

УДК 577.112.7

ПРИМЕНЕНИЕ SPR-БИОСЕНСОРА ДЛЯ АНАЛИЗА БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ВОДНОЙ СРЕДЕ И БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ МЕМБРАНЕ НА ПРИМЕРЕ P450_{scc} (CYP11A1)

© 2021 г. П. В. Ершов^а, Л. А. Калужский^а, Е. О. Яблоков^{а, *}, О. В. Гнеденко^а, А. А. Ковалевский^б, А. М. Тумилович^б, А. А. Гилеп^б, Н. В. Струшкевич^с, А. С. Иванов^а

^а Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, 119121 Россия

^б Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, 220141 Республика Беларусь

^с Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

*e-mail: evgeyablokov1988@mail.ru

Поступила в редакцию 14.07.2020 г.

После доработки 20.08.2020 г.

Принята к публикации 25.08.2020 г.

Белок-белковые взаимодействия (ББВ) лежат в основе функционирования множества метаболических и сигнальных путей. Особый интерес представляют ББВ с участием мембранных белков, образующих стабильные или временные комплексы для передачи сигнала в клетку, транспорта ионов и молекул, переноса электронов в различных электрон-транспортных цепях. Метод SPR позволяет оценить термодинамику, кинетические (k_{on} и k_{off}) и равновесные (K_d) константы ББВ, а также определить модулирующие действия низкомолекулярных соединений. Цель данной работы состояла в адаптации протоколов SPR-анализа для исследования ББВ с участием митохондриального цитохрома P450 CYP11A1, митохондриального цитохрома b5 (CYB5B) и аденодоксиона (Adx). Было показано, что взаимодействия Adx – CYP11A1 и CYB5B–CYP11A1 зависят от способа иммобилизации белков и микроокружения. Ранее нами было показано, что в водном микроокружении при сходном значении k_{off} ($1.5 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$), значения k_{on} комплексов Adx–CYP11A1 и CYB5B–CYP11A1 различались на порядок ($(6.5 \pm 0.5) \times 10^4$ и $(0.30 \pm 0.03) \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ соответственно), что согласуется с высоким сродством CYP11A1 к физиологическому редокс-партнеру Adx. В липидном микроокружении скорость распада комплекса CYP11A1–Adx значительно выше, чем в водном, k_{off} составляет $(9.1 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Для сравнения параметры комплекса CYP11A1–CYB5B определить не удалось вследствие неспецифического связывания мембранных белков, используемых в качестве аналитов, с фосфолипидным бислоем на L1-чипе. Мы впервые доказали применимость SPR-метода для детекции и количественной оценки комплексообразования митохондриальных цитохромов P450 с их редокс-партнерами как в водном, так и липидном микроокружении. Экспериментальные протоколы SPR-анализа, которые были разработаны и проверены в этой и предыдущих работах, представляют собой неотъемлемую часть современных подходов для изучения ферментов семейства цитохромов P450 (CYP-optics), а также могут быть применимы для исследования мембранных белков.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс (SPR), SPR-биосенсор, протоколы SPR, митохондриальный цитохром P450 11A1 (CYP11A1), митохондриальный цитохром b5 (CYB5B), редокс-партнеры, белок-белковые взаимодействия, кинетика, аффинность, стероиды

DOI: 10.31857/S0233475521010047

ВВЕДЕНИЕ

Оптико-биосенсорный анализ, основанный на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR), позволяет регистрировать любые белок-белковые и белок-лигандные взаимодействия в режиме реального времени без использования вспомогательных детектирующих молекул, при этом один из партнеров по взаимодействию

иммобилизуется на оптическом чипе (лиганд), а другой подается в измерительную ячейку с потоком рабочего буфера (аналит). Разные комбинации химических групп на поверхности оптического чипа позволяют иммобилизовать белковые молекулы ковалентно или нековалентно, ориентированным или случайным образом. Важным фактором выбора способа иммобилизации по-

прежнему остаются физико-химические характеристики взаимодействующих биомолекул: наличие аффинной метки на N- или C-конце белка, мембранного “якоря”, профиль распределения сульфгидрильных и аминокрупп по поверхности белковой глобулы.

Цитохромы P450 (CYP) представляют собой класс гемсодержащих монооксигеназ, осуществляющих биохимические превращения огромного множества ксенобиотиков, лекарств, эндогенных метаболитов, а также участвующих в биосинтезе стероидных гормонов. Ферментативная активность P450 осуществляется с участием электронов, которые передаются от NADPH на железо гема с участием белков редокс-партнеров. В зависимости от клеточной локализации P450, разные редокс-белки осуществляют перенос электронов: NADPH-зависимая цитохром-P450-оксидоредуктаза (CPR) — в эндоплазматическом ретикулуме и короткая редокс-цепь, состоящая из адренодоксинредуктазы (AdR) и адренодоксина (Adx) — в митохондриях.

У митохондриальных цитохромов P450 имеется несколько участков связывания с мембраной, а редокс-партнер взаимодействует с дистальной стороной молекулы, удаленной от сайта связывания с мембраной. Эта особенность и чувствительность гемового кофактора к химическим воздействиям накладывают ограничения при проведении SPR-анализа белок-белковых взаимодействий с участием цитохромов P450. Ранее мы показали, что CYP11A1 в водном микроокружении образует высокоаффинные комплексы с Adx [1, 2] и с митохондриальным цитохромом b5 (CYB5B) [3], а также способен к комплексообразованию с другими цитохромами P450 [4]. Взаимодействия характеризовались высокой аффинностью, со значениями K_d в субмикромольном диапазоне.

