

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

БИОСЕНСОРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ, МОДУЛИРУЮЩИХ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СИСТЕМЕ МИКРОСОМАЛЬНЫХ ЦИТОХРОМОВ P450 И
NADPH-ЗАВИСИМОЙ P450 ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

П.В. Ершов¹, Е.О. Яблоков^{1*}, Ю.В. Мезенцев¹, Л.А. Калужский¹, А.Я. Луцкич², А.М. Тумилович²,
Е.Ю. Карпуть², А.А. Гилен², А.С. Иванов¹

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская, 10; *e-mail: evgeyablokov1988@mail.ru

²Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси,
Республика Беларусь, 220141, Минск, ул. Купревича, 5/2

Исследование влияния низкомолекулярных соединений (субстраты, эндогенные метаболиты, лекарственные соединения и ксенобиотики) на кинетические и равновесные параметры функционально значимого бинарного белок-белкового взаимодействия (ББВ) представляет собой как фундаментальную, так и клиническую значимость. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) является методом первого выбора для решения подобных задач. Ранее SPR анализ позволил выявить модулирующее действие стероидных субстратов на аффинность ББВ стероидогенных микросомальных цитохромов P450 (CYP) с редокс-партнёрами. В данной работе мы показали пригодность подхода для оценки анализа селективного влияния кофермента NADPH на взаимодействие цитохромов CYP3A4 и CYP2E1 с NADPH-зависимой P450 оксидоредуктазой (CPR). NADPH не влиял на комплекс CYP3A4/CPR, тогда как скорость диссоциации комплекса CYP2E1/CPR в присутствии NADPH значительно уменьшалась: значение k_{off} без NADPH составляло $(3.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, а в присутствии NADPH - $(3.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-4} \text{ c}^{-1}$. Таким образом, NADPH повышал аффинность комплексообразования CYP2E1/CPR примерно на один порядок, не влияя на значение k_{on} комплекса. При ко-инъекции NADPH по предварительно сформированному (в отсутствие NADPH) бинарному комплексу CYP2E1/CPR отмечено незначительное изменение k_{off} (изменение сигнала биосенсора < 10%). Это, возможно, указывает на стабилизирующую роль NADPH в процессе комплексообразования белковых партнеров. Таким образом, использование нашего подхода позволило оценить влияние основного поставщика электронов для микросомальной монооксигеназной системы цитохрома P450 на взаимодействие CYP/CPR.

Ключевые слова: модуляторы аффинности; модуляторы кинетики; низкомолекулярные соединения; NADPH; цитохром P450; NADPH-зависимая цитохром P450 оксидоредуктаза

DOI: 10.18097/BMCRM00134

ВВЕДЕНИЕ

Соединения с молекулярной массой менее 900 Да (непептидной природы (далее - низкомолекулярные соединения, НС) способны оказывать разносторонние эффекты на белковые макромолекулы, образуя с ними стабильные или короткоживущие комплексы. Вследствие такого комплексообразования могут индуцироваться локальные или глобальные конформационные изменения белковой молекулы, что так или иначе отражается на ее способности к комплексообразованию с партнерами по белок-белковому взаимодействию (ББВ). Целенаправленный поиск НС, направленных на зону контакта (интерфейс) двух белков клинически значимого ББВ либо усиливающих, либо дестабилизирующих взаимодействие, представляет собой актуальную ветвь в разработке инновационных лекарственных средств [1–3]. Метаболизм организма человека включает большое количество соединений, среди которых есть те, которые способны модулировать аффинность разных белковых комплексов. Это также имеет место и в монооксигеназной системе цитохромов P450 и их редокс-партнеров: дифлавиновой NADPH-зависимой цитохром P450-оксидоредуктазы (CPR) и цитохрома b5 (CYPB5A).

