

УДК 577.112

# Прямой молекулярный фишинг новых белков-партнеров тромбосансинтазы человека

А. В. Свирид<sup>1</sup>, П. В. Ершов<sup>2</sup>, Е. О. Яблоков<sup>2</sup>, Л. А. Калужский<sup>2</sup>, Ю. В. Мезенцев<sup>2\*</sup>,  
А. В. Флоринская<sup>2</sup>, Т. А. Сушко<sup>1,3</sup>, Н. В. Струшкевич<sup>1</sup>, А. А. Гилеп<sup>1</sup>, С. А. Усанов<sup>1</sup>,  
А. Е. Медведев<sup>2</sup>, А. С. Иванов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, 220141, Беларусь, Минск, ул. Академика В.Ф. Купревича, 5, корп. 2

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Россия, Москва, Погодинская ул., 10, стр. 8

<sup>3</sup>Department of Bioengineering, School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo 108-8639, Japan

\*E-mail: yu.mezentsev@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2017

Принята к печати 11.10.2017

**РЕФЕРАТ** Тромбосансинтаза (TBXAS1) катализирует реакцию изомеризации простагландина H<sub>2</sub> с образованием тромбосана A<sub>2</sub> – аутокринного и паракринного фактора многих клеток. Высокая активность и метастабильность этих производных арахидоновой кислоты позволяют предположить существование надмолекулярных структур, участвующих в регуляции биосинтеза и адресной транслокации тромбосана к рецептору. Целью настоящей работы была идентификация белков-партнеров TBXAS1 из лизата ткани печени человека с использованием комплексного подхода, основанного на применении технологии прямого молекулярного фишинга, LC-MS/MS-идентификации белков и валидации белок-белкового взаимодействия с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Идентифицированы 12 потенциальных белков-партнеров TBXAS1, в том числе компоненты, регулирующие организацию цитоскелета (BBIP1 и ANKMY1), компоненты коагуляционного каскада крови (SERPINA1, SERPINA3, APOH, FGA и FN1) и фермент метаболизма ксенобиотиков и эндогенных биорегуляторов (CYP2E1). SPR-валидация на биосенсоре Biacore 3000 подтвердила эффективность взаимодействия CYP2E1 (фермент метаболизма простагландина H<sub>2</sub> до 12-ННТ/проантагониста тромбосана A<sub>2</sub>) с TBXAS1 ( $K_d = (4.3 \pm 0.4) \times 10^{-7}$  М). Показательно, что аффинность комплексообразования TBXAS1 · CYP2E1 пятикратно возрастает в присутствии изатина (индол-2,3-дион, низкомолекулярный непептидный эндогенный биорегулятор, продукт CYP2E1). Полученные нами результаты позволяют предположить важность взаимодействия данных гемопротеинов в регуляции биосинтеза эйкозаноидов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** белки-партнеры, изатин, поверхностный плазмонный резонанс, прямой молекулярный фишинг, тромбосансинтаза (CYP5A1, TBXAS1), цитохром P450.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ББВ – белок-белковые взаимодействия; SPR (surface plasmon resonance) – поверхностный плазмонный резонанс;  $k_{on}$  – константа скорости ассоциации;  $k_{off}$  – константа скорости диссоциации;  $K_d$  – равновесная константа диссоциации.

## ВВЕДЕНИЕ

Тромбосансинтаза человека (TBXAS1) входит в суперсемейство цитохромов P450 (CYP5A1), однако, по своей функции она отличается от «классических» цитохромов P450, которые катализируют разнообразные монооксигеназные реакции при участии редокс-партнеров в качестве донора электронов [1]. TBXAS1 катализирует реакцию изомеризации простагландина H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), не требующую редокс-парт-

неров и приводящую к образованию тромбосана A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) [2]. Последний, выступая в качестве паракринного регулятора, является важным медиатором агрегации тромбоцитов и сокращения стенок кровеносных сосудов, который способствует повышению артериального давления.

Помимо изомеризации PGH<sub>2</sub> TBXAS1 катализирует альтернативную реакцию превращения PGH<sub>2</sub>, осуществляя его расщепление на 12-гидрокси-

5,8,10-гептатриеновую кислоту (12-ННТ) и малоновый диальдегид (MDA) [3]. В настоящее время нет точных сведений о функциональной роли MDA и 12-ННТ. MDA может образовывать аддукты с аминокислотами белков или полярных групп фосфолипидов и таким образом играть определенную роль в молекулярных механизмах возникновения атеросклероза, рака и ряда генетических заболеваний [4, 5]. 12-ННТ и ее метаболиты могут блокировать действие лейкотриеновых рецепторов и выступать в качестве частичного антагониста ТХА<sub>2</sub> за счет увеличения синтеза простаглицина и антагонистического воздействия на рецептор тромбосана (ТХАР) [6, 7]. Нельзя исключить, что TBXAS1 способна выполнять и другие функции, катализируя типичные для цитохромов P450 монооксигеназные реакции с участием редокс-партнеров.

Первоначально TBXAS1 выделили из тромбоцитов человека [3] и легких свиньи [8]. TBXAS1 преимущественно синтезируется в протромбоцитах и стволовых гемопоэтических клетках-предшественниках моноцитов, лейкоцитов и макрофагов, где ТХА<sub>2</sub> участвует в регуляции дифференцировки [9]. Синтез TBXAS1 обнаружен также в клетках легких, почек, желудка, кишечника, селезенки, тимуса, поджелудочной железы и печени [10]. ТХАР, относящийся к классу сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR), представлен в большом количестве тканей (в легком, селезенке, печени, матке, плаценте, аорте, сердечной мышце, кишечнике, тимусе, почках, спинном и головном мозге) [11]. Это может свидетельствовать о других возможных функциях TBXAS1 или об универсальности механизмов реализации его основной функции.

Один из подходов к выяснению неизвестных функций белка основан на изучении его взаимодействия с другими белками, функции которых уже известны [12]. В основе этого подхода лежит концепция о том, что функции взаимодействующих белков-партнеров должны либо быть взаимосвязаны, либо образовывать единый белковый комплекс, выполняющий последовательные взаимосвязанные функции. Субстрат и продукт реакции TBXAS1 – крайне короткоживущие и активные липофильные молекулы, диффузный транспорт которых затруднен, а рецептор к ТХА<sub>2</sub> находится на внешней стороне плазматической мембраны. Это предполагает существование специфического транспортного механизма, или, вероятнее всего, взаимодействия с взаимосвязанными белковыми комплексами, ответственными за перенос этих короткоживущих соединений.

