©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ИЗАТИНА НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОХРОМА b_5 С ЦИТОХРОМАМИ Р450

П.В. Ершов[1]*, Е.О. Яблоков[1], Ю.В. Мезенцев[1], Л.А. Калужский[1], А.В. Флоринская[1], А.В. Веселовский[1], О.В. Гнеденко[1], А.А. Гилеп[2], С.А. Усанов[2], А.Е. Медведев[1], А.С. Иванов[1]

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ), 119121, Москва, Погодинская ул., 10, стр. 8; эл. почта: pavel79@inbox.ru
[2]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси (ИБОХ), 220141 Беларусь, Минск, ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5, корп. 2

Цитохромы Р450 (CYP) – многочисленные гем-содержащие ферменты, участвующие в разнообразных биохимических процессах, включая метаболизм ксенобиотиков, биосинтез холестерина, стероидных гормонов и др. Поскольку одним из субстратов ряда CYP служит индол, который окисляется ими до изатина, мы предположили, что изатин по принципу обратной связи может влиять на межмолекулярные взаимодействия белков-компонентов монооксигеназной системы, включающей CYP. Целью данной работы было исследование возможного влияния изатина на взаимодействие ряда CYP человека с цитохромом b_5 (CYB5A). В модельной оптико-биосенсорной тест-системе на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР) был проведен анализ взаимодействия иммобилизованного CYB5A с 8 различными CYP в присутствии и в отсутствии изатина. Впервые показано, что высокая концентрация изатина (270 мкМ) увеличивала значение K_d комплексов CYB5A/CYP3A5 и CYB5A/CYP3A4 (в 2 и 3 раза соответственно), но не влияла на комплексообразование CYB5A с другими CYP, включая метаболизирующие индол CYP 2C19 и CYP2E1. При этом инжекция изатина после образования на оптическом чипе молекулярного комплекса CYB5A/CYP3A4 примерно на 30% увеличивала скорость его распада. По данным молекулярного докинга изатин может влиять на взаимодействие CYP3A5 или CYP3A4 с CYB5A за счёт связывания в области контакта CYB5A/CYP.

Ключевые слова: цитохромы Р450, цитохром b_5, белок-белковые взаимодействия, изатин, поверхностный плазмонный резонанс, интерактомика

DOI 10.18097/PBMC20176302170

ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы Р450 (CYP) являются суперсемейством монооксигеназ, широко распространённых в живых организмах. У человека обнаружено более 50 типов CYP [1], участвующих в разнообразных биохимических и физиологических процессах, таких как метаболизм ксенобиотиков (в том числе лекарственных соединений) (CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 и CYP1B1 [2-5]), биосинтез холестерина и стероидных гормонов (CYP11A1 [6], CYP17A1 [7], CYP11B1 [8]). Небольшой гемопротеин цитохром b_5 (CYB5A) взаимодействует с рядом CYP, выполняя в этих монооксигеназных системах роль переносчика электронов и аллостерического эффектора [9-14]. Известно, что связывание субстрата CYP способно изменять сродство комплексов в комплексах CYP/CYB5A [15]. Одним из субстратов цитохромов Р450 системы является индол, который окисляется до изатина рядом CYP (CYP2A6, CYP2C19 и CYP2E1) [16]. Изатин (2,3-диоксоиндол) – эндогенный индол, обладающий широким спектром биологических и фармакологических активностей, которые реализуются при взаимодействии с многочисленными внутриклеточными изатин-связывающими белками [17-20].

Мы предположили, что изатин, являясь продуктом монооксигеназной системы CYP, может по типу обратной связи влиять на межмолекулярные взаимодействия отдельных компонентов этой системы.

Целью данной работы была оценка влияния изатина на белок-белковые взаимодействия (ББВ) между CYB5 и различными CYP в модельной оптико-биосенсорной тест-системе на основе поверхностного плазмонного резонанса (ППР). В тестовую выборку цитохромов Р450 были включены как индол-метаболизирующие CYP, так и другие CYP (в качестве контроля) с узкой и широкой субстратной специфичностью.