ББВ в системе цитохромов P450 можно охарактеризовать различными методами. Один из способов оценки влияния НС

на ББВ заключается в изменении кинетических параметров этого ББВ в присутствии соответствующих НС. При этом равновесная константа диссоциации (K_d) ББВ представляет собой “статическую” компоненту и не всегда отражает реальный эффект от НС. Кинетические константы (константы скорости ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off})) комплекса являются динамической компонентой и по их изменению можно судить о влиянии НС на ББВ. Поэтому, именно определение последних приобретает исключительную ценность при изучении этого процесса. Так, в недавней нашей работе [4] с использованием технологии поверхностного плазмонного резонанса (Surface Plasmon Resonance, SPR) нами было показано, что стероидные субстраты примерно на порядок повышали аффинность комплексообразования цитохрома P450 17A1 (CYP17A1) с CYPB5A, что было обусловлено пропорциональным увеличением значения k_{on} (без изменения k_{off}). С другой стороны, эндогенный биорегулятор изатин, реализующий свой биологический эффект посредством изатин-связывающих белков [5], влиял на кинетику взаимодействий CYPB5A с цитохромами P450 3A4 и 3A5 [6] и гетеродимеризацию CYP2E1/CYP5A1 [7]. Таким образом, серия работ убедительно продемонстрировала универсальное использование SPR технологии для выявления НС, которые способны модулировать кинетические и равновесные параметры



белкового комплексообразования.

На примере нескольких стероидогенных микросомальных цитохромов P450 с узкой субстратной специфичностью было показано, что субстраты и продукты ферментативных реакций не модулировали их комплексообразование с CPR [4]. Поэтому, с фундаментальной точки зрения, интересным представляется вопрос о существовании модуляции взаимодействия CYP/CPR такими НС, которые бы не были вовлечены в реакции, катализируемые цитохромами P450. В частности, SPR эксперименты позволили установить, что кофермент NADP⁺ повышал в пять раз аффинность взаимодействия CPR с «нецитохромным» белком – гем-оксигеназой (НО-1) вследствие повышения скорости ассоциации белкового комплекса [8]. Как и НО-1, цитохромы P450 нуждаются в притоке электронов для осуществления ферментативных реакций [9], которые, как правило, представляют собой введение в молекулу субстрата атома кислорода [10]. CPR, получив электроны от NADPH, передает их на микросомальные CYP, и, следовательно, комплексообразование CPR/CYP может зависеть от редокс-статуса кофактора CPR [11]. Мы предположили, что параметры комплексообразования CYP/CPR способны изменяться в присутствии NADPH в системе, так как наличие донора электронов является критически важным для протекания катализируемых CYP монооксигеназных реакций.

Целью данной работы была проверка данной гипотезы на примере взаимодействия двух микросомальных цитохромов CYP3A4 и CYP2E1 с CPR. SPR анализ показал наличие селективного модулирующего действия NADPH на CYP2E1/CPR. NADPH повышал стабильность комплекса CYP2E1/CPR примерно на один порядок, тогда как в случае CYP3A4/CPR не было обнаружено значимого эффекта NADPH на стабильность этого комплекса. Влияние NADPH было специфичным для взаимодействия CYP2E1/CPR, так как взаимодействие CYP2E1/CYB5A (негативный контроль) не модулировалось этим кофактором.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рекомбинантные белковые препараты

В работе были использованы высоко очищенные (>95%, по данным электрофореза в полиакриламидном геле) препараты рекомбинантных белков: микросомальные цитохромы P450 (CYP3A4, CYP2E1), микросомальный цитохром *b*₅ (CYB5A) и цитохром P450 редуктаза (CPR), полученные гетерологичной экспрессией в *E. coli* в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси [4,6]. Препарат NADPH был получен от фирмы «Sigma Aldrich» (США).

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

В работе использовали четырёхканальные оптические биосенсоры Biacore T-200 и Biacore 3000 («GE Healthcare», США), адаптированные для работы в автоматизированном режиме с использованием 96-луночных полистироловых планшетов. В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP+ (10 мМ HEPES (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0.005% Tween-20 (v/v)). Ковалентную иммобилизацию

