

**ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОХРОМА P450 7B1 С АЗОЛАМИ И СТЕРОИДАМИ****А.В. Янцевич, Я.В. Диченко, С.В. Шпак, Н.В. Струшкевич, А.А. Гилеп, С.А. Усанов***Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь***Введение**

Цитохром P450 7B1 (CYP7B1) – фермент (EC 1.14.13.100), состоящий из 506-ти аминокислотных остатков и катализирующий гидроксилирование ряда стероидов по 6- или 7-му углеродному атому [1]. Показано, что в качестве субстратов CYP7B1 могут выступать 25-гидроксихолестерин [2], 27-гидроксихолестерин, прегненолон, дегидроэпиандростерон [2], 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диол [3]. Гидроксилирование снижает физиологическую активность субстратов этого фермента и ускоряет их превращение в продукты, которые легко выводятся из организма. Для работы данного фермента необходимы НАДФН и НАДФН-зависимая цитохром P450 редуктаза. CYP7B1 локализован в эндоплазматическом ретикулуме печени [4], репродуктивной системы [5] и мозга [6] и выполняет в этих тканях различные функции. В печени фермент участвует в синтезе желчных кислот [4], вводя гидроксильную группу в 7 $\alpha$ -положение 25- и 27-гидроксихолестерина. В репродуктивной системе CYP7B1 метаболизирует эстрогены [7], гидроксилируя 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диол в 6 $\alpha$ -положение, а 27-гидроксихолестерин и дегидроэпиандростерон в 7 $\alpha$ -положение. В мозге CYP7B1 инактивирует нейростероиды, к которым относятся прегненолон и дегидроэпиандростерон. Недавние исследования показали, что потеря функциональной активности данного фермента в мозге приводит к спастической параплегии (виду прогрессирующей нейропатии) [8, 9, 10]. До настоящего времени в чистом виде данный фермент не был получен, соответственно, параметры связывания его с лигандами не известны [1]. В данной работе впервые функционально активный CYP7B1 человека экспрессирован в клетках *E. coli*, очищен до гомогенного состояния с использованием аффинной хроматографии, получены его характеристики, проведен скрининг лигандов этого белка среди стероидов (потенциальных субстратов) и азолов (потенциальных ингибиторов). Определены параметры связывания фермента с обнаруженными лигандами.

**Методы исследования****Реагенты**

В работе использовали NaCl, Na(K)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, Na(K)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, («Диа-М», Россия), 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-пропансульфонат (CHAPS), N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота (HEPES), имидазол, тебуконазол, эконазол, пропиконазол, миконазол, клотримазол, бифоназол, кетоконазол, ципроконазол, флуконазол, 25-гидроксихолестерин, 27-гидроксихолестерин, ДГЭА, прегненолон, 5 $\alpha$ -андростан-3,17 $\beta$ -диол («Sigma», США). Сорбент Ni<sup>2+</sup>-IDA сефароза 6B был синтезирован как описано в [11] с использованием реагентов фирмы «Sigma» (США).

**Оборудование и приборы**

Спектры поглощения регистрировали с использованием прибора Shimadzu UV3000 («Shimadzu», Япония), Solar CM2203 («Solar», Беларусь). Центрифугирование клеток и клеточных компонентов проводили на центрифуге Avanti<sup>TM</sup> J-25 («Beckman Coulter», США). Разрушение бактериальных клеток осуществляли при помощи гомогенизатора Emulsiflex C5 («Avestin», Канада). Белковый электрофорез проводили на приборе Mighty Small-2 SE250 («Hofer», США).

**Гетерологическая экспрессия CYP7B1 и выделение рекомбинантного CYP7B1**

Для гетерологической экспрессии использовали штамм *E. coli* DH $\alpha$ 5, содержащий плазмиду pCWori+CYP7B1, определяющую устойчивость штамма к ампициллину. Использовали следующие условия культивирования: 23 $^{\circ}$ C, скорость перемешивания 130 об/мин, концентрация ИПТГ 0,5 мМ, 24 ч с момента индукции.

