ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ В.Н.ОРЕХОВИЧА»

На правах рукописи

Яблоков Евгений Олегович

МОЛЕКУЛЯРНОЕ УЗНАВАНИЕ, АФФИННОСТЬ И ТЕРМОДИНАМИКА БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ЦИТОХРОМ Р450-ЗАВИСИМЫХ МОНООКСИГЕНАЗНЫХ СИСТЕМАХ

Специальность 03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор А.С. Иванов

Оглавление

Список используемых сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	6
Цитохромы Р450	6
Актуальность проблемы	7
Цель работы	8
Задачи	8
Научная новизна работы	8
Научно-практическая значимость работы	9
Апробация диссертационной работы	10
Личный вклад автора	10
Публикации	10
Структура работы	12
Глава 1. Обзор литературы	13
1.1 Роль ферментной системы цитохрома Р450	13
1.2 Открытие разнообразия фементных систем цитохрома Р450	14
1.3 Микросомальная ферментная система цитохрома Р450	16
1.3.1 Общая характеристика микросомальной монооксигеназной Р450-	
зависимой системы	16
1.3.2 Структура и свойства цитохром Р450 редуктазы	18
1.3.3 Роль межмолекулярных взаимодействий СҮР-СРК в функционирова	нии
микросомальной монооксигеназной системы	25
1.3.4 Структура и функции микросомального цитохрома b5	26
1.3.5 Митохондриальная изоформа цитохрома b5	36
1.3.6 Значение межмолекулярных взаимодействий между СҮР и СҮВ5	37
1.4 Митохондриальная ферментая система цитохрома Р450	38
1.4.1 Характеристика митохондриальной монооксигеназной системы	38
1.4.2 Структура и функция адренодоксина	41
1.4.3 Взаимодействие адренодоксина с микросомальными Р450	51
1.5 Бактериальная ферментная система цитохрома Р450	53
1.5.1 История изучения бактериальных цитохромов Р450	53
1.5.2 Функции бактериальных цитохромов Р450	54
1.6 Эволюция и разнообразие ферментных систем цитохрома Р450	55
1.7 Метод SPR (Surface Plasmon Resonance)	59
1.7.1 Описание подходов для изучения белок-белковых комплексов	59
1.7.2 Описание явления SPR	60
1.7.3 Описание принципа детекции межмолекулярных взаимодействий	
оптическими биосенсорами на эффекте SPR	62
Глава 2. Материалы и методы	67
2.1 Оборудование	67
2.2 Материалы	67
2.3 Регистрация белок-белковых взаимодействий с помощью оптического	
биосенсора на технологии оптического плазмонного резонанса	71

2.3.1 Подготовка прибора	72
2.3.2 Подготовка буфера	72
2.3.3 Подбор иммобилизационного буфера	72
2.3.4 Иммобилизация лигандов на чипе CM-5	73
2.3.5 Подготовка аналита	77
2.3.6 Анализ взаимодействий	78
2.3.7 Обработка данных и анализ кинетики	79
2.4 Анализ термодинамических параметров взаимодействия цитохромов Р450	И
иммобилизированных белков-партнёров	79
2.5 Методы статистической обработки	80
2.5.1 Определение доверительного интервала для получаемых параметров	
взаимодействия	80
2.5.2 Фитинг	81
2.5.3 Алгоритм Левенберга-Марквардта	81
2.5.4 Оценка качества фитирования	81
2.5.5 Достоверность данных	82
Глава 3. Результаты и их обсуждение	83
3.1 Подбор иммобилизационного буфера	83
3.2 Подбор экспериментальных условий и анализ взаимодействий	83
3.3 Аффинность и селективность взаимодействия СҮР с СҮВ5 (А и В) крысы	И
человека1	06
3.4 Определение термодинамических параметров образования белок-белковых	Х
комплексов СҮР с СҮВ5 (А и В) крысы и человека 1	09
3.5 Аффинность и селективность взаимодействия СҮР с СРК крысы и AdX	
человека1	119
3.6 Определение термодинамических параметров белок-белковых комплексов	6
СҮР с СРК крысы и AdX человека 1	20
ЗАКЛЮЧЕНИЕ1	31
ВЫВОДЫ 1	36
Благодарности1	37
Список литературы 1	38

Список используемых сокращений

- SPR, ППР surface plasmon resonance, поверхностный плазмонный резонанс.
- RU resonance unit, резонансная единица.
- EDC N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид.
- NHS N-гидроксисукцинимид.
- SDS додецилсульфат натрия.
- ЭПР эндоплазматический ретикулюм.
- NADPH, НАДФ*Н-восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотидфосфата.
- FAD, ФАД флавинадениндинуклеотид
- FMN, ФМН флавинмононуклеотид
- СҮР цитохром Р450
- СРRrat цитохром Р450 редуктаза крысы
- AdXhum адренодоксин человека
- СҮВ5Arat цитохром В5 тип А микросомальный крысы
- CYB5Brat цитохром B5 тип В внешней мембраны митохондрий крысы
- CYB5Ahum цитохром B5 тип А микросомальный крысы
- CYB5Bhum цитохром B5 тип В внешней мембраны митохондрий человека

СҮР51А1hum - цитохром Р450, семейство 51, подсемейство А, тип 1 человека СҮР51А1calb - цитохром Р450, семейство 51, подсемейство А, тип 1 *C. albicans* СҮР3А4hum - цитохром Р450, семейство 3, подсемейство А, тип4 человека СҮР3А5hum - цитохром Р450, семейство 3, подсемейство А, тип4 человека СҮР1В1hum - цитохром Р450, семейство 1, подсемейство В, тип 1 человека СҮР2С9hum - цитохром Р450, семейство 2, подсемейство С, тип 9 человека СҮР17А1еq - цитохром Р450, семейство 17, подсемейство А, тип 1 лошади СҮР11А1bov - цитохром Р450, семейство 11, подсемейство А, тип 1 быка СҮР11В1hum - цитохром Р450, семейство 11, подсемейство В, тип 1 человека

ВВЕДЕНИЕ

Цитохромы Р450

В настоящее время известно более 150 различных цитохромов Р450, обнаруженных в животных, растениях, грибах, бактериях. Только у строго анаэробных бактерий этот гемопротеин отсутствует. Прокариоты содержат растворимый Р450. Переход к эукариотическим системам сопровождается встраиванием Р450 в мембрану, как в случае дрожжей и грибов. Все цитохромы Р450 высших организмов - мембранные ферменты. В эволюционном плане наиболее древней является бактериальная монооксигеназная система [1].

Бактериальная монооксигена за состоит из трех водорастворимых компонентов: ФАД-содержащего флавопротеина (NADPH- или NADH-зависимая P450-редуктаза), железо-серного белка (например, в окисляющей камфору системе бактерии *Pseudomonas putida* - путида-редоксин) и P450. Характерной особенностью этой системы является абсолютная специфичность к субстрату, например P450cam [1].

На промежуточной ступени эволюционной лестницы стоит митохондриальная гидроксилазная система надпочечников. Она имеет все признаки бактериальной растворимой системы и также состоит из трех компонентов. Два ее компонента - ФАД-содержащий флавопротеин (NADPH- или NADH-зависимая редуктаза, AdR) и негеминовый серосодержащий белок (адренодоксин, AdX) - водорастворимы и локализованы в матриксе митохондрий, третий - Р450 встроен в мембрану. Обращает на себя внимание высокая субстратная специфичность митохондриальных гемопротеинов, что делает эту систему еще более похожей на бактериальную. Митохондриальные цитохромы Р450 участвуют главным образом в окислении эндогенных субстратов.

Монооксигеназная система микросом печени (микросомальные Р450системы) эукариот состоят из трёх компонентов: флавопротеина, содержащего FAD и FMN (NADPH-зависимая P450-редуктаза, CPR), цитохрома P450 (CYP) и цитохрома b5 (CYB5). Все компоненты этой системы представляют собой мембранные белки. Наряду с печенью и надпочечниками, монооксигеназные системы, содержащие P450, обнаружены также в почках, легких, некоторых отделах мозга, коже, слизистой оболочке носа, кишечника и других тканях [1].

Актуальность проблемы

Монооксигеназная система цитохрома P450 играет важную роль в метаболизме ксенобиотиков, синтезе эндогенных биологически активных веществ, таких как стероидные гормоны, холестерин и простагландины. В настоящее время нет единого представления о молекулярном механизме функционирования этой сложной системы и роли белок-белковых взаимодействий (ББВ) между отдельными редокс-партнёрами. В литературе имеются только отдельные разрозненные данные о ББВ в данной системе, что не позволяет делать однозначных заключений относительно функциональной важности такого комплексообразования.

Цитохром Р450-зависимые монооксигеназные системы присутствуют практически во всех живых организмах, что говорит о древности их возникновения. Известны одиночные данные о ББВ между белками-партнерами из разных организмов с образованием химерных комплексов. Это говорит о возможном консерватизме устройства и функционирования монооксигеназных систем и создает дополнительную проблему в изучении роли ББВ, так как обычно наблюдается крайне высокая (почти абсолютная) видовая специфичность молекулярного узнавания между белками-партнерами в различных молекулярных комплексах.

Поэтому изучение ББВ между белками-партнерами монооксигеназных систем из различных организмов является крайне актуальным. Данное

7

исследование должно быть комплексным и включать анализ не только специфичности молекулярного узнавания, но и оценку аффинности, кинетики и термодинамики ББВ. Последнее особенно важно для понимания механизмов формирования и функционирования белковых комплексов в цитохром Р450зависимых монооксигеназных системах.

Цель работы

Определение специфичности молекулярного узнавания, аффинности и параметров термодинамики взаимодействий между белками-партнёрами в цитохром P450-зависимых монооксигеназных системах.

Задачи

1. Оптимизировать метод ковалентной иммобилизации и многократной нативной регенерации белков монооксигеназных систем на поверхности оптического чипа биосенсора.

2. Выполнить анализ аффинности, кинетики и селективности взаимодействий различных изоформ цитохрома Р450, цитохрома b5, цитохром Р450 редуктазы и адренодоксина.

3. Оценить видовую специфичность молекулярного узнавания между цитохромом P450 и его редокс-партнёрами из разных видов живых организмов.

4. Выполнить комплексный анализ термодинамики ББВ между различными редокс-партнёрами монооксигеназных систем.

Научная новизна работы

Результаты работы носят фундаментальный характер. В работе впервые был выполнен массовый комплексный анализ ББВ сразу для 9 изоформ цитохромов Р450 человека из различных семейств (около 20% от всех известных Р450

человека), включающий определение кинетических, равновесных и термодинамических параметров.

Объем полученных данных оказался достаточным для сравнительного анализа термодинамических особенностей ББВ и разделении их на группы в зависимости от соотношения энтальпийного и энтропийного компонентов. Такое разделение обнаружено впервые и представляет реальный вклад в фундаментальные знания о межмолекулярных взаимодействиях между белками, входящими в состав монооксигеназных систем.

В работе впервые был выполнен подробный анализ взаимодействий микросомальных цитохромов P450 с адренодоксином и цитохром P450 редуктазой, а также митохондриальных цитохромов P450 и b5, что дало новые фундаментальные данные о различиях между монооксигеназными системами эндоплазматического ретикулюма и митохондрий.

Научно-практическая значимость работы

Полученные новые фундаментальные знания о разделении белок-белковых взаимодействий в Р450-зависимых монооксигеназных системах на группы в зависимости от соотношения энтальпийного и энтропийного компонентов могут быть основой для дальнейшего изучения Р450-зависимых монооксигеназных систем.

Получены данные об аффинности, консервативности и специфичности взаимодействий цитохромов P450 с белками-партнёрами, которые могут быть использованы для создания лекарств нового поколения, контролирующих образование функционально активных белок-белковых комплексов.

Полученные новые термодинамические данные о белок-белковых взаимодействиях могут быть использованы для разработки и совершенствования методов и подходов 3D моделирования молекулярных комплексов компонентов Р450-зависимых монооксигеназных систем.

9

Апробация диссертационной работы

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих конференциях:

1. II всероссийская научная конференция молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», 12-14 ноября, Санкт-Петербург, Россия

2. IV съезд биофизиков России, 20 - 26 августа 2012, Нижний Новгород, Россия

Личный вклад автора

Все экспериментальные работы на оптическом биосенсоре выполнены автором лично.

Гетерологическая экспрессия рекомбинантных СҮР и их партнёров были проведены под руководством к.б.н. Гилепа А.А. в Институте биоорганической химии Национальной академии наук республики Беларусь, Республика Беларусь, Минск.

Планирование всех экспериментов, анализ и интерпретация экспериментальных данных, формулировка теоретических положений выполнены автором работы под руководством д.б.н., профессора Иванова А.С.

Публикации

По материалам работы опубликовано 6 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, включенных в перечень ВАК Минобрнауки России.

По теме диссертации были опубликованы следующие статьи:

1. 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. «Белок-белковые взаимодействия в Р450 ЗА4 и ЗА5 системах»// Биомедицинская химия, 2014, Т.60(1), 17-27.

2. 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. «SPR and electrochemical analyses of interactions between CYP3A4 or 3A5 and cytochrome b5.» // Chemical Physics Letters. 2014, v. 593, p. 40–44. doi: 10.1016/j.cplett.2013.12.041

3. 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. "Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: experimental simulation and SPR validation" // Proteomics. 2012, V.12(22), P. 3295-8. doi: 10.1002/pmic.201200135. Epub 2012 Nov 2

4. Ivanov A.S., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentsev Y., Yablokov E., Kaluzhsky L., Gnedenko O., Buneeva O., Haidukevich I., Sergeev G., Lushchyk A., Yantsevich A., Medvedeva M., Kozin S., Popov I., Novikova S., Zgoda V., Gilep A., Usanov S., Lisitsa A., Archakov A. "Protein interactomics based on direct molecular fishing on paramagnetic particles: Practical realization and further SPR validation" // Proteomics. 2014., Jul. 15, doi: 10.1002/pmic.201400117. [Epub ahead of print]

5. Калужский Л.А., Яблоков Е.О., Гнеденко О.В., Мольнар А.А., Янцевич А.В., Муха Д.В., Гилеп А.А., Иванов А.С., Усанов С.А., Арчаков А.И. «Влияние низкомолекулярных ингибиторов и субстратных аналогов цитохрома P450(51) человека на его взаимодействие с микросомальным цитохромом b5 человека» // Медицинский академический журнал. Приложение. Материалы II всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия», 12-14 ноября 2012, Санкт-Петербург, Россия. С.269.

6. Яблоков Е.О., Гнеденко О.В. Мольнар А.А Иванов А.С. Усанов С.А. Арчаков А.И. «Молекулярное узнавание между белками в Р450-зависимых монооксигеназных системах» //Материалы IV съезда биофизиков России, 20-26 августа 2012, Нижний Новгород, Россия. С. 325.

Структура работы

Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 169 страницах машинописного текста, сордержит 6 таблиц и 53 рисунка. Список литературы включает 284 источника.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Роль ферментной системы цитохрома Р450

Катализ монооксигеназных реакций осуществляется цитохромом Р450, при этом необходимо получение электронов от NADPH или NADH, поэтому функционирование цитохрома P450 всегда связано с NAD(P)H-зависимой окислительно-восстановительными редуктазой или системами В клетке. Несколько различных типов Р450-зависимых систем включают белки, имеющие домены, выполняющие функцию редуктазы и цитохрома в пределах одной молекулы. Структурное разнообразие систем цитохрома Р450 может быть связано с высочайшим разнообразием физиологических функций Р450 в организмах эукариот и прокариот. Цитохромы Р450 представлены в эндоплазматическом ретикулюме (микросомальная фракция), как в гладком, так и шероховатом, и в митохондриях клеток животных, в то время как в клетках растений и грибов они найдены только в эндоплазматическом ретикулюме. Компоненты микросомальной системы Р450 представлены исключительно белками, связанными с мембраной, в то время как митохндриальная система состоит из связанного с мембраной цитохрома Р450 и растворимой редуктазной системы. Все компоненты системы Р450 являются растворимыми белками в клетках прокариот.

Субстраты реакций, катализируемых P450, как правило, гидрофобные органические вещества. Это отражается в тесной связи митохондриальной и микросомальной системы цитохрома P450 с мембраной, так как их субстраты имеют тенденцию концентрироваться в мембранах. Растворимость компонентов системы P450 прокариот может быть объяснена отсутствием внутриклеточных мембранных систем для фиксации цитохромов P450.

Структурное разнообразие ферментной системы P450 представляет собой интересный случай, когда физиологическое разнообразие функций фермента сопровождается изменениями его партнёров. Суперсемейство генов P450, которыми кодируется большое количество различных цитохромов P450, произошло, по-видимому, от одного древнего гена-предшественника и приобрело высокое разнообразие параллельно с эволюцией живых организмов. Так как P450 требует наличие редуктазы для функционирования, молекулярная эволюция цитохрома должна быть ограничена необходимостью взаимодействия с ферментом-партнёром. Этот обзор суммирует знания о структурном разнообразии ферментной системы цитохрома P450 и здесь обсуждается её связь с функциональным разнообразием, возникшим в ходе эволюции организмов эукариот и прокариот.

1.2 Открытие разнообразия фементных систем цитохрома Р450.

Впервые Р450 был обнаружен в микросомальной фракции печени животного в 1962 году [2], и ферментная активность Р450 из коры надпочечников была [3]. охарактеризована как монооксигеназная В следующем году Роль микросомальной NADPH-цитохром *с* редуктазы в Р450-катализируемой NADPHзависимой монооксигеназной реакции была предложена в 1968 году [4]. Последующие исследования подтвердили важную роль NADPH-цитохром с редуктазы в микросомальных Р450-катализируемых монооксигеназных реакциях, сейчас эту редуктазу называют NADPH-цитохром-P450 редуктаза. Все цитохромы Р450 и редуктаза связаны с микросомальной мембраной.

Наличие Р450 в митохондриях, изолированных из коры надпочечников, было обнаружено в 1964 году [5]. В 1966 году [6] было обнаружено, что NADPHзависимая стероид-гидроксилазная активность митохондрий коры связана с мембранным Р450, и растворимой NADPH-P450 редуктазой. Система так же включает адренодоксин и NADPH-адренодоксин редуктазу. Митохондриальная ферментная система Р450 присутствует у животных, но её наличие не показано у грибов и растений. Однако некоторые статьи содержат сведения о наличии Р450 в хлоропластах растений [7].

Бактериальный Р450 впервые был обнаружен у бактероидов *Rhizobium* в 1967 году [8]. В отличии от микросомальной и митохондриальной систем Р450,

14

обнаруженных ранее, *Rhizobium* P450 был растворимым. Однако, функция P450 у бактероидов пока не выяснена. В следующем году было обнаружено ещё два бактериальных цитохрома. Один был найден в *Pseudomonas putida* [9], а другой в *Coryebacterium sp.*, [10]. Цитохром P450 из *Pseudomonas*, P450cam (CYP101), катализирует NADPH-зависимую реакцию окисления камфоры и требует для функционирования растворимую NADPH-P450 редуктазную систему, состоящую из путидаредоксина и NADPH-путидаредоксин редуктазы [9]. Согупеbacterium P450 катализирует NADPH-зависимую реакцию окисления п-октана до 1-октанола. Множество растворимых P450 было обнаружено в различных прокариотах в последние годы.

Первый самодостаточный фьюжн-фермент, содержащий домены цитохрома P450 и P450-редуктазы, был найден у *Bacillus megaterium* в 1987 году и назван P450 BM-3 (CYP102A1) [11]. Сходные фьюжн-белки были найдены в других видах бактерий и так же нескольких видах грибов в последующие годы. Недавние анализы геномной последовательности различных прокариотических организмов показали возможность наличия нескольких новых белков слияния P450-редуктаза в бактериях.

Р450 могут катализировать монооксигеназные реакции при отсутствии молекулярного кислорода при условии наличия органических или неорганических пероксидов. Этот тип моноокигеназной активности Р450, который не нуждается в поставке восстановительных эквивалентов от редуктазы, был обнаружен в 1975 году [12, 13]. Некоторые цитохромы Р450 катализируют перестройку атомов кислорода в молекуле субстрата [14], этот тип активности так же независим от редуктазы. Исключительно интересный случай представляет собой Р450nor (СҮР55А1), обнаруженный в грибах *Fusarium oxysporum* в 1993 году [15]. Р450nor катализирует восстановление оксида азота и его гем-простетическая группа получает электроны прямо от NADPH [15].

1.3 Микросомальная ферментная система цитохрома Р450.

1.3.1 Общая характеристика микросомальной монооксигеназной Р450-зависимой системы

Микросомальная ферментная P450 щироко система цитохрома распространена среди эукариот и отвечает за катализ NADPH-зависимого окисления многочисленных эндогенных и экзогенных субстратов. Она состоит из Р450 и редуктазы, которые связаны с цитоплазматической поверхностью Их эндоплазматического ретикулюма клетки. синтез осуществляется мембраносвязанными рибосомами, после чего они встраиваются в мембрану амино-концевой сигнальной последовательностью [16, 17]. Связывание с мембраной важно ИХ взаимодействия И функционирования. лля Для восстановления монооксигеназной активности очищенных P450 и NADPH-P450 редуктазы осуществляют встраивание этих ферментов в фосфолипидные липосомы или мицеллы детергента.

Несколько разных видов молекул цитохрома P450 сосуществуют на мембране эндоплазматического ретикулюма в некоторых тканях животных, например в ткани печени и почек, и уровень экспрессии каждого по отдельности зависит от внешних и внутренних стимулов. Некоторые цитохромы P450, специализированные на метаболизме веществ, поступающих из внешней среды, такие как CYP1A1 в печени, быстро и заметно индуцируются в присутствии ксенобиотиков, в то время, как другие компоненты ферментной системы, NADPH-P450 редуктаза и цитохром b5, практически не изменяют свой уровень. Повидимому, микросомальная ферментная система цитохрома P450 обладает высокой гибкостью, что позволяет ей отвечать на необходимость новой метаболической активности путём изменения уровня только одного компонента, в частности цитохрома P450.

Микросомальная система цитохромов Р450 в первую очередь связана с метаболизмом ксенобиотиков. Для процессов метаболизма ксенобиотиков наиболее важны СҮР4А4, СҮР3А5, СҮР2С9 и СҮР1В1. Цитохром СҮР3А4

принимает участие в метаболизме более 50% всех известных лекарственных веществ [18]. Цитохром СҮРЗА5 является близким гомологом цитохрома СҮРЗА4, формирующимся за счёт альтернативного сплайсинга. Цитохром СҮР2С9 составляет примерно 20% от всех цитохромов микросомальной фракции печени и метаболизирует около 25% известных лекарственных веществ [19]. Особенно стоит отметить, что среди субстратов цитохрома СҮР2С9 много распространённых лекарств, характеризующихся узкой терапевтической шкалой, таких как варфарин, фенитоин, аценокумарол, толбутамид, лозартан и глипизид [19]. Кроме того, экспрессирующийся вне печени цитохром СҮР2С9 принимает участие в метаболизме таких важных эндогенных лигандов, как арахидоновая и линолевая кислоты, 5-гидрокситриптамина. Цитохром СҮРІВ1 играет важную В первой фазе метаболизма множества ксенобиотиков, а роль так же полициклических углеводородов и 17β-эстрадиола. Так же СУР1В1 важен для процессов эмбрионального развития, мутации, связанные с геном ЭТОГО цитохрома, ассоциированы с развитием первичной глаукомы. Кроме этого СҮР1В1 активирует множество проканцерогенов [20].

микросомальные Помимо метаболизма ксенобиотиков P450 цитохромы осуществляют синтез эндогенных лигандов, наиболее важными из которых являются стероидные гормоны. Фермент микросом ланостерол-14α-деметилаза, или СҮР51А1, принимает участие в синтезе холестерина [21]. По-видимому этот цитохром самый древний из всего семейства Р450. Другой микросомальный цитохром P450, СУР17А1 является ключевым ферментом биосинтеза стероидных гормонов [22]. Этот цитохром осуществляет разветвление биохимических путей синтеза предшественников стероидных гормонов, идущих от прегненолона, направляя маршрутам, синтез по ведущим к минералокортикоидам, глюкокортикоидам и половым гормонам. Такую функцию СУР17А1 может благодаря ферментативной 17выполнять двум видам активности гидроксилазная и 17,20-лиазная. Переключение между этими «режимами» осуществляется благодаря цитохрому b5, о чём будет рассказано далее.

Функционирование этих цитохромов, как И всех микросомальных монооксигеназ, неразрывно связано с окислительно-восстановительнми процессами, проистекающими как в молекуле субстрата, так и в гемовом железе цитохрома Р450. Источником восстановительных эквивалентов, электронов, для этих процессов служит НАДФ*Н. Этот перенос опосредован рядом белковпартнёров, таких как НАДФ*Н-зависимая редуктаза цитохромов P450 (CPR, P450редуктаза) и цитохром b5, представляющие собой флаво- и гемопротеин соответственно. Эти белки-партнёры цитохромов Р450 содержат коферменты, способные изменять своё состояние окисления, что опоследет перенос электронов на цитохром Р450 для осуществления каталитического цикла. Далее мы подробнее рассмотрим белки-партнёры микросомальных цитохромов Р450.

1.3.2 Структура и свойства цитохром Р450 редуктазы

NADPH-P450 редуктаза принадлежит обширному семейству к дифлавиновых оксидоредуктаз. Типичным представителем этого семейства, помимо NADPH-P450 редуктазы является нитрооксид синтаза (NOS), а так же флавоцитохром P450BM3 и редуктаза метионинсинтазы (MSR). Для белков этого семейства характерно наличие двух флавинсвязывающих доменов, ассоциированных с ФАД и ФМН. Каждый флавиновый кофермент играет свою роль. ФАД принимает сразу два электрона от НАДФ*Н (два восстановительных ФМН [23,24]. ФМН эквивалента) и сразу переносит их на передаёт восстановительные эквиваленты на цитохром Р450 по очереди, один за другим [25, 26-29]. Как правило флавинсодержащие домены соеденены гибким линкером, обеспечивающим высокую подвижность доменов относительно друг друга. Причём эта подвижность важна для осуществления функции NADPH-P450 редуктазы. Наличие такого подвижного и гибкого домена приводит к тому, что в растворе молекулы редуктазы представлены двумя конформерами, «открытая» и «закрытая», пребывающими В динамическом равновесии. Кроме того, CPR двойной исследования методом электрон-электронного резонансной

18

спектроскопии (ELDOR) [30, 31] показывают, что молекула CPR принимает несколько "закрытых" и "открытых" конформаций в растворе. Эллис и др [32], используя комбинацию ЯМР и рассеивания рентгеновских лучей (SAXS), показали, что окисленная CPR человека существует в растворе в виде смеси приблизительно равных количеств двух конформаций, одна из которых согласуется с кристаллической структурой (закрытая форма) и одна увеличенная в размерах, более лабильная структура, которая предположительно требуется для взаимодействия со своими партнерами по транспорту электроном. Кроме того, НАДФ*Н предпочтительно связывается с молекулой NADPH-P450 редуктазы, которая пребывает в закрытой конформации. В отличие от этого, Винсент и др. [33] недавно показали, используя ЯМР высокого разрешения в сочетании с изотопно-меченными аминокислотами, что окисленная CPR в растворе без связанного НАДФ существует в конформации, схожей с закрытой конформацией, наблюдаемой в кристалле [34, 35]. Кажется более разумным, что молекулы в закрытой конформации, способные к внутримолекулярному переносу электрона, формируются путем связывания с НАДФ*Н, в то время как молекулы в открытой конформации, способные переносить электрон от ФМН на цитохром Р450, образуются преимущественно в отсутствие связанного кофермента. Хотя детальный остается неясным, механизм совокупные данные позволяют предположить, регулируются что движения доменов окислительновосстановительным состоянием фермента, а так же наличием и/или отсутствием связанного НАДФ*Н или НАДФ. В последнее время Pudney др. [36] с использованием метода остановленного потока и флуоресцентного резонансного переноса энергии, были получены данные, свидетельствующие о том, что восстановление флавиновых коферментов вызывает переход молекулы NADPH-Р450 редуктазы в открытую конформацию, в то время как связывание нуклеотидов индуцирует «закрывание» молекулы СРЯ.

Точные белок-белковые и/или междоменные взаимодействия необходимы для быстрого и специфического транспорта электронов в мультибелковых или

многодоменных окислительно-восстановительных ферментах. Таким образом, точный контроль ассоциации и диссоциации доменов или белков является ключевым фактором для быстрого и контролируемого переноса электронов [37]. NADPH-P450 редуктаза представляет собой мультидоменный белок и её функционирование требует определённых межмолекулярных и междоменных взаимодействий. Точные и специфические взаимодействия между ФМН- и ФАДдоменами внутри молекулы, и между ФМН-доменом и цитохромом P450 переноса электрона, необходимы для осуществления необходимого для осуществления каталитической функции цитохрома Р450. Подвижность ФМНдомена существенна для поочерёдной и посдедовательной передачи электрона. Промежуточный комплекс, состоит ИЗ белков-партнёров В различных образуется конформационных состояниях, изначально пол влиянием электростатических взаимодействий. Впоследствии происходит формирование специфического комплекса с одной строго определённой конформацией и взаимоориентацией белков-партнёров. Этот комплекс способствует оптимизации взаимоположения окислительно-восстановительных центров для эффективного транспорта электронов. ФМН-домен несущий консервативные участки кислых аминокислотных остатков, участвующих в электростатических взаимодействиях с партнерами. ФМН-домен характеризуется наличием значительного дипольного момента [38], который опеспечивает стыковку с гем-содержащими центрами белков-партнёров. В микросомальной системе цитохрома Р450, гидрофобный липидный бислой способствует, предположительно, концентрированию молекул белков-партнёров и, следовательно, увеличению частоты их взаимодействия, а также для поддержанию их правильной ориентации для эффективного транспорта электронов [39-41]. Так все Р450 и NADPH-Р450 редуктаза связаны с мембраной эндоплазматического ретикулюма и перенос электронов от редуктазы к цитохрому зависит от их взаимодействия с мембраной.

Один из возможных механизмов взаимодействия заключается в случайном соударении Р450 и редуктазы, связанных с мембраной, в ходе их латеральной

диффузии в липидном бислое [42]. Формирование молекулярных кластеров Р450 и редуктазы на мембране представляет собой другой вероятный механизм их взаимодействия, но молярное соотношение редуктазы к цитохрому в микросомах печени гораздо больше единицы, на один моль редуктазы приходится 1020 моль Р450. Более того NADPH-P450 редуктаза поставляет электроны не только цитохромам Р450, и так же некоторым другим микросомальным мембранным ферментам: гем-оксигеназе, сквален-оксигеназе, и так далее. Были получены доказательства формирования молекулярных кластеров Р450 и NADPH-P450 редуктазы на мембранах липосом и микросом [43, 44], но агрегаты должны быть в динамическом равновесии со свободными компонентами [45].

Высоко консервативная проксимальная поверхность микросомальных Р450 относительно электроположительна и может взаимодействовать с отрицательно заряженной поверхностью ФМН-домена CPR [46, 47-49]. Предполагаемая модель P450-CPR комплекса позволяет увидеть, что полная площадь контакта между двумя молекулами ~ 1500 Å², из которых 870 Å², расположены между FMN и P450 электроположительная область Р450 взаимодействует [46]. Эта также с отрицательной поверхностью цитохрома b5, который стимулирует катализ, вызывая конформационное изменение в активном центре [50]. В дополнение к этим взаимодействиям, которые обусловлены гидрофильными аминокислотными остатками цитохрома Р450 и редуктазы, гидрофобные аминокислотные остатки, на проксимальном участке некоторых микросомальных цитохромов также способствуют взаимодействию с СРК [51]. Модель, основанная на молекуле заторможенной в открытой конформации вследствии мутации в шарнирной области соединительного домена по Hamdane и Xia и др [46], также демонстрирует, что плоскости гема и ФМН почти перпендикулярны друг к другу, и расстояние между гемом и флавиновым кофактором составляет около 12 Å. Два аминокислотных остатка, Phe429 и Glu439, принадлежащие цитохрому P450 лежат между двумя кофакторами. Можно предположить, что эти остатки могут играть роль посредников в процессе переноса электронов между кофакторами. Также Натdane др. предположили, что в открытой конформации СРR связывается с цитохромом P450 и осуществляет перенос электронов. После переноса электронов, цитохром P450 удаляется движением домена СРR [46]. Это согласуется с недавними результатами SAXS показавшими, что движение доменов СРR связано с окислительно-восстановительными процессами. В окисленной форме редуктаза компактна, в то время как восстановление её кофакторов способствует переходу молекулы в развернутую конформацию [52]. Можно предположить, что образование редуктазой белок-белкового комплекса со своим белком-партнёром так же смещает равновесие в сторону открытой конформации, то есть редокс-партнёр как бы фиксирует молекулу редуктаза в открытой конформации.

