

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.015.1; 577.15; 543.94

© Коллектив авторов

ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЦИТОХРОМА P450 17A1 (CYP17A1) ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

В.В. Шумянцева, Т.В. Булко, А.Ю. Мишарин, А.А. Арчаков*

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10; тел.: (499)2465820; факс: (499)2450857; эл. почта: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Исследовано электрохимическое восстановление рекомбинантной формы цитохрома P450 17A1 ((CYP17A1) человека, который был иммобилизован на электроде, модифицированном биосовместимым нанокompозитным материалом на основе синтетического мембраноподобного вещества дидодецилдиметиламмоний бромида (DDAB) и наночастиц золота. Аналитические характеристики DDAB/Au/CYP17A1 электродов были исследованы методами цикловольтамперометрии, квадратно-волновой вольтамперометрии, дифференциальной импульсной вольтамперометрии. Проведен анализ электрохимического поведения фермента в присутствии природного субстрата (прегненолон **1**), известного ингибитора (кетоконазол **2**), а также трёх синтетических производных прегненолона: ацетилпрегненолон (**3**), циклопрегненолон (**4**), тетрабром прегненолон (**5**). Кетоконазол (**2**), азольный ингибитор цитохромов P450, ингибировал каталитический катодный ток в присутствии субстрата прегненолона (**1**). Соединения **3-5** не проявляли субстратных свойств в системе электрод/CYP17A1. Соединение **3** не проявляло ингибиторных свойств, а соединения **4** и **5** ингибировали каталитическую активность CYP17A1 по отношению к прегненолону. Электрохимическое восстановление CYP17A1 может быть адекватной заменой реконструированной системе, в которой необходимы дополнительные белки редокс-партнеры для проявления каталитической активности гемопротеинов надсемейства цитохромов P450.

Ключевые слова: рекомбинантный цитохром P450 17A1 человека, электрохимия, ингибиторы, прегненолон.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохромы P450, метаболизирующие экзогенные и эндогенные субстраты, являются функционально значимыми гемопротеинами с позиций медицинской биохимии [1, 2]. Микросомальный цитохром P450 17 α -гидроксилаза/17,20-лиаза (17 α -лиаза или CYP17, CYP17A1, P450C17) – один из важнейших ферментов в биосинтезе андрогенов, последовательно катализирующий две ключевые стадии этого биосинтетического пути: 17 α -гидроксилирование прегненолона (и прогестерона) и окислительное расщепление связи C17-C20 в образующемся 17 α -гидроксипрегненолоне (и 17 α -гидроксипрогестероне). Продукты последней реакции – дегидроэпиандростерон и андростандион являются субстратами 17 α -гидроксистероид дегидрогеназы и предшественниками тестостерона [3].

Суперэкспрессия CYP17, обусловленная полиморфизмом соответствующего гена, приводит к раку простаты, а развитие болезни прямо зависит от уровня

* - адресат для переписки

ПОИСК ЛИГАНДОВ ЦИТОХРОМА P450 17A1 ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

андрогенов [4]. Поэтому CYP17 в настоящее время рассматривается в качестве важной мишени для создания новых противоопухолевых препаратов [5], а многие специфичные ингибиторы CYP17 используются в практической онкологии для лечения рака простаты [6-11]. Не менее важными вопросами являются: изучение каталитической активности и электрохимического потенциала фермента, поиск новых соединений, влияющих на его активность, а также разработка новых технологий для исследований отдельных стадий сложного каталитического процесса [12-19].

Целью данной работы являлось исследование электрохимического восстановления CYP17 (использован препарат рекомбинантной формы фермента - CYP17A1) и анализ электрохимического поведения фермента в присутствии природного субстрата (прегненолон **1**), известного ингибитора (кетоконазол **2**), а также трех синтетических производных прегненолона **3–5**. Структурные формулы и систематические названия исследованных в данной работе соединений приведены на рисунке 1.