В настоящей работе представлены методические подходы оптико-биосенсорного анализа для оценки межмолекулярных взаимодействий с участием цитохромов P450. В качестве объекта исследования был использован митохондриальный цитохром P450 11A1 (P450scs, CYP11A1), катализирующий отщепление боковой цепи стероидных субстратов (холестерина, 7-дегидрохолестерола, эргостерола, люмистерола), а также гидроксирование витаминов D3 и D2 [5, 6]. С помощью SPR-биосенсора были исследованы параметры взаимодействия Adx и CYP11A1, иммобилизованного в фосфолипидной бислойной мембране.

Для демонстрации возможного применения SPR-анализа для детекции белок-белковых взаимодействий (ББВ) с участием мембранных белков, находящихся в липидном микроокружении, нами был выбран митохондриальный цитохром P450 CYP11A1, так как его взаимодействия с белками-партнерами в водном микроокружении уже

были подробно изучены [1]. Детекцию можно проводить как в водной среде, так и в липидном микроокружении, в зависимости от типа оптического чипа. Следует отметить, что параметры взаимодействия CYP11A1 с белками-партнерами в водном и липидном микроокружении различаются. Перспективным представляется изучение взаимодействия митохондриальных CYP с Adx в липидном микроокружении различного состава, поскольку доступ гидрофобных субстратов в активный центр происходит из мембраны. Однако оценку влияния липофильных молекул на взаимодействие, определение термодинамических параметров белок-белковых комплексов, а также исследования мембранотропных анализов предпочтительнее проводить в водном микроокружении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование, расходные материалы и белковые препараты. В работе был использован 4-канальный SPR-биосенсор Biacore T-200 (GE Healthcare, США), оптические чипы CM5 серии S (с полимерной поверхностью, покрытой карбоксилированным декстраном) и чипы L1 серии S (GE Healthcare) с липофильными группами на поверхности. В качестве рабочих буферов был использован HBS-N (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl) и HBS-EP+ (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.05% Tween-20), 10 mM ацетат натрия (pH 5.0), водный раствор 0.1 M NHS (N-гидрокси-сукцинимид) и 0.4 M EDC (1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбодиимид гидрохлорид) и стоковые растворы HBS-N и HBS-EP+ получали от GE Healthcare.

Высокоочищенные (>95% по данным SDS-PAGE) препараты рекомбинантных белков (CYP11A1, CYB5B, Adx) были получены как описано ранее [1, 7]. Бычий сывороточный альбумин (BCA) был получен от фирмы Sigma Aldrich (США).

Протокол ковалентной неориентированной иммобилизации на оптическом чипе CM5. Данный протокол был использован для иммобилизации Adx, CYB5B, BCA, а также CYP11A1 на оптическом чипе. После уравнивания поверхности чипа CM5 рабочим буфером HBS-EP+ в течение 30 мин и скорости потока 10 мкл/мин выполняли промывку раствором 50 mM NaOH в течение 30 с и скорости потока 30 мкл/мин. Иммобилизацию белков в разных каналах биосенсора осуществляли ковалентно путем формирования амидных связей между аминокруппами белка и карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM5. Для этого карбоксильные группы чипа активировали пропусканием через канал биосенсора смеси равных объемов 0.2 M EDC/0.05 M NHS в течение 7 мин при скорости потока

5 мкл/мин. Далее осуществляли введение раствора белка (25 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5.0) в течение 10 мин со скоростью 5 мкл/мин. Целевой уровень иммобилизации белков был в диапазоне 4000–5000 рез. ед. (резонансных единиц, от англ. resonance units, RU) или в среднем 4.5 нг белка на 1 мм² поверхности чипа.

Протокол “прямой” и “инвертированной” регистрации ББВ на CM5-чипе. Протокол “прямой” регистрации был использован для детекции комплексообразования иммобилизованного на чипе белка CYP11A1 (лиганд); редокс-партнеры вводили в измерительную ячейку биосенсора в виде раствора (аналит). При “инвертированной” регистрации ББВ в качестве лиганда использовали редокс-партнеры, а в качестве аналита — CYP11A1.

Регистрация взаимодействия аналита в разных концентрациях с иммобилизованными на чипе лигандами осуществлялась путем их пропускания через контрольный (без белка) и затем через рабочий каналы оптического биосенсора в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. По окончании инъекции аналита, в течение 10 мин регистрировали диссоциацию белкового комплекса, после чего связавшийся аналит удаляли путем двукратной инъекции раствора 2 М NaCl и 0.4% CHAPS в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Результирующие сенсограммы (запись сигнала биосенсора во времени) представляли собой разницу между рабочим и контрольным каналом. Для определения значений кинетических констант комплексообразования (k_{on} , k_{off}) измерения выполняли при 25°C. Значения K_d , которые представляют собой отношение величин k_{off}/k_{on} , рассчитывали с помощью программы BIAevaluation software (GE Healthcare). Для вычисления термодинамических параметров (ΔG , ΔH , $-T\Delta S$), измеряли значения кинетических констант комплексообразования цитохромов P450 с редокс-партнерами в интервале температур от 10 до 40°C с шагом 5°C, как описано ранее [1, 3].