МЕТОДИКА

Материалы

В работе использованы высоко очищенные (>95%, по данным электрофореза) препараты рекомбинантных белков: цитохромы Р450 (CYP2C9, CYP3A5, CYP3A4, CYP11A1, CYP17A1, CYP11B1, CYP2C19, CYP2E1), микросомальный цитохром b_5 (CYB5A) и цитохром Р450 редуктаза (CPR), полученные в ИБХ НАН Беларуси [20].

Поверхностно-плазмонный резонанс (ППР)

Анализ ББВ выполняли в двухстадийной оптимизированной тест-системе на базе оптического биосенсора Biacore 3000 (“GE Healthcare”, США), работающего на эффекте ППР. Расчет значений равновесной константы диссоциации (K_d) и констант скоростей образования (k_{on}) и распада комплексов (k_{off}) выполняли путём обработки полученных сенсограм

* - адресат для переписки

с помощью программного комплекса Biaevaluation v.4.1. В качестве лиганда был использован CYB5A, ковалентно иммобилизованный на оптическом чипе CM5, согласно [21]. В качестве рабочего буфера был использован буфер HBS-EP+ с добавлением 2 мМ дитиотреитола. В качестве аналитов были использованы растворы (0,5 мкМ) тестовых белков (CYP и CPR) с добавлением 270 мкМ изатина и инкубацией в течение 15 мин. Контролем служили пробы, инкубированные в течение 15 мин без изатина. Инжекцию аналита выполняли в режиме Quickinject в течение 5 мин со скоростью потока 10 мкл/мин. При обнаружении действия изатина на ББВ выполняли серию инжекций с разными концентрациями аналита для последующего вычисления кинетических и равновесных констант комплексообразования. Дополнительно исследовали влияние изатина на скорость диссоциации комплексов CYB5A/CYP, предварительно сформированных в его отсутствии (вторая стадия тест-системы).

Молекулярное моделирование

В работе использованы пространственные структуры CYP3A4 (коды PDB 1tqn, 3ua1, 4k9t и 4k9w) из банка данных PDB [http://rcsb.org/] и четыре модели CYP3A5, построенные по методу гомологии на основе структур CYP3A4 на web-сервере SWISS-MODEL с оценкой качества моделей по величине QMEAN (http://swissmodel.expasy.org/) [22, 23]. Структуры моделей были оптимизированы методом минимизации энергии по методу Пауэлла с использованием силового поля Tripos в вакууме. Значения парциальных атомных зарядов рассчитывали методом Gasteiger-Huckel. Структура изатина была построена и оптимизирована в программе SYBYL8.1. Парциальные атомные заряды рассчитывали полуэмпирическим кванто-химическим методом AM1. Молекулярный докинг изатина с CYP3A4 и CYP3A5 выполняли с использованием программы DOCK 6.5 (США). Доступные для растворителя поверхности были рассчитаны по алгоритму Конолли с радиусом пробы 1,4 Å. Поля для электростатического потенциала и потенциала Ван дер Ваальса были сгенерированы на решётке с шагом 0,3 Å; “отсечка” для нековалентных взаимодействий составляла 12,0 Å.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В соответствии с ранее опубликованными данными [24, 25], иммобилизованный CYB5A образовывал комплексы с различными типами CYP, включая изоформы, участвующие в образовании изатина из индола (рис. 1). При этом изатин влиял на образование комплексов только CYB5A/CYP3A4 и CYB5A/CYP3A5, заметно снижая сигнал биосенсора при достижении равновесия комплексообразования. Для получения количественных характеристик действия изатина на данные ББВ были получены наборы сенсограмм ББВ при разных концентрациях аналитов. В качестве примера на рисунке 2А приведены наборы сенсограмм взаимодействия CYP3A4 с CYB5A в отсутствии и в присутствии изатина.

