

УДК 577.117.2+577.151.63

СКРИНИНГ НОВЫХ ИНДОЛОСТЕРОИДОВ В КАЧЕСТВЕ СУБСТРАТОВ ЦИТОХРОМОВ P450 *in silico*

Я. В. ПАНАДА¹⁾, Я. В. ФАЛЕТРОВ¹⁾, Н. С. ФРОЛОВА¹⁾, В. М. ШКУМАТОВ¹⁾

¹⁾Учреждение БГУ «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем»,
ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Беларусь

Описано моделирование взаимодействия индолостероидов с цитохромами P450, участвующими в процессе стероидогенеза. Наиболее высокое сродство было предсказано по отношению к ферментам CYP3A4, CYP7A1 и CYP11A1, способным катализировать превращение холестерина. Для белков, осуществляющих превращение стероидов прегнанового и эстранового рядов, обнаружено снижение аффинности индолостероидов по сравнению с природными субстратами, вызванное структурными различиями. Результаты расчетов позволяют предположить, что исследуемые индолостероиды с наибольшей вероятностью могут подвергаться гидроксильрованию в положениях 4 и 7, а также ингибировать действие CYP17A1 за счет координационного взаимодействия с гемом.

Ключевые слова: индолостероиды; цитохромы P450; молекулярный докинг.

SCREENING OF NOVEL INDOLE STEROIDS AS CYTOCHROME P450 SUBSTRATES *in silico*

J. U. PANADA^a, Y. V. FALETROV^a, N. S. FROLOVA^a, V. M. SHKUMATOV^a

^aInstitute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University,
14 Leninhradskaja Street, Minsk 220006, Belarus

Corresponding author: V. M. Shkumatov (biopharm@bsu.by)

In this work we describe the modeling of interactions between indole steroids and steroidogenic cytochromes P450. The highest possible affinity is expected of enzymes involved in cholesterol transformation (i. e. CYP3A4, CYP7A1, CYP11A1). In case of pregnane and estrane-converting proteins a decrease in the binding energy of synthetic steroids is found. The variations in affinity are explained in terms of structural difference. These calculations imply that indole steroids are most likely to be hydroxylated at positions 4 and 7 as well as interfere with CYP17A1 activity by heme coordination.

Key words: indole steroids; cytochrome P450; molecular docking.

Образец цитирования:

Панада Я. В., Фалетров Я. В., Фролова Н. С., Шкуматов В. М. Скрининг новых индолостероидов в качестве субстратов цитохромов P450 *in silico* // Журн. Белорус. гос. ун-та. Химия. 2018. № 1. С. 28–34.

For citation:

Panada J. U., Faletrov Y. V., Frolova N. S., Shkumatov V. M. Screening of novel indole steroids as cytochrome P450 substrates *in silico*. *J. Belarus. State Univ. Chem.* 2018. No. 1. P. 28–34 (in Russ.).

Авторы:

Ян Владимирович Панада – младший научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Ярослав Вячеславович Фалетров – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Нина Степановна Фролова – научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Владимир Макарович Шкуматов – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор; заведующий лабораторией биохимии лекарственных препаратов.

Authors:

Jan U. Panada, junior researcher at the laboratory of biochemistry of drugs.

panada@bsu.by

Yaroslav V. Faletrov, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of biochemistry of drugs.

yaroslav82@tut.by

Nina S. Frolova, researcher at the laboratory of biochemistry of drugs.

biopharm@bsu.by

Vladimir M. Shkumatov, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), full professor; head of the laboratory of biochemistry of drugs.

