006.07.017
- Li S., Du L., Bernhardt R. (2020) Redox partners: function modulators of bacterial P450 enzymes. *Trends Microbiol.*, **28**(6), 445-454. DOI: 10.1016/j.tim.2020.02.012
- Akhtar M., Wright J.N., Lee-Robichau P. (2011) A review of mechanistic studies on aromatase (CYP19) and 17 α -hydroxylase-17,20-lyase (CYP17). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **125**, 2-12. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.11.003
- Schenkman J.B., Jansson I. (2003) The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol. Ther.*, **97**(2), 139-152. DOI: 10.1016/s0163-7258(02)00327-3
- Im S.C., Waskell L. (2011) The interaction of microsomal cytochrome P450 2B4 with its redox partners, cytochrome P450 reductase and cytochrome b(5). *Arch. Biochem. Biophys.*, **507**, 144-153. DOI: 10.1016/j.abb.2010.10.023
- Ortiz de Montellano P.R. (ed.) (2015) *Cytochrome P450. Structure, mechanism, and biochemistry.* University of California, San Francisco, California, USA, 2099 p.
- Ewen K.M., Kleser M., Bernhardt R. (2011) Adrenodoxin: the archetype of vertebrate-type [2Fe-2S] cluster ferredoxins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1814**, 111-125. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.06.003
- Gomez L., Kovac J.R., Lamb D.J. (2015) CYP17A1 inhibitors in castration-resistant prostate cancer. *Steroids*, **95**, 80-87. DOI: 10.1016/j.steroids.2014.12.021
- Hargrove T.Y., Friggeri L., Wawrzak Z., Sivakumaran S., Yazlovitskaya E.M., Hiebert S.W., Guengerich F.P., Waterman M.R., Lepesheva G.I. (2016) Human sterol 14 α -demethylase as a target for anticancer chemotherapy: towards structure-aided drug design. *J. Lipid Res.*, **57**, 1552-1563. DOI: 10.1194/jlr.M069229
- Liu J., Chakraborty S., Hosseinzadeh P., Yu Y., Tian S., Petrik I., Bhagi A., Lu Y. (2014) Metalloproteins Containing Cytochrome, Iron-Sulfur, or Copper Redox Centers. *Chem. Rev.*, **114**, 4366-4469. DOI: 10.1021/cr400479b