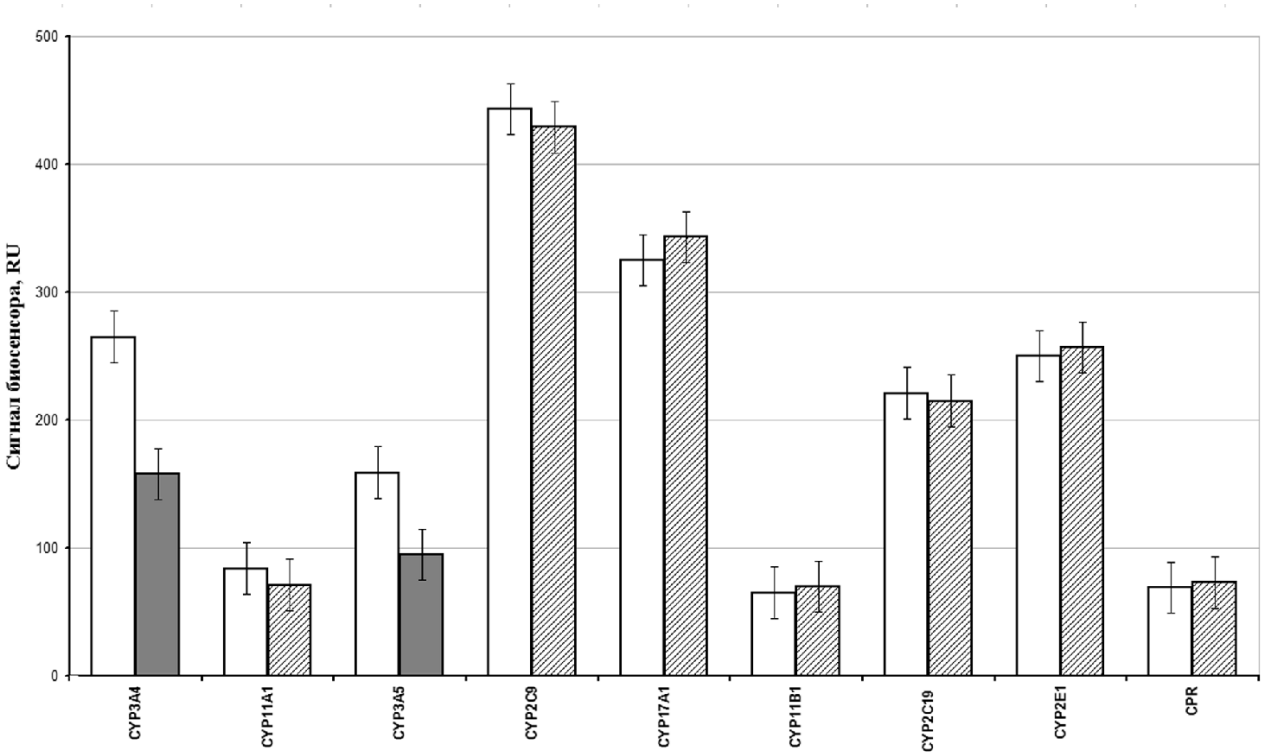

Рисунок 1. Белок-белковые взаимодействия между цитохромом b_5, иммобилизованном на оптическом чипе, и его партнерами (CYP и CPR) в присутствии и отсутствии 270 мкМ изатина. Обозначения: белый цвет – ББВ без изатина, штриховка – ББВ в присутствии изатина, позитивный результат теста обозначен серым цветом. RU – response units (1 RU соответствует 1 пг аналита связанному на поверхности чипа на 1 мм^2). Приведены средние заначения сигнала биосенсора ± ошибка средней n≤5.