В данной работе это явление находило отражение в значительном положительном изменении энтропии, которым сопровождалось формирование комплексов CPR-P450. Следует отметить, что в работе Masakazu и соавт. показан комплекс CPR С другим партнёром, ферментом гемоксигеназой (HO). Взаимоположение и области контакта молекул CPR и её редокс-партнёра полностью идентичны таковым в комплексе CPR-P450. Что важно, структура данного комплекса была установлена в результате рентгеноструктурного анализа кристалла. Молекула CPR содержала искусственный мутациии в шарнирной области, аналогичные тем, что находили применение в вышеупомянутой работе Hamdane и др. Кроме того, поверхность связывания также соответствует структуре ФМН- и гем-содержащего доменов цитохрома P450 BM3, который является природным фьюжн-белком [53]. Таким образом можно предположить, что крайне широкая специфичность CPR, способной взаимодействовать не только с десятками разлитчных цитохромов Р450, но и с другими гем-содержащими окислительно-восстановительными ферментами гемоглобином, И лаже С обусловлена занчительным снижением энергии молекулы при переходе в открытую конформацию и мало зависит от структуры белка-партнёра. Вероятно, от белка-партнёра требуется только относительно положительный заряд на

значительной площади молекулы и наличие гема или иного кофермента, способного выполнять роль акцептора электронов. Относительно положительный заряд будет способствовать правильной ориентации ФМН-домена редуктазы, который характеризуется значительным дипольным моментом и относительным отрицательным зарядом. Кофермент, способный принять электроны от флавинов СРR будет способствовать окислению связанного НАДФ*Н до НАДФ, что, в свою очередь будет служить пусковым механизмом для механического «выталкивания» белка-партнёра от ФМН-домена ФАД-доменом.

Помимо белок-белковых взаимодействий, мембрана эндоплазматического ретикулюма также играет ключевую роль в переносе электронов. В искусственной Р450-содержащей системе, растворимая СРR, лишённая гидрофобного Nконцевого мембранного якоря (остатки 44 аминокислот), не в состоянии переносить электроны на цитохром Р450 [54]. Можно предположить, что связывание с мембраной облегчает взаимодействие и правильную ориентацию для эффективного транспорта электронов между двумя партнерами. Хотя структурные модели растворимых форм ферментов показали высокую подвижность ФМНдомена по отношению к ФАД-домену из-за наличия соединительного домена и шарнира, следует отметить, что в действительности ФМН-домен связан с мембраной эндоплазматического ретикулюма с помощью гидрофобного якоря. Таким образом, шарнир способствует перемещению ФАД-домена по отношению к ФМН-домену и цитохрому Р450, которые прикреплены к мембране. При переходе в закрытую конформацию, ФАД-домен передвигается в ближе к ФМН-домену, что способствует переносу электронов на ФМН. Однако, как только ФМН переходит в восстановленное состояние, ФАД-домен должен отходить, чтобы позволить цитохрому P450 провзаимодействовать с доменом FMN.

Таким образом, на мембране эндоплазматического ретикулюма движение ФАД-связывающего домена с помощью шарнира в значительной степени ответственно за позиционирование ФМН-домена и облегчает образование активного комплекса между активным сайтом ФМН и гемом цитохрома P450 [55, 56]. Кроме того, растворимая СРR, лишённая N-концевой мембраносвязывающего домена, не может передавать электроны растворимому цитохрому b5. Таким образом, эффективный транспорт электронов происходит только в присутствии солюбилизированной интактной СРR и цитохрома b5 [57, 58], что свидетельствует о том, что взаимодействие СPR и цитохрома P450 (или цитохрома b5) с мембраной эндоплазматического ретикулюма имеет важное значение для эффективного транспорта электронов.

Необходимость NADPH-P450 редуктазы для микросомальных P450катализируемых реакций была подтверждена in vitro путём использования очищенных ферментов и фосфолипидов, а так же in vivo делецией NADPH-P450 редуктазы печени. Делеция NADPH-P450 редуктазы у мышей приводит к исчезновению P450-зависимой монооксигеназной активности в печени, при этом уровень P450 в микросомальной фракции несколько повышается [59, 60].

Исследования естественных мутаций в генах дифлавиновых редуктаз и соответствующих им фенотипов способствовали выяснению связи структурафункция этого семейства ферментов. Ген CPR человека находится на хромосоме 7q11.2 [61] и содержит 16 экзонов. Человеческий ген кодирует 680 аминокислот, последовательность которых на 94% идентична таковой у CPR крысы. Как и ожидалось, в целом трёхмерная пространственная структура человеческой CPR очень похожа таковую у CPR крысы [62, 63]. Система CPR-P450 является одной из микросомальных окислительных ферментных систем. Хотя v основных млекопитающих существуют многочисленные функциональные гены цитохромов Р450 (например, у крысы 74, 92 у мышей, у человека 59), есть только один ген СРК в геноме каждого вида [64, 65]. В ходе проекта «Геном человека» были обнаружены 59 функциональных генов цитохромов Р450. Семь из них кодируют митохондриальные ферменты, каждый из которых играет ключевую роль в биосинтезе стеринов, ещё 50 кодируют микросомальные ферменты. Оставшиеся гены кодируют простациклин синтазу (СҮР8А1) и тромбоксан-синтазу (СҮР5А1). Из 50 микросомальных ферментов, 20 участвуют в биосинтезе эндогенных

субстратов [66], таких как стероиды и эйкозаноиды; 17 специализируются на метаболизме ксенобиотиков; и 13 представляют собой орфан-ферменты [67]. Все микросомальные цитохромы P450 способны принять электроны от CPR, предположительно связываясь с консервативными участками ФМН-домена редуктазы.

Анализ методом направленного мутагенеза был произведён с целью определения аминокислотных остатков, принимающих участие в катализе [68, 69]. CPR передает электроны трём микросомальнм цитохромам P450, отвечающих за стероидогенез, в том числе 17-гидроксилазе/17,20 лиазе (СҮР17А1), 21гидроксилазе (СҮР21А2), и ароматазе (СҮР19А1), а также, отвечающим за биосинтез холестерина СҮР51А1 и не-Р450 ферменту сквален монооксигеназе. Таким образом, миссенс мутации гена CPR человека способны вызвать множественные дефекты, связанные с нарушением биосинтеза холестерина и стероидогенеза, например, бисексуальные гениталии, поликистоз яичников и/или синдромом Антли-Бикслер, пороков развития скелета, В том числе краниосиностоз.

1.3.3 Роль межмолекулярных взаимодействий CYP-CPR в функционировании микросомальной монооксигеназной системы

Из преведённых выше сведений можно заключить, что процессы формирования белок-белковых комплексов критически важны для получения цитохромами P450 электронов, необходимх для осуществления катализа, от P450-редуктазы. Всвязи с тем, что центральную роль не только в образовании, но и в функционировании комплекса CPR-P450 играет активное движение доменов молекулы P450редуктазы относительно друг друга, можно предположить, что формирование комплексов CPR-P450 происходить за счёт измененя не сколько энтальпии, сколько энтропии системы. Однако основным источником информации о структуре таких комплексов остаётся компьютерное моделирование, не способное оценить и учесть изменения энтропии в ходе формирования белок-белковых комплексов. В данной работе были получены характеристики термодинамических параметров формирования белок-белковых комплексов между СРR и различными цитохромами P450. Было обнаружено, что ведущей силой взаимодействия СPR с цитохромами P450 является изменение энтропии. Так же была подтверждена универсальность P450-редуктазы, которая способна к образованию комплексов со всеми цитохромами P450, принадлежащими как к микросомальной, так и к митохондриальной монооксигеназным P450-зависимым ферментным системам.

1.3.4 Структура и функции микросомального цитохрома b5

Как было сказано выше, помимо CPR в микросомальной монооксигенозной системе цитохромов P450 есть ещё один поставщик электронов — цитохром b5. Кроме этогоэтот белок выполняет так же ряд функций, не связанных с переносом электрона. Далее рассмотрим более подробно этот белок.

Цитохром b₅ (далее CYB5) представляет собой небольшой (примерно 15 кДа) белок, содержащий в качестве простетической группы гем. В клетках млекопитающих имеется две изоформы CYB5, имеющие общее строение (сходный порядок расположения структурных элементов и идентичную укладку полипептидных цепей), но кодируемые разными генами. Данные изоформы имеют различную внутриклеточную локализацию - в мембране эндоплазматического ретикулума находится микросомальная изоформа (CYB5A), а в наружной мембране митохондрий - митохондриальная (CYB5B) [70].

Из анализа доступных геномных данных млекопитающих следует, что все СҮВ5mc содержат 134 аминокислотных остатка. Сравнение аминокислотных последовательностей СҮВ5A млекопитающих показывает их идентичность на 84-97%. Изоформа СҮВ5B несколько больше и содержит 146 аминокислотых остатков, сравнение первичных последовательностей СҮВ5B млекопитающих показывает идентичность 63-65%. Сходство первичных структур двух изоформ СҮВ5 невысокое, так попарное сравнение полноразмерных СҮВ5A и СҮВ5B крысы показывает только 49% идентичности [71].

Структурно обе изоформы СҮВ5 состоят из N-терминального гидрофильного и

гидрофобного С-терминального участка [72]. N-терминальный домен состоит приблизительно из 100 аминокислотных остатков и содержит в своей структуре небелковый компонент - гем (железопорфирин IX). Гем удерживается в структуре СҮВ5 за счет двух координированных связей с имидазольными группами гистидинов [73]. Гидрофильная часть белка расположена в цитозоле, где она принимает участие В транспорте электронов при окислительновосстановительных реакциях. Средний гидрофобный домен, насчитывающий остатков, расположенный около 20 аминокислотных ближе к С-концу, представляет собой мембранный якорь, внедренный в липидный бислой биологической мембраны и удерживающий белок на поверхности мембраны. С помощью компьютерного моделирования было показано, что данный участок молекулы СҮВ5А образует петлю, погружённую в липидную мембрану [74].

С-концевой участок СҮВ5А содержит порядка 7 аминокислотных остатков и расположен на поверхности мембраны эндоплазматического ретикулума [75]. Соответствующий участок СҮВ5В, содержит около 10 остатков аминокислот и, вероятно, направлен во внутримембранное пространство митохондрии [72]. В этом С-концевом участке содержится необходимая информация о месте мембранной локализации той или иной изоформы СҮВ5. Так было показано, что в С-концевом участке СҮВ5В содержится две положительно заряженные аминокислоты Arg137 и Lys144, которые обуславливают транспорт и встраивание белка в наружную мембрану митохондрий [76].

Несмотря на общность структурной организации, изоформы СҮВ5 проявляют разные физико-химические свойства и по-разному оказывают влияние на активность цитохромов Р450 (СҮР). Эти различия обусловлены особенностями строения гидрофильного домена СҮВ5. Показано, что у СҮВ5В гидрофильный домен имеет более жесткую структуру, за счет чего данный белок более устойчив к химической и термической денатурации, однако менее эффективно взаимодействует с редокс-партнерами по сравнению с изоформой СҮВ5В [77].

Давно известно, что цитохром b5 способен увеличить активность некоторых

монооксигеназных реакций цитохромов P450, но механизм этого эффекта остается спорным. Исследования, проведенные в последние годы, прояснили эту проблему, обозначив три способа воздействия цитохрома b5 на функциональную активность цитохромов P450. Первый способ представляет собой прямой, не зависящий от CPR, перенос двух необходимых электронов от НАДФ-цитохром b5 редуктазы на P450. Второй способ заключается в передаче второго электрона на цитохром P450, гемовое железо которого пребывает в охуferrous-состоянии, цитохрома b5 редуктазы или цитохром P450 редуктазы. Третий способ представляет собой аллостерическую стимуляцию активности P450 не сопряжённую с переносом электрона. Доказательства, имеющиеся к настоящему времени, а так же результаты, полученные в ходе выполнения этой работы, указывает, что каждый из этих путей может работать в естественных условиях.

Цитохром b5 так же вовлечен в реакции биосинтеза липидов, выступая в крайней качестве донора электронов для, ПО мере, трех отдельных микросомальных десатураз, которые синтезируют ненасыщенные жирные кислоты [78]. Ненасыщенные жирные кислоты необходимы для обеспечения текучести мембран, а также служат в качестве предшественников арахидоновой кислоты и эйкозаноидных сигнальных молекул. Цитохром b5 важен также для процессов биосинтеза плазмалгена и стеролов, выступая в качестве донора электронов для ферментов-десатураз, принимающих участие в катализе реакций синтеза этих соединений.

Цитохром b5 связан с эндоплазматическим ретикулюмом, как и его донор электронов, NADH-цитохром b5 редуктазой. Добавление NADH в суспензию микросом печени увеличивает функциональную активность метаболизма лекарственых веществ что свидетельствует о вовлечении b5 редуктазы/ цитохрома b5 в P450-опосредованные реакции [79,80]. Эту гипотезу подтверждают результаты исследований с применением антител к цитохрому b5 [81,82]. Известно, что цитохром b5 способен с лёгкостью восстанавливаться в присутствии NADPH [83]. На основании этого можно предположить, что цитохром P450-редуктаза также может служить в качестве донора электронов для цитохрома b5, что так же было подтверждено in vitro с использованием препаратов очищенных белков [58]. Эти исследования позволили связать цитохром b5 с монооксигеназной системой микросомальных цитохромов P450 и подняли вопросы о роли и механизмах воздействия цитохрома b5 на метаболизм лекарственных веществ.

Участие цитохрома b5 в микросомальных Р450-катализируемых реакциях было известно с самого начала исследования этой ферментной системы. Хотя получение электронов микросомальными цитохромами P450 зависит от NADPH-Р450 редуктазы, было обнаружено, что добавление NADPH стимулирует NADPHзависимое окисление субстратов микросомами печени [84]. Участие цитохрома b5 в поставке электронов от NADPH цитохрому P450 было предложено в 1971 году [85]. Возможно, что восстановление железа гема цитохрома Р450 зависит от NADPH-P450 редуктазы в то время, как электрон для активации молекулы кислорода, связанной с железом гема P450, может быть получен от цитохрома b5 [86]. Однако, апо-цитохром b5 был так же эффективен для усиления NADPHзависимого окисления субстратов в востановленной мембранной системе [87, 88]. Молекулярные механизмы стимулирования Р450-зависимых реакций цитохромом b5 всё ещё противоречивы [89-91], хотя цитохром b5 может рассматриваться как компонент микросомальной ферментной системы цитохрома Р450. Наличие цитохрома b5 в восстановленной мембранной системе не только стимулирует NADPH-зависимую монооксигеназную активность различных микросомальных цитохромов Р450, но так же оказывает влияние на селективность по отношению к положению окисляемого атома молекулы субстрата в реакциях, катализируемых P450. B случае Р450с17 некоторыми цитохромами (CYP17A), который катализирует 17α-гидроксилирование и 17,20-лиазную реакции прогестерона, при добавлении цитохрома b5 к восстановленной системе 17,20-лиазная реакция стимулируется больше, чем 17α-гидроксилирование [86, 92-94].

Значительный интерес представляет собой такой способ обеспечения

цитохромов Р450 электронами, при которым основным донором выступает НАДФ*Н-цитохром b5 редуктаза, опосредованный цитохромом b5 и независящий от НАДФ*Н-цитохром Р450 редуктазы. Kuwahara и Mannering [95] привели доводы в пользу такого пути для реакции О-деалкилирования р-нитрофенентола в микросомах, используя в качестве экспериметальных методик различные подходы, в том числе антитела к цитохрому b5 и НАДФ*Н-цитохром P450 редуктазе. Появление рекомбинантных систем экспрессии белков значительно облегчило исследования с использованием очищенных компонентов: Ямадзаки и соавт. [96] обнаружили, что система b5-редкутаза/ цитохром b5/цитохром Р450 ЗА4 способна катализировать реакции окисления тестостерона и нифедипина гораздо более значительно, чем можно наблюдать в экспериментах восстановленной системой Р450-редуктазы/Р450 ЗА4. Эти результаты показывают, что несмотря на известную разницу окислительно-восстановительных потенциалов цитохромов b5 и P450, перенос электронов на некоторые цитохромы Р450 может происходить по пути NADH/b5-редуктаза/цитохром b5, даже в отсутствие цитохром Р450-редуктазы. Следует отметить, что для цитохрома b5 не было показано возможности изменять среднюю точку потенциала Р450 ЗА4 [97].

Также было обнаружено, что высокая скорость оборота такого фермента как цитохром P450 2E1, поддерживается поступлением электронов через цитохром b5 от NADH-цитохром b5 редуктазы. Ямадзаки и др. [98] обнаружили, что в восстановленной системе, содержащей NADH, b5-редуктазу, цитохромы b5, и Р450 2E1 скорость реакции окисления 7-этоксикумарина примерно на четверть выше по сравнению со скоростью такой же реакции в системе цитохром Р450редуктаза/цитохром 2E1. В суспензии микросом печени человека, антитела к цитохром Р450-редуктазе вызывают только незначительное сокращение скорости реакции деалкилирования 7-этоксикумарина. Это может подтверждать, что электроны от NADH достигали цитохромов P450 через b5-редуктазу и цитохром b5. Были произведены подобные исследования in vivo, с использованием рекомбинантного реактива Эймса [99,100] метаболизма для оценки

диметилнитрозамина цитохромом P450 2E1, который коэкспрессировался с различными комбинациями цитохром P450-редуктазы, цитохрома b5, и цитохромb5 редуктазы. Результаты свидетельствуют, что P450 редуктаза-независимый путь получения электронов может эффективно функционировать в естественных условиях. Насколько эта система физиологически функциональна в клетках млекопитающих трудно сказать, но исследования мутантных животных, нокаутных по гену P450 редуктазы должны оказаться полезными (следует отметить, что все животные с выключенным геном цитохром P450-редуктазы погибают ещё на стадии эмбриогенеза [101], это может быть связано с тем, что редуктаза цитохромов P450 вовлечена в важные биохимические процессы, не сопряжённые с монооксигеназной системой цитохромов P450).

Рассмотрим подробнее второй механизм воздействия цитохрома b5 на функциональную активность цитохромов P450. Исследования по стимуляции реакций окисления лекарств цитохромом P450 путем добавления NADH к суспензии микросом привело Hildebrandt и Estabrook [84] к выводу, что цитохром b5 может способствовать передачи второго электрона на цитохром P450 в ходе каталитического цикла. Синергетический эффект NADH в суспензии микросом проявлялся для многих, но не для всех, субстратов цитохромов P450. Впоследствии было показано, что аналогичные эффекты наблюдаются при получении электронов по пути b5-редуктаза/цитохромb5 в реконструированных системах [102].

Тем не менее, в большинстве случаев было достаточно только цитохрома b5 для стимуляции. Поскольку цитохром P450-редуктаза может легко восстановить цитохром b5 [58], ни НАД*Н, ни b5-редуктаза не являются необходимыми компонентами, и электроны могут перетекать из НАДФ*Н (или НАД*Н) с помощью цитохром P450-редуктазы, как на цитохром b5, так и на P450. И, хотя восстановление железа P450 цитохромом b5 термодинамически невыгодно, средний потенциал цитохрома P450 в охуferrous-состоянии (железо гема уже восстановленно одним электроном) составляет ~50 мВ [103]. Это позволяет

цитохрому b5 с лёгкостью поставлять второй электрон для каталитический цикла. Этот стимулирующий эффект цитохрома b5 в восстановленных системах цитохромов P450 в настоящее время хорошо известем для реакций с участием разнообразных эндогенных и экзогенных субстратов цитохромов P450, а также для различных изоформ P450 [85].

Цитохром b5 образует прочный, эквимолярный комплекс с цитохромами Р450 при помощи ионных взаимодействий между гемом и карбоксильными группами цитохрома b5 и положительно заряженных групп аминокислот на цитохроме Р450 [104, 105]. Эти комплексы характеризуются значениями констант диссоциации (Kd) в диапазоне низких микромолярных, приспособлены и необходимы лля переноса электронов [106]. Формирование химически модифицированных, ковалентно связанных комплексов не исключает получение электронов цитохром Р450-редуктазы. Это наблюдение OT привело К предположению, что b5 служит «буфером накопления» для электронов, позволяя Р450-редуктазе донировать два электрона и одновременно восстанавливать железо гема цитохромов P450 и b5 до ferrous-состояния [107]. После перехода гемового железа цитохрома P450 в охуferrous-состояние в ходе каталитического цикла, b5 может передать второй электрон для завершения восстановления. Эта гипотеза, удовлетворяющая в плане объяснения способности цитохрома b5 повышать скорость метаболизма и повышения эффективности сопряжения окисления NADPH и образования продукта, получила экспериментальное подтверждение [108, 109].

Однако не ясно, как P450 / b5 комплекс может принять электроны от P450редуктазы, так как исследования с применением компьютерного моделирования и направленного мутагенеза показали, что сайты связывания цитохрома b5 и P450редуктазы на поверхности цитохрома P450 частично перекрываются (проксимальная поверхность) [110]. Разрешение этого вопроса ждет дальнейших исследований.

Остановимся на таком интересном механизме воздействия цитохрома b5 на

32

каталитическую активность цитохромов Р450, как аллостерическая регуляция. Этот процес не зависит от способности цитохрома b5 передавать электроны за счёт изменения степени окисления своего гемового железа. Первые свидетельства о «некаталитической роли» для цитохрома b5 были получены при исследованиях, в ходе которых гем этого белка был заменен марганец-протопорфирином IX [111]. Хотя такой модифицированный белок не способен принять или переносить электрон с Р450-редуктазы или b5-редуктазы, он сохранил способность при добавлении в восстановленные системы, содержащие цитохромы P450 2B4 или 1А2, уменьшать значение константы Михаэлиса (Км) нескольких субстратов Р450. доказательство аллостерической роли цитохрома b5 Окончательное было получено результате случайно обнаруженного явления. Это В явление заключалось в том, что апо-цитохром b5 (форма цитохрома, которая лишена гема) может стимулировать протекание некоторых реакций, катализируемых цитохромом P450 3A4, так же эффективно, как и холо-цитохром b5 (то есть нативный цитохром b5, содержащий гем). Это показало, что перенос электронов цитохромом b5 не является необходимым для проявления стимулирующего действия [86]. Хотя недавно утверждали, что апо-b5 на самом деле "крадет" гем цитохрома P450 3A4 (за счёт очень высокого сродства апо-цитохрома b5 к гему) и такой «восстановленный» b5 что затем участвует В окислительновосстановительных реакциях с цитохромами Р450 и Р450-редуктазой [112]. Доказательства, опровергающие этот аргумент были представлены в работе [113].

Апо-b5 повышает скорость восстановления Р450 ЗА4 без изменения средней ferric/ferrous цитохрома потенциала P450, предположительно точки по кинетическому, а не по термодинамическому механизму. Стимулирующий эффект субстратами цитохрома P450 3A4 некоторыми (тестостерон, заметен С нифедипин). Некоторые субстраты, этилморфин, способны такие как непосредственно стимулировать перенос электронов от Р450-редуктазы, и добавление b5, как апо- или холофермента, не дает дополнительных преимуществ.

Механизм, посредством которого цитохром b5 и этилморфин повышали

перенос электронов к 3А4 еще не понят. Более того, стимулирование цитохромом b5 не всегда приводит к увеличению переноса электронов от P450-редуктазы. В случае с цитохромами P450 2C9 и 4А7 стимуляция апо- и голо-цитохромом b5 произошла без заметного увеличения скорости переноса электронов от P450-редуктазы [114, 115].

Аллостерическое воздействие цитохрома b5 теперь дэкспериментально подтверждено для ряда цитохромов P450. Наряду с P450 3A4, 2C9, и 4A7, о которых уже шла речь выше, в этот список входят P450 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 3A5, и 17A1 [116, 117]. Оказалось, что апо-b5 препятствует связыванию субстрата с цитохромом P450 4A7, но увеличивает число оборотов фермента, о чем свидетельствует увеличение значений Km, Kcat, и Ks для лаурата. Авторы предположили, что b5 может изменить канал доступа субстрата к гему и связывающий карман и, возможно, ускорить освобождение продукта реакции [115]. Следует отметить, что многие из P450, отмеченных выше, аллостерическая стимуляция апо-b5 весьма скромна, как правило меньше, чем в два раза, а физиологическая роль этого процесса еще не осознана.

В самом деле, существует очень мало исследований in vivo о влиянии экспрессии цитохрома b5 на активность цитохромов P450. Аоуата и др. [118] осуществляли коэкспрессию человеческих цитохромов b5, P450-редуктазы, и P450 2B1 в человеческих клетках (ТК-) и получили семикратное увеличение скорости реакции деалкилирования p-нитрофенитола в присутствии цитохрома b5. Однако, вклад в эффект переноса электрона и конформационных изменений не был рассмотрен в этой ранней работе. Ротроп и коллеги [119] показали, что коэкспрессия b5 человека в дрожжах увеличивает P450 3A4-опосредованное гидроксилирование тестостерона в семь раз. Voice и др. [120] сообщили о повышает активности P450 3A4 приблизительное два раза, когда с ним был коэкспрессирован цитохром b5 в клетках *Escherichia coli*. Но опять же, ни одна из групп не рассматривала вопрос о вкладе аллостерического влияния и переноса электрона. Было показано, что совместная экспрессия в клетках Salmonella Турһітигіuт цитохрома b5 дает пятикратный рост уровня метаболизма диметилнитрозамина цитохромом P450 2E1 [99], но перенос электрона имеет важное значение для этой стимуляции [116, 114]. Этот крайне ограниченный объем информации, полученных при изучении рекомбинантных экспрессионных систем, поддерживает представления о роли b5 in vivo, особенно для цитохромов P450 3A4 и 2E1. Но для других P450, отмеченых выше, физиологическая роль цитохрома b5 остается неизвестной, требуется использование b5-нокаутных животных или клеточных линий. Кроме того, вопрос вкладе конформационной стимуляции и переноса электрона, вероятно, потребует создание гем-дефицитных мутантных форм цитохрома b5.

В отличие от метаболизирующих лекарства цитохромов Р450, о которых сказано выше, есть весомые доказательства того, что аллостерическое влияние цитохрома b5 играет важную роль в регуляции активности P450 17A1. Этот цитохром Р450 последовательно гидроксилирует прегненолон (или прогестерон), переводя стероид в соответствующие 17а-гидрокси производное. Далее за этой реакцией следует второе гидроксилирование, ведущие к расщеплению углерод-(17,20-лиазная углеродной реакция) формированию связи И дегидроэпиандростерона (DHEA) или андростендиона, соответственно. В 17αгидроксипроизводные являются предшественниками глюкокортикоидов, в то время как продукты 17,20 лиазной реакции служат прекурсорами половых стероидов. Таким образом цитохром Р450 17А1 является узловым ферментом стероидогенеза, задающим направление синтеза прекурсоров стероиднх гормона. Без обработки цитохромом 17А1 прогестерон и прегненолон идут на образование минералкортикоидов, после реакции 17α-гидроксилирования метаболиты приводят к глюкокортикоидам, а после серии двух реакций гидроксилирования образуются предшественники половых гормонов.

Было предположено, что цитохром b5 вносит свой вклад в дифференциальную регуляцию этих двух путей, модулируя активность цитохрома P450 17A1 в репродуктивных тканях. Уровнь экспрессии цитохрома b5 высок в тканях, которые синтезируют половые стероиды, таких как яичко [121] и сетчатая зона коры надпочечников [122]. Несколько лабораторий показали, что стимуляция лиазной активности P450 17A1 цитохромом b5 не требует переноса электрона [87, 123]. Как апо-, так и голо-цитохром b5 может давать стимуляцию 17,20-лиазной активности в восемь и более раз, не оказывая заметного воздействия на реакцию 17α-гидроксилирования [87]. Стимуляция цитохромом b5 максимальна при соотношении b5:P450 равном 1:1. Дальнейшие исследования показали, что мутации на поверхности P450 для взаимодействия с редокс-партнером значительно снижают способность цитохрома b5 осуществлять стимулирование активности цитохрома 17A1 [124].

Остается нерешенным вопрос о том, как цитохром b5 и P450-редуктаза образуют тройной комплекс с цитохромом P450 и почему это должно стимулировать реакции, катализируеме цитохромом P450. Возможно дело в изменении ориентации молекулы редуктазы цитохрома P450 в таком тройном комплексе, либо повышение скорости ассоциации и диссоциации редуктазы P450 (что приводит к повышению темпов оборота), или b5-индуцированные изменения в связывании субстрата или диссоциации молекулы продукта. Независимо от механизма, модуляция цитохромом b5 является важным инструментом, с помощью которого дифференциированный синтез глюкокортикоидов и половых стероидов регулируется в различных тканях.

1.3.5 Митохондриальная изоформа цитохрома b5

В дополнение в цитохрому b5, в печени животных был найден другой b5подобный гемопротеин. Так как этот новый гемопротеин был локализован на внешней мембране митохондрий его назвали ОМ-b (СҮВ5) в 1980 году [125]. ОМb спектрально идентичен цитохрому b5, но аминокислотная последовательность OM-b из печени крысы только на 58% идентична последовательности цитохрома b5 микросом из печени крысы [126]. Было обнаружено, что OM-b экспрессируется в различных тканях животных, а так же представлен в эндоплазматическом
ретикулюме некоторых тканей, включая яички и кору надпочечников [127]. Было показано вовлечение ОМ-b в NADPH-зависимый синтез андрогенов цитохромом P450c17 в клетках Лейдига крысы [128].

Микросомальные Р450 удерживаются в эндоплазматическом ретикулюме несколькими механизмами [129-131]. Однако, несколько авторов сообщили о присутствии цитохромов Р450 микросомального типа на плазматической мембране клеток животных [132, 133]. При некоторых физиологических состояниях небольшие количества цитохромов Р450 микросомального типа, вероятно, покидают эндоплазматический ретикулюм и перемещаются на поверхность клеточной мембраны, возможно с помощью секреторных путей [134, 135]. Однако, авторы некоторых статей отрицают присутсивие цитохрома Р450 на клеточной поверхности [136]. Присутствие цитохрома Р450 на плазматической мембране клеток остаётся спорным.

1.3.6 Значение межмолекулярных взаимодействий между СҮР и СҮВ5

Цитохром b5 переживает полную противоречий историю в качестве компонента микросомальной монооксигеназной системы цитохрома P450. От первоначальных исследований, где предполагалось что этот белок представляет солбой неотъемлемую часть монооксигеназной системы, до низведения к артефакту исследований in vitro. Однако сегодня показано, что b5 играет важную роль в монооксигеназной системе цитохрома P450 in vivo, и что есть несколько механизмов, с помощью которых он стимулирует активность P450. Будущие исследования с трансгенными животными, скорее всего, более четко обрисуют различные роли b5 в многочисленных реакциях монооксигеназных систем, а так же вклад этого небольшого гемопротеина в свойства и токсикологические эффекты лекарств и ксенобиотиков.

В этой работе были произедены исследования взаимодействий двух изоформ цитохромов b5 с цитохромами P450 in vitro. Из приведённых выше данных понятно, что роль белок-белковых взаимодействий между цитохромами P450 и b5

сложно переоценить. Однако, несмотря на это, в механихмах взатимодействия этих двух гемопротеинов ещё довольно много тёмных пятен. Данные, полученные в ходе этой работы указывают на интересное сходство между цитохромами Р450 3А4, 3А5 и 17А1 в плане их взаимодействия с микросомальным цитохромом b5. Так же сделаны интересные наблюдения, которые касаются способности некоторых цитохромов Р450 различать микросомальную и митохондриальную изоформу цитохрома b5, а так же позволяющие подтвердить роль всех трёх механизмов воздействия b5 на активность цитохромов P450. Получение сведения по термодинамике процессов формирования белок-белковых комплексов b5-P450 базу биоинформационных могут дать эксперементальную для методов исследования, в том числе компьютерного моделирования.

1.4 Митохондриальная ферментая система цитохрома Р450.

1.4.1 Характеристика митохондриальной монооксигеназной системы

Некоторые Р450 локализованы в митохондриях клеток тканей животных. Они являются минорной группой в суперсемействе цитохромов Р450 животных, по сравнению с микросомальными цитохромами. У человека семь цитохромов Р450 были найдены в митохондриях, в то время, как общее число цитохромов у человека достигает 57. Митохондриальные формы Р450 это уникальная ветвь филогенетического дерева цитохромов Р450 животных [137]. Они, как правило, специализируются на метаболизме эндогенных стероидов и каждый из них катализирует сайт-селективные реакции специфических субстратов. Это резко отличает их от микросомальных цитохромов, которые обладают более широкой субстратной специфичностью и метаболизируют даже ксенобиотики. В митохондриях растений и грибов цитохромы Р450 не найдены.

Митохондриальные цитохромы P450 прикреплены на обращённой к матриксу стороне внутренней мембраны [138]. Связывание митохондриальных цитохромов P450 с внутренней мембраной митохондрий выглядит более слабым по сравнению с микросомальными цитохромами, заякоренными в мембранане ЭПР гидрофобной трансмембранной последовательностью. Некоторые гидрофобные аминокислотные остатки в области F-G петли молекулы P450 могут отвечать за связывание митохондриальных цитохромов с мембраной [139, 140], хотя точный механизм связывания пока не описан. Их редуктазная система NADPH-адренодоксин состоит ИЗ адренодоксина И редуктазы, которые растворены в матриксе митохондрий [6]. Адренодоксин был впервые выделен из митохондрий коры надпочечников в 1965 году [139]. Это железосерный белок, содержащий один [2Fe2S] железосерный кластер на молекулу. NADPHадренодоксин редуктаза представляет собой FAD-содержащий флавопротеин. Все этой системы кодируются мРНК компоненты ядерными генами И ИХ транслируются на цитоплазматических рибосомах для получения сигнального аминоконцевого пептида [137]. Предшественники ферментов импортируются в митохондрию, где подвергаются процессингу и встраиваются во внутреннюю мембрану. Размер митохондриальных цитохромов Р450 вместе с сигнальным пептидом около 500 аминокислотных остатков, так же как и микросомальные Р450, имеющие якорную последовательность на N-конце.