biopharm@bsu.by

Введение

Синтетические производные стероидов активно исследуются в качестве новых препаратов для лечения гормональных нарушений, а также некоторых форм доброкачественных и злокачественных опухолей [1]. В частности, стероиды, содержащие гетероцикл в боковой цепи, представляют интерес как аналоги абиратерона, подавляющего биосинтез андрогенов за счет ингибирования CYP17A1 и используемого для терапии метастатических опухолей предстательной железы. Интерес к сочетанию индольного и стероидного фрагментов вызван, с одной стороны, способностью индолов подавлять клеточные сигнальные процессы, с другой – возможностью использования тетрациклического остатка в качестве специфичной транспортной группы [2–4]. Поскольку метаболизм и биodeградация стероидов в значительной мере обусловлены гемозависимыми монооксигеназами CYP450 [5], нами проведено моделирование взаимодействия синтетических индолостероидов с некоторыми ферментами указанного семейства. Выбор цитохромов P450 в качестве объектов исследования также связан с описанными в литературе взаимодействиями индолов и гемопротеинов, участвующих в процессах канцерогенеза. В частности, противоопухолевая активность 3,3'-дииндолилметана включает в себя ингибирование цитохромов P450, участвующих в первой фазе метаболизма и активирующих карциногенные ксенобиотики [6]. Кроме того, 3,3'-дииндолилметан препятствует CYP450-опосредованному гидроксилированию эстрогена и эстрадиола, подавляя тем самым эстрогенозависимые процессы пролиферации [7]. Ряд замещенных индолов, основанных на структуре антагониста эстрогеновых рецепторов зиндоксифена, был исследован в качестве нестероидных ингибиторов CYP17A1 и CYP19A1 [8]. Наконец, 3-арилэтилиндолы обладают антииммунодепрессантными свойствами благодаря ингибированию гемопротеина триптофан-2,3-диоксигеназы, гиперэкспрессируемого в некоторых опухолевых клетках в целях подавления иммунного распознавания [9]. Таким образом, индолостероиды представляют интерес как специфичные лиганды стероидогенных и гемосодержащих белков.

Материалы и методы исследований

Структурные формулы исследуемых стероидов изображены на рис. 1. Нумерация атомов боковой цепи проводилась в соответствии с рекомендациями комиссии International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) [10].

При моделировании лиганд-рецепторных взаимодействий использовали данные, депонированные в банке белковых структур RCSB PDB (pdb id 3RUK для CYP17A1, 5JKW для CYP19A1, 3SN5 для CYP7A1, 3MZS для CYP11A1, 1W0E для CYP11A1). Построение лигандов и обработку результатов осуществляли с помощью программных пакетов *PyMol 1.5.0.1* и *MGLTools 1.5.6*. Для расчетов использовали