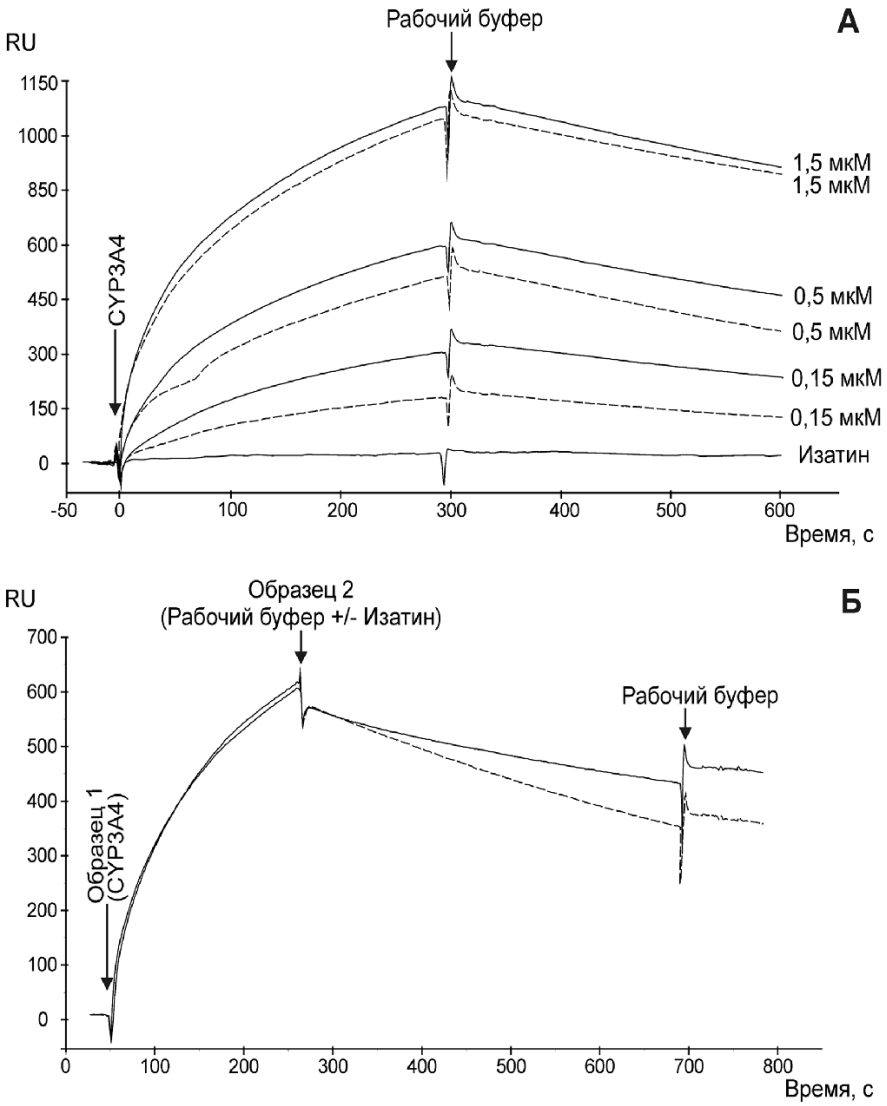

Рисунок 2. ППР сенсограммы образования/диссоциации молекулярного комплекса между CYB5A и CYP3A4: А – в отсутствии (сплошная линия) и в присутствии 270 мкМ изатина (пунктирная линия). Б – сенсограммы диссоциации сформированного на чипе молекулярного комплекса CYB5A/CYP3A4: инжекция 0,5 мкМ CYP3A4 (образец №1); инжекция рабочего буфера без добавления изатина (сплошная линия), либо с добавлением 270 мкМ изатина (пунктирная линия) (образец №2). Скорость потока рабочего буфера 10 мкл/мин.

Расчёт кинетических и равновесных параметров комплексообразования CYB5A с CYP3A4 и CYP3A5 показал трёхкратное и двукратное увеличение равновесной константы диссоциации (K_d) (таблица) соответственно. Как видно из таблицы, данный эффект в случае CYB5A/CYP3A4 обусловлен преимущественно уменьшением величины константы скорости образования комплексов (k_{on}), в то время как в случае CYB5A/CYP3A5 – возрастанием константы скорости распада комплексов (k_{off}).

Заметного влияния изатина на параметры комплексообразования CYB5A с другими исследованными CYP, включая индол-метаболизирующими цитохромами (CYP2E1 и CYP2C19), не обнаружено (таблица).