Клетки *E. coli* разрушали с использованием гомогенизатора Emulsiflex C5. Из мембран белок солибилизировали 1% ХАПС. Несольбилизированный материал осаждали центрифугированием (40000 g, 60 мин). Супернатант наносили на колонку с Ni<sup>2+</sup>-IDA сефарозой 6В. Колонку промывали 5-ю объемами буфера А (50 mM КРВ, 25 mM имидазол, 0,3 M NaCl, 0,2% CHAPS, 20% глицерин, pH 7,4). Затем белок элюировали 40 мл буфера В (25 mM КРВ, 250 mM имидазол, 0,3 M NaCl, 0,2% CHAPS, 20% глицерин, pH 7,4). От имидазола в препарате белка избавлялись с помощью адсорбционной хроматографии с использованием гидроксиапатита (ГАП). Для этого наносили раствор белка на колонку с ГАП и промывали ее 5-ю объемами буфера С (25 mM КРВ, 0,3 M NaCl, 0,2% CHAPS, 20% глицерин, pH 7,4). Целевой белок затем элюировали 3 объемами буферного раствора D (0,6 M калий-фосфатный буфер, 0,2% CHAPS, 20% глицерин, pH 7,4).

Весь процесс выделения проводили при температуре 4°C. Для контроля процесса на каждом этапе отбирали 200 мкл образца и анализировали белковый состав с помощью электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na.

Полученные в процессе очистки гомогенные по составу фракции объединяли, полученный препарат аликвотировали и хранили при температуре -70°C. Концентрацию рекомбинантного цитохрома P450 определяли из разностного спектра карбонильного комплекса, используя коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{450-490 \text{ нм}}=91000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### Результаты и обсуждение

Рекомбинантный цитохром P450 7B1 гетерологически экспрессирован в клетках штамма *E. coli* DH5 $\alpha$ . Уровень экспрессии составил 0,6 мкмоль (35 мг белка) на литр культуральной среды. Белок содержит последовательность из шести гистидиновых остатков в N-концевой области. Клетки разрушались экструзионным методом. Белок солибилизировали из мембран ХАПС (конечная концентрация 1%). Очищали с помощью металохелатной хроматографии до гомогенного состояния. Полученный препарат белка не содержал денатурированной формы P420, был гомогенным по данным ДСН-электрофореза (рисунок 1) и отношение A417/A280 (показатель чистоты) было равным 0,96 (рисунок 2).

Метод скрининга лигандов цитохрома P450 основан на способности вещества замещать молекулу воды в активном центре фермента и вызывать переход иона железа гема в высоко- или низкоспиновое состояние. Замещение может быть легко обнаружено по изменениям в спектре поглощения при спектрофотометрическом титровании (рисунок 3). Экспериментальные результаты аппроксимировали к уравнению, характеризующему прочное связывание, с использованием алгоритма Левенберга-Марквардта и, таким образом, определяли константу диссоциации.

Азолы являются одними из эффективнейших ингибиторов цитохромов P450. Замещенные производные имидазола и триазола являются эффективными системными противогрибковыми препаратами. Изначально производные азолов, применяемые при лечении грибковых заболеваний включали в себя имидазолы (клотримазол, миконазол и кетоконазол), за которыми последовали триазолы 1-го (флуконазол и итраконазол) и, затем, 2-го поколения – производные флуконазола (вориконазол, равуконазол) и итраконазол (позаконазол). Азолы ингибируют у грибов фермент C14- $\alpha$ -деметилазу системы цитохрома P450, которая отвечает за конверсию ланостерола в эргостерол [12]. Это ведет к истощению эргостерола в мембране грибной клетки и ее гибели.

Активность *in vitro* у азолов варьирует и не всегда может совпадать с клинической активностью [13]. Азолы активны против *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Paraccoccidioides brasiliensis*; обычно резистентны к азолам *Candida glabrata*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* и зигомицеты. Здесь же следует отметить, что многие из азольных ингибиторов C14- $\alpha$ -деметилазы являются также и ингибиторами других изоформ цитохрома P450. В связи с этим информация о действии азольных ингибиторов на отдельные изоформы цитохрома P450 является важным фармакологическим показателем.