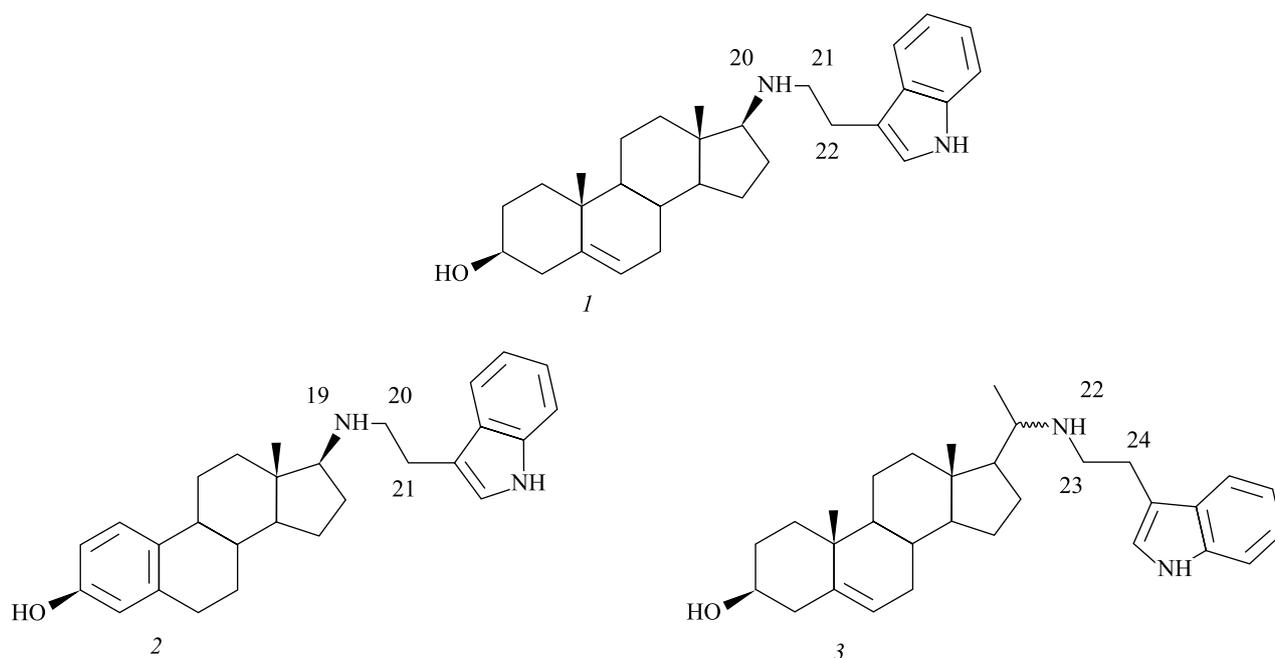


Рис. 1. Строение исследованных лигандов с нумерованными атомами боковой цепи
Fig. 1. The structure of steroidal ligands used in the study. The numbers refer to the side-chain atoms

программу *AutoDock Vina 1.1.2* [11]. Оценка энергии связывания проводилась с применением исходной функции взаимодействия. Все вычисления осуществлялись в приближении жесткой структуры белков. Конформационное пространство имело форму куба со стороной, длина которой равна 30 Å. Отбор конформаций производили путем сравнения положений стероидных лигандов с кристаллографической структурой из банка данных RCSB PDB, а также на основании ориентации индольного фрагмента относительно простетической группы белков.

Результаты исследований и их обсуждение

Количественные параметры вычисленных конформаций индолостероидов в активных центрах цитохромов P450 представлены в таблице.

Характеристики расчетных конформаций индолостероидов

Calculated parameters of indole steroid conformations

Белок	Лиганд	ΔG , ккал · моль ⁻¹	r , Å (атом лиганда – атом простетической группы)
CYP17A1	Прегненолон	-11,1	4,2 (C ₁₇ -Fe)
	<i>1</i>	-10,0	4,9 (N'-Fe)
	<i>2</i>	-7,8	5,1 (N'-Fe)
	20S-3	-7,0	3,3 (N'-Fe)
CYP19A1	Тестостерон	-12,3	4,0 (C ₁₉ -Fe)
	<i>1</i>	-6,4	> 6,0 (C ₁₉ -Fe)
	<i>2</i>	-6,8	> 7,0 (C ₁₀ -Fe)
	20R-3	-5,0	6,0 (C ₁₉ -Fe)
	20S-3	-5,7	6,0 (C ₁₉ -Fe)
CYP7A1	Холестерин	-12,1	4,9 (C ₇ -Fe)
	<i>1</i>	-12,2	5,3 (C ₇ -Fe)
	<i>2</i>	-11,5	5,2 (C ₇ -Fe)
	20R-3	-10,7	5,0 (C ₇ -Fe)
	20S-3	-10,7	5,1 (C ₇ -Fe)
		-9,8	5,9 (N'-Fe)
CYP11A1	Холестерин	-11,9	3,4 (C ₂₂ -Fe)
	<i>1</i>	-13,6	3,8 (C ₂₁ -Fe)
	<i>2</i>	-13,2	3,7 (C ₂₀ -Fe)
	20R-3	-12,9	3,4 (C ₂₃ -Fe)
	20S-3	-13,0	3,0 (C ₂₃ -Fe)
CYP3A4	Холестерин	-10,3	4,0 (C ₄ -Fe)
	<i>1</i>	-11,0	4,0 (N'-Fe)
		-10,7	4,2 (C ₄ -Fe)
		-10,8	4,1 (N'-Fe)
	<i>2</i>	-10,3	3,7 (C ₂ -Fe)
		-10,2	4,0 (C ₄ -Fe)
		-10,3	3,5 (C ₄ -Fe)
	20R-3	-10,3	3,5 (C ₄ -Fe)
20S-3	-10,3	3,5 (C ₄ -Fe)	

Для конформаций индолостероидов в активном центре CYP17A1 характерно снижение аффинности по сравнению с прегненолоном (природным субстратом). Несмотря на высокую энергию взаимодействия, в случае соединения *1* наблюдается значительное удаление индольного фрагмента от гема, препятствующее координации с ионом железа. Для сравнения: сближение индольного остатка