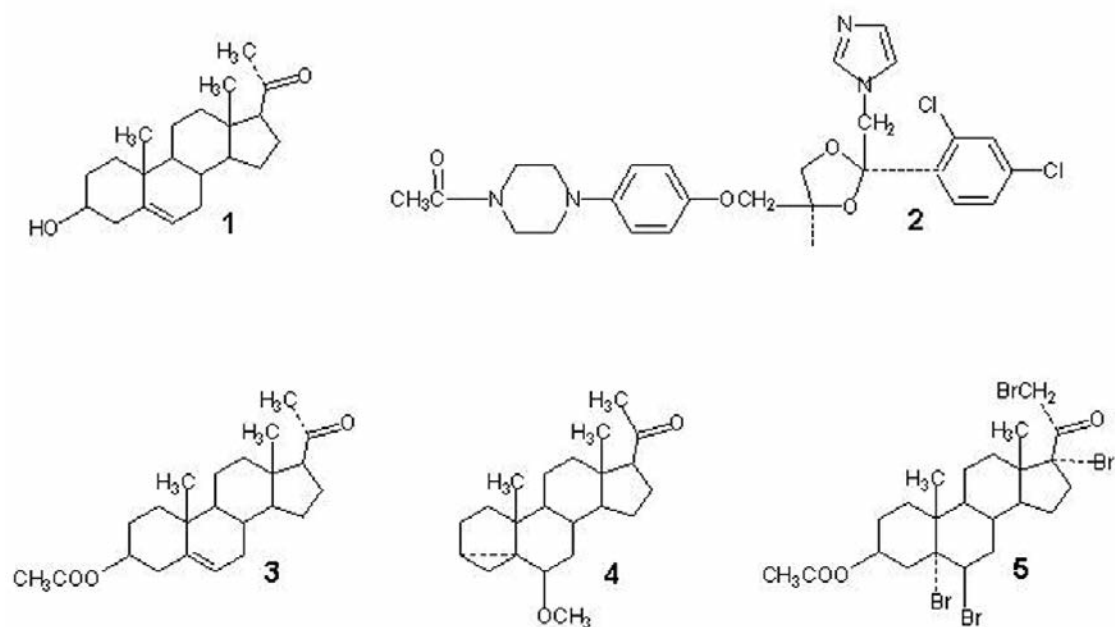


Рисунок 1.

Химические структуры исследованных соединений:

- 1** - прегненолон (прегн-5-ен-3β-ол-20-он);
- 2** - кетоконазол (цис-1-ацетил-4-[4-[[2-(2,4-дихлорфенил)-2-(1H-имидазол-1-илметил)-1,3-диоксолан-4-ил]-метокси]фенил]пиперазин);
- 3** - ацетат прегненолона (3β-ацетоксипрегн-5-ен-20-он);
- 4** - 3α,5-цикло-6β-метокси-5α-прегнан-20-он;
- 5** - 3β-ацетокси-5α,6β,17α,21-тетрабромпрегнан-20-он.

МЕТОДИКА. В работе использованы: прегненолон **1**, кетоконазол **2**, дидодецилдиметиламмоний бромид (DDAB), боргидрид натрия, Тритон X-100 и золотохлористоводородная кислота, полученные от фирм “Sigma” и “Aldrich”; препарат рекомбинантного человеческого цитохрома P450 17A1 (0,108 мкг/мкл), полученный от “Novus Biological” и соединения **3–5**, синтезированные известными методами [20, 21]. Синтез коллоидного раствора золота (наночастиц золота), стабилизированного DDAB проводили согласно [22].

Спектральные исследования проводили с помощью Cary 100 Scan UV-Vis спектрофотометра. Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата AUTOLAB ("Eco Chemie", Нидерланды), снабжённого программным обеспечением GPES. Все измерения проводили при комнатной температуре. Электрохимические исследования проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,04% Тритон X 100, pH 7,4. В работе использовали трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП "Русенс", Россия, <http://analyt.chem.msu.ru>), с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами, и хлорсеребряным электродом сравнения (графитовая паста для печати Gwent). Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы даны относительно хлорсеребряного электрода сравнения (Ag/AgCl).

Цикловольтамперограммы регистрировали при скорости сканирования от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии (КВА): начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал -600 мВ (для восстановительных процессов), шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц. Параметры, используемые в дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВ): амплитуда импульса 25 мВ, начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал -600 мВ, шаг потенциала 1 мВ, продолжительность импульса 50 мс.

В электрохимических экспериментах использовали 3,6 мМ раствор кетоконазола (**2**) в смеси ацетон-диметилформамид (1:1), 10 мМ раствор прегненолона (**1**) в этаноле, 10 мМ растворы соединений **3-5** в спирте. Концентрацию фермента определяли спектрально по образованию комплекса восстановленной формы с оксидом углерода, используя коэффициент поглощения ϵ_{450} 91 мМ⁻¹см⁻¹.