Хотя адренодоксин и NADPH-адренодоксин редуктаза обнаруживаются в супернатанте после разрушения изолированных митохондрий ультразвуком, есть вероятность того, что адренодоксин ассоциирован с мембранными P450 в митохондриях. При электромикроскоприровании клеток коры надпочечника была показана ассоциация адренодоксина и NADPH-адренодоксин редуктазы с внутренней мембраной митохондрий [141, 142]. Адренодоксин обладает высоким аффинностью к цитохромам P450 и было обнаружено образование комплексов in vitro [143, 144].

Как уже было сказано выше, отличие митохондриальных цитохромов P450 от микросомальных заключается в том, что они в первую очередь связаны с синтезом таких важных эндогенных лигандов, как стероидные гормоны. Самый известный, типичный митохондриальный цитохром CYP11A1 (холестерол десмолаза, side chain cleavage enzyme, P450scc) катализирует образование

прегненолона холестерина [145], последовательно окисляя гибкий ИЗ угдеводородный «хвост» молекулы холестерола до кетогруппы прегненолона. Таким образом этот фермент осуществляет введение молекул холестерина в процессы биосинтеза стероидных гормонов, что делает СҮР11А1 критически важным для нормальной жизнидеятеьности организма. Мутации в гене этого цитохрома приводят к формированию врождённой липоидной гиперплазии надпочечников. Однако описан лишь один случай этого заболевания, связанный с мутацией гена CYP11A1, чаще подвергается нарушению ген белка StAR, ответственного за «накачку» холестерина в митохондрии [146]. Вероятно мутации в гене СҮР11А1 настолько критичны для организма, что приводят к гибели эмбриона. Цитохромы 11В1 и 11В2 осуществляют синтез альдостерона и кортизола [147], активных минералокортикоидов и глюкокортикоидов. Цитохром 11**B**1 катализирует реакцию 11β-гидроксилирования, синтезируя кортизол глюкокортикоид) кортикостерон, являющийся (основной И прекурсором альдостерона. Этот фермент интенсивно экспрессируется в клетках пучковой зоны коры надпочечников. Цитохром 11В2 или альдостерон синтаза, близкий гомолог цитохрома 11В1, экспрессируется в клетках клубочковой зоны коры Осуществляет надпочечников. альдостерона (основной синтез минералокортикоид) из кортикостерона. Мутации в генах этих ферментов приводят к различным видам альдестеронизма и врождённой гиперплазии коры надпочечников.

Как уже было сказано выше про микросомальные цитохромы P450, цитохромы P450 митохондрий так же катализируют окислительновосстановительные реакции, сопряжённые с изменением степени окисления гемового железа, входящего в их состав как кофермент. Следовательно, как и микросомальные цитохромы, цитохромы митохондрий нуждаются в притоке электронов для осуществления каталитической активности. Эти электроны поступают к ним от НАДФ*Н тоже опосредованно, через белки-переносчики. Таким белком-пратнёром для митохондриальных цитохромов P450 служит небольшой отрицательно заряженный делок адренодоксин, содержащий в качестве кофермента железосерный кластер 2Fe2S. Электроны адренодокиин получает от адренодоксин-редуктазы, флавопротеина, получающего электроны от НАДФ*Н. Далее мы подробно рассмотрим адренодоксин и его роль в функционировании митохондриальной системы цитохромов P450.

1.4.2 Структура и функция адренодоксина

Адренодоксин и его редуктаза считаются маркёрами митохондриальной ферментной системы с монооксигеназной активностью с 1967 года [6]. Однако, как было показано позже, некоторые митохондриальные цитохромы, перенаправленные в ЭПР с помощью генной инженерии, способны принимать электроны от микросомальной NADPH-P450 редуктазы в ходе экспрессии в дрожжевых клетках [148]. Так же было показано, что микросомальные цитохромы Р450 могут принимать электроны от адренодоксина в восстановленной мембранной системе [149, 150]. Скорее всего, митохондриальные цитохромы Р450 способны взаимодействовать с микросомальной NADPH-P450 редуктазой, а микросомальные Р450 способны принимать электроны от адренодоксина, но эти взаимодействия менее эффективны, чем между естественными партнёрами.

Адренодоксин относится к семейству ферредоксинов. Ферредоксины представляют собой небольшие, растворимые и кислые белки (они очень богаты кислыми остатками аминокислот). Эти белки содержат по крайней мере один железосерный кластер в качестве простетической группы и, как правило, выступают в качестве белков-переносчиков электронов [151]. Они могут быть разделены на различные классы в зависимости от числа и типа их железосерныхкластеров: [2Fe-2S], [3Fe-4S], [4Fe-4S], [3Fe-4S] и [4Fe-4S] или [4Fe-4S] и [4Fe-4S] кластеры. В ферредоксинах "бактериального типа" либо моно-, либо двойной железосерный кластер содержащий [3Fe-4S] и / или [4Fe-4S] кластеры [152]. [2Fe-2S] ферредоксинов, подсемейства: Среди есть три ферредоксины растительного типа [2Fe-2S] из фотосинтезирующих организмов, тиоредоксинподобные ферредоксины [2Fe-2S], примером которых может служить ферредоксин из Clostridium pasteurianum и, наконец, ферредоксины позвоночных [2Fe-2S] [153]. Однако последняя группа включает в себя не только [2Fe-2S] ферредоксины эукариот, но и прокариот [154]. Вероятно, лучше всего изучены ферредоксины именно этого класса, особенно митохондриальный адренодоксин млекопитающих бактериальный путидаредоксин (Pdx) из Pseudomonas (Adx) И Putida. Адренодоксин и путидаредоксин принимают участие в функционировании P450 монооксигеназных систем цитохромов первого класса (т.е. бактериальные Р450-зависимые митохондриальная классические И монооксигеназные системы) [155], действуя в качестве белков-переносчиков электронов между ферредоксинредуктазой (или адренодоксинредуктазой в случае с AdX) и цитохромами P450 [156].

Благодаря своей важной роли в биосинтезе стероидных гормонов млекопитающих, Adx привлекал большое внимание в последние десятилетия. В самом деле, название "адренодоксин" происходит от ткани, из которой Adx был впервые выделен. Этот железо-серный белок был впервые веделен из ткани надпочечников [6, 157, 158], органа в котором синтезируются такие стероидные гормоны, как глюкокортикоиды, минералкортикоиды и андрогены.

В качестве компонента монооксигеназной системы цитохрома P450 в митохондриях клеток коры надпочечников, AdX передает электроны на цитохром CYP11A1 и ферменты семейства CYP11B от HAДФ*H-зависимой ферредоксин редуктазы, которую, следовательно, называют адренодоксин-редуктазой (AdR). CYP11A1, также известный как P450scc (фермент отщепляющий боковую цепь молекулы холестерина, о котором было сказано выше), катализирует три последовательные стадии гидроксилирования, приводящие в итоге к удалению боковой цепи холестерина с получением таким образом прегненолона, который является предшественником всех стероидных гормонов млекопитающих. Помимо CYP11A1 также зависят от поставок адренодоксином электронов и CYP11B1 и CYP11B2, которые катализируют окончательные шаги биосинтеза главного

глюкокортикоида человека (кортизола) и главного минералокортикоидного гормона человека (альдостерон) соответственно. Помимо надпочечников, экспрессия AdX также происходит в плаценте [159], печени [160,161] и почках [162-164]. В этих тканях он участвует в метаболизме стероидов, витамина D3 и желчных кислот [165, 166].

Так как Adx действует в качестве важнейшего переносчика электронов для нескольких митохондриальных цитохромов P450, принимающих участие в жизненно важных физиологических процессах, то не удивительно, что мутации и нарушения функций AdX не были описаны до сих пор [167]. Так как организм, дефектный по гену адренодоксина, вероятнее всего будет погибать ещё на стадии эмбриона. Было высказано мнение, что потеря плацентой способности синтезировать прогестерон в связи с дефицитом либо AdX, либо AdR или CYP11A1 приводит к спонтанному аборту на сроке около 6-7 недель беременности у человека [168]. Тем не менее, в последние несколько лет было зарегистрировано шесть клинических случаев мутаций в гене CYP11A1 [146, 169-173], и представляется возможным, что мутации в гене AdX, которые не приводят к полной потере функции, также не смертельны для развивающегося плода.

В структурных функциональных исследований адренодоксина И млекопитающих в основном фигурировал AdX быка или человека. AdX человека кодируется ядерным геном, который находится на хромосоме 11q22 и состоит из четырех экзонов [165, 174]. Молекулы мРНК AdX как у человека [159], так и быка [175], кодируют белок-предшественник более высокой молекулярной массы, содержащего N-концевой сигнальный участок, которого нет в зрелом белке. У ферредоксина быка N-концевой сигнальный домен белка-предшественника, длина 58 которого составляет аминокислот, действует как сигнальная последовательность для отправки в митохондрии. Этот домен удаляется после транспорта в митохондрии [176, 177]. После этого получается молекула зрелого бычьего AdX, которая состоит из 128 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 14,4 кДа [178].

Субклеточное распределение митохондриальных и микросомальных цитохромов обычно строго контролируется в клетке, но есть сообщения о присутствии некоторых видов микросомальных цитохромов Р450 в митохондриях [179-182]. Похоже, порция микросомального цитохрома P450 ЧТО малая сортируется не правильно при определённых физиологических условиях и направляется в митохондрии. Импортированные в митохондрии цитохромы Р450 микросомального типа проявляют ферментную активность [179, 182], но физиологическое значение цитохрома микросомального типа в митохондриях пока остаётся непонятным.

Далее рассмотрим более подробно структуру адренодоксина. До сих порне были опубликованы данные рентгеноструктурного анализа восстановленного AdX Однако были проведены структурные исследования окисленной и восстановленной формы бычьего AdX с использованием ЯМР спектроскопии высокого разрешения [183, 184]. В то время как структура окисленной формы согласуется с известными рентгеновсими структурами [185, 186], можно сказать, что значительные конформационные изменения происходят при восстановлении [2Fe-2S] кластера.

Наиболее значительные изменения химического сдвига наблюдались для Сконцевых остатков, но также и в области, соответствующей аминокислотным остаткам 68-85, были зарегистрированы значительные различия [183]. Эта область представляет собой домен первичного взаимодействия, представляющий из себя петлю, образованную аминокислотными остатками остатками 80-84. Обсуждению подлежал тот факт, что петля стабилизируется одной из α-спиралей (остатки 72-79, принадлежащие к этому домену первичного взаимодействия) молекулы AdX в окисленном состоянии. Смещение петли при восстановлении кофермента может приводить к тому, что в восстановленной форме наблюдается укорочение этой спирали (остатки 72-75). Гипотетически это может привести к изменению позиции остатка D79. Так как D79 имеет важное значение для взаимодействий с окислительно-восстановительными партнерам, можно предложить, что это изменение может вызвать диссоциацию комплекса Adx-AdR. Также конформационные изменения в С-концевой области, вероятно, важны для взаимодействий с редокс-партнёрами и осуществления электронтранспортной функции AdX. Хотя С-концевой домен AdX крайне неупорядочен в окисленной форме, он становится гораздо более упорядоченным при восстановлении кофермента [183, 184]. Было предложено, что структурные изменения в С-концевой домена вызывает диссоциацию димера AdX при восстановлении [183].

Помимо аминокислот С-конца, аминокислоты 38, 57, 75, 81-83, и 95 демонстрируют существенные различия при сравнении химических сдвигов при анализе молекул AdX, находящихся в окисленном и восстановленном состоянии [183]. Интересные результаты, касающиеся редокс-зависимых конформационных изменений AdX также были получены в работах с применением H56 мутантов [184]. Абсолютно консервативный аминокислотный остаток H56 был выбран для направленного мутагенеза, поскольку он образует водородные связи с Y82 и S88, таким образом связывая основной домен AdX с доменом взаимодействия [185, 187]. Была продемонстрирована роль H56 в качестве важнейшего звена в передаче редокс-зависимых конформационных эффектов от связывающей области кластера в область первичного взаимодействия [184]. Было ранее предположено, что восстановление AdX может привести к разрушению водородной связи между H56 и T82 [183]. Результаты Kostic соавт. [184] показали, что водородные связи поддерживается в восстановленной форме и, что это даже необходимо для ограничения гибкости в области взаимодействия AdX.

Хотя многие исследования были проведены с целью выяснения функции AdX и его взаимодействий с AdR и ферментной систоемой цитохромов P450, точный механизм понять пока не удается. Были предложены три основные модели, описывающие процесс переноса электронов от AdR через AdX для цитохромов P450. Первая модель "шаттл-переносчик", которая заключается в том, что AdX функционирует в качестве мобильного носителя электронов между AdR и CYP [188, 189]. Вторая модель говорит об образовании тройного комплекса 1:1:1 между AdR, AdX и CYP [190], тогда как третья модель постулирует формирование тетрамерного комплекса 1:2:1 между AdR, AdX и CYP [191].

впечатлением от новых данных о стректуре полноразмерного Под аденодоксина была предложена гипотеза о вовлечении в процессы переноса электронов функциональных димеров AdX [186], которая согласуется с моделями как тетрамерного комплекса, так и с моделью Hanukoglu и Lambeth, если предположить, что модель шаттла-переносчика распространяется на димеры AdX. Эта модифицированная модель в дальнейшем была более детально разработана Beilke соавт. [183]. Ими было предложено, что две молекулы адренодоксина в окисленной форме образуют димер, который связывается с AdR. Сначала молекула AdX, непосредственно связанная с AdR, восстанавливается. Затем эта молекула AdX переносит электрон на вторую молекулу AdX, что приводит к диссоциации димера AdX. Впоследствии, молекула Adx по-прежнему связанная с AdR восстанавливается и диссоциирует от редуктазы. Оба восстановившихся мономера AdX окисляются индивидуально цитохромом P450, освобождая окисленные молекулы AdX, которые могут начинать этот цикл снова, формируя димер окисленных молекул AdX.

Помимо сведений о кристаллической структуре AdX, есть несколько сообщений о формировании димеров AdX. Возникновение димеров Adx наблюдалось как на клеточной поверхности E.coli осуществляющих гетерологическую экспрессию адренодоксина, так и в растворе чистого рекомбинантного AdX быка было показано наличие димеров методом гельхроматографии [192]. Совсем недавно, самоассоциация в димеры окисленного AdX также была подтверждена методом аналитического ультрацентрифугирования, в то время как восстановленный AdX представлен исключительно в виде мономеров [193]. Учитывая, что только восстановленный и мономерный AdX способен передавать электроны на СУР11А1 [49], а так же, что мономеризованный и, возможно, также димеризованный окисленный AdX может ингибировать функционирование CYP11A1 in vivo [194-197], модель Beilke представляется не лишённой смысла. Тем не менее следует указать, что не стоит отдавать предпочтение модели шаттла-переносчика, нельзя исключить, что существуют различные механизмы в различных окислительно-восстановительных системах, так как AdX поставляет электроны нескольким митохондриальным цитохромам P450.

Для того, чтобы выполнять свою роль как переносчика электронов между AdR и CYP, Adx должен взаимодействовать со свомими редокс-партнёрами. В процессе взаимодействия, молекулы редокс-партнёров проходят через различные [198]. Взаимоузнавание взаимодействующих этапы белков предшествует формированию недолговременных комплексов, в которых взаимодействия слабы и взаимоориентация молекул белков не завершена [199]. Затем специфические белок-белковые взаимодействия приводят к формированию прецизионного, активного донор-акцепторного комплекса, в котором происходит туннелирование электронов. Заключительным этапом взаимодействия является диссоциация редокс-партнеров после переноса электронов [200]. Интересно, что диссоциация AdX-CYP11A1 комплекса, вероятно, является лимитирующей стадией в работе всей системы ADR-AdX-CYP11A1 [201].

Для процессов узнавания и взаимодействия между ферредоксином хлорпластов и его ферредоксинредуктазы, которые принимают участие в фотосинтезе [202, 203], крайне важен высокий дипольный момент белковпартнёроа. Можно предположить, что и во взаимодействие AdX с его белкамипартнёрами также, вносит свой вклад значительный дипольный момент молекулы адренодоксина. Однако, полученные недавно экспериментальные данные ясно показали, что высокий дипольный момент молекулы AdX (примерно 800 Д) не принимает участия в электростатическом взаимодействии и преориентации адренодоксина с его редокс-партнёрами [204]. Для изучения влияния дипольного момента молекулы на биологические функции AdX были получены пять K98E, K6E/K98E, рекомбинантных мутантых по остаткам лизина (К6Е, K6E/K22Q/K24Q K6E/K22Q/K24Q/K98E) И вариантов адренодоксина С

последовательно уменьшающимся дипольным моментом (от 600 до 200 Д). Значения окислительно-восстановительного потенциала всех мутантных форм были аналогичны таковому у AdX дикого типа. Так же не былоа нарушена способность этих мутантных форм адренодоксина к образованию комплекса с AdR и CYP11A1. Кроме того, активность реакции отщепления боковой цепи холестерина, катализируемой СҮР11А1, не продемонстрировала зависимости от мутации. Это показывает, что общая активность цепи переноса электронов не нарушается. В экспериментах по изучению белков с измененным дипольнып моментом было показано, что эффект от уменьшения дипольного момента был для нарушить преориентацию слишком слаб того, чтобы белков И дестабилизировать образование комплекса [204].

Путем химической модификации и направленного мутагенеза были однозначно определены ключевые аминокислоты AdX, которые необходимы для его специфических взаимодействий с редокс-партнёрами AdR и CYP11A1, [205]. Дополнительная информация была получена также из данных по кристаллической структуре AdX [185, 186], AdR [206] и ковалентно сшитого 1:1 комплекса AdX:AdR [207, 208]. Поскольку изоэлектрической точка AdX лежит в кислой области [209], а также наблюдается значительное влияние ионной силы раствора на взаимодействие AdX и его редокс-партнёрами [210], было предложено, что отрицательно заряженные остатки кислых аминокислот являются вероятными кандидатами в качестве точек электростатических взаимодействий с AdR и цитохромами Р450. Эксперименты с использованием химической модификации и направленного мутагенеза позволили определить высококонсервативную область на поверхности молекулы адренодоксина, включая в том числе остатки 68-86 [211-213]. Было установлено, что остатки D76 и D79 в этой зоне AdX участвуют в электростатических взаимодействиях с остатками положительно заряженых аминокислот молекулы AdR. В случае человеческого AdX был особенно выраженный эффект, когда аспарагиновая кислота в положении 76 или 79 была заменена на аспарагин или даже глутаминовую кислоту [214, 215]. Таким образом

можно говорить о том, что для адренодоксина, как и для цитохрома b5 и CPR, характерно взаимодействие положительно заряженнми аминокислотами своих партнёров, то есть йонные взаимодействия играют важную роль по крайней мере в образовании первичного комплекса.

Из сказанного выше можно сделать вывод, что одной из точек регуляции системы митохондриальных цитохромов Р450, и, в частности, стероидогенеза, может служить как раз адренодоксин. Рассмотрим далее один из способов этой регуляции. AdX является непосредственным донором электронов для нескольких митохондриальных цитохромов Р450, поэтому модуляция взаимодействия адренодоксина с его редокс-партнерами и, тем самым переноса электронов, может повлиять на несколько шагов в стероидогенеза и биосинтеза витамина D [167, 216]. Взаимодействие между различными компонентами AdR-AdX-CYP11A1 системы в основном базируется на электростатических взаимодействиях. Поэтому посттрансляционные модификации, такие как введение фосфатной группы, может существенно изменить взаимодействие редокс-партнёров за счёт сильного изменения заряда. Действительно, было показано, что Adx может быть фосфорилируется как in vitro, так и in vivo. Уже в 1980-х годах in vivo наблюдали фосфорилирование AdX в клетках почек крыс и полученные данные позволяют фосфорилирование сделать вывод 0 TOM, что существенно снижает гидроксилазную активность СҮР27В1 [217]. Этот эффект был подтвержден последующими исследованиями in vitro, в ходе которых было установлено, что аминокислотный остаток AdX S88 (и, возможно, T85 или T97) играет роль сайта фосфорилирования для цАМФ-зависимой протеинкиназы [218, 219]. В отличие от тормозящего действия фосфо-AdX на 25-OH-D3-1α-гидроксилазную активность СҮР27В1, фосфорилирование AdX по остатку S88 положительно влияет на активность реакций, катализируемых СУР11А1 и СУР11В1 [218]. Совсем недавно добавление ингибиторов исследования клеточных культур показали, ЧТО протеинкиназ привело к значительным изменениям гидроксилирования стероидов в клетках, стабильно экспрессирующих СҮР11В1 или СҮР11В2. Степень

выраженности эффекта зависила от ингибитора, изоформы CYP11B и субстрата [220].

Что касается взаимодействия AdX с представителями семьи CYP11, было обнаружено, что некоторые мутации, а также фосфорилирование AdX по-разному взаимодействие с СУР11А1 И CYP11B2 [221]. оказывает влияние на Предложительно, это может играть важную роль в регуляции стероидогенеза. Таким образом, посттрансляционные модификации AdX и/или другие клеточные факторы и их влияние на процессы образования белок-белковых комплексов и переноса электронов, будут важной темой для будущих исследований. Помимо фундаментальных исследований, также возможно биотехнологическое применение AdX в качестве переносчика электронов на различные цитохромы Р450, это обстоятельство так же вызывает растущий интерес. Еще одно новое поле исследований ферредоксинов, которое привлекает все большее внимание, представляет собой проблему биогенеза железо-серных кластеров. Учитывая современное состояние исследований нет признаков того, что сам по себе AdX участвует в этом процессе, однако у бактерий и низших эукариот есть ферредоксины высоко гомологичные AdX, которые, как предполагается, играют важную роль в процессах биосинтеза железо-серных кластеров [222]. Таким образом, даже если функция переноса электрона AdX ограничена системой цитохромов Р450, дальнейшие исследования по этого ферредоксина позвоночных приведет к более глубокому пониманию структуры и функции ферредоксинов позвоночных вообще и биологических систем, в функционировании которх они участвуют.

Отдельно стоит затронуть такую интересную особенность адренодоксина, как его способность не только взаимодействовать с ферментами микросомальной системы цитохромов P450, но поставлять им электроны не менее эффективно, чем CPR. Было обнаружено, что AdX способен способствовать катализу реакций, протекающих под воздействием микросомального цитохрома CYP2B4 [148]. Было обнаружено, что эффективность переноса электронов от AdX на CYP2B4 составляет 27% от таковой для переноса электронов от CPR на этот цитохром Р450. Кроме этого продукция перекиси водорода вследствии «утечки» второго каталитического электрона была повышена, если в качестве донора электронов по отношению к СҮР2В4 выступал AdX. Другая группа исследователей использовала качестве экспериментального объекта микросомальные цитохромы Р450, В играющие важную роль в процессах стероидогенеза, а именно транкированный и полноразмерный СҮР17А1, транкированные СҮР19 и СҮР21 [223]. Было адренодоксин способен способствовать обнаружено, ЧТО каталитической активности этих моноокигеназ, при этом профиль получаемых продуктов реакции совпадал с таковым при донировании электронов CPR. Более того, активность протекания реакций, катализируемых СҮР17 и СҮР21, в системе trP450-AdX-AdR существенно превышала активность в системе trP450-CPR. Однако активность СҮР19 в системе trP450-AdX-AdR была существенно ниже. Вероятно это связано с особенностями его структуры и отсутствием необходимых для взаимодействия с AdX положительно заряженных аминокислотных остатков, наличие которых критически важно для взаимодействия AdX с микросомальными P450 [148].

1.4.3 Взаимодействие адренодоксина с микросомальными Р450

В данной работе было обнаружено, что адренодоксин способен к образованию комплексов со множеством микросомальных Р450 (включая СҮРЗА4, СҮРЗА5, СҮР51А1, СҮР1В1, СҮР17А1), за исключением СҮР2С9. Неспособность СҮР2С9 взаимодействовать с адренодоксином, скорее всего, заложена в его первичной структуре. Следует отметить, что цитохром СҮР17А1, продемонстрировавший значительное увеличение активности при получении электронов от адренодоксина, характеризуется наибольшем сродством к AdX среди всех микросомальных Р450, исследованных в данной работе. Со всеми микросомальными Р450 адренодоксин взаимодействовал за счёт изменения энтропии, тогда как комплексы AdX-митохондриальный Р450 образовывались за счёт согласованных и синэргичных изменений и энтропии, и энтальпии. Факт

образования белок-белковых комплексов упомянутых выше цитохромов Р450 остро нуждается в дополнении экспериментальными данными о каталитической активности этих Р450 в присутствии адренодоксина. Одноко стоит отметить, что физиологическая роль таких взаимодействий не совсем понятна. Известно, что делеция гена CPR летальна. Однако, если по каким-то причинам нарушается синтез или фолдинг Р450-тканях печени, то животные с такой патологией могут жить. Цитохром b5 может обеспечить лишь второй электрон для большинства Р450, чего неостаточно для катализа. Вероятно есть какой-то механизм получения электронов «в обход» редуктазы, вполне вероятно, что в такой ситуаци донором адренодоксин. Однако, может выступать способность адренодоксина взаимодействовать с микросомальными Р450 в первую очередь важна для фундаментальных исследований, направленных на понимание функционирования электрон-транспортных белок-белковых комплексов, эволюционной и видовой консервативности системы цитохромов Р450.

В итоге можно сказать, что система митохондриальных цитохромов Р450 в целом менее изучена, по сравнению с микросомальной монооксигеназной системой. Это касается как структуры, так и межмолекулярных взаимодйствий белков-партнёров. Экспериментальные данные 0 прямых изменениях кинетических и равновесных параметров белок-белковых комплексов, не говоря уже о термодинамических параметрах, крайне редки. При том, что роль белокбелковых взаимодействий в процессе переноса электронов и функционировании монооксигеназных Р450-зависимых систем так же трудно переоценить, как и важность митохондриальной системы цитохромов Р450 для процессов биосинтеза стероидных гормонов. Экспериментальные данные по изучению белок-белковых взаимодействий в микросомальной монооксигеназной системе не так скудны, но тем не менее так же недостаточны для каких-либо обобщений и системного понимания.

1.5 Бактериальная ферментная система цитохрома Р450.

1.5.1 История изучения бактериальных цитохромов Р450

После обнаружения и описания ферментной системы растворимого цитохрома, окисляющего камфору, Pseudomonas putida в 1968 году [9], подобные системы растворимых Р450 были найдены и охарактеризованы в некоторых других бактериях [224-228]. Это система растворимых ферментов, состоящая из P450, И NADH-ферредоксин цитохрома ферредоксина редуктазы. Эта трёхкомпонентная система похожа на ферментную систему цитохромов из митохондрий животных, но бактериальная система использует NADH в качестве донора электронов для монооксигеназной реакции, в то время как система цитохрома Р450 как в микросомах, так и в митохондриях животных эту роль играет NADPH. Недавно новый цитохром P450 был обнаружен в Citrobacter braakii. Когда C. braakii используют цинеол как источник углерода и энергии, они экспрессируют цитохром P450cin (cineole) (СҮР176) [229], который получает электроны для реакции гидроксилирования цинеола от циндоксина, FMNсодержащего флафопротеина, а не от ферродоксина [230].

Первоначально считалось, что бактериальные цитохромы специализируются на метаболизме поступающих из вне субстратов (в случае *Pseudomonas putida* это камфора), для последующего использования этих субстратов в качестве источников энергии и углерода. Предполагали, что бактериальные цитохромы P450 кодируются в плазмидах. Так некоторые виды бактерий, включая грамотрицательную палочку *Escherichia coli*, оказались лишенными цитохрома P450, распространённость его ожидалась весьма ограниченной. Однако, более поздние исследования показали наличие множества цитохромов P450, кодируемых хромосомой, во многих видах бактерий; 20 генов P450 у *Mycobacterium tuberculosis* [231], девять генов у *Bacillus subtilis* [232], 18 генов у *Streptomyces versicolor* [233], и так далее. По-видимому, P450 более широко распространён у бактерий, чем считали ранее.

Р450 так же были найдены у некоторых архей [234, 235]. Цитохромы Р450

растворены в цитоплазме, и преимущественно архей так же являются термостабильными белками [236]. Ферментная система P450 Sulfolobus sulfataricus использует пируват В качестве донора электронов. Эта трёхкомпонентная система состоит из цитохрома Р450 (СҮР 119), ферредоксина и 2-оксо-ферредоксин оксидоредуктазы [237]. Это исключительный случай, так как обычно в системе P450 используются NADH или NADPH в качестве донора электронов.

1.5.2 Функции бактериальных цитохромов Р450

Высяснение физиологических функций цитохромов, обнаруженных при анализе бактериальных геномов, оказалось трудной задачей. Из двадцати генов М. *tuberculosis*, только один кодирует цитохром P450, подобный эукариотическому СҮР51А1 [237], который отвечает за катализ реакции 14а-деметилирования ланостерола у животных и 14α-деметилирования обтусифолиола у растений. СҮР51-подобный ген *M. tuberculosis* был экспрессирован в *E. coli* и проявил способность катализировать 14α-деметилирование ланостерола и обтусифолиола [238]. Однако, стеролы не были найдены в числе липидных компонентов клеток M. Tuberculosis. Функция этого цитохрома пока остаётся неизвестной. У Streptomyces versicolor так же был найден СҮР51-подобный ген, но его роль в жизнедеятельности оказалась не существенна и стеролы не обнаружены в клетках этой бактерии [239]. Цитохром P450 Rhizobium был первым бактериальным цитохромом, обнаруженным в 1967 году [8], а генетическое древо Р450 (СҮР112, СҮР114, СҮР117) было идентифицировано в 1998 году [240], ферментная физиологические функции P450 активность И цитохромов остаются Экспериментальное нарушение неизвестными. генов этих цитохромов подтверждает, что они не нужны для симбиоза и формирования корневых клубеньков [241].

Бактериальные Р450 растворимы в цитоплазме и их молекулярный размер примерно 400 аминокислотных остатков, существенно меньше, чем у

микросомальных и митохондриальных мембранных цитохромов. Сравнение аминокислотных последовательностей бактериальных и эукариотических цитохромов P450 подтверждает то, что они произошли от одного общего предка. Растворимость бактериальных P450 обусловлена отсутствием гидрофобной Nконцевой последовательности, характерной для P450 эукариот. Бактериальные клетки не имеют таких мощных внутриклеточных мембранных структур, как ЭПР эукариот. Слабая представленность внутриклеточных мембран, по-видимому, коррелирует с растворимостью бактериальных цитохромов P450.

1.6 Эволюция и разнообразие ферментных систем цитохрома Р450.

Сравнение аминокислотных последовательностей цитохромов Р450 эукариот и прокариот приводит к выводу, что суперсемейство генов Р450 возникли и дивергировали от одного предкового гена. Анализ геномов различных организмов позволил построить филогенетическое дерево эукариотических цитохромов Р450. Разнообразие функций системы Р450 и физиологических условий, возникшее в ходи эволюции, отражается и в разнообразии редокспартнёров цитохромов Р450. На рис. 1 представлены наиболее распространённые варианты структуры редокс-партнёров и их кофакторов.



Рис. 1. Биологическое разнообразие редокс-системы цитохрома Р450 [242]. Ферменты-монооксигеназы системы цитохрома Р450 получают электроны от ряда редокс-партнёров (показаны разнообразных примеры). Спирали И слои представлены в виде нитей и лент на каждом изображении. Кофакторы показаны в виде фигур из сфер. А - СҮР121 Р450 из М. tuberculosis. Гем в середине молекулы. В — СРК крысы. ФАД (левее) и ФМН расположены очень близко, что важно для переноса электрона. С — редуктаза фталат диоксигеназы из Pseudomonas cepacia, заметны кофакторы - FMN (выше) и железосерный кластер [2Fe2S]. D и E адренодоксин редуктаза и адренодоксин быка соответственно. Адренодоксин редуктаза содержит FAD, в то время как адренодоксин — железосерный кластер [2Fe2S]. F — флаводоксин из Е. coli, кофактор — ФМН, расположенный на поверхности глобулы.

Данные в целом подтверждают мнение, что СҮР51, который катализирует 14α-деметилирование предшественника стеролов, является самой древней формой у эукариотических организмов [243]. Так как стеролы являются необходимым

56

компонентом клеточной мембраны животных, грибов и растений, исходная форма цитохрома так же стара, как эукариотические организмы в истории жизни на Земле, и, вероятно, микросомальная система старейшая из всех систем цитохрома P450 у эукариот. Наличие различных внутриклеточных мембран, в том числе ЭПР, где и располагается микросомальная система цитохрома P450, является характерной особенностью клеток эукариот.

