

ХИМИЯ
CHEMISTRY

УДК 577.112

Поступило в редакцию 08.09.2017

Received 08.09.2017

В. В. Бритиков, Е. В. Панкратова, член-корреспондент С. А. Усанов

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

**РАЗНОСТНАЯ ЯМР СПЕКТРОСКОПИЯ С ПЕРЕНОСОМ НАСЫЩЕНИЯ
В ИССЛЕДОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМА P450cam
С 4-ФЕНИЛИМИДАЗОЛОМ: ОБНАРУЖЕНИЕ НОВОГО ПРОМЕЖУТОЧНОГО
СОСТОЯНИЯ КОМПЛЕКСА**

Аннотация. Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия цитохрома P450cam с 4-фенилимидазолом (4-PI) методом спектрофотометрии и ЯМР спектроскопии. Полученные методом разницы переноса насыщения ЯМР (РПН-ЯМР) данные указывают на существование промежуточного короткоживущего состояния 4-фенилимидазола в активном сайте P450cam, где 4-фенилимидазол связан с внутренней областью активного сайта и/или областью канала доступа субстрата без образования координационной связи между атомами азольной группы лиганда и атомом железа гема. В данной работе нами впервые применен метод РПН-ЯМР для исследования взаимодействия цитохрома P450 с лигандом. Равновесная константа диссоциации комплекса P450cam–4-PI, рассчитанная с использованием зависимости фактора амплификации РПН при нулевом времени насыщения, составляет 10,4 мМ и отличается от константы, рассчитанной при постоянном времени насыщения (34,6 мМ), что указывает на зависимость определения K_d при использовании РПН-ЯМР от времени насыщения и концентраций взаимодействующих веществ. Сравнение энергии диссоциации для промежуточного комплекса (11,2 кДж) относительно комплекса с прямой координацией (28,5 кДж) позволяет предположить, что основной вклад во взаимодействие белок–лиганд вносит гидрофобное взаимодействие 4-PI с внутренней поверхностью полости активного сайта P450cam. Обнаруженное промежуточное состояние позволяет объяснить образование гидроксильированных форм ингибиторов азольной природы при взаимодействии с цитохромами P450, когда ингибитор находится в промежуточной форме в качестве субстрата, без образования координационной связи с атомом железа гема.

Ключевые слова: ЯМР спектроскопия, РПН-ЯМР, цитохром P450cam, 4-фенилимидазол, белок-лигандное взаимодействие, резонансный перенос энергии, разностное спектрофотометрическое титрование, диссоциация комплекса, промежуточное короткоживущее состояние лиганда

Для цитирования: Бритиков, В. В. Разностная ЯМР спектроскопия с переносом насыщения в исследовании взаимодействия цитохрома P450cam с 4-фенилимидазолом: обнаружение нового промежуточного состояния комплекса / В. В. Бритиков, Е. В. Панкратова, С. А. Усанов // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2017. – Т. 61, № 5. – С. 66–79.

Vladimir V. Britikov, Elena V. Pankratova, Corresponding Member Sergey A. Usanov

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

**SATURATION TRANSFER DIFFERENCE NMR SPECTROSCOPY IN STUDIES OF THE INTERACTION
OF CYTOCHROME P450cam WITH 4-PHENYLIMIDAZOLE: DETECTION OF A NOVEL INTERMEDIATE
STATE OF THE COMPLEX**

Abstract. The present work is devoted to the investigation of the interaction of cytochrome P450cam with 4-phenylimidazole (4-PI) using spectrophotometry and NMR spectroscopy. The data obtained by the STD-NMR method indicate the existence of an intermediate short-lived state of 4-phenylimidazole in the active site of P450cam where 4-phenylimidazole is bound to the inner region of the active site and/or to the substrate access channel without the formation of a coordination bond between the ligandazole group atoms and the heme iron atom. In this article, we first used the STD-NMR method to study the interaction of cytochrome P450 with ligand. The equilibrium dissociation constant of the P450cam-4-PI complex, which was calculated using the dependence of the amplification factor at zero saturation time (10.4 mM), differs from the constant that was calculated at

constant saturation time (34.6 mM). This fact indicates the dependence of the K_d determination using STD-NMR at saturation time and concentrations of interacting substances. Comparison of the dissociation energy for the intermediate complex (11.2 kJ) relative to the direct coordination complex (28.5 kJ) suggests that the main contribution to the protein-ligand interaction is related to the hydrophobic interaction of 4-PI with the inner surface of the cavity of the active site of P450cam. The observed intermediate state makes it possible to explain the formation of hydroxylated forms of azole inhibitors during the interaction with cytochromes P450, when an inhibitor is in an intermediate form as a substrate and is not bound by a coordination bond with a heme iron atom.

Keywords: NMR spectroscopy, STD-NMR, cytochrome P450cam, 4-phenylimidazole, protein-ligand interaction, resonant energy transfer, differential spectrophotometric titration, dissociation of complex, intermediate short-lived ligand state

For citation: Britikov V. V., Pankratova E. V., Usanov S. A. Saturation transfer difference NMR spectroscopy in studies of the interaction of cytochrome P450cam with 4-phenylimidazole: detection of a novel intermediate state of the complex. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2017, vol. 61, no. 5, pp. 66–79 (in Russian).

Введение. Суперсемейство цитохрома P450 является одной из наиболее распространенных и разнообразных ферментных систем в природе. Цитохромы P450 широко представлены во всех биологических царствах и катализируют различные комплексные окислительные реакции. Наиболее характерной реакцией для P450 является монооксигенирование органического соединения путем внедрения активированного атома кислорода. Активация молекулярного кислорода цитохромом P450, путем последовательного переноса двух электронов на молекулу кислорода, и сопутствующее гидроксилирование неактивного субстрата по C–H связи являются одним из наиболее важных процессов в природе, а цитохромы P450, несомненно, одни из наиболее привлекательных объектов в области биохимии и молекулярной биологии уже на протяжении полувека, в основном, благодаря огромному прикладному потенциалу и мировому развитию фармацевтической химии и персонализированной медицины [1].

Взаимодействие белков с низкомолекулярными лигандами – критическая стадия всех энзимологических и большинства биологических процессов. Тема исследования связывания цитохрома P450 с лигандами особенно сложна, вызвано это огромным количеством субстратов и ко-субстратов, которые связываются с различными формами цитохрома P450. Кроме того, некоторые изоформы P450 демонстрируют отсутствие специфичности и взаимодействуют с огромным числом различных по структуре лигандов. В результате маловероятно обнаружение общих правил, описывающих структурные, термодинамические и кинетические механизмы, которые будут применимы для характеристики всех взаимодействий между цитохромами P450 и их лигандами. Среди возможных типов взаимодействий P450–лиганд, изученных в последние годы, большинство усилий было направлено на небольшие органические молекулы или газообразные диатомные лиганды. Связывание субстратов с цитохромом P450 обычно рассматривается как первый этап в каталитическом цикле. Этот процесс интенсивно изучается с помощью различных биохимических и биофизических подходов [2].

Экспериментальные подходы, используемые для изучения связывания лигандов с P450, можно разделить на две категории: обычные биофизические методы, применимые к негемовым белкам, и экспериментальные методы, которые контролируют изменения в спектральных свойствах гема, отражающие связывание с лигандами и/или вследствие конформационных изменений белка.

В основном, большое количество результатов получено при помощи оптических методов детекции как для определения равновесных констант связывания, так и для кинетических параметров взаимодействия. Данный подход зависит от взаимодействия лигандов с гемовой группой, координированием по атому железа, в случае присутствия в лиганде атомов с неподеленной электронной парой, при этом характер спектральных изменений в области полосы Soret зависит от силы поля лиганда. В отсутствие координирования при достаточно близком расположении групп лиганда к гему образуется пятикоординационное состояние, характеризующееся расщеплением молекулярных электронных орбиталей гема таким образом, что происходит распаривание пяти электронов на внешней оболочке атома железа (высоко-спиновое состояние).

К основным методам, которые способны детектировать связывание лигандов с цитохромом P450 без контроля за изменением спинового состояния железа гема, можно отнести изотермическую титровальную калориметрию, флуоресцентные методы, поверхностный плазмонный резонанс (ППР) и ЯМР методы.