Для приготовления электродов на поверхность рабочего графитового электрода наносили 2 мкл 5 мМ коллоидного раствора золота в 0,1 М DDAB в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин.) наносили 2 мкл исследуемого гемопротейна. Электроды оставляли на 12 часов при +4°C во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов.

Для экспериментов в анаэробных условиях аргон пропускали в буферный раствор электролита и анализируемый раствор фермента в течение 30 минут.

Абсорбционные спектры поглощения CYP17 записывали после нанесения на прозрачные полихлорвиниловые пластины размером 4×2,5 мм 5 мкл 0,1 М DDAB в хлороформе, а затем, после испарения хлороформа, 4 мкл 20 мкМ. Пластины помещали в стандартные спектральные полистирольные кюветы объёмом 1,5 мл. В качестве контроля использовали пластины с DDAB (5 мкл 0,1 М DDAB в хлороформе).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Исследование каталитической активности представителей надсемейства цитохромов P450 требует обязательного присутствия белков редокс-партнеров и доноров электронов (NADPH) [1, 2]. При электрохимическом восстановлении гемопротейнов семейства цитохромов P450 редокс-партнеры не являются необходимыми. Электрохимические системы исполняют двойную функцию: заменяют белки-партнеры и являются источником электронов для окислительно-восстановительных ферментов [15-18].

Электрохимические свойства рекомбинантных цитохромов P450c17 из различных источников (человека, быка, свиньи) были исследованы ранее [19]. Авторы показали, что при использовании пиролитического графитового электрода, модифицированного дидодецилдиметиламмоний бромидом, регистрируется электрохимическое восстановление гемопротейна с окислительно-восстановительным потенциалом относительно нормального водородного электрода $E = -48, -54$ и -3 мВ (для P450c17 человека, быка и свиньи, соответственно). В присутствии субстратов этих форм - прогестерона, прегненолона, 17 α -гидроксипрегненолона и 17 α -гидроксипрогестерона - не были зарегистрированы изменения электрохимических параметров в широком

ПОИСК ЛИГАНДОВ ЦИТОХРОМА P450 17A1 ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

интервале экспериментальных условий. Авторы мотивируют эти результаты отсутствием кислорода, необходимого для проявления каталитической активности цитохрома P450.

Способность цитохромов P450 связываться с субстратами или ингибиторами в аэробных условиях, регистрируемая электрохимически с помощью анализа вольт-амперных характеристик ферментных электродов, была показана нами ранее [15, 22]. Каталитический ток в присутствии субстратов и ингибирование катализа в присутствии ингибиторов позволяет проводить скрининг потенциальных субстратов или ингибиторов цитохромов P450 электрохимическими методами.

Для проведения электрохимических экспериментов по восстановлению CYP17 были использованы трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати. Сочетание мембраноподобных жидкокристаллических пленок и наночастиц металлов позволяет получать стабильные плёнки с высокой способностью к переносу электронов между электродом и гемопротеином. При включении наночастиц золота в пленки мембраноподобных веществ повышается чувствительность и стабильность электрохимических параметров электродов. Это связано с тем, что наночастицы металлов на стандартном металлическом или графитовом электроде ведут себя, как системы нанoeлектродов [23-27]. Кроме того, нанокомпозитный материал на основе DDAB и наночастиц золота является биосовместимым материалом, так как спектры цитохромов P450 при встраивании в мембрану DDAB/Au не изменяются [15].

Несмотря на низкую концентрацию экспрессированного цитохрома P450 (CYP17A1; 0,108 мкг/мкл, 1 нМ) при встраивании гемопротеина в мембрану DDAB/Au в аэробных условиях методом дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВ) регистрируются четкие восстановительные пики в области - 418 мВ (рис. 2). По данным ДИВ было рассчитано количество электроактивных молекул CYP17A1 на электроде (поверхностная концентрация электроактивных молекул белка) [28, 29]. Электроактивность проявляли около 4% ($87 \pm 10 \times 10^{-15}$ моль/электрод или $2,77 \times 10^{-12}/\text{см}^2$), что типично для ферментных электродов.