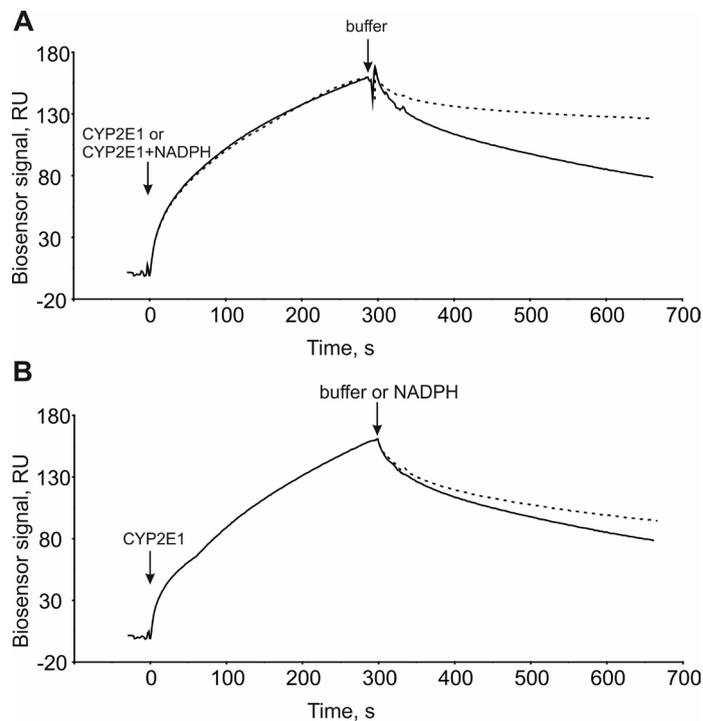


Рисунок 1. SPR оценка влияния NADPH на кинетические параметры ББВ на примере CYP2E1/CPR. (А) - инъекция 250 нМ CYP2E1 по иммобилизованному на чипе CPR в отсутствие (сплошная линия) или присутствии 100 мкМ NADPH (пунктирная линия). (В) - инъекция рабочего буфера (сплошная линия) или 100 мкМ NADPH (пунктирная линия) после формирования комплекса CYP2E1/CPR в отсутствие NADPH. Инъекцию всех образцов выполняли в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин.

белковых препаратов CYB5A и CPR в рабочие каналы биосенсора (№2 и №3) выполняли на оптическом чипе CM5 («GE Healthcare») за поверхностные аминогруппы белка по стандартному протоколу от производителя, используя в качестве иммобилизационного буфера 10 мМ ацетат натрия (pH 5.5). Целевой уровень иммобилизации составлял 5000 RU (5 нг/мм²). Первый канал использовали в качестве контрольного канала (без иммобилизации белка) для коррекции эффектов неспецифического связывания аналитов с поверхностью чипа. В ходе иммобилизации были последовательно выполнены следующие процедуры: (а) инъекция смеси равных объемов 0.2 М EDC и 0.05 М NHS в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин; (б) инъекция 25 мкг/мл раствора белка в иммобилизационном буфере в течение 10 мин при скорости потока 5 мкл/мин; (в) промывка каналов биосенсора рабочим буфером HBS-EP+ в течение 1 ч при скорости потока 25 мкл/мин.

Анализируемые образцы, содержащие NADPH в концентрациях от 1 мкМ до 200 мкМ, были приготовлены в HBS-EP+ буфере [8] непосредственно перед измерениями. Инъекцию проб, содержащих разные концентрации CYP или CYP+NADPH, выполняли в течение 5 мин при скорости потока 25 мкл/мин. Для регенерации поверхности оптического чипа однократно инжестировали регенерационный раствор (2М NaCl и 0.4% CHAPS) в течение 30 с при скорости 25 мкл/мин. Результирующий сигнал биосенсора представлял собой разницу между рабочим и контрольным каналами биосенсора. Запись сигнала биосенсора в резонансных единицах (RU) в режиме реального времени осуществлялась в виде сенсограмм, к которым затем подбирали кривые

Таблица 1. Константа скорости ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}) и равновесная константа диссоциации (K_d) комплексообразования цитохромов P450 с редокс-партнерами в отсутствии/присутствии кофактора NADPH

| Белковый комплекс | NADPH | k_{on} , $M^{-1}c^{-1}$ | k_{off} , c^{-1} | K_d , μM |
|-------------------|-------|---|---|---------------------------------|
| CYP3A4/CYB5A | - | $(6.6 \pm 0.2) \cdot 10^3$ * | $(2.0 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$ | 0.30 ± 0.03 |
| CYP3A4/CYB5A | + | $(6.8 \pm 0.3) \cdot 10^3 \leftrightarrow$ ** | $(1.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \leftrightarrow$ | $0.27 \pm 0.03 \leftrightarrow$ |
| CYP2E1/CYB5A | - | $(6.3 \pm 0.3) \cdot 10^3$ | $(2.7 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ | 0.44 ± 0.04 |
| CYP2E1/CYB5A | + | $(6.6 \pm 0.2) \cdot 10^3 \leftrightarrow$ | $(2.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \leftrightarrow$ | $0.39 \pm 0.02 \leftrightarrow$ |
| CYP3A4/CPR | - | $(0.8 \pm 0.1) \cdot 10^3$ | $(1.1 \pm 0.1) \cdot 10^{-3}$ | 1.37 ± 0.12 |
| CYP3A4/CPR | + | $(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^3 \uparrow$ | $(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-3} \leftrightarrow$ | $0.80 \pm 0.05 \downarrow$ |
| CYP2E1/CPR | - | $(7.4 \pm 0.5) \cdot 10^3$ | $(3.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-3}$ | 0.50 ± 0.06 |
| CYP2E1/CPR | + | $(8.6 \pm 0.4) \cdot 10^3 \leftrightarrow$ | $(3.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-4} \downarrow$ | $0.04 \pm 0.00 \downarrow$ |

