

УДК 577.152.133:152.123 + 579.222.4:577.175.53 + 577.175.5

Я. В. ФАЛЕТРОВ, В. М. ШКУМАТОВ

## ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ БИОСИНТЕЗА СТЕРОИДОВ НА ТРАНСФОРМАЦИЮ СУБСТРАТОВ РЕКОМБИНАНТНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ ЦИТОХРОМЫ P450

НИИ физико-химических проблем

Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

Ферменты класса оксидоредуктаз, а именно цитохромы P450 и гидроксистероид-дегидрогеназы (ГСД) различной субстратной специфичности, катализируют основные реакции биосинтеза стероидных гормонов (СГ). Ингибирование некоторых из них (P450c19, P450c17, 17 $\beta$ -ГСД) является новой стратегией лекарственной терапии ряда опухолевых заболеваний, однако в определенных случаях подобное ингибирование этих и других форм P450 и ГСД (P450scs, 3 $\beta$ -ГСД) будет нежелательным [1—3]. Генно-инженерные (рекомбинантные, трансгенные) микроорганизмы, экспрессирующие P450 биосинтеза СГ, являются новым типом тест-систем для исследования потенциальных лекарств, представляя собой биохимическую модель клеток стероидогенных органов (надпочечников, половых органов) [2, 3].

Цель настоящей работы заключалась в разработке экспериментальной модели, включающей трансгенные микроорганизмы, экспрессирующие ферменты млекопитающих, которая, в сочетании с подходами *in silico*, служит для оценки прямого или побочного действия лекарственных веществ.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали рекомбинантные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* YEp5117 $\alpha$ , синтезирующие P450c17 под контролем промотора GAL10 (индукция галактозой), ряд штаммов *Yarrowia lipolytica*, продуцирующих P450scs и P450c17 под контролем промотора ICL1 (индукция алканами, алифатическими спиртами и кислотами), а также бактерии *Escherichia coli*, синтезирующие «зрелую» форму P450scs (индукция изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозидом). Реконструкцию активности стероидтрансформирующих систем и спектрофотометрическое титрование осуществляли с использованием субмитохондриальных частиц, микросомальной фракции, а также высокоочищенных белков: P450scs, аденодоксинредуктазы (AR), аденодоксина (Ad), НАДФН: цитохром P450 редуктазы (CPR). Для анализа продуктов превращения стероидных субстратов применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) со спектрофото- и флуорометрическим детектированием (хроматографы Shimadzu с детекторами SPD-M10A и RF-10Ax1), тонкослойную хроматографию, газожидкостную хроматографию с пламенно-ионизационным детектированием (хроматограф Shimadzu GC-17A). Для исследований *in silico* использовали следующие программы: BLAST (поиск гомологичных белков), Modeller (гомологичное моделирование трехмерной структуры белков), Autodock (белок-лигандный докинг), ChemOffice и HyperChem (квантово-химические расчеты).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было установлено, что активность P450c17 в клетках *S. cerevisiae* и *Y. lipolytica* обусловлена функциональным сопряжением P450c17 и CPR [4, 5]. Определено, что в клетках этих дрожжей  $17\alpha$ -гидрокипрогестерон подвергается 20-кетовосстановлению с образованием  $17\alpha$ , 20-дигидроксипрегн-4-ен-3-онов: в *S. cerevisiae* наблюдалось селективное образование  $17\alpha$ , 20 $\alpha$ -изомера; в *Y. lipolytica* —  $17\alpha$ , 20 $\alpha$ - и  $17\alpha$ , 20 $\beta$ -изомеров в соотношении примерно 3 : 4 [4, 5]. Аналогами 20 $\alpha$ -ГСД у *S. cerevisiae* являются белки Gcy1p и Ypr1p (гены AKR3A2 и AKR3A1 соответственно), являющиеся НАДФН-зависимыми альдо-кеторедуктазами. Gcy1p и Ypr1p катализируют восстановление альдегидных групп глицеральдегида и ряда пентоз. Ypr1p катализирует образование изоамиловых спиртов из метаболитов лейцина и изолейцина, что связывает 20-кетовосстановление с еще одной реакцией инактивации прегнанов в *S. cerevisiae* — 3-О-ацетилированием. Анализ базы данных генома *Y. lipolytica* позволил установить у этих дрожжей белки — гомологи известных 20 $\alpha$ - и 20 $\beta$ -ГСД. Пять белков *Y. lipolytica* (коды доступа транслированных последовательностей по базе данных NCBI XP\_501195.1, XP\_500595.1, XP\_502389.1, XP\_500109.1, XP\_504101.1) оказались наиболее гомологичными с альдо-кеторедуктазами Gcy1p, Ypr1p и AKR1C1 человека (20 $\alpha$ -, 3 $\alpha$ -ГСД). Один или несколько из них является предполагаемой 20 $\alpha$ -ГСД *Y. lipolytica*. Один белок *Y. lipolytica* (код — XP\_503594.1) обладает лучшей степенью гомологии в сравнении с 20 $\beta$ -ГСД из *Mycobacterium bovis* и *Streptomyces exfoliates*, принадлежащих суперсемейству SDR (short-chain dehydrogenase/reductase).

