

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ СТЕРОИД 22-NBD-ХОЛЕСТЕРИН – НОВЫЙ ЭФФЕКТОР ЦИТОХРОМА P450_{scc}

Interaction of cytochrome P450_{scc} (a key enzyme of steroid hormones' biosynthesis) and a fluorescent steroid 22-NBD-cholesterol has been investigated. The analysis of molecular docking results and spectrofluorimetric measurements point out on ability of 22-NBD-cholesterol to bind itself into lipophilic site(s) of P450_{scc}, including the active centre of the enzyme. In the conditions of functional activity of P450_{scc} formation of hydrophilic derivative of 22-NBD-cholesterol – a product of oxidation of the steroid by P450_{scc} – has been detected.

Цитохром P450_{scc} (CYP11A1, далее – P450_{scc}) является митохондриальным мембранным ферментом, содержащим в качестве редокс-активной группы нековалентно-связанный гем, ион железа которого скоординирован с тиогруппой остатка цистеина этого белка. Ферментная система, состоящая из P450_{scc} в качестве терминальной оксидазы и двух электрон-транспортных белков (адренодоксина и адренодоксин-редуктазы), катализирует окислительное расщепление C20–C22-связи боковой цепи холестерина с образованием прегненолона – предшественника всех типов стероидных гормонов. В ходе данной реакции P450_{scc} осуществляет три монооксигеназных цикла, соответствующие последовательному образованию 22-гидроксихолестерина (22-гидроксилирование), 20,22-дигидроксихолестерина (20-гидроксилирование) и прегненолона (20,22-лиазная реакция). Холестерин и его перечисленные гидроксипроизводные являются субстратами P450_{scc} [1, 2]. Также установлены и другие субстраты P450_{scc}. Например, P450_{scc} катализирует расщепление C20–C22-связи 25-доксил-27-нор-холестерина [3] и 7-дегидрохолестерина (провитамина D3) [4], 20- и 22-гидроксилирование витамина D3 [5], 24- и затем 17 α -гидроксилирование эргостерина (провитамина D2), 20 α - и 17 α -гидроксилирование витамина D2 [4, 6].

Флуоресцентные аналоги стеролов – удобные средства для изучения структурно-функциональных свойств белков, участвующих в процессах рецепции, транспорта и метаболизма стероидов [7, 8]. Одним из таких аналогов является 22-(N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил)амино)-23,24-биснор-5-холан-3 β -ол (22-NBD-холестерин), который можно рассматривать как аналог холестерина (субстрата P450_{scc}), так и производное 20(S)-аминометил-прегн-5-ен-3 β -ола (сильного ингибитора P450_{scc}) [9].

В данной работе представлены результаты компьютерного моделирования и экспериментальных исследований 22-NBD-холестерина в качестве потенциального эффектора (субстрата или ингибитора) P450_{scc}.

Материал и методика

Были использованы: 22-NBD-холестерин («Molecular Probes», США), Тритон-X100 («Sigma», США), дипальмитоиллецитин, холат натрия и 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтан-сульфоновая кислота (HEPES) («Serva», Германия), НАДФН («Reanal», Венгрия); ацетонитрил «ос. ч.» («Криохром», РФ). Остальные реактивы – производства стран СНГ квалификации «ч. д. а.» или «х. ч.». Цитохром P450_{scc}, аденодоксин и аденодоксин-редуктазу выделяли из надпочечников быка согласно [10].

Компьютерные расчеты зарядов на гетероатомах стероидов, моделирование структуры P450_{scc} и докинг. Структуры 20(S)-аминометил-прегн-5-ен-3 β -ола и 22-NBD-холестерина были построены с использованием пакета программ ChemOffice (CambridgeSoft, США). Заряды на атомах соединений рассчитывались в программе HyperChem 7.01 (Hypercube Inc., США) с использованием полуэмпирических методов CNDO, INDO, MNDO и AM1 по алгоритму Полака – Райбера; значения градиента при окончании расчетов не превышали 0,01. Для экспериментов по докингу заряды и конформацию структур этих стероидов рассчитывали согласно методу INDO. В работе использовали доступную онлайн модель P450_{scc} (pdb id: 2asa) и собственную модель P450_{scc}, построенную на основе трехмерной структуры митохондриального P450 24A1 (pdb id: 3k9v) с применением программы Modeller 9v3 и Easy Modeller v1.0. Докинг был осуществлен с помощью программ Autodock 4.0 и AutoDock Tools (Graphics Laboratory, Scripps Research Institute, США) в ригидном варианте согласно модели «ключ – замок». Координаты центров областей взаимодействия (размером 60 \times 60 \times 60 Å³) были выбраны вблизи гемовых групп моделей.