Среди биофизических методов исследования белок-лигандных взаимодействий, ЯМР спектроскопия является самым мощным и универсальным, бурно развивающимся, физико-химическим методом исследования, так как обеспечивает сайт-специфической количественной информацией на атомарном уровне. ЯМР спектроскопия – широко известная техника для анализа белок-лигандных взаимодействий в большом диапазоне аффинности (от нМ до мМ). ЯМР широко используется для определения констант диссоциации, в частности для относительно слабых взаимодействий ($K_d > 10$ мМ), что является проблематичным для других биофизических методов. Методы ЯМР традиционно делят на две группы: эксперименты, где наблюдения проводятся над сигналами ЯМР-спектров белка (белок-наблюдаемые ЯМР эксперименты), и на те, где наблюдаются ЯМР-спектры лиганда (лиганд-наблюдаемые ЯМР эксперименты). Белок-наблюдаемые ЯМР эксперименты, в основном, полагаются на анализ возмущений химических сдвигов, которые возникают в двумерных ЯМР-спектрах C^{13} - или N^{15} -меченых образцов белка при связывании лиганда [3].

Лиганд-наблюдаемые ЯМР эксперименты основаны на изменении размер-чувствительных ЯМР параметров для лиганда в присутствии белкового рецептора. Рассматривая белок-лигандный комплекс со слабой и умеренной аффинностью (обычно K_d лежит в диапазоне от 0,1 мкМ до 1,0 мМ), наблюдаемые ЯМР параметры представляют собой простое популяционно-взвешенное среднее между свободным и связанным состояниями. В отличие от белок-наблюдаемых лиганд-наблюдаемые эксперименты более чувствительны для белков больших размеров и требуют меньшего количества белка без изотопного мечения. Лигандные методы могут быть использованы для идентификации связывающихся веществ и измерения аффинности комплекса белок–лиганд, а также обеспечивают соответствующую структурной информацией [4].

Лиганд-наблюдаемые ЯМР эксперименты можно разделить на несколько групп: эксперименты, которые основываются на межмолекулярном переносе намагниченности за счет ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) (tr-NOESY, INPHARMA, ILOE, STD и WaterLOGSY); эксперименты по измерению скоростей ядерных релаксаций (усиление парамагнитной релаксации, измерение парамагнитных сдвигов) и эксперименты, основанные на разнице времен вращательной корреляции молекул (DOSY).

На данный момент самым используемым методом ЯМР для анализа белок-лигандных взаимодействий является STD (от английского – **saturation transfer difference**, что означает эксперимент по разнице переноса насыщения ЯМР, далее РПН-ЯМР). Впервые эта методика была разработана в 2001 г. Майром и Мэйром [5]. Данный метод апробирован на системе взаимодействия между галактозой и белком агглютинином RCA120. РПН-ЯМР имеет преимущество над таким часто используемым методом, как ППР, так как позволяет определять взаимодействие с лигандами в широком диапазоне аффинности, имеет более высокопропускную способность (хорошо оптимизирован для скрининга библиотек лигандов), не зависит от непредвиденных повреждений измерительной системы, как в случае с чипами ППР. Самым важным преимуществом является возможность получения структурных данных для белок-лигандных комплексов (эпитопное картирование), помимо термодинамических и кинетических параметров взаимодействия. РПН-ЯМР, как и все эксперименты, основанные на переносном ЯЭО, часто проводятся в условиях быстрого обмена лиганда.

РПН эксперимент заключается в следующем: при помощи селективных радиочастотных импульсов осуществляется насыщение определенных ядерных спинов белковой молекулы (наиболее часто используется область алифатических сигналов от 0 до 1 ppm). Затем ядерная намагниченность от белка переносится посредством ЯЭО и спиновой диффузии на ядра молекулы лиганда, если таковой взаимодействует с определенной областью молекулы белка. Эксперимент проводится в 2 этапа. На первом этапе селективный радиочастотный импульс подается на нерезонансной частоте белка (офф-резонанс). Полученный спектр соответствует сигналам от общего пула лиганда. На втором этапе селективный импульс подается на резонансной частоте белка (он-резонанс), в случае если лиганд взаимодействует с белком, то тогда происходит аттенюация сигналов лиганда. Оценка результирующего разностного спектра позволяет определить взаимодействующие лиганды. Эксперимент РПН-ЯМР в основном проводится при условиях, когда концентрация лиганда во много раз превышает концентрацию белка. В условиях быстрого обмена

(для лигандов со слабым и средним аффинитетом от 0,1 мкМ до мМ) связанного с белком лиганда наблюдаемые изменения в РПН соответствуют популяционно-взвешенному среднему значению между связанным и свободным в растворе лигандом [6].

Прогресс в области РПН-ЯМР не остановился с момента его разработки. Были внесены изменения в стратегию проведения эксперимента для нивелирования артефактных погрешностей в измерении равновесной константы диссоциации, а также расширена область применения данного метода. Например, разработан способ детекции взаимодействия лигандов с белками непосредственно в живых клетках с использованием РПН по двойной разнице [7]. РПН-ЯМР был модифицирован и применен для непосредственного измерения взаимодействия белков, иммобилизованных на сефарозной матрице [8]. При совместном использовании данных по молекулярному моделированию и РПН-ЯМР для получения структурных данных о белок-лигандном комплексе, предложена теория полной релаксации и матрицы конформационных изменений (CORCEMA), также разработана вычислительная программа на ее основе [9].

Комплексы цитохрома P450 с лигандами азольной, триазольной (далее азолы) природы характеризуются повышенной устойчивостью (высокоаффинные лиганды) вследствие образования координационной связи между атомом железа гемовой группы и атомом азота с неподеленной электронной парой азола. Данное свойство позволяет использовать эти соединения в качестве высоко аффинных ингибиторов цитохрома P450 (лекарства, фунгициды, инсектициды) [10]. Образование промежуточных короткоживущих комплексов в данном случае теоретически возможно из-за погруженного в ядро белка активного сайта и протяженного канала доступа субстрата. РПН-ЯМР позволяет установить комплексы белок-лиганд, которые находятся в быстром обмене. Это свойство может позволить обнаружить промежуточные комплексы P450 с азолами, в которых не образуется координационная связь. Такие комплексы могут оказывать влияние на общую каталитическую реакцию, осуществляемую цитохромом P450. В данной работе мы впервые применили РПН-ЯМР к исследованию взаимодействия цитохрома P450 с его низкомолекулярным лигандом. В качестве объекта исследования был выбран цитохром P450cam и взаимодействующий с ним 4-фенилимидазол (4-PI).

Цитохром P450cam (CYP101) из почвенной бактерии *Pseudomonas putida* является одним из модельных объектов в исследовании функционирования цитохром P450 зависимой монооксигеназной системы и исследуется уже на протяжении многих десятилетий [11]. P450cam осуществляет регио- и стерео-селективное гидроксирование d-камфары до 5-экзо-гидроксикамфары путем активации молекулы кислорода электронами, поступающими от электрон-транспортной системы, состоящей из NADH-путидаредоксин редуктазы и путидаредоксина [12]. P450cam – первый цитохром P450, для которого определена пространственная структура кристаллического состояния по данным рентгеноструктурного анализа [13]. На сегодняшний день расшифрованы кристаллические структуры комплексов P450cam с различными лигандами его активного сайта [14; 15], но отсутствует информация о состояниях комплексов в растворе на атомарном уровне.

P450cam является гидрофильным белком, нарабатывается в больших количествах при помощи гетерологической экспрессии в клетках *E. coli*, а также достаточно стабилен при обычных условиях. Преимуществом 4-PI в исследовании методом ЯМР является его растворимость в миллимолярных концентрациях в водных буферных растворах, небольшое количество сигналов химических сдвигов в области слабого поля (область ароматических сигналов) и их хорошее разрешение на современных ЯМР спектрометрах. Кристаллическая структура данного комплекса расшифрована методом рентгеноструктурного анализа (pdb код 1PHF). Известно, что 4-PI располагается в активном сайте P450cam так, что образуется координационная связь между атомом азота (N¹) и атомом железа гема (комплекс с прямой координацией, образование которого легко детектируется оптической спектроскопией по изменению полосы поглощения Core). При этом азольное кольцо 4-PI практически перпендикулярно оси I-спирали P450cam. 4-PI имеет второй свободный атом азота и может находиться в протонированном состоянии, в отличие от 1-фенилимидазола. Этим обуславливается существенная разница в константе диссоциации между ними в комплексе с P450cam, а также их различия в пространственном положении. Эти различия объясняются термодинамическим проигрышем в десольватации N² атома для 4-PI [16].