Некоторые цитохромы Р450 представлены в митохондриях клеток животных. Они представляют собой уникальную ветвь филогенетического дерева цитохромов Р450 животных и катализируют оксигеназные реакции с участием холестерола, стероидов и витамина D [137]. Так как P450 не были найдены в митохондриях растений и грибов, по видимому, цитохромы Р450 появились в митохондриях после того, как ветвь животных отделилась от растений, а позже и ветви грибов в ходе эволюции эукариот. Перемещение Р450 из ЭПР в митохондрии, скорее всего, произошла из-за мутации (или мутаций) в сигнальном пептиде, отвечающем за сортинг. Р450, импортированные в митохондрии, нашли электронов, адренодоксин, обеспечения подходящего донора лля функционирования в новом клеточном компартменте, а затем произошла дивергенция на несколько видов митохондриальных цитохромов в ходе эволюции животных. Адренодоксин и адренодоксин редуктаза так же представлены в дрожжах [244, 245] и был обнаружен синтез железосерных кластеров в митохондриях [246], которые являются обязательной простетической группой некоторых ферментов, включая некоторые компоненты дыхательной цепи митохондрий. Похоже, что древние эукариотические организмы приобрели гены адренодоксина и его редуктазы от прокариотических симбионтов, которые впоследствии стали митохондриями.

Эволюционное родство между цитохромами Р450 прокариот и эукариот не ясно. Был ли некий предок генов Р450 у прокариот до появления эукариот — пока открытый вопрос. Высокая частота мутаций в генах бактерий и вероятность горизонтального переноса генов из эукариотических в прокариотические

организмы делают этот вопрос трудным для анализа. Р450 ВМ-3, вероятно, мог произойти от предшественника у эукариот [247, 248]. В случае СҮР51 в одной статье предполагают [249], что это изначально прокариотический белок, в другой статье обсуждается вероятность переноса гена от некоторых эукариотических организмов, в частности растений [250].

Предковый ген Р450 развивался путём дупликаций и мутаций, это развитие привело к возникновению множества генов, кодирующих разные молекулярные виды цитохромов P450, в то время как их партнёр, NADPH-P450 редуктаза, кодируется одним геном у животных [251]. Грибы и растения, вероятно, имеют два гена, кодирующих NADPH-P450 редуктазу [252, 253]. Редуктаза, видимо, представляет собой продукт слияния двух белков, FAD- и FMN-содержащего [254]. Аминокислотная последовательность [254, 255] и кристаллографические структуры NADPH-P450 редуктазы крысы [256] и человека [36] говорит о том, что данный белок в ходе эволюции образовался при слиянии двух предковых генов, которые кодировали белки, аналогичные ФМН-содержащему флаводоксину (Fld) ферредоксин-НАДФ ФАД-содержащей оксидоредуктазе (FNR) [254]. И Аминокислотная последовательность Fld соответствует позицияс от 77 до 228 NADPH-P450 Последовательность, аминокислоты редуктазы крысы. гомологичная FNR, соответствует аминокислотным остаткам от 267 до 325 и от 450 до 678. Примерно 55 первых аминокислот формируют якорный участок, с помощью которого молекула NADPH-P450 редуктазы держится в мембране эндоплазматического реликулюма. Аминокислотные остатки, образующие гибкие перекрываются с FNR-подобным соединительный домен (CD)доменом (аминокислотные остатки от 244 до 266 и от 326 до 450 в поседовательности NADPH-P450 редуктазы крысы). Гибкий соединительный домен, образованый множеством спиралей, прочно соединён с FNR-подобным доменом. Вместе они формируют ФАД-домен. ФАД- и ФМН-домены соединены гибким шарниромБ который соответствует 12-и аминокислотным остаткам от Gly-232 до Arg-243 (по сиквиенсу NADPH-P450 редуктазы крысы) и расположен между F-спиралью

ФМН-домена и бета-слоем 6 CD-домена [34-36]. Редуктаза поставляет электроны не только цитохромам P450, но так же и некоторым другим микросомальным ферментам, гем-оксигеназе, сквален-оксигеназе, и т.д., и важна для эмбрионального развития и жизнидеятельности животных, так как делеция гена, кодирующего NADPH-P450 редуктазу, летальна для мышей [251]. Эволюционное происхождение NADPH-P450 редуктазы так же интересный вопрос, который предстоит уточнить.

Исходя из этих данных, представляется интересным провести массовый оптико-биосенсорный анализ взаимодействий компонентов ферментной системы цитохрома P450. а так подтверждение межвидовой же эволюционной консервативности участков молекул, отвечающих межмолекулярные за взаимодействия в системе цитохрома Р450, что и было выполнено на примере наиболее значимых микросомальных и митохондриальных цитохромов P450 из разных видов организмов (CYP3A4hum, CYP3A5hum, CYP51A1hum, CYP51A1calb. CYP2C9hum. CYP1B1hum, CYP17A1eq, CYP11A1bov, СҮР11В1hum, СҮР11В2hum), цитохром Р450 редуктазы крысы (CPRrat) и цитохромов b5 (СҮВ5А, СҮВ5В) крысы и человека. Измерения кинетических и равновеснх констант белок-белковых комплексов производили на оптическом SPR-биосенсоре Biacore 3000. Далее подробно рассмотрим явление SPR(ППР) и принцип работы оптического биосенсора.

1.7 Memod SPR (Surface Plasmon Resonance)

1.7.1 Описание подходов для изучения белок-белковых комплексов

В целом подходы для исследования белок-белковых взаимодействий можно разделить на биоинформационные и экспериментальные.

Биоинформационные методы можно разделить на пять категорий: основанные на геномной информации, эволюционных отношениях, трёхмерной структуре белка,

59

белковых доменах и первичной структуре белка.

В последнее время в белковой интерактомике все большее распространение получают экспериментальные подходы, что привело к быстрому росту объема фактических данных о белок-белковых взаимодействиях и соответственно начало тормозить развитие вычислительных (биоинформационных) подходов. Однако последние не утрачивают своего значения, так как являются дополняющими к экспериментальным подходам и обеспечивают системный анализ экспериментальных данных, а также предсказание новых белок-белковых взаимодействий и планирование новых экспериментальных исследований для их обнаружения [257].

Экспериментальные методы можно разделить на геномные (дрожжевая дигибридная система, синтетические генетические матрицы, корреляционный профиль экспрессии мРНК), биохимические (на основе твёрдофазной аффинной хроматографии, коиммунопреципитация, афинная хроматография белков со специфической меткой, тандемная аффинная очистка, молекулярный фишинг на чипе оптического биосенсора) [257].

Следует отметить, что крупным недостатком метода с использванием дрожжевых дигибридных систем является большое количество ложноотрицательных и ложноположительных результатов.

Важным подходом для изучения взаимодействия биомолекул в режиме реального времени является метод поверхностного плазмонного резонанса (ППР, SPR). Один из партнёров взаимодействия иммобилизован на подложке (в терминологии исследований с применением биосенсоров — лиганд), второй — находится в растворе, протекающим над этой поверхностью (аналит).

1.7.2 Описание явления SPR

SPR — это физический процесс, который происходит, когда плоскополяризованный свет попадает на металлическую плёнку при условии полного внутреннего отражения [258].

60

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) - это квантовое оптикоэлектрическое явление, возникающее при взаимодействии света с поверхностью металла. При определенных условиях энергия световых фотонов передается группе электронов, называемых плазмонами, на поверхности металлов. Передача энергии происходит только на специфической, резонансной длине волны света. То есть длине волны, где квант энергии, переносимый фотоном, точно равен уровню квантовой энергии плазмонов.

а) Полное внутреннее отражение



б) Поверхностный плазмонный резонанс



Рис. 2. Принцип полного внутреннего отражения и возникновение

поверхностного плазмонного резонанса.

Поверхностный плазмонный резонанс основан на одном из основных принципов оптики – принципе полного внутреннего отражения (рис. 2a). На границе раздела двух фаз с различными коэффициентами преломления, η1 и η2, полное отражение происходит при значениях угла падения больше критического

угла θ, когда η1 > η2. Одновременно с этим от границы раздела фаз в фазу 2 распространяется затухающая электромагнитная волна.

Поверхностный плазмонный резонанс возникает, когда на поверхности раздела фаз между двумя оптическими средами помещена тонкая проводящая пленка. При особом угле падения, большем, чем угол полного внутреннего отражения, поверхностные плазмоны в проводящей пленке (осциллирующие на поверхности металла электроны) входят в резонанс со светом из-за совпадения частот. Так как при этом резонансе поглощается энергия, то интенсивность отраженного света показывает спад при угле, на котором возникает ППР (рис. 2б).

Резонансную длину волны можно определить с большой точностью измерением интенсивности света, отраженного металлической поверхностью. На большинстве длин волн металл работает как зеркало, отражая практически весь падающий свет. На удовлетворяющей резонансным условиям длине волны падающий свет почти полностью поглощается, соответственно, длина волны, на которой происходит максимальное поглощение света, и есть резонансная длина волны.

1.7.3 Описание принципа детекции межмолекулярных взаимодействий оптическими биосенсорами на эффекте SPR

Взаимодействие света с поверхностью металла приводит к возникновению плазмона, группы возбужденных электронов, которые проявляют себя как единый электрический объект. Плазмон, в свою очередь, генерирует электрическое поле, которое распространяется приблизительно на 100 нанометров над металлической поверхностью. Особенность этого явления, которая делает ППР аналитическим инструментом, такова, что любое изменение химического состава среды в области действия поля плазмона, приводя к изменению коэффициента преломления среды, вызывает изменение резонансной длины волны света. Т.е., химическое изменение выражается в сдвиге длины волны света, который в большей степени поглощается, чем отражается, и величина сдвига количественно связана с величиной химического изменения. Резонансная длина волны ППР определяется

тремя факторами: металлом, структурой поверхности металла и природой среды, контактирующей с поверхностью металла.

Явление ППР не является специфичным. Оно не может делать различия между разными химическими изменениями. Хотя это может казаться ограничением, на самом деле это является огромным преимуществом. Специфичность зависит от выбора пары молекул, которые реагируют только друг с другом. Из этой пары одна молекула является детектором, а другая - анализируемым объектом. Любая пара молекул, которая обладает специфической связью, может быть использована для ППР измерений. Такими парами могут быть антиген и антитело, комплементарно сопряженные нити ДНК, фермент и его субстрат или комплексообразователь и ион металла.

ППР можно использовать как основу для сенсора, обладающего способностью качественного и количественного определения широкого спектра химических и биологических объектов. Для анализа взаимодействия между двумя объектами на первой стадии происходит иммобилизация одного из объектов на поверхность чипа, далее через канал сенсора прокачивают раствор со вторым объектом. При этом взаимодействие регистрируется по изменению резонансного угла.

Метод ППР обладает рядом важных практических преимуществ по сравнению с существующими аналитическими методами. Например, при использовании флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС), необходимо образовать вещества С флуорофором. При использовании комплексы исследуемого изотермической калориметрии титрования, также как и в ФКС, невозможно провести с одной пробой макромолекулы анализ взаимодействия с другим соединением, поскольку измерения проводятся в растворе путём однократного добавления различных концентраций лиганда, а не в проточной системе, позволяющей удалить весь анализируемый образец лиганда. Также при использовании этих методов наблюдается значительный расход материалов по сравнению с приборами, работающими на технологии ППР. Ещё одним важным преимуществом ППР является регистрация в реальном времени, путём возможности записи сенсограммы взаимодействия, в то время как другие методики позволяют получить набор данных в виде дискретных измерений. При использовании ППР время от нанесения пробы до получения результата зависит от конкретного объекта, но может занимать до 5 минут. В большинстве случаев нет необходимости в предварительной подготовке образца для его использования в качестве сенсора. Некоторые потенциальные области применения включают медицинскую диагностику, мониторинг окружающей среды, мониторинг сельскохозяйственных пестицидов и антибиотиков, анализ пищевых добавок, контроль за биологическими и химическими агентами военного и промышленного происхождения, а также мониторинг процессов химического и биологического производства в реальном времени.

Регистрацию в реальном времени процессов белок-белковых взаимодействий с помощью оптического биосенсора Biacore 3000 (GE Healthcare, CIIIA), работающего технологии поверхностного плазмонного резонанса, на выполполняют следующим образом. В микрожидкостную систему биосенсора инжектируют раствор белка через два канала оптического чипа (один – контрольный, В котором отсутствует исследуемый белок. второй c иммобилизированным методом ковалентной пришивки за аминогруппы К декстрановой поверхности оптического чипа цитохромом). Иммобилизованную на оптическом чипе молекулу обычно обозначают как «лиганд», а молекулы в инжектируемом растворе - «аналит». Далее будут применяться именно эти термины. На рис. 3 представлена типичная сенсограмма взаимодействия аналита с лигандом.

64



Рис. 3. Типичная сенсограмма взаимодействия, получаемая при работе на оптическом биосенсоре типа Biacore 3000 или T200.

Расчёт равновесных констант диссоциации комплексов белков-партнёров с помощью программного пакета BIAevaluation 4.1 (General Electric, США) после получения набора сенсограмм взаимодействия иммобилизованного белка с серией растворов различных концентраций белка-партнёра.

При введении образца кинетический процесс образования и разрушения комплекса «белок – лиганд» может быть описан следующей схемой:

Белок + Лиганд
$$\underset{k_d}{\overset{k_a}{\Leftrightarrow}}$$
 Белок * Лиганд _

где ka и kd – константы скорости образования и разрушения комплекса белка с лигандом, соответственно.

Скорость образования комплекса «белок – лиганд» («лиганд-аналит») описывается следующим выражением:

65

$$\frac{d(Белок \cdot Лиганд)}{dt} = k_a [Белок] [Лиганд] - k_d [Белок] [Лиганд]$$

где [Белок], [Лиганд] и [Белок[•]Лиганд] – концентрации иммобилизованного белка, лиганда в растворе и их комплекса, соответственно. Учитывая то, что один из компонентов (белок) иммобилизован на поверхности чипа, это выражение можно переписать следующим образом:

(1)
$$\frac{d(R)}{dt} = k_a (R_{max} - R) \cdot C - k_d R = k_a R_{max} \cdot C - R(k_a \cdot C + k_d)$$

где R – сигнал биосенсора, Rmax – приращение сигнала при насыщении мест связывания иммобилизованного белка лигандом из раствора, С – концентрация лиганда. В условиях, когда раствор лиганда постоянно протекает через канал с иммобилизованным белком, концентрация лиганда практически не меняется со временем и межмолекулярные взаимодействия можно рассматривать как реакцию псевдопервого порядка.

Расчёт термодинамических параметров взаимодействий белков-партнёров с использованием описанных ранее подходов после получения наборов сенсограмм взаимодействия иммобилизованного белка с серией растворов различных концентраций белка-партнёра при различных температурах [259]. Подробнее способ рассчёта термодинамических параметров описан в разделе «Материалы и методы».

Глава 2. Материалы и методы

2.1 Оборудование

1) Оптический биосенсор на технологии оптического плазмонного резонанса

Biacore 3000 (General Electric Helthcare Bio-Science AB, CIIIA)

2) Вакуумная система LABOXACT (KNF, Южная Корея)

3) Вакуумная фильтровальная система (Sartorius, Германия)

2.2 Материалы

1) HBS-EP⁺ буфер (150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА, 0,05% P20, 10 мМ HEPES, pH

7.4), GE Helthcare Bio-Science AB, CIIIA.

2) HBS-N буфер (150 мМ NaCl, 10 мМ HEPES, pH 7,4), GE Helthcare Bio-Science AB, США.

3) HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 99%, ACROS ORGANICS, CIIIA.

4) Малеиновая кислота, 99%, ACROS ORGANICS, США.

5) Натрий хлористый, NaCl, XЧ, Реахим, Россия.

6) CHAPS, 3-[(3-хлорамидопропил)диметиламмонио]-1-пропансульфонат, 99%, AppliChem, США.

7) NHS (N-Hydroxysuccinimide, 1-hydroxypyrrolidine-2,5-dione), GE Helthcare Bio-Science AB, CIIIA.

8) EDC, (1-ethyl-3-(3-dimethylaминopropyl)carbodiimide hydrochloride), GE Helthcare Bio-Science AB, США.

9) Этаноламин (2-Амино-1-Ethanol), 1.0 M ethanolaмине-HCl pH 8,5, GE Helthcare Bio-Science AB, США.

10) BIAnormalizing solution (раствор глицерина, 70% по объёму), GE Helthcare Bio-Science AB, США.

11) Biadesorb solution 1 (SDS, додецил сульфат натрия, 0,5%), GE Helthcare Bio-

Science AB, CША.

12) Biadesorb solution 2 (50 мМ глицин, pH 9,5), GE Helthcare Bio-Science AB, CША.

13) Набор ацетатных буферов для pH-скаутинга (10 мМ ацетат натрия, pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5) GE Helthcare Bio-Science AB, США.

14) Рекомбинантный адренодоксин, AdX
[*Homo sapiens*] GENE ID: 2230FDX1(Адренодоксин человека, чистота по данным SDS-электрофореза более 90%, концентрация – 789 мкМ в буфере, содержащем 0,5 M NaCl, 20% глицерина, 0,2% PSMF, 10 мМ фосфат калия, pH 7,4)

15) Рекомбинантная НАДФН — цитохром P450 редуктаза (P450R, CPR) [*Rattus norvegicus*] Gene ID: 29441 CPR

(НАДФН — цитохром Р450 редуктаза крысы, чистота по данным SDSэлектрофореза более 95%, концентрация - 178 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина, 0,5 мМ EDTA, 250 мМ фосфата калия, pH 7,2)

16) Рекомбинантный цитохром B5 тип A микросомальный (Cyb5a) [*Rattus norvegicus, Homo sapiens*] Gene ID: 64001 CYB5A.

(Цитохром b5 тип A крысы или человека, чистота более 95% по данным SDSэлектрофореза, концентрация - 239 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина, 0,2% холата натрия, 400 мМ фосфата калия, pH 7,4)

17) Рекомбинантный цитохром В5 тип В внешней мембраны митохондрий (Cyb5b, Cyb5m, Omb5)

[Rattus norvegicus, Homo sapiens] Gene ID: 80773 CYB5B

(Цитохром b5 тип В крысы или человека, чистота по данным SDS-электрофореза более 95%, концентрация - 256 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина, 0,2% холата натрия, 400 мМ фосфата калия, pH 7,4)

18) Рекомбинантный цитохром Р450, семейство 1, подсемейство В, тип 1 [*Homo sapiens*] GENE ID: 1545 CYP1B1

(Цитохром Р450 человека СҮР 1В1, чистота по данным SDS-электрофореза более 95%, концентрация – 33,4 мкМ в буфере, содержащем 300 мМ NaCl, 20% глицерина и 0,2% CHAPS, 1 мМ DTT, 500 мМ фосфата калия, pH 7,4)

19) Рекомбинантный цитохром P450, семейство 2, подсемейство С, тип 9 [*Homo sapiens*] GENE ID: 1559 CYP2C9

(Цитохром P450 человека СҮР 2С9, чистота по данным SDS-электрофореза более 95%, концентрация – 223 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина и 0,3% CHAPS, 5 мМ меркаптоэтанола, 600 мМ фосфата калия, pH 7,4)

Рекомбинантный цитохром P450, семейство 17, подсемейство А, тип 1
 [*Equus caballus*] GENE ID: 100034232 CYP17A1

(Цитохром P450 лошади СҮР 17А1, чистота по данным SDS-электрофореза более 98%, концентрация – 100 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина и 0,2% em913, 0,1% DTT, 400 мМ фосфата калия, pH 7,4)

21) Рекомбинантный цитохром Р450, семейство 11, подсемейство А, тип 1 [*Bos taurus*] GENE ID: 338048 CYP11A1

(Цитохром Р450 быка СҮР 11А1, чистота по данным SDS-электрофореза более 95%, концентрация – 322,3 мкМ в буфере, содержащем 1 М NaCl, 20% глицерина и 0,3% холата натрия, 50 мМ фосфата калия, pH 7,4)

22) Рекомбинантный цитохром P450, семейство 11, подсемейство В, тип 1 [*Homo sapiens*] GENE ID: 1584 CYP11B1

(Цитохром P450 человека СҮР 11В1, чистота по данным SDS-электрофореза более 95%, концентрация – 35,2 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина, 0,5%

холата натрия, 50 мМ фосфата калия, рН 7,4)

23) Рекомбинантный цитохром P450, семейство 11, подсемейство В, тип 2 [*Homo sapiens*] GENE ID: 1585 CYP11B2

(Цитохром P450 человека СҮР 11В2, чистота по данным SDS-электрофореза более 98%, концентрация – 101 мкМ в буфере, содержащем 0,5 M NaCl, 20% глицерина, 0,5% CHAPS, 50 мМ фосфата калия, pH 7,4)

24) Рекомбинантный цитохром P450, семейство 51, подсемейство A, тип 1 [*Homo sapiens*] GENE ID: 1595 CYP51A1

(Цитохром Р450 человека СҮР 51А1, чистота по данным SDS-электрофореза более 95%, концентрация - 165 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина и 0,2% CHAPS, 1 мМ DTT, 300 мМ фосфата калия, pH 7,2)

25) Рекомбинантный цитохром P450, семейство 51, подсемейство A, тип 1 [*Candida albicans PI0613.2*] GENE ID: 3641571 ERG11

(Цитохром P450 *Candida albicans* CYP 51A1, чистота по данным SDSэлектрофореза более 95%, концентрация - 128 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина и 0,2% CHAPS, 0,1 мМ DTT, 600 мМ фосфата калия, pH 7,2)

26) Рекомбинантный цитохром P450, семейство 3, подсемейство A, тип 5 [*Homo sapiens*] Gene ID: 1577 CYP3A5.

(Цитохром Р450 человека СҮРЗА5, чистота по данным SDS-электрофореза более 95%, концентрация - 161 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина и 0,2% CHAPS, 1 мМ DTT, 550 мМ фосфата калия, pH 7,2)

27) Рекомбинантный цитохром P450, семейство 3, подсемейство A, тип4 [*Homo sapiens*] Gene ID: 1576 CYP3A4

(Цитохром P450 человека СҮРЗА4, чистота по данным SDS-электрофореза более

95%, концентрация - 165 мкМ в буфере, содержащем 20% глицерина, 0,2% СНАРЅ, 1 мМ DTT, 550 мМ фосфата калия, pH 7,2)

Препараты белка $N \ge N \ge 14-27$ были любезно предоставлены сотрудниками Института биоорганической Химии Национальной Академии Наук республики Беларусь под руководством профессора Усанова С.А. в рамках договора о научнотехническом сотрудничестве. Препараты, представляющие собой продукт гетерологической экспрессии целевого белка в *E. coli*, были разделены на аликвоты по 5 мкл, заморожены в жидком азоте и хранились при температуре - 40° C.

Методы получения высокоочищенных (>95% по SDS-PAGE) и функционально активных препаратов рекомбинантных цитохромов P450 (СҮР) описаны для СҮРЗА4 и СҮРЗА5 в [260], СҮР17А1 -[261], СҮР51А1 -[262], СҮР11А1 -[263], СҮР11В1 и СҮР11В2 -[264], СҮР2С9 -[265]. Препараты двух изоформ СҮВ5 (СҮВА и СҮВ5В) были получены по методике, описанной в [266].

2.3 Регистрация белок-белковых взаимодействий с помощью оптического биосенсора на технологии оптического плазмонного резонанса

Анализ взаимодействий был произведён с помощью оптического биосенсора на эффекте SPR Biacore 3000 с использованием research-grade CM5 (GE Helthcare Bio-Science AB, CША). На поверхности чипа в разных каналах посредством карбодиимидной реакции были ковалентно иммобилизованы цитохромы P450 CYP51A1, CYP3A5, CYP3A4 и белки-партнёры цитохромов P450, такие как CPR, AdX, CYB5A, CYB5B. Запись сенсограмм и все стандартные процедуры производили с помощью программы Biacore 3000 Control Software v.4.1.2 (GE Helthcare Bio-Science AB, CША).

2.3.1 Подготовка прибора

Для предварительной очистки жидкостной системы был использован стандартный метод "Desorb", предусмотренный разработчиком программного обеспечения прибора. После процедуры докирования технологического чипа несколько раз выполнялась стандартная промывка растворами Biadesorb 1 и 2, затем два часа промывка HBS-N или HBS-EP⁺ буфером.

2.3.2 Подготовка буфера

Однократный HBS-N или HBS-EP⁺ буфер готовили добавляя 225 мл дистилированной воды к 25 мл 10х HBS-N или HBS-EP⁺ концентрата. Полученный буфер был дегазирован и профильтрован через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

2.3.3 Подбор иммобилизационного буфера

Для определения оптимальных условий иммобилизации белка на СМ-5 чипе, обусловливающих максимальную количественную пришивку белка, провели исследование зависимости уровня электростатического концентрирования белка у поверхности оптического чипа от рН среды, В которой производится (процедуру рН-скаутинга). В качестве иммобилизация рабочего буфера использовали HBS-N буфер (0,15 M NaCl, 0,01 M HEPES, pH 7,4). Были приготовлены пробы белков (СҮР51А1, СҮР3А5, СҮРЗА4, СРR, AdX, СҮВ5А, СҮВ5В) концентрацией 15 мкг/мл в ацетатном буфере (10 мМ ацетат натрия, рН 4,0, 4,5, 5,0, 5,5), 5 мМ малеатном буфере (pH 6,6), 10 мМ HEPES-буфере (pH 7,4). Инжекции проводились в течении 10 минут на скорости 5 мкл/мин. Удаление не специфически адсорбированного белка производили инжекцией раствора 25 мМ NaOH на скорости 50 мкл/мин в течение 60 с.
2.3.4 Иммобилизация лигандов на чипе СМ-5

Иммобилизацию производили на СМ5 чип с карбоксиметилдекстраном. Для иммобилизации использовали в качестве рабочего буфера HBS-N (0,15 M NaCl, 0,01 М HEPES, pH 7,4). Процедуру проводили при 25°С, включив в проточную систему прибора только один канал чипа, на котором проводилась иммобилизация. Иммобилизацию белка, посредством карбодиимидной реакции за производили следующим образом. Выполняли аминогруппы, активацию карбоксильных групп декстрана поверхности чипа инжекцией смеси растворов EDC (0,4 M) и NHS (0,1 M) в объёмном соотношении 1:1 в течении 7 минут на скорости потока 5 мкл/мин. Пробу белка с концентрацией 15 мкг/мл пропускали по чипу в течении 10 минут на скорости 2 мкл/мин. Для увеличения количества иммобилизованного белка пробу разводили до конечной концентрации буфером с рН 7,4 (10 мМ HEPES) для СҮР 51А1 и СҮРЗА5, рН 6,6 (5 мМ малеат) для СҮРЗА4, pH 5,0 (10 мМ ацетат натрия) для CPR, pH 4,5 (10 мМ ацетат натрия) для AdX, СУВ5А и СУВ5В. После инжекции белка не прореагировавшие активированные карбоксильные группы декстрана дезактивировали инжекцией раствора этаноламина-HCl (1,0 M) в течении 3 минут на скорости 5 мкл/мин. Количество белка (белок-лиганд), ковалентно иммобилизованного посредством карбодиимидной на карбоксиметилированном декстране реакции чипа составляло в среднем 3000-8000 RU (resonance units), что эквивалентно 5-8 нг белка/мм2, или 50-140 фмоль цитохрома Р450, 60-100 фмоль CPR, 250-400 фмоль AdX, 300-500 фмоль цитохрома b5 на мм² поверхности чипа. Ниже, на рис. 4-10 представлены типичные сенсограммы процедуры иммобилизации с обозначением основных этапов.



Рис. 4. Типичная сенсограмма иммобилизации СҮР51А1. Стрелками указаны моменты инжекции активирующей смеси EDC/NHS, белка, этаноламина.



Рис. 5. Типичная сенсограмма иммобилизации СҮРЗА4. Стрелками указаны моменты инжекции активирующей смеси EDC/NHS, белка, этаноламина.



Рис. 6. Типичная сенсограмма иммобилизации СҮРЗА5. Стрелками указаны моменты инжекции активирующей смеси EDC/NHS, белка, этаноламина.



Рис. 7. Типичная сенсограмма иммобилизации AdX. Стрелками указаны моменты инжекции активирующей смеси EDC/NHS, белка, этаноламина.



Рис. 8. Типичная сенсограмма иммобилизации СРВ. Стрелками указаны моменты инжекции активирующей смеси EDC/NHS, белка, этаноламина.



Рис. 9. Типичная сенсограмма иммобилизации СҮВ5А. Стрелками указаны моменты инжекции активирующей смеси EDC/NHS, белка, этаноламина.



Рис. 10. Типичная сенсограмма иммобилизации СҮВ5В. Стрелками указаны моменты инжекции активирующей смеси EDC/NHS, белка, этаноламина.

После иммобилизации белка была произведена стандартная процедура "Prime", предусмотренная разработчиками программного обеспечения прибора. Эта процедура представляет собой пятикратную промывку жидкостной системы биосенсора рабочим буфером HBS-EP+.

2.3.5 Подготовка аналита

В качестве аналитов были использованы рекомбинантные препараты СРR крысы, СҮВ5 тип A и B человека и крысы, AdX человека, СҮР51A1 C.alb., СҮР11A1 быка, СҮР17A1 лошади и СҮР2С9, 1B1, 51A1, 3A4, 3A5, 11B1, 11B2 человека. Непосредственно перед инжекцией образцы разбавляли до требуемых концентраций добавлением стандартного HBS-EP+. Использовали следующие концентрации:

- CPR rat 0,2; 0,5; 2,0; 5,2; 10,4 мкМ
- СҮВ5А rat 2,0; 3,4; 5,1; 8,5; 10,2 мкМ
- CYB5B rat 2,1; 3,7; 5,1; 7,4; 10,3 мкМ

- CYB5B human 7,4; 10,1; 12,2; 14,8; 19,8 мкМ
- AdX human 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 мкМ
- CYP1B1 human 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 мкМ
- CYP2C9 human 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5 мкМ
- CYP11A1 bovine 0,001; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 мкМ
- CYP11B1 human 0,001; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 мкМ
- CYP11B2 human 0,001; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 мкМ
- CYP3A4 human 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5; 5,0 мкМ
- CYP3A5 human 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 2,5; 5,0 мкМ
- CYP51A1 human 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 мкМ
- CYP51A1C.alb 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 мкМ
- CYP17A1equine 0,1; 0,3; 0,75; 1,5; 3,5 мкМ

2.3.6 Анализ взаимодействий

В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP+ (150 мМ NaCl, 0,05% P20, 10 мМ HEPES, pH 7,4). Регистрацию взаимодействий производили в диапазоне температур от 10 до 40°C, с шагом 5°C. После стабилизации необходимого значения температуры выполняли стандартную процедуру «Normalise» для калибровки оптической системы, которая заключается в инжекции 70% раствора глицерина (BIAnormalizing) в жидкостную систему биосенсора. Для контроля был использован первый канал, не содержащий иммобилизованного белка. Инжекции белка-аналита производили при скорости потока 5 мкл/мин. Длительность инжекции выбирали в зависимости от аналита и лиганда: для CYB5-CYP время контакта составляло 300 с, для CYP-CYB5 от 300 до 450 с, для CPR-CYP и CYP-CPR 450-600 с, для CYP-AdX от 300 до 450 с.

Фаза диссоциации регистрировалась 300-600 с (в зависимости от длительности инжекции), затем производили регенерацию. Для регенерации использовали регенерационный буфер 1M NaCl, 0,05% P20, 0,2% CHAPS, 10 мМ HEPES, pH 7,4.

Регенерационный буфер инжектировали при скорости 55 мкл/мин в течение 50 с. После завершения инжекции регенерирующего раствора выжидали не менее 300 инжекцией следующей белка-аналита. контроля перед Для секунд белок-белковых неспецифических взаимодействий производили инжекции растворов альбумина и гемоглобина с конечной концентрацией 10 мкМ на скорости 5 мкл/мин в течение 600 с.

2.3.7 Обработка данных и анализ кинетики

Обработка данных и анализ кинетики были выполнены с помощью программы BIAevaluation v 4.1.1 (General Electric Helthcare Bio-Science AB, CША). Обработанные данные были фитированы с помощью алгоритма Левенберга-Марквардта глобально по простой модели (1:1 по Lanmuir).

2.4 Анализ термодинамических параметров взаимодействия цитохромов Р450 и иммобилизированных белков-партнёров.

При каждой температуре измерения (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40°С) были рассчитаны значения равновесной константы диссоциации. Наборы сенсограмм обрабатывали с помощью программного комплекса «BIAevaluation 4.1» (GE, США) и рассчитывали равновесные константы диссоциации (Kd) комплексов «цитохром Р450 — белок-партнёр». Температурная зависимость Kd белок-белковых комплексов позволяет построить графики Вант-Гоффа (уравнение 1) в координатах 1000/T – lnKd, где Kd – константа диссоциации белок-белковых комплексов, T — абсолютная температура, ΔH – изменение энтальпии, ΔS – изменение энтропии, R – универсальная газовая постоянная Больцмана.

(1) $\ln Kd = (\Delta H/R)(1000/T) - (\Delta S/R)$

Разделив угловой коэффициент уравнения прямой вида y=ax+b (где a — угловой коэффициент, равный ΔH/R) аппроксимирующей график Вант-Гоффа (все

графики были линейными в диапазоне от 10 до 40°С, коэффициент корреляции $r^2 \ge 0,91$), на R, получали значение изменения равновесной энтальпии (Δ H). Аппроксимацию графиков Вант-Гоффа производили в программе Grapher 7.

Значение изменения энергии Гиббса (ΔG) получали из уравнения (2), где Kd – значение кажущейся равновесной константы диссоциации при 298°K. Из уравнения (3) получали значение -TΔS. Значение энтропийной компоненты так же можно получить из графика Вант-Гоффа, фиксируя участок, отсекаемый графиком по оси ординат. Однако, это гораздо менее точный метод, чем рассчёт по уравнению (3).