Протокол получения липосом на основе 1,2-диолеил-глицеро-3-фосфатидилхолина (DOPC) и 1,2-диолеил-глицеро-3-фосфоглицерина (DOPG). В текущей работе критическим моментом является захват липосом гидрофобными углеводородными цепями (“гидрофобными якорями”) на поверхности оптического чипа с последующим их превращением в планарный липидный бислой. Для этих процессов важно, чтобы бислойная мембрана липосом была жидкой. Именно поэтому для создания экспериментальной модели бислойной мембраны были использованы препараты липидов на основе олеиновой мононенасыщенной жирной кислоты. Образцы фосфолипидов DOPC и DOPG растворяли в хлороформе до концентрации 10 и 2 мг/мл соответственно. Далее го-

товили смесь в молярном соотношении DOPC (80%) и DOPG (20%). После многократного пипетирования смесь переносили в круглодонную колбу и высушивали на вакуумном роторном испарителе Rotacool (Heidolph, Германия) до образования на дне колбы тонкой пленки фосфолипидов, которую диспергировали при помощи стеклянных шариков в HBS-N-буфере до конечной концентрации 2 мг/мл. Затем суспензию переносили в пробирку и дополнительно диспергировали на льду в течение 2 мин на ультразвуковом гомогенизаторе Sonoplus hd 3110 (Bandelin, Германия), мощность излучателя составляла 20% от максимальной. Полученную суспензию однослойных липосом стандартизовали по размеру путем многократной экструзии через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм с использованием набора LipoFast-Basic (Avestin, Канада).

Протокол контроля качества суспензии липосом методом динамического светорассеяния (DLC). Полученные суспензии липосом анализировали с использованием дзета-сайзера (Malvern, Англия) при следующих условиях: температура 25°C, частота измерений 333.6 тыс/с, длительность измерения 60 с, количество повторов 18. Исходную суспензию липосом разводили калий-фосфатным буфером (pH 7.4) до конечной концентрации 100 мкг/мл. Измерения проводили в специализированной кварцевой кювете zmv 1002 (Malvern). Пик максимальной интенсивности светорассеяния соответствовал диаметру частиц 100 нм. Контроль качества суспензии липосом выполняли по графику корреляционной функции; удовлетворительным результатом измерений считался коэффициент корреляции выше 0.75. В качестве стандарта использовали 5% раствор сахарозы в воде с основным и второстепенным пиками интенсивности светорассеяния частиц с диаметром 1 и 200 нм соответственно [8].

Протокол создания липидной бислойной мембраны на поверхности чипа L1 и нековалентная иммобилизация CYP11A1 в липидной бислойной мембране. После уравнивания поверхности чипа L1 рабочим буфером HBS-N в течение 30 мин и скорости потока 10 мкл/мин через рабочий и контрольный каналы биосенсора пропускали растворы 50 мМ NaOH и 2 М NaCl в течение 30 с со скоростью потока 30 мкл/мин. Через рабочий канал биосенсора последовательно пропускали: (1) суспензию липосом, содержащую 2 мг/мл смеси DOPC : DOPG = 80 : 20%, в течение 18 мин при скорости потока 5 мкл/мин и (2) 10 мМ NaOH в течение 30 с при скорости 30 мкл/мин. Затем для контроля гомогенности сформированного плоского липидного бислоя на поверхности оптического чипа вводили раствор бычьего сывороточного альбумина (BCA) (0.2 мг/мл в HBS-N-буфере) в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Далее образец, содержащий 5 мкМ

Таблица 1. Влияние температурного фактора на кинетические параметры комплексообразования CYP11A1–Adx и CYP11A1–CYB5B в водном микроокружении

$T, ^\circ\text{C}$	$k_{\text{on}}, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	$k_{\text{off}}, \text{c}^{-1}$	$K_{\text{d}}, \text{нМ}$	$k_{\text{on}}, \text{M}^{-1} \text{c}^{-1}$	$k_{\text{off}}, \text{c}^{-1}$	$K_{\text{d}}, \text{нМ}$
CYP11A1–Adx				CYP11A1/CYB5B		
10	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	8	н/о	н/о	н/о
15	$(1.2 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.4 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	12	н/о	н/о	н/о
20	$(8.3 \pm 0.7) \times 10^4$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	18	$(4.4 \pm 0.3) \times 10^3$	$(2.8 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	638
25	$(6.5 \pm 0.3) \times 10^4$	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	23	$(3.1 \pm 0.2) \times 10^3$	$(1.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	500
30	$(7.3 \pm 0.3) \times 10^4$	$(2.2 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	30	$(6.1 \pm 0.3) \times 10^3$	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	163
35	$(6.9 \pm 0.3) \times 10^4$	$(2.7 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	39	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^4$	$(8.0 \pm 0.5) \times 10^{-4}$	69
40	$(7.3 \pm 0.3) \times 10^4$	$(3.6 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	49	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^4$	$(6.8 \pm 0.3) \times 10^{-4}$	30

Примечание. Значения K_{d} рассчитывали по отношению $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. В таблице представлены средние значения параметров $\pm$ стандартное отклонение ($n = 3$). н/о – не определяли.

CYP11A1 в HBS-N-буфере, пропускали через рабочий канал биосенсора в течение 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Для контроля уровня иммобилизации белка-лиганда пропускали растворы 10 мМ HEPES (pH 7.4), содержащие возрастающие концентрации NaCl (от 0 до 2 М). Отсутствие падения сигнала биосенсора после пропуска растворов NaCl и систематического снижения дрейфа базовой линии указывали на достаточно прочное связывание молекул CYP11A1 с бислойной липидной мембраной.