На сегодняшний день имеется крайне скудная информация об экспериментально подтвержденных белок-белковых взаимодействиях (ББВ) с уча-

тием TBXAS1. В базе данных BioGRID есть только две записи о зарегистрированных ББВ с участием TBXAS1 (<https://thebiogrid.org/112778/summary/homo-sapiens/tbxas1.html?sort=bait>): (1) взаимодействие с эукариотическим фактором элонгации 1 α-2 (EEF1A2) со ссылкой на неопубликованные данные [13]; (2) взаимодействие с убиквитином С (UBC) [14]. Наиболее вероятно, что оба этих взаимодействия неспецифические, так как в той же базе BioGRID зарегистрировано 132 возможных взаимодействия EEF1A2 со 124 партнерами и 2332 взаимодействия UBC с 1440 партнерами. В 2016 году Meling D.D. в реферате своей диссертации (Protein-protein interactions and mechanistic insights for CYP2J2 and TBXAS1) привел неопубликованные данные о взаимодействии TBXAS1 с цитохромом-P450-редуктазой (CPR) (<http://hdl.handle.net/2142/90774>), что, несомненно, может быть функционально значимым, так как CPR является известным белком-партнером микросомальных цитохромов P450.

Ранее для поиска новых белков-партнеров, взаимодействующих с целевым белком, мы разработали комплексный подход, основанный на применении технологии прямого молекулярного фишинга на аффинном сорбенте с иммобилизованным целевым белком (или пептидом) в качестве лиганда, масс-спектрометрической идентификации выделенных белков и валидации потенциальных ББВ с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) [15–17].

Цель настоящей работы состояла в поиске возможных новых белков-партнеров TBXAS1 в лизате ткани печени человека с использованием данного подхода. В результате на аффинной колонке с иммобилизованной TBXAS1 с помощью LC-MS/MS-анализа были выделены и идентифицированы 12 потенциальных белков-партнеров TBXAS1, один из которых оказался цитохромом P450 (CYP2E1). Валидация методом SPR подтвердила его взаимодействие с иммобилизованной на оптическом чипе TBXAS1 и выявила еще один потенциальный белок-партнер (CYP11B2). Контрольные SPR-эксперименты с пятью другими цитохромами P450 (CYP2C19, CYP11A1, CYP11B1, CYP3A4, CYP3A5) дали отрицательный результат, что говорит о высокой специфичности выявленных ББВ. Поскольку CYP2E1 участвует в метаболизме различных производных индола [18], то дополнительно исследовали возможное влияние известного эндогенного биорегулятора изатина (индол-2,3-диона) [19–22] на взаимодействие CYP2E1 и CYP11B2 с TBXAS1. Обнаружили, что изатин в 5 раз увеличивает аффинность взаимодействия TBXAS1 · CYP2E1 и не влияет на взаимодействие TBXAS1 · CYP11B2.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Биоматериалы

В работе использовали образцы ткани печени человека, полученные от фирмы ILSbio, LLC ([www.ilsbio.com](http://www.ilsbio.com)). Высокоочищенные (> 95% по данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE)) препараты рекомбинантных белков: TBXAS1, цитохромы P450 – лимонен-6-монооксигеназа (CYP2C19), стероид-20,22-лиаза (CYP11A1), стероид-11 $\beta$ -гидроксилаза (CYP11B1), альдостеронсинтаза (CYP11B2), таурохенодезоксихолат-6 $\alpha$ -монооксигеназа (CYP3A4), гидроксилаза циклических углеводов (CYP3A5), 4-нитрофенол-2-гидроксилаза (CYP2E1), микросомальный цитохром b<sub>5</sub> (CYP5A), NADPH-цитохром-P450-редуктаза (CPR), NADPH-аденодоксинредуктаза (ADR), аденодоксин (ADX), феррохелатаза (FECH), SMAD4, RAB27B – получены в Институте биоорганической химии НАН Беларуси путем молекулярного клонирования и гетерологической экспрессии в бактериальной системе (*E. coli*) с последующей очисткой с помощью металл-аффинной и ионообменной хроматографии [23, 24]. Препарат ретинолсвязывающего белка 4 (RBP4) получен от Cayman chemical (США).

### Лизат ткани печени человека

Лизат получали путем гомогенизации 100 мг образца в ступке Поттера с добавлением 1 мл лизирующего буфера CellLytic Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent (Sigma, США) и 10 мкл коктейля ингибиторов протеаз (Sigma, США). После центрифугирования при 13400 *g* и 4°C в течение 25 мин собирали супернатант, добавляли 25% глицерина и хранили при температуре –80°C. Содержание общего белка в пробах лизата, определенное спектрофотометрически по методу Бредфорда, составляло 10–20 мг/мл.

### Прямой молекулярный фишинг

Аффинный сорбент с иммобилизованной TBXAS1 в качестве белка-наживки получали путем ковалентного связывания белка на CNBr-сефарозе 4B (GE Healthcare, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Установлено, что оптимальным для связывания используемого препарата тромбосансинтазы с сорбентом было соотношение 0.5 мг белка/1 г сорбента. Инактивацию оставшихся активных групп сорбента выполняли путем его инкубации в буфере, содержащем 100 мМ Трис-HCl (pH 7.4), 150 мМ NaCl. Прямой молекулярный фишинг осуществляли в оригинальной микроколонке (объем 200 мкл), заполненной аффинным сорбентом. В контрольных экспериментах использовали аналогич-

ную микроколонку, заполненную «пустой» (без белка-наживки) инактивированной CNBr-сефарозой 4B. В качестве рабочего буфера использовали буфер HBS-EP+ (10 мМ HEPES (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 3 мМ EDTA, 0.05% Tween 20), пропускаемый через микроколонку со скоростью потока 50 мкл/мин при температуре 15°C. Хроматографическое разделение проводили с использованием системы АКТА Purifier 10 (GE Healthcare, США). Аффинное выделение белков-партнеров тромбосансинтазы выполняли, пропуская через колонку 2 мл лизата (0.5 мг/мл белка), разбавленного в 2 раза рабочим буфером, в течение 80 мин. Связавшиеся на сорбенте белки элюировали 4% раствором HCOOH (pH 2.5) при скорости потока 50 мкл/мин в течение 100 мин. Содержание общего белка в элюатах, определенное по методу Бредфорда, составляло 25–35 мкг/мл (среднее 30 мкг/мл). Эксперименты по аффинному выделению потенциальных белков-партнеров TBXAS1 повторяли 3 раза.

