УДК 577.112.083

А. Я. ЛУЩИК, А. А. ГИЛЕП, И. П. ГРАБОВЕЦ, С. А. УСАНОВ

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ЦИТОХРОМА CYP1B1 ЧЕЛОВЕКА

Институт биоорганической химии НАН Беларуси

(Поступила в редакцию 25.09.2014)

Введение. Важную роль в метаболизме различных органических соединений (ксенобиотиков) и стероидных гормонов играют микросомальные цитохромы P450, преимущественно локализованные в печени [1, 2]. Одним из наименее изученных форм цитохромов P450 печени является CYP1B1.

Ген цитохрома P450 1B1 (CYP1B1) расположен на хромосоме 2p в 21–22-м регионе и состоит из 3 экзонов и 2 интронов, фермент состоит из 543 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 56 кДа [3]. Индуцируется CYP1B1 полициклическими ароматическими углеводородами, гетероциклическими аминами, N-нитрозаминами и диоксинами. Установлено, что регуляция экспрессии CYP1B1 осуществляется по механизму, сходному с регуляцией экспрессии CYP1A1 и CYP1A2 [4–6].

CYP1B1 является минорной формой цитохрома P450 в печени [7] и участвует в метаболизме N-нитрозаминов, различных полициклических ароматических соединений и стероидных гормонов, таких как 17β-эстрадиол. В ходе гидроксилирования 17β-эстрадиола образуются 2- и 4-гидроксипроизводные эстрадиола, которые затем могут взаимодействовать с ДНК, вызывая мутации [8]. Показано, что ряд полиморфизмов CYP1B1 существенно изменяет каталитическую активность фермента и его субстратную специфичность [8].

Помимо метаболизма стероидных гормонов, CYP1B1 метаболически инактивирует структурно различные противоопухолевые препараты (доксорубицин, доцетаксел, и тамоксифен) и, как следствие, приводит к резистентности опухоли к химиотерапии [9].

Показано, что ряд полиморфизмов CYP1B1 изменяет каталитическую активность фермента и его субстратную специфичность. Данные замены расположены в субстрат- и гемсвязывающих сайтах, которые кодируются вторым и третьим экзонами [8]. Недавние исследования показали, что ряд полиморфных замен приводит к повышению активности CYP1B1 и увеличивает частоту заболевания некоторыми видами злокачественных заболеваний [9]. Среди них рак простаты, рак легких, рак почек [10, 11]. Известно также, что ряд полиморфизмов CYP1B1 связан с соматическими заболеваниями, такими как аномалия Петерса и глаукома, однако механизм развития данных заболеваний не установлен [12, 13].

Известно, что получение белков при помощи бактериальных систем экспрессии является наиболее экономически выгодным, а получение цитохромов P450 из природного материала или реконструкция каталитической активности *in vivo*, как правило, сопряжено с рядом трудностей. Оценка каталитических параметров и установление продуктов реакций, катализируемых с помощью бактосомных препаратов цитохромов P450 также имеет ряд ограничений и трудностей. В связи с этим цель данной работы – получение высокоочищенного препарата CYP1B1 дикого типа путем гетерологической экспрессии с дальнейшей хроматографической очисткой и изучение каталитических свойств белка.

Материалы и методы. ***Экспрессия, выделение и очистка CYP1B1_cw02, CYP1B1_cw03.*** Ночную культуру клеток *E.coli DH5α*, содержащих целевую плазмиду, переносили в TBS-среду

в соотношении 1 : 200. В качестве селективного маркера использовали ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Клетки растили в орбитальном шейкере при температуре 37 °С и перемешивании 180 об/мин. Индукцию синтеза белка проводили добавлением ИПТГ в конечной концентрации 0,5 мМ при оптической плотности А600, равной 0,7 (7 ч), а также добавляли предшественник биосинтеза гема – ω-аминолевулиновую кислоту до концентрации 0,65 мМ. Синтез белка производили при 26 °С и перемешивании 130 об/мин в течении 48 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течении 20 мин, осадок ресуспендировали в *буфере А*: 50 мМ калий-фосфатный буфер (КФБ), (pH 7,4), содержащем 0,3 М NaCl, 20 % глицерин, 0,4 мМ PMSF и хранили при –74 °С.