(2) $\Delta G = RT \ln K d$

$$(3) \Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

Получив набор значений Kd, ΔG, ΔH и -TΔS, производили статистическую обработку как описано в пункте "Методы статистической обработки".

2.5 Методы статистической обработки

2.5.1 Определение доверительного интервала для получаемых параметров взаимодействия

Определялось исправленное выборочное среднее квадратичное отклонение полученных величин, которое вычислялось по формуле:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x_e})^2 \cdot n_i}$$

где S – исправленное выборочное среднее квадратичное отклонение, n – количество повторов, x – значение величины, x – выборочное среднее:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i \cdot n_i$$

2.5.2 Фитинг

Фитинг кривой это процесс построения кривой или математической функции, которая имеет наилучшее соответствие серии точек данных, возможен при условии ограничения. Кривая фитинга может быть как интерполяцией, где требуется точное совпадение с данными, так и сглаживанием, где функция строится как аппроксимация фита к данным. Необходима оценка каждого приближения, метод наименьших квадратов является одним из подходящих для этой цели способов.

2.5.3 Алгоритм Левенберга-Марквардта

Метод оптимизации, направленный на решение задач о наименьших квадратах. Данный алгоритм предназначен для решения проблемы минимизации функции, применяется преимущественно для оценки нелинейных функций на пространстве параметров этой функции. Интерполяция по методу Левенберга-Марквардта сочетает в себе принципы алгоритма Гаусса-Ньютона и метода градиентного спуска. Данный алгоритм находит только локальный минимум функции, а не его глобальное значение.

2.5.4 Оценка качества фитирования

Фит (модель взаимодействия, построенная на основе экспериментальной сенсограммы) строился программой BIAevaluation 4.1 (General Electric Healthcare Bio-Science AB, США) с использованием алгоритма Левенберга-Марквардта. Качество фита оценивалось по трём параметрам, два из которых вычислялись программой BIAevaluation 4.1 (стандартная ошибка и χ^2):

1. χ^2 – среднее квадратичное отклонение точек данных от точек построенной модели. Наилучшими признавались фиты со значением χ^2 меньшим 10. Однако, в случае, если полученные сенсограммы при фитировании выдавали значение χ^2 строго большее 10 единиц, то за конечный результат принимался фит с

наименьшим значением χ^2 , причём значение последнего должно было быть значительно меньше максимального значения RU на сенсограмме.

2. Стандартная ошибка – расчётный параметр для каждой полученной характеристики фита, который характеризует чувствительность модели к изменению данной характеристики.

3. Визуальное соответствие модельного графика и записанной в режиме реального времени сенсограммы.

2.5.5 Достоверность данных

Масса реагентов, завешиваемых на электронных лабораторных весах Sartorius TE64, достоверно определялась до 0,001 грамма.

Отклонение по объёму забираемой пробы для лабораторных пипеток Eppendorf согласно технической документации составляло 0,4-0,8% для пипетки 2-20 мкл, 0,2-0,7% для пипетки 20-200 мкл, 0,2-0,6% для пипетки 100-1000 мкл и 0,15-0,6% для пипетки 500-5000 мкл. Ошибки в количествах веществ, которые добавляли в растворы этими пипетками, соответствует ошибкам объёмов.

Достоверность регистрации сенсограмм взаимодействия «белок – низкомолекулярное соединение» обеспечивалась технологией регистрации в реальном времени.

Глава З. Результаты и их обсуждение

3.1 Подбор иммобилизационного буфера

Электростатическая преконцентрация белка обусловлена отрицательным зарядом карбоксильных групп декстрана на поверхности чипа при pH>3,5 и положительным суммарным зарядом молекулы белка при pH<pI. Для использованных в качестве лигандов цитохромов СҮР51А1, СҮРЗА5, СҮРЗА4 pI лежит в диапазоне примерно 8,0-8,5, что обеспечивает заметный уровень преконцентрации при нейтральном значении рН буфера и низкой концентрации хлорида натрия (менее 10 мМ). Главной целью было максимально возможное сохранение нативности таких лабильных белков, как цитохромы Р450, а не большое количество иммобилизованного вещества. Большое количество белка, иммобилизованного на чипе рассматривается скорее как негативное обстоятельство в случае регистрации белок-белковых взаимодействий, когда аналит имеет молекулярную массу десятки тысяч дальтон. Исходя из этих принципов для иммобилизации выбрали значения pH 7,4 и 6,6 (10 мМ HEPES и 5 мМ малеат соответственно). Однако для белков-партнёров цитохромов Р450 значение pI лежит в диапазоне 4,5-5,5 (теоретические расчётные значение pI_{AdX} равно 5,5, pI_{CPR} 5,3, pI_{CYB5} 4,8), что предопределяет использование в качестве иммобилизационного буфера слабокислый раствор ацетата натрия. Предпочтение отдавали максимально мягким условиям иммобилизации, выбирая буфер с таким значением pH, при котором можно достигнуть минимально необходимого количества иммобилизованного белка. Для иммобилизации AdX и CYB5 использовали ацетатный буфер со значением pH 4,5, для CPR значение pH иммобилизационного буфера составляло 5,0.

3.2 Подбор экспериментальных условий и анализ взаимодействий

Каждое измерение проводилось в трёх повторах. Для подбора условий эксперимента в качестве лиганда на первом этапе измерений использовали

цитохромы P450, на втором — белки-партнёры. Типичные сенсограммы взаимодействий белков-партнёров с иммобилизованным на оптическом CM5 чипе CYP51A1hum, CYP3A5hum, CYP3A4hum, записанные в реальном времени при температуре 25°C, представлены на рисунках:



Рис. 11. Сенсограмма взаимодействия CPRrat с иммобилизованным CYP51A1human при 25°C.



Время, с

Рис. 12. Сенсограмма взаимодействия CPRrat с иммобилизованным CYP3A4human при 25°C.



Время, с

Рис. 13. Сенсограмма взаимодействия CPRrat с иммобилизованным CYP3A5human при 25°C.



Рис. 14. Сенсограмма взаимодействия CYB5Arat с иммобилизованным CYP51A1human при 25°C.



Время, с

Рис. 15. Сенсограмма взаимодействия CYB5Arat с иммобилизованным CYP3A4human при 25°C.



Время, с

Рис. 16. Сенсограмма взаимодействия CYB5Arat с иммобилизованным CYP3A5human при 25°C.



Время, с

Рис. 17. Сенсограмма взаимодействия CYB5Brat с иммобилизованным CYP51A1human при 25°C.

В результате обработки приведённых выше сенсограмм были получены следующие параметры взаимодействий.

Таблица 1. Кинетические параметры и равновесная константа распада комплексов аналит-лиганд (CPRrat, CYB5Arat, CYB5Brat, CYB5Bhum) с иммобилозованными цитохромами P450 человека. «н.в» - нет взаимодействия.

Аналит	Лиганд	ka $(M^{-1}c^{-1})$	$kd(c^{-1})$	Kd (мкМ)
CPRrat	CYP51A1	289±23,1	(1,6±0,2)E-03	5,7±0,8
	CYP3A4	299±35,8	(2,1±0,3)E-03	7,2±0,9
	CYP3A5	380±22,8	(2,1±0,1)E-03	2,8±0,4
CYB5Arat	CYP51A1	288±39,6	(3,8±0,4)E-03	13,2±1,5
	CYP3A4	749±59,9	(2,3±0,3)E-03	3,1±0,7
	CYP3A5	497±64,6	(2,4±0,3)E-03	4,9±0,9
CYB5Brat	CYP51A1	430±51,6	(3,0±0,2)E-03	7±0,9
	CYP3A4	Н.В.	Н.В.	Н.В.
	CYP3A5	Н.В.	Н.В.	H.B.
CYB5B	CYP51A1	Н.В.	Н.В.	Н.В.
hum	CYP3A4	H.B.	Н.В.	H.B.

Аналит	Лиганд	ka ($M^{-1}c^{-1}$)	$kd(c^{-1})$	Kd (мкM)	
	CYP3A5	271±46	(1,2±0,1)E-02	46,1±6,5	

Данные, представленные в этой таблице, проиллюстрированы следующими диаграммами.



Рис. 18. Константа скорости образования белок-белковых комплексов. Условные сокращения такие же, как в таблице 1. Условия эксперимента такие, как описано в пункте «Анализ взаимодействий».

Видно, что скорость образования комплексов СҮВ5-СҮР в целом выше, чем при взаимодействии СРR-СҮР. Скорость образования комплексов максимальна в случае СҮВ5Arat-СҮР3A4hum, в полтора раза превышая скорость образования аналогичных комплексов своего близкого гомолога (СҮВ5Arat-СҮР3A5hum), существенно (более чем в 2,5 раза) и достоверно отличаясь от скорости образования комплексов СҮВ5Arat-СҮР51A1hum. В то время как скорость образования СРR-СҮР существенно не варьирует.



Рис. 19. Константа скорости распада белок-белковых комплексов. Условные сокращения такие же, как в таблице 1. Условия эксперимента такие, как описано в пункте «Анализ взаимодействий».

Наименьшая скорость распада характерна для комплексов СРR-СҮР, особенно СРRrat-СҮРЗА5. Комплексы СРR-СҮР распадаются медленнее, чем СҮВ5-СҮР в случае СҮР51А1 и СҮРЗА5, в то время как скорости распада СРRrat-СҮРЗА4 и СҮВ5Аrat-СҮРЗА4 достоверно не отличаются. Скорость распада максимальна в случае СҮВ5Вhum-СҮРЗА5.



Рис. 20. Равновесная константа диссоциации белок-белковых комплексов.

Условные сокращения такие же, как в таблице 1. Условия эксперимента такие, как описано в пункте «Анализ взаимодействий».

Близкие гомологи (гомология 84% по данным UniProt) СҮРЗА4 и СҮРЗА5 по-разному реагируют с CPRrat и CYB5Arat. У СҮРЗА4 больше аффинность к микросомальному цитохрому b5, CYP3A5 образует более прочные комплексы с редуктазой цитохрома P450. Так же CYP3A5 обладает некоторой аффинностью к CYB5Bhum. Равновесная константа распада комплекса в данном случае велика за счёт довольно большой константы скорости распада.

На следующем этапе анализа белок-белковых взаимодействий был произведён биосенсорный анализ инвертированных пар. На поверхности чипа были иммобилизованы CPRrat, CYB5Arat, CYB5Brat, CYB5Bhum. Типичные сенсограммы взаимодействий данных белков с иммобилизованным на оптическом CM5 чипе CPRrat, CYB5Arat, CYB5Brat, CYB5B hum записанные в реальном времени при температуре 25°C, представлены на рисунках:



Рис. 21. Сенсограмма взаимодействия CYP51A1hum с иммобилизованой CPRrat при 25°C.



Время, с

Рис. 22. Сенсограмма взаимодействия СҮРЗА4hum с иммобилизованой CPRrat при 25°С.



Время, с

Рис. 23. Сенсограмма взаимодействия СҮРЗА5hum с иммобилизованой CPRrat при 25°С.



Время, с

Рис. 24. Сенсограмма взаимодействия СҮР51А1hum с иммобилизованным СҮВ5Arat при 25°С.



Рис. 25. Сенсограмма взаимодействия СҮРЗА4hum с иммобилизованным СҮВ5Arat при 25°С.



Время, с

Рис. 26. Сенсограмма взаимодействия СҮРЗА5hum с иммобилизованным СҮВ5Arat при 25°С.



Время, с

Рис. 27. Сенсограмма взаимодействия СҮРЗА4hum с иммобилизованным СҮВ5Brat при 25°С



Время, с

Рис. 28. Сенсограмма взаимодействия СҮРЗА5hum с иммобилизованным СҮВ5Brat при 25°С



Время, с

Рис. 29. Сенсограмма взаимодействия СҮР51А1hum с иммобилизованным СҮВ5Bhuman при 25°С.



Рис. 30. Сенсограмма взаимодействия СҮРЗА4hum с иммобилизованным СҮВ5Bhuman при 25°С.

В результате обработки приведённых выше сенсограмм были получены следующие параметры взаимодействий.

Таблица 2. Кинетические параметры и равновесная константа распада комплексов цитохромов P450 человека (СҮРЗА4hum, СҮРЗА5hum, СҮР51A1hum) с иммобилозованными белками-партнёрами (CPRrat, CYB5Arat, CYB5Brat, CYB5Bhum). «н.в.» - нет взаимодействия

Лиганд	Аналит	ka ($M^{-1}c^{-1}$)	$kd(c^{-1})$	Kd (мкМ)
CPRrat	CYP51A1	(1,38±0,1)E+003	(4,18±0,6)E-004	0,30±0,05
	CYP3A4	792±95	(1,24±0,1)E-003	1,50±0,04
	CYP3A5	(1,25±0,1)E+003	(8,63±0,2)E-004	0,70±0,04

Лиганд	Аналит	ka ($M^{-1}c^{-1}$)	kd (c^{-1})	Kd (мкМ)
CYB5Arat	CYP51A1	412±60	(8,16±0,6)E-003	19,8±3,7
	CYP3A4	(3,36±0,5)E+003	(6,84±0,1)E-004	0,20±0,03
	CYP3A5	(1,14±0,1)E+004	(8,27±0,1)E-004	0,07±0,003
CYB5Brat	CYP51A1	H.B.	H.B.	H.B.
	CYP3A4	(1,64±0,1)E+003	(8,19±0,1)E-004	0,50±0,02
	CYP3A5	(3,99±0,2)E+003	(1,96±0,1)E-003	0,5±0,06
CYB5B human	CYP51A1	402±50	(4,16±0,6)E-002	103,0±18,7
	CYP3A4	(9,55±0,2)E+003	(2,81±0,4)E-003	0,3±0,03
	CYP3A5	(1,64±0,2)E+003	(8,20±0,1)E-004	0,5±0,04

Данные, представленные в этой таблице, проиллюстрированы следующими диаграммами.



Рис. 31. Константа скорости образования белок-белковых комплексов. Условные сокращения такие же, как в таблице 1. Условия эксперимента такие, как описано в пункте «Анализ взаимодействий».



Рис. 32. Константа скорости распада белок-белковых комплексов. Условные сокращения такие же, как в таблице 1. Условия эксперимента такие, как описано в пункте «Анализ взаимодействий».



Рис. 33. Равновесная константа диссоциации белок-белковых комплексов. Условные сокращения такие же, как в таблице 1. Условия эксперимента такие, как описано в пункте «Анализ взаимодействий».

Видно, что в том случае, если аналитом является цитохром Р450, а на чипе иммобилизован белок-партнёр, аффинность комплексов значительно выше. Это может говорить о том, что основные аминокислоты, образующие ионные пары межмолекулярном взаимодействии, принадлежат цитохрому Р450 и при модифицируются при иммобилизации таким образом, что межмолекулярные взаимодействия цитохрома с CPR и b5 сильно затрудняются, но молекулярное узнавание Взаимодействие при этом не нарушается. ковалентно иммобилизованных на карбоксиметилдекстран оптического чипа биосенсора цитохромов P450 с CYB5 нарушается в большей степени, чем с CPR. Известно, что площадь зоны контакта белковых молекул в комплексах СҮР450-СҮВ5 меньше, чем в CYP450-CPR. Это отражено на рис. 34-37, на которых приведены модели комплексов СҮР-СҮВ5, СҮР-АdX, СҮР-СРR.



Рис. 34. Модель комплекса СУР450-СУВ5. Показаны только взаимодействующие Аминокислотные 30-45, 60-69 И 376-379, участки молекул. остатки взаимодействующие мембраной, Молекулы с показаны красным. гема представлены красными сферами. Спираль С, содержащая аминокислотные остатки, взаимодействующие с СҮВ5 и СРК выделена жёлтым. Взято из [267].

На модели, представленной на рис. 34 гидрофобные участки СҮР позиционированы в наружный слой бислойной липидной мембраны. Цитохром b5 был вручную докирован с СҮР2С5 таким образом, что аминокислотные остатки СҮВ5 Asp65 и Val66 расположены рядом с остатком Lys121, которым начинается С-спираль, и Lys429 СҮР2С5 [268].

Такое расположение объясняет, почему Lys121 и Lys429 цитохрома P450 2C5 гомологичны аминокислотным остаткам Arg122 и Arg433 CYP450 2B4, которые принимают участие во взаимодействии с Asp65 и Val66 цитохрома b5 кролика [267].

100



Рис. 35. Модель комплекса СУР2Е1-СУВ5. СУР2Е1 окрашен жёлтым, его гем чёрным. Цитохром b5 серый, его гем — зелёный. Взаимодействующие аминокислотные остатки цитохрома P450 и b5 окрашены синим и красным соответственно. А. Взаимодействующие участки СҮР2Е1 и b5 обозначены Участки белков, коричневым И пурпурным соответственно. далёкие OT взаимодействующих поверхностей, удалены. В. Молекула b5 в комплексе повёрнута на 180 градусов вправо чтобы стала видна взаимодействующая боковых цепей поверхность. Атомы азота положительно заряженных аминокислотных остатков СҮР2Е1 окрашены синим, атомы кислорода боковых цепей отрицательно заряженных аминокислот СҮВ5 окрашены красным. Взято из [269].



Рис. 36. Модель комплекса (А) между СҮР2В4 и СРR. Розовым цветом показан СҮР2В4, жёлтым и зелёным — соответственно FMN и FAD-домены СРR. В и С – изоэлектрические поверхности цитохрома и редуктазы соответственно, где синим показаны положительно заряженные аминокислотные остатки, а красным — отрицательно заряженные, D – взаиморасположение гема (красный) и FMN (жёлтый), показана ориентация кофакторов относительно аминокислотных остатков (Phe-429 and Glu-549) цитохрома P450, которые лежат между редокспартнёрами. Е и F — интерфейсы взаимодействия СPR-СYP450. Показаны пять пар солевых мостиков, участники которых помечены одинаковым буквенным индексом (например R122(а) цитохрома и E92(а) редуктазы. Взято из [46].

На рис. 36 представлена возможная организация комплекса CPR-CYP450, где в роли цитохрома P450 выступает CYP2B4 человека. Учитывая высокую консервативность участков межмолекулярных взаимодействий, а так же гомологию между семействами цитохромов (более 40% [Nelson, 1996]) и NADPH

— цитохром P450 редуктазой человека и крысы (92% по данным UniProt) можно предположить, что в случае взаимодействия CYP51A1, CYP3A4 и CYP3A5 с CPRrat образуются аналогичные комплексы. Общая площадь контакта между двумя молекулами составляет 1500 Å², из которых 870 Å² приходится на контакт между ФМН-доменом и CYP450. Контакт между ФМН-доменом и CYP450 имеет преимущественно электростатическую природу. На рисунке 17 это пять пар солевых мостиков (Glu-92, Glu-93, Asp-113, Glu-142, и Asp-208 ФМН-домена и Arg-122, Arg-126, Lys-433, Arg-422, Arg-133 CYP450) и одна водородная связь (Arg-443 CYP450 и Tyr-178 CPR) в интерфейсе [270].

Это подтверждается тем, что для регенерации в ходе работы использовали буфер с высокой концентрацией хлорида натрия (1M NaCl, 0,05% P20, 0,2% CHAPS, 10 мМ HEPES, pH 7,4), что оказывает влияния на электростатические взаимодействия. Вероятно в образовании этого интерфейса принимают участие не только заряженные и полярные, но и гидрофобные аминокислотные остатки, так как наличие в регенерационном буфере детергента (CHAPS) было обязательным. При этом стоит отметить, что CHAPS мягкий амфотерный детергент, разрушающий почти исключительно гидрофобные взаимодействия.

ФМН-домен взаимодействует с основанием вогнутой поверхности СҮР450 таким образом, что плоскость гема позиционируется строго перпендикулярно плоскости ФМН. Кратчайшее расстояние между кофакторами (виниловый радикал В-кольца гема и С8-метил группа флавина) около 12 Å. Однако между кофакторами лежат остатки Phe-429 и Glu-439 цитохрома, можно предположить, что они принимают участие в переносе электрона между гемом и флавином [270]. Интересно, что взаиморасположение и ориентация кофакторов в этой модели сходны с обнаруженными в кристалле комплекса гем- и флавин-связывающих доменов бактериального цитохрома СҮР450 ВМЗ, только расстояние между кофакторами в этом случае составляет 18 Å [271]. В этой модели и ФАД-домен так же контактирует с цитохромом (площадь контакта 630 Å²). Это обеспечивает

позиционирования кофакторов. Bce максимальную точность девять аминокислотных остатка цитохрома, для которых методом направленного образование мутагенеза было предсказано участие В контакта CPR с располагаются в зоне интерфейса модели, представленной на рисунке 36 [46].



Рис. 37. Кристаллическая структура комплекса СУР11А1-Adx. Гем СУР11А1 локализован в глубине высококонсервативного гидрофобного ядра, что характерно для СҮР. Предполагаемые положение мембраны обозначаено горизонтальной линией. AdX (синий) связан с проксимальной поверхностью СҮР11А1 (зеленый). Гем, молекула холестерина в активном центре, и [2Fe-2S] кластер показаны стержнями. По данным, представленным в работе [264].

На рис. 37 видно, что Adx связывается в области проксимальной поверхности СYP11A1, а именно своей F-спиралью (домен взаимодействия) с K-спиралью CYP11A1 и с петлей, окружающей [2Fe-2S] кластер (положительно заряженный домен), а так же с C- и L-спиралями CYP11A1. При формировании комплекса Adx-CYP11A1 доминируют водородные связи. Так же присутствуют два солевых мостика, которые образуются между Lys339CYP11A1- Asp72Adx и Lys343CYP11A1-Asp76Adx; что соотвует данным, полученным в экспериментах с применением направленного мутагенеза и химической модификации [272, 273]. Остаток Asp79 домена взаимодействия AdX, способен оказывать влияние на активность CYP11A1 (28-30), но не участвует в непосредственном контакте, однако тесно контактирует (расстояние составляет приблизительно 5 Å) с Lys406, причем последний участвует в связывании редокс-партнера [274]. Интересно отметить, что эффект от замены Asp79Adx [275] является более выраженным, чем эффект от замены либо Lys404, Lys406 или Arg411 из CYP11A1 [274]. Предполагают, что в процессе комплексообразования, Asp79Adx изначально может взаимодействовать с любым из этих остатков [264].

Площадь контакта молекул белок-белковом прямо В комплексе пропорциональна количеству аминокислотных остатков, вовлечённых В образование комплекса. Можно предположить, что этот факт определяет большую модификациям способности чувствительность К химическим CYP450 взаимодействовать с цитохромами b5, по сравнению со способностью к образованию комплексов с CPR.

Белки-партнёры цитохромов P450 (CPR, AdX, CYB5) образуют белок-белковые комплексы за счёт отрицательно заряженных карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот. Карбоксильные группы аминокислотных остатков не затрагиваются в процессе иммобилизации, основанной на карбодиимидной реакции, взаимодействие иммобилизованного белка-партнёра с цитохромом P450 не нарушается. По этой причине для дальнейшего анализа белок-белковых взаимодействий, в том числе при получении температурной зависимости Kd, в качестве аналита использовали цитохромы P450, а белки-партнёры использовали в качестве лигандов. Тем не менее, следует учитывать тот факт, что в процессе иммобилизации белок подвергается модификации — возникает ковалентная связь между одной из -NH₂ групп белка (концевая аминогруппа или ε-аминогруппа лизина), кроме того в результате молекулы лиганда ориентированны не

единообразно. Так же отсутствует естественное микроокружение — липидный бислой.

После подбора экспериментальных условий список экспериментальных объектов был дополнен цитохромами СҮР2С9, СҮР1В1, СҮР17А1, СҮР11А1, СҮР11В1 и СҮР11В2, СҮР51А1саlb, а так же AdX и СҮВ5. Сенсограммы, полученные при регистрации взаимодействий этих СҮР с белками-партнёрами аналогичны представленным на рис. 21-30.

3.3 Аффинность и селективность взаимодействия СҮР с СҮВ5 (А и В) крысы и человека

Был выполнен биосенсорный анализ белок-белковых взаимодействий СҮР с цитохромами b5 при температуре 25°С. Полученные результаты показаны в таблице 3.

Таблица 3. Значения равновесной константы диссоциации комплексов СҮР-СҮВ5 (Kd, мкМ) при 25°С, «-» нет взаимодействия.

	CYB5Arat	CYB5Ahum	CYB5Brat	CYB5Bhum
CYP3A4hum	0,20±0,03	0,35±0,04	0,50±0,02	0,30±0,03
CYP3A5hum	0,070±0,003	4,8±0,4	0,50±0,06	0,50±0,04
CYP51A1hum	19,8±3,7	75,3±6,8	-	103,0±18,7
CYP51A1calb	-	-	-	-
CYP11A1bov	-	-	-	0,50±0,02
CYP2C9hum	-	-	-	-
CYP17A1eq	-	0,4±0,03	-	-
CYP11B2hum	-	-	-	0,19±0,003
CYP11B1hum	-	-	-	0,5±0,03
CYP1B1hum	0,01±0,003	0,01±0,001	0,04±0,002	0,04±0,005

Значения Кd при 25°С лежат в диапазоне от 0,01 до 103 мкМ. Как видно в табл. 3, некоторые СҮР демонстрируют избирательность по отношению к изоформе СҮВ5, так же в ряде случаев имеет место видовая специфичность. Для начала остановимся на неизбирательных СҮР. В качестве контроля вместо цитохромов Р450 инжектировали растворы альбумина и гемоглобина, как было сказано в пункте «Анализ взаимодействий». Альбумин и гемоглобин не взаимодействовали с СҮВ5.

Микросомальные цитохромы СҮРЗА4, СҮРЗА5, СҮРІВ1 и СҮР51А1 не проявили видовой специфичности и избирательности к изоформам СҮВ5, табл 3. Эти СҮР взаимодействуют как с СҮВ5А, так и с СҮВ5В человека и крысы. Афинность СУР1В1 по отношению к СУВ5 очень значительна, Кd порядка десятков нМ. Микросомальный СҮР51А1 отличается очень низкой афинностью по отношению ко всем изоформам СҮВ5 как человека, так и крысы. Значения Кd комплексов этого цитохрома с СҮВ5 составляют десятки мкМ. Вместе с тем, в работе [116] было продемонстрировано, что СҮВ5 не оказывает никакого эффекта на активность СУР1В1. С чем связано взаимодействие цитохрома b₅ с СУР1В1 и отсутствие стимулирования/ингибирования активности последнего, остается неясным. Одним из объяснений может служить то, что СҮР1В1 происходит от предшествующего фермента, роль цитохрома b₅ для которого являлась определяющей. Ранее было показано, что СҮВ5 не способен оказывать влияние на уровень каталитической активности СҮР51А1. В противоположность сказанному выше, цитохром b5 способен воздействовать на каталитическую активность СҮРЗА4 и СҮРЗА5. Эти СҮР взаимодействуют с СҮВ5А и СҮВ5В как крысы, так и человека. Однако всё же присутствует определённая видовая специфичность. Комплексы СҮРЗА4 и СҮРЗА5 с СҮВ5В крысы и человека имеют практически одинаковую аффинность, характерны значениями Kd порядка 0,3-0,5 мкМ. Это соответствует комплексам с хорошей аффинностью. Комплексы СҮРЗА4 с СҮВ5А человека и крысы, а так же СҮРЗА5 с СҮВ5Агаt, характеризуются значениями Кd

0,2, 0,35 и 0,07 мкМ соответственно. Тогда как для комплексов СҮРЗА5 с СҮВ5А человека значение Kd составляет 4,8 мкМ. Причины этих особенностей, скорей всего в структурных различиях СҮРЗА4 и СҮРЗА5. Этот вопрос требует дальнейшей проработки с применением методов компьютерного моделирования 3D-структур белок-белковых комплексов, а так же ряда оптико-биосенсорных экспериментов с мутантными молекулами СҮРЗА4 и СҮРЗА5. Не исключено, что комплексы СҮВ5В человека и крысы с этими СҮР имеют сходные значения Kd изза структурных особенностей гидрофильного домена митохондриальной изоформы цитохрома b5 (значительно большая жёсткость, чем у гидрофобного домена микросомальной изоформы) [73].

Заслуживают отдельного внимания СҮР, продемонстрировавшие видовую специфичность и избирательность ПО отношению к изоформам CYB5. Микросомальный СҮР17А1 взаимодействовал только с СҮВ5А человека, образуя комплексы с хорошей аффинностью (Кd 0,4 мкМ). Микросомальный цитохром b5 является известным регулятором каталитической активности CYP17A1. Неспособность СҮВ5В эффективно связываться с СҮР17А1 подтверждается полученными ранее данными по постановке активности, где СУВ5В не оказывал влияния на 17,20-лиазную активность СУР17А1. Митохондриальные цитохромы Р450 (СҮР11А1, СҮР11В1, СҮР11В2) образуют комплексы только с СҮВ5В человека. Аффинность этих комплексов высока, значения Kd порядка 0,2-0,5 мкМ. В настоящей работе впервые продемонстрировано образование комплексов между СҮВ5В и СҮР11А1, СҮР11В1 и СҮР11В2, при этом для данных СҮР не зафиксировано образования комплексов с СҮВ5А. Остается неясным, чем обусловлена такая избирательность митохондриальных СҮР. Вопрос о том, какое влияние СҮВ5В может оказывать на активность митохондриальных цитохромов, остаётся открытым.

Не было зафиксировано образование комплексов микросомального СҮР2С9 и СҮВ5 (табл. 3). В работе [116] было показано наличие стимулирующего эффекта СҮВ5А на активность СҮР2С9. Вполне вероятно, что СҮВ5 переносит электроны
на СҮР2С9 по челночному механизму. Этот процесс сопряжен с формированием белок-белковых комплексов, характеризующихся очень быстрым распадом (kd > 1 c⁻¹) [276]. Комплексы с такими кинетическими параметрами на оптическом биосенсоре невозможно зарегистрировать, поскольку прирост массы на поверхности чипа будет нивелирован быстрым распадом образовавшихся диффузией аналита в комплексом И молекул раствор. He способным взаимодействовать с СҮВ5 был и СҮР51А1calb. Это можно объяснить не только фермента, функциональными особенностями этого но видовой И специфичностью.

Обобщая, можно сказать, что СҮВ5 по отношению к СҮР характеризуется высокой селективностью и избирательностью. Это соответствует функции, которую осуществляет СҮВ5, а именно тонкая настройка работы монооксигеназной системы. Однако факт образования белок-белковых комплексов in vitro не всегда согласуется с данными биохимических экспериментов, иначе говоря, характерно образование непродуктивных комплексов. Кроме того, можно говорить о видовой специфичности, однако этот вопрос требует более глубокого изучения.

3.4 Определение термодинамических параметров образования белок-белковых комплексов СҮР с СҮВ5 (А и В) крысы и человека

Производили регистрацию образования белок-белковых комплексов в диапазоне температур от 10 до 40°С с шагом в 5°С. Для каждой температуры производили рассчёт значений Kd. Таким образом получали семь значений, по которым строили графики Вант-Гоффа, демонстрирующие температурную зависимость Kd. Все графики Вант-Гоффа были линейными в диапазоне от 10 до 40°С, $r^2 \ge 0,91$. Значения изменения свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии получали как описано в пункте «Анализ термодинамических параметров взаимодействия цитохромов Р450 и иммобилизованных белков-

партнёров». Исходя из полученных данных, представленных в таблице 4, можно выделить энтальпийно-зависимые и энтропийно-зависимые белок-белковые комплексы СҮР-СҮВ5.

Таблица 4. Представлены значения изменения свободной энергии Гиббса (ΔG), энтальпии (ΔH), энтропии (-TΔS), сопровождающие образование комплексов CYP-CYB5. «-» нет взаимодействия.

