

ISSN 0002–354X (print)
УДК 577.152.33+577.152.16

Поступило в редакцию 04.11.2016
Received 04.11.2016

Н. М. Литвинко, Г. Н. Антончик, Т. Г. Глушакова, Д. О. Герловский

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА P450 И ФОСФОЛИПАЗ A₂ РАЗНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ, ОБНАРУЖИВАЕМЫЕ КД-СПЕКТРОСКОПИЕЙ

(Представлено членом-корреспондентом С. А. Усановым)

Проведено изучение особенностей белок-белкового взаимодействия цитохромов P450 (CYP2B4 и CYP3A4) и фосфолипаз A₂ (ФЛА₂) с использованием спектроскопии кругового дихроизма. Обнаружены разнонаправленные эффекты в изменении спектров КД смеси ФЛА₂ яда змеи–CYP2B4 (соотношение 1 : 4 моль/моль) и смеси ФЛА₂ поджелудочной железы свиньи–CYP3A4 человека (соотношение 1 : 20 моль/моль) в сравнении со спектрами КД индивидуальных белков соответственно, что свидетельствует о прямом белок-белковом взаимодействии ФЛА₂ и CYP. При этом результирующий спектр КД в первом случае характеризуется увеличением в 2,5 раза значений молярной эллиптичности смеси белков по отношению к молярной эллиптичности цитохрома P450, а во втором – существенным уменьшением этого показателя, что отражает значительные изменения в конформации этих биополимеров при взаимодействии.

Ключевые слова: фосфолипазы A₂ поджелудочной железы и яда змеи, CYP3A4, CYP2B4, КД-спектроскопия.

N. M. Litvinko, G. N. Antonchik, T. G. Glushakova, D. O. Gerlovsky

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

FEATURES OF THE PROTEIN-PROTEIN INTERACTION OF CYTOCHROME P450 AND PLA₂ OF DIFFERENT NATURE REVEALED USING CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY

(Communicated by Corresponding Member S. A. Usanov)

The study of the features of the protein-protein interaction of cytochrome P450 (CYP3A4 and CYP2B4) and phospholipase A₂ (PLA₂) using circular dichroism spectroscopy was carried out.

The divergent effects were found in the change of the CD-spectrum of the mixture of snake venom PLA₂–CYP2B4 (ratio 1 : 4 mole/mole) and the mixture of porcine pancreatic PLA₂–human CYP3A4 (ratio 1 : 20 mole/mole), as compared to the CD-spectra of the individual protein, respectively, which evidences direct protein-protein interactions of PLA₂ and CYP.

The resultant CD-spectrum in the first case is characterized by a 2.5-fold increase in the molar ellipticity protein mixture in relation to the molar ellipticity of cytochrome P450, and the second – by a significant reduction of this index, which reflects the significant changes in the conformation of the interaction of these biopolymers.

Keywords: pancreatic phospholipases A₂, snake venom phospholipases A₂, CYP3A4, CYP2B4, CD-spectroscopy.

Введение. Известно, что функциональная активность цитохрома P-450 (КФ 1.14.14.1, CYP), как и фосфолипазы A₂ (КФ 3.1.1.4., ФЛА₂) связана с поверхностью раздела фаз «липид–вода». CYP является мембранно-связанным белком подобно рецепторам G-белка и тирозин киназы, через взаимодействие с которыми опосредуется участие фосфолипаз в функционировании передачи внешнего сигнала на внутренний «язык» клетки. CYP является терминальной оксидазой в монооксигеназной ферментной системе, окисляет разнообразные соединения и принимает участие в выведении лекарственных средств из организма [1]. Монооксигеназная система печени играет важную роль в метаболизме арахидоновой кислоты [2], которая отщепляется под действием ФЛА₂ от фосфоглицеридов (рис. 1). Другим продуктом, образующимся при гидролизе фосфолипидов с участием ФЛА₂, является лизофосфолипид. Известно, что лизолецитин проявляет эффекторное действие и на каталитическую активность CYP [3].

Поскольку имеются сведения о синергическом действии белков друг на друга для выполнения определенной функции [4], наряду с активацией монооксигеназного катализа продуктами ферментативного гидролиза фосфолипидов, нельзя исключить прямого белок-белкового взаимодействия между ФЛА₂ и CYP.