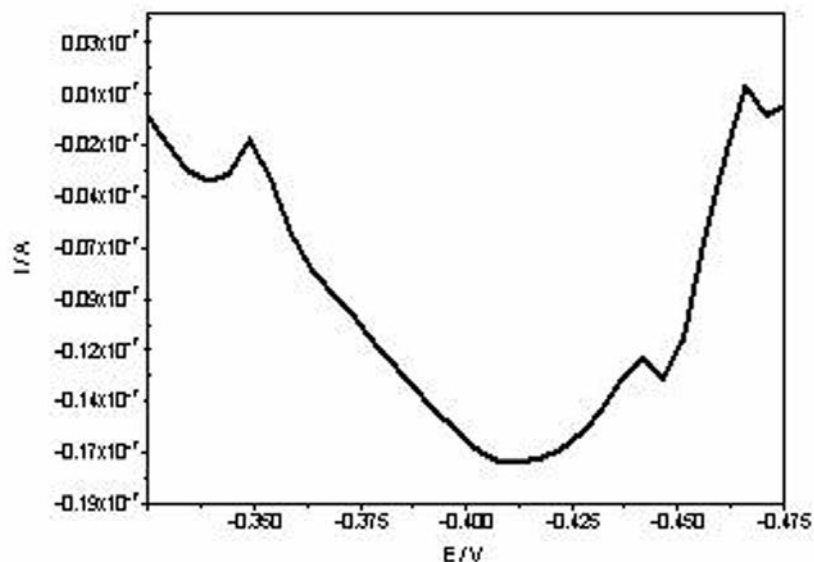


Рисунок 2.

Дифференциальная импульсная вольтамперограмма (ДИВ) DDAB/Au/CYP17A1 электрода (скорректированная по базовой линии, восстановительные пики). Объем электролита 1 мл, 100 мМ калий-фосфатный буфер, 50 мМ NaCl, 0,04% Тритон X 100, pH 7,4.

Параметры, используемые ДИВ: амплитуда импульса 25 мВ, начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал -600 мВ, шаг потенциала 1 мВ, продолжительность импульса 50 мс.

Так как прегненолон **1** является субстратом CYP17A1, при прибавлении прегненолона к электроду с иммобилизованным ферментом наблюдается увеличение амплитуды тока, характерное при проявлении электрокатализа (рис. 3). Электрохимическая константа Михаэлиса для прегненолона составила $5 \pm 0,7$ мкМ. Кетоконазол **2** является ингибитором этого фермента, и, как и следовало ожидать, не дает увеличение тока в концентрации 3,6 мкМ (рис. 3). Последующее прибавление прегненолона **1** не приводит к увеличению каталитического тока, так как кетоконазол связывается с железом гема и препятствует активации кислорода для реакции гидроксирования [2].

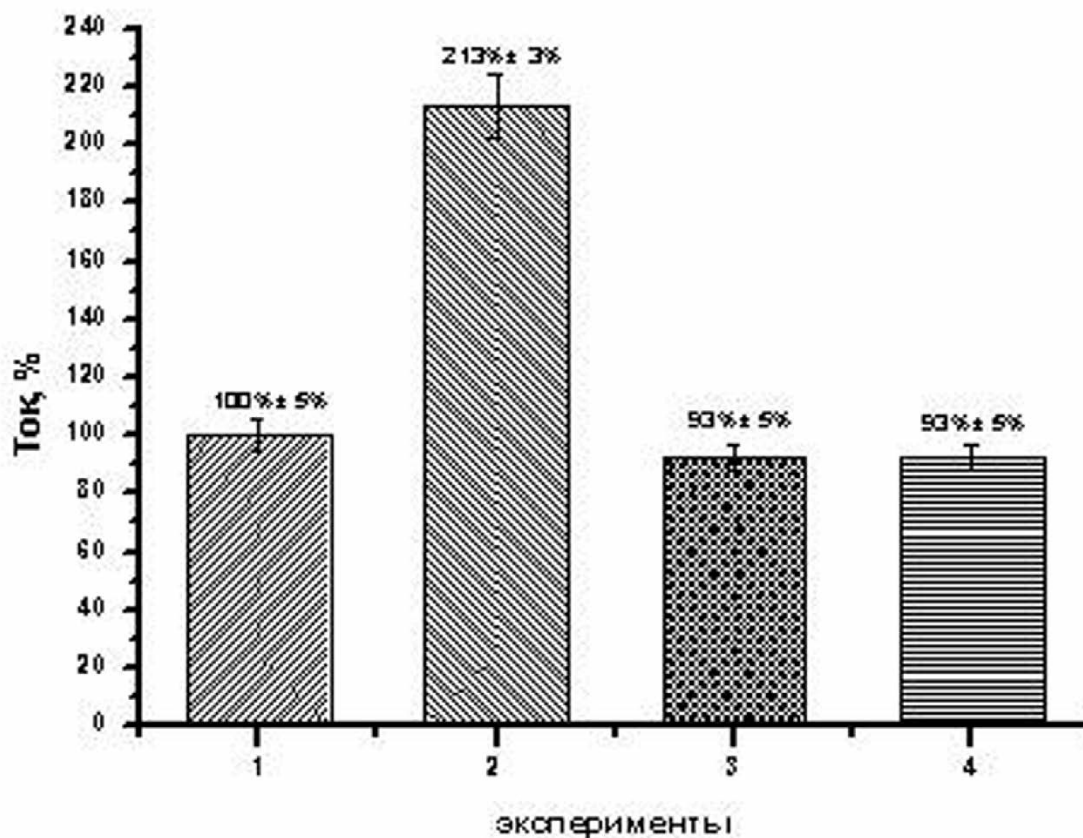


Рисунок 3.

Интенсивность восстановительных пиков дифференциальных импульсных вольтамперограмм в аэробных условиях:

- 1) DDAB/Au/CYP17A1 электрод,
- 2) DDAB/Au/ CYP17A1 электрод + **1** (10 мкМ),
- 3) DDAB/Au/ CYP17A1 электрод + **2** (3,6 мкМ),
- 4) DDAB/Au/ CYP17A1 электрод + **2** (3,6 мкМ) + **1** (10 мкМ).

Значения амплитуд токов ДИВ были скорректированы по базовой линии.

Приведены средние результаты 5 экспериментов.

Соединения 3–5 в концентрации до 10 мкМ (сравнимой с концентрацией прегненолона) не давали увеличения каталитического тока и не проявляли субстратные свойства по отношению к CYP17A1, (по данным амперометрического титрования и вольтаметрического анализа методом КВА и ДИВ) (рис. 4, эксперименты 2, 4, 6). Однако, последующее прибавление субстрата **1**

ПОИСК ЛИГАНДОВ ЦИТОХРОМА P450 17A1 ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

(прегненолона) к ферменту в присутствии соединения **3** вызывало увеличение тока (рис. 4, эксперимент 3), что может свидетельствовать об отсутствии ингибиторных свойств у соединения **3**. Соединение **4** ингибирует практически полностью каталитическую активность CYP17A1 по отношению к прегненолону (рис. 4, эксперимент 5). В присутствии соединения **5** каталитический ток, соответствующий гидроксилированию прегненолона, снижается в 1,5 раза (145% по сравнению с 213% в системе CYP17A1/прегненолон) (рис. 4, эксперимент 7 и рис. 3, эксперимент 2). Таким образом, соединения **4** и **5**, по данным электрохимического анализа, могут рассматриваться как потенциальные ингибиторы активности CYP17A1 по отношению к прегненолону.

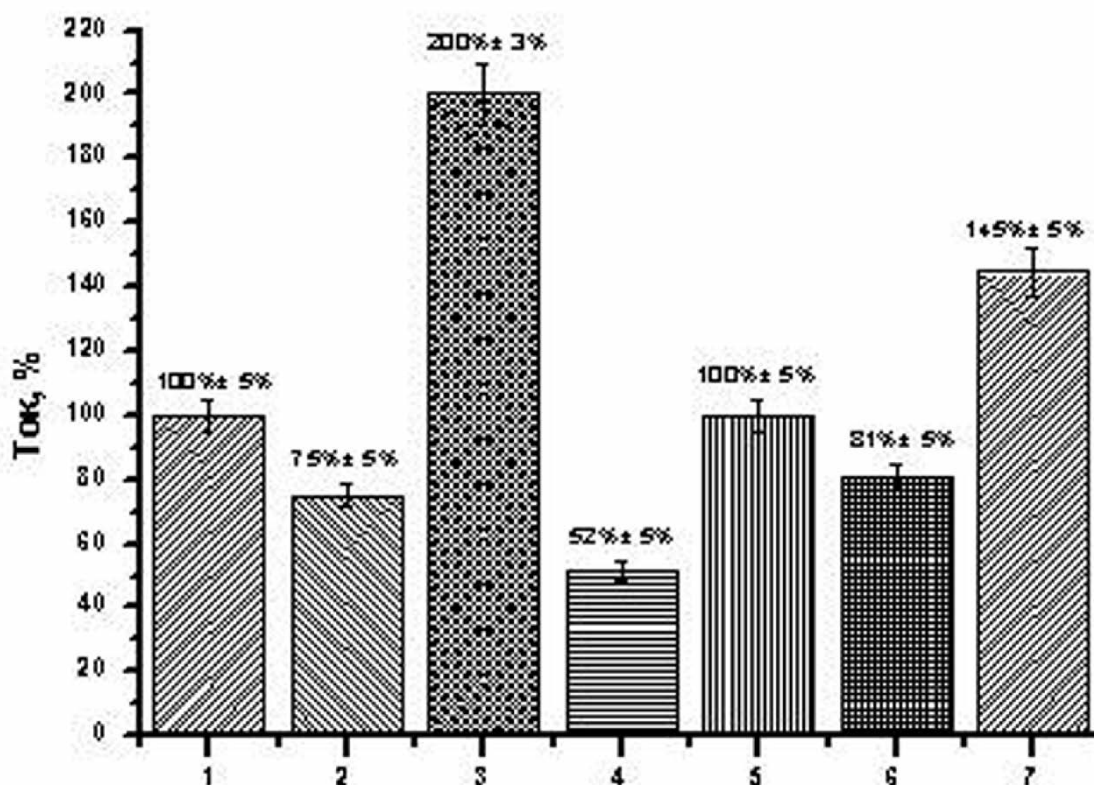


Рисунок 4.

Интенсивность восстановительных пиков дифференциальных импульсных вольтамперограмм в аэробных условиях:

- 1) DDAB/Au/CYP17A1 электрод,
- 2) DDAB/Au/ CYP17A1 электрод + 3 (10 мкМ),
- 3) DDAB/Au/ CYP17A1 электрод + 3 (10 мкМ) + 1 (10 мкМ),
- 4) DDAB/Au/ CYP17A1 электрод + 4 (10 мкМ),
- 5) DDAB/Au/ CYP17A1 электрод + 4 (10 мкМ) + 1 (10 мкМ),
- 6) DDAB/Au/ CYP17A1 электрод + 5 (10 мкМ),
- 7) DDAB/Au/ CYP17A1 электрод + 5 (10 мкМ) + 1 (10 мкМ),

Значения амплитуд токов ДИВ были скорректированы по базовой линии.

Приведены средние результаты 5 экспериментов.

Таким образом, электрохимические эксперименты позволяют проводить первичный скрининг и выявлять новые потенциально активные соединения в ряду таковых, не проявляющих субстратных свойств. Результаты настоящей работы