Пара (лиганд/аналит)	ΔG (ккал/моль)	ΔН (ккал/моль)	-ТАЅ (ккал/моль)
CYB5Arat/CYP3A4hum	-9,0±0,3	-34,9±3,2	25,9±3,9
CYB5Ahum/CYP3A4hum	-8,8±0,6	-39,7±4,0	30,7±4,6
CYB5Brat/CYP3A4hum	-8,6±0,4	-27,9±2,2	18,9±2,8
CYB5Bhum/CYP3A4hum	-8,9±0,8	-30,7±3,8	21,3±3,2
CYB5Arat/CYP3A5hum	-9,7±0,4	-34,8±2,7	25,1±3,7
CYB5Ahum/CYP3A5hum	-7,2±0,2	-27,0±1,8	19,8±2,9
CYB5Brat/CYP3A5hum	-8,6±0,3	-21,7±2,2	13,1±1,9
CYB5Bhum/CYP3A5hum	-8,6±0,2	-17,3±1,8	8,7±1,3
CYB5Arat/CYP51A1hum	-6,4±0,9	62,9±7,4	-69,4±10,4
CYB5Ahum/CYP51A1hum	-5,6±0,8	76,6±9,5	-82,3±12,3
CYB5Brat/CYP51A1hum	-	-	-
CYB5Bhum/CYP51A1hum	-5,4±0,8	32,1±3,8	-37,6±5,6
CYB5Arat/CYP51A1calb	-	-	-
CYB5Ahum/CYP51A1calb	-	-	-
CYB5Brat/CYP51A1calb	-	-	-
CYB5Bhum/CYP51A1calb	-	-	-
CYB5Arat/CYP2C9hum	-	-	-

Пара (лиганд/аналит)	ΔG (ккал/моль)	ΔН (ккал/моль)	-Т Δ Ѕ (ккал/моль)
CYB5Ahum/CYP2C9hum	-	-	-
CYB5Brat/CYP2C9hum	-	-	-
CYB5Bhum/CYP2C9hum	-	-	-
CYB5Arat/CYP17A1eq	-	-	-
CYB5Ahum/CYP17A1eq	-8,8±0,7	-15,3±2,5	6,5±0,8
CYB5Brat/CYP17A1eq	-	-	-
CYB5Bhum/CYP17A1eq	-	-	-
CYB5Arat/CYP1B1hum	-9,4±0,8	8,8±0,8	$-20,4\pm3,1$
CYB5Ahum/CYP1B1hum	-10,8±1,2	8,9±0,9	-19,7±2,2
CYB5Brat/CYP1B1hum	-10,1±1,0	11,8±1,6	-21,8±1,8
CYB5Bhum/CYP1B1hum	-10,0±1,1	16,6±1,9	-26,6±2,3
CYB5Arat/CYP11A1bov	-	-	-
CYB5Ahum/CYP11A1bov	-	-	_
CYB5Brat/CYP11A1bov	-	-	-
CYB5Bhum/CYP11A1bov	-8,5±0,5	38,2±4,3	-46,7±5,8
CYB5Arat/CYP11B1hum	-	-	-
CYB5Ahum/CYP11B1hum	-	-	-
CYB5Brat/CYP11B1hum	-	-	-
CYB5Bhum/CYP11B1hum	-8,6±0,3	9,6±1,4	-18,1±3,2
CYB5Arat/CYP11B2hum	-	-	-
CYB5Ahum/CYP11B2hum	-	-	-
CYB5Brat/CYP11B2hum	-	-	-
CYB5Bhum/CYP11B2hum	-9,2±0,4	61,3±6,4	-70,5±6,7

Для энтальпийно-зависимых комплексов характерны значения $\Delta H < 0$, -T $\Delta S > 0$. Образование таких комплексов происходит за счёт изменения энтальпии. Это свидетельствует о том, что взаимодействие молекул СҮР и СҮВ5 происходит за счёт образования солевых мостиков и водородных связей [277]. В то же время энтропийная компонента (-T Δ S) положительна и противодействует образованию белок-белковых комплексов. Это может быть обусловлено десольватацией полярных групп при вытеснении воды из зоны контакта белковых молекул [278]. Сенсограммы энтальпийно-зависимых комплексов при изменении температуры претерпевают следующие изменения. При изменении температуры от 10 до 40°С незначительно увеличивается скорость образования комплексов (ka возрастает), существенно увеличивается скорость распада комплексов (kd возрастает). Таким образом, при повышении температуры происходит уменьшение аффинности энтальпийно-зависимых комплексов за счёт увеличения kd. Эти изменения отражены на графиках Вант-Гоффа (зависимость натурального логарифма Kd от 1/Т, для удобства представления данных часто используют величину 1000/Т), представленных на рис. 38 и 39.



Рис. 38. Графики Вант-Гоффа для белок-белковых комплексов СУВ5Аhum-

CYP3A4hum, CYB5Bhum-CYP3A4hum, CYB5Ahum-CYP3A5hum, CYB5Bhum-CYP3A5hum.



Рис. 39. Графики Вант-Гоффа для белок-белковых комплексов CYB5Arat-CYP3A4hum, CYB5Brat-CYP3A4hum, CYB5Arat-CYP3A5hum, CYB5Brat-CYP3A5hum.

Энтальпийно-зависимые комплексы с СҮВ5А и СҮВ5В образуют СҮРЗА4, СҮРЗА5, СҮР17А1. Значения термодинамических параметров этих комплексов приведены на рис 40. Таким образом комплексы этих СҮР с цитохромом b5 образуются за счёт электростатических взаимодействий. Известно, что для СҮРЗА4, СҮРЗА5 и СҮР17А1 цитохром b5 является аллостерическим эффектором. В ряде работ [279, 280] показана исключительная важность электростатических взаимодействий между СҮР и b5 для аллостерической регуляции.



Рис. 40. Термодинамические параметры энтальпийно-зависимых белокбелковых комплексов СҮР-СҮВ5. Цифрами обозначены следующие комплексы: 1-СҮРЗА4hum-СҮВ5Arat, 2-СҮРЗА4hum-СҮВ5Ahum, 3-СҮРЗА4hum-СҮВ5Brat, 4-СҮРЗА4hum-СҮВ5Bhum, 5-СҮРЗА5hum-СҮВ5Arat, 6-СҮРЗА5hum-СҮВ5Ahum, 7-СҮРЗА5hum-СҮВ5Brat, 8-СҮРЗА5hum-СҮВ5Bhum, 9-СҮР17А1еq-СҮВ5Ahum.

Образование энтропийно-зависимых комплексов происходит за счёт изменения энтропии, значение компоненты -T Δ S<0. Можно предположить, что образование энтропийно-зависимых сопряжено гидрофобными комплексов с взаимодействиями и десольватацией гидрофобных зон [277, 278]. Значение энтальпийной компоненты положительно ($\Delta H>0$), что свидетельствует 0 конформационных изменениях в молекулах СҮР и СҮВ5 [277]. При изменении температуры от 10 до 40°С значительно увеличивается скорость образования комплексов (kon возрастает), скорость распада комплексов незначительно ворастает (koff возрастает). Таким образом, при повышении температуры происходит увеличение аффинности энтрапийно-зависимых комплексов за счёт увеличения kon. Эти закономерности продемонстрированы на графиках Вант-Гоффа, представленных на рис. 41 и 42.



Рис. 41. Графики Вант-Гоффа для белок-белковых комплексов CYB5Ahum-CYP1B1hum, CYB5Bhum-CYP1B1hum, CYB5Arat-CYP1B1hum, CYB5Brat-CYP1B1hum, CYB5Ahum-CYP51A1hum, CYB5Bhum-CYP51A1hum.



Рис. 42. Графики Вант-Гоффа для белок-белковых комплексов СҮВ5Вhum-СҮР11А1bov, СҮВ5Bhum-СҮР11В1hum, СҮВ5Bhum-СҮР11В2hum.



счёт энтропийной компоненты. Значения термодинамических параметров этих комплексов приведены на рис. 43. Образование комплекса в результате не специфического гидрофобного взаимодействия мембранных доменов митохондриальных СҮР и CYB5 маловероятно, 0 чем свидетельствует избирательность СҮР11А1, СҮР11В1 и СҮР11В2 по отношению к СҮВ5В. Тем не следует учитывать локализацию цитохромов Р450 и СУВ5В в менее. митохондрии. Митохондриальные цитохромы Р450 локализованы на внутренней мембране митохондрии, контактируют с матриксом. Митохондриальная изоформа СҮВ5 встраивается во внешнюю мембрану митохондрий. Таким образом, можно говорить о том, что в физиологических условиях эти белки, скорее всего, не встречаются.



Рис. 43. Термодинамические параметры энтрапийно-зависимых белокбелковых комплексов митохондриальных СҮР-СҮВ5. Цифрами обозначены следующие комплексы: 1-СҮР11А1bov-СҮВ5Вhum, 2-СҮР11В1hum-СҮВ5Вhum, 3-СҮР11В2hum-СҮВ5Вhum.

Микросомальные СҮР1В1 и СҮР51А1 образуют энтропийно-зависимые комплексы со всеми изоформами цитохрома b₅ человека и крысы (СҮВ5А и

СҮВ5В). Значения термодинамических параметров этих комплексов приведены на рис 44. Как уже было сказано выше, СҮВ5 не оказывает никакого влияния на функциональную активность этих СҮР. Можно предположить, что гидрофобные участки молекул СҮР1В1 и СҮР51А1 взаимодействуют с мембранным доменом СҮВ5. Это может удовлетворительно объяснить отсутствие избирательности и низкую аффинность комплексов СҮР51А1-СҮВ5, но остаётся непонятной причина столь высокого сродства СҮР1В1 к цитохромам b5.



Рис. 44. Термодинамические параметры энтрапийно-зависимых белокбелковых комплексов СҮР-СҮВ5. Цифрами обозначены следующие комплексы: 1-СҮР1В1hum-СҮВ5Arat, 2-СҮР1В1hum-СҮВ5Ahum, 3-СҮР1В1hum-СҮВ5Brat, 4-СҮР1В1hum-СҮВ5Bhum, 5-СҮР51А1hum-СҮВ5Arat, 6-СҮР51А1hum-СҮВ5Ahum, 7-СҮР51А1hum-СҮВ5Brat, 8-СҮР51А1hum-СҮВ5Bhum.

На рис. 45. в графическом виде представлено разделение ББК СҮР-СҮВ5 на группы, в зависимости от значения энтальпийной и энтропийной компонент.



Рис. 45. Разделение комплексов СҮР-СҮВ5 на группы, в зависимости от значений энтальпийной (ΔΗ) и энтропийной (-ΤΔS) компонент. Цветом обведены группы комплексов СҮВ5 с цитохромами Р450. Стрелками указаны группы, соответствующие СҮРЗА4, СҮРЗА5, СҮР17А1, СҮР51А1, СҮР1В1. Точки, не включённые в группы, соответствуют комплексам митохондраильных цитохромов с СҮВ5В.

В итоге мы можем говорить о том, что цитохром СҮВ5 образует энтальпийнозависимые комплексы с теми СҮР, по отношению к которым он играет роль аллостерического эффектора. Для СҮРЗА4, СҮРЗА5, СҮР17А1 цитохром b5 играет роль аллостерического регулятора. В ряде работ [279, 280] показана исключительная важность электростатических взаимодействий для образования СҮР с аллостерическим регулятором b5. комплекса что согласуется С CYP-CYB5 Энтропийно-зависимые полученными данными. комплексы соответствуют тем цитохромам Р450, на активность которых СҮВ5 не оказывает влияния. Скорее всего, образование таких комплексов связано с гидрофобными

118

взаимодействиями мембранных доменов СҮР и СҮВ5.

3.5 Аффинность и селективность взаимодействия СҮР с СРR крысы и AdX человека

Был выполнен биосенсорный анализ белок-белковых взаимодействий СҮР с CPR и AdX при температуре 25°С. Полученные результаты показаны в таблице 5.

Таблица 5. Значения равновесной константы диссоциации комплексов СҮР-СРК и СҮР-AdX (Kd, мкМ) при 25°С, «-» нет взаимодействия.

	AdXhum	CPRrat
CYP3A4hum	0,25±0,01	1,50±0,04
CYP3A5hum	0,55±0,03	0,70±0,04
CYP51A1hum	0,45±0,03	0,30±0,05
CYP51A1calb	3,5±0,3	0,020±0,001
CYP11A1bov	0,010±0,001	0,31±0,02
CYP2C9hum	-	0,1±0,02
CYP17A1eq	0,01±0,003	1,8±0,06
CYP11B2hum	0,03±0,002	0,5±0,03
CYP11B1hum	0,08±0,004	0,3±0,01
CYP1B1hum	0,01±0,003	0,02±0,005

Значения Kd при 25°C лежат в диапазоне от 0,01 до 3,5 мкМ, аффинность варьирует от очень высокой до хорошей. Как видно в табл. 5, все СҮР образуют комплексы как с CPR, так и с AdX. В качестве контроля вместо цитохромов P450 инжектировали растворы альбумина и гемоглобина, как было сказано в пункте «Анализ взаимодействий». Альбумин не взаимодействовал ни с AdX, ни с CPR. Гемоглобин не продемонстрировал способности к образованию комплексов с AdX. Однако гемоглобин был способен взаимодействовать с CPR, образуя комплексы со значением Кd порядка 8 мкМ (данные не приведены). Это вполне согласуется с данными других авторов, которые подтверждают низкую избирательность CPR по отношению к белкам-партнёрам. Редуктаза цитохромов Р450 универсальна, обладает широкой специфичностью по отношению к белкам-партнёрам, что соответствует её роли поставщика электронов для всех цитохромов в гладком эндоплазматическом ретикулюме. В её структуру заложена возможность «узнавать» и «обслуживать» десятки различных цитохромов. Адренодоксин поставляет электроны только нескольким митохондриальным цитохромам, которые требовательны к источнику электронов из-за большого разнообразия электрон-транспортных систем в митохондриях. Микросомальные цитохромы не требовательны к поставщикам электронов из-за «монополизма» столь В микросомах. Требовательные цитохромы митохондрий принимают электроны только от адренодоксина, но не от редуктазы.

Таким образом, можно говорить о чрезвычайно широкой специфичности (или не выраженной селективности) основных доноров электронов из микросомальной и митохондриальной монооксигеназных систем по отношению к редокспартнёрам. Таким образом, низкая избирательность сочетается с довольно сильно различающейся аффинностью, значениия Kd для разных СYP могут отличаться на два порядка.

3.6 Определение термодинамических параметров белок-белковых комплексов CYP с CPR крысы и AdX человека

Производили регистрацию образования белок-белковых комплексов в диапазоне температур от 10 до 40°С с шагом в 5°С. Для каждой температуры производили рассчёт значений Kd. Таким образом получали семь значений, по которым строили графики Вант-Гоффа, демонстрирующие температурную зависимость Kd, представленные на рис. 46-49. Все графики Ванг-Гоффа были линейными в диапазоне от 10 до 40°С, $r^2 \ge 0.91$.



Рис. 46. Графики Вант-Гоффа для белок-белковых комплексов CPRrat-CYP3A4hum, CPRrat-CYP3A5hum, CPRrat-CYP51A1hum, CPRrat-CYP2C9hum, CPRrat-CYP17A1eq, CPRrat-CYP1B1hum.



Рис. 47. Графики Вант-Гоффа для белок-белковых комплексов CPRrat-CYP11A1bov, CPRrat-CYP11B1hum, CPRrat-CYP11B2hum.



Рис. 48. Графики Вант-Гоффа для белок-белковых комплексов AdXhum-CYP3A4hum, AdXhum-CYP3A5hum, AdXhum-CYP51A1hum, AdXhum-CYP17A1eq, AdXhum-CYP1B1hum.



Рис. 49. Графики Вант-Гоффа для белок-белковых комплексов AdXhum-CYP11A1bov, AdXhum-CYP11B1hum, AdXhum-CYP11B2hum.

Значения изменения свободной энергии Гиббса, энтальпии и энтропии получали как описано в пункте «Анализ термодинамических параметров

взаимодействия цитохромов P450 и иммобилизированных белков-партнёров». Исходя из полученных данных, представленных в таблице 6, можно утверждать, что энтропия играет важную роль в образовании белок-белковых комплексов адренодоксина и CPR с белками-партнёрами. Данные, приведённые в таблице 6, отражены на рис. 50-52.

Таблица 6. Представлены значения изменения свободной энергии Гиббса (ΔG), энтальпии (ΔH), энтропии (ΔS), сопровождающие образование комплексов СҮР-СРR и СҮР-AdX, а так же -T ΔS . «-» нет взаимодействия.

Пара (лиганд/аналит)	ΔG (ккал/моль)	∆Н (ккал/моль)	-ТДЅ (ккал/моль)
AdXhum/CYP3A4hum	-9,1±0,3	22,1±2,7	-31,2±4,7
CPRrat/CYP3A4hum	-7,9±0,2	26,5±3,1	-34,4±5,3
AdXhum/CYP3A5hum	-8,5±0,4	24,7±2,7	-33,2±4,9
CPRrat/CYP3A5hum	-8,4±0,2	44,6±5,4	-53,0±7,9
AdXhum/CYP51A1hum	-8,7±0,3	33,9±4,3	-42,6±6,3
CPRrat/CYP51A1hum	-8,8±0,7	26,4±2,9	-35,2±5,2
AdXhum/CYP51A1calb	-7,4±0,6	48,7±5,3	-56,2±8,4
CPRrat/CYP51A1calb	-10,4±0,8	28,6±3,3	-39,0±5,8
AdXhum/CYP17A1eq	-10,8±0,9	12,0±1,1	-22,9±2,8
CPRrat/CYP17A1eq	-7,8±0,3	38,4±2,8	-46,2±6,5

Пара (лиганд/аналит)	∆G (ккал/моль)	АН (ккал/моль)	-ТДЅ (ккал/моль)
AdXhum/CYP2C9hum	-	_	-
CPRrat/CYP2C9hum	-9,3±0,5	42,3±4,4	-51,5±6,7
AdXhum/CYP1B1hum	-10,8±0,8	45,9±4,8	-56,7±5,8
CPRrat/CYP1B1hum	-10,5±0,9	39,0±4,5	-49,5±5,2
AdXhum/CYP11A1bov	-10,8±0,7	-22,1±2,7	11,3±0,9
CPRrat/CYP11A1bov	-8,9±0,8	49,3±6,2	-58,2±6,8
AdXhum/CYP11B2hum	-10,3±0,5	-3,7±0,4	-6,6±0,7
CPRrat/CYP11B2hum	-8,6±0,4	24,5±3,7	-33,1±2,6
AdXhum/CYP11B1hum	-9,6±0,4	-1,9±0,2	-7,8±0,8
CPRrat/CYP11B1hum	-8,9±0,3	17,93±2,8	-26,9±3,2

Опираясь на характеристики комплексов CPR и AdX с цитохромами P450, можно отметить тенденцию к разделению массива данных на две группы, в зависимости от значений -T Δ S и Δ H. Белок-белковые комплексы из первой группы характеризуются значениями -T Δ S<0, Δ H>0 (энтропийно-зависимые комплексы), для комплексов из второй группы типичны значения -T Δ S

В первую группу можно включить энтропийно-зависимые комплексы CPR с микросомальными и митохондриальными цитохромами, рис 46, 47 и 50, а так же

комплексы AdX с микросомальнми цитохромами, рис. 48 и 51. Значения -T Δ S<0 в данном случае свидетельствуют о значительных перестройках в молекулах белков во время формирования комплекса. Положительные значения Δ H так же характерны для глубоких структурных изменений, которые могут сопровождаться разрывом внутримолекулярных солевых мостиков и водородных связей, десольватацией общирных участков молекулярной поверхности в зоне контакта двух белков.



Рис. 50. Термодинамические параметры белок-белковых комплексов CPRrat-CYP. Цифрами обозначены следующие CYP: 1-CYP3A4, 2-CYP3A5, 3-CYP51A1hum, 4-CYP51A1calb, 5-CYP17A1eq, 6-CYP2C9hum, 7-CYP1B1, 8-CYP11A1bov, 9-CYP11B1hum, 10-CYP11B2hum.



Рис. 51. Термодинамические параметры белок-белковых комплексов AdXhum-CYP. Цифрами обозначены следующие СҮР: 1-СҮРЗА4, 2-СҮРЗА5, 3-СҮР51А1hum, 4-СҮР51А1calb, 5-СҮР2С9hum, 6-СҮР17А1еq, 7-СҮР1В1.

Энтальпийно-зависимые комплексы митохондриальных цитохромов с AdX, для которых он является естественным донором электронов, можно отнести ко второй группе, рис 49 и 52. Комплексы митохондриальных P450 с AdX образуются за счёт изменения энтальпии, либо за счёт вклада как энтальпии, так и энтропии. При 10 ДО 40°С сенсограммы, изменении температуры ОТ соответствующие образованию комплексов митохондриальных CYP c AdX, претерпевали следующие изменения. Незначительно увеличивается скорость образования комплексов (kon возрастает), существенно увеличивается скорость распада комплексов (koff возрастает). Таким образом, при повышении температуры происходит уменьшение аффинности энтальпийно-зависимых комплексов за счёт увеличения koff.



Рис. 52. Термодинамические параметры белок-белковых комплексов AdXhum-СҮР. Цифрами обозначены следующие СҮР: 1-СҮР11А1bov, 2-СҮР11В1hum, 3-СҮР11В2hum.

Однако температурная зависимость комплексов СҮР11В1 и СҮР11В2 достаточно пологая (рис. 49), при этом значение изменения свободной энергии Гиббса велико, -9,6 и -10,3 ккал/моль соответственно. Это указывает на то, что формирование этих комплексов происходит так же за счёт энтропийной компоненты. Отрицательные значения Δ H, по-видимому, свидетельствуют о возникновении новых солевых мостиков и водородных связей как между молекулами партнёров, так и внутримолекулярных. Эти данные согласуются с работами других авторов, в которых была продемонстрирована исключительная важность электростатических взаимодействий для образования комплексов AdX с митохондриальными СҮР.

Следует отметить, что для молекул CPR вне комплексов с цитохромами P450 характерно динамическое равновесие двух конформаций — закрытой и открытой [281]. Комплексы с цитохромами редуктаза образует в открытой конформации, поэтому значения ΔG, ΔH и -TΔS, полученные из температурной зависимости Kd,

характеризуют некий суммарный процесс — не только образование комплекса P450-CPR, но и переход молекул CPR в открытую конформацию. При этом перестройки конформационные В молекуле цитохрома происходят не значительные. Исходя из того, что в живых системах взаимодействие редуктазы с цитохромами P450 так же неразрывно сопряжено с переходом молекул CPR в открытую конформацию, можно считать, что полученные на биосенсоре данные реальные процессы. Адренодоксин индуцирует отражают существенные конформации цитохрома в процессе образования изменения комплекса, перестройки в молекуле AdX не очень существенны. Следовательно, из Kd P450-AdX получаем температурной зависимости комплексов ΜЫ термодинамические параметры самого комплексообразования и изменений конформации цитохрома Р450, которыми оно сопровождается. Таким образом можно утверждать, что полученные в этой работе данные об исключительной роли энтропийной компоненты в формировании комплексов CYP-CPR и CYP-AdX согласуются со сведениями о значительных конформационных изменениях в структуре белков-партнёров при формировании этих комплексов.

Из полученных данных об изменении энергии Гиббса можно предположить, что комплексы цитохромов P450 с редокс-партнёрами занимают промежуточное положение между короткоживущими и долговременными. Для короткоживущих белок-белковых комплексов характерно значение изменения энергии Гиббса больше, чем -8 ккал/моль, для долговременных это значение составляет -15 ккал/моль и ниже [37, 276]. Можно предположить, что времени существования короткоживущего комплекса недостаточно как для конформационных перестроек молекул, принимающих участие во взаимодействии, так и для правильного «узнавания» цитохромом P450 своих редокс-партнёров. Вероятно, как за счёт конформационных изменений, так и за счёт «узнавания» создаются условия для быстрой, эффективной и безопасной передачи электрона.

На рис. 53. в графическом виде представлено разделение ББК СҮР-СҮВ5 на группы, в зависимости от значения энтальпийной и энтропийной компонент.



Рис. 53. Разделение комплексов СҮР-СРК и СҮР-АdХ на группы, в зависимости от значений энтальпийной (ΔΗ) и энтропийной (-TΔS) компонент. Цветом обведена группа энтальпийно-зависимых комплексов AdX с митохондриальными цитохромами P450. Стрелками указаны точки, соответствующие комплексам AdX с CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2.

Можно говорить о том, что редуктаза не отличает микросомальные цитохромы от митохондриальных. Взаимодействуя с цитохромами митохондрий и микросом, CPR образует комплексы, характеризующиеся схожими термодинамическими параметрами. Адренодоксин не только способен отличать митохондриальные цитохромы от микросомальных, но и демонстрирует большую, по сравнению с редуктазой, аффинность к цитохромам Р450. Есть возможность утверждать, что по отношению к цитохромам P450 AdX обладает большей избирательностью и аффинностью, чем CPR. Кроме того, адренодоксин и редуктаза отличаются по способности обеспечивать функционирование цитохромов Р450. НАДФ*Н-P450 цитохромов способна передавать электроны редуктаза не на

129

митохондриальные цитохромы. Адренодоксин, который образует как с микросомальными, так и с митохондриальными цитохромами продуктивные комплексы и осуществляет передачу электрона.

Подводя итог, можно говорить о том, что редуктаза цитохромов Р450 является более «универсальным» партнёром, что касается белок-белковых взаимодействий. Термодинамические параметры комплексов СҮР-СРК мало различаются между митохондриальными микросомальными цитохромами. Адренодоксин И демонстрирует как позитивные, так и негативные изменения энтальпии и энтропии в зависимости от того, с микросомальным или митохондриальным цитохромом происходит взаимодействие. Кроме того полученные данные, свидетельствующие об исключительной важности изменения энтропии для CPR-CYP, формирования подтверждают комплексов справедливость существующих компьютерных моделей этого комплекса. Способность адренодоксина взаимодействовать с микросомальными цитохромами, а CPR с митохондриальными, а так же особенности ферментативной активности таких неканоничных редокс-партнёров и различия между митохондриальной И микросомальной монооксигеназной системой, заслуживает дальнейшего изучения с привлечением биохимических методов. К сожалению, не представлялось возможности провести анализ видовой специфичности, используя CPR и AdX не только от крысы или человека, но и из других организмов. Можно предположить, что видовая специфичность у CPR и AdX по отношению к CYP будет ниже, чем у СҮВ5 по отношению к СҮР. Что соответствует функции AdX и особенно СРR, как универсального донора электронов, в отличии от СҮВ5, который играет роль белка-эффектора, осуществляющего тонкую регуляцию ферментативной активности СҮР.

130

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы были получены значения кинетических констант скорости распада и образования, равновесных констант распада для комплексов цитохромов P450 (СҮРЗА4, СҮРЗА5, СҮР51А1, СҮР51А1calb, СҮР2С9, СҮР1В1, CYP17A1, CYP11A1, **CYP11B1** И **CYP11B2**) с редокс-партнёрами монооксигеназной системы, такими как цитохром P450 редуктаза (CPRrat), адренодоксин (AdXhum) и цитохром b5 (СҮВ5 крысы и человека, изоформы А и В). Использовались белки, принадлежащие разным отрядам млекопитающих, при этом взаимодействие было достаточно избирательным и приводило к образованию прочных комплексов, то есть формировались химерные комплексы, что говорит об эволюционной консервативности интерфейсов межмолекулярного взаимодействия компонентов системы цитохрома Р450. Это согласуется с данными, полученными ранее другими исследователями [133-137]. Однако для ряда цитохромов Р450 CYP11A1, CYP11B1, **CYP11B2**) (CYP17A1, была характерна видовая специфичность межмолекулярных взаимодействий.

Установлено, что комплексы распадались при высокой ионной силе буфера, что подтверждают общую схему взаимодействия цитохромов P450 с CPR, AdX и СҮВ5, а именно важнейшую роль электростатических взаимодействий, где положительный заряд локализован на основных аминокислотах (в первую очередь лизин, реже - аргинин) C, L и J-спиралей P450, а отрицательный — на кислых остатках аспартата и глутамата FMN-домена редуктазы или цитохрома b5. При ковалентной иммобизизации за цитохромов Р450 за аминогруппы были получены значения константы диссоциации комплексов на один-два порядка выше, чем значения, полученные без использования ковалентной карбодиимидной работах 283]. иммобилизации В других [282, При иммобилизации на карбоксиметилдексран чипа партнёров цитохромов Р450 были получены значения, сопоставимые с таковыми в работах других авторов [282-284].

Это подтверждает то, что основные аминокислоты, образующие ионные пары при межмолекулярном взаимодействии, принадлежат цитохрому P450 и модифицируются при иммобилизации таким образом, что межмолекулярные взаимодействия цитохрома с CPR и b5 сильно затрудняются, но молекулярное узнавание при этом не нарушается.

Было обнаружено, что СҮВ5 по отношению к СҮР характеризуется высокой селективностью. Это соответствует функции, которую осуществляет СҮВ5, а именно осуществление тонкой настройки работы монооксигеназной системы. Однако факт образования белок-белковых комплексов in vitro не всегда согласуется с данными биохимических экспериментов, иначе говоря, характерно образование непродуктивных комплексов. Установлено, что функционально активные комплексы СҮР-СҮВ5 образуются за счёт изменения энтальпии. Кроме того, можно говорить о видовой специфичности цитохромов b5 по отношению к ряду СҮР (СҮР17А1, СҮР11А1, СҮР11В1, СҮР11В2), однако этот вопрос требует более глубокого изучения. Цитохром Р450 редуктаза И адренодоксин характеризуются низкой селективностью по отношению к цитохромами Р450. Это соответствует их роли основного поставщика электронов для монооксигеназных систем микросом и митохондрий, включающих десятки различных цитохромов P450. О видовой специфичности CPR и AdX в рамках данной работы говорить трудно, так как были использованы белки из одного вида. Однако можно предположить, что это явление не будет выражено для основных доноров электронов для моноокигеназных систем.

Оптико-биосенсорный анализ межмолекулярных взаимодействий некоторых СҮР с белками-партнёрами уже выполняли ранее другие авторы [282-284]. В этой работе впервые был выполнен массовый анализ белок-белковых взаимодействий компонентов моноокигеназных систем. Это позволило получить новые фундаментальные знания. Впервые было обнаружено разделение комплексов партнёров монооксигеназных систем на группы, в зависимости от ведущего фактора образования комплекса.

Было обнаружено, что цитохром СҮВ5 образует энтальпийно-зависимые комплексы с теми СҮР, по отношению к которым он играет роль аллостерического эффектора. Для СҮРЗА4, СҮРЗА5, СҮР17А1 цитохром b5 играет роль аллостерического регулятора. Таким образом, была подтверждена исключительная важность электростатических взаимодействий для образования комплекса СҮР с аллостерическим регулятором b5. Энтропийно-зависимые комплексы СҮР-СҮВ5 соответствуют тем цитохромам P450, на активность которых СҮВ5 не оказывает влияния. Скорее всего, образование таких комплексов связано с гидрофобными взаимодействиями мембранных доменов СҮР и СҮВ5.

важным фактором образования белок-белковых Было установлено, что комплексов цитохромов P450 с CPR и AdX является изменение энтропии. Редуктаза цитохромов P450 не способна отличать микросомальные И митохондриальные СҮР, комплексы СҮР-СРК образуются за счёт изменения энтропии, $\Delta H>0$ и-T $\Delta S<0$. Адренодоксин способен различать микросомальные и митохондриальные цитохромы. С микросомальными цитохромами P450 адренодоксин взаимодействует за счёт изменения энтропии, $\Delta H>0$ и -T $\Delta S<0$. Комплексы адренодоксина с митохондриальным цитохромом CYP11A1bov образуются за счёт изменения энтальпии ($\Delta H < 0$, -T $\Delta S > 0$). С другими CYP11B1hum и CYP11B2hum, митохондрий, цитохромами адренодоксин взаимодействует за счёт изменений энтальпии и энтропии, $\Delta H < 0$ и -T $\Delta S < >0$. Таким образом, по отношению к цитохромам Р450 адренодоксин проявляет большую избирательность, чем CPR. Можно предположить, что это связано с тем, что в митохондриях локализовано множество окислительно-восстановительных ферментных систем, тогда как с микросомах моноокигеназная система цитохрома Р450 доминирует. Вместе с тем, в митохондриях человека локализовано не более десятка цитохромов Р450, тогда как в микросомах сосредоточено большинство CYP человека настоящее время 50 (в известно порядка различных

микросомальных цитохромов P450). Таким образом адренодоксин должен проявлять большую селективность и специфичность для доставки электронов митохондриальным цитохромам. Тогда как CPR способна поставлять электроны не только цитохромам P450, но и ряду других ферментов, осуществляющих окислительно-восстановительные реакции (гем оксидаза, сквален оксидаза).

B настоящее время нет однозначно определённого механизма взаимодействия молекул редокс-партнёров монооксигеназной системы цитохрома Р450. Данные о термодинамических параметрах комплексов цитохромов Р450 с белками-партнёрами играют важную роль понимания для механизмов взаимодействия белков-компонентов монооксигеназной системы. В настоящее время недостаточно сведений о термодинамике комплексов цитохромов Р450 с белками-партнёрами. Эти данные необходимы для выявления общих принципов и закономерностей межмолекулярных взаимодействий компонентов монооксигеназных систем. Поэтому важно получение фундаментальных знаний о белок-белковых термодинамических параметрах комплексов партнёров монооксигеназной системы. Кроме того, эти сведения могут быть полезны для валидации имеющихся компьютерных моделей комплексов цитохромов Р450 с белками-партнёрами. Модели белок-белковых комплексов важны для понимания межмолекулярных взаимодействий. Уточнение механизмов механизмов межмолекулярного узнавания позволит создавать ингибиторы взаимодействий между партнёрами в системе цитохрома Р450. Эти вещества могут быть перспективными лекарственными средствами. Так же более тонкое понимание структуры интерфейса позволяет оценить расстояние между простетическими группами и их взаимоориентацию, что важно для уточнения механизма передачи электрона при работе монооксигеназной системы цитохрома Р450.

Планируются дальнейшие исследования в этой области с применением методов компьютерного моделирования, анализа биохимической активности, направленного мутагенеза. Данная работа была выполнена в рамках

134

международных грантов РФФИ (совместно с Институтом биоорганической Химии Национальной Академии Наук республики Беларусь) 10-04-90026-Бел_а «Механизмы белок-белковых взаимодействий и электронного транспорта в цитохром Р450 зависимых монооксигеназных системах», «Биосенсорный анализ консервативных молекулярных узнаваний белков-партнёров Р450-зависимых монооксигеназных систем» 14-04-31816 мол_а, и 11-04-01107-а «Исследование специфичности молекулярного узнавания в системе цитохрома Р450(51) человека», а так же государственного контракта № 16.740.11.0372 «Интерактомика белков 18-ой хромосомы человека».