Спектрофлуориметрические измерения. Для приготовления образцов использовали 20 мМ HEPES буфер (pH 7,5), содержащий 0,25 % холата натрия и 0,2 мМ этилендиаминтетраацетата. Спектры флуоресценции растворов цитохрома P450_{scc} (конечная концентрация 1 мкМ), 22-NBD-холестерина (1 или 2 мкМ) и P450_{scc} совместно с 22-NBD-холестерином регистрировали в кварцевой

кювете (длина оптического пути составляла 1 см) спектрофлуориметром CM2203 («Солар», Беларусь). Возбуждение флуоресценции осуществляли светом с длинами волн $\lambda = 466$ и 290 нм, характерных для 22-NBD-холестерина и остатков триптофана соответственно [3, 7, 8]. Растворы с 22-NBD-холестерином готовили из исходного 1 мМ спиртового раствора путем разведения и инкубации перед измерениями в течение 5 мин.

Реконструкция ферментной системы с P450sc. Для реализации ферментативной активности P450sc использовали следующие условия: 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,3), содержащий 0,04 % холата натрия, 0,05 % Тритон-X100, 25 мкМ лецитина; конечные концентрации P450sc, адренodoxина и адренodoxин-редуктазы составляли 0,2, 1,0 и 0,5 мкМ соответственно. К 1 мл такой смеси добавляли 5÷20 мкл 1 мМ раствора 22-NBD-холестерина в этаноле и инкубировали 30 мин при 5 °С, а затем 5 мин при 37 °С. Реакцию инициировали добавлением НАДФН до конечной концентрации 200 мкМ, а останавливали путем экстракции четырехкратными объемами последовательно этилацетата и хлороформа. Объединенный экстракт упаривали досуха и растворяли в 500 мкл этанола. Полученные этанольные растворы анализировали методами тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

ТСХ и ВЭЖХ. ТСХ осуществляли на силикагелевых пластинках («Fluka», Германия) с флуоресцентным индикатором с максимумом при 254 нм. Мобильная фаза – смесь бензол : ацетон (4:1 по объему). Для детектирования использовали ультрафиолетовые лампы с максимумом испускания 365 нм («Спектр-М», РФ).

ВЭЖХ проводили на хроматографе LC10-AD с флуориметрическим детектором RF-10Ax1 и спектрофотометрическим детектором SPD-10A («Shimadzu», Япония) с использованием колонки-картриджа LiChroCART C18 (250x4 мм, диаметр частиц 5 мкм) («Merck», Германия). Мобильная фаза – смесь ацетонитрил : вода : изопропанол (84:16:5 по объему), скорость элюирования – 1 мл/мин, объем вводимых проб – 2,5 мкл. Флуоресценцию элюата регистрировали на $\lambda = 530$ нм (возбуждение осуществляли светом с $\lambda = 466$ нм).

Результаты и их обсуждение

Ранее было показано, что рассчитанные величины частичных зарядов на N-атомах гетероциклических ингибиторов цитохромов P450 являются критерием прочности координационной связи между этими атомами и железом гемов P450 [11]. Нами проведены расчеты частичных зарядов на N-атомах 22-NBD-холестерина и 20(S)-аминометил-прегн-5-ен-3 β -ола – ингибитора P450sc [9] (рис. 1, таблица). Сравнение структур и величин рассчитанных зарядов на N-атомах аминогрупп 22-NBD-холестерина и 20(S)-аминометил-прегн-5-ен-3 β -ола показывает, что 4-нитробензо[c][1,2,5]оксадиазольный (NBD) заместитель может уменьшать возможность N-атома в составе аминогруппы 22-NBD-холестерина, образовывать координационную связь с железом гема P450sc за счет ослабления его донорных свойств и стерических препятствий. В таблице также приведены данные для N-атома в положении 3 имидазольного цикла кетоконазола – ингибитора цитохромов P450.