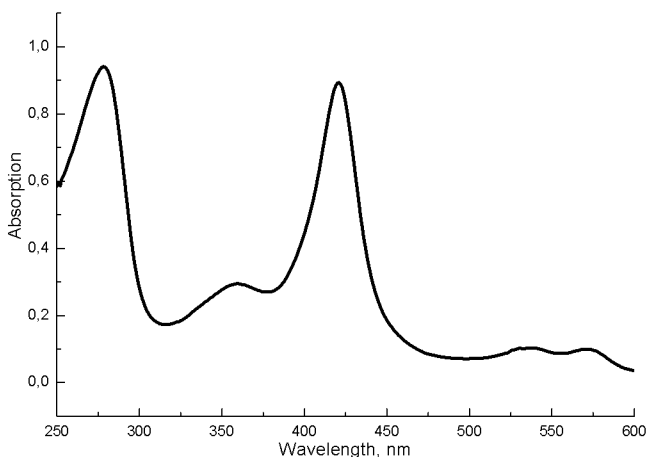
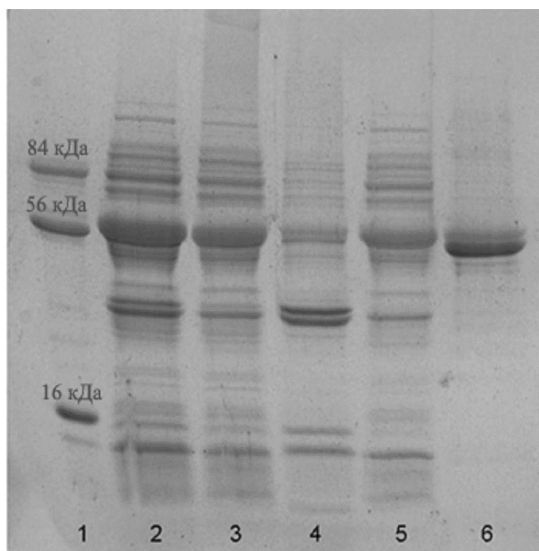


Рисунок 2 – Спектр поглощения препарата СУР7В1

1 – стандарт молекулярных масс; 2 – клеточный лизат; 3 – солюбилизованная фракция; 4 – несольбилизованная фракция; 5 – не связавшиеся с  $\text{Ni}^{2+}$ -IDA-белки; 6 – конечный препарат СУР7В1

Рисунок 1 – ДСН-электрофорез в 12% ПААГ препарата белка на различных стадиях очистки

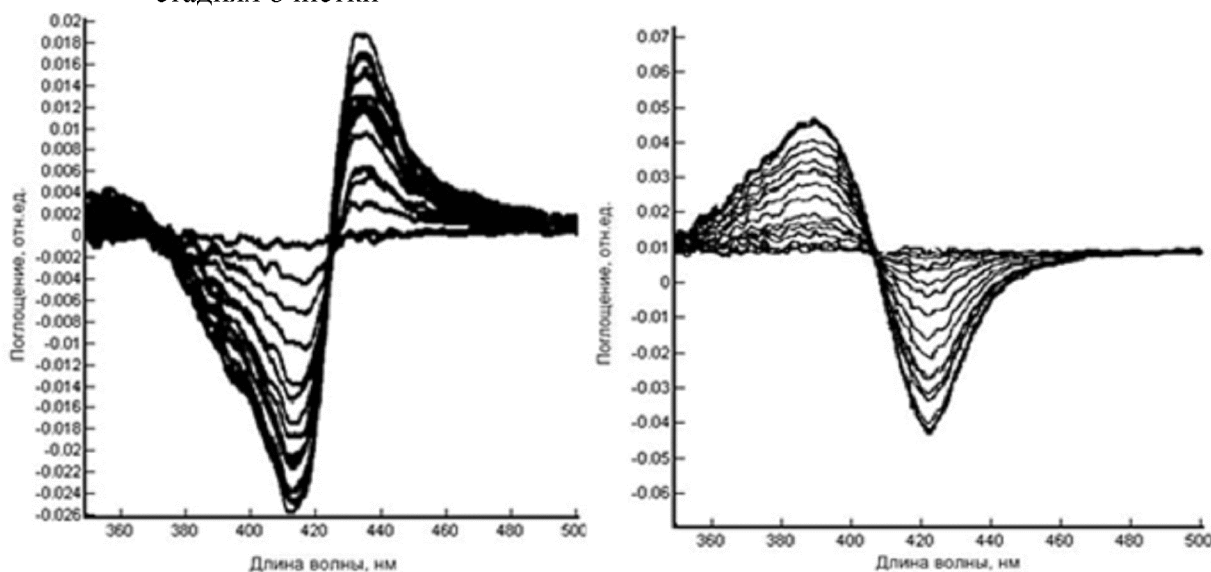


Рисунок 3 – Результаты спектрофотометрического титрования СУР7В1 эконазолом и 27-гидроксихолестерином

Из группы проанализированных азолов, как экспериментально продемонстрировано, эффективно связываются с СУР7В1 только 7, а 2 с достаточно низкой аффинностью. Среди указанных препаратов клотримазол и миконазол, открытые в 1969 г., плохо абсорбируются при приеме *per os*, при этом клотримазол не может быть введен парентерально и используется почти исключительно для местного лечения орального и вагинального кандидоза. Одно время выпускали препараты миконазола для внутривенного применения (дактарин), однако действие их было оценено как не вполне оптимальное, и

миконазол применяют преимущественно для лечения поверхностных микозов. Таким образом, указанные медицинские препараты на основе азолов, применяемые внутривенно или парентерально при длительном лечении микозов могут вызывать нарушения функции СУР7В1.

