Биомедицинская химия, 2019 том 65, вып. 1, с. 63-66.

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

©Коллектив авторов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ПРОСТАЦИКЛИНСИНТАЗЫ С ЦИТОХРОМАМИ Р450

О.В. Гнеденко[1]*, Е.О. Яблоков[1], П.В. Ершов[1], А.В. Свирид[2], Т.В. Шкель[2], И.В. Гайдукевич[2], Н.В. Струшкевич[2], А.А. Гилеп[2], С.А. Усанов[2], А.С. Иванов[1]

[1]Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича, 119121, Москва, Погодинская ул. 10; *эл. почта: gnedenko.oksana@gmail.com
[2]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, 220141, Беларусь, Минск, ул. Акад. В.Ф. Купревича, 5, корп. 2

Выполнены биосенсорные эксперименты по исследованию взаимодействия простациклинсинтазы (PGIS) с различными белками цитохром Р450-зависимых монооксигеназных систем. Обнаружено взаимодействие PGIS с микросомальными (CYP21A2, CYP2E1) и митохондриальными (CYP27A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP11A1) цитохромами Р450. Определены кинетические и равновесные параметры формирования белковых комплексов. Полученные результаты позволяют предположить, что взаимодействие данных гемопротеинов может играть важную роль в регуляции биосинтеза как простациклина, так и его физиологического противовеса тромбоксана A_2.

Ключевые слова: простациклинсинтаза (PGIS, CYP8A1); цитохром Р450; поверхностный плазмонный резонанс (SPR); оптический биосенсор Biacore

DOI: 10.18097/PBMC20196501063

ВВЕДЕНИЕ

Простациклин (PGI_2) относится к классу простаноидов и продуцируется эндотелиальными клетками. За синтез простациклина и его физиологического антагониста тромбоксана A_2 (TXA_2) отвечают простациклинсинтаза (PGIS, CYP8A1; КФ 5.3.99.4) и тромбоксансинтаза (TXAS, CYP5A1; КФ 5.3.99.5), принадлежащие к суперсемейству цитохромов Р450 [1]. PGIS катализирует реакцию изомеризации простагландина H_2 (PGH_2) в простациклин, который является сильнодействующим аутокринным и паракринным вазодилататором и ингибирует агрегацию тромбоцитов [2, 3]. PGIS экспрессируется преимущественно в эндотелиальных и гладкомышечных клетках и ассоциирована с эндоплазматическим ретикулумом и ядерной мембраной [2, 4, 5]. Фермент локализован, главным образом, в аорте и тканях лёгкого. Дисбаланс в синтезе PGI_2 и TXA_2 приводит к сердечно-сосудистым заболеваниям, например артериальной гипертензии, ишемии мозга или инфаркту миокарда [2]. Препараты аналогов PGI_2 успешно применяются в терапии лёгочной артериальной гипертензии. Тот факт, что продукты биосинтеза простаноидов, в частности PGI_2 и TXA_2, 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 простаноидов является актуальной задачей. Ранее было идентифицировано 12 потенциальных белков-партнеров CYP5A1 [7], в том числе CYP2E1 (фермент метаболизма простагландина H_2 до 12-гидрокси-5,8,10-гептатриеновой кислоты – проантагониста TXA_2).

Целью данной работы было выявление потенциальных белковых партнеров PGIS среди ряда цитохромов Р450.

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 Р450 (CYP8A1, CYP5A1, CYP3A5, CYP3A4, CYP17A1, CYP2E1, CYP21A2, CYP2C9, CYP19A1, CYP2C19, CYP11B2, CYP11B1, CYP11A1, CYP27A1), микросомальный цитохром b_5 (CYB5A), NADPH-цитохром Р450-редуктаза (CPR), NADPH-адренодоксинредуктаза (AdR) и адренодоксин (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 аминогруппами PGIS. Карбоксильные группы чипа активировали путём инжекции смеси 0,2 M EDC/0,05 M NHS в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Инжекцию 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 инжекций 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 инжекцией буфера, содержавшего 1 M 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 Р450, так и их функциональные партнеры: CYP5A1, CYP3A5, CYP3A4, CYP17A1, CYP2E1, CYP21A2, CYP2C9, CYP19A1, CYP2C19, CYP11B2, CYP11B1, CYP11A1, CYP27A1, CYB5A, CPR, Adx, AdR. Было обнаружено, что два микросомальных цитохрома Р450 (CYP21A2, CYP2E1) и четыре митохондриальных цитохрома Р450 (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 Р450 с их функциональными партнёрами (CPR, CYB5A, Adx) [10-13]. Значения K_d белковых комплексов убывали в следующем порядке K_d(CYP11B2)> K_d(CYP11A1)> K_d(CYP21A2)>K_d(CYP27A1)>K_d(CYP11B1)>K_d(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 = 4,3×10^{-7} M и 6,9×10^{-7} M, соответственно) [7]. Комплексы CYP2E1 с PGIS более прочные, чем с TXAS, тогда как CYP11B2 с простациклинсинтазой взаимодействовал слабее.