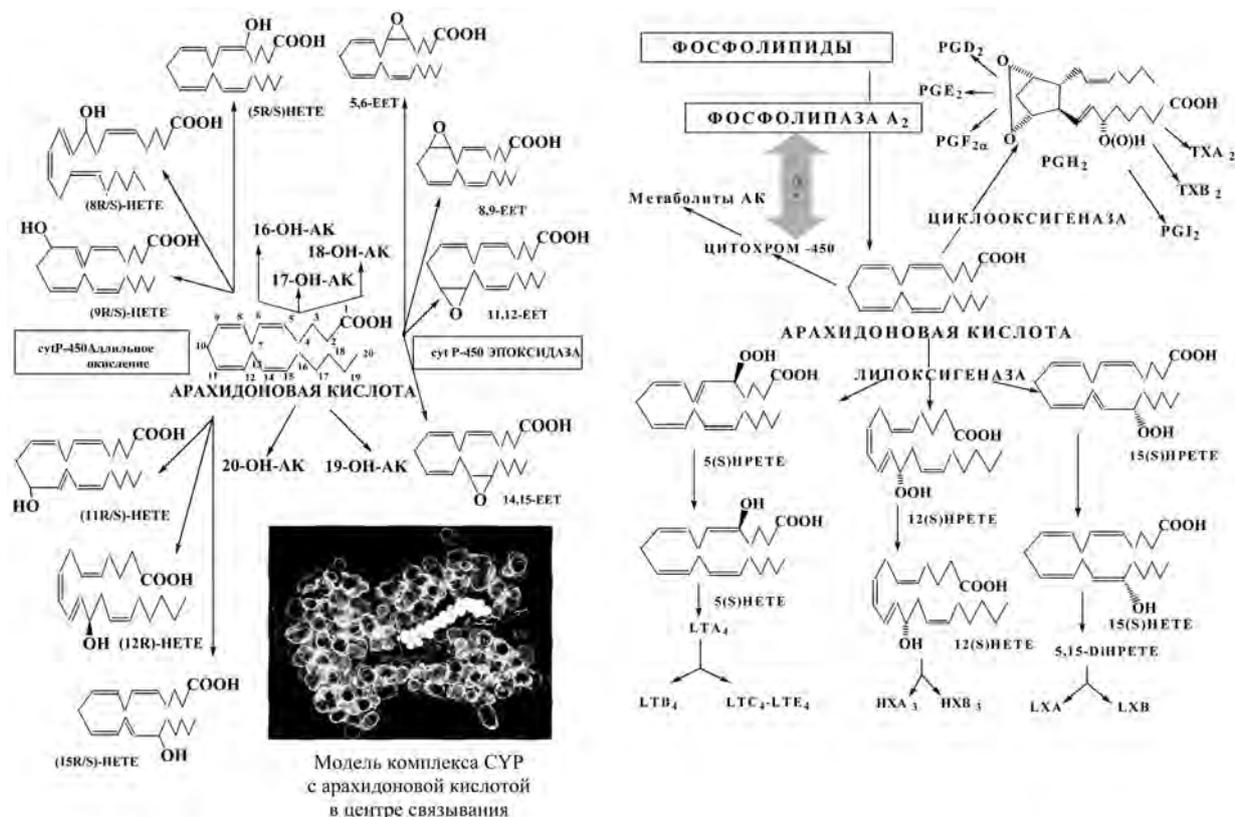


Рис. 1. Схема СУР-зависимого метаболизма арахидоновой кислоты

Fig. 1. Scheme of CYP-dependent metabolism of arachidonic acid

В пользу такого предположения свидетельствуют данные, полученные нами при изучении активности ФЛА₂ и СУР *in vivo* до и после введения экспериментальным животным фенобарбитала, которые указывают на функциональную значимость фосфолипаз в процессах трансформации ксенобиотиков через возможное опосредованное продуктами липолитической реакции взаимодействие с СУР [5].

Установление закономерностей, характерных для функционирования мембранно-связанных ферментов, затруднено вследствие сложного состава биологических мембран и многообразия выполняемых функций. В связи с этим широкое распространение нашло моделирование функций ферментов в относительно простых системах, состоящих из изучаемого объекта, его субстрата и кофактора.

Цель работы – исследование с помощью КД-спектроскопии особенностей прямого белок-белкового взаимодействия цитохрома Р-450 3А4 человека и фосфолипазы А₂ панкреатической железы, а также цитохрома Р-450 2В4 кролика и фосфолипазы А₂ яда змеи.

Выбор мембранно-связанных СУР обусловлен тем, что в качестве лиганда для связывания с этими белками предполагается ФЛА₂ – фермент, участвующий в гидролизе основных компонентов мембран, фосфолипидов, и возможностью их прямого взаимодействия.

Материалы и методы исследования. В работе использовали лиофилизированный препарат ФЛА₂ из яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (Опытный завод органического синтеза и биопрепаратов Института химии АН Эстонии) и панкреатическую ФЛА₂ (Sigma, Р6534). Трис, ЭДТА, сывороточный альбумин (Serva, Германия), остальные реактивы были отечественного производства. Все органические растворители перед использованием очищались перегонкой. Хроматографически гомогенный фосфатидилхолин выделяли из желтков куриных яиц [6].