Материалы и методы исследования. *Гетерологическая экспрессия рекомбинантного P450cam.* Экспрессию P450cam осуществляли с использованием клеток *E. coli* (DH5 α), трансформированных плазмидным вектором pBI25, в который по сайту рестрикции *Hind III* был клонирован ген цитохрома P450cam дикого типа. Первичную ночную культуру пересевали в малые колбы (100 мл среды) с ТВ-средой, микроэлементами, ампициллином (100 мкг/мл) и инкубировали до достижения оптической плотности 2,5–3 (D_{600}) при температуре 37 °С и 180 об/мин (8–9 ч). Из малых колб культуру переносили в большие колбы (500 мл среды) с той же средой и инкубировали один час при температуре 37 °С. После добавляли в среду индуктор экспрессии изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид до концентрации 100 мкг/мл, аминоклевулиновую кислоту (70 мг/л) и инкубировали клетки 48 ч при температуре 26 °С и 130 об/мин. Полученные клетки осаждали центрифугированием 20 мин (20000 g) и ресуспендировали в 50 мМ калий фосфатном буфере (КФБ) (рН 7,4), содержащем 20 % глицерина, 50 мМ NaCl, 0,4 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). Полученную суспензию хранили при –80 °С.

Очистка рекомбинантного P450cam. К размороженным клеткам добавляли ФМСФ до концентрации 1 мМ. Клетки разрушали с использованием аппарата Emulsiflex. Разрушенные клетки осаждали центрифугированием 1 ч при 18000 об/мин и температуре 4 °С. Полученный супернатант, содержащий цитохромом P450cam наносили на хроматографическую колонку с диэтил-аминоэтил-сефарозой 6В (cross-linked), предварительно уравновешенную 50 мМ КФБ (буфер А) (рН 7,4) с 1 мМ дитиотреитолом (ДТТ) и 10 мМ NaCl. После нанесения колонку последовательно промывали десятью объемами буфера А с увеличением концентрации NaCl (10 мМ, 30 мМ, 50 мМ, 100 мМ). Элюцию P450cam осуществляли буфером А с 20 % глицерина и 400 мМ NaCl. Далее белок очищали при помощи гель-фильтрационной хроматографии с использованием матрицы Sephadex G-100 Superfine, уравновешенной 50 мМ КФБ (рН 7,4) с 1 мМ ДТТ. В дальнейшем использовали фракции P450cam с соотношением поглощения A_{417}/A_{280} нм выше 1,4.

Разностное спектрофотометрическое титрование. Сродство 4-PI к P450cam определяли по изменению поглощения в диапазоне длин волн 350–500 нм. Для измерений использовали двулучевую спектрофотометр Cary 5000. Цитохром P450cam разбавляли до концентрации 1 мкМ в 100 мМ КФБ (рН 7,4). Концентрацию стокового раствора P450cam определяли спектрофотометрически по поглощению карбонильного комплекса восстановленной формы при 450 нм ($\epsilon = 91000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и по поглощению при 417 нм для свободной формы ($\epsilon = 117000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). В обоих случаях концентрации совпадали. Не наблюдалось образование 420-й неактивной формы. Титрование производили 4-PI, растворенным в метаноле. Измерения проводили при температуре 22 °С. В кювету сравнения добавляли метанол без 4-PI. Конечная концентрация метанола в буферном растворе белка составила 3 %. Изменение поглощения оценивали по разнице на длине волны при 434 и 400 нм. Для определения равновесной константы диссоциации использовали зависимость разности поглощения от концентрации 4-PI. Экспериментальные точки аппроксимировали кривой Ленгмюра для случая связывания с одним сайтом с использованием программного пакета Origin 2016.

Измерение константы скорости диссоциации 4-PI от P450cam методом остановленной струи. Измерения проводили с использованием спектрофотометра ультрафиолетовой/видимой/ближней инфракрасной области спектра Cary5000, оснащенного установкой для быстрого смешивания методом остановленной струи SX20 производства Applied Photophysics. Диссоциацию 4-PI из комплекса с P450cam определяли непрямым методом: насыщенный раствор P450cam (2 мкМ) с 4-PI (250 мкМ) смешивали с раствором d-камфары (2,5 мМ). Изменение поглощения детектировали при длине волны 434 нм и температуре 22 °С. Измерения проводились в 5 повторах. Полученные кинетически кривые подвергались регрессионному анализу методом наименьших квадратов для вычисления констант скоростей реакции диссоциации в программном пакете Origin 2016.

Подготовка образца для ЯМР спектроскопии. Для ЯМР измерений использовали цитохром P450cam в 100 мМ D₂O-КФБ. Для этого цитохром P450cam в обычном КФБ концентрировали при помощи ультрафильтрации в пробирках Millipore 30000 MWCO и затем разбавляли в D₂O буфере. Данную процедуру повторяли многократно, чтобы концентрация первоначального буфера стала меньше 1 %. Конечную концентрацию белка доводили до 500 мМ. Концентри-

рованный раствор 4-PI получали при растворении в дейтерированном метаноле (d_4 -MetOH). Для измерений использовали 5 мм ЯМР ампулы высокого разрешения. Объем образцов составлял 700 мкл.

Измерение РПН-ЯМР. Измерения РПН-ЯМР для комплекса 4-PI с P450cam осуществляли на ЯМР-спектрометре Bruker Avance 500 (резонансная частота для протонов 500 МГц). Для измерений использовали импульсную программу stddif из стандартных импульсных последовательностей программы TopSpin 2.1 (Bruker). Сигнал стабилизации поля (сигнал лока) устанавливали по D_2O . Проводили калибровку длительности стандартного мощного 90-градусного импульса. Частоту селективного импульса для возбуждения ядер цитохрома P450cam устанавливали на 0,8 ppm, для нерезонанса – на 30 ppm. Мощность селективного импульса устанавливалась на 46 дБ. Время задержки d1 соответствовало 5-кратному времени для T1 релаксации. Измерения проводили при различном времени насыщения d21.

Результаты и их обсуждение. *Разностное спектрофотометрическое титрование.* Положение полосы поглощения Soret хорошо коррелирует со спиновым состоянием железа гема цитохрома P450cam, что подтверждается методами прямого измерения спинового состояния. Так связывание субстрата приводит к переходу железа из низко- в высоко-спиновое состояние, при этом максимум поглощения полосы Soret сдвигается с 417 на 391 нм [17]. В свою очередь лиганды, содержащие в своем составе атомы азота с неподеленной электронной парой (например, азольные ингибиторы), образуют координационную связь с атомом железа, в результате чего железо гема становится 6-координационным, а полоса поглощения Soret сдвигается в длинноволновую область спектра (417 → 420 → 425 нм).

Для определения равновесной константы диссоциации комплекса P450cam–4-PI мы использовали метод разностного спектрофотометрического титрования. Добавление 4-PI вызывает смещение максимума поглощения P450cam вследствие координирования атома азота по атому железа гема (рис. 1). Найденная равновесная константа диссоциации ($8,99 \pm 0,38$ мкМ) соответствует умеренному сродству для лиганда азольной природы, чего и следовало ожидать, учитывая структуру 4-PI.

Кинетика диссоциации комплекса P450cam–4-PI. Для определения времени жизни комплекса с прямой координацией нами проведен эксперимент по замещению 4-PI камфарой при помощи

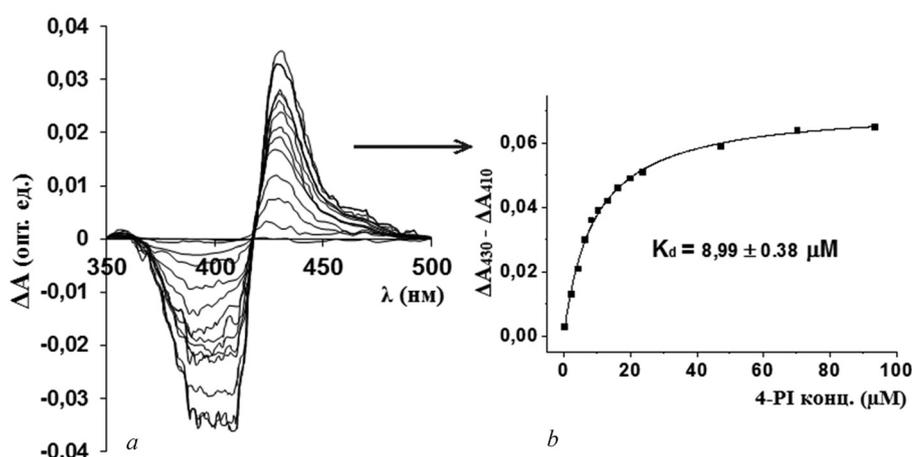


Рис. 1. Определение сродства 4-PI к P450cam методом разностного спектрофотометрического титрования: *a* – разностный спектр при титровании P450cam (1 мМ) с 4-PI (0,3–93 мМ); *b* – экспериментальные точки зависимости разности поглощения при 400–430 нм от концентрации 4-PI с аппроксимирующей кривой. Данная кривая найдена методом наименьших квадратов с использованием зависимости Ленгмюра для случая взаимодействия с одним центром связывания