В случае комплексов CYB5A/CYP3A4 изатин был способен не только тормозить ББВ, но и ускорять диссоциацию комплексов, сформированных на поверхности чипа перед введением изатина (рис. 2Б). Однако данный эффект не наблюдался при диссоциации комплекса CYB5A/CYP3A5.

Для возможной интерпретации полученных данных о селективном влиянии изатина на комплексообразование CYB5A/CYP3A4 и CYB5A/CYP3A5 были выполнены компьютерные эксперименты по моделированию пространственной структуры CYP3A5 и молекулярного докинга изатина по общим поверхностям CYP3A4 и CYP3A5. Пространственные структуры модели CYP3A5 и шаблона (CYP3A4), использованного для построения, приведены на рисунке 3 (А и Б). Всего было построено четыре модели CYP3A5 на основе четырёх структур CYP3A4 в качестве шаблонов. Проверка построенных моделей с помощью программы Procheck показала их корректность. Структуры CYP3A4 и соответствующие им построенные модели CYP3A5 были затем использованы для поиска потенциальных мест связывания изатина.

Таблица. Влияние изатина на кинетические и равновесные параметры комплексообразования между цитохромами b_5 (CYB5A) и Р450 (CYP3A4, CYP3A5, CYP2E1 и CYP2C19)

	Изатин	k_{on}, ($M^{-1}c^{-1}$)	k_{off}, (c^{-1})	K_d, (M)
CYB5A/CYP3A4	–	$(1,3\pm0,4)\cdot10^{4}$	$(1,0\pm0,2)\cdot10^{-3}$	$(8,0\pm1,2)\cdot10^{-8}$
CYB5A/CYP3A4	+	$(6,0\pm1,3)\cdot10^{3}$	$(1,6\pm0,3)\cdot10^{-3}$	$(2,6\pm0,2)\cdot10^{-7}\uparrow$
CYB5A/CYP3A5	–	$(5,1\pm0,2)\cdot10^{3}$	$(1,1\pm0,1)\cdot10^{-3}$	$(2,2\pm0,2)\cdot10^{-7}$
CYB5A/CYP3A5	+	$(4,4\pm0,2)\cdot10^{3}$	$(2,1\pm0,3)\cdot10^{-3}$	$(4,7\pm0,3)\cdot10^{-7}\uparrow$
CYB5A/CYP2E1	–	$(6,4\pm0,1)\cdot10^{3}$	$(2,9\pm0,2)\cdot10^{-3}$	$(4,5\pm0,3)\cdot10^{-7}$
CYB5A/CYP2E1	+	$(6,6\pm0,2)\cdot10^{3}$	$(3,1\pm0,3)\cdot10^{-3}$	$(4,6\pm0,1)\cdot10^{-7}$
CYB5A/CYP2C19	–	$(1,7\pm0,1)\cdot10^{4}$	$(8,4\pm0,3)\cdot10^{-3}$	$(4,9\pm0,3)\cdot10^{-7}$
CYB5A/CYP2C19	+	$(1,9\pm0,3)\cdot10^{4}$	$(8,0\pm0,4)\cdot10^{-3}$	$(4,6\pm0,2)\cdot10^{-7}$

Примечание: k_{on} – константа скорости образования белок-пептидного комплекса, k_{off} – константа скорости диссоциации комплекса, K_d - равновесная константа диссоциации комплекса. Знак ↑ показывает увеличение K_d.