20*S*-изомера **3** с простетической группой фермента сопровождается уменьшением энергии взаимодействия до $-7,0$ ккал/моль. Для 20*R*-стероида **3** субстратоподобные конформации не выявлены. Это обусловлено структурными различиями между прегненолоном и индолостероидами (в частности, наличием у последних объемного ароматического фрагмента). Кроме того, в случае соединений **1** и **2** подвижность индольных колец ограничена длиной боковой цепи, что препятствует субстратоподобному расположению в активном сайте фермента и увеличивает вклад стерических взаимодействий. В противоположность этому боковая цепь стероида **3** имеет достаточную длину для сближения индола с гемом, что показано на рис. 2. Вероятно, наблюдаемое при этом снижение энергии связывания, по сравнению с другими лигандами, вызвано внутримолекулярными торсионными взаимодействиями.

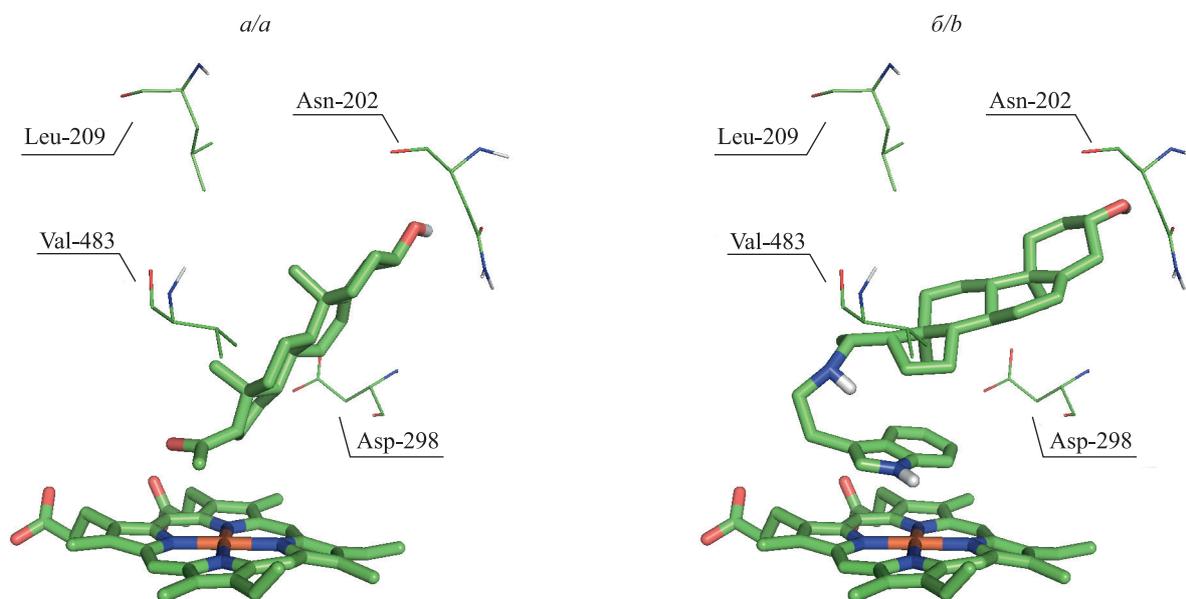


Рис. 2. Сравнительное расположение прегненолона (а) и 20*S*-изомера стероида **3** (б) в активном сайте CYP17A1
Fig. 2. Comparison of pregnenolone (a) and 20*S*-isomer of steroid **3** (b) positioned within CYP17A1 active site

В случае ферментов CYP7A1 и CYP11A1 боковые цепи индолостероидов сопоставимы по размерам с алкильным фрагментом холестерина. В результате расположение синтетических лигандов в полости белка совпадает с предсказанным для холестерина (рис. 3).

Стероидный остов индолопроизводных в случае CYP7A1 несколько смещен относительно холестерина, что позволяет образовывать водородные связи с аминогруппой Leu-361 и гидроксигруппой Ser-105. Следует также отметить снижение энергии связывания изомеров **3** на 1,5 ккал/моль по сравнению с другими стероидами, вызванное увеличением длины боковой цепи. В частности, 20*R*-изомер соединения **3** вынужден принимать изогнутую конформацию боковой цепи ввиду отталкивающего воздействия остатков Phe-102, His-111 и Ile-114. Из таблицы также видно, что в случае CYP11A1 энергия связывания холестерина меньше вычисленной для индолостероидов. Причиной этого является близость атома азота в составе индольного кольца с карбонильной группой остатка Ala-286, благодаря чему образуется дополнительная водородная связь. Анализ литературных данных позволяет предположить, что в случае превращения исследуемых соединений под действием CYP11A1 расщепление боковой цепи по связи C—N маловероятно [12].