Fig. 1. Determination of the interaction of 4-PI with P450cam by the method of difference spectrophotometric titrating: *a* – difference spectrum when titrating P450cam (1 mM) with 4-PI (0.3–93 mM); *b* – experimental points of the dependence of the absorption difference at 400–430 nm on 4-PI concentration and the approximating curve. This curve is found by the least square method and the use of the Langmuir dependence for the case of the interaction with one binding site

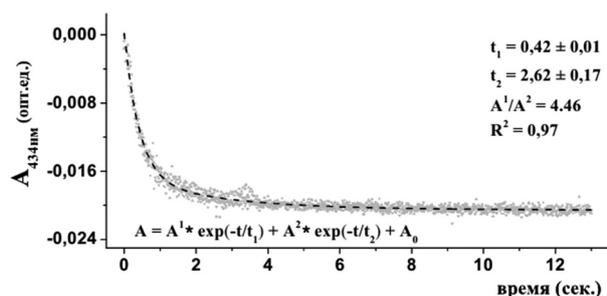


Рис. 2. График кинетики диссоциации комплекса между 4-PI (250 мкМ) и P450cam (2 мкМ) при добавлении избытка d-камфары (2,5 мМ). Экспериментальные данные кинетической кривой соответствуют четырем измерениям при 22 °С методом остановленной струи

Fig. 2. Plot of the dissociation kinetics of the complex between 4-PI (250 μ M) and P450cam (2 μ M) added with an excess of d-camphor (2.5 mM). Experimental data of the kinetic curve correspond to four measurements at 22 °C made by the stop-flow method

в связанном с P450cam состоянии. Данная кривая хорошо аппроксимируется двухэкспоненциальной зависимостью (с временем $t_1 = 1,506$, $t_2 = 0,41$), на основании чего мы предполагаем существование двух различных комплексов P450cam–4-PI с прямой координацией.

Это объясняется тем, что 4-PI может находиться в двух резонансных формах (рис. 3) и координирование возможно при участии обоих атомов азота.

РПН-ЯМР эксперимент. РПН-ЯМР эксперимент проводится в условиях избытка лиганда относительно белка. При таких условиях можно наблюдать влияние связанного с белком лиганда на интенсивность сигналов ЯМР за счет быстрого обмена с общим пулом лиганда в растворителе. Для комплексов с прямой координацией, со временем жизни порядка секунд, влиянием на общий пул лиганда можно пренебречь (это связано с низкой концентрацией белка, временем релаксации протонов), только малая часть связанного лиганда успевает передать намагниченность в раствор за время насыщения радиочастотным импульсом. Поэтому эффекта от комплекса с прямой координацией не должно наблюдаться в РПН-ЯМР эксперименте.

Нами получен РПН-ЯМР спектр при добавлении P450cam к избытку 4-PI (рис. 4). В референсном спектре (частота насыщения 30 ppm, вне резонанса) (рис. 4, b) обнаруживается остаточный сигнал от метильной группы метанола, так как добавляемый 4-PI предварительно растворяли в d4-метаноле. Разностный РПН-ЯМР спектр (рис. 4, a), полученный вычитанием референсного РПН-ЯМР спектра из спектра на резонансной частоте (насыщение селективным импульсом на частоте резонанса алифатических групп белка при 0,8 ppm), отражает взаимодействие 4-PI с P450cam в режиме быстрого обмена. Отсутствие сигнала в разностном РПН-ЯМР спектре для метильной группы метанола указывает на отсутствие его взаимодействия с P450cam. Кроме аттенюации сигнала 4-PI в РПН-ЯМР спектре в области частот, которые подвергаются резонансному насыщению, обнаруживаются сигналы от протонов белковых групп. Полученные результаты соответствуют первоначальным теоретическим предположениям промежуточного взаимодействия 4-PI со специфическим сайтом связывания P450cam до момента координирования по атому железа гема, так как в противном случае также можно было бы ожидать атте-

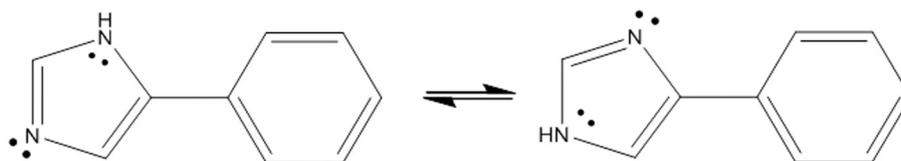


Рис. 3. Две резонансные структуры 4-PI

Fig. 3. Two resonance structures of 4-PI

метода остановленной струи (рис. 2). При добавлении d-камфары (природный субстрат) к комплексу P450cam–4-PI устанавливается новое термодинамическое равновесие в системе, а количество комплекса P450cam с 4-PI уменьшается. При связывании с d-камфарой атом железа гема цитохрома P450cam становится пятикоординационным. Пятикоординационное состояние является высоко-спиновым, в отличие от шестикоординационного низко-спинового для комплекса с 4-PI. При этом максимум поглощения сдвигается в коротковолновую область спектра (393 нм). Таким образом, замещение 4-PI камфарой можно контролировать по уменьшению поглощения при 434 нм (максимум в разностном спектре, рис. 1, a). Временная константа полученной кинетической кривой (рис. 2) соответствует времени жизни 4-PI

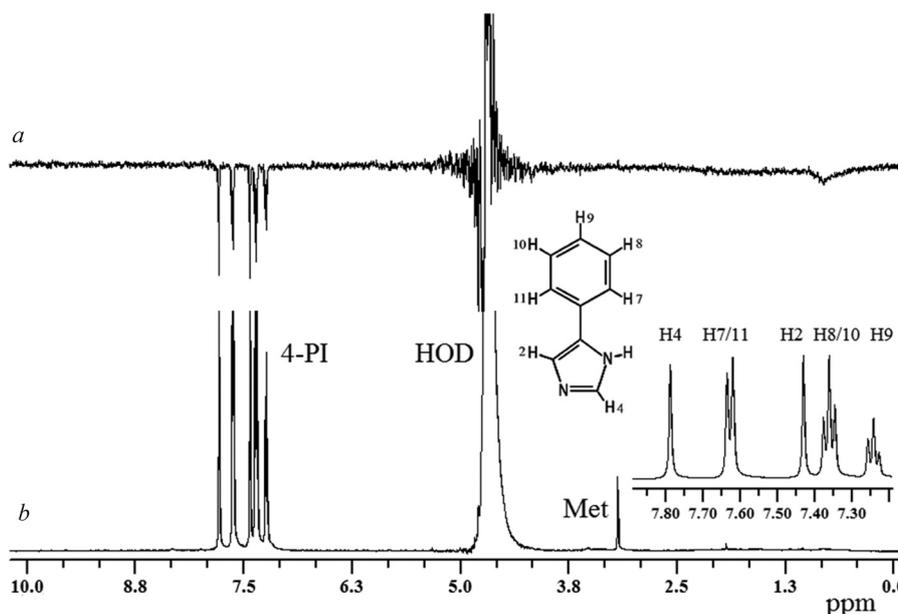


Рис. 4. ^1H -ЯМР спектры раствора 4-PI (11 мМ) в присутствии P450cam (6 мкМ) (D_2O -КФБ 100 мМ, рD 7,5): *a* – разностный РПН-ЯМР спектр (получен при вычитании спектра с радиочастотным насыщением P450cam из спектра без насыщения); *b* – РПН-ЯМР спектр с частотой селективного импульса в области 30 ppm (вне резонанса). На вставке изображена область спектра с сигналами 4-PI, с отнесением их химических сдвигов относительно молекулярной структуры. HOD – остаточный сигнал от протонов воды, Met – сигнал от метильной группы d4-метанола

Fig. 4. ^1H -NMR spectra of the solution of 4-PI (11 mM) in the presence of P450cam (6 μM) (D_2O -KFB 100 mM, pD 7.5): *a* – difference STD-NMR spectrum (obtained by subtracting a spectrum with radiofrequency saturation of P450cam from a spectrum without saturation); *b* – STD-NMR spectrum with a selective pulse frequency within 30 ppm (outside resonance). The insert shows the region of the spectrum with 4-PI signals, with the assignment of their chemical shifts relative to the molecule structure. HOD is the residual signal of water protons and Met is the signal of the methyl group of d4-methanol

нюации сигнала молекулы метанола. В дальнейшем большой интерес представляет количественное определение данного промежуточного взаимодействия, в целях сравнения с комплексом с прямой координацией.

Для определения равновесной константы диссоциации для такого быстро-обмениваемого состояния при взаимодействии P450cam с 4-PI использовали зависимость РПН $_{\text{ФА}}$ при нулевом времени насыщения от концентрации 4-PI.