В условиях экспрессии P450c17 клетки трансгенных дрожжей катализировали  $17\alpha$ -гидроксилирование прегненолона. В *S. cerevisiae* прегненолон и  $17\alpha$ -гидроксипрегненолон подвергаются 3-О-ацетилированию, которое катализируется ферментом ATF2p. Добавление в среду изоамилового, амилового или циклогексилового спирта (0,2—0,5 об. %) значительно снижает образование 3-О-ацетатов прегненолона и  $17\alpha$ -гидроксипрегненолона. Вероятной причиной этого является конкуренция алифатического и стероидного спиртов за превращения с помощью ATF2p [6]. Установлено, что в случае *Y. lipolytica* образования прегненолон 3-О-ацетата и  $17\alpha$ -гидроксипрегненолон 3-О-ацетата не происходит. Анализ генома *Y. lipolytica* показывает отсутствие у этих дрожжей белков со значимой гомологией с ATF2p *S. cerevisiae* [7]. Об этом в первую очередь свидетельствует величина ожидания отличий для наиболее гомологичной последовательности (код XP\_503024.1) —  $7,7 \cdot 10^{-3}$  (для сравнения, значение этого параметра для CPR *S. cerevisiae* и CPR *Y. lipolytica* составляет  $2 \cdot 10^{-158}$ ). Отсутствие у *Y. lipolytica* функциональных аналогов ATF2p является важным преимуществом данного типа дрожжей как биокатализатора для направленного превращения стероидов. При использовании этих микроорганизмов в качестве тест-системы можно исследовать перспективные ингибиторы P450c17 ряда  $3\beta$ -гидрокси- $\Delta^5$ -стероидов, такие как Абиратерон или VN/124-1 (находятся на стадии клинических испытаний) [2].

Определено, что *S. cerevisiae* катализируют превращение андростендиона и эстрона в тестостерон и эстрадиол соответственно, т. е.  $17\beta$ -кетовосстановление (рис. 1). Функции  $17\beta$ -ГСД в *S. cerevisiae* выполняют белки Ayr1p и Fox2p (участвуют в метаболизме липидов). Осуществлено гомологичное моделирование трехмерной структуры этих ферментов и расчет параметров белок-лигандных взаимодействий (докинг) андростендиона и эстрона с полученными модельными

ми структурами. Сравнение локализации 17-кетогрупп стероидов указывает на то, что эстрон является более предпочтительным субстратом для Aug1p, а андростендион — для Fox2p (рис. 2).