В случае CYP3A4 исследуемые лиганды ориентированы к простетической группе гидроксильной группой, находящейся в положении 3. Как правило, наиболее близким к каталитическому центру является 4-й атом углерода. Для соединения **2** также была предсказана возможность ориентации 2-м атомом по отношению к гему, что может привести к образованию изомерных *орто*-гидроксилированных производных. Полученные результаты соответствуют экспериментальным данным о региоспецифичности действия CYP3A4 по отношению к различным стероидным субстратам [7; 13]. Максимальная энергия связывания стероидов **1** и **2** достигается при расположении индольного фрагмента вблизи плоскости гема (рис. 4). В описанном случае возможно образование водородной связи между гидроксильной группой в положении 3 и карбонильной группой Arg-106, а также аминогруппой стероида и карбонильной группой Ile-369, что стабилизирует изогнутую конформацию лиганда.

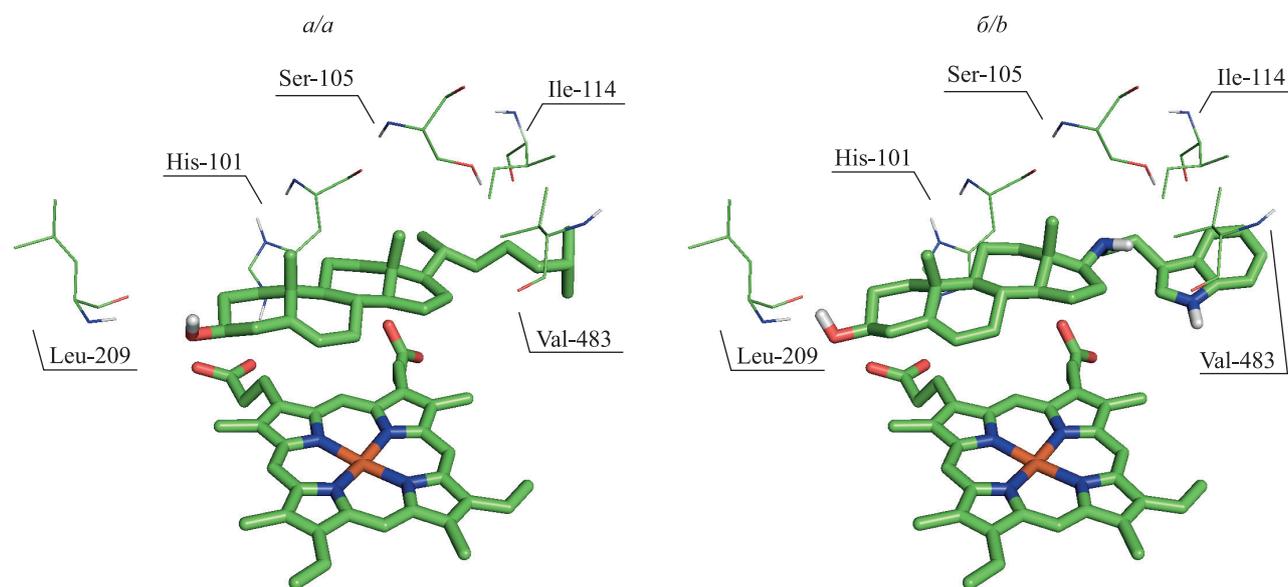


Рис. 3. Сравнительное расположение холестерина (а) и индолостероида 1 (б) в активном сайте CYP7A1
Fig. 3. Comparison of cholesterol (a) and indole steroid 1 (b) positioned within CYP7A1 active site

При расположении искусственных лигандов в активном сайте CYP19A1 ожидается снижение энергии связывания на 5–6 ккал/моль по сравнению с естественным лигандом. Данное обстоятельство вызвано наличием объемной боковой цепи, отсутствующей у физиологических субстратов указанного фермента. Подтверждением этого является уменьшение рассчитанной энергии связывания при возрастании длины боковой цепи. При расположении тетрациклического ядра аналогично естественным лигандам индольный фрагмент испытывает отталкивающее воздействие остатков Arg-115, Leu-372, Val-373 и Met-374. Данный фактор приводит к развороту индолостероидов на 180° относительно положения, характерного для природных субстратов [14]. При этом возможно образование водородной связи между индольным атомом азота и амидной группой Gln-218.

