



УДК 577.175.6

## ПЕНТАЦИКЛИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ СТЕРОИДОВ: ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -ЦИКЛОПЕНТАНОПРОГЕСТЕРОНА С БЕЛКАМИ МАТКИ КРЫСЫ

© 1999 г. А. Н. Смирнов<sup>#</sup>, Е. В. Покровская,  
В. П. Шевченко\*, И. С. Левина\*\*, А. В. Камерницкий\*\*

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119899, Москва;

\* Институт молекулярной генетики РАН, Москва;

\*\* Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН, Москва

Поступила в редакцию 05.02.99 г. Принята к печати 30.03.99 г.

С помощью <sup>3</sup>H-меченых производных измерены кинетические параметры специфического связывания прогестерона (I) и 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестерона (II) с белками растворимой фракции матки крысы. Установлено, что их сродство к белкам сопоставимо ( $K$  10.5  $\pm$  2.4 и 6.7  $\pm$  3.4 нМ для (I) и (II), соответственно, при 22 ч инкубации). Немеченое соединение (II) способно вытеснять [<sup>3</sup>H]прогестерон из комплексов с белком с независимой от концентрации эффективностью, соответствующей соотношению величин  $K$  для соединений (I) и (II). В то же время эффективность немеченого прогестерона по вытеснению [<sup>3</sup>H]соединения (II) из комплексов с белком падала с ростом концентрации прогестерона. Концентрация мест высокоаффинного связывания [<sup>3</sup>H]соединения (II) в 1.5–2 раза превышала концентрацию мест для [<sup>3</sup>H]прогестерона. Динамика диссоциации комплексов [<sup>3</sup>H]прогестерона и [<sup>3</sup>H]соединения (II) с белками носила двуфазный характер с тенденцией к снижению констант скорости диссоциации для обеих фаз с увеличением времени экспозиции [<sup>3</sup>H]лигандов с белками. Соотношение быстро- и медленнодиссоциирующих лиганд-рецепторных комплексов при этом не менялось. Полученные данные позволяют предполагать наличие в растворимой фракции матки крысы двух типов белков, различающихся по способности узнавать дополнительный пентацикл D' в структуре стероида.

*Ключевые слова:* рецепторы прогестерона; аналоги прогестерона; специфичность связывания; кинетика связывания.

В женском организме стероидный гормон прогестерон (соединение (I)) выполняет ряд функций, связанных с репродукцией. Он участвует в организации полового цикла, стимулирует созревание и оплодотворение ооцита, подготавливает репродуктивный тракт к имплантации зародыша и играет ведущую роль в поддержании беременности. Прогестерон оказывает также влияние на поведенческие реакции и водно-солевой обмен организма [1–3].

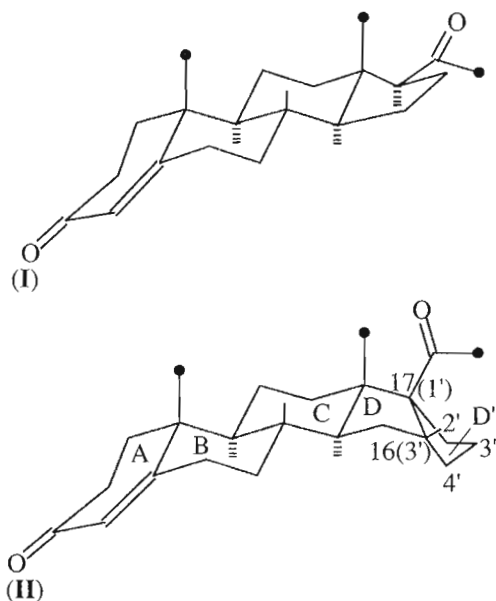
Синтетические аналоги прогестерона находят широкое применение в акушерстве и гинекологии, а также в гормональной контрацепции. Широта спектра биологических эффектов природного гормона и большинства его аналогов не всегда соответствует потребностям медицинской практики. Создание гормональных аналогов более узкой направленности представляется возможным за счет использования известной неоднородности рецепторов прогестерона [4–5] и за счет относительной автономности различных их

функций (гомодимеризации молекул, транспорта в клеточное ядро, связывания с гормончувствительными элементами ДНК, взаимодействия с коактиваторными и корепрессорными транскрипционными факторами), пластичности конформации гормонсвязывающего домена рецептора и отсутствия жесткой детерминированности аминокислотных остатков рецептора, осуществляющих взаимодействие с лигандами [6–8].