свидетельствуют, что электрохимические технологии могут рассматриваться как существенный элемент в комплексе исследований по поиску и созданию новых лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального Агентства по науке и инновациям Министерства образования и науки РФ (государственный контракт № 02.740.11.0306), Совета по грантам Президента РФ (НШ-439.2008.4) и Межведомственной Программы “Протеомика в медицине и биотехнологии”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis, London.
2. Lewis D.F.V. (Ed.) (2001) Guide to Cytochrome P450. Structure and function. Taylor and Francis Eds., London and New York.
3. Yap T.A., Carden C.P., Attard G., de Bono J.S. (2008) Curr. Opin. Pharmacol., **8**, 449-457.
4. Madigan M.P., Gao Y.T., Deng J., Pfeiffer R.M., Chang B.L., Zheng S. et al. (2003) Int. J. Cancer, **107**, 271-275.
5. Hakki T., Bernhardt R. (2006) Pharmacology & Therapeutics, **111**, 27-52.
6. Li J.S., Li Y., Son C., Brodie A.M. (1996) J. Med Chem, **39**, 4335-4339.
7. Handratta V.D., Vasaitis T.S., Njar V.C., Gediya L.K., Kataria R., Chopra P. et al. (2005) J. Med Chem, **48**, 2972-2984.
8. Hutschenreuter T.U., Ehmer P.B., Hartmann R.W. (2004) J. Enzyme Inhib. Med. Chem., **19**, 17-32.
9. Duc I., Duranti V., Cardinali S., Riviere A., De Giovanni A., Shieda-Botelle J., Barcelo G., Adje N., Carniato D., Lafay J., Pascal J.C., Delansorne R. (2003) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **84**, 537-542.
10. Jagusch C., Negri M., Hille U., Hu Q., Bartels M., Jahn-Hoffmann K., Mendieta M., Rodenwaldt B., Muller-Vieira U., Schmidt D., Lauterbach Th., Recantini M., Cavalli A., Hartmann R. (2008) Bioorg. Med. Chem., **16**, 1992-2010.
11. Mendieta M., Negri M., Jagusch C., Hille U., Muller-Viera U., Schmidt D., Hansen K., Hartmann R. (2008) Bioorg. Med. Chem. Letters, **18**, 267-273.
12. Bruno R.D., Njar C.O. (2007) Bioorg. Med. Chem., **15**, 5047-5060.
13. Bruttomesso A. C., Eiras J., Ramirez J., Galagovsky L.R. (2009) Tetrahedron Lett., **50**, 4022-4024.
14. Haidar S., Ehmer P., Barassin S., Batzl-Hartmann C., Hartmann R.W. (2003) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **84**, 555-562.
15. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Rudakov Yu.O., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Lisitsa A.V., Karuzina I.I., Archakov A.I. (2007) J. Inorg. Biochem., **101**, 859-865.
16. Bistolas N., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W. (2005) Biosens. Bioelectron., **20**, 2408-2423.
17. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I. (2005) J. Inorg. Biochem., **99**, 1051-1063.
18. Udit A.K., Gray H.B. (2005) Biochem. Biophys. Res. Commun., **338**, 470-476.
19. Jonson D.L., Conley A.J., Martin L.L. (2006) J. Mol. Endocrinol., **36**, 349-359.
20. Julian P.L., Karpel W.J. Sterols. I.X. (1950) J. Am. Chem. Soc., **72**, 362-366.
21. Partridge J.J., Faber S., Uskokovic M.R. (1974) Helv. Chim. Acta, **57**, 764.
22. Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Archakov A.I. (2009) Biochemistry (Moscow), **74**, 438-444.
23. Gooding, J.J. (2005) Electrochimica Acta, **50**, 3049-3060.
24. Broun K.R., Fox A.P., Natan M. J. (1996) J. Am. Chem. Soc., **118**, 1154-1157.
25. Daniel M.-Ch., Astruc D. (2004) Chem. Rev., **104**, 293-346.
26. Cheng W., Dong S., Wang E. (2002) Langmuir, **18**, 9947-9952.

27. Riley D.J. (2002) *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **7**, 186-192.
28. Broun A.P., Koval C., Anson F.C. (1976) *J. Electroanal. Chem.*, **72**, 379-387.
29. Ferapontova E.E., Ruzgas T., Gorton L. (2003) *Anal Chem.*, **75**, 4841-4850.

Поступила: 29. 09. 2010.

SCREENING OF POTENTIAL SUBSTRATES OR INHIBITORS OF CYTOCHROME P450 17A1
(CYP17A1) BY ELECTROCHEMICAL METHODS

V.V. Shumyantseva, T.V. Bulko, A.Yu. Misharin, A.I. Archakov

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: 4992465820; fax: 4992450857;
e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

The electrochemical reduction of the recombinant form of human cytochrome P450 17A1 (CYP17A1) was investigated. Hemeprotein was immobilized on electrode modified with biocompatible nanocomposite material based on the membrane-like synthetic surfactant didodecyldimethylammonium bromide (DDAB) and gold nanoparticles. Analytical characteristics of DDAB/Au/CYP17A1 electrodes were investigated with cyclic voltammetry, square wave voltammetry, and differential pulse voltammetry. Analysis of electrochemical behaviour of cytochrome P450 17A1 was conducted in the presence of substrate pregnenolone (1), inhibitor ketoconazole (2), and in the presence of synthetic derivatives of pregnenolone: acetylpregnenolone (3), cyclopregnenolone (4), and tetrabrompregnenolone (5). Ketoconazole,azole inhibitor of cytochromes P450, blocked catalytic current in the presence of substrate pregnenolone (1). Compounds 3-5 did not demonstrate substrate properties towards electrode/CYP17A1 system. Compound 3 did not block catalytic activity towards pregnenolone, but compounds 4 and 5 inhibited such activity. Electrochemical reduction of CYP17A1 may serve as an adequate substitution of the reconstituted system which requires additional redox partners - for the exhibition of catalytic activity of hemoproteins of the cytochrome P450 superfamily.

Key words: recombinant form of human cytochrome P450 17A1, electrochemistry, inhibitors, pregnenolone.