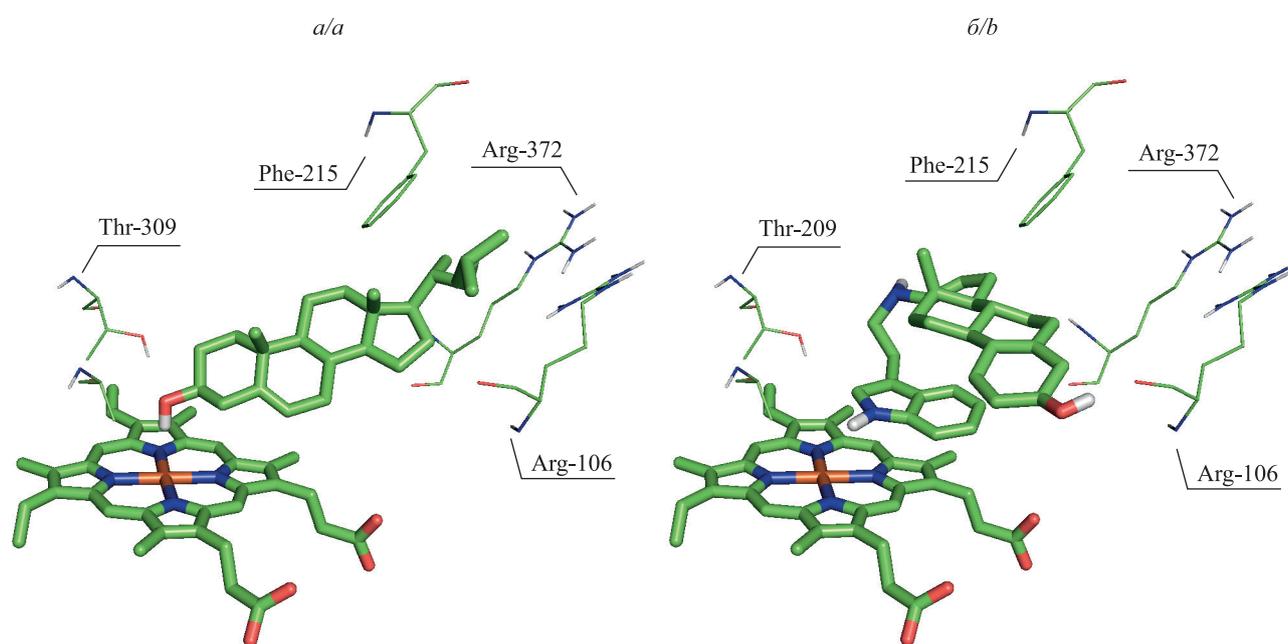


Рис. 4. Сравнительное расположение холестерина (а) и индолостероида 2 (б) ($\Delta G = -10,8$ ккал/моль) в активном сайте CYP3A4
Fig. 4. Comparison of cholesterol (a) and indole steroid 2 (b) ($\Delta G = -10.8$ kcal/mol) positioned within CYP3A4 active site

Заключение

В ходе исследования проведено моделирование взаимодействия индолостероидов с рядом цитохромов P450, осуществляющих превращение стероидов в организме человека. Результаты моделирования показывают, что в большинстве случаев искусственные лиганды способны принимать конформацию, аналогичную субстратной. В зависимости от природы белка энергия связывания варьирует в пределах от $-5,0$ до $-13,6$ ккал/моль. При наличии нескольких субстратоподобных конформаций различия в энергии связывания не превышают 1 ккал/моль. Наиболее высокое сродство было предсказано для ферментов, катализирующих превращения холестерина (CYP3A4, CYP7A1, CYP11A1), что объясняется геометрическим сходством индолостероидов и природного субстрата. За исключением 20S-изомера производного 3, для исследуемых стероидов не обнаружено конформаций, способствующих координации индольного остатка с гемом CYP17A1. Полученные результаты позволяют осуществить рациональное тестирование индолостероидов в качестве лигандов стероидпревращающих цитохромов P450.