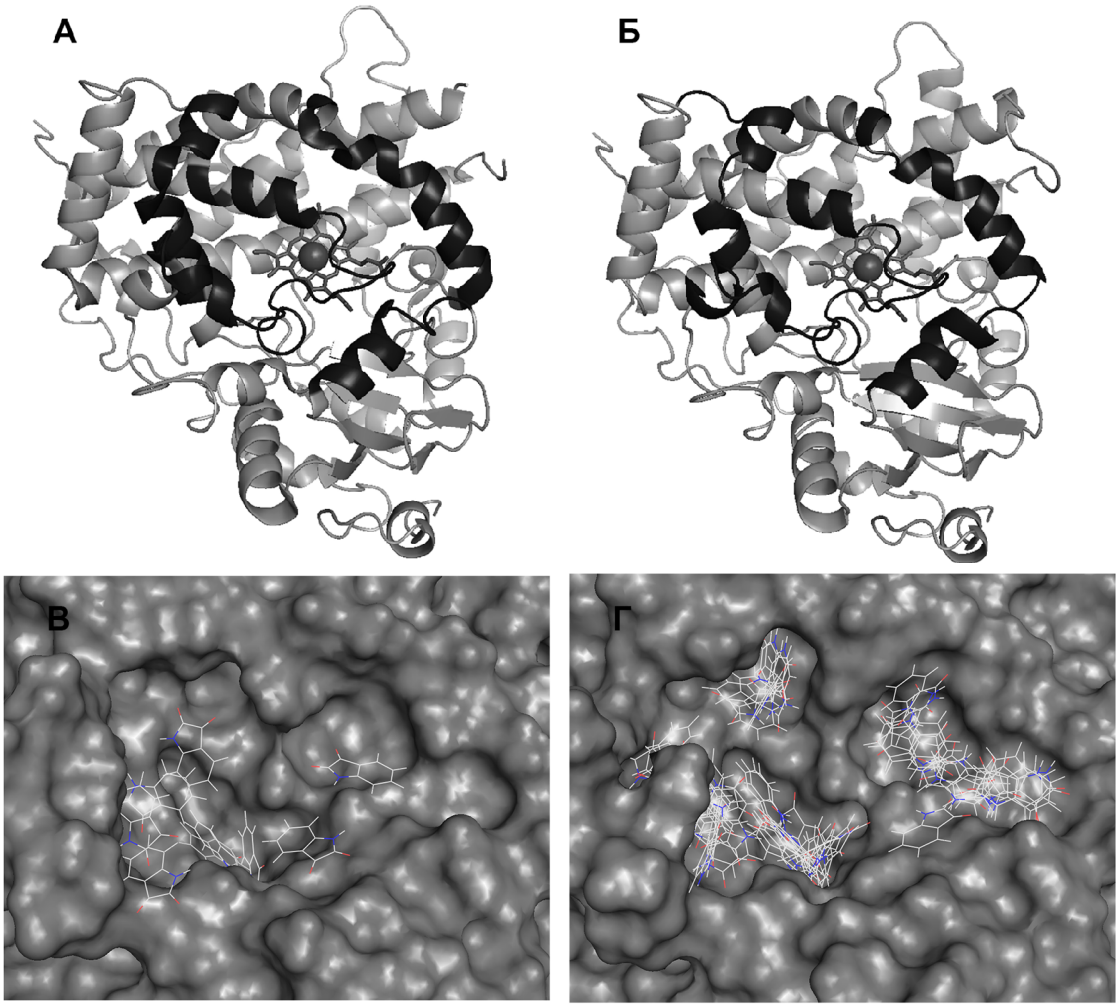

Рисунок 3. Структуры цитохрома CYP3A4 (А, В) и модели цитохрома CYP3A5 (Б, Г) и позиции докинга изатина (В, Г). А, Б: тёмно-серым цветом показана область связывания цитохромов Р450 и цитохрома b_5. В, Г: эта область показана в виде поверхности Ван-дер-Ваальса.

Процедуру докинга изатина проводили по всей поверхности белков. Анализ результатов показал, что на поверхности цитохромов можно выделить четыре основных кластера, где могут разместиться молекулы изатина (рис. 3): (1) район F-G спиралей, (2) район А спирали, (3) область β-тяжей и самый крупный кластер (4) на проксимальной стороне CYP3A4 и CYP3A5 в предполагаемой области контактного интерфейса при формировании комплексов с CYB5A и CPR. Необходимо отметить, что мутационные модификации структуры CYP в данной области приводят к резкому снижению энергии связывания CYP с редокс-партнерами [26].

