

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**ПРОТЕОЛИПОСОМЫ КАК СПОСОБ ИММОБИЛИЗАЦИИ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ
ДЛЯ SPR-АНАЛИЗА НА ПРИМЕРЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ CYP3A4 И CYP5A ЧЕЛОВЕКА**

Л.А. Калужский^{1}, Е.О. Яблоков¹, М.С. Кисель², А.М. Тумилович², С.А. Усанов², Т.В. Шкель²,
О.В. Гнеденко¹, А.С. Иванов¹*

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

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

Микросомальные системы цитохромов P450 человека состоят из трёх компонентов, являющихся мембранными белками: гемопротеина цитохрома P450 (CYP), NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы (CPR) и небольшого регуляторного гем-содержащего белка цитохрома b_5 (CYP5A). Важным направлением в изучении системы цитохромов P450 является исследование межмолекулярных взаимодействий как с белками-партнёрами, так и с возможными прототипами лекарств. Одним из передовых подходов к изучению межмолекулярных взаимодействий является использование метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR). При этом возникает проблема иммобилизации мембранных белков на оптический чип SPR-биосенсора. Для моделирования нативных условий важное значение имеет соблюдение правильной ориентации белковой глобулы в пространстве. Ранее нами был разработан метод, предполагающий прямую иммобилизацию нативных мембранных белков в планарную бислойную липидную мембрану на поверхности чипа биосенсора. Другим широко распространённым подходом для работы с мембранными белками является конструирование протеолипосом, содержащих мембранные белки. В данной работе нами на примере белковых партнёров CYP3A4 и CYP5A было проведено сравнение двух подходов создания протеолипосом для SPR-анализа межмолекулярных взаимодействий мембранных белков: встраивание мембранного белка в липосому, насыщенные детергентом, и встраивание мембранного белка в формирующиеся протеолипосомы по механизму мицеллярной коалесценции. SPR-анализ показал взаимодействие CYP3A4 с протеолипосомами, полученными методом встраивания CYP5A в липосому, насыщенные детергентом. Факт взаимодействия между CYP3A4 и полученными методом мицеллярной коалесценции протеолипосомами, содержащими CYP5A, зафиксировать не удалось. Полученные результаты показали, что встраивание мембранного белка в липосому, насыщенные детергентом, является более предпочтительным методом для работы с SPR-биосенсором по сравнению с методом формирования протеолипосом мицеллярной коалесценцией. Приведенные подробные протоколы создания протеолипосом и SPR-анализа могут быть полезны широкому кругу исследователей.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс; цитохром P450; цитохром b_5 ; протеолипосомы

DOI: 10.18097/BMCRM00160

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что в большинстве геномов различных организмов от 20% до 30% генов кодируют мембранные белки [1, 2]; в геноме человека этот показатель составляет 30% [1]. Мембранными белками, как правило, являются рецепторы, белки, отвечающие за межклеточные взаимодействия, ионные каналы, белки-транспортёры, некоторые электрон-транспортные белки, а также ферменты. Мембранные белки являются мишенями для 50% всех современных лекарств [3]. Одним из классов мембранных белков, значимых с точки зрения фармакологии, являются ферменты монооксигеназной системы – цитохромы P450 и их белки-переносчики электронов. Микросомальные системы цитохромов P450 человека состоят из трёх компонентов, являющихся мембранными белками – гемопротеина цитохрома P450 (CYP), NADPH-зависимой цитохром P450 редуктазы (CPR) и небольшого регуляторного гем-содержащего белка цитохрома b_5 (CYP5A) [4]. Микросомальные CYP осуществляют метаболизм ксенобиотиков, синтез

стероидных гормонов и других биологически активных соединений. Некоторые микросомальные CYP человека рассматриваются как перспективные мишени для антигиперхолестеринемической терапии (ингибиторы CYP51) [5] и как мишени для противораковых препаратов (ингибиторы CYP19 и CYP17) [6, 7].

По этой причине огромное значение приобретает исследование межмолекулярных взаимодействий цитохромов P450 как с белками-партнёрами, так и с возможными прототипами лекарств. Одним из наиболее высокопроизводительных и высокочувствительных методов изучения межмолекулярных взаимодействий является биосенсорный анализ, принцип работы которого основан на анализе эффекта поверхностного плазмонного резонанса (surface plasmon resonance, SPR). Однако, возникает проблема иммобилизации мембранных белков на оптический чип биосенсора. Важным является ориентированная иммобилизация таких белков в нативных условиях, с соблюдением правильной ориентации белковой глобулы в пространстве относительно поверхности сенсора.