### LC-MS/MS-анализ

Для масс-спектрометрической идентификации белков выполняли специальную пробоподготовку. Из каждой хроматографической фракции отбирали аликвоту, содержащую 30 мкг общего белка, и подвергали стандартной процедуре трипсинолиза с предварительным алкилированием и восстановлением сульфгидрильных групп белков. Все процедуры выполняли в концентраторах Vivaspin 500 Centrifugal Concentrator, 10 кДа MWCO (GE Healthcare, США) по методу FASP [25]. Для трипсинолиза белков использовали лиофилизированный препарат трипсина из поджелудочной железы свиньи (активность 15600 Ед/мг, кат. номер V5111, Promega, США). Масс-спектрометрический анализ образцов выполняли в трех технических повторях с использованием хроматографа Agilent 1200 и масс-детектора Agilent серии 6300 с ионной ловушкой Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, США). Разделение пептидов выполняли на обращенно-фазовой HPLC-колонке ZORBAX Extend-C18 (2.1 × 150 мм, 1.8 мкм) (Agilent Technologies, США), в градиенте растворителя А (0.2% раствор муравьиной кислоты в воде) и растворителя В (0.2% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле) в течение 55 мин при скорости тока 350 мкл/мин. Объем образца, наносимого на колонку, составлял 15 мкл (~ 7–8 мкг материала). Характер градиента был следующим: от 0 до 20% растворителя В за 5 мин, от 20 до 80% за 40 мин, от 80 до 95% за 5 мин и 95%, 5 мин. Температура колонки – 50°C. Масс-спектры получали в режиме положительной ионизации (APESI-ионизация) со сле-

дующими параметрами: температура газа 400°C, скорость тока газа 9 л/мин, напряжение на капилляре 2 кВ, напряжение на фрагментаторе 360 В. Масс-анализатор работал в авто-MS/MS-режиме со следующими параметрами: диапазон  $m/z$  от 50 до 2200  $m/z$ , энергию фрагментации рассчитывали по следующим формулам  $(3.1(m/z)/100 + 1.0)V$  для  $z = 2$  и  $(3.6(m/z)/100 - 4.8)V$  для  $z \geq 3$ . Белки идентифицировали с помощью программы Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) с использованием базы данных SwissProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)). Использовали следующие параметры поиска: протеолитический фермент трипсин, допустимые отклонения по массе моноизотопных пептидов  $\pm 2.6$  Да, допустимые отклонения MS/MS  $\pm 0.6$  Да, число допустимых пропусков сайтов расщепления трипсином – 2, переменные модификации – «окисленный метионин», фиксированные модификации – «карбамидометил». В результирующий список достоверно обнаруженных белков включали только те белки, идентифицируемые при трех технических повторах со значимостью 0.01 и Mascot Score > 50.

#### Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

Анализ ББВ выполняли на четырехканальном оптическом биосенсоре Biacore 3000 (GE Healthcare, США), работающем на эффекте поверхностного плазмонного резонанса под управлением компьютерной программы Biacore Control Software v. 1.0. Сигналы биосенсора регистрировали в резонансных единицах RU (1 RU соответствует связыванию 1 пг белка на поверхности оптического чипа). Значения равновесных констант диссоциации ( $K_d$ ), констант скорости образования ( $k_{on}$ ) и распада ( $k_{off}$ ) комплексов рассчитывали с помощью программного комплекса BiaEvaluation v. 4.1.

Иммобилизацию TBXAS1 осуществляли путем формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM5 и свободными аминоклассами белка. С этой целью использовали набор Amine Coupling Kit (GE Healthcare, США), а инъекцию образца TBXAS1 (50 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 5.0) выполняли со скоростью 5 мкл/мин в течение 20 мин. Уровень иммобилизации TBXAS1 в рабочем канале оптического биосенсора в среднем составлял 7500 RU (7.5 нг/мм<sup>2</sup>).

Регистрацию взаимодействий тестовых белков с иммобилизованной TBXAS1 осуществляли в режиме реального времени путем инъекций образцов белков в диапазоне концентраций от 50 нМ до 5 мкМ сначала через контрольный (без белка) и рабочий (с иммобилизованной TBXAS1) каналы оптического биосенсора в течение 10 мин при скорости по-

тока 5 мкл/мин. После каждого измерения выполняли регенерацию поверхности оптического чипа путем инъекции буфера, содержавшего 2 М NaCl и 0.4% CHAPS, в течение 30 с при скорости потока 20 мкл/мин. Все измерения выполняли не менее 4 раз, что обеспечивало достаточную точность и воспроизводимость результатов (значение CV было менее 10%). В экспериментах по оценке возможного влияния непептидного низкомолекулярного эндогенного биорегулятора изатина (2,3-диоксоиндола) на ББВ с участием TBXAS1 к образцам белков-аналитов добавляли изатин в конечной концентрации 100 мкМ и инкубировали смесь в течение 15 мин.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

