

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

БИОАРГАНИЧНАЯ ХИМИЯ
BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 577.175.62+577.175.64
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-4-450-454>

Поступила в редакцию 20.03.2018
Received 20.03.2018

**Т. В. Шкель, И. П. Грабовец, А. А. Гилеп, Т. С. Варакса,
Н. В. Струшкевич, В. И. Долгопалец, Ю. Г. Чернов**

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

**БЕЛОК-ЛИГАНДНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ CYP51 CANDIDA GLABRATA
И CYP11B1 ЧЕЛОВЕКА С 7-ЗАМЕЩЕННЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ
19-НОРТЕСТОСТЕРОНОВ**

Аннотация. Изучено взаимодействие монооксигеназ человека и патогенных грибов с полученными ранее сложными эфирами изомерных 7-метил-19-нортегестеронов и ряда гетероароматических кислот – производных пиридина и пиазина. Показано взаимодействие с активным центром CYP11B1 производных стероидов андростанового ряда, содержащих метильную группу при C7 и остатки гетероароматических кислот при C17β.

Ключевые слова: цитохром P450, монооксигеназы, 7-метил-19-нортегестерон, 6-хлорникотиновая, 6-метоксиникотиновая, 2-хлорникотиновая, никотиновая и пиазинкарбоновая кислоты, стероиды, андрогены

Для цитирования. Белок-лигандные взаимодействия CYP51 *Candida glabrata* и CYP11B1 человека с 7-замещенными производными 19-нортегестеронов / Шкель Т. В. [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук. – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 450–454. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-4-450-454>

**T. V. Shkel, I. P. Grabovec, A. A. Gilep, T. S. Varaksa,
N. V. Strushkevich, V. I. Dolgopalets, Yu. G. Charnou**

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

**PROTEIN-LIGAND INTERACTIONS OF CYP51 CANDIDA GLABRATA
AND HUMAN CYP11B1 WITH 7-SUBSTITUTED 19-NORTESTOSTERONES**

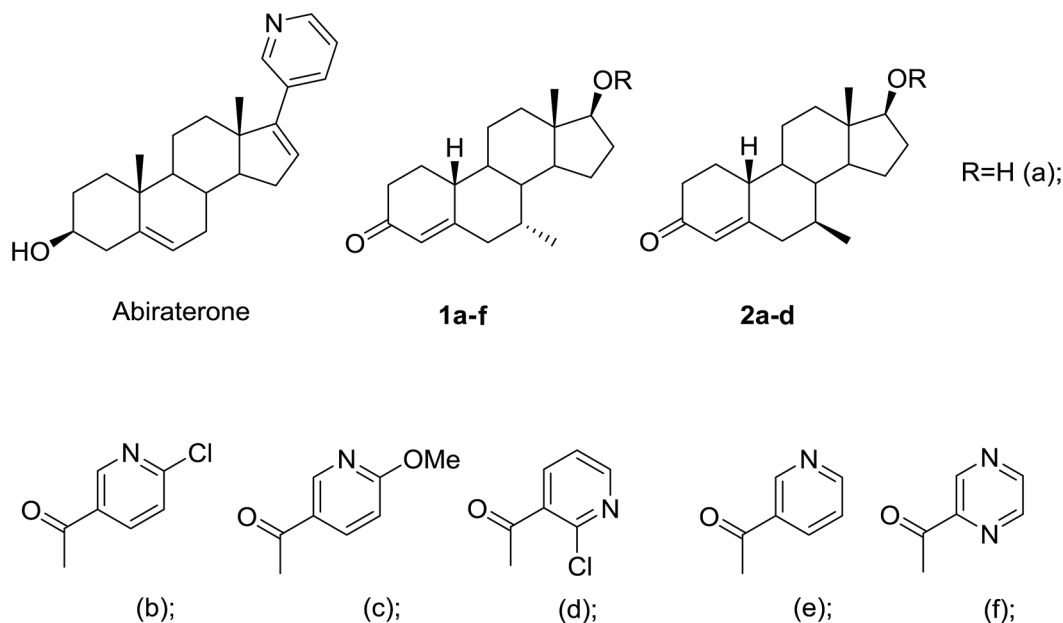
Abstract. The interaction of human monooxygenases and pathogenic fungi with previously obtained esters of isomeric 7-methyl-19-nor-testosterones and a number of heteroaromatic acids – derivatives of pyridine and pyrazine, was studied. Interaction with the active center of CYP11B1 derivatives of steroids of the androstane series containing methyl group at C7 and residues of heteroaromatic acids at C17β is shown.