Протокол регистрации ББВ в бислойной липидной мембране на поверхности L1-чипа. Образцы, содержащие Adx в концентрациях 0.5–3 мкМ в HBS-N-буфере, последовательно пропускали через контрольный (без белка-лиганда) и рабочий (с иммобилизованным в бислойной липидной мембране CYP11A1) каналы биосенсора. Продолжительность введения образцов Adx составляла 5 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Сенсограммы взаимодействия CYP11A1–Adx представляли собой разницу сигналов рабочего канала (с CYP11A1) и контрольного (без белка). После окончания введения раствора аналита и регистрации диссоциации комплексов CYP–Adx, липиды и белки удаляли с поверхности L1 чипа трехкратной промывкой раствором, содержащим 2 М NaCl и 0.5% CHAPS, в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин, и однократной промывкой 50 мМ NaOH (30 с, 30 мкл/мин).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн схемы биосенсорных экспериментов выбирается в зависимости от задач по определению параметров комплексообразования цито-

хромов P450 с редокс-партнерами. Можно отметить три наиболее часто встречающиеся задачи.

1) Определение кинетических констант и равновесной константы диссоциации белкового комплекса при стандартных условиях (температура 25°C). В данном случае предпочтительно фосфолипидное микроокружение, созданное на поверхности оптического чипа L1, с учетом структурных особенностей рекомбинантных белков. Пример данного применения будет описан ниже.

2) Определение термодинамических параметров комплексообразования в широком температурном диапазоне 10–40°C на чипах CM-типа с покрытием из карбоксилированного декстрана без создания липидного микроокружения. В данном варианте исключается систематическая ошибка эффекта температурного фактора на физико-химические и реологические свойства фосфолипидов, и как следствие, влияние на ББВ. Такой подход использовался в работах [1, 3], где были охарактеризованы ББВ с участием CYP11A1 и его редокс-партнеров (CYB5A, CYB5B, CPR, Adx). Недостатком неориентированной иммобилизации белков на оптических чипах типа CM является снижение чувствительности детекции молекулярных взаимодействий [9]. В данной работе мы исследовали влияние температурного фактора на кинетические параметры комплексообразования CYP11A1 с редокс-партнерами (табл. 1). Интересно отметить, что для комплексов CYP11A1–Adx и CYP11A1–CYB5B наблюдались разнонаправленные изменения кинетических параметров взаимодействия под влиянием температурного фактора. Значения K_{d} комплекса CYP11A1–Adx монотонно возрастают с повыше-

нием температуры, тогда как для комплекса CYP11A1–CYB5B наблюдалась обратная зависимость.

3) Оценка влияния низкомолекулярных соединений на кинетические и термодинамические параметры взаимодействия цитохромов P450 с редокс-партнерами.

Малые молекулы (низкомолекулярные соединения, пептиды, фрагменты антител) способны влиять на кинетику белок-белковых взаимодействий, а следовательно, изменять аффинность комплекса. Среди низкомолекулярных соединений, с молекулярной массой ≤ 1 кДа, интерес представляют субстраты, продукты и ингибиторы цитохромов P450. Их модулирующее действие на образование комплексов цитохромов P450 с редокс-партнерами можно оценить методом SPR, учитывая следующие факторы:

а) растворимость в водных растворах и органических растворителях (спирты, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (ДМФ));

б) стабильность белкового комплекса в присутствии органических растворителей;

в) выбор нескольких тестовых концентраций соединения (диапазон молярного соотношения белок-аналит/соединение). Максимальная концентрация соединения должна быть равной или превышать значение константы Михаэлиса (при наличии данных), но в то же время не вызывать преципитацию соединения в анализируемом образце;

г) способность соединений связываться с иммобилизованным на чипе белком-лигандом и его белком-партнером (аналитом);

д) оптимальная ионная сила и состав рабочего буфера: наличие детергентов, восстанавливающих агентов (дитиотреитол), а также хелатирующих агентов (например, EDTA);

е) время инкубации белка-аналита с соединением.

Ранее нами было показано [10], что в присутствии стероидных субстратов скорость образования комплекса стероидогенного микросомального цитохрома P450 17A1 (CYP17A1) с цитохромом b5 (CYB5A) увеличивается, чего не наблюдалось в случае CPR и Adx. В данных экспериментах CYB5A был ковалентно иммобилизован за аминогруппы на CM5-чипе, а раствор CYP17A1 вводили в качестве аналита в отсутствие (контроль) или в присутствии стероидных субстратов. В данной системе добавление фосфолипидного окружения неизбежно приводило бы к артефактам измерений из-за совокупного вклада факторов, таких как сродство стероидных субстратов к бислойной липидной мембране, влияние липидного состава бислоя на связывание субстрата с

цитохромом P450, а также подвижность мембранотропных субстратов в бислое [11, 12].