Таким образом, при дизайне селективного аналога прогестерона или другого стероидного гормона (при сохранении высокого сродства к рецептору) следует, видимо, предусматривать возможность индукции изменения конформации рецептора, отличной от вызываемой природным гормоном. Возможность дифференцированного влияния на конформацию подтверждается анализом атомных моделей комплексов рецептора с разными лигандами, полученных на основе рентгеноструктурного анализа [9].

Одним из возможных подходов может служить введение в структуру природного гормона заместителей, предположительно способных изменять

<sup>#</sup> Автор для переписки (тел.: (095) 939-36-78; факс: (095) 939-43-09; e-mail: smirnov\_an@hotmail.com).



конstellацию аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии с лигандом. К таким аналогам можно отнести 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестерон (соединение II). Дополнительный D'-алкановый цикл только за счет своего объема может отдалить  $\alpha$ -поверхность стероида от расположенных в непосредственной близости аминокислотных остатков белка и при этом образовать новые гидрофобные связи. Но влияние данного заместителя на лиганд-рецепторное взаимодействие, видимо, этим не ограничивается. Сочленение двух циклопентановых структур (колец D и D') приводит к существенному изменению конфигурации кольца D стероида, изменению ориентации и ограничению подвижности 17 $\beta$ -ацетильной боковой группы аналога [10], играющей доминантную роль во взаимодействии прогестерона с его рецептором [11]. Можно, таким образом, ожидать, что конформация рецептора прогестерона в

комплексе с прогестероном (I) и его аналогом (II) различна и, соответственно, спектры биологических эффектов этих соединений также могут различаться. Действительно, при введении самкам кролика соединение (II) стимулировало преградивные изменения в матке более эффективно, чем сам прогестерон, но было менее эффективно в тесте поддержания беременности и не проявляло контрацептивной активности [12, 13]. Настоящая работа представляет собой этап в изучении особенностей взаимодействия соединения (II) с рецепторами прогестерона, определяющих диссоциацию его биологических эффектов.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

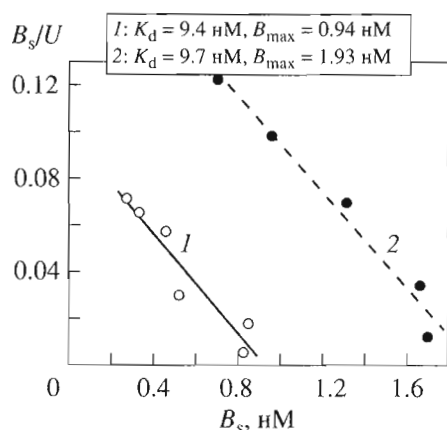
Оба  $^3\text{H}$ -меченых лиганда специфически связываются белками растворимой фракции матки. Представленные на рис. 1 графики Скэтчарда свидетельствуют об однородности по сродству высокоаффинных мест связывания для [ $^3\text{H}$ ]соединения (I) и [ $^3\text{H}$ ]соединения (II) с сопоставимыми величинами  $K_d$  порядка 10 нМ (табл. 1). При этом, однако, концентрация связывающих мест ( $B_{\text{max}}$ ) для [ $^3\text{H}$ ]аналога (II) приблизительно в 2 раза превышала аналогичный параметр для [ $^3\text{H}$ ]прогестерона.

Специфическое связывание [ $^3\text{H}$ ]прогестерона белком подавлялось как немеченым прогестероном, так и немеченым аналогом (II) со сходной эффективностью (рис. 2а, табл. 1). Ингибирование связывания [ $^3\text{H}$ ]прогестерона немеченым соединением (II) носило конкурентный характер (рис. 3а) с эффективностью, не зависевшей от концентрации конкурента, о чем свидетельствует параллельный ход кривых 1 и 2 на рис. 2а и линейность зависимости наклона графиков от концентрации конкурента на рис. 3а. Эти результаты соответствуют модели "один белок-два конкурирующих лиганда".