Библиографические ссылки

1. Cabeza M., Sánchez-Márquez A., Garrido M., et al. Recent advances in drug design and drug discovery for androgen-dependent diseases // *Curr. Med. Chem.* 2016. Vol. 23, № 8. P. 792–815. DOI: 10.2174/0929867323666160210125642.
2. Chen Z., Tao Z.-Z., Chen S.-M., et al. Indole-3-carbinol inhibits nasopharyngeal carcinoma growth through cell cycle arrest *in vivo* and *in vitro* // *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, issue 12. e82288. DOI: 10.1371/journal.pone.0082288.
3. Sorriento D., del Giudice C., Bertamino A., et al. New small molecules, ISA27 and SM13, inhibit tumour growth inducing mitochondrial effects of p53 // *Br. J. Cancer*. 2015. Vol. 112, № 1. P. 77–85. DOI: 10.1038/bjc.2014.577.
4. Ingallinella P., Bianchi E., Ladwa N. A., et al. Addition of a cholesterol group to an HIV-1 peptide fusion inhibitor dramatically increases its antiviral potency // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106, № 14. P. 5801–5806. DOI: 10.1073/pnas.0901007106.
5. Novikova L. A., Faletrov Ya. V., Kovaleva I. E., et al. From structure and functions of steroidogenic enzymes to new technologies of gene engineering // *Biochemistry (Moscow)*. 2009. Vol. 74, № 13. P. 1482–1504. DOI: 10.1134/S0006297909130057.
6. Stresser D. M., Bjeldanes L. F., Bailey G. S., et al. The anticarcinogen 3,3'-diindolylmethane is an inhibitor of cytochrome P-450 // *J. Biochem. Toxicol.* 1995. Vol. 10, № 4. P. 191–201. DOI: 10.1002/jbt.2570100403.
7. Parkin D. R., Malejka-Giganti D. Differences in the hepatic P450-dependent metabolism of estrogen and tamoxifen in response to treatment of rats with 3,3'-diindolylmethane and its parent compound indole-3-carbinol // *Cancer Detect. Prev.* 2004. Vol. 28, № 1. P. 72–79. DOI: 10.1016/j.cdp.2003.11.006.
8. Parkin D. R., Lu Y., Bliss R. L., et al. Inhibitory effects of a dietary phytochemical 3,3'-diindolylmethane on the phenobarbital-induced hepatic CYP mRNA expression and CYP-catalyzed reactions in female rats // *Food Chem. Toxicol.* 2008. Vol. 46, issue 7. P. 2451–2458. DOI: 10.1016/j.fct.2008.03.029.
9. Dolušić E., Larrieu P., Moineaux L., et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) inhibitors. 3-(2-(Pyridyl)ethenyl)indoles as potential anticancer immunomodulators // *J. Med. Chem.* 2011. Vol. 54, № 15. P. 5320–5334. DOI: 10.1021/jm2006782.
10. Nomenclature of steroids (recommendations 1989) / ed. by G. P. Moss // *Pure Appl. Chem.* 1989. Vol. 61, issue 10. P. 1783–1822. DOI: 10.1351/pac198961101783.
11. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading // *J. Comput. Chem.* 2010. Vol. 31, issue 2. P. 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
12. Kellis Jr. J. T., Sheets J. J., Vickery L. E. Amino-steroids as inhibitors and probes of the active site of cytochrome P-450. effects on the enzyme from different sources // *J. Steroid Biochem.* 1984. Vol. 20, issue 2. P. 671–676. DOI: 10.1016/0022-4731(84)90141-9.
13. Diczfalusy U., Nylén H., Elander P., et al. 4 β -Hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2011. Vol. 71, issue 2. P. 183–189. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2010.03773.x.
14. Lewisa D. F. V., Lee-Robichaud P. Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998. Vol. 66, issue 4. P. 217–233. DOI: 10.1016/S0960-0760(98)00032-6.