Клетки разрушали на приборе EmulsiFlex C5 (Avestin Inc., «Canada»), перед разрушением добавляли 5 мкл бензоназы (25 u/мкл). Солюбилизацию белка производили при 4 °С, в течение часа и постоянном перемешивании при добавлении 20%-ного раствора Chaps до конечной концентрации 1 %. Осаждение несолюбилизированного материала производили с ипользованием центрифугирования при 18 500 об/мин в течение часа. Супернатант отбирали и проводили дальнейшую хроматографическую очистку с использованием сорбента Ni^{2+}NTA-Сефарозы 6В. Колонка была предварительно уравновешена *буфером А*. После нанесения белка на Ni-NTA агарозу производили промывку 20 объемами колонки *буфером А*. Затем промывали 20 объемами колонки *буфером А* с градиентом имидазола от 25 до 80 мМ. Сбивку производили *буфером В,* содержащим 50 мМ КФБ (pH 7,4), 0,3 М NaCl, 20 % глицерин, 0,2 % CHAPS и 350 мМ имидазол при скорости потока 11 мл/ч. Полученные фракции разводили в 8 раз буфером, содержащим 100 мМ Tris (pH 7,4), 0,3 М NaCl, 20 % глицерин, 0,3 % CHAPS, 0,1 mM дитиотреитол, и проводили вторую хроматографию на гидроксиапатите. После нанесения белка промывку производили *буфером С*: 10 мМ КФБ (pH 7,4), 0,3 М NaCl, 20 % глицерин, 0.3 % CHAPS, 0,1 мМ дитиотреитол. Сбивку производили *буфером D,* содержащим 600 мМ КФБ (pH 7,4), 0,3 М NaCl, 20 % глицерин, 0,3 % CHAPS. Полученные белковые фракции хранили при –74 °С.

Концентрацию целевого белка определяли исходя из разностного спектра поглощения комплекса низкомолекулярного лиганда (CO) с восстановленным дитионитом натрия цитохромом P450, используя коэффициент молярного поглощения ε_{A450} = 0,091 $мМ^{-1} \cdot см^{-1}$. Разностные спектры поглощения записывались с помощью прибора Shimadzu UV-3000. Для определения чистоты белка и спиновой формы записывали абсолютный спектр поглощения на спектрофотометре Nanodrop 2000.

Определение молекулярной массы целевого белка и наличие примесных белков определяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. В качестве маркера молекулярной массы использовали CSL-PPL «Cleaver scientific».

Разностное спектрофотометрическое титрование. Для определения лигандов активного центра производили разностное спектрофотометрическое титрование. Метод основан на детектировании спектральных изменений в результате межмолекулярного взаимодействия лиганда с железом гема в активном сайте фермента. Конечная концентрация раствора белка составляла 1 мкМ; в качестве буфера разбавления использовали 50 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7,4). Данные титрования были аппроксимированы с помощью алгоритма Левенберга–Марквардта в программном пакете Origin 8.0. Определение константы диссоциации комплекса белок–лиганд (K_d) производили по формуле:

$$A = A_{\max} \frac{[L]_t + [R]_0 + K_d - \sqrt{([L]_t + [R]_0 + K_d)^2 - 4[R]_0[L]_t}}{2[R]_0},$$

где A – наблюдаемое изменение поглощения при концентрации лиганда $[L]$; $A_{\max}$ – изменение поглощения при концентрации лиганда $[L]$, при которой происходит насыщение; $[L]_t$ – общая концентрация лиганда; $[R]_0$ – общая концентрация белка; K_d – константа диссоциации для комплекса белок–лиганд.

Реконструкция каталитической активности CYP1B1. Для реконструкции каталитической активности препарат рекомбинантного CYP1B1 смешивали с NADPH-цитохром P450

редуктазой (CPR) в соотношении 1 : 2 и выдерживали при комнатной температуре 5 мин. Добавляли 50 мМ КФБ (pH 7,4) до конечного объема смеси 500 мкл, добавляли субстрат до концентрации 100 мкМ, и выдерживали при 37 °С 10 мин. Реакцию запускали добавлением регенерирующей системы, содержащей изоцитратдегидрогеназу 1 ед/мл, изоцитрат натрия 2 мг/мл, NADPH 0,0191 мг/мл. Через заданные промежутки времени реакцию останавливали добавлением 10-кратного объема метанола. Полученную смесь упаривали под током аргона и растворяли в 100 мкл этанола.

Хроматографическое разделение продуктов реакции гидроксилирования 17 β-эстрадиола и определение каталитических параметров реакции. Хроматографическое разделение продуктов реакции осуществляли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Agilent 1200. В качестве неподвижной фазы использовали колонку с инвертированной фазой (Agilent eclips XDB-C18). В качестве мобильной фазы для разделения продуктов реакции 17 β-эстрадиола использовали водно-метанольный раствор (45 % вода и 55 % метанол) при изократическом разделении, а для разделения продуктов реакции остальных субстратов использовали водно-метанольный раствор с линейным градиентом метанола от 42 до 70 %.