Для определения кинетических констант и равновесной константы диссоциации белкового комплекса с помощью SPR-биосенсора нами были разработаны методы оценки комплексообразования CYP11A1–Adx и CYP11A1–CYB5B в системе водного и фосфолипидного микроокружения. Схема иммобилизации препаратов рекомбинантных белков на оптическом чипе CM5 и на чипе L1 приведена на рис. 1. Четырехканальный биосенсор Biacore позволяет регистрировать максимум три целевых взаимодействий, так как один канал используется в качестве контроля (коррекция на неспецифическую сорбцию веществ на поверхности чипа). В качестве контрольного белка для оценки специфичности связывания изучаемых белков, а также для “закрытия” возможных оставшихся гидрофобных участков на L1-чипе, не занятых липидным бислоем, использовали БСА. Сигналы связывания БСА с подложкой чипа составляли не более 5% от уровня равновесных сигналов после формирования липидного бислоя, что свидетельствует о достаточно однородном распределении последнего на чипе L1. Также было отмечено отсутствие взаимодействия Adx, CYB5B и CYP11A1 с иммобилизованным БСА на чипе CM5. Сравнительный анализ кинетических и равновесных параметров комплексообразования с участием CYP11A1 приведен в табл. 2. Так, взаимодействие между ковалентно иммобилизованным CYP11A1 на чипе CM5 и Adx (аналит) не регистрировалось даже при высоких концентрациях Adx. Использование инвертированной пары лиганд-аналит позволило зарегистрировать высокоаффинное комплексообразование CYP11A1–Adx с K_d порядка 10^{-9} – 10^{-8} М [1], что согласуется с ранее опубликованными данными других авторов [13]. В первом случае имеет место либо нарушение пространственной структуры контактной области белка-лиганда, либо химическая модификация аминокислотных остатков CYP11A1, принимающих участие во взаимодействии с Adx. Следует отметить, что дизайн схемы иммобилизации целевых и контрольных белков обусловлен структурными особенностями различных изоформ цитохромов P450 и их редокс-партнеров. Слабокислая среда (pH 5.0) буфера для иммобилизации практически не влияет на спектральные свойства CYP8A1, который был иммобилизован на чипе без потери гемового кофактора [4] в виде мономерной формы, что следовало из отсутствия ступенчатого падения сигнала биосенсора при пропускании растворов ионных детергентов. Демонстрация возможности комплексообразования CYP11A1 с иммобилизованным за аминогруппы цитохромом b5 (CYB5B) показана на рис. 2, при этом CYB5B, так же как и

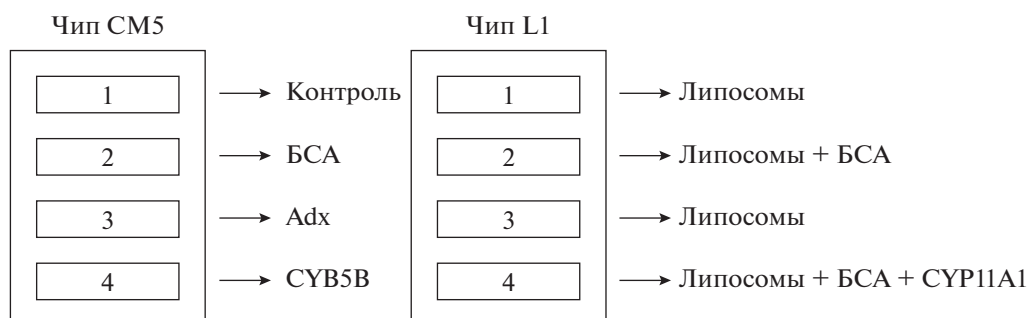


Рис. 1. Схема иммобилизации белков в разных каналах биосенсора на чипах CM5 и L1. На чипе CM5 канал 1 был использован в качестве контрольного канала (без иммобилизации белка) для коррекции неспецифического связывания CYP11A1 с поверхностью чипа. В каналах 2, 3, 4 были ковалентно иммобилизованы бычий сывороточный альбумин (BSA) (дополнительный контроль), Adx и CYB5B соответственно. На чипе L1 каналы 1 и 3 были контрольными (липидный бислой, без белка), канал 2 – контроль связывания с BSA, канал 4 – иммобилизованный в липидном бислое CYP11A1.

CYP8A1, не переходил в апоформу при воздействии pH.

С другой стороны, Adx – водорастворимый белок, в отличие от других редокс-партнеров, таких как CYB5B (CYB5A) или CPR. Это дает возмож-

ность использовать Adx в качестве аналита для регистрации взаимодействия с CYP11A1, находящимся в фосфолипидном микроокружении, так как не наблюдается неспецифического связывания Adx с липидным бислоем, (рис. 3). Напротив,

Таблица 2. Сравнительный анализ параметров комплексообразования CYP11A1 с его редокс-партнерами в зависимости от вариантов SPR-анализа

Белковые партнеры по взаимодействию		Кинетические параметры		Равновесные параметры
лиганд	аналит	$k_{\text{он}}, \text{М}^{-1} \text{с}^{-1}$	$k_{\text{офф}}, \text{с}^{-1}$	$K_{\text{д}}, \text{нМ}$
Водное микроокружение (ковалентная иммобилизация лиганда за аминокруппы на оптическом чипе CM5 с поверхностью, покрытой карбоксилированным декстраном)				
Прямое взаимодействие				
CYP11A1	Adx	Нет	Нет	Нет
CYP11A1	CYB5B	Нет	Нет	Нет
Инвертированное взаимодействие				
Adx	CYP11A1	$(6.5 \pm 0.5) \times 10^4$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	23 [1]
CYB5B	CYP11A1	$(0.30 \pm 0.03) \times 10^4$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-3}$	500 [3]
Фосфолипидное микроокружение (нековалентная иммобилизация лиганда в липидном бислое на оптическом чипе L1)				
Прямое взаимодействие				
CYP11A1	Adx	$(1.6 \pm 0.1) \times 10^4$	$(9.1 \pm 0.3) \times 10^{-3}$	570
CYP11A1	CYB5B	Ограничение детекции*		
Инвертированное взаимодействие				
Adx	CYP11A1	Невозможность иммобилизации лиганда**		
CYB5B	CYP11A1	Ограничение детекции*		

Примечание. Кинетические параметры представляют собой средние значения $\pm$ стандартное отклонение (SD) ($n = 3$).