Для повышения каталитической эффективности биотрансформаций исследовано влияние ряда детергентов (в концентрации 0,2 масс. %) на 17 $\alpha$ -гидроксилирование прогестерона (начальная концентрация 125 мкМ) клетками трансгенных дрожжей *Y. lipolytica* DE5-54.1, синтезирующими P450c17 и P450scs. Степени превращения прогестерона в 17 $\alpha$ -гидроксипрогестерон в случае Твина 80, Эмульгена 913, Тритона X100, цетилтриметиламмония бромида (СТАВ), холата Na, додецилсульфата Na (ДСН) за 30 ч составили 47, 44, 30, 0, 40, 0 % соответственно (в контроле — 23 %). В случае СТАВ и ДСН биотрансформа-

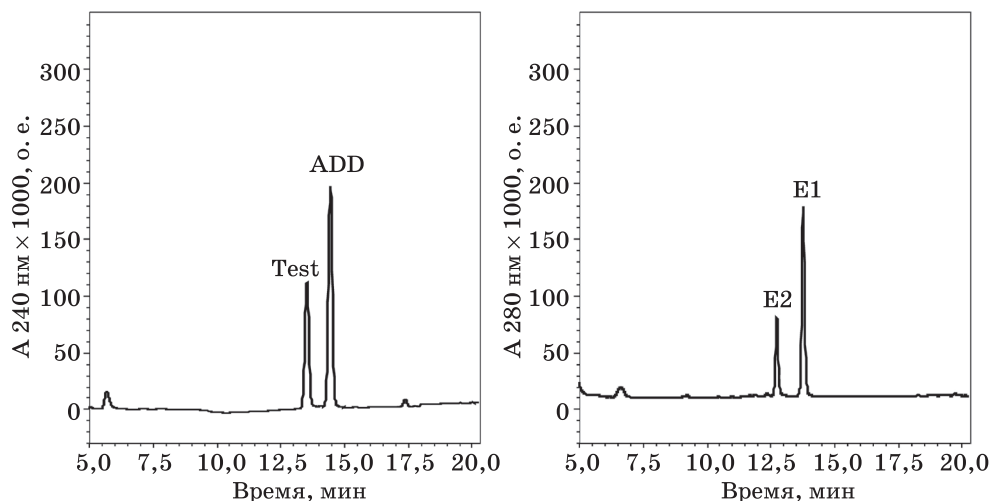


Рис. 1. ВЭЖХ стероидных продуктов, образующихся при превращениях андростендиона и эстрона галактозо-индуцированными клетками *S. cerevisiae* GRF18/УЕр1817 $\alpha$  через 24 ч биотрансформации: ADD, Test, E1 и E2 — андростендион, тестостерон, эстрон и эстрадиол соответственно

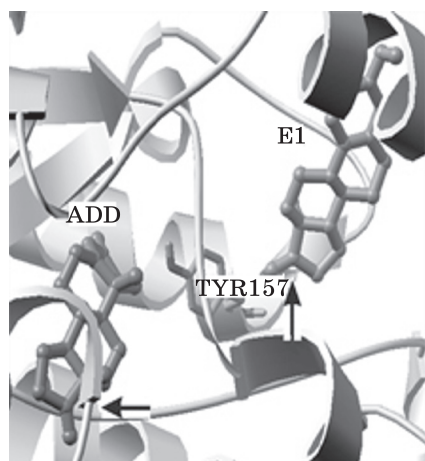


Рис. 2. Модель локализации эстрона и андростендиона вблизи каталитически активного консервативного остатка тирозина (Tyr157) фермента Aug1p. ADD и E1 — андростендион и эстрон соответственно. Стрелками указаны положения в пространстве 17-кетогрупп ADD и E1

ция не наблюдалась, что является следствием их денатурирующего действия как на клеточные структуры, так и на изолированные белки. Стимулирующий эффект детергентов на функциональную активность обусловлен повышением растворимости прогестерона при относительно высокой начальной концентрации, а также улучшением параметров массопереноса субстрата в клетку [8].