В результате исследований Ангуло и соавт. [18] показано, что равновесная константа диссоциации (K_d), определенная методом РПН-ЯМР по зависимости фактора амплификации от концентрации лиганда при выбранном времени насыщения, зачастую переоценивается. Показано, что K_d зависит от концентрации белка, интенсивности выбранного сигнала и времени насыщения. В свою очередь, эти зависимости можно отнести к процессу повторного быстрого связывания (ребиндинга), когда уже насыщенный намагниченностью связанный с белком лиганд успевает диссоциировать, а затем повторно связаться за время насыщения, не успевая релаксировать до первоначального состояния. Ангуло разработана схема РПН-ЯМР эксперимента [6], позволяющая обойти нежелательные эффекты и определить истинную термодинамическую равновесную константу диссоциации. Основной принцип заключается в определении K_d по зависимости фактора амплификации от концентрации лиганда при времени насыщения, стремящемся к нулю. Для этого необходимо провести измерения РПН при различном времени насыщения для каждой концентрации лиганда. Затем по зависимости фактора амплификации от времени насыщения определить константу скорости насыщения и максимальный фактор амплификации. Произведение этих двух величин дает фактор амплификации РПН при нулевом времени насыщения. Построив зависимость фактора амплификации в нулевом насыщении от концентрации лиганда можно определить, используя аппроксимацию полученных экспериментальных точек изотермой Ленгмюра (для случая взаимодействия с одним центром связывания), истинную термодинамическую равновесную константу диссоциации.

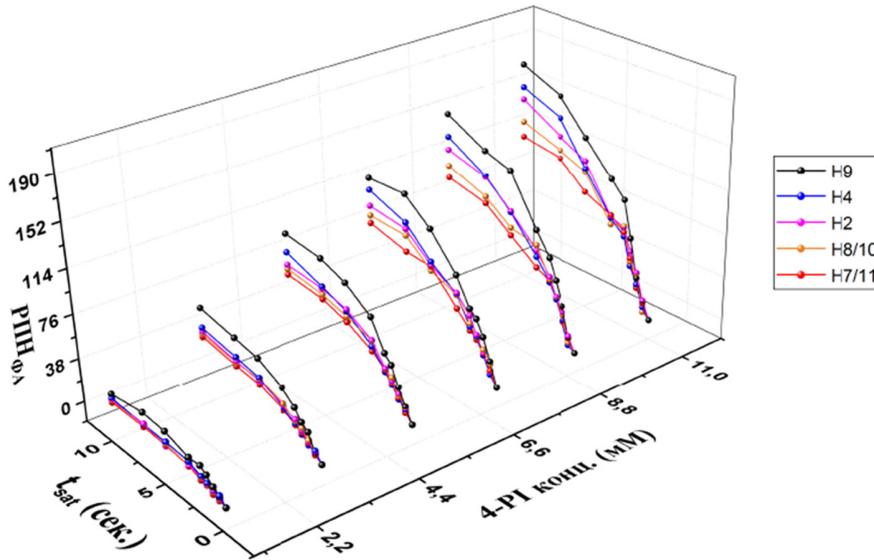


Рис. 5. График зависимости $STD_{\Phi A}$ сигналов протонов 4-PI от концентрации 4-PI и времени насыщения (t_{sat}) в присутствии P450cam (6 мкМ). Цветовая легенда отображает принадлежность кривых к определенным сигналам протонов 4-PI

Fig. 5. $STD_{\Phi A}$ of proton signals of 4-PI as a function of 4-PI concentration and saturation time (t_{sat}) in the presence of P450cam (6 μ M). Color indicates that the curves stand for the determined signals of 4-PI protons

Майер и Майер предложили преобразовать наблюдаемые экспериментальные интенсивности $(I_0 - I_{sat}) / I_0$ в фактор амплификации $RPN_{\Phi A}$:

$$RPN_{\Phi A} = \frac{\varepsilon(I_0 - I_{sat})}{I_0} = \varepsilon\eta_{RPN}$$

Учитывая это, можно представить вышеизложенную теорию данного эксперимента в виде следующих выражений:

$$RPN_{\Phi A}(t_{sat}) = RPN_{\Phi A}^{max} (1 - \exp(-k_{sat}t_{sat})),$$

где $RPN_{\Phi A}(t_{sat})$ – наблюдаемая интенсивность $RPN_{\Phi A}$; $RPN_{\Phi A}^{max}$ – асимптотический максимум кривой увеличения RPN ; t_{sat} – время насыщения селективным импульсом; k_{sat} – константа скорости, относящаяся к релаксационным свойствам выбранного ядра, которая определяет скорость увеличения $RPN_{\Phi A}$. $RPN_{\Phi A}^{max}$ и k_{sat} вычисляется методом наименьших квадратов, а начальный наклон кривой определяется как

$$dRPN_{\Phi A} / dt(0) = RPN_{\Phi A}^{max} k_{sat},$$

$$\lim_{t_{sat} \rightarrow 0} d / dt(RPN_{\Phi A}) = k_{sat} RPN_{\Phi A} = RPN_{\Phi A0}.$$

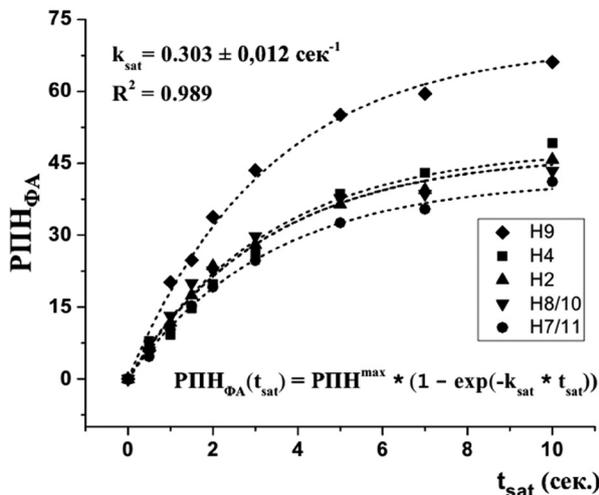


Рис. 6. График зависимости $RPN_{\Phi A}$ сигналов протонов 4-PI от времени насыщения при концентрации 4-PI 3 мМ

Fig. 6. $STD_{\Phi A}$ of proton signals of 4-PI as a function of 4-PI concentration and saturation equal to 3 mM

Нами получены экспериментальные данные зависимости $RPN_{\Phi A}$ от времени насыщения для определения $RPN_{\Phi A0}$ для пяти сигналов от различных протонов 4-PI (рис. 5). Полученные кривые хорошо аппроксимируются моноэкспоненциальной зависимостью для RPN (рис. 6). Это свидетельствует в пользу того, что полученные экспериментальные кривые соответствуют од-

ному состоянию, где 4-PI взаимодействует с одним сайтом связывания. При увеличении концентрации 4-PI происходит увеличение $RPN_{\Phi A}$, что согласуется с теорией РПН-ЯМР.

Рассчитанные по кривым значения $RPN_{\Phi A_{\max}}$ и k_{sat} (таблица) позволили определить значения для $RPN_{\Phi A0}$. Найденные значения для $RPN_{\Phi A_{\max}}$ дают возможность осуществить «эпитопное картирование», т. е. определить относительную близость расположения протонов лиганда к насыщаемым селективным радиочастотным импульсом белковым группам. Так максимально близко к белку располагается протон H9, в то время как протоны H7 и H11 наиболее отдалены.

Расчитанные по экспериментальным данным (рис. 5) значения максимального фактора амплификации ($RPN_{\Phi A_{\max}}$) и константы скорости насыщения (k_{sat}), а также их произведения

Values of the maximum amplification factor ($STD_{\Phi A_{\max}}$) and saturation rate constants (k_{sat}), as well as their products calculated from the experimental data in Fig. 5

Концентрация (мМ) Concentration (mM)	$RPN_{\Phi A_{\max}}$ $STD_{\Phi A_{\max}}$										k_{sat} (сек ⁻¹)	
	H4		H7/11		H2		H8/10		H9			
1	16,6	(±0,8)	14,8	(±0,7)	16,3	(±0,8)	18,4	(±0,8)	26,9	(±0,9)	0,459	(±0,031)
3	48,2	(±1,2)	41,6	(±1,2)	47,0	(±1,2)	46,9	(±1,2)	69,8	(±1,4)	0,304	(±0,012)
5	83,8	(±2,3)	71,6	(±2,1)	82,5	(±2,3)	78,6	(±2,2)	112,1	(±2,6)	0,295	(±0,013)
7	113,9	(±3,1)	92,6	(±2,9)	108,9	(±3,1)	102,0	(±3,0)	141,4	(±3,5)	0,273	(±0,012)
9	140,7	(±4,7)	113,0	(±4,2)	139,6	(±4,6)	124,8	(±4,4)	176,0	(±5,3)	0,242	(±0,013)
11	164,4	(±7,3)	133,3	(±6,6)	161,4	(±7,2)	144,8	(±6,9)	196,5	(±8,0)	0,245	(±0,018)

Данные зависимости $RPN_{\Phi A0}$ от концентрации 4-PI с использованием соотношения Ленгмюра для взаимодействия с одним сайтом связывания (рис. 7) позволили определить истинную равновесную константу диссоциации комплекса P450cam–4-PI, которая составила 10,4 мМ. Данная константа на три порядка отличается от той, которая была определена нами спектрофотометрическим методом (8,9 мкМ).