Примечание. *В таблице приведены средние значения констант \pm стандартное отклонение ($n = 3$). **Стрелками показано направление изменения параметров белкового взаимодействия в присутствии NADPH по сравнению с контролем; (\leftrightarrow) - отсутствие значимых изменений параметра.

поверхностного связывания Лэнгмюра 1:1 в программе BIAevaluation software v. 4.1.1. Значения равновесных констант диссоциации (K_d) рассчитывали по отношению констант скорости диссоциации (k_{off}) и ассоциации (k_{on}), т.е. $K_d = k_{off}/k_{on}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние NADPH на взаимодействие (комплексообразование) CYP2E1 (CYP3A4) с их редокс-партнерами

Влияние кофактора NADPH на ББВ было различным в зависимости от конкретных пар цитохромов P450 и редокс-партнеров (табл. 1). SPR анализ показал, что комплекс CYP2E1/CPR стабилизировался вследствие снижения значения k_{off} почти в 10 раз при отсутствии изменений скорости ассоциации комплекса. Типичные сенсограммы взаимодействия показаны на рисунке 1А.

Иначе выглядело влияние NADPH на комплексообразование CPR/CYP3A4. Было выявлено незначительное усиление скорости образования комплекса (менее чем в 2 раза) без значимого эффекта на стабильность комплекса. Важно упомянуть, что NADPH не модулировал комплексообразование CYP2E1 (или CYP3A4) с цитохромом b_5 .

Контрольные SPR эксперименты показали невысокий уровень сигналов связывания NADPH (100 μM) с иммобилизованной на чипе CPR (12–16 RU), что лишь в 2.5–3 раза превышало дрейф базовой линии биосенсора (~ 1 RU/мин). Также установлено, что концентрация NADPH, при которой наблюдались равновесные эффекты на комплексообразование, составляла не менее 100 μM , что согласуется с данными Higashimoto и соавт. по исследованию влияния $NADP^+$ на взаимодействие CPR/НО-1 [8]. Мы предполагаем, что стабилизация комплекса CYP2E1/CPR была обусловлена тем, что связывание кофактора с CPR может инициировать конформационные изменения структуры белка, соответствующие более благоприятной геометрической ориентации взаимодействующих участков с цитохромом P450, что, в частности, обсуждается в работах [12,13]. Сопоставимая амплитуда увеличения аффинности наблюдалась в присутствии субстратов при комплексообразовании цитохрома b_5 со стероидогенными микросомальными цитохромами P450 [4].

Таким образом, на примере субстратов и кофактора было показано наличие паттерна их селективного модулирующего действия на кинетические параметры бинарных ББВ с участием компонентов P450-зависимой монооксигеназной системы.

Методические аспекты SPR анализа с целью селекции различных НС, влияющих на кинетику (аффинность) бинарного ББВ

Выбор условий иммобилизации целевых белков на чипе. На основе описанных результатов в данной статье, а также серии более ранних наших работ [4,6,14,15] по изучению модулирующего действия НС на ББВ, важно рассмотреть некоторые методические особенности ключевых стадий дизайна SPR экспериментов.