Результаты и их обсуждение. Для получения растворимого гомогенного препарата CYP1B1 нами были использованы генетические конструкции на базе вектора pCW-LIQ, содержащие кодирующую последовательность CYP1B1. Наличие последовательности, кодирующей CYP1B1 в экспрессионном векторе, проверялось секвенированием с использованием наборов: («ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycler Sequencing Kit», «Big Dye X Terminator Purification Kit» и секвенатора Applied Biosystems 3130). В конструкции CYP1B1_cw02 из С-концевой последовательности были удалены 2 аминокислотных остатка и добавлена гексагистидиновая последовательность, а в N-концевой последовательности белка в конструкции

гистидиновая последовательно

Другим возможным медиатором может являться витамин А, который также метаболизируется CYP1B1 [17]. Однако в литературных источниках нет данных о взаимодействии CYP1B1 с минералокортикоидами, глюкокортикоидами и андрогенами, важной функцией которых является регуляция минерального обмена. Данные разностного спектрофотометрического титрования приведены в таблице. Было установлено взаимодействие по первому типу спектрального ответа с тестостероном, прогестероном, прегненолоном, дезоксикортикостероном, а в случае альдостерона и тестостерон пропионата наблюдался обратный первый тип спектрального ответа.

Параметры, характеризующие взаимодействие CYP1B1 со стероидами

Лиганд	ΔA_{max}	K_d, мкМ
Прогестерон	0,075	29,06 ± 5,56
Тестостерон	0,018	69,12 ± 17,20
Тестостерон пропионат	0,014	0,12 ± 0,08
Прегненалон	0,019	1,42 ± 0,18
Дезоксикортикостерон	0,044	86,28 ± 16,22
Кортизон	Нет взаимодействия	–
Кортизол	Нет взаимодействия	–
Альдостерон	0,019	5,56 ± 1,11

Для оценки каталитических параметров реакции с участием CYP1B1 была реконструирована каталитическая система с хорошо изученным субстратом 17 β-эстрадиолом. Нами подтверждено образование 2- и 4-гидроксилированных продуктов 17 β-эстрадиола, а скорость реакций гидроксилирования составила соответственно 0,057 и 0,15 мин$^{-1}$ для данных продуктов реакции (рис. 3).

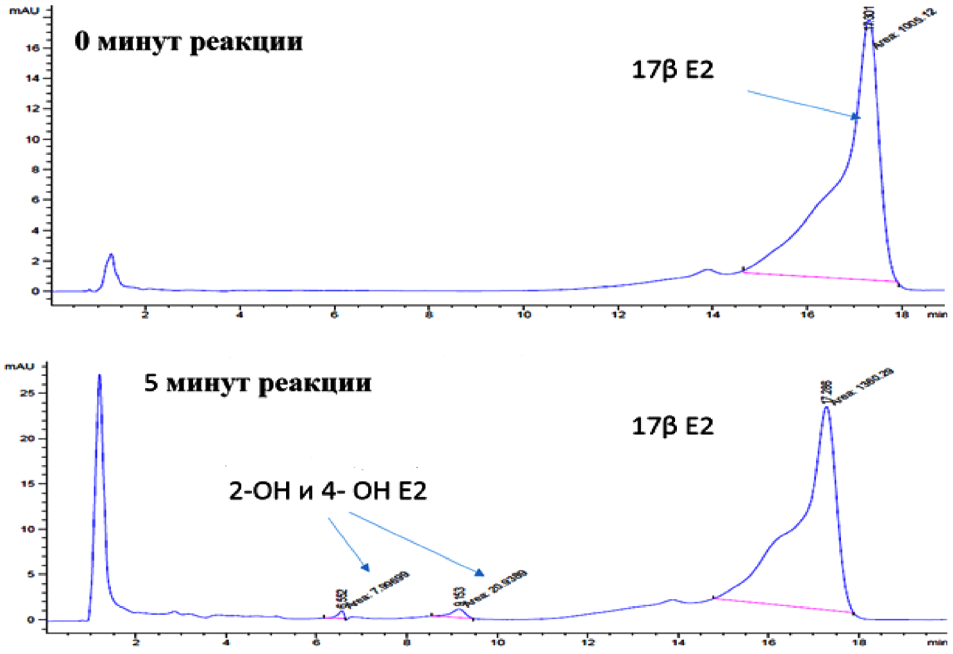

Рис. 3. Хроматограммы продуктов реакции гидроксилирования 17 β-эстрадиола препаратом CYP1B1