Зависимость k_{sat} от концентрации 4-PI (рис. 8) указывает на наличие реассоциации насыщенного намагничённостью 4-PI при его низкой концентрации, в тот момент, когда отношение P450cam/4-PI возрастает. После переноса насыщения с молекулы P450cam диссоциировавшая молекула 4-PI успевает заново связаться до момента полной релаксации намагничённости. Данный факт подтверждает целесообразность определения равновесной константы диссоциации по зависимости $RPN_{\Phi A0}$ от концентрации лиганда вместо определения по зависимости $RPN_{\Phi A}$ при постоянном времени насыщения. Действительно, ранее мы определили равновесную константу диссоциации комплекса P450cam–4-PI по зависимости $RPN_{\Phi A}$ от концентрации 4-PI при постоянном времени насыщения (рис. 9). Найденная таким образом K_d составила 34,6 мМ, что в несколько раз превышает K_d , найденную по $RPN_{\Phi A0}$ (10,4 мМ). Таким образом, мы можем утверждать, что определение при постоянном времени насыщения из-за эффекта реассоциации приводит к завышению определяемой K_d , которая в данном случае зависит от времени насыщения, интенсивности выбранного сигнала, концентрации белка и отличается от истинной термодинамической равновесной константы. При увеличении концентрации 4-PI отношение P450cam/4-PI уменьшается, вследствие чего

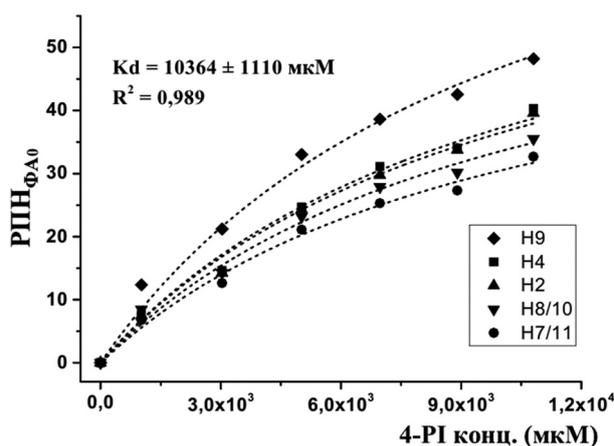


Рис. 7. Кривые зависимости $RPN_{\Phi A0}$ сигналов протонов 4-PI от концентрации 4-PI, найденные методом наименьших квадратов по экспериментальным точкам с использованием зависимости Ленгмюра для случая взаимодействия с одним центром связывания

Fig. 7. $STD_{\Phi A0}$ of proton signals of 4-PI as a function of 4-PI concentration determined by the least square method and the use of the Langmuir relation for the case of the interaction with one binding site

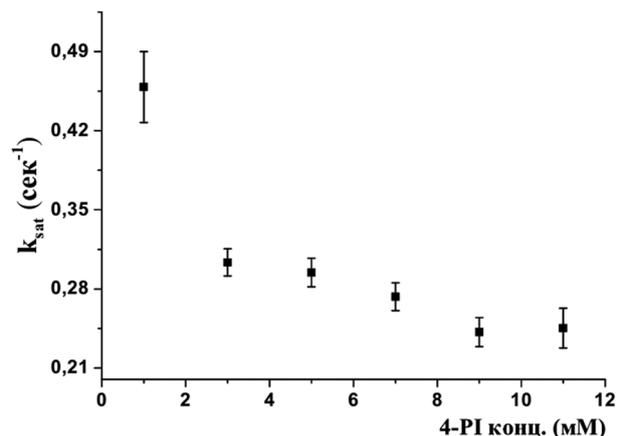


Рис. 8. Зависимость константы скорости насыщения (k_{sat}) от концентрации 4-PI

Fig. 8. Saturation rate constant (k_{sat}) as a function of 4-PI concentration

тательно, активный сайт P450cam обладает большой степенью гидрофобности, поэтому при ассоциации с ним 4-PI выделяется такое количество энергии. Таким образом, мы можем предположить, что после проникновения через канал доступа в погруженный активный сайт P450cam 4-PI некоторое время существует в некоординированном состоянии. Если координирование не происходит из-за конформационных ограничений структуры P450cam, то за счет флуктуации групп полипептидной цепи активного сайта и канала доступа 4-PI может диссоциировать в раствор.

Флуктуации активного сайта P450cam подтверждаются исследованиями время-разрешенного измерения анизотропии флуоресценции d-камфары при взаимодействии с ним, где была показана ее мобильность [19]. Так же подвижность d-камфары обнаруживается при анализе кристаллографических данных термального бета-фактора [20].

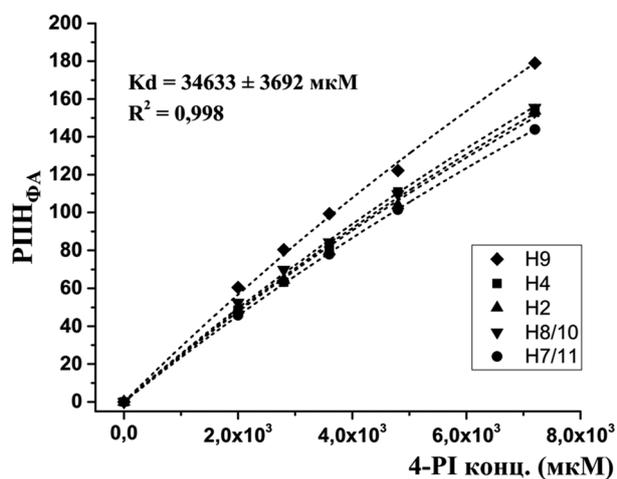


Рис. 9. Кривые зависимости РПН_{ФА} сигналов протонов 4-PI от концентрации 4-PI при времени насыщения 8 с, найденные методом наименьших квадратов по экспериментальным точкам с использованием зависимости Ленгмюра для случая взаимодействия с одним центром связывания

Fig. 9. STD_{ФА} of proton signals of 4-PI as a function of 4-PI concentration during the 8 sec saturation time found by the least square method and the use of the Langmuir relation for the case of the interaction with one binding site

частота процесса реассоциации насыщенного намагниченностью 4-PI снижается. При малых концентрациях 4-PI вероятность повторной реассоциации выше.

Исходя из полученных нами данных, мы можем утверждать, что РПН-ЯМР эксперимент позволил нам обнаружить новое состояние комплекса между P450cam и 4-PI. В данном состоянии 4-PI не координирован по атому железа гема, энергия взаимодействия (11,2 кДж) намного меньше и обусловлена только взаимодействием интерфейса активного сайта. Время жизни такого комплекса мало, и вследствие этого 4-PI быстро обменивается с объемом растворителя. Свободная энергия связывания (11,2 кДж) приблизительно соответствует величине разницы энергии перехода 4-PI из водного в гидрофобное окружение. Действительно,

активный сайт P450cam обладает большой степенью гидрофобности, поэтому при ассоциации с ним 4-PI выделяется такое количество энергии. Таким образом, мы можем предположить, что после проникновения через канал доступа в погруженный активный сайт P450cam 4-PI некоторое время существует в некоординированном состоянии. Если координирование не происходит из-за конформационных ограничений структуры P450cam, то за счет флуктуации групп полипептидной цепи активного сайта и канала доступа 4-PI может диссоциировать в раствор.

Флуктуации активного сайта P450cam подтверждаются исследованиями время-разрешенного измерения анизотропии флуоресценции d-камфары при взаимодействии с ним, где была показана ее мобильность [19]. Так же подвижность d-камфары обнаруживается при анализе кристаллографических данных термального бета-фактора [20].