Липосомы и протеолипосомы получали по методу [7]. Для определения активности ФЛА₂ использовали хроматографическое разделение (ТСХ) липидных компонентов из реакционной

смеси [8]. Реакцию липолиза проводили в 0,05 М трис-НСl буферном растворе, рН 7,4, содержащем CaCl_2 ($2 \cdot 10^{-3}$ М) при 30 °С при постоянном помешивании с помощью магнитной мешалки. Реакцию начинали введением в реакционную смесь ФЛА₂. Молярное отношение фермент/субстрат составляло 1 : 10000 (фосфатидилхолин, ФХ). Через соответствующие промежутки времени отбирали равные по объему аликвоты, которые быстро вносили в пробирки, содержащие для остановки реакции ЭДТА ($1,5 \cdot 10^{-2}$ М) и для экстракции продуктов реакции двойной объем смеси хлороформ–метанол в отношении 2 : 1 (по объему). После экстракции пробы центрифугировали, нижний слой выпаривали и исследовали продукты реакции ТСХ на пластинках с силикагелем в системе растворителей хлороформ–метанол–вода (65 : 25 : 5). После проявления реактивом Васьковского пятна, соответствующие фосфолипиду и его лизопроизводному, вырезали и проводили в них анализ на содержание фосфора [9]. Степень гидролиза выражали как отношение количества фосфора в образовавшемся лизофосфатидилхолине к суммарному фосфору продукта и непрореагировавшего исходного субстрата. Степень экстракции продуктов реакции из реакционной смеси составляла не менее 85 %.

СУР2В4 был выделен из микросом печени кроликов, получавших фенобарбитал в течение 5 дней [10]. Очищенные препараты имели удельное содержание СУР2В4 12,13 нмоль/мг белка и характеризовались одной полосой при электрофорезе в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В работе использовали также высокоочищенную форму рекомбинантного СУР3А4 [1].

Спектроскопия кругового дихроизма (КД): измерения выполнены на спектрополяриметре J-20 (JASCO, Япония) в термостатируемой кювете (10 °С) с длиной оптического пути 1 или 2 мм при концентрации белка 0,07–0,3 мг/мл. Скорость сканирования составляла 5 нм/мин при постоянном времени 16 с. Каждый спектр представляет собой усредненный результат трех сканирований. Молярная эллиптичность была рассчитана, исходя из усредненной молекулярной массы аминокислотного остатка, равной 115. Инкубацию смеси белков проводили 30 мин при 37 °С.

Результаты и их обсуждение. Имеются данные о проникновении секреторных ФЛА₂, к которым относятся изоферменты поджелудочной железы и яда кобры, в кровяное русло при патологиях или воздействии яда змей [11], что предполагает возможность непосредственного контакта со встроенными в мембрану цитохромами Р450 и дальнейшего взаимного влияния на их функционирование.

Ранее нами обнаружено увеличение активности ФЛА₂ яда кобры при встраивании СУР2В4 в бислойную модельную мембрану [12]. По предварительным данным при повышении доли СУР3А4 человека в составе модельной мембраны также увеличивается активность панкреатической ФЛА₂ по отношению к гидролизу ФХ [13].

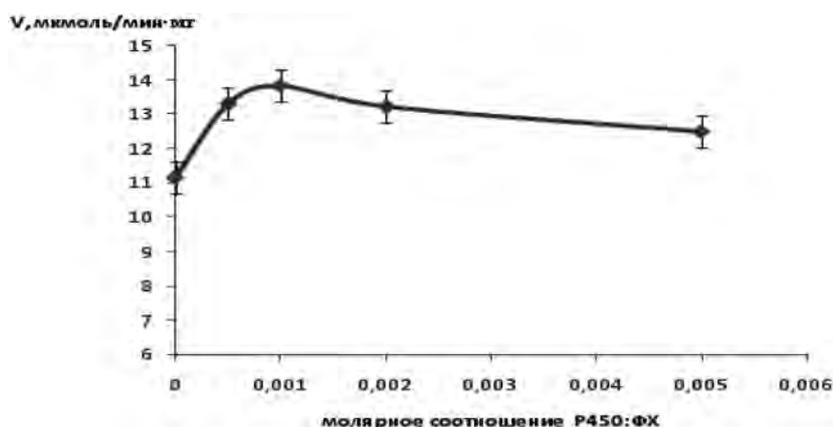


Рис. 2. Зависимость относительной скорости гидролиза фосфатидилхолина в составе липосом под действием ФЛА₂ от молярного соотношения ФХ : СУР3А4

Fig. 2. The dependence of the relative rate of phosphatidylcholine hydrolysis when acted by PLA₂ on the molar phosphatidylcholine – СУР3А4 ratio

Действительно, в процессе гидролиза ФХ в составе протеолипосом с включением СУР3А4 наблюдается активация панкреатической ФЛА₂ с максимумом при молярном соотношении СУР : ФХ в промежутке 1 : 500–1 : 1000 и дальнейшим ее постепенным снижением (рис. 2). Однако степень активации панкреатической ФЛА₂ при встраивании СУР3А4 в липосомы с ФХ (увеличение относительной активности в 1,4 раза) намного меньше, чем ФЛА₂ яда змеи по отношению к ФХ в составе протеолипосом с СУР2В4 (в 6,5–7,5 раз) [12]. Разница в увеличении активности может объясняться как особенностями белок-белкового взаимодействия данных ферментов, так и внесением СУР изменений различной степени в структуру приобелкового слоя модельной мембраны [12]. Постепенное снижение активности по сравнению с контролем можно объяснить уменьшением количества липида в составе модельной мембраны при одновременном увеличении количества встроенного СУР3А4.