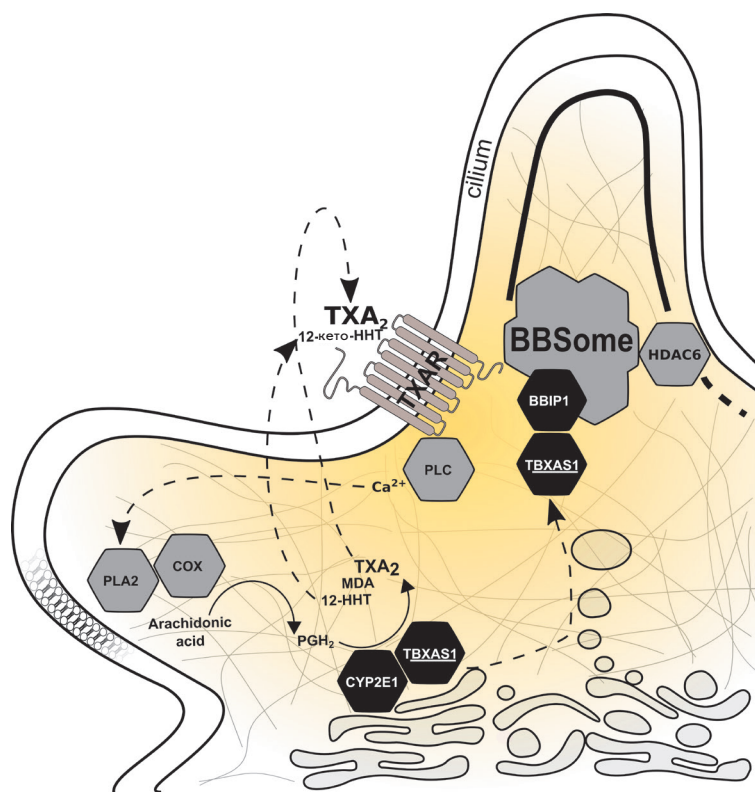
Для выявления новых белков-партнеров TBXAS1 использовали образцы ткани печени, поскольку в них экспрессируется как целевой белок, так и рецептор к ТХА<sub>2</sub>. Комплексный подход, основанный на технологии прямого молекулярного фишинга на аффинном сорбенте с иммобилизованным на CNBr-сефарозе 4В целевым белком, масс-спектрометрической идентификации выделенных белков и валидации ББВ с SPR, позволил выделить и идентифицировать 12 потенциальных белков-партнеров TBXAS1 из лизата ткани печени человека (таблица).

На сегодняшний день в научной литературе отсутствует какая-либо информация о взаимодействии этих белков с TBXAS1. Однако можно сделать некоторые предположения об их возможной функциональной взаимосвязи с TBXAS1.

Например, белок BBIP1 (компонент BBSome, транспортного белкового комплекса ресничек) принимает участие в регуляции стабильности клеточно-цитоскелета [26, 27].

Информация о ANKMY1 существует только на уровне транскрипта. Тем не менее, в его структуре выделяют анкириновые повторы, которые образуют один из наиболее распространенных интерфейсов для ББВ. Эти повторы обнаружены в белках, которым свойственны разнообразные функции [28]. Исходя из этого мы предполагаем, что анкириновые повторы ANKMY1 могут специфически узнавать определенные структурные мотивы TBXAS1, обеспечивая взаимодействия этих белков.

Вместе с тем, необходимо отметить, что белки, идентифицированные в результате прямого молекулярного фишинга, могут рассматриваться только в качестве потенциальных партнеров TBXAS1, так как из-за особенностей данной технологии из лизата могут быть выделены не только реальные белки-партнеры, но и «выловленные» вместе с ними посторонние белки, находящиеся в составе сложных надмолекулярных комплексов или мицелл [17]. В по-



**Рис. 1.** Схематическое представление системы биосинтеза  $\text{TXA}_2$ , дополненное полученными нами экспериментальными данными. PLC – фосфолипаза C, PLA2 – фосфолипаза A2, COX – циклооксигеназа. Биосинтез  $\text{TXA}_2$  начинается с высвобождения арахидоновой кислоты из фосфолипидов мембраны с помощью PLA2. Затем COX катализирует реакцию превращения арахидоновой кислоты в простагландин  $\text{H}_2$ , который затем метаболизируется TBXAS1 с образованием  $\text{TXA}_2$ , 12-ННТ и MDA. Параллельно с этим простагландин  $\text{H}_2$  превращается CYP2E1 в 12-ННТ и MDA.  $\text{TXA}_2$ , связываясь с TXAR, вызывает передачу сигнала по инозитолфосфатному пути с активацией PLC и мобилизацией внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , что оказывает стимулирующее действие на PLA2. 12-ННТ под действием 15-гидроксипростагландина дегидрогеназы образует 12-кето-ННТ, оказывающий частичный антагонистический эффект на TXAR. TBXAS1 предположительно взаимодействует с BBIP1, который является компонентом белкового транспортного комплекса ресничек (BBSome). BBIP1, в свою очередь, способен влиять на стабильность микротубулинового цитоскелета, опосредованно ингибируя HDAC6 (гистондеацетилазу 6)

лученном нами «улове» (таблица) к подобным белкам можно отнести SERPINA1, SERPINA3, APOH, FGA и FN1, которые входят в каскад свертывания крови [29, 30], а также сывороточные белки HP, SAA1, CP, которые могут иметь высокий уровень неспецифической сорбции.

Особый интерес представляет присутствие в списке «улова» белка, CYP2E1, относящегося к классу цитохромов P450. Функциональная связь CYP2E1 с TBXAS1 может иметь важное значение в контексте взаимодополняющих ферментативных реакций превращения общих субстратов. Как известно, для CYP2E1 характерны широкая субстратная специфичность и широкий профиль тканевой локализации, включая печень [31]. Например, CYP2E1 способен окислять арахидоновую кислоту (посредством  $\omega$ -1-гидроксилирования), а также простагландин  $\text{H}_2$  [32] до побочных метаболитов, которые, в свою очередь, образуются в реакциях изомеризации простагландина  $\text{H}_2$  в тромбоксан  $\text{A}_2$ . Дальнейший метаболит одного из продуктов реакции – 12-кето-ННТ – способен влиять на эффекты  $\text{TXA}_2$  за счет увеличения продукции простагландина и антагонистического действия на TXAR [4, 5]. Таким образом, совместная локализация TBXAS1, осуществляющей синтез тромбоксана  $\text{A}_2$ , и CYP2E1, могла бы служить

дополнительным механизмом регуляции эффективности ферментативных реакций превращения общих субстратов. С другой стороны, следствием олигомеризации разных цитохромов P450 может быть также изменение каталитических параметров ферментативных реакций, например, средства ферментов к субстрату [33]. Схематическое представление системы биосинтеза  $\text{TXA}_2$ , дополненное полученными нами экспериментальными данными, представлено на рис. 1.