С целью расширения спектра исходных субстратов для биотрансформаций исследована каталитическая доступность стероидов (отход производства биодизельного топлива из рапсового масла), а также флуоресцентного аналога холестерина. Установлено, что  $\beta$ -ситостерин и кампестерин эффективно превращаются в прегненолон с помощью реконструированной *in vitro* холестерин-трансформирующей системы, в то время как брассикастерин, содержащий двойную связь при C22, не подвергается указанному превращению. Установлено, что флуоресцентный стероид (22-(N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил)амино)-23,24-биснор-5-холан-3 $\beta$ -ол (22-NBD-холестерин) способен связываться в активных центрах цитохрома P450scs и микробных холестерин-оксидаз, а также подвергаться окислительной модификации этими ферментами [9, 10] (рис. 3).

Следующий этап исследования заключался в оценке параметров превращения стероидов рекомбинантными дрожжами под воздействием стероидных фармакологически активных соединений. Установлено, что синтетические ингибиторы стероидной природы левоноргестрел, даназол и мифепристон уменьшают скорость биотрансформации прогестерона (начальная концентрация равна константе Михаэлиса и составляет 1 мкМ) клетками *S. cerevisiae* YEr5117 $\alpha$  со значениями констант ингибирования ( $K_i$ ) 400, 450 и 600 нМ соответственно (табл. 1). Для дополнительной оценки аффинности этих лекарственных соединений к P450c17 был осуществлен белок-лигандный докинг. Так как трехмерная структура P450c17

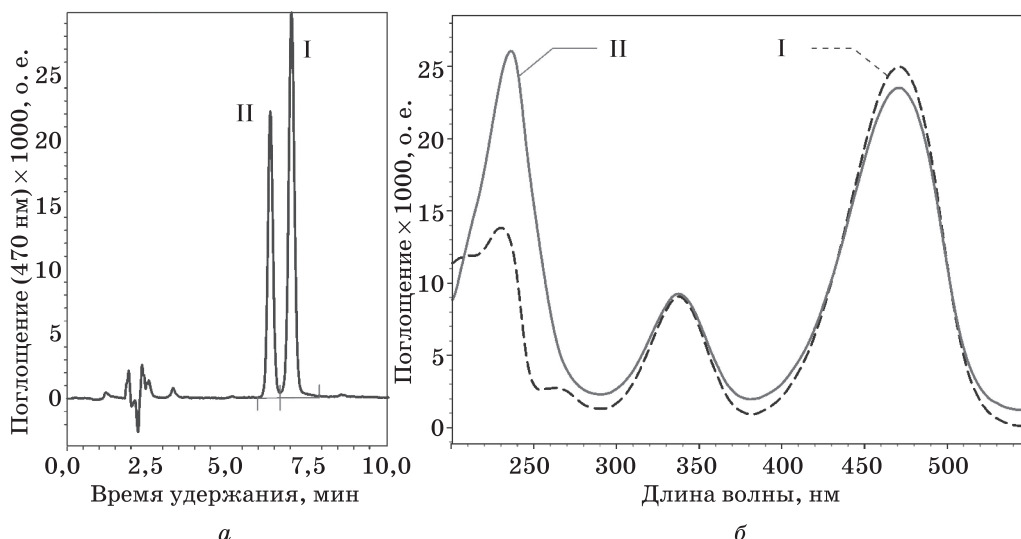


Рис. 3. Результаты ВЭЖХ анализа биотрансформации 22-NBD-холестерина холестерин-оксидазой:  
 а — хроматографическая кривая по поглощению при 470 нм;  
 б — спектры поглощения в максимумах хроматографических пиков с временами удерживания 6,4 (II) и 7,0 мин (I — 22-NBD-холестерин)