* Ограничение детекции ББВ из-за вклада неспецифического связывания CYB5B и CYP11A1, используемых в качестве аналитов, с фосфолипидным бислоем на чипе L1.

** Невозможность иммобилизации Adx в фосфолипидном бислое на чипе L1.

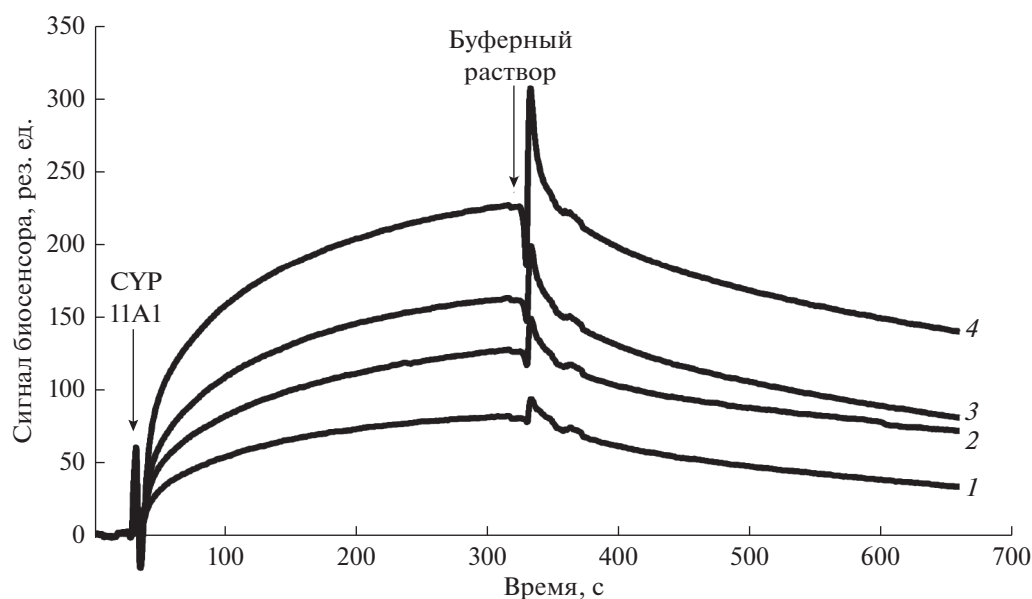


Рис. 2. SPR-анализ взаимодействия цитохрома *b5* (CYB5B), ковалентно иммобилизованного за аминогруппы на оптическом чипе CM5, и CYP11A1. В качестве аналита использовали растворы CYP11A1 в следующих концентрациях, нМ: 250 (1), 500 (2), 1000 (3) и 2000 (4). Все измерения выполнялись при 25°C. Результирующий сигнал биосенсора представлял собой разницу между рабочим (с иммобилизованным CYB5B) и контрольным (без белка) каналами биосенсора; сигналы биосенсора представлены в резонансных единицах, 1 рез. ед. соответствует связыванию 1 пг белка на 1 мм² поверхности чипа.

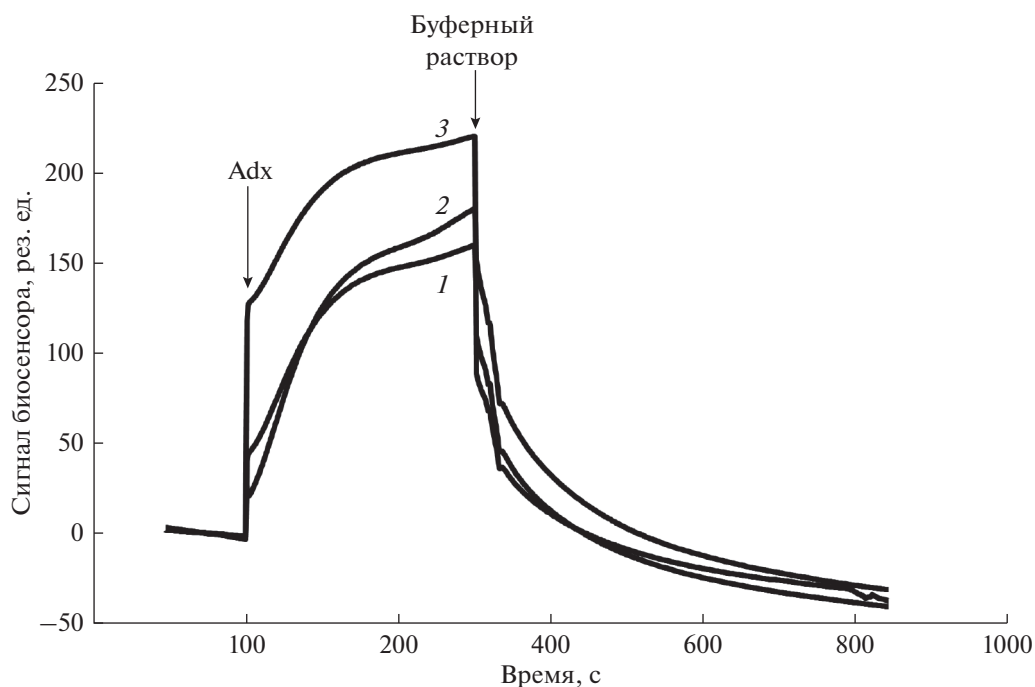


Рис. 3. SPR-анализ взаимодействия CYP11A1, иммобилизованного в фосфолипидном микроокружении на чипе L1, и адренодоксина (Adx). В качестве аналита использовали растворы Adx в следующих концентрациях, мкМ: 0.5 (1), 1 (2) и 3 (3). Все измерения выполнялись при 25°C. Результирующий сигнал биосенсора представлял собой разницу между рабочим (с иммобилизованным CYP11A1) и контрольным (с липидным бислоем, но без белка) каналами биосенсора; сигналы биосенсора представлены в резонансных единицах, 1 рез. ед. соответствует связыванию 1 пг белка на 1 мм² поверхности чипа.