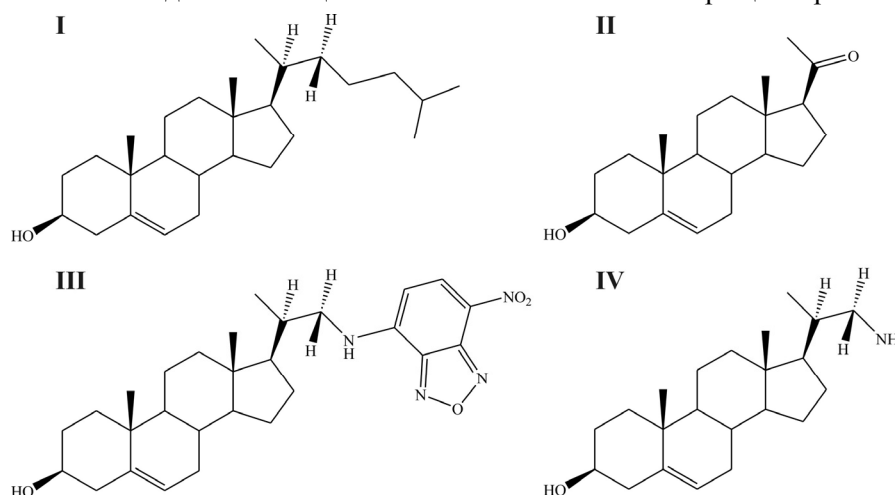


Рис. 1. Структурные формулы холестерина (I) и прегненолона (II) – субстрата и продукта P450sc-зависимой холестерин-трансформирующей ферментной системы, 22-NBD-холестерина (III) – флуоресцентного аналога стеролов и 20(S)-аминометил-прегн-5-ен-3 β -ола (IV) – ингибитора P450sc. Для I, II, IV показаны атомы водорода у атомов углерода C20 и C22 боковой цепи, подвергающихся гидроксигированию P450sc при превращении холестерина в прегненолон

**Величины частичных зарядов на атомах азота исследованных соединений
с использованием полуэмпирических методов**

Соединение, группа	Метод расчета			
	CNDO	INDO	MNDO	AM1
20(S)-аминометил-прегн-5-ен-3 β -ол, -NH ₂	-0,184	-0,216	-0,276	-0,351
22-NBD-холестерин, -NH-	-0,159	-0,170	-0,339	-0,296
Кетоконазол *, имидазол-1-ил	-0,192	-0,236	-0,230	-0,135

Примечание. * Для N-атома в положении 3 имидазольного цикла кетоконазола – цис-1-ацетил-4-[4-[[2-(2,4-дихлорфенил)-2-(1H-имидазол-1-ил-метил)-1,3-диоксолан-4-ил]метокси]фенил]-пиперазина – ингибитора цитохромов P450.

Далее с использованием двух моделей трехмерной структуры P450scs установлено, что 22-NBD-холестерин может связываться в активном центре P450scs. Причем в большинстве случаев флуоресцентная группа 22-NBD-холестерина локализовывалась в окружении (расстояние менее 2 Å) липофильных фрагментов гема или аминокислотных остатков (Tyr121, Gly325, Gly326, Val327 и Val391 в случае модели 2asa и Trp126, Leu140, Ala324, Gly325, Phe241, Leu393 и Leu494 в случае собственной модели трехмерной структуры P450scs).

I, отн. ед.

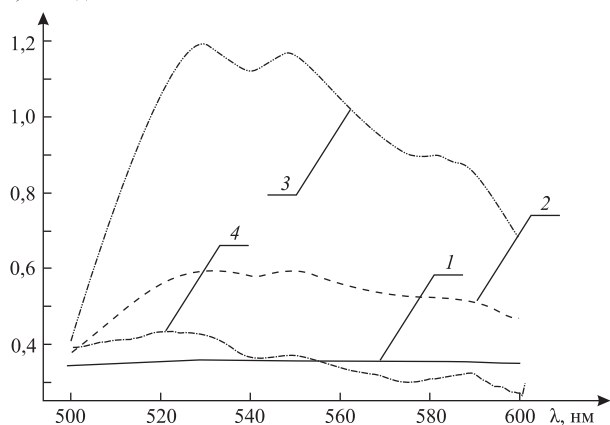


Рис. 2. Спектры флуоресценции растворов P450scs (конечная концентрация 1 мкМ) (1), 22-NBD-холестерина (2 мкМ) (2) и смеси P450scs (1 мкМ) с 22-NBD-холестерином (2 мкМ) (3 и 4). Спектры 1–3 регистрировались при длине волны возбуждения 466 нм; 4 – при длине волны возбуждения 290 нм

Показано, что интенсивность флуоресценции 22-NBD-холестерина была выше в случае наличия в буфере P450scs по сравнению с аналогичным раствором без белка (рис. 2). Флуоресценция самого P450scs в данных условиях не регистрировалась. Известно, что интенсивность флуоресценции NBD-меченых соединений увеличивается в гидрофобном окружении [7, 8]. При возбуждении 22-NBD-холестерина светом с $\lambda = 290$ нм спектр флуоресценции этого стероида регистрировался только при наличии P450scs в растворе (рис. 2, кривая 4). Это обусловлено тем, что возбуждение 22-NBD-холестерина светом с $\lambda = 290$ нм практически не происходит, тогда как остатки триптофана P450scs в этих условиях возбуждаются и флуоресцируют с максимумом эмиссии около 320 нм. Так как 22-NBD-холестерин значительно поглощает свет в диапазоне $\lambda = 320\div 350$ нм, при локализации вблизи остатков триптофана происходит его возбуждение и флуоресценция [3, 8]. Таким образом, данные компьютерного моделирования и спектрофлуориметрических исследований позволяют заключить, что 22-NBD-холестерин способен связываться с гидрофобными сайтами P450scs, часть из которых содержит остатки триптофана и/или расположена вблизи гема этого белка.