выводы

1. Выполнен глубокий массовый анализ белок-белковых взаимодействий компонентов монооксигеназных систем, получены кинетические и равновесные константы, рассчитаны термодинамические параметры. Для комплексов цитохромов P450 с белками-партнёрами наиболее характерны значения Kd от 0,01 до 5 мкМ.

2. Обнаружено образование комплексов СРК и СҮВ5 крысы с цитохромами Р450 человека (СҮРЗА4, СҮРЗА5, СҮР1В1), адренодоксина человека с цитохромами Р450 лошади (СҮР17А1) и быка (СҮР11А1), что позволяет говорить о консервативности межмолекулярных взаимодействий между некоторыми белками-партнёрами монооксигеназных систем.

3. Обнаружено, что цитохромы CYP17A1eq, CYP11A1bov, CYP11B1hum, CYP11B2hum, взаимодействовали только с CYB5hum, но не с CYB5rat. Таким образом для ряда цитохромов характерна относительная видовая специфичность.

4. Показано, что если СҮВ5 является аллостерическим эффектором СҮР, то для таких комплексов характерны значения $\Delta H < 0$ и -T $\Delta S > 0$. В том случае, если СҮВ5 не оказывает влияния на активность СҮР, комплексы характеризуются значениями $\Delta H > 0$, -T $\Delta S < 0$.

5. Обнаружено, CPR ЧТО комплексы С микросомальными И митохондриальными цитохромами P450 характеризуется одинаковыми Kd. Комплексы CPR-CYP образуются за счёт изменения энтропии, значения $\Delta H>0$ и - $T\Delta S < 0$. Адренодоксин способен различать микросомальные и митохондриальные взаимодействуя с митохондриальными цитохромами цитохромы, счёт за изменений энтальпии и энтропии ($\Delta H < 0$ и -T $\Delta S < >0$), а с микросомальными СҮР за счёт изменения энтропии ($\Delta H > 0$ и -T $\Delta S < 0$).

Благодарности

Хочу выразить благодарность моему научному руководителю, д.б.н., профессору Иванову A.C. за руководство, коллективу лаборатории межмолекулярных взаимодействий ИБМХ за содействие и поддержку, а так же коллегам из Института биоорганической Химии Национальной Академии Наук профессора руководством республики Беларусь под Усанова C.A. за предоставление препаратов высокоочищеных рекомбинантных компонентов моноокигеназных систем и консультирование по ряду вопросов.

Список литературы.

1 Арчаков А. И., Микросомальное окисление, М., 1975

2 Omura, T., and Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. J. Biol. Chem. 237, 1375-1376

3 Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., and Rosenthal, O. (1963) The light reversible carbon monoxide inhibition of the steroid C21-hydroxylase system of the adrenal cortex. Biochem. Z. 338, 741-755

4 Lu, A.Y.H., and Coon, M.J. (1968) Role of hemoprotein P-450 in fatty acid ohydroxylation in a soluble enzyme system from liver microsomes. J. Biol. Chem. 243, 1331-1332

5 Harding, B.W., Wong, S.H., and Nelson, D.H. (1964) Carbon monoxidecombining substances in rat adrenal. Biochim. Biophys. Acta. 92, 415-417

6 Omura, T., Sanders, E., Estabrook, R.W., Cooper, D.Y., and Rosenthal, O. (1966) Isolation from adrenal cortex of a nonheme iron protein and a flavoprotein functional as a reduced triphosphopyridine nucleotide-cytochrome P450 reductase. Arch. Biochem. Biophys. 117, 660-673

7 Watson, C.J.W., Froelich, J.E., Josefsson, C.A., Chapple, C., Durst, F., Benveniste, I., and Coolbaugh, R.C. (2001) Localization of CYP86B1 in the outer envelope of chloroplasts. Plant Cell Physiol. 42, 873-878

8 Appleby, C.A. (1967) A soluble haemoprotein P-450 from nitrogen-fixing
Rhizobium bacteroids. Biochim. Biophys. Acta 147, 399402 Katagiri, M., Ganguli,
B.N., and Gunsalus, I.C. (1968) A soluble cytochrome P-450 functional in methylene
hydroxylation. J. Biol. Chem. 243, 3543-3546

9 Cardini, G., and Jurtshuk, P. (1968) Cytochrome P-450 involvement in the oxidation of n-octane by cell-free extracts of Corynebacterium sp. Strain 7E1C. J. Biol. Chem. 243, 6070-6072

10 Narhi, L.O., and Fulco, A.J. (1987) Identification and characterization of two

functional domains in cytochrome P-450 BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by bartiturates in B. metgatelium. J. Biol. Chem. 262, 6683-6690

11 Rahintula, A.D., and O'Brien, P.J. (1975) Hydroperoxide dependent Odealkylation reactions catalyzed by liver microsomal cytochrome P-450. Biochem.Biophys. Res. Commun. 62, 268-275

12 Hrycay, E.G., Gustafsson, J., Ingelman-Sundberg, M., and Ernster, L. (1975) Sodium periodate, sodium chlorite, organic hydroperoxide, and H2O2 as hydroxylating agents in steroid hydroxylation reactions catalyzed by partially purified cytochrome P-450. Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 209-216

13 DeWitt, D.J., and Smith, W.L. (1983) Purification of prostacyclin synthase from bovine aorta by immunoaffinity chromatography. Evidence that the enzyme is hemoprotein. J. Biol. Chem. 258, 3285-3293

14 Nakahara, K., Tanimoto, T., Hatano, K., Usuda, K., and Shoun, H. (1993) Cytochrome P-450 55A1 (P-450 dNIR) acts as nitric oxide reductase employing NADH as the direct electron donor. J. Biol. Chem. 268, 8350-8355

15 Sakaguchi, M., Mihara, K., and Sato, R. (1987) A short amino-terminal segment of microsomal cytochrome P-450 functions both as an insertion signal and as a stoptransfer sequence. EMBO J. 6, 2425-2431

16 Kida, Y., Ohgiya, S., Mihara, K., and Sakaguchi, M. (1998) Membrane topology of NADPH-cytochrome P450 reductase on the endoplasmic reticulum. Arch. Biochem. Biophys. 351, 175-179

17 Henderson, C.J., Otto, D.M., Carie, D., Magnuson, M.A., Laren, A.W., Rosewell,
I., and Wolf, C.R. (2003) Inactivation of hepatic cytochrome P450 system by
conditional deletion of hepatic cytochrome P450 reductase. J. Biol. Chem. 278, 1348013486

18 Akiyama I., Tomiyama K., Sakaguchi M., Takaishi M., Mori M., Hosok M., Nagamori S., Shimizu N., Huh N., Miyazaki M. (2004) Int. J. Mol. Med., 14 663-668.

19 Rettie AE, Jones JP (2005). Clinical and toxicological relevance of CYP2C9:

drug-drug interactions and pharmacogenetics. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 45: 477– 94

20 Badal S, Delgoda R. CYP1B1: Friend OR Foe? A critical review. OA Biochemistry 2013 Apr 01;1(1):8

21 Lepesheva, Galina I., and Michael R. Waterman. "Sterol 14α-Demethylase Cytochrome P450 (CYP51), a P450 in All Biological Kingdoms." *Biochim Biophys Acta*. 2008. 1770(3): 467-77.

22 Interaction of apo-cytochrome b5 with cytochromes P4503A4 and P45017A: relevance of heme transfer reactions. Guryev OL, Gilep AA, Usanov SA, Estabrook RW. Biochemistry. 2001 Apr 24;40(16):5018-31.

23 Iyanagi T, Mason HS. Biochemistry. 1973; 12:2297–2308. [PubMed: 4145653]

24 Vermilion JL, Coon MJ. J. Biol. Chem. 1978; 253:8812–8819. [PubMed: 31362]

25 Roman, LJ.; Masters, BS. Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Devlin, TM., editor.

26 Iyanagi T. Int. Rev. Cytol. 2007; 260:35–112. [PubMed: 17482904]

27 Munro AW, Girvan HM, McLean KJ. Nat. Prod. Rep. 2007; 24:585-609.

[PubMed: 17534532]

28 Laursen T, Jensen K, Moller BL. Biochim. Biophys. Acta. 2011; 1814:132–138. [PubMed:20624491]

29 Mowat CG, Gazur B, Campbell LP, Chapman SK. Arch. Biochem. Biophys. 2010; 493:37–52.

30 Hay S, Brenner S, Khara B, Quinn AM, Rigby SE, Scrutton NS. J. Am. Chem. Soc. 2010;132:9738–9745. [PubMed:20572660]

31 Pudney CR, Heyes DJ, Khara B, Hay S, Rigby SE, Scrutton NS. FEBS J. 2012; 279:1534–1544. [PubMed: 22142452]

32 Ellis J, Gutierrez A, Barsukov IL, Huang WC, Grossmann JG, Roberts GC. J. Biol. Chem. 2009;284:36628–36637. [PubMed: 19858215]

33 Vincent B, Morellet N, Fatemi F, Aigrain L, Truan G, Guittet E, Lescop E. J. Mol. Biol. 2012;420:296–309. [PubMed: 22543241] 34 Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BS, Kim JJ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.1997; 94:8411–8416. [PubMed: 9237990]

35 Xia C, Panda SP, Marohnic CC, Martasek P, Masters BS, Kim JJ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011; 108:13486–13491. [PubMed: 21808038]

36 Pudney CR, Khara B, Johannissen LO, Scrutton NS. PLoS Biol. 2011; 9 e1001222.

37 Bashir Q, Scanu S, Ubbink M. FEBS J. 2011; 278:1391–1400. [PubMed: 21352493]

38 Zhao Q, Modi S, Smith G, Paine M, McDonagh PD, Wolf CR, Tew D, Lian LY, Roberts GC, Driessen HP. Protein Sci. 1999; 8:298–306. [PubMed: 10048323]

39 Taniguchi H, Imai Y, Iyanagi T, Sato R. Biochim. Biophys. Acta. 1979; 550:341–356. [PubMed:103585]

40 Backes WL, Kelley RW. Pharmacol. Ther. 2003; 98:221–233. [PubMed: 12725870]

41 Cojocaru V, Balali-Mood K, Sansom MS, Wade RC. PLoS Comput Biol. 2011; 7:1–14.

42 Gut, J., Richter, C., Cherry, R.J., Winterhalter, K.H., and Kawato, S. (1982) Rotation of cytochrome P-450. II. Specific interactions of cytochrome P-450 reductase in phospholipid vesicles. J. Biol. Chem. 257, 7030-7036

43 Kuznetsov, V.Y., Ivanov, Y.D., and Archakov, A.I. (2004) Atomic force microscopy revelation of molecular complexes in the multiprotein cytochrome P450 2B4 containing system. Proteomics. 4, 2390-2396

44 Miwa, G.T., and Lu, A.Y.H. (1984) The association of cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase in phospholipids membranes. Arch. Biochem. Biophys. 234, 161-166

45 Cohen, B.S., and Estabrook, R.W. (1971) Microsomal electron transport reactions. II. The use of reduced triphosphopyridine nucleotide and/or reduced diphosphopyridine nucleotide for the oxidative N-demethylation of aminopyrine and other drug substrates. Arch. Biochem. Biophys. 143, 46-53 46 Hamdane D, Xia C, Im SC, Zhang H, Kim JJ, Waskell L. J. Biol. Chem. 2009; 284:11374–11384. [PubMed: 19171935]

47 Bridges A, Gruenke L, Chang YT, Vakser IA, Loew G, Waskell L. J. Biol. Chem. 1998; 273:17036–17049. [PubMed:9642268]

48 Johnson EF. Drug Metab. Dispos. 2003; 31:1532–1540. [PubMed: 14625350]

49 Im SC, Waskell L. Arch. Biochem. Biophys. 2011; 507:144–153. [PubMed: 21055385]

50 Im SC, Waskell L. Arch. Biochem. Biophys. 2011; 507:144–153. [PubMed: 21055385]

51 Kenaan C, Zhang H, Shea EV, Hollenberg PF. Biochemistry. 2011; 50:3957– 3967. [PubMed:21462923]

52 Huang WC, Ellis J, Moody PC, Raven EL, Roberts GC (2013) Redox-linked domain movements in the catalytic cycle of cytochrome p450 reductase. Structure 21(9):1581–1589

53 Sevrioukova IF, Li H, Zhang H, Peterson JA, Poulos TL (1999) Structure of a cytochrome P450-redox partner electron-transfer complex. Proc Natl Acad Sci USA 96(5):1863–1868.

54 Black SD, Coon MJ. J. Biol. Chem. 1982; 257:5929–5938. [PubMed: 6802823]

55 Ellis J, Gutierrez A, Barsukov IL, Huang WC, Grossmann JG, Roberts GC. J. Biol. Chem. 2009;284:36628–36637. [PubMed: 19858215]

56 Iyanagi T. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005; 338:520–528. [PubMed: 16125667]

57 Iyanagi T, Mason HS. Biochemistry. 1973; 12:2297–2308. [PubMed: 4145653]

58 Enoch HG, Strittmatter P. J. Biol. Chem. 1979; 254:8976–8981. [PubMed:

113406]

59 Gu, J., Weng, Y., Zhang, Q.Y., Cui, H., Behr, M., Wu, L., Yang, W., and Zhang, L. (2003) Liver-specific deletion of the NADPH-cytochrome P450 reductase gene. Impact on plasma cholesterol homeostasis and the function and regulation of microsomal cytochrome P450 and heme oxygenase. J. Biol. Chem. 278, 25895-25910

60 Richter, C., Winterhalter, K.H., and Cherry, R.J. (1979) Rotational diffusion of cytochrome P-450 in Rat Liver Microsomes. FEBS Lett. 102, 151-154

61 Yamano S, Aoyama T, McBride OW, Hardwick JP, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Mol. Pharmacol. 1989; 36:83–88. [PubMed: 2501655]

62 Wang M, Roberts DL, Paschke R, Shea TM, Masters BS, Kim JJ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997; 94:8411–8416. [PubMed: 9237990]

63 Xia C, Panda SP, Marohnic CC, Martasek P, Masters BS, Kim JJ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011; 108:13486–13491. [PubMed: 21808038]

64 Shen AL, O'Leary KA, Kasper CB. J. Biol. Chem. 2002; 277:6536-6541.

[PubMed: 11742006]

65 Otto DM, Henderson CJ, Carrie D, Davey M, Gundersen TE, Blomhoff R, Adams

RH, Tickle C, Wolf CR. Mol. Cell. Biol. 2003; 23:6103–6116. [PubMed: 12917333] 66 Guengerich FP. Chemical Res. Toxicol. 2008; 21:70–83.

67 Guengerich FP, Cheng Q. Pharmacol. Rev. 2011; 63:684–699. [PubMed: 21737533]

68 Shen AL, Kasper CB. J. Biol. Chem. 1995; 270:27475–27480. [PubMed: 7499204]

69 Shen AL, Porter TD, Wilson TE, Kasper CB. J. Biol. Chem. 1989; 264:7584– 7589. [PubMed:2708380]

70 Y. Yu, H. Yamasaki, K. Kita, and S. Takamiya, Purification and molecular characterization of a novel b5-type cytochrome of the parasitic nematode, Ascaris suum. Arch Biochem Biophys 328 (1996) 165-72.

71 A. Altuve, S. Silchenko, K.H. Lee, K. Kuczera, S. Terzyan, X. Zhang, D.R. Benson, and M. Rivera, Probing the differences between rat liver outer mitochondrial membrane cytochrome b5 and microsomal cytochromes b5. Biochemistry 40 (2001) 9469-83.

72 P. Strittmatter, The nature of the heme binding in microsomal cytochrome b5. J Biol Chem 235 (1960) 2492-7.

73 A.S. Ivanov, V.S. Skvortsov, and A.I. Archakov, [Computer modeling of the

three-dimensional structure of full-length cytochrome B5]. Vopr Med Khim 46 (2000) 615-25.

74 G. Vergeres, J. Ramsden, and L. Waskell, The carboxyl terminus of the membrane-binding domain of cytochrome b5 spans the bilayer of the endoplasmic reticulum. J Biol Chem 270 (1995) 3414-22.

75 R. Kuroda, T. Ikenoue, M. Honsho, S. Tsujimoto, J.Y. Mitoma, and A. Ito, Charged amino acids at the carboxyl-terminal portions determine the intracellular locations of two isoforms of cytochrome b5. J Biol Chem 273 (1998) 31097-102.

76 S.F. Velick, and P. Strittmatter, The oxidation-reduction stoichiometry and potential of microsomal cytochrome. J Biol Chem 221 (1956) 265-75.

77 A. Perret, and D. Pompon, Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and b5 rules uncoupling mechanisms. Biochemistry 37 (1998) 11412-24.

78 Vergeres G,Waskell L. Cytochrome*b*5, its functions, structure and membrane topology. Biochimie 1995;77:604–620.

79 Conney AH, Brown RR, Miller JA, Miller EC. The metabolism of methylated aminoazo dyes. VI. Intracellular distribution and properties of the demethylase system. Cancer Res 1957;17:628–633.

80 Correia MA, Mannering GJ. DPNH synergism of TPNHdependent mixed function oxidase reactions. Drug Metab Dispos 1973;1:139–149.

81 Mannering GJ, Kuwahara S, Omura T. Immunochemical evidence for the participation of cytochrome *b5* in the NADH synergism of the NADPH-dependent monooxidase system of hepatic microsomes. Biochem Biophys Res Commun 1974;57:476–481

82 NoshiroM, Harada N, Omura T. Immunochemical study on the participation of cytochrome *b*5 in drug oxidation reactions of mouse liver microsomes. Biochem Biophys Res Commun 1979;91:207–213.

83 Oshino N, Imai Y, Sato R. A function of cytochrome *b*5 in fatty acid desaturation by rat liver microsomes. J Biochem (Tokyo) 1971;69:155–167.
84 Hildebrandt, A., and Estabrook, R.W. (1971) Evidence for the participation of cytochrome b5 in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. Arch. Biochem. Biophys. 143, 66-79

85 Noshiro, M., Ullrich, V., and Omura, T. (1981) Cytochrome b5 as electron donor for oxy-cytochrome P-450. Eur. J. Biochem. 116, 521-526

86 Yamazaki, H., Johnson, W.W., Ueng, Y.F., Shimada, T., and Guengerich, F.P. (1996) Lack of electron transfer from cytochrome b5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. J. Biol. Chem. 271, 27438-27444

87 Auchus, R.J., Lee, T.C., and Miller, W.L. (1998) Cytochrome b5 augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. J. Bio. Chem. 273, 3158-3165

88 Guryev, O.L., Gilep, A.A., Usanov, S.A., and Estabrook, R.W. (2001) Interaction of apo- cytochrome b5 with cytochrome P450 3A4 and P450 17A Relevance of heme transfer reactions. Biochemistry. 40, 5018-5031

89 Yamazaki, H., Shimada, T., Martin, M.V., and Guengerich, F.P. (2001) Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo- cytochrome b5: Evidence against transfer of heme from cytohrome P450 3A4 to apocytochrome b5 or heme oxygenase. J. Biol. Chem. 276, 30885-30891

90 Reed, J.R., and Hollenberg, P.F. (2003) Examining the mechanism of stimulation of cytochrome P450 by cytochrome b5: The effect of cytochrome b5 on the interaction between cytochrome P450 2B4 and P450 reductase. J. Inorg. Biochem. 97, 265-275

91 Onoda, M., and Hall, P.F. (1982) Cytochrome b5 stimulates purified testicular microsomal cytochrome P-450 (C-21 side-chain cleavage). Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 454-460

92 Kominami, S., Ogawa, N., Morimune, R., Huang, D.Y., and Takemori, S. (1992) The role of cytochrome b5 in adrenal microsomal steroidogenesis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 42, 57-64

93 Katagiri, M., Kagawa, N., and Waterman, M.R. (1995) The role of cytochrome b5 in the biosynthesis of androgens by human P450c17. Arch. Biochem. Biophys. 317,

343-347

94 Ito, A. (1980) Cytochrome b5-like hemoprotein of outer mitochondrial membrane, OM cytochrome b. J. Biochem. 87, 63-71

95 Kuwahara S, Mannering GJ. Evidence for a predominantly NADH-dependent Odealkylating system in rat hepatic microsomes. Biochem Pharmacol 1985;34:4215– 4228.

96 Yamazaki H, Nakano M, Imai Y, Ueng YF, Guengerich FP, Shimada T. Roles of cytochrome *b*5 in the oxidation of testosterone and nifedipine by recombinant cytochrome P450 3A4 and by human liver microsomes. Arch Biochem Biophys 1996;325:174–182.

97 Yamazaki H, Johnson WW, Ueng YF, Shimada T, Guengerich FP. Lack of electron transfer fromcytochrome *b*5 in stimulation of catalytic activities of cytochrome P450 3A4. Characterization of a reconstituted cytochrome P450 3A4/NADPHcytochrome P450 reductase system and studies with apo-cytochrome *b*5. J Biol Chem 1996;271:27438–27444

98 Yamazaki H, Nakano M, Gillam EM, Bell LC, Guengerich FP, Shimada T. Requirements for cytochrome *b5* in the oxidation of 7-ethoxycoumarin, chlorzoxazone, aniline, and *N*-nitrosodimethylamine by recombinant cytochrome P450 2E1 and by human liver microsomes. Biochem Pharmacol 1996;52:301–309.

99 Cooper MT, Porter TD. Cytochrome *b*5 coexpression increases the CYP2E1dependent mutagenicity of dialkylnitrosamines in methyltransferase-deficient strains of *Salmonella typhimurium*. Mutat Res 2001;484:61–68.

100 Cooper MT, Porter TD. Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferasedeficient strains of Salmonella typhimurium coexpressing human cytochrome P450 2E1 and reductase. Mutat Res 2000;454:45–52.

101 Shen AL, O'Leary KA, Kasper CB. Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. J Biol Chem 2002;277:6536–6541.

102 Lu AY, West SB, Vore M, Ryan D, Levin W. Role of cytochrome b5 in

hydroxylation by a reconstituted cytochrome P-450-containing system. J Biol Chem 1974;249:6701–6709.

103 Guengerich FP. Oxidation–reduction properties of rat liver cytochromes P-450 and NADPH-cytochrome p450 reductase related to catalysis in reconstituted systems. Biochemistry 1983;22:2811–2820.

104 Tamburini PP, White RE, Schenkman JB. Chemical characterization of protein–protein interactions between cytochrome P450 and cytochrome *b*5. J Biol Chem 1985;260:4007–4015.

105 Tamburini PP, Schenkman JB. Mechanism of interaction between cytochromes P450 RLM5 and *b*5: Evidence for an electrostatic mechanism involving cytochrome *b*5 heme propionate groups. Arch Biochem Biophys 1986;245:512–522.

106 Bonfils C, Balny C, Maurel P. Direct evidence for electron transfer from ferrous cytochrome *b*5 to the oxyferrous intermediate of liver microsomal cytochrome P-450 LM2. J Biol Chem 1981;256:9457–9465.

107 Tamburini PP, Schenkman JB. Purification to homogeneity and enzymological characterization of a functional covalent complex composed of cytochromes P-450 isozyme 2 and *b*5 from rabbit liver. Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:11–15.

108 Schenkman JB, Voznesensky AI, Jansson I. Influence of ionic strength on the P450 monooxygenase reaction and role of cytochrome *b*5 in the process. Arch Biochem Biophys 1994;314:234–241.

109 35. Guengerich FP, Johnson WW. Kinetics of ferric cytochrome P450 reduction by NADPH-cytochrome P450 reductase: Rapid reduction in the absence of substrate and variations among cytochrome P450 systems. Biochemistry 1997;36:14741–14750.

110 Bridges A, Gruenke L, Chang YT, Vakser IA, Loew G, Waskell L. Identification of the binding site on cytochrome P450 2B4 for cytochrome *b*5 and cytochrome P450 reductase. J Biol Chem 1998;273:17036–17049.

111 Morgan ET, Coon MJ. Effects of cytochrome *b*5 on cytochrome P-450-

catalyzed reactions. Studies with manganese-substituted cytochrome *b*5. Drug Metab Dispos 1984;12:358–364.

112 Guryev OL, Gilep AA, Usanov SA, Estabrook RW. Interaction of apocytochrome *b*5 with cytochromes P4503A4 and P45017A: Relevance of heme transfer reactions. Biochemistry 2001;40:5018–5031.

113 Yamazaki H, ShimadaT, MartinMV, GuengerichFP. Stimulation of cytochrome P450 reactions by apo-cytochrome *b*5: Evidence against transfer of heme from cytochrome P450 3A4 to apo-cytochrome *b*5 or heme oxygenase. J BiolChem 2001;276:30885–30891.

Yamazaki H, Gillam EM, Dong MS, Johnson WW, Guengerich FP,
Shimada T. Reconstitution of recombinant cytochrome P450 2C10(2C9) and
comparison with cytochrome P450 3A4 and other forms: Effects of cytochrome P450–
P450 and cytochrome P450–b5 interactions. Arch Biochem Biophys 1997;342:329–337.

115 Loughran PA, Roman LJ, Miller RT, Masters BS. The kinetic and spectral characterization of the *E. Coli*-expressed mammalian CYP4A7: Cytochrome *b5* effects vary with substrate. Arch Biochem Biophys 2001;385:311–321.

116 Yamazaki H, Nakamura M, Komatsu T, Ohyama K, Hatanaka N, Asahi S, Shimada N, Guengerich FP, Shimada T, Nakajima M, Yokoi T. Roles of NADPH-P450 Reductase and Apo- and Holo-Cytochrome *b*5 on Xenobiotic Oxidations Catalyzed by 12 Recombinant Human Cytochrome P450s Expressed in Membranes of *Escherichia coli*. Protein Expr Purif 2002;24:329–337.

117 Auchus RJ, Lee TC, Miller WL. Cytochrome *b5* augments the 17,20-lyase activity of human P450c17 without direct electron transfer. J Biol Chem 1998;273:3158–3165.

118 Aoyama T, Nagata K, Yamazoe Y, Kato R, Matsunaga E, Gelboin HV, Gonzalez FJ. Cytochrome *b5* potentiation of cytochrome P-450 catalytic activity demonstrated by a vaccinia virus-mediated in situ reconstitution system. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:5425–5429.

119 Pompon D, Perret A, Bellamine A, Laine R, Gautier JC, Urban P.

Genetically engineered yeast cells and their applications. Toxicol Lett 1995;82/83:815–822.

120 VoiceMW, Zhang Y,Wolf CR, Burchell B, Friedberg T. Effects of human cytochrome *b*5 on CYP3A4 activity and stability in vivo. Arch Biochem Biophys 1999;366:116–124.

121 Mason JI, EstabrookRW, Purvis JL. Testicular cytochrome P450 and iron– sulfur protein as related to steroid metabolism. Ann NY Acad Sci 1973;212:406–419.

122 Yanase T, Sasano H, Yubisui T, Sakai Y, Takayanagi R, Nawata H. Immunohistochemical study of cytochrome b5 in human adrenal gland and in adrenocortical adenomas from patients with Cushing's syndrome. Endocrinol J 1998;45:89–95.

123 Brock BJ, Waterman MR. Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species. Biochemistry 1999;38:1598–1606.

124 Geller DH, Auchus RJ, Miller WL. P450c17 mutations R347H and R358Q selectively disrupt 17,20-lyase activity by disrupting interactions with P450 oxidoreductase and cytochrome *b*5. Mol Endocrinol 1999; 13: 167–175.

125 Lederer, F., Ghrir, R., Guiard, B., Cortial, S., and Ito, A. (1983) Two homologous cytochrome b5 in a single cell. Eur. J. Biochem. 132, 95-102

126 Ogishima, T., Kinoshita, J., Mitani, F., Suematsu, M., and Ito, A. (2003) Identification of outer mitochondrial cytochrome b5 as a modulator for androgen synthesis in Leydig cells. J. Biol. Chem. 278, 21204-21211

127 Soucy, P., and Luu-The, V. (2002) Assessment of the ability of type 2 cytochrome b5 to modulate 17, 20-lyase activity of human P450c17. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 80, 71-75

128 Murakami, K., Mihara, K., and Omura, T. (1994) The transmembrane region of microsomal cytochrome P450 identified as the endoplasmic reticulum retention signal. J. Biochem. 116, 164-175

129 Szeczesna-Skorupa, E., Ahn, K., Chen, C.D., Doray, B., and Kemper, B.

(1995) The cytoplasmic and N-terminal transmembrane domains of cytochrome P450 contain independent signals for retention in the endoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 270, 24327-24333

130 Szczesna-Skorpa, E., and Kemper, B. (2000) Endoplasmic retention determinants in the transmembrane and linker domains of cytochrome P450 2C1. J. Biol. Chem. 275, 19409-19415

131 Amarneh, B.A., and Simpson, E.R. (1996) Detection of aromatase cytochrome P450, 17a-hydroxylase cytochrome P450 and NADPH-P450 reductase on the surface of cells in which they are expressed. Mol. Cell. Endocrinol. 119, 69-74

132 Neve, E.P.A., and Ingelman-Sundberg, M. (2000) Molecular basis for the transport of cytochrome 2E1 to the plasma membrane. J. Biol. Chem. 275, 17130-17135

133 Robin, M.A., Maratrat, M., Loeper, J., Durand-Schneider, A.M., Tinet, M., Ballet, F., Beaune, P., Feldman, G., and Passayre, D. (1995) Cytochrome P450 2B follows a vesicular route to the plasma membrane in cultured rat hepatocytes. Gastroenterol. 108, 1110-1123

Robin, M.A., Maratrat, M., LeRoy, M., LeBretton, F.P., Bonierbale, E.,
Dansette, P., Ballet, F., Mansuy, D., and Passayre, D. (1996) Antigenic targets in
Tienillic acid hepatitis: Both cytochrome P450 2C11 and 2C11-tienillic acid adducts are
transported to the plasma membrane of rat hepatocytes and recognized by human sera.
J. Clin. Invest. 98, 1471-1480

Yamamoto, A.M., Mura, C., De Lemos-Chiarandini, C., Krishnamoorthy,
R., and Alvarez, F. (1993) Cytochrome IID6 recognized by LKM1 antibody is not
exposed on the surface of hepatocytes. Clin. Exp. Immunol. 92, 381-390

136 Omura, T. (2006) Mitochondrial P450s. Chemico-Biol. Interaction 163,86-93

137 Churchill, P.F., and Kimura, T. (1979) Topological studies of cytochrome P-450scc andnP-45011b in bovine adrenocortical inner mitochondrial membranes. Effects of controlled tryptic digestion. J. Biol. Chem. 254, 10443-10448

138 Suzuki, k., and Kimura, T. (1965) An iron protein as a component of steroid

11b-hydroxylase complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 340-345

Headlam, M., Wilce, M.C.J., and Tuckey, R.C. (2003) The F-G loop region of cytochrome P450scc (CYP11A1) interact with the phospholipids membrane.
Biochim. Biophys. Acta. 1617, 96-108

140 Mitani, F., Ishimura, Y., Izumi, S., and Watanabe, K. (1979) Immunohistochemical localization of adrenodoxin and adrenodoxin reductase in bovine adrenal cortex. Acta Endocrinol. 90, 317-327

141 Hatano, O., Sagara, Y., Omura, T., and Takakusu, A. (1989)Immunohistochemical localization of adrenodoxin in bovine adrenal cortex by proteinA-gold technique. Histochem. 91, 89-97

142 Lambeth, J.D., Geren, L.M., and Millett, F. (1984) Adrenodoxin interaction with adrenodoxin reductase and cytochrome P450scc. Cross-linking of protein complexes and effects of adrenodoxin modification by 1-ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)carbodiimide. J. Biol. Chem. 259, 10025-10029

Hara, T., and Kimura, T. (1989) Active complex between adrenodoxin
reductase and adrenodoxin in the cytochrome P450scc reduction reaction. J. Biochem.
105, 601-605

Sakaki, T., Kominami, S., Hayashi, K., Akiyoshi-Shibata, M., and
Yabusaki, Y. (1996) Molecular engineering study on electron transfer from NADPHP450 reductase to rat mitochondrial P450c27 in yeast microsomes. J. Biol. Chem. 271, 26209-26213

145 Hanukoglu I (Dec 1992). "Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis.". *J Steroid Biochem Mol Biol* 43 (8): 779–804.

146 Toshihiro Tajima, Kenji Fujieda, Naoya Kouda, Jun Nakae, and Walter L. Miller "Heterozygous mutation in the cholesterol side chain cleavage enzyme (p450scc) gene in a patient with 46,XY sex reversal and adrenal insufficiency." J Clin Endocrinol Metab. 2001 Aug;86(8):3820-5.

147 Kawamoto T, Mitsuuchi Y, Toda K, Yokoyama Y, Miyahara K, Miura S,

Ohnishi T, Ichikawa Y, Nakao K, Imura H (February 1992). "Role of steroid 11 betahydroxylase and steroid 18-hydroxylase in the biosynthesis of glucocorticoids and mineralocorticoids in humans". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (4): 1458–62.