регистрация взаимодействия между CYP11A1, иммобилизованным на чипе L1 в фосфолипидном микроокружении, и его альтернативным редокс-партнером CYB5B (аналит) имела некоторые ограничения — CYB5B связывался с липидной бислойной мембраной на чипе как в контрольном канале биосенсора, так и в канале с иммобилизованным в бислой CYP11A1. Исключить фоновое связывание CYB5B с липидным бислоем можно путем использования водорастворимой транкированной по мембранному домену формы белка (с удаленным мембранным якорем), однако такие ББВ не будут отражать реальной картины.

С учетом вышеизложенного SPR-анализ термодинамических параметров и влияние низкомолекулярных соединений стероидной природы (субстраты, продукты, ингибиторы) на белок-белковые взаимодействия Adx–CYP11A1 и CYB5B–CYP11A1 предпочтительно проводить в водном микроокружении, т.е. в таких условиях, когда редокс-партнер ковалентно иммобилизован на чипе SM-типа, а цитохром P450 используется в качестве аналита (в растворе).

Таким образом, с помощью оптико-биосенсорного анализа было обнаружено, что взаимодействие CYP11A1 с Adx зависит от способа иммобилизации белков (при иммобилизации на чип CYP11A1 взаимодействия с Adx не было) и микроокружения (водная среда или липидный бислой). С помощью разработанного метода было зарегистрировано взаимодействие CYB5B с CYP11A1. Несмотря на различную локализацию данных белков в клетке (CYB5B расположен на внешней мембране митохондрии, CYP11A1 — на внутренней), результат представляет интерес с точки зрения потенциальной регуляции активности стероидогенного цитохрома CYP11A1 на уровне ББВ. На основании полученных данных можно сделать вывод, что при работе на оптическом SPR-биосенсоре с цитохромами P450 предпочтительна ковалентная иммобилизация редокс-партнера (Adx, CYB5) на чипе SM-типа. Такой способ иммобилизации подходит для первичной оценки параметров ББВ (кинетические и равновесные константы, термодинамические параметры взаимодействия), а также для оценки влияния низкомолекулярных соединений на взаимодействие CYP с редокс-партнерами. Для анализа ББВ мембранных белков в липидном микроокружении в качестве аналита предпочтительнее использовать белок-партнер, не имеющий тропности к мембране. Параметры ББВ с участием CYP, установленные в липидном и в водном микроокружении, могут отличаться, предположительно, в зависимости от способа иммобилизации белка-лиганда на оптическом чипе. Так, неодинаковая плот-

ность доступных сайтов для связывания белка-партнера вследствие экранирования декстрановой поверхностью или липидным бислоем функциональных химических групп контактной поверхности, а также ограничение конформационных степеней свободы фиксированной белковой молекулы могут вносить вклад в наблюдаемую разницу значений кинетических констант.

Применение SPR-биосенсора было расширено для детекции разных комбинаций белок-белковых взаимодействий с участием мембранных гем-содержащих ферментов цитохромов P450 и их редокс-партнеров в водном и фосфолипидном микроокружении. Разработанные нами экспериментальные протоколы могут использоваться для дифференциальной оценки кинетики, аффинности и термодинамики комплексообразования, а также для оценки эффекта субстратов и/или продуктов на параметры комплексообразования. SPR-анализ ББВ представляет собой ценный инструмент в арсенале современных подходов в исследовании данного класса ферментов (CYP-omics).

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование взаимодействия CYP11A1–Adx в бислойной липидной мембране было выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-04-00485). Оптимизация SPR-протоколов для работы с мембранными белками P450-зависимых систем была выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы. Работа проводилась с использованием оборудования Центра коллективного пользования “Протеом человека” при ИБМХ, поддержанного субсидией Минобрнауки (№ 075-15-2019-1502 от 5 сентября 2019 года).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yablokov E.O., Sushko T.A., Ershov P.V., Florinskaya A.V., Gnedenko O.V., Shkel T.V., Grabovec I.P., Strushkevich N.V., Kaluzhskiy L.A., Usanov S.A., Gilep A.A., Ivanov A.S. 2019. A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of interactions of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners. *Biochimie*. **162**, 156–166.
2. Strushkevich N., MacKenzie F., Cherkesova T., Grabovec I., Usanov S., Park H.-W. 2011. Structural basis for pregnenolone biosynthesis by the mitochondrial monooxygenase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **108** (25), 10139–10143.