Сопоставление структур CYP3A4 и CYP3A5 в области связывания CYB5A показало минимальные различия: гомологичные замены трёх аминокислотных остатков и одна аминокислотная делеция у CYP3A5. Из рисунка 3 видно, что распределение возможных положений изатина, полученных в результате докинга, различается. В случае CYP3A4 обнаружен единичный кластер в области аминокислотных остатков 355-360 и 423-427, а в случае CYP3A5 было обнаружено три кластера: (1) самый большой кластер идентичен кластеру для CYP3A4, (2) около остатков 125-136 и 342-346, и самый маленький (3) около остатков 346-350 и 443-447. Полученные результаты свидетельствуют, что изатин может влиять на взаимодействие двух данных CYP с CYB5A за счёт связывания в области их контакта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в экспериментах с использованием технологии ППР впервые было показано селективное влияние изатина на ББВ в цитохром Р450-зависимой монооксигеназной системе. Под влиянием изатина происходило увеличение K_d для комплексов CYB5A/CYP3A5 и CYB5A/CYP3A4 в 2-3 раза, что обусловлено преимущественным снижением константы скорости образования комплексов (k_{on}) (в случае CYB5A/CYP3A4) и возрастанием константы скорости распада комплексов (k_{off}) (в случае CYB5A/CYP3A5). На предварительно сформированные на оптическом чипе комплексы CYB5A/CYP3A4 изатин оказывал прямой дестабилизирующий эффект. В заключение необходимо отметить, что исходная гипотеза о возможном действии изатина по типу обратной связи на ББВ с участием индол-метаболизирующих цитохромов Р450 (CYP2C19 и CYP2E1) не получила экспериментального подтверждения.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

ЛИТЕРАТУРА

1. *Guengerich F., Wu Z., Bartleson C.* (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., **338**, 465-469.
2. *Shen A., O'Leary K., Kasper C.* (2002) J. Biol. Chem., **277**, 6536-6541.
3. *Nebert D., Russell D.* (2002) Lancet, **360**, 1155-1162.
4. *Akiyama I., Tomiyama K., Sakaguchi M., Takaishi M., Mori M., Hosokawa M., Nagamori S., Shimizu N., Huh N., Miyazaki M.* (2004) Int. J. Mol. Med., **14**, 663-668.
5. *Rettie A., Jones J.* (2005) Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., **45**, 477-494.
6. *Hanukoglu I.* (1992) J. Steroid. Biochem. Mol. Biol., **43**, 779-804.
7. *Guryev O., Gilep A., Usanov S., Estabrook R.* (2001) Biochemistry, **40**, 5018-5031.
8. *Kawamoto T., Mitsuuchi Y., Toda K., Yokoyama Y., Miyahara K., Miura S., Ohnishi T., Ichikawa Y., Nakao K., Imura H.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 1458-1462.
9. *Gnedenko O., Yablokov E., Usanov S., Mukha D., Sergeev G., Bulko T., Kuzikov A., Moskaleva N., Shumyantseva V., Ivanov A., Archakov A.* (2014) Chem. Phys. Lett., **593**, 40-44.
10. *Velick S., Strittmatter P.* (1956) J. Biol. Chem., **221**, 265-275.
11. *Perret A., Pompon D.* (1998) Biochemistry, **37**, 11412-11424.
12. *Guengerich F.* (1983) Biochemistry, **22**, 2811-2820.
13. *Noshiro M., Ullrich V., Omura T.* (1981) Eur. J. Biochem., **116**, 521-526.
14. *Dailey H., Strittmatter P.* (1980) J. Biol. Chem., **255**, 5184-5189.
15. *Estrada D., Laurence J., Scott E.* (2013) J. Biol. Chem., **288**, 17008-17018.
16. *Gillam E., Notley L., Cai H., DeVoss J., Guengerich F.* (2000) Biochemistry, **39**, 13817-13824.
17. *Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A.* (2010) Proteomics, **10**, 23-37.
18. *Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Медведев А.Е., Арчаков А.И.* (2012) Биохимия, **77**, 1584-1599.
19. *Medvedev A., Buneeva O., Kopylov A., Gnedenko O., Medvedeva M., Kozin S., Ivanov A., Zgoda V., Makarov A.* (2015) Int. J. Mol. Sci., **16**, 476-495.
20. *Сергеев Г.В., Гилеп А.А., Усанов С.А.* (2014) Биохимия, **79**, 520-531.
21 *Ershov P., Mezentsev Y., Gnedenko O., Mukha D., Yantsevich A., Britikov V., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Molnar A., Ivanov A., Lisitsa A., Gilep A., Usanov S., Archakov A.* (2012) Proteomics, **12**, 3295-3298.
22. *Arnold K., Bordoli L., Kopp J., Schwede T.* (2006) Bioinformatics, **22**, 195-201.
23. *Biasini M., Bienert S., Waterhouse A., Arnold K., Studer G., Schmidt T., Kiefer F., Gallo Cassarino T., Bertoni M., Bordoli L., Schwede T.* (2014) Nucleic Acids Res., **42** (Web Server issue), W252-258. DOI: 10.1093/nar/gku340.
24. *Гнеденко О.В., Иванов А.С., Яблоков Е.О., Усанов С.А., Муха Д.В., Сергеев Г.В., Кузиков А.В., Москалева Н.Е., Булко Т.В., Шумянцева В.В., Арчаков А.И.* (2014) Биомед. химия, **60**, 17-27. DOI:10.18097/pbmc20146001017.
25. *Yamazaki H., ShimadaT., Martin M.V., Guengerich F.P.* (2001) J. Biol. Chem., **276**, 30885-30891.
26. *Zhao C., Gao Q., Roberts A.G., Shaffer S.A., Doneanu C.E., Xue S., Goodlett D.R., Nelson S.D., Atkins W.M.* (2012) Biochemistry, **51**, 9488-9500.