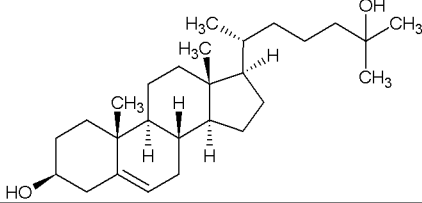
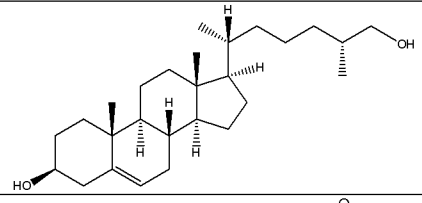
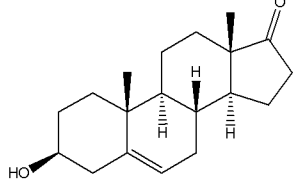
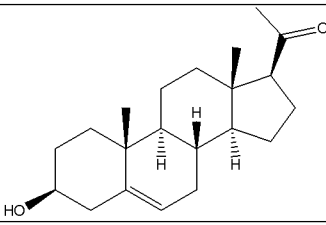
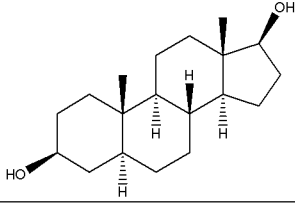
Таблица 1 – Параметры взаимодействия ряда азолов с СУР7В1

Лиганд	Структура	$\Delta A_{max}/nmol$	$K_d, \mu M$
Тебуконазол		0,067±0,002	0,1±0,004
Эконазол		0,064±0,002	0,65±0,003
Пропиконазол		0,059±0,004	0,13±0,005
Миконазол		0,051±0,002	0,23±0,005
Клотримазол		0,050±0,003	0,33±0,005
Бифоназол		0,043±0,004	0,43±0,004
Кетоконазол		0,042±0,002	0,56±0,008
Ципроконазол		0,031±0,004	3,2±0,005
Флуконазол		0,012±0,003	26±0,5

Исследования связывания стероидов СУР7В1 показали, что СУР7В1 связывает пять стероидов из обширной группы проанализированных, к числу которых относятся 25-гидроксихолестерин, 27-гидроксихолестерин, ДГЭА, прегненолон, 5 $\alpha$ -андростан-3,17 $\beta$ -диол (таблица 2). Эти данные совпадают с имеющимися в литературе сведениями о субстратах данного фермента. Из связывающихся с СУР7В1 стероидов 25- и 27-гидроксихолестерин, ДГЭА, 5 $\alpha$ -андростан-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -диол обладают достаточно высокой аффинностью к белку, что

следует из малых величин констант диссоциации. Связывание прегненолона с СYP7B1 характеризуется большим по величине значением константы диссоциации, почти на порядок превышающем величину, характерную для других стероидов. Здесь же следует отметить, что родственные соединения, к которым относятся 20-гидроксихолестерин, 22-гидроксихолестерин, 24-гидроксихолестерин не взаимодействуют с ферментом, что указывает на ключевую роль положения гидроксильной группы в связывании субстрата.

Таблица 2 – Параметры взаимодействия ряда стероидов с СYP7B1

Лиганд	Структура	$\Delta A_{max}/nmol$	$K_d, \mu M$
25-гидроксихолестерин		0,14±0,005	0,8±0,04
27-гидроксихолестерин		0,109±0,001	0,9±0,02
ДГЭА		0,099±0,002	2,7±0,05
прегненолон		0,036±0,004	8,3±0,07
5α-андростан-3,17β-диол		0,087±0,003	1,3±0,004