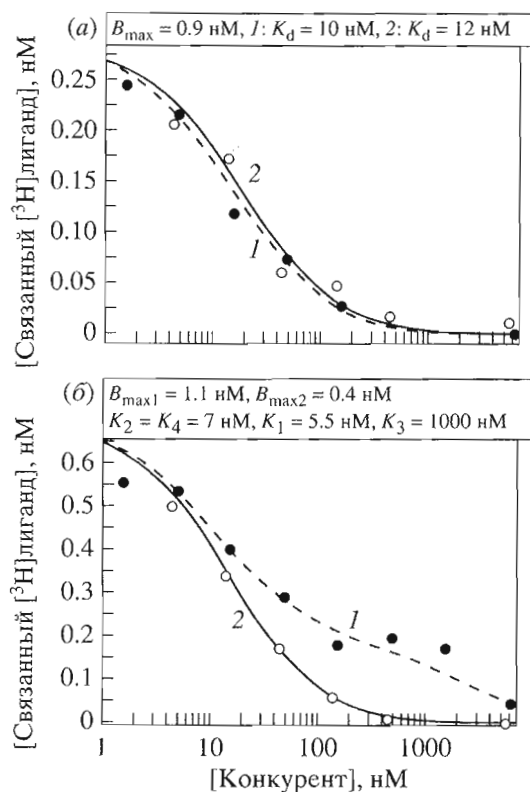
**Таблица 1.** Анализ равновесных параметров взаимодействия прогестерона и 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестерона с белками растворимой фракции матки крысы

[ $^3\text{H}$ ]Лиганд	Немеченый лиганд	Время, ч	$K_1$ , нМ	$K_2 = K_4$ , нМ	$K_3$ , нМ	$B_{\text{max}1}$ , пмоль на 1 мг белка	$B_{\text{max}2}$ , пмоль на 1 мг белка
Прогестерон	16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклопентанопрогестерон	22	9.0 $\pm$ 1.3 (3)	11.2 $\pm$ 0.8 (3)	не выявл.	0.72 $\pm$ 0.26 (3)	не выявл.
16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Циклопентанопрогестерон	Прогестерон	5	6.5 $\pm$ 1.6 (3)	18.3 $\pm$ 4.2 (3)	633 $\pm$ 289 (3)	2.06 $\pm$ 0.96 (3)	1.11 $\pm$ 0.26 (3)
-	-	22	6.7 $\pm$ 3.4 (5)	10.5 $\pm$ 2.4 (5)	810 $\pm$ 243 (5)	0.99 $\pm$ 0.23 (5)	0.51 $\pm$ 0.04 (5)

Представлены средние величины  $\pm$  ошибка измерений. В скобках – число определений.  $K_1 = K$  для высокоаффинных сайтов связывания прогестерона.  $K_2 = K_4 = K$  для специфических сайтов связывания 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестерона.  $K_3 = K$  для низкоаффинных сайтов связывания прогестерона.  $B_{\text{max}1}$  – концентрация высокоаффинных сайтов связывания прогестерона.  $B_{\text{max}2}$  – концентрация низкоаффинных сайтов связывания прогестерона (см. схему и систему уравнений в разделе "Эксперимент. часть").



**Рис. 1.** Скэтчардовский анализ связывания [ $^3\text{H}$ ]прогестерона (1) и [ $^3\text{H}$ ]-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестерона (2) белками растворимой фракции матки крысы.  $B_s$  – специфически связанный [ $^3\text{H}$ ]лиганд,  $U$  – несвязанный [ $^3\text{H}$ ]лиганд. Время инкубации 22 ч. Концентрация белка 0.73 мг/мл.