Поступила: 08. 12. 2016.
Принята к печати: 20. 01. 2017.

THE EFFECT OF ISATIN ON PROTEIN-PROTEIN INTERACTIONS BETWEEN CYTOCHROME b_5 AND CYTOCHROMES P450

P.V. Ershov[1], E.O. Yablokov[1], Yu.V. Mezentsev[1], L.A. Kalushskiy[1], A.V. Florinskaya[1], A.V. Veselovsky[1], O.V. Gnedenko[1], A.A. Gilep[2], S.A. Usanov[2], A.E. Medvedev[1], A.S. Ivanov[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; e-mail: pavel79@inbox.ru
[2]Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus,
5/2 Kuprevicha str., Minsk, 220141 Belarus

Cytochromes P450 (CYP) are involved in numerous biochemical processes including metabolism of xenobiotics, biosynthesis of cholesterol, steroid hormones etc. Since some CYP catalyze indol oxidation to isatin, we have hypothesized that isatin can regulate protein-protein interactions (PPI) between components of the CYP system thus representing a (negative?) feedback mechanism. The aim of this study was to investigate a possible effect of isatin on interaction of human CYP with cytochrome b_5 (CYB5A). Using the optical biosensor test system employing surface plasmon resonance (SPR) we have investigated interaction of immobilized CYB5A with various CYP in the absence and in the presence of isatin. The SPR-based experiments have shown that a high concentration of isatin (270 μM) increases K_d values for complexes CYB5A/CYP3A5 and CYB5A/CYP3A4 (twofold and threefold, respectively), but has no influence on complex formation between CYB5A and other CYP (including indol-metabolizing CYP2C19 and CYP2E1). Isatin injection to the optical biosensor chip with the preformed molecular complex CYB5A/CYP3A4 caused a 30%-increase in its dissociation rate. Molecular docking manipulations have shown that isatin can influence interaction of CYP3A5 or CYP3A4 with CYB5A acting at the contact region of CYB5A/CYP.

Key words: cytochromes P450, cytochrome b_5, protein-protein interaction, isatin, inhibitor, surface plasmon resonance, interactomics