В связи с этим провели сравнительное исследование белок-белкового взаимодействия двух ФЛА₂ – яда змеи (активна в виде димера) и поджелудочной железы свиньи (активна в виде мономера), обладающих разными по степени гидрофобности специфическими участками для распознавания поверхности раздела «липид–вода», необходимыми при связывании с субстратом или, соответственно, с СУР2В4 и СУР3А4. Для установления особенностей влияния взаимодействия «белок–белок» и «белок–лиганд» на конформацию исследуемых биополимеров и их функцию мы использовали КД-спектроскопию в диапазоне 190–250 нм, которая за счет высокой чувствительности к структурным перестройкам позволяет определить содержание в них элементов вторичной структуры разных типов. При этих длинах волн хромофором выступает пептидная связь, и сигнал возрастает, когда пептидная связь расположена в упорядоченном, структурно упакованном окружении. α -спирали, β -структуры и беспорядочные клубки – каждая структура имеет характерную форму и величину КД-спектра [14].

Спектры КД ФЛА₂ яда змеи и поджелудочной железы свиньи, а также СУР2В4 и СУР3А4 каждый в отдельности являются классическим вариантом спектров α -спиральных белков с умеренным содержанием β -складчатых структур, принадлежащих к $\alpha + \beta$ -классу [14]. Так, значения молярной эллиптичности $[\theta]$ в точках минимума КД-спектров этих белков (т. е. на длинах волн 208 и 222 нм) для ФЛА₂ яда змеи и поджелудочной железы свиньи, СУР2В4 и СУР3А4 имеют значения -5200 , -3300 , -10300 и -8500 град \cdot см² \cdot дмоль⁻¹ соответственно [12; 15].

Нами ранее отмечались неаддитивные изменения в спектрах КД при взаимодействии ФЛА₂ яда кобры и СУР2В4 [12]. Спектры КД для смеси ФЛА₂ яда кобры и СУР2В4 значительно отличаются от исходных спектров: результирующий спектр характеризуется аномально высокой отрицательной эллиптичностью (около -32000 град \cdot см²/дмоль⁻¹). Подобные спектры КД наблюдаются в особых условиях для белков семейства иммуноглобулинов, обладающих β -складчатой структурой, принадлежащих к $\beta\beta$ -классу [14] и свидетельствуют о реорганизации вторичной и третичной структур $\alpha \rightarrow \beta$ (так называемый $\alpha \rightarrow \beta$ reshuffling). Учитывая меньшую эллиптичность ФЛА₂, эти структурные изменения следует отнести к СУР2В4 в связи со структурообразующими белок-белковыми взаимодействиями.

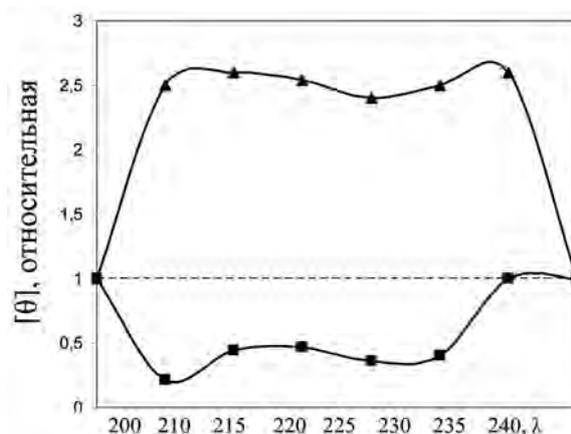


Рис. 3. Зависимость от длины волны молярной эллиптичности $[\theta]$ смеси цитохрома P450 и фосфолипазы A₂, отнесенной к молярной эллиптичности цитохрома P450: смесь СУР 2В4 с ФЛА₂ змеи (верхняя кривая) и СУР 3А4 с панкреатической ФЛА₂ (нижняя кривая), за единицу принята молярная эллиптичность $[\theta]$, град \cdot см² \cdot дмоль⁻¹ каждого из цитохромов P450 соответственно