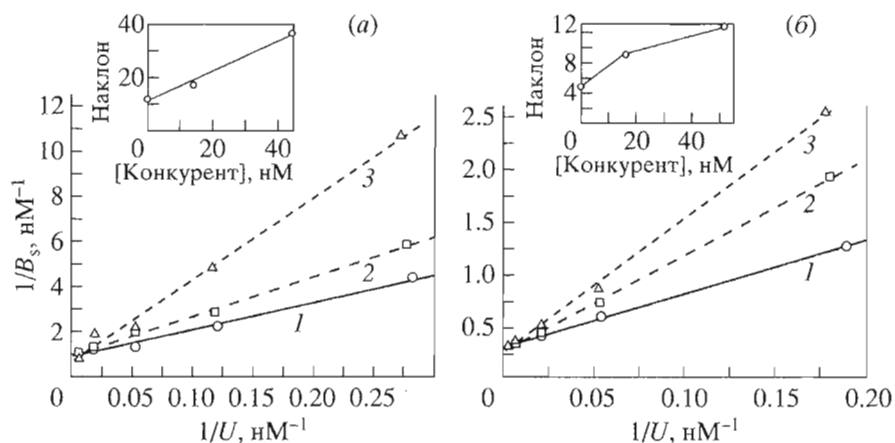


**Рис. 2.** Ингибирование специфического связывания белками растворимой фракции матки крысы [ $^3\text{H}$ ]прогестерона (а) и [ $^3\text{H}$ ]-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестерона (б) немечеными прогестероном (1) и 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестероном (2). Линии тренда соответствуют параметрам, указанным в рамке. Время инкубации 22 ч. Концентрация белка 0.73 мг/мл. Концентрации [ $^3\text{H}$ ]лигандов – 4.8 (а) и 6.6 нМ (б).

Иная ситуация наблюдалась при использовании [ $^3\text{H}$ ]аналога (II). Хотя немеченый прогестерон вытесняет [ $^3\text{H}$ ]соединение (II) из комплексов с белком, но его эффективность снижается с ростом концентрации, что проявляется в отсутствии параллельности кривых вытеснения немечеными конкурентами (I) и (II) (рис. 2б). Сходный с прогестероном характер вытеснения [ $^3\text{H}$ ]соединения (II) из комплексов с белком проявлял сильный прогестин промегестон (R5020). Графики ингибирования связывания [ $^3\text{H}$ ]соединения (II) немеченым прогестероном в двойных обратных координатах пересекаются на оси ординат (рис. 3б), что свидетельствует о конкурентном характере ингибирования, но прирост наклона этих графиков не пропорционален концентрации прогестерона.

Для объяснения этих данных мы предположили, что соединение (II) специфически связывается двумя белками. Поскольку скэтчардовские графики для [ $^3\text{H}$ ]соединения (II) линейны (см. рис. 1), эти белки, очевидно, не различаются существенно по сродству к соединению (II) (что соответствует  $K_2 = K_4$  на схеме, представленной в разделе “Экспериментальная часть”). Один из белков, очевидно, соответствует рецептору прогестерона и связывает прогестерон (и промегестон) с высоким сродством ( $K_1$  на схеме), соответствующим  $K$  связывания [ $^3\text{H}$ ]прогестерона. Связывание прогестерона (и промегестона) вторым белком значительно слабее ( $K_3$  на схеме) и поэтому практически не отражается на ходе скэтчардовских графиков для [ $^3\text{H}$ ]прогестерона (см. рис. 1). Концентрации двух белков, связывающих соединение (II), сопоставимы. Последнему предположению соответствуют данные о приблизительно двукратном превышении величин концентрации высокоаффинных мест связывания для [ $^3\text{H}$ ]соединения (II) (в соответствии со схемой и системой уравнений из раздела “Экспериментальная часть”  $B_{\max}$  для соединения (II) =  $B_{\max 1} + B_{\max 2} = P_1 L + P_1 + P_1 L^* + P_2 L + P_2 + P_2 L^*$ ) над аналогичным параметром для [ $^3\text{H}$ ]прогестерона ( $B_{\max}$  для прогестерона =  $B_{\max 1}$ ) (см. рис. 1). В соответствии с этой гипотезой было проведено численное решение указанной выше системы уравнений с подбором параметров  $B_{\max 1}/B_{\max 2}$ ,  $K_1$  и  $K_3$ . Полученные расчетные кривые достаточно хорошо соответствуют экспериментальным точкам (см. рис. 2б) и параметрам, полученным с помощью скэтчардовского анализа (см. табл. 1). Таким образом, модель “два белка–два конкурирующих лиганда” вполне отвечает имеющемуся экспериментальному материалу.