Возможность образования гетеромерного комплекса TBXAS1/CYP2E1 подтверждена в прямых экспериментах с использованием технологии SPR и иммобилизованной на оптическом чипе CM5 TBXAS1 (рис. 2). Для проверки специфичности взаимодействий TBXAS1 и CYP2E1 проведены контрольные SPR-эксперименты по регистрации возможных взаимодействий с тромбоксансинтазой других белков-аналитов: микросомальных (CYP2C19, CYP3A4, CYP3A5) и митохондриальных (CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2) цитохромов P450, известных белков-партнеров цитохромов P450 (CYB5A, CPR, ADR, ADX), а также ряда белков, не имеющих отношения к монооксигеназным системам цитохромов P450 (FECH, SMAD4, RAB27B, RBP4) (рис. 3). Все остальные белки, за исключением CYP11B2, даже в микро-

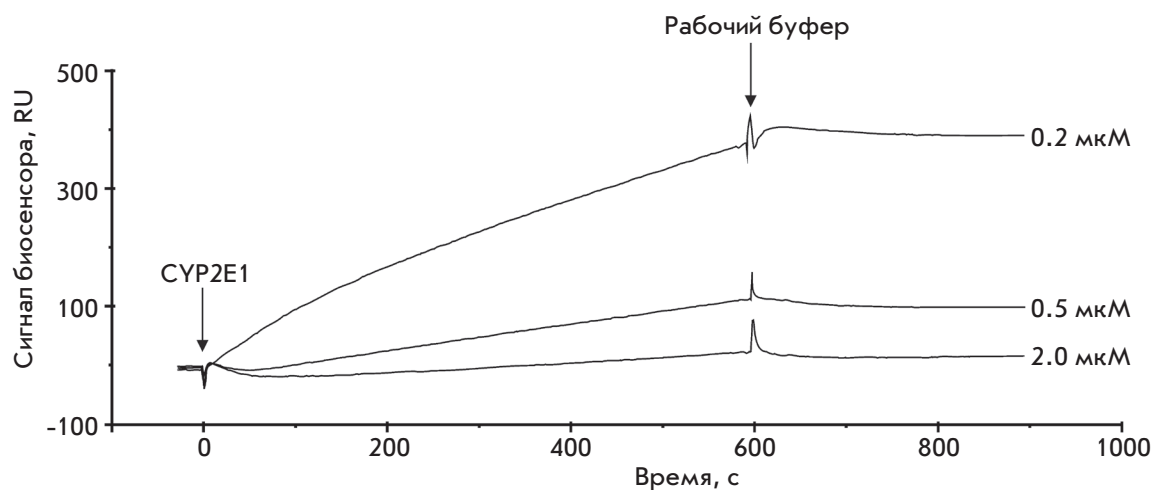


Рис. 2. Типичные серии сенсограмм взаимодействия CYP2E1 в разных концентрациях с иммобилизованной на оптическом чипе CM5 TBXAS1

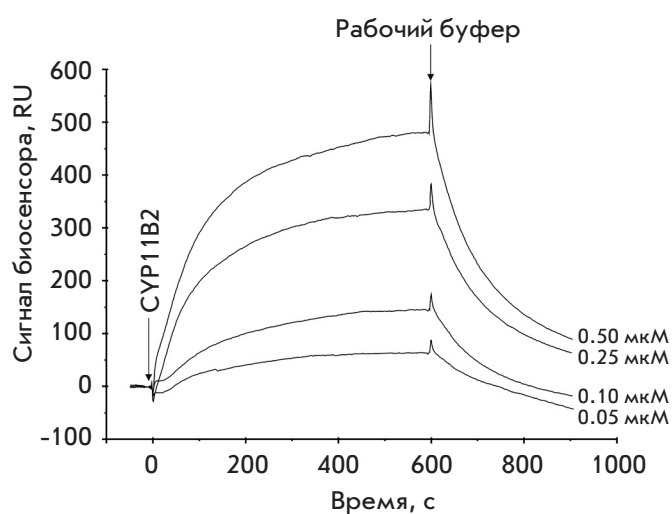


Рис. 3. Типичные серии сенсограмм взаимодействия CYP11B2 в разных концентрациях с иммобилизованной на оптическом чипе CM5 TBXAS1

молярных концентрациях не связывались с иммобилизованной на оптическом чипе TBXAS1.

Аналогичный контрольный эксперимент с использованием TBXAS1 в качестве белка-аналита показал отсутствие процесса ее димеризации или олигомеризации. Таким образом, можно с уверенностью утверждать, что взаимодействие CYP2E1 и CYP11B2 с TBXAS1 является высокоспецифичным.

Вычисленные значения  $K_d$  образования комплексов TBXAS1 · CYP11B2 и TBXAS1 · CYP2E1 составили  $(6.9 \pm 0.3) \times 10^{-7}$  М и  $(4.3 \pm 0.4) \times 10^{-7}$  М соответственно. Эти значения сопоставимы с  $K_d$  комплексов различных цитохромов P450 с их функциональными партнерами (CPR, CYP5A, ADX) [23, 34–37]. Важно отметить, что при небольшом различии в аффинности комплексообразования ( $K_d$  различаются при-

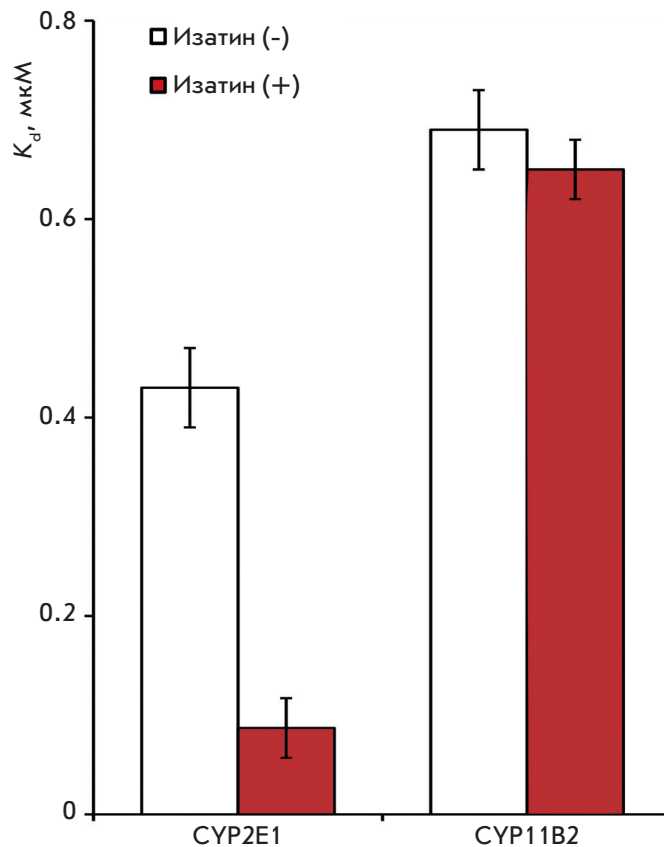


Рис. 4. Диаграмма значений равновесных констант диссоциации комплексов ( $K_d$ ) TBXAS1 · CYP2E1 и TBXAS1 · CYP11B2 в отсутствие и в присутствии 100 мкМ изатина;  $M \pm m$ ,  $n = 3$