3. Yablokov E., Florinskaya A., Medvedev A., Sergeev G., Strushkevich N., Luschik A., Shkel T., Haidukevich I., Gilep A., Usanov S., Ivanov A. 2017. Thermodynamics of interactions between mammalian cytochromes P450 and b5. *Arch. Biochem. Biophys.* **619**, 10–15.
4. Гнеденко О.В., Яблоков Е.О., Ершов П.В., Свирид А.В., Шкель Т.В., Гайдукевич И.В., Струшкевич Н.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Иванов А.С. 2019. Взаимодействие протастинсинтазы с цитохромами P450. *Биомед. химия.* **65** (1), 63–66.
5. Guryev O., Carvalho R.A., Usanov S., Gilep A., Estabrook R.W. 2003. A pathway for the metabolism of vitamin D3: Unique hydroxylated metabolites formed during catalysis with cytochrome P450_{scc} (CYP11A1). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100** (25), 14754–14759.
6. Slominski A.T., Li W., Kim T.-K., Semak I., Wang J., Zjawiony J.K., Tuckey R.C. 2015. Novel activities of CYP11A1 and their potential physiological significance. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **151**, 25–37.
7. Сергеев Г.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. 2014. Роль структурных доменов цитохрома b₅ во взаимодействии с цитохромами. *Биохимия.* **79** (5), 520–531.
8. Kaszuba M., McKnight D., Connah M.T., McNeil-Watson F.K., Nobbmann U. 2008. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *J. Nanopart. Res.* **10** (5), 823–829.
9. Калужский Л.А., Ершов П.В., Курпединов К.С., Сони́на Д.С., Яблоков Е.О., Шкель Т.В., Гайдукевич И.В., Сергеев Г.В., Усанов С.А., Иванов А.С. 2019. SPR анализ белок-белковых взаимодействий с участием цитохромов P450 и цитохрома b₅, встроенных в бислойную липидную мембрану. *Биомед. химия.* **65** (5), 374–379.
10. Ershov P.V., Yablokov E.O., Florinskaya A.V., Mezentsev Y.V., Kaluzhskiy L.A., Tumilovich A.M., Gilep A.A., Usanov S.A., Ivanov A.S. 2019. SPR-based study of affinity of cytochrome P450s / redox partners interactions modulated by steroidal substrates. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **187**, 124–129.
11. Šrejber M., Navrátilová V., Paloncýová M., Bazgier V., Berka K., Anzenbacher P., Otyepka M. 2018. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: An overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners. *J. Inorgan. Biochem.* **183**, 117–136.
12. Yamada A., Shimizu N., Hikima T., Takata M., Kobayashi T., Takahashi H. 2016. Effect of Cholesterol on the Interaction of Cytochrome P450 Substrate Drug Chlorzoxazone with the Phosphatidylcholine Bilayer. *Biochemistry.* **55** (28), 3888–3898.
13. Neunzig J., Bernhardt R. 2014. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) stimulates the first step in the biosynthesis of steroid hormones. *PLOS ONE.* **9** (2), e89727.

Application of the SPR Biosensor for the Analysis of Protein–Protein Interactions in Aqueous Environment and Bilayer Lipid Membrane As Exemplified by P450_{scc} (CYP11A1)

P. V. Ershov¹, L. A. Kaluzhskiy¹, E. O. Yablokov¹*, O. V. Gnedenko¹, A. A. Kavaleuski²,
A. M. Tumilovich², A. A. Gilep², N. V. Strushkevich³, A. S. Ivanov¹

¹Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, 119121 Russia

²Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, 220141 Republic of Belarus

³Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, 121205 Russia

*e-mail: evgeyablokov1988@mail.ru

Protein–protein interactions (PPIs) are crucial for the successful realization of many metabolic and signaling pathways. Of particular interest are PPIs of membrane proteins, which form stable and/or transient complexes for the signal transduction, ion transport, and electron transfer within electron transfer chains. The Surface Plasmon Resonance (SPR) allows analyzing the thermodynamic and kinetic parameters (k_{on} and k_{off}) and equilibrium constants (K_d) of PPI, as well as the assessment of the effects of low molecular weight compounds. The aim of the present study was the adaptation of the SPR protocols for PPIs involving mitochondrial cytochrome P450 CYP11A1, mitochondrial cytochrome b₅ (CYB5B), and adrenodoxin (Adx). We found that the Adx–CYP11A1 and CYB5B–CYP11A interactions depend on the method of protein immobilization and on the microenvironment. For example, the k_{off} values for complexes Adx–CYP11A1 and CYB5B–CYP11A1 in the water phase were similar $(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, while the values of k_{on} for these complexes differed from each other by almost one order of magnitude $((6.5 \pm 0.5) \times 10^4$ and $(0.30 \pm 0.03) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively). This is in good agreement with the known high affinity of CYP11A1 to its cognate redox partner Adx. In the lipid environment, the rate of complex dissociation was higher than that in the water phase with k_{off} value equal to $(9.1 \pm 0.3) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. For the CYP11A1–CYB5B complex, the parameters of interaction in the lipid phase were not determined due to unspecific binding of the proteins used as analytes to the lipids immobilized on the L1 chip. We show for the first time that SPR method could be used for the detection and quantitative analysis of PPI of mitochondrial cytochromes (CYP) with their redox partners

both in water and in lipid phase. Experimental protocols developed and validated in this and in our previous work may serve as valuable tools for studies of CYP proteins, CYPomics, and could also be applied for other membrane proteins. **Funding.** The study of the CYP11A1–Adx interactions in the bilipid membrane environment was performed with support of the Russian Foundation for Basic Research (project no. 19-04-00485). Optimization of SPR protocols for analysis of membrane protein of P450-dependent systems was performed in the framework of the Program for Basic Research of State Academies of Sciences for 2013–2020. The work was performed using the equipment of the “Human Proteome” Core Facilities of the Institute of Biomedical Chemistry, which is supported by the Ministry of Education and Science (agreement no. 075-15-2019-1502 of September 5, 2019).

Keywords: surface plasmon resonance (SPR), SPR biosensor, SPR protocols, mitochondrial cytochrome P450 11A1 (CYP11A1), mitochondrial cytochrome *b5* (CYB5B), redox-partners, protein–protein interaction, kinetics, affinity, steroids