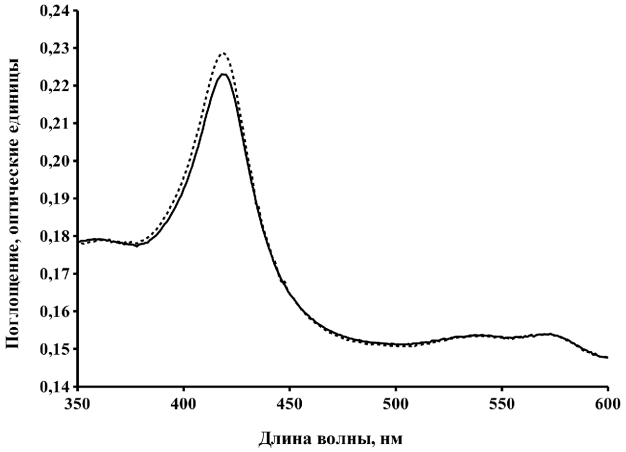

Рисунок 1. Спектры поглощения образца PGIS в 50 мМ фосфатном буфере, pH 7,4 (сплошная линия) и образца PGIS после инкубации в течение 10 мин в 10 мМ ацетатном буфере, pH 5,0, и нейтрализации pH до 7,4 фосфатным буфером (пунктир).

Таблица. Кинетические и равновесные параметры взаимодействия цитохромов Р450 с иммобилизованной PGIS

Аналит	k_{on}, $M^{-1}c^{-1}$	k_{off}, c^{-1}	K_d, M
CYP2E1	$(3,89\pm0,04)\cdot10^{4}$	$(2,44\pm0,06)\cdot10^{-3}$	$6,27\cdot10^{-8}$
CYP21A2	$(1,21\pm0,01)\cdot10^{4}$	$(3,08\pm0,05)\cdot10^{-3}$	$2,55\cdot10^{-7}$
CYP11B1	$(4,4\pm0,1)\cdot10^{4}$	$(6,45\pm0,03)\cdot10^{-3}$	$1,47\cdot10^{-7}$
CYP11B2	$(1,14\pm0,06)\cdot10^{3}$	$(5,69\pm0,03)\cdot10^{-3}$	$5,0\cdot10^{-6}$
CYP27A1	$(2,83\pm0,06)\cdot10^{4}$	$(5,80\pm0,09)\cdot10^{-3}$	$2,05\cdot10^{-7}$
CYP11A1	$(8,66\pm0,1)\cdot10^{3}$	$(4,93\pm0,07)\cdot10^{-3}$	$5,69\cdot10^{-7}$