мерно в 2 раза) взаимодействия TBXAS1 · CYP11B2 и TBXAS1 · CYP2E1 сильно отличаются по кинетическим параметрам: образование и распад комплекса TBXAS1 · CYP2E1 происходят примерно на порядок медленнее, чем TBXAS1 · CYP11B2. Константы скорости образования комплекса ( $k_{on}$ ) отличаются в 10

Масс-спектрометрическая идентификация белков в элюатах с хроматографических микроколонок, наполненных аффинным сорбентом

№	Ген	Белок	М.м., Да	Входной номер <sup>а</sup>	Score <sup>б</sup>	Пептиды <sup>в</sup>	emPAI <sup>г</sup>
Сорбент с иммобилизованной тромбоксансинтазой (только опыт). Потенциальные белки-партнеры тромбоксансинтазы (TBXAS1)							
1	FGA	Fibrinogen alpha chain	95656	P02671	97	19 (2)	0.04
2	FN1	Fibronectin	266052	P02751	95	14 (2)	0.01
3	CP	Ceruloplasmin	122983	Q24478	85	10 (5)	0.03
4	SERPINA3	Alpha1-antichymotrypsin	47792	P01011	67	9 (3)	0.08
5	SAA1	Serum amyloid A1 protein	13581	P0DJI8	67	7 (3)	0.29
6	CYP2E1	Cytochrome P450 2E1	56849	P05181	61	11 (4)	0.12
7	ANKMY1	Ankyrin repeat and MYND domain-containing protein 1	107101	Q9P2S6	59	25 (7)	0.03
8	ACTB	Actin, cytoplasmic 1	42052	P60709	56	17 (2)	0.13
9	BBIP1	BBSome-interacting protein 1	10557	A8MTZ0	54	10 (4)	0.38
10	SERPINA1	Alpha 1-antitrypsin	46878	P01009	50	3 (3)	0.13
11	APOH	Beta2-glycoprotein 1	39584	P02749	52	3 (3)	0.09
12	HP	Haptoglobin	45861	Q61687	50	42 (6)	0.21
Сорбент без иммобилизации белка (только контроль)							
1	ACY1	Aminoacylase-1	46084	Q03154	59	17 (3)	0.08
2	ADH1A	Alcohol dehydrogenase 1A	40745	P07327	189	85 (19)	0.42
3	SLC25A4	ADP/ATP translocase 1	33271	P12235	59	16 (5)	0.24
4	SLC25A5	ADP/ATP translocase 2	33059	P05141	71	27 (5)	0.11
5	MAOB	Amine oxidase [flavin-containing] B	59238	P27338	147	31 (8)	0.20
6	ASL	Argininosuccinate lyase	51910	P04424	89	9 (3)	0.07
7	ASS1	Argininosuccinate synthase	46786	P00966	59	48 (6)	0.17
8	ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	56525	P25705	108	27 (4)	0.07
9	ATP5C1	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	33032	P36542	95	16 (4)	0.24
10	CALR	Calreticulin	48283	P27797	68	10 (4)	0.25
11	HSPD1	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	61187	P10809	126	28 (7)	0.13
12	CPS1	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia], mitochondrial	165975	P31327	249	119 (27)	0.17
13	DEFA1	Neutrophil defensin 1	10536	P59665	58	8 (5)	0.38
14	FBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1	37218	P09467	78	4 (3)	0.10
15	FABP1	Fatty acid-binding protein, liver	14256	P07148	184	29 (17)	1.08
16	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36201	P04406	169	23 (5)	0.22
17	AGL	Glycogen debranching enzyme	176819	P35573	77	18 (7)	0.06
18	SHMT1	Serine hydroxymethyltransferase, cytosolic	53619	P34896	88	16 (5)	0.14
19	HSPA5	78 kDa glucose-regulated protein	72402	P11021	75	19 (4)	0.11
20	GSTA1	Glutathione S-transferase A1	25672	P08263	94	74 (13)	1.29
21	IDH1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	46915	O75874	274	15 (9)	0.17
22	IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	51333	Q8IQA7	105	10 (4)	0.15
23	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	36950	P00338	240	9 (8)	0.21
24	NONO	Non-POU domain-containing octamer-binding protein	54311	Q15233	102	27 (6)	0.14
25	PGM1	Phosphoglucomutase-1	61696	P36871	120	10 (6)	0.12
26	SFPQ	Splicing factor, proline- and glutamine-rich	76216	P23246	106	27 (7)	0.10
27	ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial	45456	P24752	60	11 (4)	0.17
28	TPI1	Triosephosphate isomerase	31057	P60174	150	12 (4)	0.26

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

29	UGT2B10	UDP-glucuronosyltransferase 2B10	61190	P36537	55	8 (3)	0.06
30	UGP2	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	57076	Q16851	72	15 (4)	0.13
Контроль (К) и опыт (О)							
1	UGP2	Alcohol dehydrogenase 1B	40684	P00325	408	117 (34)	1.02
					90	53 (6)	0.30
2	ADH4	Alcohol dehydrogenase 4	41108	P08319	222	36 (16)	0.42
					85	13 (8)	0.30
3	ALB	Serum albumin	71317	P02768	2790	360 (150)	1.90
					959	186 (50)	0.66
4	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase, mitochondrial	56859	P05091	400	33 (15)	0.29
					94	7 (3)	0.07
5	ALDOB	Fructose-bisphosphate aldolase B	39961	P05062	167	25 (8)	0.31
					220	28 (8)	0.09
6	APOA1	Apolipoprotein A-I	30759	P02647	98	12 (6)	0.42
					53	25 (6)	0.59
7	ATP5F1	ATP synthase subunit b, mitochondrial	28947	P24539	192	17 (10)	0.45
					97	13 (5)	0.28
8	ATP5L	ATP synthase subunit g, mitochondrial	11421	O75964	265	7 (6)	0.35
					157	5 (5)	0.35
9	DCXR	L-xylulose reductase	26182	Q7Z4W1	194	27 (6)	0.15
					161	8 (5)	0.15
10	DECR1	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	36330	Q16698	250	24 (11)	0.22
					222	13 (8)	0.10
11	HSD17B4	Peroxisomal multifunctional enzyme type 2	80092	P51659	1754	179 (87)	1.26
					112	16 (5)	0.09
12	SORB	Sorbitol dehydrogenase	38927	Q00796	171	17 (13)	0.44
					73	7 (4)	0.10
13	CES1	Liver carboxylesterase 1	62766	P23141	88	28 (4)	0.06
					83	20 (4)	0.06
14	HBA1	Hemoglobin subunit alpha	15305	P69905	70	48 (10)	2.90
					82	16 (6)	0.25
15	HBB	Hemoglobin subunit beta	16102	P68871	153	30 (11)	0.54
					222	29 (14)	0.54
16	HMGCS2	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, mitochondrial	57113	P22791	249	26 (13)	0.37
					98	10 (3)	0.07
17	HRG	Histidine-rich glycoprotein	60510	P04196	60	14 (6)	0.13
					52	9 (5)	0.13
18	PHB2	Prohibitin-2	33276	Q99623	107	11 (4)	0.11
					99	7 (3)	0.11
19	ACAA2	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	42354	P42765	82	20 (6)	0.18
					71	15 (3)	0.18
20	TF	Serotransferrin	79294	P02787	138	20 (6)	0.15
					142	22 (7)	0.20
21	SLC25A1	Tricarboxylate transport protein, mitochondrial	34333	P53007	70	9 (4)	0.23
					54	10 (3)	0.23