### Выводы

В данной работе впервые получен в гомогенном состоянии рекомбинантный цитохром P450 7B1. Проведен скрининг лигандов среди обширной группы азолов и стероидов. Среди 17-ти исследованных азолов, которые широко используются в медицине и промышленности, только миконазол, 4-фенилимидазол, бифоназол, клотримазол, кетоконазол, ципроконазол, тебуконазол, и эконазол связываются с СYP7B1. Из проверенных стероидов лигандами оказались 5α-холестан-3β,17β-диол, ДГЭА, прегненолон, 25- и 27-гидроксихолестерин. 5α-холестан-3β,17β-диол, ДГЭА, прегненолон, 25- и 27-гидроксихолестерин связываются с СYP7B1 с приблизительно одинаковой аффинностью. Константа диссоциации комплекса СYP7B1 с прегненолоном почти на порядок выше. Эти данные косвенно свидетельствуют о том, что, возможно, прогестерон конвертируется СYP7B1 медленнее, чем остальные субстраты. Дальнейшие исследования активности полученного фермента позволят прояснить выдвинутое предположение. Аффинность белка к ряду азолов больше чем к стероидным

субстратам, и, таким образом, эти азолы могут выступать эффективными ингибиторами активности CYP7B1.

### Список литературы

1. CYP7B1: one cytochrome P450, two human genetic diseases, and multiple physiological functions / A.R. Stiles [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2009. – Vol. 284. P. 28485–28489.
2. Cyp7b1 catalyses the 7 $\alpha$ -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in rat prostate / C. Martin [et al.] // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 355. – P. 509–515.
3. CYP7B1-mediated metabolism of dehydroepiandrosterone and 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol--potential role(s) for estrogen signaling / H. Pettersson [et al.] // *FEBS J.* – 2008. – Vol. 275. – P. 1778–1789.
4. Norlin, M. Expression of key enzymes in bile acid biosynthesis during development: CYP7B1-mediated activities show tissue-specific differences / M. Norlin // *J. Lipid. Res.* – 2002. – Vol. 43. – P. 721–731.
5. Early onset of puberty and early ovarian failure in CYP7B1 knockout mice / Y. Omoto [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 2814–2819.
6. Two novel CYP7B1 mutations in Italian families with SPG5: a clinical and genetic study / C. Criscuolo [et al.] // *J. Neurol.* – 2009. – Vol. 256. – P. 1252–1257.
7. Estrogen-mediated regulation of CYP7B1: a possible role for controlling DHEA levels in human tissues / W. Tang [et al.] // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 100. – P. 42–51.
8. Analysis of CYP7B1 in non-consanguineous cases of hereditary spastic paraplegia / R. Schule [et al.] // *Neurogenetics.* – 2009. – Vol. 10. – P. 97–104.
9. CYP7B1 mutations in pure and complex forms of hereditary spastic paraplegia type 5 / C. Goizet [et al.] // *Brain.* – 2009. – Vol. 132. – P. 1589–1600.
10. White matter lesions in spastic paraplegia with mutations in SPG5/CYP7B1 / R. Biancheri [et al.] // *Neuromuscul. Disord.* – 2009. – Vol. 19. – P. 62–65.
11. Porath, J. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions / J. Porath, B. Olin // *Biochemistry.* – 1983. – Vol. 22. – P. 1621–1630.
12. Yoshida, Y. Sterol 14  $\alpha$ -demethylase and its inhibition: structural considerations on interaction of azole antifungal agents with lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase (P-450(14DM)) of yeast / Y. Yoshida, Y. Aoyama // *Biochem. Soc. Trans.* – 1991. – Vol. 19. – P. 778–782.
13. Hitchcock, C.A. Cytochrome P-450-dependent 14  $\alpha$ -sterol demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals / C.A. Hitchcock // *Biochem. Soc. Trans.* – 1991. – Vol. 19. – P. 782–787.

### INTERACTION OF CYTOCHROME P450 7B1 WITH AZOLES AND STEROIDS

**A.V. Yantsevich, Ya.V. Dichenko, S.V. Shpak, N.V. Strushkevich, A.A. Gilep, S.A. Usanov**

*Institute of bioorganic chemistry of National academy of sciences of Belarus, Minsk, Belarus*

Cytochrome P450 7B1 converts endogenous substrates and play an important role in bile acid synthesis, in steroid hormone metabolism, metabolism of estrogen receptor ligands and immunoglobulin production. The activity of these enzyme in relation to different substrates unknown though this information may be useful for understanding physiological functions of these enzymes. In our work we screen a number of hydroxylated derivatives of cholesterol as potential substrates for the enzyme. As alternative active site probes we used azoles substituted with different steric groups. Among 17 azoles with different structures miconazole, 4-phenylimidazole, bifonazole, clotrimazole, ketoconazole, cyproconazole, tebuconazole and econazole effectively bind to CYP7B1. Among tested steroids CYP7B1 binds 25-hydroxycholesterol, 27-hydroxycholesterol, DHEA, pregnenolone, 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol.