

БИОХИМИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 577.175.5

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ БИОСИНТЕЗА СТЕРОИДОВ НА БИОТРАНСФОРМАЦИЮ ПРОГЕСТЕРОНА РЕКОМБИНАНТНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ ЭКСПРЕССИРУЮЩИМИ ЦИТОХРОМ P450c17

В.М. Шкуматов¹, Е.В. Усова¹, Н.С. Фролова¹, Г. Барт², Ш. Мауерсбергер²

¹Учреждение Белорусского государственного университета
“Научно-исследовательский институт физико-химических проблем”,
ул.Ленинградская 14, Минск, 220050 Беларусь;

тел./факс: (375-17) 209-5461; эл. почта: biopharm@bsu.by

²Институт микробиологии Технологического университета Дрездена,
Дрезден, Германия

С использованием рекомбинантных микроорганизмов *S. cerevisiae* GRF18YEp5117 α , экспрессирующих цитохром P450c17 из коры надпочечников быка, исследовано влияние ряда модификаторов биосинтеза стероидов на соотношение реакций 17 α -гидроксилирования прогестерона и 20 α -восстановления. Дексаметазон и метирапон не оказывали влияния как на реакцию 17 α -гидроксилирования прогестерона, так и на реакцию 20 α -восстановления 17 α -гидроксипрогестерона. Мифепристон и даназол не модифицировали ковалентно аминокислотные остатки цитохрома P450c17 или его гемовую группу в условиях проведения биотрансформации прогестерона рекомбинантными дрожжами. Кетоконазол, мифепристон и даназол действовали как низкоаффинные конкурентные ингибиторы, а 20-дигидропроизводные прогестерона являлись ингибиторами смешанного типа для цитохрома P450c17. Все использованные модификаторы не влияли на функциональные свойства дрожжевого аналога 20 α -гидроксистероид дегидрогеназы. По увеличению влияния на каталитические параметры цитохрома P450c17 примененные модификаторы можно расположить в следующий ряд: 20 β -дигидропрогестерон (максимальный эффект) > мифепристон = кетоконазол > 20 α -дигидропрогестерон > даназол > дексаметазон, метирапон (без эффекта).

Ключевые слова: цитохром P450c17, 17 α -гидроксилирование, 20 α -восстановление, рекомбинантные микроорганизмы.

ВВЕДЕНИЕ. Многофункциональная ферментная система 17 α -гидроксилаза-17,20-лиаза с цитохромом P450c17 (далее P450c17) в качестве терминальной оксидазы обеспечивает в клетках коры надпочечников человека разветвление путей биосинтеза на 17-дезоксиды (минералкортикоиды) и 17 α -гидроксикортикостероиды (глюкокортикоиды), а также катализирует реакцию расщепления связи C₁₇-C₂₀, ведущую к образованию половых гормонов [1-4]. Проявление множественных активностей одной протомерной формой белка характерно также и для других цитохромов P450, участвующих в биосинтезе стероидов, в частности, это обосновано при установлении первичной структуры P450ssc и изучении его структурно-функциональной организации [5,6].

Системы гетерологической экспрессии P450c17 млекопитающих в клетках микроорганизмов используются по ряду направлений. Первое связано с синтезом,

выделением и очисткой P450c17 для изучения роли природных или направленных замен в первичной структуре этого белка, сопровождающихся нарушением гидроксилазной или лиазной реакций [7-9]. Второе направление предусматривает использование гетерологической экспрессии для создания модельных систем для поиска эффективных ингибиторов P450c17 и изучения действия различных лекарств на ферменты биосинтеза стероидов [10-12]. В рамках третьего направления осуществляется конструирование рекомбинантных микроорганизмов, способных к направленным биотрансформациям стероидных субстратов [13-16]. Ранее мы описали гетерологическую экспрессию P450c17 в дрожжах под контролем промотора *GAL10*. Экспрессированный P450c17 был функционально сопряжен с собственной цитохром P450-редуктазой дрожжей с уровнем числа оборотов *in vivo* 10-20 мин⁻¹ [17,18].

В последнее время широко исследуется полиморфизм гена CYP17 и его связь с риском развития рака. Установлено, что аллель A2 гена CYP17 имеет повышенную скорость транскрипции, что выражается в увеличении образования андрогенов и эстрогенов и может привести к развитию синдрома поликистозных яичников, рака простаты и молочной железы. Терапия рака предстательной железы предполагает использование препаратов, понижающих биосинтез половых гормонов – антиандрогенов, некоторые из которых являются ингибиторами P450c17. Рекомбинантный штамм *S. cerevisiae* YEp5117α можно рассматривать как новую модель для изучения действия различных модификаторов биосинтеза стероидов, в том числе и вновь синтезируемых ингибиторов P450c17, поскольку рекомбинантные дрожжи сочетают как биосинтетическую функцию 17α-гидроксилирования, так и инактивирующую стероиды функцию 20-восстановления.

В настоящей работе использованы различные по механизму действия модификаторы биосинтеза стероидов: антагонист рецепторов прогестерона (мифепристон), агонист глюкокортикоидных рецепторов (дексаметазон) [19-21], ингибиторы цитохромов P450 различной субстратной специфичности (кетоконазол, метирапон, даназол) [21,22], а также изомерные 20-дигидропроизводные субстрата для P450c17 - прогестерона. Цель работы заключалась в изучении влияния указанных выше модификаторов биосинтеза стероидов на соотношение реакций 17α-гидроксилирования прогестерона и 20-восстановления с использованием рекомбинантных микроорганизмов.

МЕТОДИКА. В работе использованы: прогестерон, 17α-гидроксипрогестерон, даназол, кетоконазол (цис-1-ацетил-4-[4-[[2-(2,4-дихлорфенил)-2-(1H-имидазол-1-ил-метил)-1,3-диоксолан-4-ил]метокси]фенил]пиперазин), мифепристон или RU-486 (11β,17β)-фенил-17-гидрокси-17-(1-пропинил)-эстра-4,9-диен-3-он), дексаметазон (9-фторо-11β,17,21-тригидрокси-16-метилпрегна-1,4-диен-3,20-дион), метирапон (2,3-бис(3-пиридил)-2-метил-пропанон-3), 20α-дигидропрогестерон, 20β-дигидропрогестерон (“Sigma”, США), среда YPD (“Difco”, США).

Рекомбинантные микроорганизмы и получение микросом. кДНК, кодирующая P450c17 из микросом коры надпочечников быка, была клонирована в челночный вектор YEp51 (LEU2, 2м ARS). Автономно реплицирующийся мультикопийный вектор YEp5117α был встроен в штамм *Saccharomyces cerevisiae* GRF18 и приводил к экспрессии P450c17. Конструирование штаммов, получение микросомальной фракции, оценку функциональной экспрессии, идентификацию целевого и побочных продуктов осуществляли как описано ранее [17,18].

Биотрансформация прогестерона рекомбинантными микроорганизмами в присутствии модификаторов биосинтеза стероидов. Через 24 часа после индукции синтеза P450c17 D-галактозой и культивирования на богатой неселективной среде YP-галактоза [17] добавляли модификаторы в концентрации 100 мкМ и через 2 часа прогестерон в концентрации 100 мкМ. Биотрансформацию осуществляли в колбах емкостью 200 мл при 28-29°C, 200 об/мин в

термостатируемом шейкере. Через определенные интервалы времени из инкубационной среды отбирали 1 мл, клетки отделяли центрифугированием, надосадочную жидкость экстрагировали этилацетатом и объединенную органическую фазу упаривали на ротаторном испарителе. Сухой остаток растворяли в 500 мкл метанола и анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографической системе LC-10AT (“Shimadzu”, Япония). Для регистрации использовали УФ-детектор с диодной матрицей SPD-M10A. Процесс хроматографии и его обработку осуществляли с помощью программного обеспечения CLASS-VP (“Shimadzu”).

Влияние модификаторов на функциональную активность P450c17. Микросомы дрожжей, содержащие 0,02 мкМ P450c17, инкубировали при 37°C с прогестероном (0,25-2,0 мкМ) в объеме 200 мкл 50 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7,2). К пробам было добавлено по 100000 имп/мин [³H]прогестерона (21,5 Ки/ммоль, “Amersham Pharmacia Biotech”, Англия). Модификаторы (2-120 мкМ) добавляли к реакционной смеси за 10 мин до начала реакции, которую инициировали добавлением NADPH (200 мкМ) и проводили в течение 10 мин. Стероиды экстрагировали из реакционной среды этилацетатом, концентрировали упариванием и анализировали методом ТСХ на пластинках с силикагелем (“Merck UV-254”, Германия), используя хроматографическую систему бензол - ацетон (4:1, по объёму). Радиоактивно меченные стероиды визуализировали добавлением перед ТСХ к пробам стандартов прогестерона, 17 α -гидроксипрогестерона, 17 α ,20 α -дигидроксипрегн-4-ен-3-она, и определяли их содержание с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика Mark III (“Tracor Analytic”, США). Значения максимальной скорости реакции (V_{max}) и константы Михаэлиса (K_m) определяли в координатах Лайнуивера-Берка. Значения констант ингибирования и характер ингибирования определяли согласно [23].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 1 приведена схема биотрансформации прогестерона рекомбинантными микроорганизмами *S. cerevisiae* GRF18YEр5117 α и структуры некоторых модификаторов биосинтеза стероидов. В отличие от систем прокариотической экспрессии P450c17 в бактериях *E. coli* [10,22], в рекомбинантных дрожжах прогестерон подвергался двум последовательным ферментативным превращениям: 17 α -гидроксилированию и 20-кето-восстановлению. Биосинтетическую функцию 17 α -гидроксилирования прогестерона выполняет P450c17, функционально сопряженный с дрожжевой NADPH-цитохром P450-редуктазой [17], которая отсутствует в системе прокариотической экспрессии. Инактивирующую стероиды функцию 20-восстановления осуществляет дрожжевой аналог 20 α -гидроксистероид дегидрогеназы (20-ГСД) [16-18], который до сих пор не обнаружен в клетках *E. coli*. Использование приведенных на рисунке 1 модификаторов в наших экспериментах было обусловлено тем, что при гетерологической экспрессии в дрожжах P450c17 подвергается непродуктивным циклам восстановления-окисления с образованием кислород-содержащих радикалов, способных активировать даназол и мифепристон. Последние, благодаря активации ацетиленовой группы и структурному сходству с прогестероном, могут модифицировать аминокислотные остатки активного центра или ковалентно связываться с гемом P450c17 [24, 25]. Кетоконазол, широко используемый антигрибковый препарат, – обладает повышенной избирательностью к дрожжевому цитохрому P450, осуществляющему 14-деметилование ланостерина, и применяется до сих пор как стандарт для оценки ингибирующего действия различных соединений на P450c17 [22]. На рисунке 2 представлены хроматограммы, иллюстрирующие изменение концентрации стероидных продуктов во внеклеточной среде при биотрансформации прогестерона рекомбинантными дрожжами *S. cerevisiae* YEр5117 α (контроль) и с предварительным добавлением даназола, мифепристона и кетоконазола. Установлено, что на начальных этапах биотрансформации действие даназола,

мифепристона и кетоконазола характеризовалось уменьшением образования 17α -гидроксипрогестерона (II) и потребления прогестерона (I) (рис. 2). Замедленная трансформация прогестерона является результирующей двух последовательных процессов - 17α -гидроксилирования и 20α -восстановления. При соотношении [модификатор]/[P450c17] 1000:1 и [модификатор]/[прогестерон] 1:1 в условиях *in vivo* не было зафиксировано необратимого ингибирования P450c17 за счет ковалентного связывания даназола или мифепристона в активном центре гемопroteина, так как наблюдалось образование целевого продукта (II). Даназол и мифепристон, имеющий как и стероид (II) сопряженную Δ^4 -3-кето-структуру и 17 -ОН группу, не модифицировали также ковалентно дрожжевой аналог 20α -ГСД, так как соотношение 17α -гидроксипрогестерона (II) и $17\alpha,20\alpha$ -дигидроксипрегн-4-ен-3-она (III) на начальных этапах было одинаковым как для контрольного эксперимента, так и для биотрансформаций в присутствии модификаторов (рис. 2). Спектрофотометрическим анализом элюционных кривых при ВЭЖХ во внеклеточной среде не обнаружено заметных количеств возможных метаболитов даназола и мифепристона. Известно, что даназол способен подвергаться микробиологической трансформации с раскрытием изоксазолового кольца с образованием 17β -гидрокси-2-(гидроксиметил)- 17α -4-ен-20-ин-3-она и дополнительного дегидрирования по кольцу А стероидного скелета с образованием 17β -гидрокси-2-(гидроксиметил)- 17α -1,4-диен-20-ин-3-она [24]. Метаболизм мифепристона с помощью цитохрома P450 (CYP3A4) сопровождается *N*-деметилованием 11β -диметиламинофенильной группы и гидроксилированием 17α -пропинильной группы [25,26]. Только для мифепристона мы обнаружили с выходом менее 5% более полярный продукт, идентификация которого является предметом последующих исследований.

Анализ изменения концентрации стероидных продуктов и модификаторов позволил установить, что скорость транспорта прогестерона внутрь клеток уменьшилась при предварительном добавлении модификаторов: время полупревращения для прогестерона составило 1,5 час в контрольном эксперименте и 9-10 час для биотрансформаций в присутствии модификаторов (рис. 3). Более медленным по сравнению с контролем было достижение максимальных выходов стероида (II) при введении в среду модификаторов. Так, выход этого продукта (II) достигал 75% уже через 6 часов в контрольном эксперименте, в то время как в присутствии модификаторов его максимальный выход составлял 50% после 12-16 часов биотрансформации прогестерона. Применение модификаторов способствовало увеличению лаг-фаз образования стероида (III). Приведенные результаты по кинетике изменения концентрации стероидных продуктов подтверждают последовательность реакций образования стероидов: $I \rightarrow II \rightarrow III$ (рис. 3). Установлено, что в течение первых двух часов инкубации концентрации внеклеточного и внутриклеточного пулов модификаторов достигали эквивалентных величин с последующей медленной фазой поглощения в течение 24 час. Достигнутые избытки модификаторов над P450c17 внутри клетки должны были привести в случае химической модификации белка производными даназола и мифепристона к полной необратимой инактивации экспрессируемого гемопroteина. Полученные результаты означают, что даназол и мифепристон, поступая в клетки, не ингибируют ковалентно P450c17 и дрожжевой аналог 20α -ГСД, но связываются с внутриклеточными структурами. Даназол и мифепристон не изменили также уровня экспрессии аналога 20α -ГСД. При этом нельзя исключить, что возможные внутриклеточные продукты метаболизма даназола и мифепристона, например, гидроксилированные производные или α,β -ненасыщенные кетоны, получаемые в результате отщепления 17 -гидроксигруппы с образованием электрофильного акцептора Михаэля, могли индуцировать синтез дегидрогеназ [27], например, 1-ацилдигидроксиацетонфосфат-редуктазы, функционального аналога 17β -гидроксистероид-дегидрогеназы млекопитающих [28]. Замедленное

образование 17α -гидроксипрогестерона (II) под действием кетоконазола на начальном этапе биотрансформации прогестерона отражает процесс замещения субстратом связанного с железом гема P450c17 имидазол-содержащего соединения – кетоконазола без его влияния на функциональные свойства аналога 20α -ГСД. Полученные результаты свидетельствуют, что действие даназола, мифепристона и кетоконазола направлено на реакцию 17α -гидроксилирования, и прежде всего уровень образования стероида (II) сказывается на индукции синтеза дрожжевого аналога 20α -ГСД.

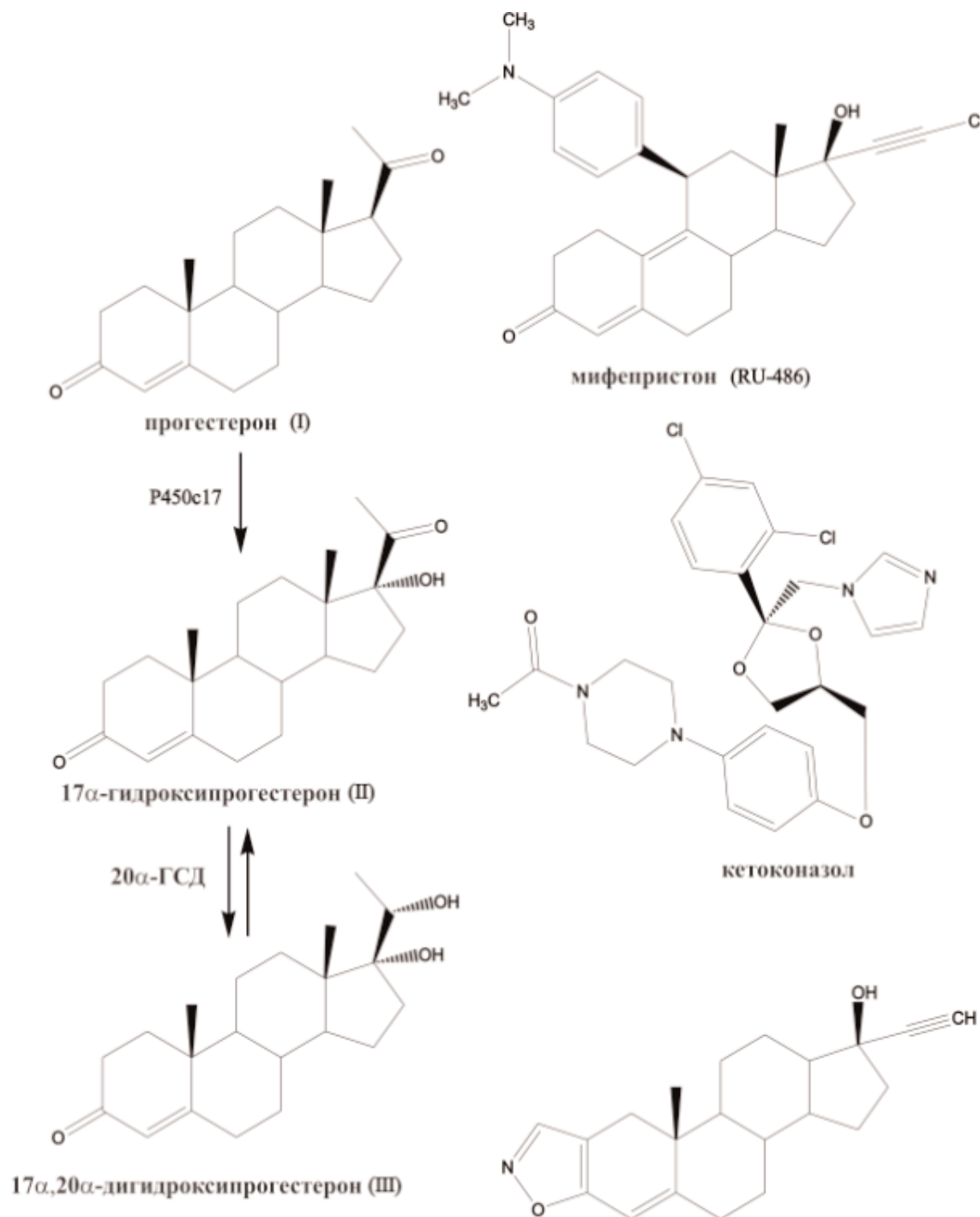


Рисунок 1.

Ферментативные превращения прогестерона в рекомбинантных дрожжах *S. cerevisiae* GRF18YEp5117 α и структурные формулы некоторых модификаторов биосинтеза стероидных гормонов.

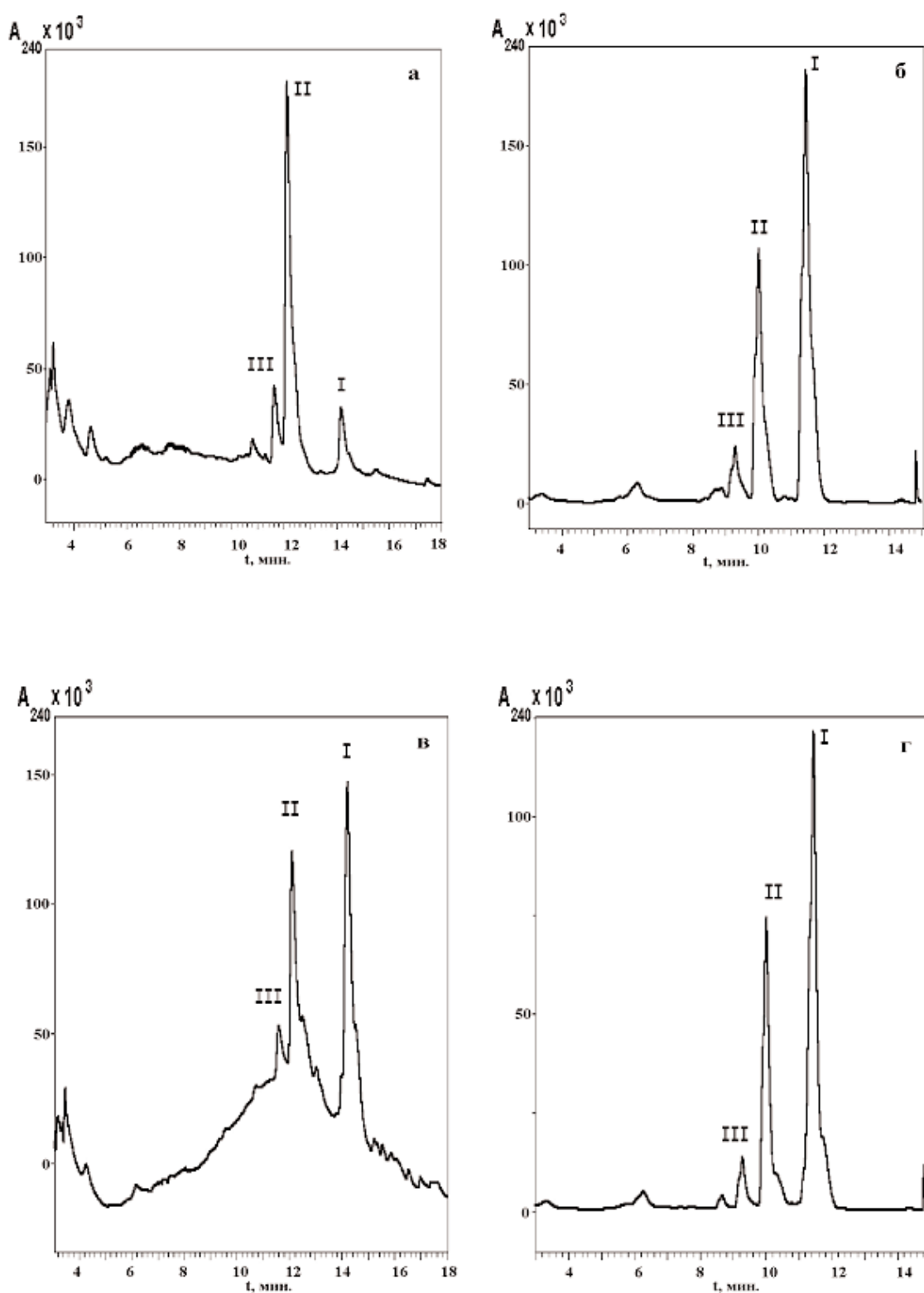


Рисунок 2.

ВЭЖХ стероидных продуктов, образующихся при биотрансформации прогестерона индуцированными D-галактозой клетками рекомбинантного штамма *S. cerevisiae* GRF18YEp5117α через 6 часов инкубации без добавления модификаторов (а), в присутствии даназола (б), мифепристона (в) и кетоконазола (г). Модификаторы добавлены в концентрации 100 мкМ за 2 часа до добавления прогестерона (100 мкМ). Пик I – исходный субстрат [прогестерон (I)], пик II – 17α-гидроксипрогестерон (II) (продукт функционирования P450c17), пик III – 17α,20α-дигидроксипрегн-4-ен-3-он (III) (продукт функционирования аналога 20α-ГСД).

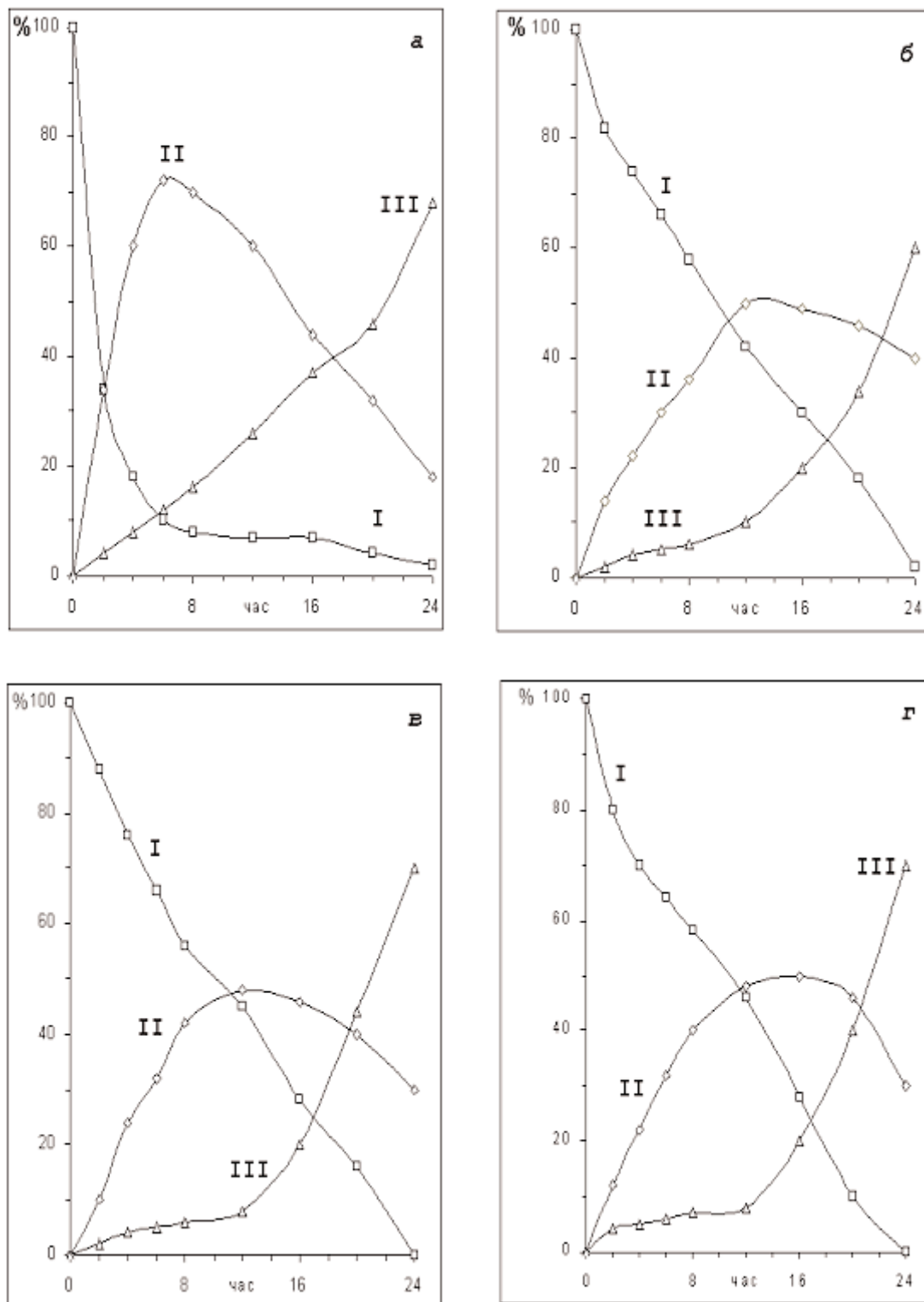


Рисунок 3.

Изменение содержания стероидов при биотрансформации прогестерона в отсутствие модификаторов (а) и в присутствии даназола (б), мифепристона (в) и кетоконазола (г) рекомбинантными дрожжами *S. cerevisiae* GRF18YEp5117α. Обозначения стероидов как на рисунках 1 и 2.

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ НА БИОТРАНСФОРМАЦИЮ ПРОГЕСТЕРОНА

Для установления прямого или опосредованного механизмов действия модификаторов, в дальнейших экспериментах использовали мембранную фракцию, содержащую P450c17. Цитохром P450c17 быка характеризуется преимущественной активностью по 17 α -гидроксилированию прогестерона; C17,20-лиазная реакция носит минорный характер [1,2]. Поэтому предложенная нами модель для оценки действия модификаторов позволяет однозначно указать характер действия модификаторов именно на первую реакцию 17 α -гидроксилирования. Кинетические параметры 17 α -гидроксилирования приведены в таблице 1; идентификация продуктов осуществлена ВЭЖХ и ТСХ-радиохроматографией. Образование 17 α ,20 α -диола (III) в условиях проведения реакций с микросомальной фракцией было незначительным и не учитывалось при оценке профиля стероидных продуктов. Агонист рецепторов глюкокортикоидов – дексаметазон, и ингибитор стероидтрансформирующего цитохрома P45011 β – метирапон, практически не изменяли эффективность 17 α -гидроксилирования прогестерона, так как значения V_{\max}/K_m для этих модификаторов соответствовали контрольным величинам. Наибольший ингибирующий эффект на P450c17 в использованной системе оказывал 20 β -дигидропрогестерон, применение которого давало значение V_{\max}/K_m 0,42, в то время как 20 α -изомер оказывал значительно меньший эффект (табл. 1). При использовании 20-стереоизомеров дигидропрогестерона было установлено, что P450c17 не осуществляет прямой реакции 17 α -гидроксилирования этих субстратов, поскольку образования соответствующих 17 α ,20(α,β)-диолов не было обнаружено. По увеличению влияния на каталитические параметры P450c17 примененные модификаторы можно расположить в следующий ряд: 20 β -дигидропрогестерон (максимальный эффект, V_{\max}/K_m 0,42) > мифепристон = кетоконазол > 20 α -гидроксипрогестерон > даназол > дексаметазон, метирапон (без эффекта, V_{\max}/K_m 7,2 и 7,4). Относительно низкие эффекты даназола, мифепристона и кетоконазола обусловлены низким структурным подобием этих модификаторов и исходного субстрата прогестерона. Необходимо отметить, что дополнительное введение уже одной гидроксильной группы (11 α -, 11 β -, 21-) в молекулу прогестерона приводит к резкому уменьшению или к отсутствию 17 α -гидроксилазной активности гетерологично экспрессированного P450c17 [17].

Таблица 1. Влияние модификаторов на 17 α -гидроксилирование прогестерона микросомальной фракцией из *S. cerevisiae* GRF18YEр5117 α , содержащей P450c17 коры надпочечников быка.

Модификатор (25 мкМ)	V_{\max} (мин ⁻¹)	K_m (мкМ)	V_{\max}/K_m
Контроль	8,3	1,1	7,5
Даназол	7,0	1,5	4,7
Мифепристон	7,9	1,5	5,3
Кетоконазол	7,5	4,0	1,9
Дексаметазон	8,6	1,2	7,2
Метирапон	7,4	1,0	7,4
20 β -дигидропрогестерон	2,5	6,0	0,42
20 α -дигидропрогестерон	7,0	2,5	2,8

Примечание: здесь и в таблице 2 представлены средние значения трёх опытов.

Для определения механизма ингибирующего действия модификаторов определены кинетические параметры 17α -гидроксилирования прогестерона в присутствии различных концентраций модификаторов. В качестве иллюстрации этой серии экспериментов на рисунке 4 представлены данные по изменению начальных скоростей образования 17α -гидроксипрогестерона от концентрации прогестерона в присутствии кетоконазола. Из этого рисунка следует, что кетоконазол является конкурентным обратимым ингибитором со значением K_i 15 мкМ. Аналогичным образом определены значения K_i для других модификаторов (табл. 2). При этом даназол, мифепристон и кетоконазол определены как конкурентные ингибиторы, а дигидропроизводные прогестерона – как ингибиторы смешанного типа действия. Такого рода механизм может предполагать сложный характер конкуренции как с субстратсвязывающим центром P450c17, так и с его активированными формами, возможно, принимающими участие в пероксидазно-подобном окислении 20-дигидропроизводных прогестерона. Сравнивая значения K_m по прогестерону и полученные значения K_i можно заключить, что исследованные соединения являются низкоаффинными ингибиторами P450c17 (значения K_i превышают в 15-80 раз значение K_m).

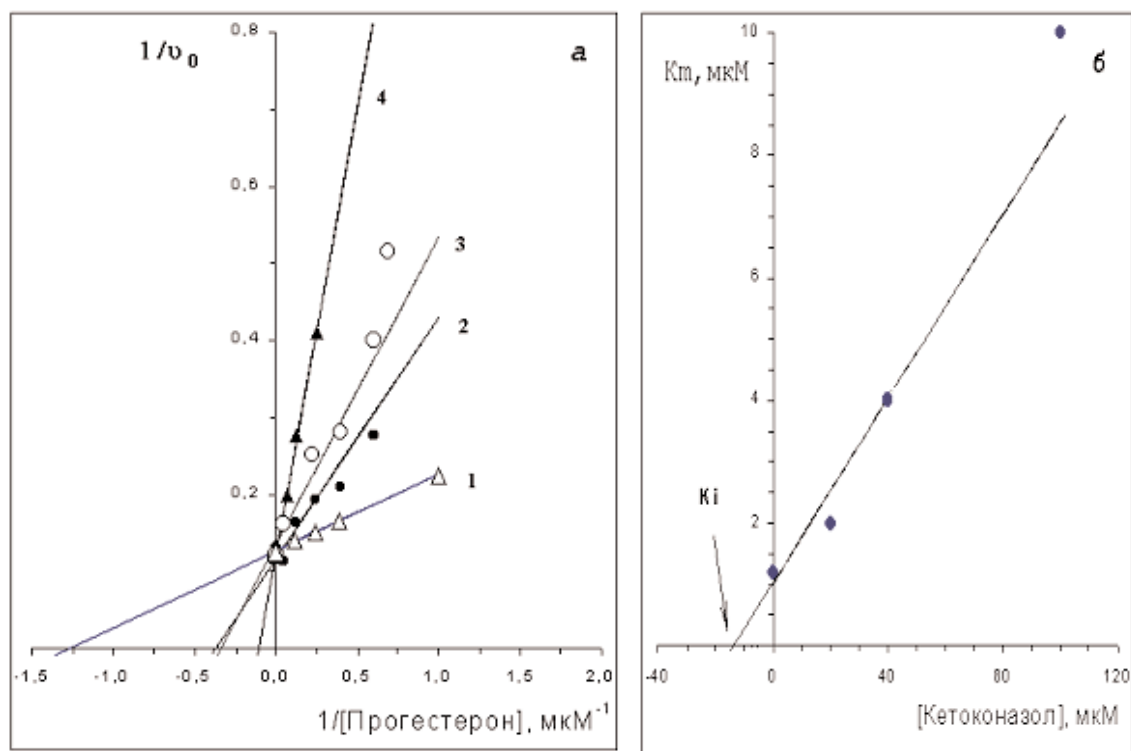


Рисунок 4.

Кинетический анализ ингибирующего действия кетоконазола на реакцию 17α -гидроксилирования прогестерона цитохромом P450c17 коры надпочечников быка в составе микросомальной фракции *S. cerevisiae* GRF18YEp5117 α : зависимость скорости 17α -гидроксилазной активности от концентрации прогестерона в координатах двойных обратных величин (а) и определение K_i в координатах Диксона (б). [Кетоконазол]: 1 – 0, 2 – 20 мкМ, 3 – 40 мкМ, 4 – 100 мкМ.

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ НА БИОТРАНСФОРМАЦИЮ ПРОГЕСТЕРОНА

Таблица 2. Тип и константы ингибирования рекомбинантного Р450с17 из коры надпочечников быка в составе микросомальной фракции *S. cerevisiae* GRF18 YEp5117α.

Модификатор	K _i , мкМ
Даназол	40 (К)
Мифепристон	60 (К)
Кетоконазол	45 (К)
20β-дигидропрогестерон	15 (С)
20α- дигидропрогестерон	80 (С)

Сокращения: К – конкурентный тип, С – смешанный тип ингибирования.

Таким образом, предложена новая аналитическая система для первичного скрининга лекарственных соединений, способных модифицировать биосинтез и метаболизм стероидных гормонов. Эта система представляет собой рекомбинантные микроорганизмы, синтезирующие Р450с17 быка, а также дрожжевой аналог 20α-ГСД млекопитающих и сочетание этих белков выгодно отличает эту систему от предложенных ранее на основе экспрессии Р450с17 в бактериях [10,22]. Мифепристон и даназол не модифицируют ковалентно аминокислотные остатки Р450с17 или его гемовую группу, а кетоконазол действует как низкоаффинный лиганд, координационно связываясь с железом гема Р450с17. Установлено, что мифепристон, даназол и кетоконазол являются конкурентными ингибиторами с низким сродством к Р450с17 и не оказывают влияния на функциональные свойства аналога 20α-ГСД.

Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б04МС-030) и INTAS (CA-03-51-4366).

ЛИТЕРАТУРА

1. Nakajin S., Hall P.F. (1981) J.Biol.Chem., **256**, 3871-3876.
2. Nakajin S., Shinoda M., Haniu M. et al. (1984) J. Biol. Chem., **259**, 3971-3976.
3. Shkumatov V.M., Usanov S.A., Chashchin V.L., Akhrem A.A. (1985) Pharmazie, **40**, 757-766.
4. Miller W.L. (1987) J. Steroid Biochem., **27**, 759-766.
5. Chashchin V.L., Vasilevsky V.I., Shkumatov V.M., Akhrem A.A. (1984) Biochim. Biophys. Acta, **787**, 27-37.
6. Chashchin V.L., Vasilevsky V.I., Shkumatov V.M. et al. (1984) Biochim. Biophys. Acta., **791**, 375-381.
7. Lee-Robichaud P., Akhtar M.E., Akhtar M. (1998) Biochem. J., **330**, 967-974.
8. Guryev O.L., Gilep A.A., Usanov S.A., Estabrook R.W. (2001) Biochemistry, **40**, 5018-5031.
9. Mathieu A.P., Auchus R.J., LeHoux J.G. (2002) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **80**, 99-107.
10. Ehmer P.B., Jose J., Hartman R.W. (2000) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **75**, 57-63.
11. Arlt W., Auchus R.J., Miller W.L. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 16767-16771.
12. Auchus R.J., Kumar S.A., Boswell A.C. et al. (2003) Arch. Biochem. Biophys., **409**, 134-144.
13. Shibata M., Sakaki T., Yabusaki Y. et al. (1990) DNA Cell Biol., **9**, 27-36.

14. Sakaki T., Akiyoshi-Shibata M., Yabusaki Y. et al. (1991) *Pharmacogenetics*, **1**, 86-93.
15. Duport C., Spagnoli R., Degryse E., Pompon D. (1998) *Nature Biotechnol.*, **16**, 186-189.
16. Szczebara F.M., Chandelier C., Villeret C., et.al. (2003) *Nature Biotechnol.*, **21**, 143-149.
17. Шкуматов В.М., Усова Е.В., Поляков Ю.С. и др. (2002) *Биохимия*, **67**, 547-560.
18. Шкуматов В.М., Усова Е.В., Радюк В.Г. и др. (2003) *Биоорган. химия*, **29**, 640-647.
19. Khalil M.W., Strutt B., Vachon D., Killinger D.W. (1994) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **48**, 545-552.
20. Leonhardt S.A., Edwards D.P. (2002) *Exp. Biol. Med.*, **227**, 969-980.
21. Pandit S., Geissler W., Harris G., Sitlani A. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 1538-1543.
22. Haidar S., Ehmer P.B., Barassin S. et al. (2003) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **84**, 555-562.
23. Диксон М., Уэбб Э. (1982) *Ферменты* (пер. с англ.), Мир, М.
24. Choudhary M.I., Azizuddin, Atta-ur-Rahman (2002) *Nat. Prod. Lett.*, **16**, 101-102.
25. He K., Woolf T.F., Hollenberg P.F. (1999) *J. Pharm. Exper. Ther.*, **288**, 791-797.
26. Khan K.K., He Y.Q., Correia M.A., Halpert J.R. (2002) *Drug Metab. Dispos.*, **30**, 985-990.
27. Burczynski M.E., Sridhar G.R., Palackal N.T., Penning T.M. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 2890-2896.
28. Vico P., Cauet G., Rose K., Lathe R., Degryse E. (2002) *Yeast*, **19**, 873-879.

Поступила: 10. 08. 2005.

EFFECT OF STEROID BIOSYNTHESIS MODIFIATORS ON THE PROGESTERONE BIOTRANSFORMATION BY A RECOMBINANT YEASTS EXPRESSING CYTOCHROME P450c17

V.M. Shkumatov¹, E.V. Usova¹, N.S. Frolova¹, G. Barth², S. Mauersberger²

¹Research Institute for Physico-chemical Problems, Belarussian State University,
ul. Leningradskaya, 14, Minsk, 220050 Belarus, tel./fax: (375-17) 209-5461;
e-mail: biopharm@bsu.by

²Institute of Microbiology, Dresden University of Technology, Mommsenstr., 13,
Dresden, 01062 Germany

Using the recombinant microorganisms *S. cerevisiae* GRF18 YEp5117 α , expressing cytochrome P450c17 from bovine adrenal cortex, we investigated the influence of the various modifiers of steroids biosynthesis on the relationship between the 17 α -hydroxylation of progesterone and 20 α -reduction. Dexamethasone and metirapon had no effect on the reaction of progesterone 17 α -hydroxylation and on the reaction of 17 α -hydroxyprogesterone 20 α -reduction. Mifepriston and danazol did not covalently modify amino acid residues of the cytochrome P450c17 or its heme group under the conditions of the biotransformation of progesterone by recombinant yeasts. Ketokonazol, mifepriston and danazol acted as low-affinity competitive inhibitors, but the 20-dihydro derivatives of progesterone were mixed type inhibitors for the cytochrome P450c17. All modifiers that we used did not influence the functional properties of the yeast analog of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase. According to the influence on the catalytic parameters of the cytochrome P450c17, the modifiers used can be arranged in the following order: 20 β -dihydroprogesterone (maximum effect) > mifepriston = ketokonazol > 20 α -dihydroprogesterone > danazol > dexamethasone, metirapon (without effect).

Key words: cytochrome P450c17, 17 α -hydroxylation, 20-reduction, recombinant yeasts.