Существуют различные методы, позволяющие в той или иной мере воспроизвести данные условия на оптическом чипе биосенсора, например, метод нанодисков [8]. Ранее нами был разработан и описан метод, предполагающий прямую иммобилизацию нативных мембранных белков в планарную бислойную липидную мембрану на поверхности чипа биосенсора [9]. Одним из широко распространённых подходов для работы с мембранными белками с помощью различных методов остается конструирование протеолипосом, содержащих мембранные белки [10].

В данной работе на примере белковых партнёров СУР3А4 и СУВ5А приведено сравнение двух методов приготовления протеолипосом: встраивание мембранного белка (СУВ5А) в липосомы, насыщенные детергентом, и встраивание мембранного белка в формирующиеся протеолипосомы по механизму мицеллярной коалесценции [11] с последующим SPR-анализом взаимодействия с СУР3А4. Данные методы приводят к формированию протеолипосом в ходе постепенного удаления из реакционной смеси мягкого детергента и отличаются в первую очередь его стартовой концентрацией в смеси. Было показано взаимодействие СУР3А4 с протеолипосомами, полученными методом встраивания мембранного белка (СУВ5А) в липосомы, насыщенные детергентом. Полученные значения кинетических и равновесных параметров взаимодействия свидетельствуют о том, что зарегистрированное взаимодействие было более аффинно по сравнению с параметрами, полученными ранее для той же пары в случае, когда СУВ5А был иммобилизован в планарный липидный бислой, сформированный на поверхности чипа биосенсора [9]. Факт взаимодействия между СУР3А4 и полученными методом мицеллярной коалесценции протеолипосомами, содержащими СУВ5А, зафиксировать не удалось. Таким образом, было показано, что встраивание мембранного белка (СУВ5А) в липосомы, насыщенные детергентом, является более предпочтительным методом для работы с SPR-биосенсором по сравнению с методом формирования протеолипосом мицеллярной коалесценцией. Приведённые в статье подробные протоколы анализа могут послужить основой для последующей оптимизации процесса иммобилизации цитохромов Р450 на поверхности оптического чипа биосенсора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Рекомбинантные белковые препараты

В работе были использованы высокоочищенные (>95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле) препараты рекомбинантных белков: микросомальный цитохром Р450 3А4 человека (СУР3А4) и микросомальный цитохром b_5 (СУВ5А) человека, полученные в результате гетерологической экспрессии в штаммах *E. coli* в Институте биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси согласно методикам, описанным ранее [12, 13].

Реактивы

10х концентрат НБС-N буфера (150 мМ NaCl, 10 мМ НЕРЕС, рН 7.4 после разведения) был получен от «Cytiva» (США). Бычий сывороточный альбумин (БСА) был получен от «AppliChem» (Германия), СНАПС (3-[(3-холамидопропил)-

диметиламмоний]-1-пропансульфонат) и препарат общей фракции липидов сои были получены от «Merck» (США). Остальные реактивы аналитической чистоты были получены от отечественных поставщиков.

Очистка фракции фосфолипидов

Фосфолипиды выделяли из общей фракции липидов сои с помощью метода осаждения холодным ацетоном согласно ранее описанному протоколу [9]:

1. Образец общей фракции липидов сои массой 5 г растворяли в минимально возможном количестве гексана при комнатной температуре.

2. Далее к получившемуся раствору добавляли значительный избыток (100 мл) ацетона, охлажденного до -18°C .

3. Надосадочную жидкость сливали.

4. Остаток ацетона удаляли с помощью роторного испарителя Rotacool («Heidolph», Германия) в круглодонной колбе при комнатной температуре (скорость вращения колбы составляла 30 об/мин) в течение 1 ч, в результате на дне колбы тонкой пленкой осаждались фосфолипиды. Процесс испарения ацетона контролировали с помощью вакуумметра и останавливали в тот момент, когда прекращалось падение давления в системе.

5. Стадии очистки фосфолипидов №2-4 повторяли 3 раза, после чего полученную фракцию фосфолипидов растворяли в хлороформе и хранили при -40°C .

Приготовление препарата липосом

Препарат липосом, использовавшийся в дальнейшем для приготовления протеолипосом, готовили согласно следующему протоколу.