<sup>a</sup> – Входящие номера в базе данных Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

<sup>b</sup> – Показатель надежности определения пептидов масс-спектрометрией (MASCOT score).

<sup>c</sup> – Число пептидов MASCOT; число уникальных пептидов (в скобках).

<sup>d</sup> – emPAI – Exponentially Modified Protein Abundance Index.

Названия идентифицированных белков приведены в том виде, в котором они фигурируют в базе данных Uniprot, использованной для их идентификации.



раз, а константы скорости распада комплекса ( $k_{\text{off}}$ ) – в 15 раз.

Обнаружение специфического комплексообразования ТВХАС1 · СУР11В2 оказалось действительно новым и неожиданным результатом, ибо СУР11В2 отсутствовал в качестве идентифицированного белка-партнера как в контроле, так и в опыте при молекулярном фишинге из лизата ткани печени (таблица). Эти данные вполне сопоставимы, не обусловлены появлением ложноотрицательного результата молекулярного фишинга и могут быть объяснены с точки зрения тканеспецифичного профиля экспрессии СУР11В2 (преимущественная экспрессия в ткани надпочечников), что следует из информации в открытых интернет-ресурсах Proteinatlas (<http://www.proteinatlas.org>) и Genecards (<http://www.genecards.org>) и публикации [38]. О функциональных последствиях данного ББВ и его причинах пока говорить затруднительно, поэтому в настоящей работе приведен только сам факт экспериментального подтверждения прямого взаимодействия ТВХАС1 с СУР11В2.

Известно, что одним из субстратов ряда цитохромов Р450 (СУР2А6, СУР2С19 и СУР2Е1), ответственных за метаболизм разнообразных ксенобиотиков, является индол, который окисляется до изатина [18]. Изатин – эндогенный биорегулятор с широким спектром биологических и фармакологических активностей, которые реализуются при его взаимодействии с многочисленными внутриклеточными изатинсвязывающими белками [19–22, 39–41]. Поскольку среди белков, взаимодействующих с ТВХАС1, оказался цитохром Р450 СУР2Е1, мы предположили, что изатин может влиять на образование комплекса ТВХАС1 · СУР2Е1. Для проверки данной гипотезы проведен SPR-анализ взаимодействия СУР2Е1 с иммобилизованной на оптическом чипе ТВХАС1 в отсутствие и в присутствии изатина. В качестве контроля использовали другую пару белков – ТВХАС1 · СУР11В2. Обнаружили, что изатин действительно влияет на формирование комплекса ТВХАС1 · СУР2Е1, увеличивая аффинность взаи-

модействия в 5 раз, и при этом не действует на взаимодействие ТВХАС1 · СУР11В2 (рис. 4). Эффект пятикратного увеличения аффинности комплексообразования ТВХАС1 · СУР2Е1 в присутствии изатина обусловлен как увеличением скорости образования комплекса (величина  $k_{\text{on}}$  выросла в 2 раза), так и снижением скорости его распада ( $k_{\text{off}}$  уменьшилась 2.5 раза).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием комплексного прямого молекулярного фишинга с последующей масс-спектрометрической идентификацией из лизата ткани печени человека выделены 12 потенциальных белков-партнеров тромбосансинтазы, относящихся к белкам цитоскелета, коагуляционного каскада крови и цитохромов Р450. С помощью SPR-технологии впервые показано прямое взаимодействие двух цитохромов Р450 (СУР2Е1 и СУР11В2) с тромбосансинтазой. Впервые показано, что аффинность образования комплекса ТВХАС1 · СУР2Е1 пятикратно увеличивается в присутствии низкомолекулярного непептидного эндогенного биорегулятора изатина (2,3-диоксоиндола). Полученные результаты дают основание предполагать наличие у ТВХАС1 других функций, таких, как участие в функционировании цитоскелета и регуляции биосинтеза биологически активных молекул. ●

*Работы по получению рекомбинантных белков выполнены в ИБОХ НАН Беларуси при поддержке БРФФИ (грант № X16P–062). Работы по молекулярному фишингу и идентификации потенциальных белков-партнеров тромбосансинтазы были выполнены в ИБМХ при поддержке РФФИ (грант № 16–54–00097 Бел\_а), а работы по исследованию влияния изатина на ББВ с участием ТВХАС1 – при поддержке РНФ (грант № 16-14-10327). LC-MS/MS-идентификация белков выполнена в ЦКП «Протеом человека» при ИБМХ.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waterman M.R., Pikuleva I.A. Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, Weinheim, Germany: Wiley-VCH., 2006. 716 p.
2. Hamberg M., Svensson J., Samuelsson B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. № 8. P. 2994–2998.
3. Haurand M., Ullrich V. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 15059–15067.
4. Uchida K. // Trends Cardiovasc. Med. 1999. V. 9. № 5. P. 109–113.
5. Chaudhary A.K., Nokubo M., Reddy G.R., Yeola S.N., Morrow J.D., Blair I.A., Marnett L.J. // Science. 1994. V. 265. № 5178. P. 1580–1582.