Выводы. Нами разработана эффективная система гетерологической экспрессии и получен гомогенный препарат CYP1B1_cw02 с высоким выходом 12,43 мг/л, тогда как «дикая» полноразмерная форма гемопротеида синтезируется в денатурированном виде в бактериальной системе экспрессии. Проведен скрининг лигандов активного центра фермента и выявлено взаимодействие CYP1B1 с тестостероном, тестостерон пропионатом, прогестероном, прегненолоном, дезоксикортикостероном. В результате реконструкции каталитической активной системы выявлено образование продуктов гидроксилирования CYP1B1 для прогестерона, дезоксикортикостерона,

но не обнаружены продукты реакции гидроксилирования альдостерона. Для установления механизмов развития глаукомы необходимо получение мутантных форм фермента, связанных с заболеванием, установление каталитических параметров и продуктов гидроксилирования.

Литература

1. *Guengerich F. P.* Cytochromes P450, drugs, and diseases. Mol Interv, 2003. Vol. 3, N 4. P. 194–204.
2. *Hodgson J.* ADMET-turning chemicals into drugs. Nat Biotechnol, 2001. Vol. 19, N 8. P. 722–726.
3. *Stoilov I. et al.* Sequence analysis and homology modeling suggest that primary congenital glaucoma on 2p21 results from mutations disrupting either the hinge region or the conserved core structures of cytochrome P4501B1. Am J Hum Genet, 1998. Vol. 62, N 3. P. 573–584.
4. *Shehin S. E., Stephenson R. O., Greenlee W. F.* Transcriptional regulation of the human CYP1B1 gene. Evidence for involvement of an aryl hydrocarbon receptor response element in constitutive expression. J Biol Chem, 2000. Vol. 275, N 10. P. 6770–6776.
5. *Shimada T. et al.* Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. Carcinogenesis, 2002. Vol. 23, N 7. P. 1199–1207.
6. *Beedanagari S. R., Taylor R. T., Hankinson O.* Differential regulation of the dioxin-induced Cyp1a1 and Cyp1b1 genes in mouse hepatoma and fibroblast cell lines. Toxicol Lett. Vol. 194, N 1–2. P. 26–33.
7. *Nelson D. R. et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. Pharmacogenetics, 1996. Vol. 6, N 1. P. 1–42.
8. *Hanna I. H. et al.* Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) pharmacogenetics: association of polymorphisms with functional differences in estrogen hydroxylation activity. Cancer Res, 2000. Vol. 60, N 13. P. 3440–3444.
9. *McFadyen M. C. et al.* Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance. Biochem Pharmacol, 2001. Vol. 62, N 2. P. 207–212.
10. *Sasaki M. et al.* Polymorphisms of the CYP1B1 gene as risk factors for human renal cell cancer. Clin Cancer Res, 2004. Vol. 10, N 6. P. 2015–2019.
11. *Chaib H. et al.* Profiling and verification of gene expression patterns in normal and malignant human prostate tissues by cDNA microarray analysis. Neoplasia, 2001. Vol. 3, N 1. P. 43–52.
12. *Bhattacharjee A. et al.* Leu432Val polymorphism in CYP1B1 as a susceptible factor towards predisposition to primary open-angle glaucoma. Mol Vis, 2008. Vol. 14. P. 841–850.
13. *Stoilov I., Akarsu A. N., Sarfarazi M.* Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. Hum Mol Genet, 1997. Vol. 6, N 4. P. 641–647.
14. *Guengerich F. P. et al.* Heterologous expression of human drug-metabolizing enzymes. Drug Metab Dispos, 1997. Vol. 25, N 11. P. 1234–1241.
15. *Strushkevich N. et al.* Structural analysis of CYP2R1 in complex with vitamin D3. J Mol Biol, 2008. Vol. 380, N 1. P. 95–106.
16. *Mookherjee S. et al.* Molecular basis for involvement of CYP1B1 in MYOC upregulation and its potential implication in glaucoma pathogenesis. PLoS One, 2012. Vol. 7, N 9. P. e45077.
17. *Chambers D. et al.* RALDH-independent generation of retinoic acid during vertebrate embryogenesis by CYP1B1. Development, 2007. Vol. 134, N 7. P. 1369–1383.

A. J. LUSHCHYK, A. A. GILEP, I. P. GRABOVETS, S. A. USANOV

HETEROLOGOUS EXPRESSION, ISOLATION, PURIFICATION, PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF RECOMBINANT HUMAN CYTOCHROME CYP1B1

Summary

In order to study the catalytic properties of CYP1B1 toward a number of steroid compounds, we have developed an effective system of heterologous expression of hemoprotein in *E.coli* and isolated the preparation of recombinant CYP1B1 «soluble» form in a highly purified state. The interaction parameters of the purified enzyme with steroid ligands have been determined.