17. *Brixius-Anderko S., Scott E.* (2021) Structural and functional insights into aldosterone synthase interaction with its redox partner protein adrenodoxin. *J. Biol. Chem.*, **296**, 100794. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100794
18. *Waskell L., Kim J.-J.P.* (2015) Electron Transfer Partners of Cytochrome P450. In: *Cytochrome P450. Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Ortiz de Montellano P.R., ed.). Springer Cham Heidelberg, New York Dordrecht London, pp. 33-68.
19. *Suzuki K., Kimura T.* (1965) An iron protein as a component of steroid 11-beta-hydroxylase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**, 340-345. DOI: 10.1016/0006-291x(65)90465-1
20. *Omura T., Sanders E., Estabrook R.W., Cooper D.Y., Rosenthal O.* (1966) Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P-450 reductase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 660-673.
21. *Kimura T., Suzuki K.* (1967) Components of the electron transport system in adrenal steroid hydroxylase. Isolation and properties of non-heme iron protein (adrenodoxin). *J. Biol. Chem.*, **242**, 485-491.
22. *Mittal S., Zhu Y.Z., Vickery L.E.* (1988) Molecular cloning and sequence analysis of human placental ferredoxin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **264**, 383-391. DOI: 10.1016/0003-9861(88)90303-7
23. *Чащин В.Л., Лапко В.Н., Адамович Т.Б., Кириллова Н.М., Лапко А.Г., Ахрем А.А.* (1986) Первичная структура гепаторедоксина из митохондрий печени быка. *Биоорганическая химия*, **12**(9), 1286-1289. [*Chashchin V.L., Lapko V.N., Adamovich T.B., Kirillova N.M., Lapko A.G.* (1986) Primary structure of hepatoredoxin from bovine liver mitochondria. *Bioorganicheskaya Khimiya*, **12**, 1286-1289.]
24. *Matsuo Y., Tomita S., Tsuneoka Y., Furukawa A., Ichikawa Y.* (1992) Molecular cloning and nucleotide sequences of bovine hepato-ferredoxin cDNA; identical primary structures of hepato- and adreno-ferredoxins. *Int. J. Biochem.*, **24**, 289-295.
25. *Pedersen J.I., Ghazarian J.G., Orme-Johnson N.R., de Luca H.F.* (1976) Isolation of chick renal mitochondrial ferredoxin active in the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase system. *J. Biol. Chem.*, **251**, 3933-3941.
26. *Ohashi M., Omura T.* (1978) Presence of the NADPH-cytochrome P-450 reductase system in liver and kidney mitochondria. *J. Biochem.*, **83**, 249-260. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a131898
27. *Лобанов Н.А., Власова Т.Н., Адамович Т.Б., Азева Т.Н., Бонина Т.А., Богдановская И.М., Лапко В.Н.* (2001) Первичная структура ферредоксина из митохондрий почек быка. *Биохимия*, **66**, 1060-1065. [*Lobanov N.A., Vlasova T.M., Adamovich T.B., Azeva T.N., Bonina T.A., Bogdanovskaya I.M., Lapko V.N.* (2001) Primary structure of ferredoxin from bovine kidney mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 860-864.]
28. *Chang C.Y., Wu D.A., Mohandas T.K., Chung B.C.* (1990) Structure, sequence, chromosomal location, and evolution of the human ferredoxin gene family. *DNA Cell Biol.*, **9**, 205-212. DOI: 10.1089/dna.1990.9.205
29. *Usanov S.A., Chashchin V.L., Akhrem A.A.* (1990) Cytochrome P-450 dependent pathways of the biosynthesis of steroid hormones. In: *Molecular mechanisms of adrenal steroidogenesis and aspects of regulation and application* (Ruckpaul K., Rein H., eds.) Akademie Verlag, Berlin, Germany, pp. 1-57.
30. *Strushkevich N., MacKenzie F., Cherkesova T., Grabovec I., Usanov S., Park H.-W.* (2011) Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 10139-10143. DOI: 10.1073/pnas.1019441108
31. *Pechurskaya T.A., Harnastai I.N., Grabovec I.P., Gilep A.A., Usanov S.A.* (2007) Adrenodoxin supports reactions catalyzed by microsomal steroidogenic cytochrome P450s. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353**, 598-604. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.12.047
32. *Ivanov Y.D., Usanov S.A., Archakov A.I.* (1999) Optical biosensor studies on the productive complex formation between the components of cytochrome P450scc dependent monooxygenase system. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **47**, 327-336. DOI: 10.1080/15216549900201353
33. *Ivanov Y.D., Kanaeva I.P., Karuzina I.I., Usanov S.A., Hui Bon Hoa G., Sligar S.G., Archakov A.I.* (2001) Revelation of ternary complexes between redox partners in cytochrome P450-containing monooxygenase systems by the optical biosensor method. *J. Inorg. Biochem.*, **87**(4), 175-184. DOI: 10.1016/S0162-0134(01)00332-4
34. *Schiffler B., Zöllner A., Bernhardt R.* (2004) Stripping down the mitochondrial cholesterol hydroxylase system, a kinetics study. *J. Biol. Chem.*, **279**, 34269-34276. DOI: 10.1074/jbc.M402798200
35. *Yablokov E., Sushko T., Ershov P., Florinskaya A., Gnedenko O., Shkel T., Grabovec I., Strushkevich N., Kaluzhskiy L., Usanov S., Gilep A., Ivanov A.* (2019) A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners. *Biochimie*, **162**, 156-166. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.04.020
36. *Yablokov E.O., Sushko T.A., Kaluzhskiy L.A., Kavaleuski A.A., Mezentshev Y.V., Ershov P.V., Gilep A.A., Ivanov A.S., Strushkevich N.V.* (2021) Substrate-induced modulation of protein-protein interactions within human mitochondrial cytochrome P450-dependent system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **208**, 105793. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2020.105793
37. *Sagara Y., Hara T., Ariyasu Y., Ando F., Tokunaga N., Horiuchi T.* (1992) Direct expression in *Escherichia coli* and characterization of bovine adrenodoxins with modified amino-terminal regions. *FEBS Lett.*, **300**, 208-212. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80847-a
38. *Huang J.J., Kimura T.* (1973) Studies on adrenal steroid hydroxylases. Oxidation reduction properties of adrenal iron-sulfur protein (adrenodoxin). *Biochemistry*, **12**, 406-409. DOI: 10.1021/bi00727a007
39. *Han X., Cheng W., Zhang Z., Dong S., Wang E.* (2002) Direct electron transfer between hemoglobin and a glassy carbon electrode facilitated by lipid-protected gold nanoparticles. *Biochem. Biophys. Acta*, **1556**, 273-277. DOI: 10.1016/s0005-2728(02)00372-9
40. *Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Khatri Y., Zavialova M.G., Bernhardt R., Archakov A.I., Shumyantseva V.V.* (2016) Scrutiny of electrochemically-driven electrocatalysis of C-19 steroid 1 α -hydroxylase (CYP260A1) from *Sorangium cellulosum* So ce56. *Anal. Biochem.*, **513**, 28-35. DOI: 10.1016/j.ab.2016.08.016
41. *Biacore Sensor Surface Handbook* (2005) 98 p.
42. *Jin W., Wollenberger U., Bernhardt R., Stöcklein W.F.M., Scheller F.W.* (1998) Direct electron transfer of adrenodoxin — a [2Fe-2S] protein — and its mutants at modified gold electrode. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **47**, 75-79.
43. *Johnson D., Norman S., Tuckey R.C., Martin L.L.* (2003) Electrochemical behaviour of human adrenodoxin