Keywords: cytochrome P450, monooxygenases, 7-methyl-19-nortestosterone, 6-chloronicotinic, 6-methoxynicotinic, 2-chloronicotinic, nicotinic and pyrazincarboxylic acids, steroids, androgens

For citation. Shkel T. V., Grabovec I. P., Gilep A. A., Varaksa T. S., Strushkevich N. V., Dolgopalets V. I., Charnou Yu. G. Protein-ligand interactions of CYP51 *Candida glabrata* and human CYP11B1 with 7-substituted 19-nortestosterones. *Vesti Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2018, vol. 54, no. 4, pp. 450–454 (In Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2018-54-4-450-454>

На сегодняшний день существует лекарственный препарат «Абиратерон» [1], который представляет собой селективный ингибитор цитохрома P450 c17 (CYP17) – фермента, проявляющего 17α-гидроксилазную и C17, 20-лиазную активность. Фермент CYP17 участвует в биосинтезе андрогенов и эстрогенов в яичках, надпочечниках и предстательной железе, включая раковые клетки. Абиратерон представляет собой стероид, содержащий пиридиновый цикл при C17. В связи с этим представляется актуальной оценка связывания структурно подобных стероидов с активным центром других клинически значимых цитохромов P450 человека и патогенных микроорганизмов.

Ранее [2, 3] был получен и описан целый ряд сложных эфиров 7 α -метил-19-нортестостерона **1a** и его 7 β -изомера: 17 β -(6-хлорникотиноилокси)-7 α -метилэстр-4-ен-3-он **1b**, 17 β -(6-хлорникотиноилокси)-7 β -метилэстр-4-ен-3-он **2b**, 17 β -(6-метоксиникотиноилокси)-7 α -метилэстр-4-ен-3-он **1c**, 17 β -(2-хлорникотиноилокси)-7 α -метилэстр-4-ен-3-он **1d**, 17 β -(2-хлорникотиноилокси)-7 β -метилэстр-4-ен-3-он **2d**, 17 β -никотиноилокси-7 α -метилэстр-4-ен-3-он **1e** и 17 β -пиразинкарбонилокси-7 α -метилэстр-4-ен-3-он **1f**.



Наш интерес к такого рода соединениям обусловлен высокой биологической активностью веществ, имеющих в своей структуре как андростановый скелет, так и остатки фармакофорных гетероароматических кислот. Настоящая работа посвящена изучению биологической активности синтезированных веществ.