до сих пор окончательно не установлена, нами была получена модель пространственной структуры P450c17 на основе 3D-структуры P450 1A2 [11]. Более высокие значения  $K_i$  обусловлены многофакторными процессами транспорта ингибиторов внутрь клетки к активному центру гемопротеида, переноса электронов в результате взаимодействия с CPR, в то время как значения констант диссоциации ( $K_d$ ) при докинге отражают только «прямое» белок-лигандное взаимодействие (табл. 2). Установлено, что 20 $\alpha$ - и 20 $\beta$ -гидроксипрегн-4-ен-3-оны выступают как ингибиторы P450c17 смешанного типа, а 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -эпоксиpregненолон и тестостерона ацетат способны связываться в активном центре P450c17 и уменьшать скорость 17 $\alpha$ -гидроксилирования прогестерона с помощью *S. cerevisiae* YEp5117 $\alpha$  [12, 13]. Противогрибковые лекарства кетоконазол и флуконазол (ингибиторы P450c14 дрожжей и ряда P450 млекопитающих) снижают скорость P450c17-зависимого 17 $\alpha$ -гидроксилирования прогестерона *S. cerevisiae* YEp5117 $\alpha$ , что может свидетельствовать о возможных побочных эффектах указанных лекарств.

Таблица 1  
Параметры взаимодействия стероидных лекарств  
с цитохромом P450c17

Вещество	$K_d$ , нМ	$K_i$ , нМ
Прогестерон	71	—
Левоноргестрел	22; 120	400
Даназол	106; 153 *	450
Мифепристон	1400; 3140	600

\* При наличии двух различных конформаций.

Далее были исследованы производные тетразолов и стерически затрудненных фенолов, молекулярные механизмы действия которых окончательно не установлены и входят в сферу научных интересов лабораторий химического факультета и НИИ ФХП БГУ [14—18].

Фармакологические свойства производных тетразолов активно исследуются; некоторые из них используются как лекарственные соединения (напр., коразол, лозартан). Это обусловлено тем, что 5-тетразолильная группа является биоизостером карбоксильной группы или тиазолидиндионового кольца, что придает метаболическую устойчивость потенциальным лекарственным веществам [14, 15]. В связи со способностью 1- и 5-незамещенных производных тетразола выступать в качестве лигандов в составе комплексов ионов металлов переменной валентности можно предположить наличие у них потенциальной способности ингибировать металлоферменты, в частности, цитохромы P450. Выявлена способность четырех 1-арилтетразолов (1-(3-бензилоксифенил)-1H-тетразола (A2), 3-(1H-тетразол-1-ил)фенола, 1-фенил-1H-тетразол-5-амин и 1-(4-этоксифенил)-1H-тетразола) взаимодействовать с P450c17 и P450scс. Показано, что 1-арилтетразолы связываются в активных центрах цитохромов P450scс и P450c17, реализуя координационную связь атомов азота тетразольных циклов с железом гема. Более низкие значения  $K_d$  (соответственно, более высокое сродство) для A2 указывают на дополнительное сильное взаимодействие его бензильного заместителя с остатками липофильных аминокислот в активных центрах P450c17 (Val483, Met99) и P450scс (Leu393, Tyr121). Тетразол A2 обладал лучшей способностью уменьшать скорость биотрансформации прогестерона и рост клеток дрожжей

*S. cerevisiae* УЕр5117 $\alpha$  среди исследованных тетразолов, но уступал кетоконазолу и флуконазолу и разрабатываемым селективным ингибиторам P450c17 [2, 16]. Таким образом, при разработке новых лекарств на основе тетразолов необходимо учитывать и минимизировать возможные побочные эффекты, обусловленные способностью тетразолов образовывать комплексы с P450.