Установлено, что при добавлении 22-NBD-холестерина в буфер, содержащий активную P450scs-зависимую ферментную систему, происходит образование нового соединения. Результаты ТСХ и ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием (рис. 3) указывают на то, что новое соединение обладает флуоресцентными свойствами 22-NBD-холестерина, но является более гидрофильным. Число оборотов 22-NBD-холестерина было около $0,1 \text{ мин}^{-1}$, что на 2–3 порядка ниже

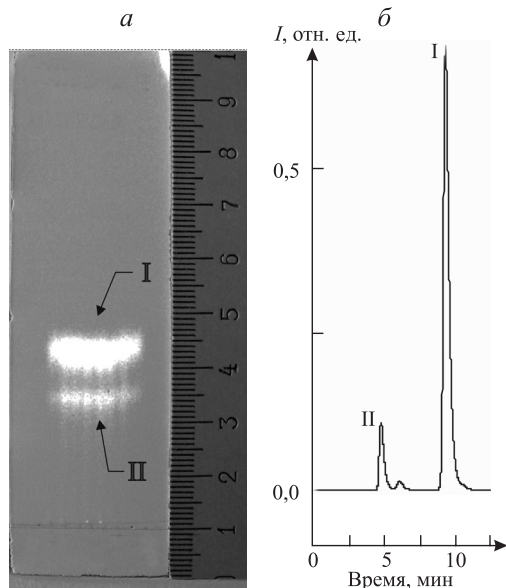


Рис. 3. Данные хроматографических анализов проб, полученных при инкубации 22-NBD-холестерина с реконструированной P450scs-зависимой ферментной системой с регистрацией при $\lambda = 570$ нм: а – фото пластинки ТСХ в свете лампы с максимумом 365 нм после разделения экстракта проб; б – хроматографическая кривая, полученная при анализе экстракта проб методом ВЭЖХ с флуоресцентным детектированием. I – 22-NBD-холестерин, II – новое соединение

величины, характерной для природной P450_{ssc}-зависимой холестерин-трансформирующей ферментной системы. Полученные результаты и данные о специфичности реакций гидроксилирования P450_{ssc} различных стероидов [1–6] позволяют заключить, что это соединение является продуктом окисления цитохромом P450_{ssc} 22-NBD-холестерина, вероятно, его 20-гидроксипроизводным. Детальная структурная идентификация нового соединения (данные ЯМР и масс-спектрометрии) будет рассмотрена в следующей публикации.

Работа выполнена при поддержке ГКПНИ «Биоинженерия и биобезопасность», ГПОФИ «Физиологически активные вещества» и ГП «Инновационные биотехнологии».

1. Shkumatov V.M., Usanov S.A., Chashchin V.L., Akhrem A.A. // Pharmazie. 1985. Vol. 40. P. 757.
2. Новикова Л.А., Фалетров Я.В., Ковалева И.Е. и др. // Успехи биол. химии. 2009. Т. 49. С.159.
3. Lange R., Maurin L., Larroque C., Bienvenue A. // Eur. J. Biochem. 1988. Vol. 172. P. 189.
4. Slominski A., Semak I., Wortsman J. et al. // FEBS J. 2006. Vol. 273. P. 2891.
5. Guryev O., Carvalho R.A., Usanov S. et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 14754.
6. Slominski A., Semak I., Zjawiony J. et al. // Chem. Biol. 2005. Vol. 12. P. 931.
7. Scheidt H.A., Muller P., Herrmann F., Huster D. // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 45563.
8. Liu R., Lu P., Chu J.W.K., Sharom F.J. // Ibid. 2009. Vol. 284. P. 1840.
9. Sheets J.J., Vickery L. // Ibid. 1983. Vol. 268. P. 11446.
10. Ахрем А.А., Шкуматов В.М., Чащин В.Л. // Биоорганическая химия. 1977. Vol. 3. P. 780.
11. Zhuang Y., Wachall B.G., Hartmann R.W. // Bioorg. Med. Chem. 2000. Vol. 8. P. 1245.

Поступила в редакцию 07.09.10.

Ярослав Вячеславович Фалетров – младший научный сотрудник НИИФХП БГУ.

Екатерина Иосифовна Белевич – младший научный сотрудник Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Игорь Станиславович Стреха – научный сотрудник НИИФХП БГУ.

Дмитрий Георгиевич Костин – кандидат биологических наук, научный сотрудник Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Ирина Петровна Едимичева – кандидат химических наук, научный сотрудник НИИФХП БГУ.

Екатерина Ивановна Слобожанина – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по научной работе Института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси.

Владимир Макарович Шкуматов – доктор биологических наук, профессор кафедры высокомолекулярных соединений.