В SPR анализе выбор значения pH иммобилизационного буфера для каждого белка осуществляется индивидуально, согласно процедуре «pH скаутинга», а критерием выбора подходящего буфера являются максимальные уровни сигналов электростатической прекоцентрации целевого белка на поверхности карбоксиметил-декстранового

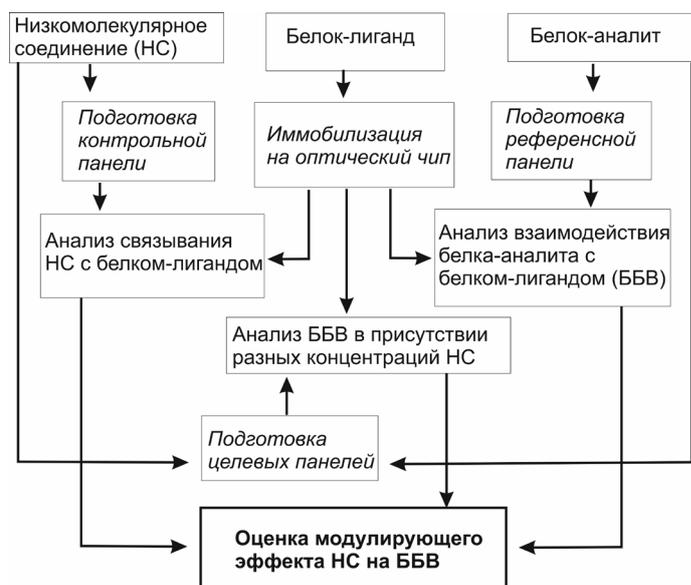


Рисунок 2. Схема SPR-анализа для оценки модулирующего действия низкомолекулярных соединений на кинетику и параметры белок-белкового взаимодействия.

Таблица 2. Типовой эксперимент по выявлению модулирующего эффекта НС на кинетику (аффинность) бинарного ББВ

| Панель | Белок-аналит* (мкМ) / НС (мкМ) | | | | | |
|-------------|--------------------------------|----------|---------|---------|-------|--------|
| | 0.01/0 | 0.05/0 | 0.1/0 | 0.5/0 | 1/0 | 10/0 |
| Референсная | 0.01/0 | 0.05/0 | 0.1/0 | 0.5/0 | 1/0 | 10/0 |
| Контрольная | 0/10 | 0/25 | 0/50 | 0/75 | 0/100 | 0/200 |
| Целевая №1 | 0.01/10 | 0.05/10 | 0.1/10 | 0.5/10 | 1/0 | 10/10 |
| Целевая №2 | 0.01/25 | 0.05/25 | 0.1/25 | 0.5/25 | 1/25 | 10/25 |
| Целевая №3 | 0.01/50 | 0.05/50 | 0.1/50 | 0.5/50 | 1/50 | 10/50 |
| Целевая №4 | 0.01/75 | 0.05/75 | 0.1/75 | 0.5/75 | 1/75 | 10/75 |
| Целевая №5 | 0.01/100 | 0.05/100 | 0.1/100 | 0.5/100 | 1/100 | 10/100 |
| Целевая №6 | 0.01/200 | 0.05/200 | 0.1/200 | 0.5/200 | 1/200 | 10/200 |

Примечание. *белок-аналит вводится в измерительную ячейку в растворе, тогда как партнер по БА (белок-лиганд) ковалентно иммобилизован на оптическом чипе.

чипа, также как и общая устойчивость структуры белка к рН. Последнее можно проверить уже после ковалентной иммобилизации белка на чипе путем исследования связывающей способности с его референсным партнером по ББВ или низкомолекулярным лигандом с известными параметрами взаимодействия. Для выполнения «рН скаутинга» следует приготовить несколько растворов белка (25 мкг/мл) в 10 мМ буферных растворах с рН 4.0–8.5, с шагом 0.5. Далее инжектируют каждый раствор в течение 2 мин при скорости 10 мкл/мин. После каждой инъекции поверхность чипа промывают 25 мМ NaOH в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин.

Ковалентная иммобилизация одного из белковых партнеров по ББВ. Многими SPR экспериментами продемонстрировано, что для исследования связывания разных концентраций белка-аналита с его партнером на чипе существенную роль играет уровень иммобилизации последнего. Мы установили, что для достижения равновесных (выход на «плато») сигналов связывания необходимо иммобилизовать от 4000 RU до 6000 RU целевого белка при условии инъекции его партнера по взаимодействию со скоростью потока не менее 25 мкл/мин. Иммобилизация от 6000 RU до 15000 RU белка особенно важна в экспериментах по скринингу коллекций низкомолекулярных соединений, где требуется максимальный уровень чувствительности детекции комплексообразования.

Дизайн SPR эксперимента для оценки действия НС на ББВ. В общем виде схема исследования действия низкомолекулярных соединений на бинарное белок-белковое взаимодействие с помощью оптического биосенсора поверхностного плазмонного резонанса показана на рисунке 2.