- on a pyrolytic graphite electrode. *Bioelectrochemistry*, **59**, 41-47. DOI: 10.1016/s1567-5394(02)00188-3
44. *Usanov S.A., Graham S.E., Lepesheva G.I., Azeva T.N., Strushkevich N.V., Gilep A.A., Estabrook R.W., Peterson J.A.* (2002) Probing the interaction of bovine cytochrome P450scc (CYP11A1) with adrenodoxin: evaluating site-directed mutations by molecular modeling. *Biochemistry*, **41**, 8310-8320. DOI: 10.1021/bi0255928
45. *Азева Т.Н., Гилеп А.А., Лепешева Г.И., Струшкевич Н.В., Усанов С.А.* (2001) Сайт-направленный мутагенез цитохрома P-450scc. II. Влияние замены остатков аргинина Arg425 и Arg426 на структурно-функциональные свойства цитохрома P-450scc. *Биохимия*, **66**, 698711. [*Azeva T.N., Gilep A.A., Lepesheva G.I., Strushkevich N.V., Usanov S.A.* (2001) Site-directed mutagenesis of cytochrome P450scc. II. Effect of replacement of the Arg425 and Arg426 residues on the structural and functional properties of the cytochrome P450scc. *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 564-575.] DOI: 10.1023/a:1010271205147
46. *Лепешева Г.И., Азева Т.Н., Струшкевич Н.В., Гилеп А.А., Усанов С.А.* (2000) Сайт-направленный мутагенез цитохрома P450scc (CYP11A1). Влияние замены остатков лизина на структурно-функциональные свойства. *Биохимия*, **65**, 1673-1683. [*Lepesheva G.I., Azeva T.N., Strushkevich N.V., Gilep A.A., Usanov S.A.* (2000) Site-directed mutagenesis of cytochrome P450scc (CYP11A1). Effect of lysine residue substitution on its structural and functional properties. *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 1409-1418.] DOI: 10.1023/a:1002809024292
47. *Струшкевич Н.В., Гарнастай И.Н., Усанов С.А.* (2010) Механизм стероидогенного электронного транспорта: роль консервативного остатка Glu429 в дестабилизации комплекса цитохром P45011A1//адренодоксин. *Биохимия*, **75**, 664-674. [*Strushkevich N.V., Harnastai I.N., Usanov S.A.* (2010) Mechanism of steroidogenic electron transport: role of conserved Glu429 in destabilization of CYP11A1-adrenodoxin complex. *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 570-578.] DOI: 10.1134/s0006297910050056
48. *Murray R.W.* (1987) Chemically modified electrodes. In: *Electroanalytical Chemistry (Bard A.J., ed.)*. Marcel Dekker, New York, 13, pp. 191.
49. *Compton R.G., Banks C.E.* (2011) *Understanding voltammetry (2nd edition)* Imperial College Press, London, UK, 444 p.
50. *Rusling F., Wang B., Yun S.* (2008) Electrochemistry of redox enzymes. In: *Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Applications (Bartlett P.N., ed.)*, John Wiley & Sons, USA, Ch. 2, p. 39.

Поступила в редакцию: 19. 01. 2022.
После доработки: 15. 02. 2022.
Принята к печати: 17. 02. 2022.

ADRENODOXINS AND THEIR ROLE IN THE CYTOCHROME P450 SYSTEMS

V.V. Shumyantseva^{1,2}, T.V. Bulko¹, O.V. Gnedenko^{1}, E.O. Yablokov¹, S.A. Usanov³, A.S. Ivanov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³Institute of Bioorganic Chemistry, Minsk, Belarus

The role of partner proteins in the formation of functional complexes in cytochrome P450 systems was investigated by means of optical biosensor technique. Kinetic constants and equilibrium dissociation constants of complexes of cytochrome CYP11A1 (P450scc) with wild-type adrenodoxin (Adx WT) and mutant forms of adrenodoxin R106D and D109R were determined using an optical biosensor. Wild-type adrenodoxin ($K_d = (1.23 \pm 0.09) \cdot 10^{-6}$ M) and mutant D109R ($K_d = (2.37 \pm 0.09) \cdot 10^{-8}$ M) formed complexes with cytochrome P450scc. For the R106D mutant, no complex formation was detected. To investigate the possibility of the participation of adrenodoxins and their mutant variants in the process of electron transfer as electron donors in mitochondrial cytochrome P450 systems, the electrochemical properties of these iron-sulfur proteins Adx WT and mutant forms of adrenodoxins were studied. Adx WT, mutant forms R106D and D109R have redox potentials $E_{1/2}$ significantly more negative than cytochromes P450 (-579±10 mV, -590±15 mV, and -528±10 mV, respectively). These results suggest that Adx WT and mutant forms may be electron donors in the cytochrome P450 systems.

Key words: adrenodoxine; mutant forms; cytochrome P450; surface plasmon resonance (SPR); electroanalysis; redox potential

Funding. The work was done in the framework of the Russian Federation fundamental research program for the long-term period for 2021-2030.

Received: 19.01.2022, revised: 15.02.2022, accepted: 17.02.2022.