6. Sadowitz P.D., Setty B.N., Stuart M. // Prostaglandins. 1987. V. 34. № 5. P. 749–763.
7. Ruf A., Mundkowski R., Siegle I., Hofmann U., Patscheke H., Meese C.O. // Br. J. Haematol. 1998. V. 101. № 1. P. 59–65.
8. Shen R.F., Tai H.H. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 25. P. 11592–11599.
9. Ullrich V., Nüsing R. // Stroke. 1990. V. 21. № 12 Suppl. P. IV 134–138.
10. Nüsing R., Sauter G., Fehr P., Dürmüller U., Kasper M., Gudat F., Ullrich V. // Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol. 1992. V. 421. № 3. P. 249–254.
11. Huang J.-S., Ramamurthy S.K., Lin X., Le Breton G.C. // Cell. Signal. 2004. V. 16. № 5. P. 521–533.

12. Ivanov A.S., Zgoda V.G., Archakov A.I. // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2011. V. 37. № 1. P. 4–16.
13. Huttlin E.L., Ting L., Bruckner R.J., Gebreab F., Gygi M.P., Szpyt J., Tam S., Zarraga G., Colby G., Baltier K., et al. // *Cell.* 2015. V. 162. № 2. P. 425–440.
14. Nathan J.A., Kim H.T., Ting L., Gygi S.P., Goldberg A.L. // *EMBO J.* 2013. V. 32. № 4. P. 552–565.
15. Ershov P., Mezentsev Y., Gnedenko O., Mukha D., Yantsevich A., Britikov V., Kaluzhskiy L., Yablokov E., Molnar A., Ivanov A., et al. // *Proteomics.* 2012. V. 12. № 22. P. 3295–3298.
16. Ivanov A.S., Medvedev A., Ershov P., Molnar A., Mezentsev Y., Yablokov E., Kaluzhskiy L., Gnedenko O., Buneeva O., Haidukevich I., et al. // *Proteomics.* 2014. V. 14. № 20. P. 2261–2274.
17. Ivanov A.S., Ershov P.V., Molnar A.A., Mezentsev Y.V., Kaluzhskiy L.A., Yablokov E.O., Florinskaya A.V., Gnedenko O.V., Medvedev A.E., Kozin S.A., et al. // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2016. V. 42. № 1. P. 14–21.
18. Gillam E.M., Notley L.M., Cai H., De Voss J.J., Guengerich F.P. // *Biochemistry.* 2000. V. 39. № 45. P. 13817–13824.
19. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. // *Biochem. Pharmacol.* 1996. V. 52. № 3. P. 385–391.
20. Medvedev A., Igosheva N., Crumeyrolle-Arias M., Glover V. // *Stress.* 2005. V. 8. № 3. P. 175–183.
21. Medvedev A., Buneeva O., Glover V. // *Biologics.* 2007. V. 1. № 2. P. 151–162.
22. Pandeya S.N., Smitha S., Jyoti M., Sridhar S.K. // *Acta Pharm.* 2005. V. 55. № 1. P. 27–46.
23. Сергеев Г.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. // *Биохимия.* 2014. Т. 79. № 5. С. 520–531.
24. Дормешкин Д.О., Свирид А.В., Гилеп А.А., Усанов С.А. // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси.* 2015. Т. 59. № 2. С. 53–60.
25. Wiśniewski J.R., Zougman A., Nagaraj N., Mann M. // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. № 5. P. 359–362.
26. Loktev A.V., Zhang Q., Beck J.S., Searby C.C., Scheetz T.E., Bazan J.F., Slusarski D.C., Sheffield V.C., Jackson P.K., Nachury M.V. // *Dev. Cell.* 2008. V. 15. № 6. P. 854–865.
27. Cerecedo D. // *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 2013. V. 24. P. 798–808.
28. Mosavi L.K., Cammett T.J., Desrosiers D.C., Peng Z. // *Protein Sci.* 2004. V. 13. № 6. P. 1435–1448.
29. Moussavi-Harami S.F., Annis D.S., Ma W., Berry S.M., Coughlin E.E., Strotman L.N., Maurer L.M., Westphall M.S., Coon J.J., Mosher D.F., et al. // *J. Proteome Res.* 2013. V. 12. № 7. P. 3393–3404.
30. Pankov R., Yamada K.M. // *J. Cell Sci.* 2002. V. 115. Pt 20. P. 3861–3863.
31. Lu Y., Cederbaum A.I. // *Free Radic. Biol. Med.* 2008. V. 44. № 5. P. 723–738.
32. Arnold C., Konkel A., Fischer R., Schunck W.-H. // *Pharmacol. Rep.* 2010. V. 62. № 3. P. 536–547.
33. Davydov D.R., Davydova N.Y., Sineva E. V., Halpert J.R. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 6. P. 3850–3864.
34. Gnedenko O.V., Yablokov E.O., Usanov S.A., Mukha D.V., Sergeev G.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Moskaleva N.E., Shumyantseva V.V., Ivanov A.S., et al. // *Chem. Phys. Lett.* 2014. V. 593. P. 40–44.
35. Bridges A., Gruenke L., Chang Y.T., Vakser I.A., Loew G., Waskell L. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 27. P. 17036–17049.
36. Strushkevich N., MacKenzie F., Cherkesova T., Grabovec I., Usanov S., Park H.-W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 25. P. 10139–10143.
37. Lewis D.F., Hlavica P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. V. 1460. № 2–3. P. 353–374.
38. Fallo F., Pezzil V., Barzon L., Mulatero P., Veglio F., Sonino N., Mathis J. M. // *Eur. J. Endocrinol.* 2002. V. 147. P. 795–802.
39. Бунеева О.А., Копылов А.Т., Тихонова О.В., Згода В.Г., Медведев А.Е., Арчаков А.И. // *Биохимия.* 2012. Т. 77. № 11. С. 1584–1599.
40. Buneeva O., Gnedenko O., Zgoda V., Kopylov A., Glover V., Ivanov A., Medvedev A., Archakov A. // *Proteomics.* 2010. V. 10. № 1. P. 23–37.
41. Medvedev A.E., Buneeva O.A., Kopylov A.T., Gnedenko O.V., Medvedeva M.V., Kozin S.A., Ivanov A.S., Zgoda V.G., Makarov A.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 16. № 1. P. 476–495.