Подготовка образцов низкомолекулярных соединений для скрининга связывающей способности с иммобилизованными белками описана в работе [14]. Навески тестируемых НС, которые не растворимы в рабочем буфере, растворяют либо в 96%-ном этиловом спирте, либо в одном из органических растворителей, например, диметилсульфооксиде. Как показала практика, для детектирования белкового комплексообразования в отсутствие низкомолекулярного соединения следует инжектировать один из белковых партнеров (аналит) в широком концентрационном диапазоне (референсная панель, например, 10 нМ, 50 нМ, 100 нМ, 500 нМ, 1000 нМ и 10000 нМ или использовать лог-разведение), в течение

5 мин при скорости 25 мкл/мин и записью процесса диссоциации молекулярного комплекса не менее 5 мин. При этом рабочий буфер (также как и анализируемый образец) следует выравнять по содержанию органического растворителя. Этот шаг требуется для исключения крайне нежелательного резкого перепада сигналов биосенсора (bulk-effect) при последовательной инъекции двух растворов с сильно отличающимися коэффициентами преломления. Одна из таких методик с использованием лабораторного рефрактометра представлена в работе [14]. Для биосенсорного анализа содержание растворителя в буфере не должно превышать 3% по объему, поскольку при более высоких концентрациях растворителя появляются приборные артефакты измерений, а также снижается конформационная стабильность белковой молекулы. После каждого биосенсорного цикла следует регенерировать поверхность чипа такой композицией буферного раствора (ионная сила, детергенты, значение рН), которая обеспечивала бы сохранение нативности иммобилизованного белка в течение всего времени проведения биосенсорного эксперимента и в то же время максимально полно удаляла связавшийся материал аналита.

Выбор концентраций НС для исследования его влияния на ББВ может также варьироваться в широких пределах, но часто зависит от способности анализируемого образца НС к агрегации, которая, в свою очередь, обусловлена растворимостью НС. Например, в работе [15], влияние изатина на белковое комплексообразование с участием феррохелатазы тестировали в диапазоне 25–270 мкМ без появления характерных признаков артефактов базовой линии биосенсора при инъекции образцов аналита. Для оценки уровней непосредственного связывания НС с иммобилизованными на чипе белками анализируемые образцы, содержащие от 4 до 6 разных концентраций НС в рабочем буфере (контрольная панель, например, 10 мкМ, 25 мкМ, 50 мкМ, 75 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ), инжектируют в течение 5 мин при скорости 25 мкл/мин. Далее в таких же условиях инжектируют несколько целевых панелей образцов, содержащих идентичные референсной панели концентрации белка-аналита и каждая целевая панель содержит лишь одну концентрацию НС. Соответственно, остальные целевые панели образцов будут отличаться только по концентрации НС. Результирующие сигналы биосенсора при анализе целевой панели будут представлять собой разницу после вычитания сигналов контрольной

панели. Далее следует выполнить сравнительный анализ параметров связывания референсной панели (без добавления НС) со скорректированной целевой панелью. В таблице 2 продемонстрирован дизайн типичного SPR эксперимента с использованием референсной, контрольной и целевых панелей анализируемых образцов.

Для НС, оказывающих значительное влияние (>2 раз) на константы скорости диссоциации ББВ, дополнительно можно исследовать их влияние на стабильность предварительно сформированного на чипе белкового комплекса в отсутствие НС, используя режим ко-инъекции (co-inject) оптического биосенсора Biacore 3000. В качестве примера подобного эксперимента в работе [6] было показано дестабилизирующее действие изатина на комплексообразование СУВ5А/СУР3А4. Интересно отметить, что SPR анализ показал лишь незначительное влияние на k_{off} (изменение сигнала биосенсора $<10\%$) (рис. 1В) при ко-инъекции 100 мкМ NADPH по предварительно сформированному бинарному комплексу СУР2Е1/СРР в отсутствие NADPH на оптическом чипе, что, возможно, указывает на стабилизирующую роль NADPH в процессе непосредственного взаимодействия СУР2Е1 с СРР.