Ряд трет-бутил замещенных производных катехолов и о-аминофенолов, а также их металлокомплексы активно исследуются в качестве противовирусных и противомикробных соединений [17, 18]. Активность ГСД и других оксидоредуктаз в клетке зависит от ее редокс-состояния, в частности баланса концентраций НАД(Ф)Н и НАД(Ф)<sup>+</sup>. Исследовано взаимодействие соединений BN01 (2-амино-4,6-ди-трет-бутилфенол) и BS08 (4,6-ди-трет-бутил-3-(2-гидроксиэтилтио)бензол-1,2-диол) с цитохромом *c* (CC), P450<sub>sc</sub>, CPR, аденодоксином (Ad) и аденодоксин-редуктазой (AR). Установлено, что CC способен окислять BN01 и BS08 по одноэлектронному механизму до соответствующих хинонов. Парадоксально, что двухэлектронный переносчик CPR способен увеличивать скорость восстановления CC соединениями BN01 и BS08. Напротив, система Ad+AR, на уровне которой осуществляется переход от двух- к одноэлектронному переносу, не изменяла скорости восстановления CC этими соединениями. Соединения BN01 и BS08 не вызывали спектральных изменений при взаимодействии с P450<sub>sc</sub>, характерных для связывания лигандов в активном центре и восстановления железа гема при соотношении концентраций фермента к лиганду 1 : 100. Дрожжи и бактерии содержат структурно-функциональные аналоги CC, CPR, Ad и AR млекопитающих [4, 19]. Найдены электрон-транспортные белки дрожжей и *E. coli*, способные к редокс-взаимодействию с P450c17 [4]. Установлена способность ферментной системы из цитоплазматической фракции бактерий *E. coli* осуществлять НАДФН-зависимое восстановление железа гема P450<sub>sc</sub> и поддерживать его активность [19]. Показано, что добавление детергентов (Твин 80, Тритон-X100, СТАВ, ДСН) до 0,1 % (выше критической концентрации мицеллообразования в воде) уменьшает скорость восстановления CC соединением BS08 в 5—10 раз. Величины спектральных ответов при 550 нм после дополнительного восстановления избытком Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> указывали на интактность активного центра CC (за исключением ДСН). Предполагается, что уменьшение скорости взаимодействия CC с BS08 обусловлено экранированием сайтов взаимодействия границами мицелл, конкурентным связыванием и частичной денатурацией [20].

Таблица 2

**Расчетные константы диссоциации (K<sub>d</sub>, мкМ) комплексов ферментов со стероидными и нестероидными лигандами**

	Fox2p*	Ayr1p	P450c17	P450 <sub>sc</sub>
BS08	6,1	4,9	2,8	2,1
BN01	8,5	6,7	7,4	4,2
Андростендион	1,1	0,8	—	—
Эстрон	1,1	1,6	—	—
Прогестерон	—**	—	<0,1	<0,1

\* Для расчетов (докинга) использовали структуру P450<sub>sc</sub> (код *pdb* 3NA0) и собственные модельные структуры остальных ферментов.

\*\* Не определяли.



Определено, что соединение BS08 в концентрациях до 100 мкМ практически не влияет на скорости 17 $\alpha$ -гидроксилирования, 20 $\alpha$ - и 17 $\beta$ -кетовосстановления стероидных субстратов клетками *S. cerevisiae* YEr5117 $\alpha$ . Моделирование взаимодействий соединений BN01 и BS08 с соответствующими белками-мишенями указывает на низкое сродство к активным центрам ферментов по сравнению со стероидами (табл. 2). Таким образом, один из возможных механизмов противомикробного действия производных катехолов и о-аминофенолов реализуется на уровне СС, белка, играющего центральную роль в процессах клеточного дыхания и апоптоза — запрограммированной смерти клеток.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены новые данные о каталитических свойствах трансгенных штаммов дрожжей *S. cerevisiae* YEr5117 $\alpha$  и *Y. lipolytica*, синтезирующих цитохромы P450 млекопитающих, а также обоснованы подходы, позволяющие ликвидировать побочные реакции 3-О-ацетилирования и 20-кетовосстановления стероидов. Количественно охарактеризована селективность взаимодействия и ингибиторная активность известных лекарственных соединений-модификаторов биосинтеза стероидов, а также производных тетразолов, катехолов и аминофенолов с использованием созданных экспериментальных подходов на основе трансгенных микроорганизмов и теоретических моделей 3D-структур ферментов биосинтеза и метаболизма стероидов. Эти данные являются важными как для направленного синтеза потенциальных ингибиторов P450c17, фермента, играющего важную роль в развитии гормонального канцерогенеза, так и для оценки побочного действия новых лекарственных средств различных фармакологических групп.