Сложность процесса взаимодействия с лигандом неоднократно упоминалась в работах при исследовании других цитохромов P450. В частности, методом ППР показано связывание цитохрома P450 3A4 с итраконазолом и кетоназолом с разными ориентациями в активном сайте. Данные лиганды имеют небольшую скорость диссоциации при взаимодействии по типу ингибитора и каталитически продуктивного состояния при взаимодействии по типу субстрата [21]. При этом изначально было известно, что итраконазол может гидроксироваться в положении, удаленном от триазольных атомов азота на расстоянии в 25 Å. Полученные результаты позволили выяснить причину образования такого продукта реакции. Измеренные равновесные константы диссоциации при помощи ППР для высоко-аффинного состояния соответствуют данным, полученным в результате разностного спектрофотометрического титрования для данных комплексов.

При помощи метода флуоресцентного резонансного переноса энергии (ФРПЭ) и титрования Джобса для цитохрома P450 3A4 установлено [22], что взаимодействие с 1-пиренбу-

танолом соответствует механизму последовательного связывания, где спиновый переход инициируется связыванием 1-пиренбутанола с сайтом с низкой аффинностью, что возможно только при насыщении сайта с высоким сродством. В исследовании взаимодействия P450eryF с флуоресцентным красителем фтор-7GA (фтор-555) [23] по изменению резонансного переноса флуоресценции было предположено существование, по крайней мере, двух сайтов связывания с разным аффинитетом. При помощи времязрешенного ФППЭ показано значительное увеличение аффинности P450eryF к фтор-7GA при повышенных давлениях, что свидетельствует в пользу конформационных превращений, вызванных связыванием с лигандом и связанным с этим значительным увеличением уровня гидратации фермента. Позднее [24] для того же лиганда при взаимодействии с P450 3A4 показано существование двух различных сайтов связывания, расположенных на значительном удалении друг от друга. При взаимодействии с периферическим сайтом связывания происходит существенный сдвиг спинового состояния, что модулирует дальнейшее связывание с активным сайтом. Авторы отмечают, что данные исследования являются первым подтверждением наличия важного сайта связывания на периферии белковой глобулы цитохрома P450 и предполагают, что механизм кооперативности P450 3A4 включает конформационный переход, запускаемый аллостерическим взаимодействием с лигандом.

В [25] предложена модель трехстадийного связывания молекулы ингибитора с цитохромом P450 3A4. С использованием комбинации флуоресцентного стоп-флоу и стоп-флоу поглощения показано возможное существование промежуточного состояния на пути к финальному комплексу с лигандом в активном сайте. В частности, наблюдалось, что тушение лигандом внутренней флуоресценции белка происходит в более быстром временном интервале, чем изменение спинового состояния гема.

Заключение. В настоящей работе мы впервые показали возможность обнаружения быстро-обмениваемого состояния азольного лиганда в активном сайте цитохрома P450cam методом РПН-ЯМР спектроскопии. В условиях, когда концентрация лиганда намного больше концентрации белка, детектирование взаимодействия методом РПН-ЯМР спектроскопии возможно только в случае быстрого обмена лиганда между активным сайтом и объемом растворителя. Нами показано, что комплекс с прямой координацией имеет время жизни в связанном состоянии порядка секунд. Этот факт указывает на невозможность обнаружения данного взаимодействия в РПН-ЯМР эксперименте. В обнаруженном нами короткоживущем комплексе между P450cam и 4-PI последний находится в промежуточном состоянии, которое предшествует координированию по атому железа гема. Можно предположить, что данное состояние 4-PI обладает большой степенью подвижности в активном сайте P450cam. Рассчитанная равновесная константа диссоциации по РПН-ЯМР позволяет утверждать, что энергия взаимодействия 4-PI в промежуточном состоянии относится, в основном, к гидрофобным взаимодействиям с полостью активного сайта цитохрома P450cam.

Таким образом, с учетом нашей работы и уже существующих данных, можно утверждать, что взаимодействие цитохромов P450 с лигандами не является простым бимолекулярным процессом. До момента образования финального комплекса с субстратом или ингибитором, последние могут связываться в промежуточных сайтах цитохрома P450 достаточное время, чтобы быть обнаруженными, например, такими методами, как ЯМР, но не детектироваться оптическими методами. К таким промежуточным сайтам можно отнести область канала доступа субстрата цитохрома P450, поверхность вблизи данного канала или область активного сайта, взаимодействие с которой препятствует дальнейшему сближению с гемовой группой.

Список использованных источников

1. Hrycaj, E. G. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450 / E. G. Hrycaj, S. M. Bandiera // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2015. – Vol. 851. – 368 p. doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2
2. Isin, E. M. Substrate binding to cytochromes P450 / E. M. Isin, F. P. Guengerich // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2008. – Vol. 392, N 6. – P. 1019–1030. doi.org/10.1007/s00216-008-2244-0
3. Aguirre, C. Overview of Probing Protein-Ligand Interactions Using NMR / C. Aguirre, O. Cala, I. Krimm // *Current Protocols in Protein Science*. – 2015. – P. 17.18.1–17.18.24. doi.org/10.1002/0471140864.ps1718s81
4. Cala, O. NMR-based analysis of protein–ligand interactions / O. Cala, F. Guillièrè, I. Krimm // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2014. – Vol. 406, N 4. – P. 943–956. doi.org/10.1007/s00216-013-6931-0
5. Mayer, M. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor / M. Mayer, B. Meyer // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – Vol. 123, N 25. – P. 6108–6117. doi.org/10.1021/ja0100120

6. Angulo, J. STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules – a quantitative approach / J. Angulo, P. M. Nieto // *European Biophysics Journal*. – 2011. – Vol. 40, N 12. – P. 1357–1369. doi.org/10.1007/s00249-011-0749-5
7. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ in native platelets than in liposomes / B. Claassen [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2005. – Vol. 127, N 3. – P. 916–919. doi.org/10.1021/ja044434w
8. Direct detection of ligand binding to Sepharose-immobilised protein using saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy / T. Haselhorst [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2007. – Vol. 359, N 4. – P. 866–870. doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.204
9. Jayalakshmi, V. Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes / V. Jayalakshmi, N. R. Krishna // *Journal of Magnetic Resonance*. – 2002. – Vol. 155, N 1. – P. 106–118. doi.org/10.1006/jmre.2001.2499
10. Godamudunage, M. P. Comparison of Cytochrome P450 3A4 and 3A7 with Azole Inhibitors / M. P. Godamudunage, J. N. Lampe, E. E. Scott // *FASEB Journal*. – 2017. – Vol. 31, N 1. – P. 669.5.
11. Sevrioukova, I. F. Structural biology of redox partner interactions in P450cam monooxygenase: a fresh look at an old system / I. F. Sevrioukova, T. L. Poulos // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2011. – Vol. 507, N 1. – P. 66–74. doi.org/10.1016/j.abb.2010.08.022
12. Mueller, E. J. Twenty-five years of P450cam research / E. J. Mueller, P. J. Loida, S. G. Sligar // *Cytochrome P450*. – Springer US, 1995. – P. 83–124. doi.org/10.1007/978-1-4757-2391-5_3
13. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450 / T. L. Poulos [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1985. – Vol. 260, N 30. – P. 16122–16130.
14. Conformational states of cytochrome P450cam revealed by trapping of synthetic molecular wires / A. M. A. Hays [et al.] // *Journal of molecular biology*. – 2004. – Vol. 344, N 2. – P. 455–469. doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.046
15. Three clusters of conformational states in p450cam reveal a multistep pathway for closing of the substrate access channel / Y. T. Lee [et al.] // *Biochemistry*. – 2011. – Vol. 50, N 5. – P. 693–703. doi.org/10.1021/bi101726d
16. Poulos, T. L. Crystal structures of metyrapone- and phenylimidazole-inhibited complexes of cytochrome P-450cam / T. L. Poulos, A. J. Howard // *Biochemistry*. – 1987. – Vol. 26, N 25. – P. 8165–8174. doi.org/10.1021/bi00399a022
17. Lipscomb, J. D. Structural aspects of the active site of cytochrome P-450cam / J. D. Lipscomb, I. C. Gunsalus // *Drug Metabolism and Disposition*. – 1973. – Vol. 1, N 1. – P. 1–5.
18. Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy Characterization of Dual Binding Mode of a Mannose Disaccharide to DC-SIGN / J. Angulo [et al.] // *ChemBioChem*. – 2008. – Vol. 9, N 14. – P. 2225–2227. doi.org/10.1002/cbic.200800361
19. Prasad, S. Binding of camphor to *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam: steady-state and picosecond time-resolved fluorescence studies / S. Prasad, S. Mazumdar, S. Mitra // *FEBS letters*. – 2000. – Vol. 477, N 3. – P. 157–160. doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01745-2
20. Crystal structure of the cytochrome P-450CAM active site mutant Thr252Ala / R. Raag [et al.] // *Biochemistry*. – 1991. – Vol. 30, N 48. – P. 11420–11429. doi.org/10.1021/bi00112a008
21. Surface plasmon resonance analysis of antifungal azoles binding to CYP3A4 with kinetic resolution of multiple binding orientations / J. T. Pearson [et al.] // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45, N 20. – P. 6341–6353. doi.org/10.1021/bi0600042
22. Fernando, H. Resolution of Multiple Substrate Binding Sites in Cytochrome P450 3A4: The Stoichiometry of the Enzyme-Substrate Complexes Probed by FRET and Job's Titration / H. Fernando, J. R. Halpert, D. R. Davydov // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45, N 13. – P. 4199–4209. doi.org/10.1021/bi052491b
23. Davydov, D. R. Allosteric transitions in cytochrome P450eryF explored with pressure-perturbation spectroscopy, lifetime FRET, and a novel fluorescent substrate, Fluorol-7GA / D. R. Davydov, N. Y. Davydova, J. R. Halpert // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47, N 43. – P. 11348–11359. doi.org/10.1021/bi8011803
24. Peripheral ligand-binding site in cytochrome P450 3A4 located with fluorescence resonance energy transfer (FRET) / D. R. Davydov [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, N 9. – P. 6797–6809. doi.org/10.1074/jbc.m111.325654
25. Isin, E. M. Multiple sequential steps involved in the binding of inhibitors to cytochrome P450 3A4 / E. M. Isin, F. P. Guengerich // *Journal of Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 282, N 9. – P. 6863–6874. doi.org/10.1074/jbc.m610346200