В данной работе мы представили протокол для оценки влияния низкомолекулярных соединений на белок-белковые взаимодействия в монооксигеназных системах с помощью оптического SPR биосенсора. Установлено, что NADPH повышает стабильность комплексов СУР2Е1/СРР. Таким образом, для одного из микросомальных цитохромов Р450 (СУР2Е1) была установлена роль NADPH как модулятора взаимодействия с основным редокс-партнёром (СРР). Это может быть одним из механизмов регуляции работы микросомальных монооксигеназных Р450 зависимых систем.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) (грант № 18-04-00071).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Andrei, S. A., Sijbesma, E., Hann, M., Davis, J., O'Mahony, G., Perry, M. W. D., Karawajczyk, A., Eickhoff, J., Brunsveld, L., Doveston, R. G., Milroy, L.-G., Ottmann, C. (2017). Stabilization of protein-protein interactions in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, **12**(9), 925–940. DOI:10.1080/17460441.2017.1346608

2. Fischer, G., Rossmann, M., Hyvönen, M. (2015). Alternative modulation of protein-protein interactions by small molecules. *Current Opinion in Biotechnology*, **35**, 78–85. DOI:10.1016/j.copbio.2015.04.006
3. Cossar, P. J., Ma, C., Gordon, C. P., Ambrus, J. I., Lewis, P. J., McCluskey, A. (2017). Identification and validation of small molecule modulators of the NusB-NusE interaction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **27**(2), 162–167. DOI:10.1016/j.bmcl.2016.11.091
4. Ershov, P. V., Yablokov, E. O., Florinskaya, A. V., Mezentsev, Y. V., Kaluzhskiy, L. A., Tumilovich, A. M., Gilep, A. A., Usanov, S. A., Ivanov, A. S. (2019). SPR-Based study of affinity of cytochrome P450s / redox partners interactions modulated by steroidal substrates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, **187**, 124–129. DOI:10.1016/j.jsbmb.2018.11.009
5. Ershov, P. V., Mezentsev, Y. V., Yablokov, E. O., Kaluzhskiy, L. A., Florinskaya, A. V., Buneeva, O. A., Medvedev, A. E., Ivanov, A. S. (2018). Effect of Bioregulator Isatin on Protein-Protein Interactions Involving Isatin-Binding Proteins. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **44**(2), 193–198. DOI:10.1134/S1068162018010053
6. Ershov, P. V., Yablokov, E. O., Mezentsev, Yu. V., Kaluzhskiy, L. A., Florinskaya, A. V., Veselovsky, A. V., Gnedenko, O. V., Gilep, A. A., Usanov, S. A., Medvedev, A. E., Ivanov, A. S. (2017). The effect of isatin on protein-protein interactions between cytochrome b5 and cytochromes P450. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **63**(2), 170–175. DOI:10.18097/PBMC20176302170
7. Svirid, A. V., Ershov, P. V., Yablokov, E. O., Kaluzhskiy, L. A., Mezentsev, Y. V., Florinskaya, A. V., Sushko, T. A., Strushkevich, N. V., Gilep, A. A., Usanov, S. A., Medvedev, A. E., Ivanov, A. S. (2017). Direct Molecular Fishing of New Protein Partners for Human Thromboxane Synthase. *Acta Naturae*, **9**(4), 92–100. DOI: 10.32607/20758251-2017-9-4-92-100
8. Higashimoto, Y., Sakamoto, H., Hayashi, S., Sugishima, M., Fukuyama, K., Palmer, G., Noguchi, M. (2005). Involvement of NADPH in the interaction between heme oxygenase-1 and cytochrome P450 reductase. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(1), 729–737. DOI:10.1074/jbc.M406203200
9. Esteves, F., Campelo, D., Gomes, B. C., Urban, P., Bozonnet, S., Lautier, T., Rueff, J., Truan, G., Kranendonk, M. (2020). The Role of the FMN-Domain of Human Cytochrome P450 Oxidoreductase in Its Promiscuous Interactions with Structurally Diverse Redox Partners. *Frontiers in Pharmacology*, **11**, 299. DOI:10.3389/fphar.2020.00299
10. Bistolos, N., Wollenberger, U., Jung, C., Scheller, F. W. (2005). Cytochrome P450 biosensors-a review. *Biosensors & Bioelectronics*, **20**(12), 2408–2423. DOI:10.1016/j.bios.2004.11.023
11. Iijima, M., Ohnuki, J., Sato, T., Sugishima, M., Takano, M. (2019). Coupling of Redox and Structural States in Cytochrome P450 Reductase Studied by Molecular Dynamics Simulation. *Scientific Reports*, **9**(1), 9341. DOI:10.1038/s41598-019-45690-2
12. Gutierrez, A., Munro, A. W., Grunau, A., Wolf, C. R., Scrutton, N. S., Roberts, G. C. K. (2003). Interflavin electron transfer in human cytochrome P450 reductase is enhanced by coenzyme binding. Relaxation kinetic studies with coenzyme analogues. *European Journal of Biochemistry*, **270**(12), 2612–2621. DOI:10.1046/j.1432-1033.2003.03633.x
13. Xia, C., Hamdane, D., Shen, A. L., Choi, V., Kasper, C. B., Pearl, N. M., Zhang, H., Im, S.-C., Waskell, L., Kim, J.-J. P. (2011). Conformational changes of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase are essential for catalysis and cofactor binding. *Journal of Biological Chemistry*, **286**(18), 16246–16260. DOI:10.1074/jbc.M111.230532
14. Kaluzhskiy, L. A., Ershov, P. V., Shkel, T. V., Gnedenko, O. V., Ivanchina, N. V., Strushkevich, N. V., Kicha, A. A., Grabovec, I. P., Gilep, A. A., Usanov, S. A., Stonik, V. A., Ivanov, A. S. (2018). Application of the SPR Biosensor in Drug Prototypes Discovery with Human Cytochrome P450(51) as an Example. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*, **1**(4), e00055. DOI:10.18097/BMCRM00055
15. Ershov, P., Mezentsev, Y., Gilep, A., Usanov, S., Buneeva, O., Medvedev, A., Ivanov, A. (2017). Isatin-induced increase in the affinity of human ferrochelatase and adrenodoxin reductase interaction. *Protein Science*, **26**(12), 2458–2462. DOI:10.1002/pro.3300