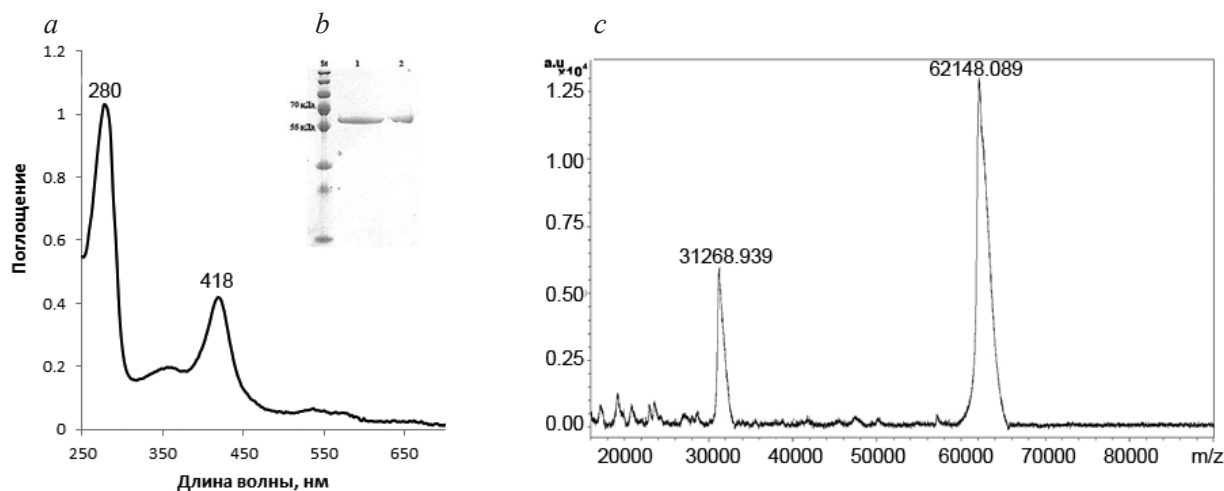


Рис. 1. Характеристика очищенного препарата рекомбинантного белка CYP51 патогенного гриба *C. glabrata*: *a* – спектр поглощения CYP51 патогенного гриба *C. glabrata*; *b* – электрофорез в 12 % ПААГ в денатурирующих условиях очищенного цитохрома CYP51 *C. glabrata*. St. – стандарт молекулярных масс, 1, 2 – фракции CYP51 после очистки на ГАП; *c* – результаты масс-спектрометрического анализа CYP51 патогенного гриба *C. glabrata*

Fig. 1. Characterization of the purified preparation of recombinant protein CYP51 of pathogenic *C. glabrata* fungus: *a* – the absorption spectrum of CYP51 pathogenic *C. glabrata* fungus; *b* – Electrophoresis in 12 % of PAAG under denaturing conditions of purified cytochrome CYP51 *C. glabrata*. St. – molecular weight standard, 1, 2 – fraction of CYP51 after purification by HAP; *c* – Results of mass spectrometry analysis of CYP51 pathogenic fungus *C. glabrata*

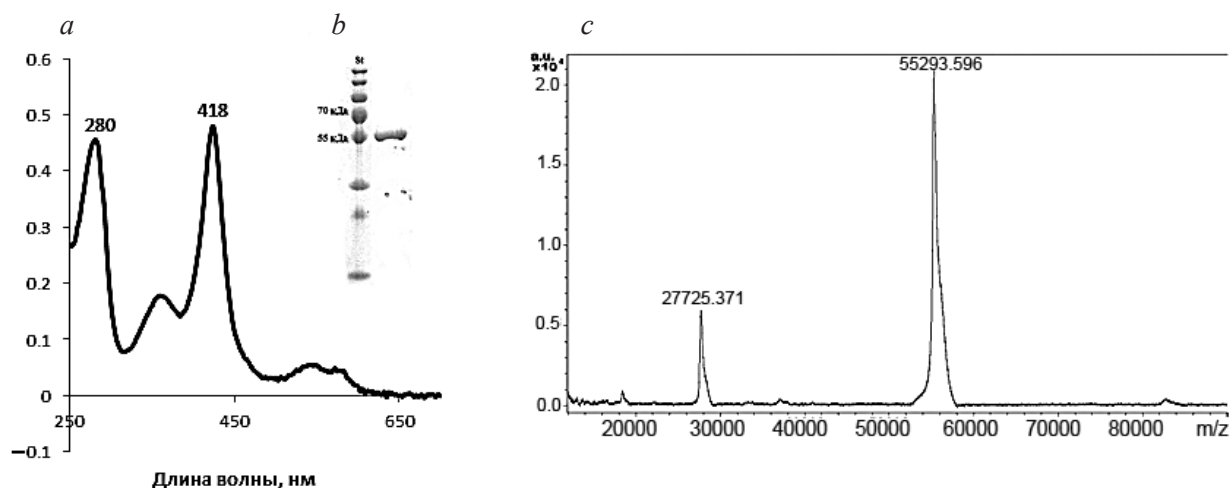


Рис. 2. Характеристика очищенного препарата рекомбинантного белка СYP11B1 человека: *a* – спектр поглощения СYP11B1 человека; *b* – электрофорез в 12 % ПААГ в денатурирующих условиях очищенного цитохрома СYP11B1 человека. St. – стандарт молекулярных масс, *l* – фракция СYP11B1 после диализа; *c* – результаты масс-спектрометрического анализа СYP11B1 человека

Fig. 2. Characterization of the purified recombinant human CYP11B1 protein preparation. *a* – Absorption spectrum of human CYP11B1; *b* – electrophoresis in 12 % of PAAG under the denaturing conditions of purified human cytochrome CYP11B1. St. – standard molecular weights, *l* – fraction CYP11B1 after dialysis; *c* – results of mass spectrometry analysis of human CYP11B1