References

1. Hrycay E. G., Bandiera S. M. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2015, vol. 851. 368 p. doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2
2. Isin E. M., Guengerich F. P. Substrate binding to cytochromes P450. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2008, vol. 392, no. 6, pp. 1019–1030. doi.org/10.1007/s00216-008-2244-0
3. Aguirre C., Cala O., Krimm I. Overview of Probing Protein-Ligand Interactions Using NMR. *Current Protocols in Protein Science*, 2015, pp. 17.18.1–17.18.24. doi.org/10.1002/0471140864.ps1718s81
4. Cala O., Guillière F., Krimm I. NMR-based analysis of protein–ligand interactions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2014, vol. 406, no. 4, pp. 943–956. doi.org/10.1007/s00216-013-6931-0
5. Mayer M., Meyer B. Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *Journal of the American Chemical Society*, 2001, vol. 123, no. 25, pp. 6108–6117. doi.org/10.1021/ja0100120
6. Angulo J., Nieto P. M. STD-NMR: application to transient interactions between biomolecules – a quantitative approach. *European Biophysics Journal*, 2011, vol. 40, no. 12, pp. 1357–1369. doi.org/10.1007/s00249-011-0749-5

7. Claassen B., Axmann M., Meinecke R., Meyer B. Direct observation of ligand binding to membrane proteins in living cells by a saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy method shows a significantly higher affinity of integrin α IIb β 3 in native platelets than in liposomes. *Journal of the American Chemical Society*, 2005, vol. 127, no. 3, pp. 916–919. doi.org/10.1021/ja044434w
8. Haselhorst T., Münster-Kühnel A. K., Oeschli M., Tiralongo J., Gerardy-Schahn R., von Itzstein M. Direct detection of ligand binding to Sepharose-immobilised protein using saturation transfer double difference (STDD) NMR spectroscopy. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, vol. 359, no. 4, pp. 866–870. doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.204
9. Jayalakshmi V., Krishna N. R. Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *Journal of Magnetic Resonance*, 2002, vol. 155, no. 1, pp. 106–118. doi.org/10.1006/jmre.2001.2499
10. Godamudunage M. P., Lampe J. N., Scott E. E. Comparison of Cytochrome P450 3A4 and 3A7 with Azole Inhibitors. *FASEB Journal*, 2017, vol. 31, no. 1, pp. 669.5.
11. Sevrioukova I. F., Poulos T. L. Structural biology of redox partner interactions in P450cam monooxygenase: a fresh look at an old system. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2011, vol. 507, no. 1, pp. 66–74. doi.org/10.1016/j.abb.2010.08.022
12. Mueller E. J., Loida P. J., Sligar S. G. Twenty-five years of P450cam research. *Cytochrome P450*. Springer US, 1995, pp. 83–124. doi.org/10.1007/978-1-4757-2391-5_3
13. Poulos T. L., Finzel B. C., Gunsalus I. C., Wagner G. C., Kraut J. The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450. *Journal of Biological Chemistry*, 1985, vol. 260, no. 30, pp. 16122–16130.
14. Hays A. M. A., Dunn A. R., Chiu R., Gray H. B., Stout C. D., Goodin D. B. Conformational states of cytochrome P450cam revealed by trapping of synthetic molecular wires. *Journal of molecular biology*, 2004, vol. 344, no. 2, pp. 455–469. doi.org/10.1016/j.jmb.2004.09.046
15. Lee Y. T., Glazer E. C., Wilson R. F., Stout C. D., Goodin D. B. Three clusters of conformational states in p450cam reveal a multistep pathway for closing of the substrate access channel. *Biochemistry*, 2011, vol. 50, no. 5, pp. 693–703. doi.org/10.1021/bi101726d
16. Poulos T. L., Howard A. J. Crystal structures of metyrapone- and phenylimidazole-inhibited complexes of cytochrome P-450cam. *Biochemistry*, 1987, vol. 26, no. 25, pp. 8165–8174. doi.org/10.1021/bi00399a022
17. Lipscomb J. D., Gunsalus I. C. Structural aspects of the active site of cytochrome P-450cam. *Drug Metabolism and Disposition*, 1973, vol. 1, no. 1, pp. 1–5.
18. Angulo J., Díaz I., Reina J. J., Tabarani G., Fieschi F., Rojo J., Nieto P. M. Saturation Transfer Difference (STD) NMR Spectroscopy Characterization of Dual Binding Mode of a Mannose Disaccharide to DC-SIGN. *ChemBioChem*, 2008, vol. 9, no. 14, pp. 2225–2227. doi.org/10.1002/cbic.200800361
19. Prasad S., Mazumdar S., Mitra S. Binding of camphor to *Pseudomonas putida* cytochrome P450cam: steady-state and picosecond time-resolved fluorescence studies. *FEBS letters*, 2000, vol. 477, no. 3, pp. 157–160. doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01745-2
20. Raag R., Martinis S. A., Sligar S. G., Poulos T. L. Crystal structure of the cytochrome P-450CAM active site mutant Thr252Ala. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, no. 48, pp. 11420–11429. doi.org/10.1021/bi00112a008
21. Pearson J. T., Hill J. J., Swank J., Isoherranen N., Kunze K. L., Atkins W. M. Surface plasmon resonance analysis of antifungal azoles binding to CYP3A4 with kinetic resolution of multiple binding orientations. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 20, pp. 6341–6353. doi.org/10.1021/bi0600042
22. Fernando H., Halpert J. R., Davydov D. R. Resolution of Multiple Substrate Binding Sites in Cytochrome P450 3A4: The Stoichiometry of the Enzyme-Substrate Complexes Probed by FRET and Job's Titration. *Biochemistry*, 2006, vol. 45, no. 13, pp. 4199–4209. doi.org/10.1021/bi052491b
23. Davydov D. R., Davydova N. Y., Halpert J. R. Allosteric transitions in cytochrome P450eryF explored with pressure-perturbation spectroscopy, lifetime FRET, and a novel fluorescent substrate, Fluorol-7GA. *Biochemistry*, 2008, vol. 47, no. 43, pp. 11348–11359. doi.org/10.1021/bi8011803
24. Davydov D. R., Rumpfolt J. A. O., Sineva E. V., Fernando H., Davydova N. Y., Halpert J. R. Peripheral ligand-binding site in cytochrome P450 3A4 located with fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Journal of Biological Chemistry*, 2012, vol. 287, no. 9, pp. 6797–6809. doi.org/10.1074/jbc.m111.325654
25. Isin E. M., Guengerich F. P. Multiple sequential steps involved in the binding of inhibitors to cytochrome P450 3A4. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, vol. 282, no. 9, pp. 6863–6874. doi.org/10.1074/jbc.m610346200

Информация об авторах

Бритиков Владимир Владимирович – науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: britikov@iboch.bas-net.by.

Панкратова Елена Вячеславовна – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: pankratovaelena3@gmail.com.

Усанов Сергей Александрович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.

Information about the authors

Britikov Vladimir Vladimirovich – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: britikov@iboch.bas-net.by.

Pankratova Elena Vyacheslavovna – Junior researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: pankratovaelena3@gmail.com.

Usanov Sergey Aleksandrovich – Corresponding Member, D. Sc. (Chemistry), Professor. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.bas-net.by.