Работа была выполнена в рамках заданий программ ГКПНИ «Биоинженерия и биобезопасность», ГПОФИ «Физиологически активные вещества», ГП «Инновационные биотехнологии», а также гранта ИНТАС (СА 03-51-4366).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Shkumatov V. M., Usanov S. A., Chashchin V. L., Akhrem A. A. // Pharmazie. 1985. Vol. 10, № 11. P. 757—773.
2. Новикова Л. А., Фалетров Я. В., Ковалева И. Е. и др. // Успехи биол. хим. 2009. Т. 49. С. 159—208.
3. Шкуматов В. М., Усова Е. В., Фролова Н. С. и др. // Биомед. хим. 2006. Т. 3, № 52. С. 298—308.
4. Hannemann F., Bichet A., Ewen K. M. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Vol. 1770, № 3. P. 330—344.
5. Шкуматов В. М., Фролова Н. С., Рудая Е. В. и др. // Прикл. биохим. микробиол. 2006. Т. 42, № 5. С. 539—546.
6. Фалетров Я. В., Фролова Н. С., Рудая Е. В. и др. // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. / редкол.: А. В. Кильевский и др. Минск: Право и экономика, 2008. Т. 7. С. 45—48.
7. Фалетров Я. В., Фролова Н. С., Мауерсбергер Ш. и др. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы междунар. конф., Минск, 25—27 июня 2008 г. / редкол.: И. Д. Вологовский, С. Н. Черенкевич и др. Минск: Изд. центр БГУ, 2008. С. 136—138.
8. Фалетров Я. В., Фролова Н. С., Рудая Е. В. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы междунар. конф., Минск, 23—25 июня 2010 г. / редкол.: И. Д. Вологовский, С. Н. Черенкевич и др. Минск: Изд. центр БГУ, 2010. С. 136—138.

9. Фалетров Я. В., Казакевич Ю. К., Фролова Н. С. и др. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы междунар. конф., Минск, 23—25 июня 2010 г. / редкол.: И. Д. Волоотовский, С. Н. Черенкевич и др. Минск : Изд. центр БГУ, 2010. С. 145—147.
10. Фалетров Я. В., Белевич Е. И., Стреха И. С. и др. // Вестн. Белорусского ун-та. Сер. 2. 2010. № 3. С. 39—42.
11. Фроленков К. А., Фролова Н. С., Рудая Е. В. и др. // Молекулярная и прикладная генетика: сб. науч. тр. 2008. Т. 7. С. 41—44.
12. Шкуматов В. М., Усова Е. В., Фролова Н. С. и др. // Биомед. хим. 2006. Т. 3, № 52. С. 298—308.
13. Усова Е. В., Фалетров Я. В., Шкуматов В. М. // Вестн. Белорусского ун-та. Сер. 2. 2005. С. 25—32.
14. Войтехович С. В., Григорьев Ю. В., Гапоник П. Н. и др. // Вестн. Белорусского ун-та. Сер. 2. 2010. № 3. С. 11—14.
15. Myznikov L. V., Hrabalek A., Koldobskii G. I. // Chem. Heterocyc. Compounds. 2007. Vol. 43, № 1. P. 1—9.
16. Фалетров Я. В., Фроленков К. А., Рябикова В. В. и др. // Свиридовские чтения: сб. ст. Минск : БГУ, 2009. Вып. 5. С. 230—237.
17. Loginova N. V., Koval'chuk T. V., Polozov G. I. et al. // Eur. J. Med. Chem. 2008. Vol. 43, № 7. P. 1536—1542.
18. Loginova N. V., Faletrov Y. V., Koval'chuk T. V. et al. // Polyhedron. 2010. Vol. 29. P. 1646—1652.
19. Шкуматов В. М., Радюк В. Г., Фалетров Я. В. и др. // Биохимия. 2006. Т. 71, № 8. С. 884—892.
20. Сивоплясова А. В., Фалетров Я. В., Гресь А. Т. и др. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: материалы междунар. конф., Минск, 23—25 июня 2010 г. / редкол.: И. Д. Волоотовский, С. Н. Черенкевич и др. Минск : Изд. центр БГУ, 2010. С. 139—141.

Поступила в редакцию 03.02.2011.