Lehnerer, M., Schulze, J., Bernhardt, R., and Hlavica, P. (1999) Some properties of mitochondrial adrenodoxin associated with its non-mitochondrial electron donor functional toward rabbit liver microsomal cytochrome P450 2B4. (1999). Biochem. Biophys. Res. Coomun. 254, 83-87

Pechurskaya, T.A., Harastai, I.N., Grabovec, I.P., Gilep, A.A., and Usanov,
 S.A. (2007) Adrenodoxin supports reactions catalyzed by microsomal steroidogenic
 cytochrome P450s. Biochem. Biophys. Res. Commun. 353, 598-604

Honkakoski, P., Kojo, A., Raunio, M., Pasanen, R., Juvonen, R., and Lang,
M.A. (1988) Hepatic mitochondrial coumarin 7-hydroxylase; comparison with the
microsomal enzyme. Arch. Biochem. Biophys. 267, 558-567

151 M. Bruschi, F. Guerlesquin, Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins, FEMS Microbiol. Rev. 4 (1988) 155–175.

152 K.N. Degtyarenko, T.A. Kulikova, Evolution of bioinorganic motifs in P450-containing systems, Biochem. Soc. Trans. 29 (2001) 139–147.

153 J. Meyer, Ferredoxins of the third kind, FEBS Lett. 509 (2001) 1–5.

M. Kostic, S.S. Pochapsky, J. Obenauer, H. Mo, G.M. Pagani, R. Pejchal,
T.C. Pochapsky, Comparison of functional domains in vertebrate-type
ferredoxins, Biochemistry 41 (2002) 5978–5989.

155 F. Hannemann, A. Bichet, K.M. Ewen, R. Bernhardt, Cytochrome P450 systems—biological variations of electron transport chains, Biochim. Biophys. Acta 1770(2007) 330–344.

156 B. Schiffler, R. Bernhardt, Bacterial (CYP101) and mitochondrial P450 systems—how comparable are they? Biochem. Biophys. Res. Commun. 312 (2003) 223–228.

157 K. Suzuki, T. Kimura, An iron protein as a component of steroid 11betahydroxylase complex, Biochem. Biophys. Res. Commun. 19 (1965) 340–345. 158 T. Kimura, K. Suzuki, Components of the electron transport system in adrenal steroid hydroxylase. Isolation and properties of non-heme iron protein (adrenodoxin), J. Biol. Chem. 242 (1967) 485–491.

159 S. Mittal, Y.Z. Zhu, L.E. Vickery, Molecular cloning and sequence analysis of human placental ferredoxin, Arch. Biochem. Biophys. 264 (1988) 383–391.

160 V.L. Chashchin, V.N. Lapko, T.B. Adamovich, N.M. Kirillova, A.G. Lapko, Primary structure of hepatoredoxin frombovine livermitochondria, Bioorg. Khim. 12 (1986) 1286–1289.

161 Y. Matsuo, S. Tomita, Y. Tsuneoka, A. Furukawa, Y. Ichikawa, Molecular cloning and nucleotide sequences of bovine hepato-ferredoxin cDNA; identical primary structures of hepato- and adreno-ferredoxins, Int. J. Biochem. 24 (1992) 289–295.

J.I. Pedersen, J.G. Ghazarian, N.R. Orme-Johnson, H.F. DeLuca, Isolation
 of chick renal mitochondrial ferredoxin active in the 25-hydroxyvitamin D3 1alphahydroxylase system, J. Biol. Chem. 251 (1976) 3933–3941.

163 M. Ohashi, T. Omura, Presence of the NADPH-cytochrome P-450 reductase system in liver and kidney mitochondria, J. Biochem. 83 (1978) 249–260.

N.A. Lobanov, T.M. Vlasova, T.B. Adamovich, T.N. Azeva, T.A. Bonina,
I.M. Bogdanovskaya, V.N. Lapko, Primary structure of ferredoxin from bovine kidney
mitochondria, Biochemistry (Mosc). 66 (2001) 860–864.

165 C.Y. Chang, D.A. Wu, T.K. Mohandas, B.C. Chung, Structure, sequence, chromosomal location, and evolution of the human ferredoxin gene family, DNA Cell Biol. 9 (1990) 205–212.

166 S.A. Usanov, V.L. Chashchin, A.A. Akhrem, Cytochrome P-450 dependent pathways of the biosynthesis of steroid hormones, in: K. Ruckpaul, H. Rein (Eds.), Molecular mechanisms of adrenal steroidogenesis and aspects of regulation and application, Akademie Verlag, Berlin, Germany, 1990, pp. 1–57

167 R. Bernhardt, M.R. Waterman, Cytochrome P450 and steroid hormone biosynthesis, in: A. Sigel, H. Sigel, R.K.O. Sigel (Eds.), The ubiquitous roles of cytochrome P450 proteins, John Wiley & Sons, Ltd, 2007, pp. 361–396. 168 W.L. Miller, Why nobody has P450scc (20,22 desmoslase) deficiency, J. Clin. Endocrinol. Metab. 83 (1998) 1399–1400.

169 N. Katsumata, M. Ohtake, T. Hojo, E. Ogawa, T. Hara, N. Sato, T. Tanaka, Compound heterozygous mutations in the cholesterol side-chain cleavage enzyme gene (CYP11A) cause congenital adrenal insufficiency in humans, J. Clin. Endocrinol. Metab. 87 (2002) 3808–3813.

170 O. Hiort, P.M. Holterhus, R. Werner, C. Marschke, U. Hoppe, C.J. Partsch, F.G. Riepe, J.C. Achermann, D. Struve, Homozygous disruption of P450 side-chain cleavage (CYP11A1) is associated with prematurity, complete 46,XY sex reversal, and severe adrenal failure, J. Clin. Endocrinol. Metab. 90 (2005) 538–541.

171 H. al Kandari, N. Katsumata, S. Alexander, M.A. Rasoul, Homozygous mutation of P450 side-chain cleavage enzyme gene (CYP11A1) in 46, XY patient with adrena insufficiency, complete sex reversal, and agenesis of corpus callosum, J. Clin. Endocrinol. Metab. 91 (2006) 2821–2826.

172 C.J. Kim, L. Lin, N. Huang, C.A. Quigley, T.W. AvRuskin, J.C. Achermann, W.L. Miller, Severe combined adrenal and gonadal deficiency caused by novelmutations in the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450scc, J. Clin. Endocrinol. Metab. 93 (2008) 696–702.

173 P. Rubtsov, M. Karmanov, P. Sverdlova, P. Spirin, A. Tiulpakov, A novel homozygous mutation in CYP11A1 gene is associated with late-onset adrenal insufficiency and hypospadias in a 46,XY patient, J. Clin. Endocrinol. Metab. 94 (2009) 936–939.

174 Y. Morel, J. Picado-Leonard, D.A. Wu, C.Y. Chang, T.K. Mohandas, B.C. Chung, W.L. Miller, Assignment of the functional gene for human adrenodoxin to chromosome 11q13–qter and of adrenodoxin pseudogenes to chromosome 20cen–q13.1, Am. J. Hum. Genet. 43 (1988) 52–59.

175 T. Okamura, M.E. John, M.X. Zuber, E.R. Simpson, M.R. Waterman, Molecular cloning and amino acid sequence of the precursor form of bovine adrenodoxin: evidence for a previously unidentified COOH-terminal peptide, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 82 (1985) 5705-5709.

176 M.F. Matocha, M.R. Waterman, Discriminatory processing of the precursor forms of cytochrome P-450scc and adrenodoxin by adrenocortical and heart mitochondria, J. Biol. Chem. 259 (1984) 8672–8678.

177 T. Omura, Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria, J. Biochem. 123 (1998) 1010–1016.

178 A.V. Grinberg, F. Hannemann, B. Schiffler, J. Müller, U. Heinemann, R. Bernhardt, Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties, Proteins 40(2000) 590–612

179 Niranjan, B.G., Raza, H., Shayig, R.M., Jefcoate, C.R., and Avadhani, N.G. (1988) Hepatic mitochondrial cytochrome P450 system. Identification and characterization of a precursor form of mitochondrial cytochrome P450 induced by 3methylcholanthrene. J. Biol. Chem. 263, 575-580

180 Genter, M.B., Clay, C.D., Dalton, T.P., Dong, H., Nebert, D.W., and Schertzer, H.G. (2006) Comparison of mouse hepatic mitochondrial versus microsomal cytochromes P450 following TCDD treatment. Biochem. Biophys. Res. Commun. 342, 1375-1381

Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Bhagwat, S.V., Biswas, G.,
Mullick, J., and Avadhani, N.G. (1999) Physiological role of the N-terminal processed
P450 1A1 targeted to mitochondria in erythromycin metabolism and reversal of
erythromycinmediated inhibition of mitochondrial protein synthesis. J. Biol. Chem. 274,
6617-6625

182 Nakahara, K., and Shoun, H. (1996) N-terminal processing and amino acid sequence of two isoforms of nitric oxide reductase cytochrome P450nor from Fusarium oxysporum. J. Biochem. 120, 1082-1087

183 D. Beilke, R. Weiss, F. Lohr, P. Pristovsek, F. Hannemann, R. Bernhardt, H. Ruterjans, A new electron transport mechanism in mitochondrial steroid hydroxylase systems based on structural changes upon the reduction of adrenodoxin, Biochemistry

41 (2002) 7969–7978.

184 M. Kostic, R. Bernhardt, T.C. Pochapsky, A conserved histidine in vertebrate-type ferredoxins is critical for redox-dependent dynamics, Biochemistry 42 (2003) 8171–8182.

185 A. Müller, J.J. Müller, Y.A. Müller, H. Uhlmann, R. Bernhardt, U. Heinemann, New aspects of electron transfer revealed by the crystal structure of a truncated bovine adrenodoxin, Adx(4-108), Structure 6 (1998) 269–280.

I.A. Pikuleva, K. Tesh, M.R. Waterman, Y. Kim, The tertiary structure of full-length bovine adrenodoxin suggests functional dimers, Arch. Biochem. Biophys.
373 (2000) 44–55.

187 V. Beckert, H. Schrauber, R. Bernhardt, A.A. Van Dijk, C. Kakoschke, V. Wray, Mutational effects on the spectroscopic properties and biological activities of oxidized bovine adrenodoxin, and their structural implications, Eur. J. Biochem. 231 (1995) 226–235.

I. Hanukoglu, C.T. Privalle, C.R. Jefcoate, Mechanisms of ionic activation of adrenal mitochondrial cytochromes P-450scc and P-45011 beta, J. Biol. Chem. 256 (1981) 4329–4335.

J.D. Lambeth, D.W. Seybert, J.R. Lancaster Jr., J.C. Salerno, H. Kamin,
 Steroidogenic electron transport in adrenal cortex mitochondria, Mol. Cell. Biochem. 45
 (1982) 13–31.

190 T. Kido, T. Kimura, The formation of binary and ternary complexes of cytochrome P450scc with adrenodoxin and adrenodoxin reductase.adrenodoxin complex. The implication in ACTH function, J. Biol. Chem. 254 (1979) 11806–11815

191 T. Hara, M. Takeshima, Conclusive evidence of a quartery cluster model for cholesterol side chain cleavage reaction catalyzed by cytochrome P450scc, Cytochrome P450. 8th International Conference, John Libbey Eurotext, Paris, France, 1994, pp. 417–420.

192 J. Jose, R. Bernhardt, F. Hannemann, Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on E. coli, J. Biotechnol. 95 (2002) 257-268.

193 J. Behlke, O. Ristau, E.C. Müller, F. Hannemann, R. Bernhardt, Selfassociation of adrenodoxin studied by using analytical ultracentrifugation, Biophys. Chem. 125 (2007) 159–165.

M. Tsubaki, A. Hiwatashi, Y. Ichikawa, Conformational change of the heme moiety of the ferrous cytochrome P-450scc-phenyl isocyanide complex upon binding of reduced adrenodoxin, Biochemistry 28 (1989) 9777–9784.

J.D. Lambeth, S.O. Pember, Cytochrome P-450scc-adrenodoxin complex.
 Reduction properties of the substrate-associated cytochrome and relation of the reduction states of heme and iron–sulfur centers to association of the proteins, J. Biol.
 Chem. 258 (1983) 5596–5602.

196 R.C. Tuckey, A.J. McKinley, M.J. Headlam, Oxidized adrenodoxin acts as a competitive inhibitor of cytochrome P450scc in mitochondria from the human placenta, Eur. J. Biochem. 268 (2001) 2338–2343.

197 A. Halavaty, J.J.Müller, J. Contzen, C. Jung, F. Hannemann, R. Bernhardt, M.Galander, F. Lendzian, U. Heinemann, Light-induced reduction of bovine adrenodoxin via the covalently bound ruthenium(II) bipyridyl complex: intramolecular electron transfer and crystal structure, Biochemistry 45 (2006) 709–718.

198 F.Hannemann, A.Guyot, A. Zöllner, J.J.Müller, U.Heinemann, R. Bernhardt, The dipole moment of the electron carrier adrenodoxin is not critical for redox partner interaction and electron transfer, J. Inorg. Biochem. 103 (2009) 997–1004.

199 M. Prudencio, M. Ubbink, Transient complexes of redox proteins: structural and dynamic details from NMR studies, J. Mol. Recognit. 17 (2004) 524–539.

H.B. Gray, J.R. Winkler, Long-range electron transfer, Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A. 102 (2005) 3534–3539.

201 B. Schiffler, A. Zöllner, R. Bernhardt, Stripping down the mitochondrial cholesterol hydroxylase system, a kinetics study, J. Biol. Chem. 279 (2004) 34269–34276.

A.R. De Pascalis, I. Jelesarov, F. Ackermann, W.H. Koppenol, M.

Hirasawa, D.B. Knaff, H.R. Bosshard, Binding of ferredoxin to ferredoxin:NADP+ oxidoreductase: the role of carboxyl groups, electrostatic surface potential, and moleculardipole moment, Protein Sci. 2 (1993) 1126–1135.

203 G. Goni, A. Serrano, S. Frago, M. Hervas, J.R. Peregrina, M.A. De la Rosa, C. Gomez- Moreno, J.A. Navarro, M. Medina, Flavodoxin-mediated electron transfer from photosystem I to ferredoxin-NADP+ reductase in Anabaena: role of flavodoxin hydrophobic residues in protein–protein interactions, Biochemistry 47 (2008) 1207– 1217.

204 F.Hannemann, A.Guyot, A. Zöllner, J.J.Müller, U.Heinemann, R. Bernhardt, The dipole moment of the electron carrier adrenodoxin is not critical for redox partner interaction and electron transfer, J. Inorg. Biochem. 103 (2009) 997–1004.

A.V. Grinberg, F. Hannemann, B. Schiffler, J. Müller, U. Heinemann, R. Bernhardt, Adrenodoxin: structure, stability, and electron transfer properties, Proteins 40 (2000) 590–612.

206 G.A. Ziegler, C. Vonrhein, I. Hanukoglu, G.E. Schulz, The structure of adrenodoxin reductase of mitochondrial P450 systems: electron transfer for steroid biosynthesis, J. Mol. Biol. 289 (1999) 981–990.

207 J.J. Müller, A. Lapko, G. Bourenkov, K. Ruckpaul, U. Heinemann, Adrenodoxin reductase–adrenodoxin complex structure suggests electron transfer path in steroid biosynthesis, J. Biol. Chem. 276 (2001) 2786–2789.

E.C. Müller, A. Lapko, A. Otto, J.J. Müller, K. Ruckpaul, U. Heinemann, Covalently crosslinked complexes of bovine adrenodoxin with adrenodoxin reductase and cytochrome P450scc. Mass spectrometry and Edman degradation of complexes of the steroidogenic hydroxylase system, Eur. J. Biochem. 268 (2001) 1837–1843.

209 N. Maruya, A. Hiwatashi, Y. Ichikawa, T. Yamano, Purification and characterization of renal ferredoxin from bovine renal mitochondria, J. Biochem. 93 (1983) 1239–1247.

210 J.D. Lambeth, D.W. Seybert, H. Kamin, Ionic effects on adrenal steroidogenic electron transport. The role of adrenodoxin as an electron shuttle, J. Biol.

Chem. 254 (1979) 7255–7264.

211 J.D. Lambeth, L.M. Geren, F. Millett, Adrenodoxin interaction with adrenodoxin reductase and cytochrome P-450scc. Cross-linking of protein complexes and effects of adrenodoxin modification by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, J. Biol. Chem. 259 (1984) 10025–10029.

L.M. Geren, P. O'Brien, J. Stonehuerner, F. Millett, Identification of specific carboxylate groups on adrenodoxin that are involved in the interaction with adrenodoxin reductase, J. Biol. Chem. 259 (1984) 2155–2160.

J. Tuls, L. Geren, J.D. Lambeth, F. Millett, The use of a specific fluorescence probe to study the interaction of adrenodoxin with adrenodoxin reductase and cytochrome P-450scc, J. Biol. Chem. 262 (1987) 10020–10025.

V.M. Coghlan, L.E. Vickery, Site-specific mutations in human ferredoxin that affect binding to ferredoxin reductase and cytochrome P450scc, J. Biol. Chem. 266 (1991) 18606–18612.

V.M. Coghlan, L.E. Vickery, Electrostatic interactions stabilizing
ferredoxin electron transfer complexes. Disruption by "conservative" mutations, J. Biol.
Chem. 267 (1992) 8932–8935.

216 W.L. Miller, Steroidogenic enzymes, Endocr. Dev. 13 (2008) 1–18.

N. Siegel, N. Wongsurawat, H.J. Armbrecht, Parathyroid hormone
 stimulates dephosphorylation of the renoredoxin component of the 25-hydroxyvitamin
 D3-1 alpha-hydroxylase from rat renal cortex, J. Biol. Chem. 261 (1986) 16998–17003.

N. Monnier, G. Defaye, E.M. Chambaz, Phosphorylation of bovine
adrenodoxin. Structural study and enzymatic activity, Eur. J. Biochem. 169 (1987) 147–
153.

219 R. Nemani, J.G. Ghazarian, B. Moorthy, N. Wongsurawat, R. Strong, H.J. Armbrecht, Phosphorylation of ferredoxin and regulation of renal mitochondrial 25hydroxyvitamin D-1 alpha-hydroxylase activity in vitro, J. Biol. Chem. 264 (1989) 220 M. Bureik, A. Zeeh, R. Bernhardt, Modulation of steroid hydroxylase activity in stably transfected V79MZh11B1 and V79MZh11B2 cells by PKC and PKd inhibitors, Endocr. Res. 28 (2002) 351–355.

M. Bureik, A. Zöllner, N. Schuster, M. Montenarh, R. Bernhardt, Phosphorylation of bovine adrenodoxin by protein kinase CK2 affects the interaction with its redox partner cytochrome P450scc (CYP11A1), Biochemistry 44 (2005) 3821– 3830.

R. Lill, Function and biogenesis of iron–sulphur proteins, Nature 460 (2009) 831–838.

223 T.A. Pechurskaya, I.N. Harnastai, I.P. Grabovec, A.A. Gilep, S.A. Usanov "Adrenodoxin supports reactions catalyzed by microsomal steroidogenic cytochrome P450s" Biochemical and Biophysical Research Communications 353 (2007) 598–604

Mueller, R., Asperger, O., and Kleber, H.P. (1989) Purification of cytochrome P-450 from n-hexadecanegrown Acinetobacter calcoaceticus. Biomed. Biochim. Acta. 48, 243-254

Trower, M.K., Sariaslani, F.S., and O'Keefe, D.P. (1989) Purification and characterization of a soybean flour-induced cytochrome P-450 from Streptomyces griseus. J. Bact. 171, 1781-1787

Ullah, A.J.H., Murray, R.I., Bhattachuaryya, P.K., Wagner, G.C., and Gunsalus, I.C. (1990) Protein components of a cytochrome P-450 linalool 8-methyl hydroxylase. J. Biol. Chem. 265, 1345-1351 Peterson, J.A., Lu, J.Y., Griesselsoder, J., Graham-Lorence, S., Carmona,
C., Witney, F., and Lorence, M.C. (1992) Cytochrome P-450terp. Isolation and
purification of the protein and cloning and sequenceing of its operon. J. Biol. Chem.
267, 14193-14203

Hawkes, D.B., Adams, G.W., Burlingame, A.L., Ortiz de Montellano, P.R., and DeVoss, J.J. (2002) Cytochrome P450cin (CYP176A), isolation, expression, and characterization. J. Biol. Chem. 277, 27725-27732

229 Kimmich, N., Das, A., Sevrioukova, I., Macharenna, Y., Sligar, S.G., and Poulos, T.L. (2007) Electron transfer between cytochrome P450cin and its FMNcontaining redox partner, cindoxin. J. Biol. Chem. 282, 27006-27011

McLean, K.J., Clift, D., Lewis, D.G., Sabri, M., Balding, P.R., Sutcliffe,
M.J., Leys, D., and Munro, A.W. (2006) The preponderance of P450s in the
Mycobacterium tuberculosis genome. Trends Microbiol. 14, 220-228

Lawson, R.J., Leys, D., Sutcliffe, M.J., Kemp, C.A., Cheesman, M.R.,
Smith, S.J., Clarkson, J., Smith, W.E., Haq, I., Perkinas, J.B., and Munro, A.W. (2004)
Thermodynamic and biophysical characterization of cytochrome P450Biol from
Bacillus subtilis. Biochemistry. 43, 12410-12426

Lamb, D.C., Skaug, T., Song, H.L., Jackson, C.J., Produst, L.M.,
Waterman, M.R., Kell, D.B., Kelly, D.E., and Kelly, S.L. (2002) The cytochrome P450 complement (CYPone) of Streptomyces versicolor A3. J. Biol. Chem. 277, 24000-24005.

233 Wright, R.L., Harris, K., Solow, B., White, R.H., and Kennelly, P.J. (1996) Cloning of a potential cytochrome P450 from the archaeon Sulfolobus solfataricus. FEBS Lett. 384, 235-239

Ho, W.W., Li, H., Nishida, C.R., Ortiz de Montellano, P.R., and Poulos,
T.L. (2008) Crystal structure and properties of CYP231A2 from the thermoacidophilic archaeon Picrophilus torridus. Biochemistry. 47, 2071-2079

235 McLean, M.A., Maves, S.A., Weiss, K.E., Krepich, S., and Sligar, S.C. (1998) Characterization of a cytochrome P450 from the acidothermophilic archae Sulfolobus sulfataricus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 252, 166-172

Puchkaev, A.V., and Ortiz de Montellano, P.R. (2005) The Sulfolobus
 sulfataricus electron donor partners of thermophilic CYP119: An unusual non NAD(P)Hdependent cytochrome P450 system. Arch. Biochem. Biophys. 434, 169-177

237 Bellamine, A., Mangla, A.T., Nes, W.D., and Waterman, M.R. (1999) Characterization and catalytic properties of the sterol 14a-demethylase from Mycobacterium tuberculosis. Proc. Natl Acad. Sci. USA 96, 8937-8942

Lamb, D.C., Fowler, K., Kieser, T., Manning, N., Podust, L.M., Waterman, M.R., Kelly, D., and Kelly, S.L. (2002) Sterol 14a-demethylase activity in Streptomyces coelicolor A3 (2) is associated with an unusual member of the CYP51 gene family. Biochem. J. 364, 555-562

Tully, R.E., van Berkum, P., Lovins, K.W., and Keister, D.L. (1998)
Identification and sequencing of a cytochrome P450 gene cluster from Bradyrhizobium
japonicum. Biochim. Biophys. Acta. 1398, 243-255

240 Tully, R.E., and Keister, D.L. (1993) Cloning and mutagenesis of a cytochrome P-450 locus from Bradyrhizobium japonicum that is expressed

anaerobically and symbiotically. App. Environ. Microbiol. 59, 4136-4142

241 Narhi, L.O., Kim, B.H., Stevenson, P.M., and Fulco, A.J. (1983) Partial characterization of a barbitrateinduced cytochrome P-450-dependent fatty acid monooxygenase from Bacillus magaterium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 851-858

242 K.J. McLean, M. Sabri, K.R. Marshall, R.J. Lawson, D.G. Lewis, D. Clift, P.R. Balding, A.J. Dunford, A.J. Warman, J.P. McVey, A.-M. Quinn, M.J. Sutcliffe, N.S. Scrutton and A.W. Munro. (2005) Biochemical Society Transactions, 33, 4, 796-801

243 Yoshida, Y., Noshiro, M., Aoyama, Y., Kawamoto, T., Horiuchi, T., and Gotoh, O. (1997) Structural and evolutionary studies on sterol-14-demethylase P450 (CYP51), the most conserved P450 monooxygenase: II. Evolutionay analysis of protein and gene structures. J. Biochem. 122, 1122-1128

244 Barros, M.H., and Nobrega, F.G. (1999) YAH1 of Saccharomyces cerevisiae: a new essential gene that codes for a protein homologous to human adrenodoxin. Gene. 233, 197-203

Lacour, T., and Dumas, B. (1996) A gene encoding a yeast equivalent of mammalian NADPH-adrenodoxin oxidoreductases. Gene. 174, 289-292

Lange, H., Kaut, A., Kispal, G., and Lill, R. (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 97, 1050-1055

247 Narhi, L.O., Kim, B.H., Stevenson, P.M., and Fulco, A.J. (1983) Partial characterization of a barbitrateinduced cytochrome P-450-dependent fatty acid

monooxygenase from Bacillus magaterium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 116, 851-858

248 Ruettinger, R.T., Wen, L.P., and Fulco, A.J. (1989) Coding nucleotide, 50regulatory, and deduced amino acid sequences of P-450 BM-3, a single peptide cytochrome P-450:NADPH-P-450 reductase from Bacillus magaterium. J. Biol. Chem. 264, 10987-10995

249 Yoshida, Y., Noshiro, M., Aoyama, Y., Kawamoto, T., Horiuchi, T., and Gotoh, O. (1997) Structural and evolutionary studies on sterol-14-demethylase P450 (CYP51), the most conserved P450 monooxygenase: II. Evolutionay analysis of protein and gene structures. J. Biochem. 122, 1122-1128

250 Rezen, T., Debeljak, N., Kordis, D., and Rozman, D. (2004) New aspects on lenosterol 14a-demethylase and cytochrome P450 evolution: Lanosterol/cycloarterol diversification and lateral transfer. J. Mol. Evol. 59, 51-58

Sibbesen, O., De Voss, J.J., and Ortiz de Montellano, P.R. (1996)
Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-P450cam triple fusion protein. Construction of a self-sufficient Escherichia coli catalytic system. J. Biol. Chem. 271, 22462-22469

Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F., and Pompon, D.
(1997) Cloning, yeast expression, and characterization of the coupling of two distantly related Arabidopsis thaliana NADPH-cytochrome P450 reductase with P450 CYP73A5.
J. Biol. Chem. 272, 191761-9186

Lah, L., Krasevec, N., Trontej, P., and Komel, R. (2008) High diversity and complex evolution of fungal cytochrome P450 reductase: cytochrome P450 system. Fungal Genetics Biol. 45, 446-458 254 Porter, T.D., and Kasper, C.B. (1986) NADPH-cytochrome P-450 oxidoreductase: Flavin mononucleotide and flavin adenine dinucleotide domains evolved from different flavoproteins. Biochemistry. 25, 1682-1687

Haniu M, Iyanagi T, Miller P, Lee TD, Shively JE. Biochemistry. 1986;25:7906–7911. [PubMed:3099837]

256 Craig DH, Chapman SK, Daff S. J. Biol. Chem. 2002; 277:33987–33994.[PubMed: 12089147]

257 А. С. Иванов, В. Г. Згода, А. И. Арчаков, Технологии белковой интерактомики (обзорная статья) (2011) Биоорганическая химия, 37 (1): 8-21

258 BIACORE AB BIACORE Technology Handbook. (1998)

259 Myszka DG. Kinetic, equilibrium, and thermodynamic analysis of macromolecular interactions with BIACORE. Methods Enzymol. 2000;323:325-40

A.A. Gilep, O.L. Guryev, S.A. Usanov, and R.W. Estabrook, Apocytochrome b5 as an indicator of changes in heme accessability: preliminary studies with cytochrome P450 3A4. J Inorg Biochem 87 (2001) 237-44.

A.A. Gilep, R.W. Estabrook, and S.A. Usanov, Molecular cloning and heterologous expression in E. coli of cytochrome P45017alpha. Comparison of structural and functional properties of substrate-specific cytochromes P450 from different species. Biochemistry (Mosc) 68 (2003) 86-98.

262 N. Strushkevich, S.A. Usanov, and H.W. Park, Structural basis of human

CYP51 inhibition by antifungal azoles. J Mol Biol 397 1067-78.

S.A. Usanov, S.E. Graham, G.I. Lepesheva, T.N. Azeva, N.V. Strushkevich,
A.A. Gilep, R.W. Estabrook, and J.A. Peterson, Probing the interaction of bovine
cytochrome P450scc (CYP11A1) with adrenodoxin: evaluating site-directed mutations
by molecular modeling. Biochemistry 41 (2002) 8310-20.

N. Strushkevich, F. MacKenzie, T. Cherkesova, I. Grabovec, S. Usanov, and H.W. Park, Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. Proc Natl Acad Sci U S A 108 10139-43.

265 И.В. Гайдукевич, А.А. Гилеп, Т.С. Черкесова, С.А. Усанов,
Клонирование, гетерологическая экспрессия, выделение и очистка
рекомбинантных белков СҮР2С9*1, СҮР2С9*2 и СҮР2С9*3 человека. Известия
Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. 3 (2012) 105-111.

G.V. Sergeev, A.A. Gilep, and S.A. Usanov, The Role of Cytochrome b5 Structural Domains in Interaction with Cytochromes P450. Biochemistry (Moscow) 79 (2014) 406-416.

J. G. Quinn, S. O.Neil, A. Doyle, C. McAtamney, D. Diamond, B. D.
 MacCraith and R.O.Kennedy. Development and application of Surface Plasmon
 Resonance-Based Biosensors for the Detection of Cell-Ligand Interactions. (2000)
 Analytical Biochemistry , 281, 135-143.

268 Stenberg, E., Persson, B., Roos, H., and Urbaniczky, C., (1991) Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins. J. Colloid. Interface Sci. 143, 513-526

Thomas A. Clarke, Sang-Choul Im, Anil Bidwai, and Lucy Waskell, (2004)
JBC Papers in Press, Vol. 279, No. 35, Issue of August 27, pp. 36809–36818
Williams, P. A., Cosme, J., Sridhar, V., Johnson, E. F., and McRee, D. E. (2000) J.
Inorg. Biochem. 81, 183–190

Qiuxia Gao, Catalin E. Doneanu, Scott A. Shaffer, Elinor T. Adman, David
R. Goodlett, and Sidney D. Nelson (2006) Identification of the Interactions between
Cytochrome P450 2E1 and Cytochrome b5 by Mass Spectrometry and Site-directed
Mutagenesis, JBC. 281, 20404–20417

Adamovich TB, Pikuleva IA, Chashchin VL, Usanov SA (1989) Selective chemical modification of cytochrome P-450SCC lysine residues. Identification of lysines involved in the interaction with adrenodoxin. Biochim Biophys Acta 996:247– 253.

272 Wada A, Waterman MR (1992) Identification by site-directed mutagenesis of two lysine residues in cholesterol side chain cleavage cytochrome P450 that are essential for adrenodoxin binding. J Biol Chem 267:22877–22882.

Usanov SA, et al. (2002) Probing the interaction of bovine cytochrome
P450scc (CYP11A1) with adrenodoxin: Evaluating site-directed mutations by molecular
modeling. Biochemistry 41:8310–8320.

274 Beckert V, Bernhardt R (1997) Specific aspects of electron transfer from adrenodoxin to cytochromes p450scc and p45011beta. J Biol Chem 272:4883–4888.

275 Bashir Q, Volkov AN, Ullmann GM & Ubbink M (2010) Visualization of the encounter ensemble of the transient electron transfer complex of cytochrome c and cytochrome c peroxidase. J Am Chem Soc 132, 241–247.

276 Wesley E. (1997) Protein–Protein Interactions Interface Structure Binding Thermodynamics and Mutational Analysis. Chem. Rev. 97, 1233-1250

277 Brady GP, Sharp KA (1997) Entropy in protein folding and in proteinprotein interactions. Curr Opin Struct Biol., 7(2):215-21

Zhao C. Gao Q., Roberts A. G., Shaffer S. A., Doneanu C. E., Xue S.,Goodlett D. R., Nelson S. D., and Atkins W. M. (2012) Biochemistry, 51, 9488–9500

279 Peng, H. M., and Auchus, R. J. (2013) Biochemistry, **52**, 210–220

M. Sugishimaa, H. Satoa, Y. Higashimotob, J. Haradaa, K. Wadac, K. Fukuyamad and M. Noguchia "Structural basis for the electron transfer from an open form of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase to heme oxygenase" (2014) PNAS, 111:7, 2524–2529

Ivanov, Y.D., Kanaeva, I.P., Kuznetsov, V.Y., Lehnerer, M., Schulze, J.,
Hlavica, P., and Archakov, A. I., The optical biosensor studies on the role of
hydrophobic tails of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochromes P450 2B4
and b5 upon productive complex formation within a monomeric reconstituted system.
(1999) Archives of Biochemistry and Biophysics, 362, 87–93

282 Ivanov, Y.D., Kanaeva, I.P., and Archakov, A.I. Optical biosensor investigation of interactions of biomembrane and water-soluble cytochromes P450 and

their redox partners with covalently immobilized phosphatidylethanolamine layers, (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 273, 750–752

283 Ю.Д. Иванов, А.В. Иванов, Н.А. Петушкова и др. Оптикобиосенсорный анализ взаимодействия редокс-партнеров цитохром Р450 2В4содержащей монооксигеназной системы в условиях гидроксилирования. (2008) Биомедицинская химия, 54, N4, 435-444.