References

1. Cabeza M., Sánchez-Márquez A., Garrido M., et al. Recent advances in drug design and drug discovery for androgen-dependent diseases. *Curr. Med. Chem.* 2016. Vol. 23, No. 8. P. 792–815. DOI: 10.2174/0929867323666160210125642.
2. Chen Z., Tao Z.-Z., Chen S.-M., et al. Indole-3-carbinol inhibits nasopharyngeal carcinoma growth through cell cycle arrest *in vivo* and *in vitro*. *PLoS ONE*. 2013. Vol. 8, issue 12. e82288. DOI: 10.1371/journal.pone.0082288.
3. Sorriento D., del Giudice C., Bertamino A., et al. New small molecules, ISA27 and SM13, inhibit tumour growth inducing mitochondrial effects of p53. *Br. J. Cancer*. 2015. Vol. 112, No. 1. P. 77–85. DOI: 10.1038/bjc.2014.577.
4. Ingallinella P., Bianchi E., Ladwa N. A., et al. Addition of a cholesterol group to an HIV-1 peptide fusion inhibitor dramatically increases its antiviral potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106, No. 14. P. 5801–5806. DOI: 10.1073/pnas.0901007106.
5. Novikova L. A., Faletrov Ya. V., Kovaleva I. E., et al. From structure and functions of steroidogenic enzymes to new technologies of gene engineering. *Biochemistry (Moscow)*. 2009. Vol. 74, No. 13. P. 1482–1504. DOI: 10.1134/S0006297909130057.
6. Stresser D. M., Bjeldanes L. F., Bailey G. S., et al. The anticarcinogen 3,3'-diindolylmethane is an inhibitor of cytochrome P-450. *J. Biochem. Toxicol.* 1995. Vol. 10, No. 4. P. 191–201. DOI: 10.1002/jbt.2570100403.
7. Parkin D. R., Malejka-Giganti D. Differences in the hepatic P450-dependent metabolism of estrogen and tamoxifen in response to treatment of rats with 3,3'-diindolylmethane and its parent compound indole-3-carbinol. *Cancer Detect. Prev.* 2004. Vol. 28, No. 1. P. 72–79. DOI: 10.1016/j.cdp.2003.11.006.

8. Parkin D. R., Lu Y., Bliss R. L., et al. Inhibitory effects of a dietary phytochemical 3,3'-diindolylmethane on the phenobarbital-induced hepatic CYP mRNA expression and CYP-catalyzed reactions in female rats. *Food Chem. Toxicol.* 2008. Vol. 46, issue 7. P. 2451–2458. DOI: 10.1016/j.fct.2008.03.029.
9. Dolušić E., Larrieu P., Moineaux L., et al. Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO) inhibitors. 3-(2-(Pyridyl)ethenyl)indoles as potential anticancer immunomodulators. *J. Med. Chem.* 2011. Vol. 54, No. 15. P. 5320–5334. DOI: 10.1021/jm2006782.
10. Moss G. P. (ed.). Nomenclature of steroids (recommendations 1989). *Pure Appl. Chem.* 1989. Vol. 61, issue 10. P. 1783–1822. DOI: 10.1351/pac198961101783.
11. Trott O., Olson A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010. Vol. 31, issue 2. P. 455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
12. Kellis Jr. J. T., Sheets J. J., Vickery L. E. Amino-steroids as inhibitors and probes of the active site of cytochrome P-450sc. effects on the enzyme from different sources. *J. Steroid Biochem.* 1984. Vol. 20, issue 2. P. 671–676. DOI: 10.1016/0022-4731(84)90141-9.
13. Diczfalusy U., Nylén H., Elander P., et al. 4 β -Hydroxycholesterol, an endogenous marker of CYP3A4/5 activity in humans. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2011. Vol. 71, issue 2. P. 183–189. DOI: 10.1111/j.1365-2125.2010.03773.x.
14. Lewisa D. F. V., Lee-Robichaud P. Molecular modelling of steroidogenic cytochromes P450 from families CYP11, CYP17, CYP19 and CYP21 based on the CYP102 crystal structure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1998. Vol. 66, issue 4. P. 217–233. DOI: 10.1016/S0960-0760(98)00032-6.

Статья поступила в редакцию 18.09.2017.
Received by editorial board 18.09.2017.