В качестве объектов для изучения биологической активности были выбраны две монооксигеназы: СYP51 патогенного гриба *Candida glabrata* и СYP11B1 человека. Выбор объектов обусловлен необходимостью глубокого изучения данных ферментов для разработки противогрибковых препаратов и лечения заболеваний, связанных с гиперсинтезом глюкокортикоидов, а также высоким структурным подобием синтезированных соединений с субстратами данных ферментов. Кроме того, оценка связывания гомологичных соединений с ферментами позволит оценить топологию активного центра данных монооксигеназ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка СYP51 патогенного гриба *Candida glabrata*. Культивирование клеток *E. coli* DH5 α , содержащих экспрессионный вектор, осуществлялось в орбитальном термостатируемом шейкере при 22 °С и 160 об/мин. Через 48 ч экспрессии клетки охлаждали на льду в течение 1 ч и после этого осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин. Осадок ресуспендировали в буфере А (50 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 20 % глицерина, 0,3 М NaCl), содержащем 0,5 мМ ФМСФ (1 объем клеток на 4 объема буфера). К суспензии клеток после экспрессии добавляли 0,1 мМ ФМСФ и ионный детергент CHAPS до конечной концентрации 0,2 %. Затем клетки разрушали с использованием гомогенизатора Emulsiflex C5. СYP51 солюбилизировали из мембран добавлением ионного детергента CHAPS к суспензии бактериальных клеток до конечной концентрации 1 %. Детергент добавляли медленно, по каплям, при постоянном перемешивании на магнитной мешалке при 4 °С. Суспензию центрифугировали в течение 1 ч при 18500 об/мин для осаждения мембран. После центрифугирования к супернатанту добавляли 1,4 мМ β -меркаптоэтанола. Затем супернатант предварительно пропускали через колонку с DEAE-целлюлозой для избавления от примесей, которые не могут быть удалены при металл-аффинной хроматографии, и элюат наносили на колонку с Ni NTA-агарозой, уравновешенной в буфере А. Затем колонку промывали 15 объемами буфера А с добавлением 0,2 % CHAPS, 25 мМ имидазола, 1,4 мМ β -меркаптоэтанола (буфер Б). Белок элюировали с колонки буфером Б, содержащем 250 мМ имидазола. Окрашенные фракции собирали, разводили в 10 раз 5 мМ калий-фосфатным буфером (рН 7,4), содержащим 0,3 М NaCl, 20 % глицерин, 0,2 % CHAPS, 0,1 мМ ди-тиотреитола (буфер С), а затем наносили на колонку с гидроксиапатитом. Предварительно колон-

ку промывали 5 объемами буфера С. После нанесения разведенного элюата колонку промывали 15 объемами буфера С, содержащего 10 мМ калий-фосфатного буфера, рН 7,4. Белок элюировали с колонки повышением концентрации калий фосфата до 600 мМ. Собранные фракции препарата хранили при -75°C . Фермент обладал характеристическим спектром цитохрома P450 и практически не содержал белковых примесей.

Выделение и очистка СYP11B1 человека. Выделение и очистка СYP11B1 человека проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [3]. Полученный фермент обладал характеристическим спектром цитохрома P450 и практически не содержал белковых примесей.

Оценка взаимодействия стероидов с активным центром монооксигеназ. Проведен анализ взаимодействия СYP51 патогенного гриба *Candida glabrata* и СYP11B1 человека с новыми производными 7 α - и 7 β -метил-19-нортестостерона. К раствору исследуемых белков объемом 250 μl с конечной концентрацией цитохромов P450 3 μM добавляли 1 μl раствора тестируемого соединения с концентрацией 0,01 М (конечная концентрация соединения в растворе – 40 μM), затем регистрировали спектр поглощения в диапазоне 350–450 нм. В качестве контроля в отдельные лунки плашки вносили раствор белка с добавлением 40 μM субстрата (эбурикол для СYP51 и дезоксикортизол для СYP11B1). В ходе анализа выявлено связывание СYP11B1 с соединениями **1af**, **2b** и **2d** на микромолярном уровне. $Kd_{\text{каж}} \leq 10$ мкМ. Со всеми исследованными соединениями наблюдался спектральный ответ I типа. В отношении СYP51 патогенного гриба *Candida glabrata* взаимодействия с исследуемыми веществами не наблюдалось. Это может быть связано с тем, что исследованные стероиды не содержат метильной группы при C14 и содержат метильную группу при C7, что препятствует связыванию синтезированных соединений с активным центром данной монооксигеназы.