Для приготовления липосом использовали круглодонную колбу DIN EN ISO 4797 («Lenz», Германия) объемом 10 мл. После предварительного взвешивания колбы в нее переносили 2 мл исходного раствора фосфолипидов в хлороформе и удаляли хлороформ с помощью роторного испарителя Rotacool при комнатной температуре и скорости вращения колбы 30 об/мин. Процесс удаления хлороформа контролировали с помощью вакуумметра. Процесс останавливали в тот момент, когда прекращалось падение давления в системе. Колбу с осажденными на стенках фосфолипидами взвешивали для расчета массы полученных фосфолипидов. В колбу добавляли 3-4 стеклянных шарика и НБС-N буфер в объеме, необходимом для создания суспензии липосом в финальной концентрации 100 мг/мл, после чего фосфолипиды диспергировали путём встряхивания. Полученную суспензию подвергали воздействию ультразвука при температуре 4°C на ультразвуковом гомогенизаторе Sonoplus hd 3110 («Bandelin», Германия) в течении 2 мин при мощности излучателя 20% от максимальной. Далее полученные липосомы стандартизировали по размеру путём многократного пропускания через поликарбонатный фильтр с диаметром пор 100 нм с помощью устройства LipoFast-Basic («Avestin», Канада). Гомогенность распределения полученных липосом по размеру контролировали методом динамического светорассеяния с использованием анализатора Zetasizer μV («Malvern», Англия) при температуре 25°C . Для этого полученную суспензию липосом растворяли в 1000 раз в

HBS-N буфере и переносили 2 мкл в измерительную кварцевую кювету zmv 1002 («Malvern»). Частота измерений составляла 333.6 тыс/с, в течение 60 с, количество повторов в рамках одного измерения – 18.

Приготовление препарата протеолипосом методом встраивания в насыщенные детергентом липосомы

В пробирке типа Эппендорф объемом 500 мкл смешивали: 10 мкл СУВ5А (4 мкг/мкл), 40 мкл фосфолипидов 100 мг/мл, 221 мкл раствора CHAPS (10 мг/мл в HBS-N буфере) и 229 мкл HBS-N буфера. Финальное содержание компонентов смеси составляло: 40 мкг СУВ5А, 4 мг фосфолипидов, 2.21 мг CHAPS. При этом содержание CHAPS составляло 0.3% от массы смеси, а соотношение белок-липид было 1:100 по массе.

Содержание детергента в смеси определяли, исходя из уравнения (1):

$$C_{CHAPS} = C_{CHAPS-мономер} + R_{sat} \times C_{фосфолипид} \quad (1),$$

где C_{CHAPS} – финальная концентрация CHAPS в смеси, $C_{CHAPS-мономер}$ – концентрация детергента в водном растворе, при которой не формируются молекулярные комплексы детергента с фосфолипидами, R_{sat} – коэффициент отношения содержания детергента и фосфолипида в смеси для формирования липосом, насыщенных детергентом (для CHAPS в водном растворе составляет 0.31 по массе [11]), $C_{фосфолипид}$ – концентрация фосфолипида в смеси. После аккуратного пипетирования и формирования однородной суспензии смесь подвергали диализу против 2 л HBS-N буфера при температуре 5°C в течение 12 ч для удаления детергента и формирования протеолипосом. Диализ проводили в пробирке типа Эппендорф объемом 500 мкл с помощью диализной мембраны Spectra/Por Dialysis Membrane («Spectrum Laboratories», Канада) с пропускной способностью пор <6000-8000 Да при постоянном перемешивании диализирующего объема с помощью магнитной мешалки.

Приготовление препарата протеолипосом методом мицеллярной коалесценции

В пробирке объемом 500 мкл смешивали: 10 мкл СУВ5А (4 мкг/мкл), 40 мкл фосфолипидов (100 мг/мл), 417 мкл раствора CHAPS (10 мг/мл в HBS-N буфере) и 33 мкл HBS-N буфера. Финальное содержание компонентов смеси составило: 40 мкг СУВ5А, 4 мг фосфолипидов, 4.17 мг CHAPS. При этом содержание CHAPS составило 0,8% от массы смеси, а соотношение белок-липид было 1:100 по массе.

Содержание детергента в смеси определяли, исходя из уравнения (2)

$$C_{CHAPS} = C_{CHAPS-мономер} + R_{sol} \times C_{фосфолипид} \quad (2),$$

где C_{CHAPS} – финальная концентрация CHAPS в смеси, $C_{CHAPS-мономер}$ – концентрация детергента в водном растворе, при которой не формируются молекулярные комплексы детергента с фосфолипидами, R_{sol} – коэффициент отношения содержания детергента и фосфолипида в смеси, необходимого для полной солюбилизации липосом (для CHAPS в водном растворе

составляет 0.8 по массе [11]), $C_{фосфолипид}$ – концентрация фосфолипида в смеси. После аккуратного пипетирования и формирования однородной суспензии смесь подвергали диализу против 2 л HBS-N буфера при температуре 5°C в течение 12 ч для удаления детергентов и формирования протеолипосом. Диализ проводили в пробирке типа Эппендорф объемом 500 мкл с помощью диализной мембраны Spectra/Por Dialysis Membrane («Spectrum Laboratories», Канада) с пропускной способностью пор <6000-8000 Да при постоянном перемешивании диализирующего объема с помощью магнитной мешалки.

Поверхностный плазмонный резонанс

SPR анализ был выполнен с применением оптического биосенсора Biacore 3000 («GE Healthcare», США). В работе были использованы оптические чипы типа L1 («Cytiva»). В качестве рабочего буфера был использован буфер HBS-N («Cytiva»). Все измерения проводили при температуре 25°C. Полученные сенсограммы взаимодействий представляли собой запись сигнала биосенсора в реальном времени в резонансных единицах RU (1 RU соответствует 1 пг белка на поверхности оптического чипа).

Результирующий сигнал биосенсора представлял собой разницу между рабочим (с иммобилизованными протеолипосомами, содержащими СУВ5А) и контрольным (с иммобилизованными контрольными липосомами, не содержащими СУВ5А) каналами биосенсора. Значения констант скорости ассоциации и диссоциации комплексов, а также K_d комплексов вычисляли с использованием программного комплекса Biacore BIAevaluation v.4.1 («GE Healthcare»).

Анализ проводили циклически, цикл состоял из следующих операций:

1. Инъекция образца липосом, не содержащих встроенный СУВ5А, в контрольный канал биосенсора в течение 30 мин при скорости потока 2 мкл/мин;
2. Инъекция образца протеолипосом, содержащих встроенный СУВ5А, в опытный канал биосенсора в течение 30 мин при скорости потока 2 мкл/мин;
3. Инъекция в опытный и контрольный канал биосенсора образца БСА с концентрацией 0.5 мг/мл в течение 10 мин при скорости потока 10 мкл/мин;
4. Инъекция целевого образца СУР3А4 в течение 5 мин при скорости потока 5 мкл/мин;
5. Регистрация сигнала биосенсора после конца инъекции СУР3А4 в течение не менее 5 мин при скорости потока 5 мкл/мин.

Между циклами анализа иммобилизованные в каналах биосенсора липосомы удаляли 4-кратной инъекцией 2 М раствора NaCl с добавлением 0.5% CHAPS (w/w) в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин и однократной инъекцией 50 мМ раствора NaOH в тех же условиях согласно ранее опубликованному протоколу [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Приготовление препарата протеолипосом

Протеолипосомы и контрольные к ним липосомы, приготовленные методом встраивания мембранного белка в насыщенные детергентом липосомы и методом мицеллярной коалесценции, были иммобилизованы в опытный и

Таблица 1. Воспроизводимость иммобилизации липосом и протеолипосом, полученных методом встраивания мембранного белка в насыщенные детергентом липосомы и методом мицеллярной коалесценции.

Насыщенные детергентом липосомы							
Липосомы				Протеолипосомы			
Иммобилизация, RU	Среднее, RU	SD, RU	CV, %	Иммобилизация, RU	Среднее, RU	SD, RU	CV, %
6878	6005	1300	22	4089	3894	353	9
6678				4140			
4079				3971			
6386				3374			
Мицеллярная коалесценция							
Липосомы				Протеолипосомы			
Иммобилизация, RU	Среднее, RU	SD, RU	CV, %	Иммобилизация, RU	Среднее, RU	SD, RU	CV, %
6587	6494	155	2	4084	3464	748	22
6658				4129			
6327				2707			
6403				2936			

Примечание: SD - стандартное отклонение, CV – коэффициент вариации, выраженный в процентах.

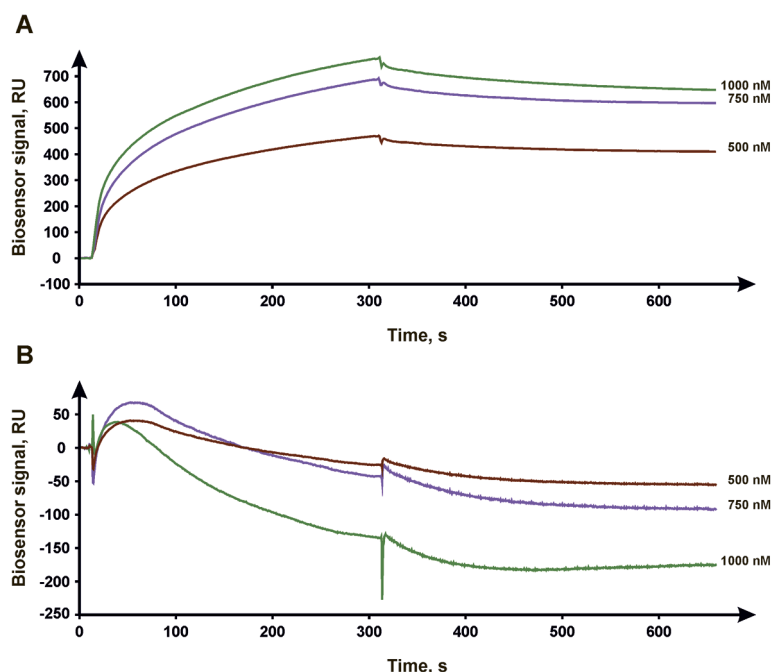


Рисунок 1. Сенсограммы взаимодействия СУР3А4 с протеолипосомами, содержащими СУВ5А. На рисунке отмечены использованные концентрации СУР3А4. А: протеолипосомы с СУВ5А были получены методом встраивания мембранного белка в насыщенные детергентом липосомы. В: протеолипосомы с СУВ5А были получены методом мицеллярной коалесценции

контрольные каналы чипа. В таблице 1 приведены значения уровней иммобилизации, полученные для определения воспроизводимости иммобилизации.

На рисунке 1 представлены полученные сенсограммы взаимодействия СУВ5А в составе протеолипосом, иммобилизованных на поверхности чипа L1, с СУР3А4.

Сенсограммы были проанализированы в специализированном программном комплексе Biacore VIAevaluation v.4.1 («GE Healthcare») и обработаны по протоколу «Kinetic Separate ka/kd». В результате были получены значения k_{on} (константа скорости образования

комплекса), k_{off} (константа скорости диссоциации комплекса), K_d (равновесная константа диссоциации комплекса) комплексообразования СУР3А4 с протеолипосомами, приведённые в таблице 2.

Как видно из рисунка 1, удалось зарегистрировать факт взаимодействия СУР3А4 с содержащими СУВ5А протеолипосомами, полученными методом встраивания мембранного белка в насыщенные детергентом липосомы. В то же время при использовании концентраций СУР3А4 до 1 мМ не удалось зарегистрировать факт взаимодействия СУР3А4 с содержащими СУВ5А протеолипосомами,

Таблица 2. Сравнение кинетических (k_{on} , k_{off}) и равновесных (K_d) констант взаимодействия СУР3А4 с иммобилизованным разными способами СУВ5А.

	k_{on} , $M^{-1}c^{-1} \times 10^3$	k_{off} , $c^{-1} \times 10^{-4}$	K_d , мкМ
Иммобилизация в планарный бислой на чипе (данные взяты из [9])	5,5±0,3	5,7±0,4	0,11±0,02
Иммобилизация в насыщенные детергентом липосомы	8,7	2,9	0,03
Иммобилизация в протеолипосомы методом мицеллярной коалесценции	н/в	н/в	н/в

Примечание. н/в - нет взаимодействия.

полученными методом мицеллярной коалесценции.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе приведены два метода создания протеолипосом, предназначенных для включения в состав липосом компонентов микросомальной монооксигеназной системы цитохрома Р450. Полученные результаты дают возможность сопоставления двух методик изготовления протеолипосом с методикой прямого встраивания белка в планарный липидный бислой на поверхности оптического чипа [9].

Было установлено, что уровни иммобилизации протеолипосом, полученных двумя разными методами, оказались сопоставимыми (табл. 1). Уровень иммобилизации протеолипосом, полученных методом встраивания в насыщенные детергентом липосомы, был достаточно стабилен и характеризовался параметром коэффициента вариации (CV), равным 9%. Протеолипосомы, полученные методом мицеллярной коалесценции, характеризовались менее стабильным уровнем иммобилизации (CV 22%) при одинаковых параметрах инъекции, но средний уровень иммобилизации отличался не более чем на 13%. Вероятно, это связано с тем, что процесс формирования липосом из мицелл в присутствии белка сильно зависит от условий и не гарантируется достаточной гомогенностью образцов. Липосомы, прошедшие процедуру получения протеолипосом методом встраивания в насыщенные детергентом липосомы, характеризовались более выраженным разбросом значений уровня иммобилизации (CV 22%) по сравнению с липосомами, использованными в методе мицеллярной коалесценции (CV 2%). Однако средние значения уровней иммобилизации, как и в случае протеолипосом, отличались друг от друга незначительно (разница составила 8%).

Липосомы, не содержащие мембранного белка, но прошедшие все процедуры как метода встраивания в насыщенные детергентом липосомы, так и метода мицеллярной коалесценции, характеризовались более высоким уровнем иммобилизации (1.6 и 1.9 раз соответственно) по сравнению с протеолипосомами. Это может быть связано с различными физико-химическими свойствами липосом, а именно с тем, что протеолипосомы за счёт связанного с ними белка имеют больший поверхностный заряд, чем липосомы, не содержащие в своей структуре белков. Более высокий поверхностный заряд препятствует плотному расположению протеолипосом на поверхности чипа за счёт электростатического отталкивания одноимённых зарядов.

Иммобилизованные протеолипосомы содержали небольшой гемопротейн – цитохром b_5 (СУВ5А),

играющий регуляторную функцию в микросомальных монооксигеназных системах цитохрома Р450 [14]. В качестве белка-партнёра для SPR-анализа межмолекулярных взаимодействий был выбран СУР3А4, активность которого зависит от СУВ5А [15]. Ранее, нами было охарактеризовано взаимодействие пары СУВ5А/СУР3А4 с включением СУВ5А в планарный липидный бислой на поверхности оптического чипа биосенсора [9]. Были количественно охарактеризованы константы скорости образования комплекса (k_{on}), константы скорости диссоциации комплекса (k_{off}) и равновесные константы диссоциации (K_d). При анализе взаимодействия СУР3А4 с иммобилизованным в протеолипосомы СУВ5А было установлено, что в случае протеолипосом, полученных методом мицеллярной коалесценции, образования комплекса не наблюдается. Параметры взаимодействия СУВ5А/СУР3А4 в протеолипосомах, полученных методом насыщения детергентом, говорят о более высоком сродстве комплекса СУВ5А/СУР3А4, чем при иммобилизации СУВ5А в планарную мембрану на поверхности оптического чипа (таблица 2). Значение K_d , полученное для пары СУВ5А/СУР3А4 при иммобилизации СУВ5А в протеолипосомах, приготовленных методом насыщения детергентом, была в 3 раза меньше, чем при взаимодействии СУР3А4 с СУВ5А, иммобилизованным напрямую в планарную липидную мембрану на поверхности чипа. Скорость образования комплексов СУВ5А/СУР3А4 была примерно в 1.6 раза больше в случае протеолипосом, изготовленных методом насыщения детергентом. Скорость диссоциации комплексов СУР3А4 с иммобилизованным в протеолипосомах СУВ5А была почти в 2 раза меньше по сравнению со взаимодействием с СУВ5А, иммобилизованным в планарную мембрану. Следует отметить, что эта разница заметная, но небольшая. Поэтому можно считать метод иммобилизации в планарную липидную мембрану, описанный ранее [9], более предпочтительным за счёт его относительной простоты и меньшей трудоёмкости.

Можно предположить, что более высокая аффинность при взаимодействии СУР3А4 с иммобилизованным в протеолипосомах СУВ5А обусловлена более правильным позиционированием СУВ5А в мембране, что достигается плавным переходом этого белка из мицеллярной фазы в липидную. При инъекции СУВ5А поверх иммобилизованной липидной мембраны в отсутствие детергента правильная ориентация молекулы, по-видимому, обеспечивается не всегда; к тому же присутствует фракция сорбированных на мембране неправильно ориентированных молекул СУВ5А. Мы полагаем, что отсутствие взаимодействия СУР3А4 с СУВ5А, иммобилизованным в протеолипосомы методом мицеллярной коалесценции, можно объяснить хаотичной ориентацией мембранных белков, встраивающихся в

формирующиеся протеолипосомы при их формировании в ходе данного метода [11]. Можно говорить о том, что по сравнению с методом насыщенных детергентом липосом, при создании протеолипосом методом мицеллярной коалесценции доля CYP5A на поверхности внутри липосомы, недоступная для CYP3A4, больше. Это связано с тем, что при применении метода насыщения детергентом целостность липосом не нарушается и почти все молекулы CYP5A встраиваются на наружной поверхности протеолипосомы с преимущественной ориентацией встраиваемых в липосомы молекул белка «вовне» [11]. При изготовлении протеолипосом методом мицеллярной коалесценции сборка протеолипосом носит стохастический характер и молекулы CYP5A распределяются между внутренней и внешней поверхностями липосомы равномерно, что приводит к снижению количества молекул CYP5A на внешней поверхности липосом. Считается, что в случае мицеллярной коалесценции вплоть до половины молекул встраиваемого белка могут быть ориентированы внутрь формирующихся протеолипосом [11, 16]. Так же метод мицеллярной коалесценции подразумевает использование более высоких концентраций детергентов (0.8% против 0.3%), что может влиять на белок при длительной инкубации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе нами на примере белковых партнёров CYP3A4 и CYP5A было проведено сравнение двух подходов создания протеолипосом, пригодных для SPR-анализа взаимодействий мембранных белков: встраивание мембранного белка в липосомы, насыщенные детергентом, и встраивание мембранного белка в формирующиеся протеолипосомы по механизму мицеллярной коалесценции. Исходя из наших наблюдений, для работы с цитохромами P450 с помощью метода SPR более приемлемым подходом оказалось встраивание белков в протеолипосомы, полученные методом встраивания в насыщенные детергентом липосомы. Однако, по сравнению с описанным нами ранее [9] методом иммобилизации мембранных белков напрямую в планарную мембрану на оптическом чипе биосенсора, создание протеолипосом с их последующей очисткой от детергента и иммобилизацией на чип биосенсора является более сложным и время-затратным методом. При этом, необходимо отметить, что изготовление протеолипосом методом мицеллярной коалесценции оказалось менее предпочтительно для работы на оптическом биосенсоре с цитохромами P450, что, по-видимому, стало следствием невозможности детерминировать ориентацию встраиваемого в протеолипосомы мембранного белка. Описанные в настоящей работе протоколы приготовления протеолипосом и SPR-анализа возможно модифицировать в зависимости от поставленных задач. Например, допустимо варьирование липидного состава мембраны при определении влияния её композиции на межмолекулярные взаимодействия.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена в рамках гранта РФФИ №19-04-00485 «SPR анализ межмолекулярных взаимодействий с участием мембранных белков, встроженных в бислойную липидную мембрану» с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека» при Институте биомедицинской химии (финансовая поддержка Минобрнауки в рамках соглашения №075-15-2019-1502 от 5 сентября 2019 года).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, **305**(3), 567–580. DOI:10.1006/jmbi.2000.4315
2. Liszewski, K. (2015) Dissecting the Structure of Membrane Proteins. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, **35**(17), 1, 14, 16–17. DOI:10.1089/gen.35.17.02
3. Overington, J. P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**(12), 993–996. DOI:10.1038/nrd2199
4. Davydov, D. R. (2011) Microsomal monooxygenase as a multienzyme system: the role of P450-P450 interactions. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **7**(5), 543–558. DOI:10.1517/17425255.2011.562194
5. Korošec, T., Ačimovič, J., Seliskar, M., Kocjan, D., Tacer, K.F., Rozman, D., Urleb, U. (2008) Novel cholesterol biosynthesis inhibitors targeting human lanosterol 14 α -demethylase (CYP51). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**(1), 209–221. DOI:10.1016/j.bmc.2007.10.001
6. Recalde-Gil, A.M., Klein-Júnior, L., Salton, J., Bordignon, S., Cechinel-Filho, V., Matté, C., Henriques, A. (2019) Aromatase (CYP19) inhibition by biflavonoids obtained from the branches of *Garcinia gardneriana* (Clusiaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, **74**(9–10), 279–282. DOI:10.1515/znc-2019-0036
7. Attard, G., Reid, A.H.M., Olmos, D., de Bono, J.S. (2009) Antitumor activity with CYP17 blockade indicates that castration-resistant prostate cancer frequently remains hormone driven. *Cancer Res.*, **69**(12), 4937–4940. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-08-4531
8. Sligar, S.G., Denisov, I.G. (2021) Nanodiscs: A toolkit for membrane protein science. *Protein Sci.*, **30**(2), 297–315. DOI:10.1002/pro.3994
9. Kaluzhskiy, L.A., Ershov, P.V., Kurpedinov, K.S., Sonina, D.S., Yablokov, E.O., Shkel, T.V., Haidukovich, I.V., Sergeev, G.V., Usanov, S.A., Ivanov, A.S. (2019) SPR Analysis of Protein-Protein Interactions Involving Cytochromes P450 and Cytochrome b5 Integrated into Lipid Membrane. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(5), 374–379. DOI: 10.18097/PBMC20196505374
10. Scalise, M., Pochini, L., Giangregorio, N., Tonazzi, A., Indiveri, C. (2013) Proteoliposomes as tool for assaying membrane transporter functions and interactions with xenobiotics. *Pharmaceutics*, **5**(3), 472–497. DOI:10.3390/pharmaceutics5030472
11. Rigaud, J.-L., Lévy, D. (2003) Reconstitution of Membrane Proteins into Liposomes. *Methods in Enzymology*, **372**, 65–86. DOI:10.1016/S0076-6879(03)72004-7
12. Gilep, A.A., Guryev, O.L., Usanov, S.A., Estabrook, R.W. (2001) Apocytocrome b5 as an indicator of changes in heme accessibility: preliminary studies with cytochrome P450 3A4. *J. Inorg. Biochem.*, **87**(4), 237–244. DOI:10.1016/S0162-0134(01)00333-6
13. Sergeev, G.V., Gilep, A.A., Usanov, S.A. (2014) The role of cytochrome b5 structural domains in interaction with cytochromes P450. *Biochemistry (Moscow)*, **79**(5), 406–416. DOI:10.1134/S0006297914050046
14. Zhang, H., Gao, N., Liu, T., Fang, Y., Qi, B., Wen, Q., Zhou, J., Jia, L., Qiao, H. (2015) Effect of Cytochrome b5 Content on the Activity of Polymorphic CYP1A2, 2B6, and 2E1 in Human Liver Microsomes. *PLoS One*, **10**(6), e0128547. DOI:10.1371/journal.pone.0128547
15. Lee, S.-J., Goldstein, J.A. (2012) Comparison of CYP3A4 and CYP3A5: The Effects of Cytochrome b5 and NADPH-cytochrome P450 Reductase on Testosterone Hydroxylation Activities. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, **27**(6), 663–667. DOI:10.2133/dmpk.DMPK-12-SH-030
16. Verchère, A., Broutin, I., Picard, M. (2017) Reconstitution of Membrane Proteins in Liposomes. *Methods Mol Biol*, **1635**, 259–282. DOI:10.1007/978-1-4939-7151-0_14

Поступила: 05.09.2021
После доработки: 17.10.2021
Принята к публикации: 01.11.2021

**PROTEOLIPOSOMES AS A METHOD OF MEMBRANE PROTEIN IMMOBILIZATION
FOR SPR-ANALYSIS WITH THE HUMAN CYP3A4 AND CYB5A INTERACTION AS AN EXAMPLE.**

L.A. Kaluzhskiy^{1}, E.O. Yablokov¹, M.S. Kisel², A.M. Tumilovich², S.A. Usanov², T.V. Shkel²,
O.V. Gnedenko¹, A.S. Ivanov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: leonid.kaluzhskiy@ibmc.msk.ru

²Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus,

5/2 Acad. Kuprevich Street, Minsk, 220141 Belarus

Microsomal systems of human cytochrome P450 consist of three components, which are membrane proteins: cytochrome P450 hemoprotein (CYP), NADPH-dependent cytochrome P450 reductase (CPR), and a small regulatory heme-containing protein cytochrome *b₅* (CYB5A). In the study of the cytochrome P450 system functioning the study of intermolecular interactions both with partner proteins and with possible drug prototypes is of great importance. Surface plasmon resonance (SPR) is a powerful and reliable tool for studying intermolecular interactions. However, there is a problem of immobilization of membrane proteins on the optical chip of the SPR biosensor. It is important to immobilize such proteins in native conditions with respect to the correct orientation of the protein globule to the surface of sensor. Previously, we have developed and described a method involving direct native immobilization of membrane proteins into a planar bilayer lipid membrane on the surface of a biosensor chip. At the same time, one of the commonly used approaches to working with membrane proteins using various methods is the construction of proteoliposomes containing membrane proteins. In this work, using CYP3A4 and CYB5A as protein partners, we evaluated two approaches to the creation of proteoliposomes: incorporation of a membrane protein into liposomes saturated with detergents and incorporation of a membrane protein into the forming proteoliposomes by the mechanism of micellar coalescence. The interaction of CYP3A4 with proteoliposomes obtained by incorporating CYB5A into detergent-saturated liposomes was shown. On the contrary, interaction between CYP3A4 and proteoliposomes containing CYB5A, obtained by the method of micellar coalescence, was not detected. Thus, it was shown that the incorporation of the membrane protein into liposomes saturated with a detergent was a more preferable method for working with an SPR biosensor as compared to the method of proteoliposomes formation by micellar coalescence. Detailed protocols for the creation of proteoliposomes and SPR-analysis can be useful to a wide range of researchers.

Key words: surface plasmon resonance; cytochrome P450; cytochrome *b₅*; proteoliposomes

FUNDING

The work was performed within the financial support of RFBR, grant № 19-04-00485 «SPR analysis of intermolecular interactions involving membrane proteins embedded in the bilayer lipid membrane» using the equipment of «Human Proteome» Core Facility of the Institute of Biomedical Chemistry supported by MINOBRNAUKI, Agreement 075-15-2019-1502 from 5 September 2019.

Received: 05.09.2021, revised: 17.10.2021, accepted: 01.11.2021