Fig. 3. The wavelength dependence of the molar ellipticity $[\theta]$ of the mixture of cytochrome P450 and PLA₂ based on the molar ellipticity of cytochrome P450: the mixture of CYP 2B4 with PLA₂ of the snake (upper curve) and CYP 3A4 with pancreatic PLA₂ (lower curve), for unit is taken the molar ellipticity $[\theta]$, deg \cdot cm² \cdot mole⁻¹ of each of cytochromes P450, respectively

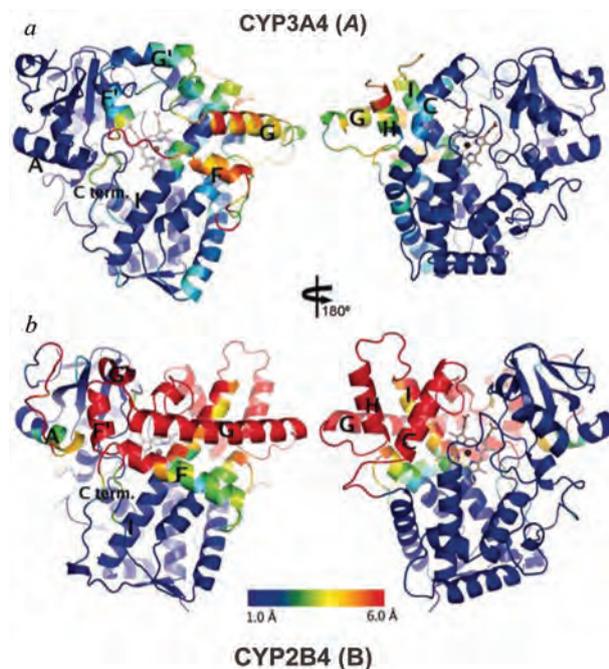


Рис. 4. Сравнение пластичности структуры CYP3A4 (a) и CYP2B4 (b)

Fig. 4. Comparison of the plasticity of the structures of CYP3A4 (a) and CYP2B4 (b)

семейства 2В, которая обуславливает широкую субстратную специфичность данных ферментов [16]. Цитохромы группы 2В (CYP2B4) многофункциональны, метаболизируют ксенобиотики, включая лекарственные препараты.

CYP3A4 по сравнению с CYP2B4 обладает относительно большой субстрат-связывающей полостью, что согласуется с размером субстратов, которые окисляются ферментом. При этом относительно большой размер полости активного сайта около каталитического центра фермента обеспечивает гетеротропность фермента, что в свою очередь, способствует альтернативным способам связывания для множества молекул субстрата. При изучении кристаллических структур CYP3A4 и CYP2B4 как с лигандами, так и без них было установлено, что при взаимодействии с субстратами конформационные изменения у CYP3A4 преимущественно затрагивают три из пяти так называемых пластических областей, которые были установлены в структуре CYP2B4. Это дает возможность предположить, что существование пластических областей – общая особенность цитохромов P450, связанных с мембраной [17].

На рис. 4 для каждой изоформы CYP конформация вторичной структуры (Protein Data Bank ID codes 1TQN for CYP3A4 and 1SUO for CYP2B4) показана оттенками разной интенсивности (см. индикатор) в соответствии с максимальной наблюдаемой разницей в положении атома C α в оптимальной суперпозиции всех доступных из базы данных структур (Protein Data Bank ID codes 1TQN, 2J0C, and 2J0D for CYP3A4 and 1PO5, 1SUO, and 2BDM for CYP2B4).

При этом, как известно, при взаимодействии CYP с разными субстратами наблюдается два типа спектральных изменений: разностные спектры поглощения с максимумом в области 385–390 нм и минимумом при 420 нм (субстраты первого типа) и разностные спектры поглощения с максимумом при 425–435 нм и минимумом в области 390–400 нм (субстраты второго типа). Полагают, что субстраты первого типа связываются в гидрофобной части белка, воздействуют на окружение гема, превращая железо из шестикоординированного низкоспинового в пятикоординированное высокоспиновое состояние, что приводит к увеличению поглощения при 390 нм

На рис. 3 видно разнонаправленное изменение в зависимости от длины волны молярной эллиптичности $[\theta]$ двух смесей цитохромов P450 и фосфолипаз A₂, обладающих разной гидрофобностью центров распознавания поверхности, по отношению к молярной эллиптичности соответствующих цитохромов P450. При этом результирующий спектр КД смеси CYP2B4 с ФЛА₂ змеи характеризуется увеличением в 2,5 раза значений молярной эллиптичности по отношению к молярной эллиптичности цитохрома P450, а смеси CYP3A4 с панкреатической ФЛА₂ – существенным уменьшением этого показателя (рис. 3). Это свидетельствует об искажении β -структур в первом случае и снижении степени упорядоченности вторичной структуры белковых молекул во втором.