Выводы. В результате анализа взаимодействия 7-замещенных 19-нортестостеронов с активным центром монооксигеназ человека и патогенных грибов было показано, что с активным центром СYP11B1 человека связываются производные стероидов андростанового ряда, содержащих метильную группу при C7 и остатки гетероароматических кислот при C17 β , а именно: 7 α -метил-19-нортестостерон, 17 β -(6-хлорникотиноилокси)-7 α -метилэстр-4-ен-3-он, 17 β -(6-хлорникотиноилокси)-7 β -метилэстр-4-ен-3-он, 17 β -(6-метоксиникотиноилокси)-7 α -метилэстр-4-ен-3-он, 17 β -(2-хлорникотиноилокси)-7 α -метилэстр-4-ен-3-он, 17 β -(2-хлорникотиноилокси)-7 β -метилэстр-4-ен-3-он, 17 β -никотиноилокси-7 α -метилэстр-4-ен-3-он и 17 β -пиразинкарбонил-окси-7 α -метилэстр-4-ен-3-он.

Список использованных источников

1. Redirecting abiraterone metabolism to fine-tune prostate cancer anti-androgen therapy / Z. Li [et al.] // Nature. – 2016. – Vol. 533. – P. 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature17954>
2. Ковганко, Н. В. Синтез 6-хлор(метокси)никотинатов 7 α -метил-19-нортестостерона / Н. В. Ковганко, Ю. Г. Чернов, Ж. Н. Кашкан // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. 2015. – № 4 – С. 50–54.
3. Ковганко, Н. В. Синтез 2-хлорникотинатов, никотината и пиразиноата 7-замещенных 19-нортестостеронов / Н. В. Ковганко, В. И. Долгопалец, Ю. Г. Чернов // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2018. – № 1 – С. 90–96.
4. Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition / N. V. Strushkevich [et al.] // Mol Endocrinol. – 2013 – Vol. 27, № 2. – P. 315–324. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1287>

References

1. Li Z., Alyamani M., Li J., Rogacki K., Abazeed M., Upadhyay S. K., Balk S. P., Taplin M. E., Auchus R. J., Sharifi N. Redirecting abiraterone metabolism to fine-tune prostate cancer anti-androgen therapy. *Nature*, 2016, vol. 533, pp. 547–551. <https://doi.org/10.1038/nature17954>
2. Kauhanka M. N., Charnou Yu. G., Kashkan Zh. N. Synthesis of 7 α -methyl-19-nortestosterone 6-chloro(methoxy) nicotines. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical Series*, 2015, no. 4, pp. 50–54 (in Russian).
3. Kauhanka M. U., Dolgopalets V. I., Charnou Yu. G. Synthesis of 2-chloronicotines, nicotine and pirazinoate of 7-substituted 19-nortestosterones. *Vestsi Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seriya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Chemical Series*, 2018, no. 1, pp. 90–96 (in Russian).
4. Strushkevich N. V., Gilep A. A., Shen L., Arrowsmith C. H., Edwards A. M., Usanov S. A., Park H. W. Structural insights into aldosterone synthase substrate specificity and targeted inhibition. *Molecular Endocrinology*, 2013, vol. 27, no. 2, pp. 315–324 <https://doi.org/10.1210/me.2012-1287>

Информация об авторах

Шкель Татьяна Владимировна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tvshkel@gmail.com

Грабовец Ирина Петровна – науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: grabovec-irina@mail.ru

Гилеп Андрей Александрович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: agilep@yahoo.com

Варакса Татьяна Сергеевна – мл. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: varaksa.tanya@gmail.com

Струшкевич Наталья Владимировна – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: natstrush@gmail.com

Долгопалец Владимир Ильич – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vid@iboch.by

Чернов Юрий Германович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник, Институт биоорганической химии, Национальная академия наук Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: chernov@iboch.by

Information about the authors

Tatsiana V. Shkel – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tvshkel@gmail.com

Irina P. Grabovec – Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grabovec-irina@mail.ru

Andrei A. Gilep – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: agilep@yahoo.com

Tatsiana S. Varaksa – Junior Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: varaksa.tanya@gmail.com

Natallia V. Strushkevich – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: natstrush@gmail.com

Vladimir I. Dolgopalets – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vid@iboch.by

Yuri G. Charnou – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chernov@iboch.by