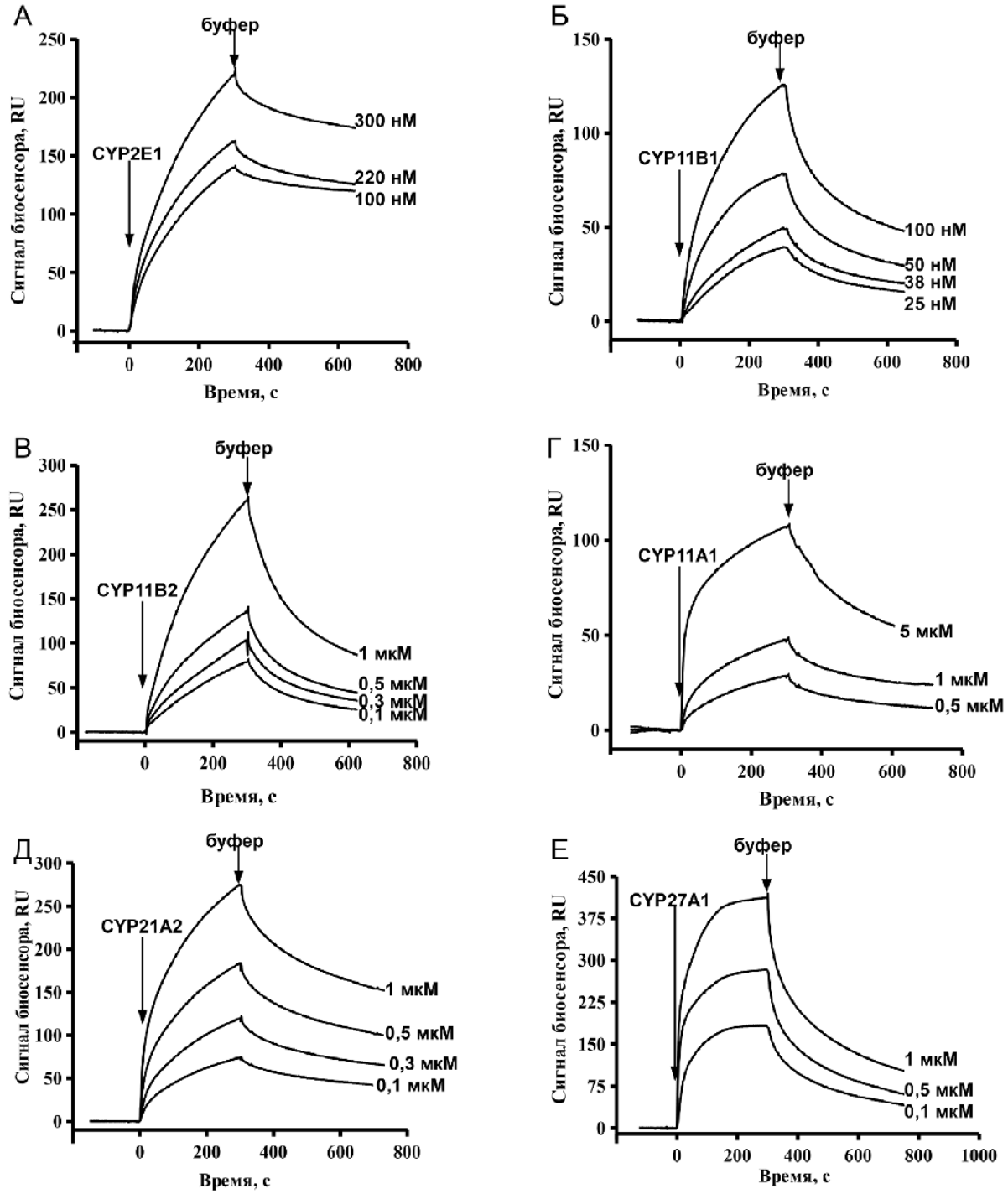

Рисунок 2. Сенсограммы взаимодействия цитохромов Р450 с иммобилизованной простациклинсинтазой. Стрелками указаны инжекции растворов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Продукты биосинтеза простаноидов, подкласса эйкозаноидов, в частности простациклин (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 простациклинсинтазы с различными белками цитохром Р450-зависимых монооксигеназных систем. Два микросомальных цитохрома Р450 (CYP21A2, CYP2E1) и четыре митохондриальных цитохрома Р450 (CYP27A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP11A1) взаимодействовали с PGIS. CYP2E1 и CYP11B2 образуют комплексы как с простациклинсинтазой, так и с тромбоксансинтазой. Полученные результаты позволяют предположить, что взаимодействие данных гемопротеинов важно для регуляции биосинтеза простациклина 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. *Свирид А.В., Ершов 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., Свирид 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. Yablokov[1], P.V. Ershov[1], A.V. Svirid[2], T.V. Shkel[2], I.V. Haidukevich[2], N.V. Strushkevich[2], A.A. Gilep[2], S.A. Usanov[2], A.S. Ivanov[1]

[1]Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com
[2]Institute 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 perfomed. 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 A_2 biosynthesis.

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