Наблюдаемое разнонаправленное изменение молярной эллиптичности для результирующих смесей этих белков, скорее всего, связано с конформационными особенностями изоферментов изучаемых цитохромов P450. Данные, полученные с помощью кристаллографии цитохромов млекопитающих, свидетельствуют об исключительной пластичности цитохромов

и уменьшению – при 420 нм, а также сдвигу максимума поглощения в коротковолновую область. Во втором случае изменения вызываются заменой лиганда в шестом координационном положении гемового железа азотом субстратов второго типа. Лиганды второго типа вызывают увеличение содержания низкоспиновой формы гемопротейна, что сопровождается уменьшением поглощения при 385–390 нм (длина волны, характерная для высокоспиновой формы) и сдвиг максимума поглощения в длинноволновую область (420–430 нм) [1].

Изучение спектров поглощения СУР3А4 в отсутствие и присутствии ФЛА₂ поджелудочной железы показывает, что наблюдается смещение максимума поглощения в коротковолновую область в пользу высокоспиновой формы гемопротейда (рис. 5). Следовательно, ФЛА₂ связывается с СУР3А4 и подобно природным донорам электронов инициирует переход гемопротейда в высокоспиновое состояние.

Таким образом, связывание исследуемых белков, вероятнее всего, происходит за счет гидрофобных взаимодействий. Подтверждением этого является то, что при изучении смесей разных цитохромов Р450 и фосфолипидов для изменений величины КД-спектра сопоставимой степени интенсивности требуется большее соотношение белков при совместной экспозиции СУР3А4 и ФЛА₂ поджелудочной железы (1 : 20) по сравнению с СУР2В4 и ФЛА₂ змеи (1 : 4), поскольку панкреатическая ФЛА₂ имеет менее гидрофобный центр распознавания поверхности, чем фермент яда кобры. Так как СУР3А4 является гетеротропным ферментом и спектры поглощения свидетельствуют о связывании ФЛА₂ и СУР3А4 (рис. 5), можно предположить наличие аллостерического эффекта ФЛА₂ на СУР3А4 при взаимодействии этих белков.

Заключение. Результаты проведенного исследования показали, что для модуляции конформационных изменений вторичной структуры в процессе белок-белкового взаимодействия цитохрома Р450 и ФЛА₂ более важны гидрофобные контакты, чем электростатические. Обнаружено, что белок-белковое взаимодействие между панкреатической ФЛА₂ и СУР3А4 приводит к повышению каталитической активности ФЛА₂ по отношению к ФХ в составе липосом более чем в 1,4 раза. Показано смещение в коротковолновую область максимума поглощения в электронных спектрах СУР3А4 в отсутствие и присутствии ФЛА₂, что доказывает связывание ФЛА₂ с СУР3А4 и предполагает, что ФЛА₂ может выступать инициатором перехода гемопротейда в высокоспиновое состояние подобно природным донорам электронов.

Дальнейшее изучение каталитической активности СУР2В4 и СУР3А4 по отношению к субстратам разного типа в присутствии ФЛА₂ различной специфичности позволит выяснить более детальный механизм взаимодействия этих биополимеров между собой и его роль в монооксигеназном катализе.

Благодарности. Авторы выражают благодарность члену-корреспонденту С. А. Усанову и канд. хим. наук А. В. Янцевичу за любезно предоставленные препараты цитохрома Р450 и Г. С. Янковской за помощь в регистрации спектров КД.

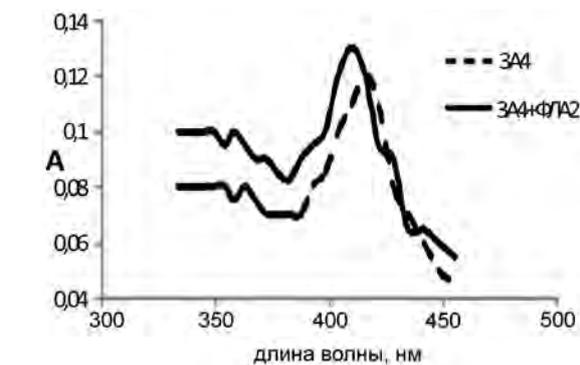


Рис. 5. Спектр поглощения СУР3А4 в отсутствие (пунктирная линия) и присутствии (сплошная линия) ФЛА₂ поджелудочной железы (0,0035 мкмоль/мл СУР3А4; 0,0022 мкмоль/мл ФЛА₂)

Fig. 5. The absorption spectrum of СУР3А4 in the absence (dotted line) and in the presence (solid line) of PLA₂ of the pancreas (0.0035 μ mole/ml СУР3А4; 0.0022 μ mole/ml PLA₂)

Acknowledgement. The authors are grateful to the Corresponding Member S. A. Usmanov and the Ph. D. (Chemistry) A. V. Yantsevich for the kindly presented preparations of cytochrome P450 and G. S. Yankovskaya for help in transmission electron microscopy registration of spectra.