Поступила: 20.08.2020
 После доработки: 14.09.2020
 Принята к публикации: 14.09.2020

BIOSENSOR SELECTION OF SMALL COMPOUNDS, MODULATING A COMPLEX FORMATION BETWEEN CYTOCHROME P450S AND NADPH-DEPENDENT P450 OXIDOREDUCTASE

P.V. Ershov¹, E.O. Yablokov^{1}, Y.V. Mezentsev¹, L.A. Kaluzhskiy¹, A.Ya. Luschik², A.M. Tumilovich², A.Yu. Karputs², A.A. Gilep², A.S. Ivanov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya Street, Moscow, 119121 Russia;

*e-mail: evgeyablokov1988@mail.ru

²Institute of Bioorganic Chemistry of National Academy of Science of Belarus,

5/2 Kuprevicha str., Minsk, 220141 Republic of Belarus

The study of the effect of low-molecular-weight compounds (substrates, endogenous metabolites, drugs and xenobiotics) on the kinetic and equilibrium parameters of functionally significant binary protein-protein interactions (PPIs) is of both fundamental and clinical importance. The surface plasmon resonance (SPR) is the method of the first choice for studying PPIs. Earlier, SPR analysis revealed the modulating effect of steroidal substrates on the affinity of interactions between steroidogenic microsomal cytochromes P450 (CYP) and their redox partner (cytochrome b_5). In this work, we have shown the suitability of the experimental approach for assessing the selective effect of the cofactor NADPH on the interaction between cytochromes CYP3A4 or CYP2E1 with NADPH-dependent P450 oxidoreductase (CPR). Experiments have shown that the CYP3A4/CPR complex is not modulated by NADPH, while the dissociation rate of the CYP2E1/CPR complex in the presence of NADPH significantly decreased: the k_{off} values in the absence and presence of NADPH were $(3.6 \pm 0.2) \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ and $(3.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, respectively. Thus, in the presence of NADPH, an increase in the affinity of CYP2E1/CPR complex formation by approximately one order of magnitude was observed, while NADPH did not affect the k_{on} value of this complex. Co-injection of NADPH at the CYP2E1/CPR complex performed in the absence of NADPH had minor influence on the k_{off} values (<10%). This suggests a stabilizing role of NADPH for the CYP2E1/CPR complex formation. Thus, the use of our approach made it possible to assess the effect of the main electron supplier for the microsomal cytochrome P450 monooxygenase system on the kinetic rate constants of CYP/CPR complexes.

Key words: affinity modulators; kinetics modulators; low molecular weight compounds; NADPH; cytochrome P450; NADPH-dependent cytochrome P450 oxidoreductase

FUNDING

This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (RFBR) (project № 18-04-00071).

Received: 20.08.2020, revised: 14.09.2010, accepted: 14.09.2020