Список использованных источников

1. Lewis, D. F. V. Guide to Cytochromes P450: Structure and Function / D. F. V. Lewis. – 2nd ed. – 2001. – 189 p. doi: org/10.1201/9781420023046.
2. Цитохром Р-450-зависимый метаболизм арахидоновой кислоты / И. В. Иванов [и др.] // Биохимия. – 1999. – Т. 64, вып. 7. – С. 869–882. PubMed ID: 10424895.

3. Метелица, Д. И. Влияние фосфолипидов на цитохром P-450 и реакции с его участием / Д. И. Метелица // Успехи современной биологии. – 1982. – Т. 94, № 3. – С. 345–359.
4. Pandini, V. Interaction of the soluble recombinant Psad subunit of spinach photosystem I with ferredoxin I / V. Pandini, A. Aliverti, G. Zanetti // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 38, N 33. – P. 10707– 10713.
5. Кисель, М. А. Влияние фенобарбитала на активность эндогенной растворимой фосфолипазы А в печени. Взаимосвязь с микросомальной гидроксигирующей системой / М. А. Кисель, Н. М. Литвинко // *Хим.-фарм. журн.* – 1995. – № 6. – С. 19–22.
6. Препаративная биохимия липидов / Л. Д. Бергельсон [и др.]. – М.: Наука, 1981. – 256 с.
7. Ingelman-Sundberg, M. Incorporation of purified components of the rabbit liver microsomal hydroxylase system into phospholipid vesicles / M. Ingelman-Sundberg, H. Glaumann // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1980. – Vol. 599, N 2. – P. 417–435. doi: 10.1016/0005-2736(80)90188-1.
8. Изучение специфичности фосфолипазы А₂ на субстратсодержащих структурах, имеющих разную надмолекулярную организацию / А. А. Ахрем [и др.] // *Биохимия*. – 1989. – Т. 54, № 4. – С. 687–693.
9. Vaskovsky, V. E. A universal reagent for phospholipid analysis / V. E. Vaskovsky, E. Y. Kostetsky, J. M. Vasendin // *J. Chromatogr.* – 1975. – Vol. 114, N 1. – P. 129–141. doi:10.1016/s0021-9673(00)85249-8.
10. Haugen, D. A. Properties of electroforetically homogeneous phenobarbital-inducible and β-naphthoflavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450 / D. A. Haugen, M. J. Coon // *J. Biol. Chem.* – 1976. – Vol. 251, N 24. – P. 7929–7939.
11. Tappia, P. S. *Phospholipases in Health and Disease* / P. S. Tappia, N. S. Dhalla. – New York: Springer, 2014. – 410 p.
12. Литвинко, Н. М. Активность фосфолипазы А₂ и С при биохимическом моделировании / Н. М. Литвинко. – Минск: УП «Технопринт», 2003. – 350 с.
13. Герловский, Д. О. Исследование действия цитохрома P-450 3A4 человека на фосфолиполилиз в модельной системе / Д. О. Герловский, Н. М. Литвинко, А. В. Янцевич // *Химия, структура и функция биомолекул: тезисы докл. IV Междунар. конф., Минск, 17–19 окт. 2012 г.* – Минск, 2012. – С. 197.
14. Василенко, К. С. Использование спектроскопии кругового дихроизма для анализа супервторичной структуры нативных и денатурированных белков: автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук: 03.00.02 / К. С. Василенко; РАН, Ин-т белка. – Пушино, 2004. – 24 с.
15. Антончик, Г. Н. Исследование белок-белкового взаимодействия цитохрома P-450 и фосфолипазы А₂ / Г. Н. Антончик, Т. Г. Гудко // *Молодежь в науке* – 2014. – Минск, 2015. – Ч. 1: сер. хим. наук. – С. 3–5.
16. *Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and other Xenobiotics* / ed. C. Ioannides. – Cambridge: RSC Publishing, 2008. – 544 p.
17. Ekroos, M. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4 / M. Ekroos, T. Sjögren // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – Vol. 103, N 37. – P. 13682–13687. doi:10.1073/pnas.0603236103.

References

1. Lewis D. F. V. *Guide to Cytochromes P450: Structure and Function*. 2nd ed. Informa Healthcare, 2001. 189 p. doi: org/10.1201/9781420023046.
2. Ivanov I. V., Groza N. V., Myagkova G. I. Cytochrome P450-Dependent Metabolism of Arachidonic Acid. *Biochemistry (Moscow)*, 1999, vol. 64, no. 7, pp. 725–737. PubMed ID: 10424895.
3. Metelitsa D. I. Phospholipide influence on cytochrome P-450 and reactions with its participation. *Uspekhi sovremennoy biologii* [Biology Bulletin Reviews], 1982, vol. 94, no. 3, pp. 345–359. (in Russian)
4. Pandini V., Aliverti A., Zanetti G. Interaction of the soluble recombinant Psad subunit of spinach photosystem I with ferredoxin I. *Biochemistry*, 1999, vol. 38, no. 33, pp. 10707–10713. doi:10.1021/bi990423h.
5. Kisel' M. A., Litvinko N. M. Phenobarbital influence on the activity of endogenous soluble phospholipase A in the liver. Interrelation with the microsomal hydroxylated system. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal* [Pharmaceutical Chemistry Journal], 1995, no. 6, pp. 19–22. (in Russian)
6. Bergelson L. D., Dyanlovitskaya E. V., Molotkovskii Yu. G., Batrakov S. G. *Preparative biochemistry of lipides*. Moscow, Nauka, 1981. 256 p. (in Russian)
7. Ingelman-Sundberg M., Glaumann H. Incorporation of purified components of the rabbit liver microsomal hydroxylase system into phospholipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1980, vol. 599, no. 2, pp. 417–435. doi: 10.1016/0005-2736(80)90188-1.
8. Achrem A. A., Shumilina T. A., Litvinko N. M., Linnik O. I., Kisel M. A. The study of the specificity of phospholipase A₂ on substrate-containing structures of different supramolecular organization. *Biochemistry (Moscow)*, 1989, vol. 54, no. 4, pp. 687–693. (in Russian)
9. Vaskovsky V. E., Kostetsky E. Y., Vasendin J. M. A universal reagent for phospholipid analysis. *Journal of Chromatography*, 1975, vol. 114, no. 1, pp. 129–141. doi:10.1016/s0021-9673(00)85249-8.
10. Haugen D. A., Coon M. J. Properties of electroforetically homogeneous phenobarbital-inducible and β-naphthoflavone-inducible forms of liver microsomal cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry*, 1976, vol. 251, no. 24, pp. 7929–7939.
11. Tappia P. S., Dhalla N. S. *Phospholipases in Health and Disease*. New York, Springer, 2014. 410 p.
12. Litvinko N. M. *Activity of phospholipase A₂ and C during the biochemical modeling*. Minsk, Technoprint Publ., 2003. 350 p. (in Russian)
13. Gerlovskii D. O., Litvinko N. M., Yantsevich A. V. Study of the Action of Human P-450 3A4 Cytochrome on Phospholipases in the Model System. *Khimiia, struktura i funktsiia biomolekul: IV mezhdunarodnaia nauchnaia konferentsiia*,

posviashchennaia 100-letiiu so dnia rozhdeniia akademika A. A. Akhrema. Sbornik materialov [Chemistry, Structure and Function of Biomolecules: the IVth International Scientific Conference Dedicated to the 100th Anniversary of Academician A.A.Akhrem: Collected Materials], Minsk, 2012, pp. 197. (in Russian)

14. Vasilenko K. S. *Use of circular dichroism spectroscopy for analysis of the super-secondary structure of native and denatured proteins*. Puschino, 2004. 24 p. (in Russian)

15. Antonchik G. M., Gudko T. G. The study of protein-protein interactions CYP and PLA₂. *Molodezh' v nauke–2014* [Youth in Science–2014]. Minsk, 2015, ch. 1: Series of Chemical Sciences, pp. 3–5. (in Russian)

16. Ioannides C. (ed.) *Cytochromes P450: Role in the Metabolism and Toxicity of Drugs and other Xenobiotics*. Cambridge, RSC Publ., 2008. 544 p.

17. Ekroos M., Sjögren T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 2006, vol. 103, no. 37, pp. 13682–13687. doi:10.1073/pnas.0603236103.

Информация об авторах

Литвинко Наталья Михайловна – д-р хим. наук, доцент, заведующая лабораторией, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al_h@mail.ru.

Антончик Галина Николаевна – канд. хим. наук, научный сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: griz_li@mail.ru.

Глушакова Татьяна Геннадьевна – Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tatsiana-gudko@gmail.com.

Герловский Денис Олегович – канд. хим. наук, научный сотрудник, Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: denis2904-83@mail.ru.

Для цитирования

Особенности взаимодействия цитохрома P450 и фосфолипаз A₂ разной специфичности, обнаруживаемые КД-спектроскопией / Н. М. Литвинко [и др.] // Докл. НАН Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 6. – С. 64–71.

Information about the author

Litvinko Natalia Mikhailovna – D. Sc. (Chemistry), Assistant Professor, Head of the Laboratory, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al_h@mail.ru.

Antonchik Galina Nikolaevna – Ph. D. (Chemistry), Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: griz_li@mail.ru.

Glushakova Tatiana Gennadievna – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tatsianagudko@gmail.com.

Gerlovskii Denis Olegovich – Ph. D. (Chemistry), Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: denis2904-83@mail.ru.

For citation

Litvinko N. M., Antonchik G. N., Glushakova T. G., Gerlovsky D. O. Features of the protein-protein interaction of cytochrome P450 and PLA₂ of different nature revealed using circular dichroism spectroscopy. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* [Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus], 2016, vol. 60, no. 6, pp. 64–71. (in Russian)