Характер ингибирования связывания [ $^3\text{H}$ ]соединения (II) немеченым прогестероном не менялся принципиально при изменениях условий инкубации лигандов с белком: добавлении в инкубационную смесь молибдата натрия (рис. 4а, б), увеличении концентрации [ $^3\text{H}$ ]соединения (II)



**Рис. 3.** Определение типа ингибирования специфического связывания белками растворимой фракции матки крысы  $[^3\text{H}]$ прогестерона немеченым  $16\alpha,17\alpha$ -циклопентанопрогестероном (а) и  $[^3\text{H}]$ - $16\alpha,17\alpha$ -циклопентанопрогестероном немеченым прогестероном (б). 1 – в отсутствие конкурента, 2, 3 – в присутствии 15.9 и 50.3 (а) или 14.1 и 44.6 нМ (б) немеченого конкурента. На вставке – зависимость наклона графиков от концентрации конкурента.  $B_s$  – специфически связанный  $[^3\text{H}]$ лиганд,  $U$  – несвязанный  $[^3\text{H}]$ лиганд. Время инкубации 5 ч. Концентрация белка 1.8 (а) и 1.5 мг/мл (б). Рассчитанные величины  $K$  и  $K_i$  (нМ): а – 12.5 и 20.0, б – 16.8 и 18.2 (для концентрации прогестерона 15.9 нМ) или 35.9 (для концентрации прогестерона 50.3 нМ).

(рис. 4в, г), увеличении длительности инкубации (рис. 4д, е), хотя параметры лиганд-белкового взаимодействия при этом могли меняться. Эти данные позволяют думать, что два предполагаемых белка не являются взаимно превращающимися в условиях эксперимента формами одного белка и что наблюдаемый характер ингибирования связывания  $[^3\text{H}]$ соединения (II) не является результатом кооперативных взаимодействий при димеризации рецептора прогестерона, которая, как известно, предотвращается молибдатом [14].

Анализ кинетики диссоциации комплексов  $[^3\text{H}]$ лигандов (I) и (II) с белком показал (рис. 5а, б), что в каждом случае этот процесс имеет две фазы – быструю и медленную, каждая из которых описывается экспоненциальной зависимостью, характерной для реакций 1-го порядка. Соответствующие величины констант скорости диссоциации ( $k_{-1}$ ) комплексов  $[^3\text{H}]$ прогестерона и  $[^3\text{H}]$ аналога (II) с белком близки между собой (табл. 2).

Доля быстро- и медленнодиссоциирующих комплексов  $[^3\text{H}]$ прогестерона и  $[^3\text{H}]$ соединения (II) также была сходной. С увеличением длительности экспозиции  $[^3\text{H}]$ лигандов с белком наблюдалась тенденция к снижению величин  $k_{-1}$  обеих фаз диссоциации. Соотношение быстро- и медленнодиссоциирующих  $[^3\text{H}]$ лиганд-белковых комплексов при этом достоверно не менялось (рис. 5в, г, табл. 2).

Сопоставление полученных результатов с данными, представленными в предыдущем разделе, позволяет предполагать, что образование комплексов рецептора прогестерона с прогестероном и соединением (II) приводит к однотипным изменениям конформации рецепторной молекулы, проявляющимся в увеличении стабильности комплексов с лигандом. Белок, предпочтительно связывающий соединение (II) по сравнению с прогестероном, в этом отношении ведет себя сходно с рецептором прогестерона.

**Таблица 2.** Кинетические параметры диссоциации специфических комплексов  $[^3\text{H}]$ прогестерона и  $[^3\text{H}]$ - $16\alpha,17\alpha$ -циклопентанопрогестерона с белками растворимой фракции матки крысы

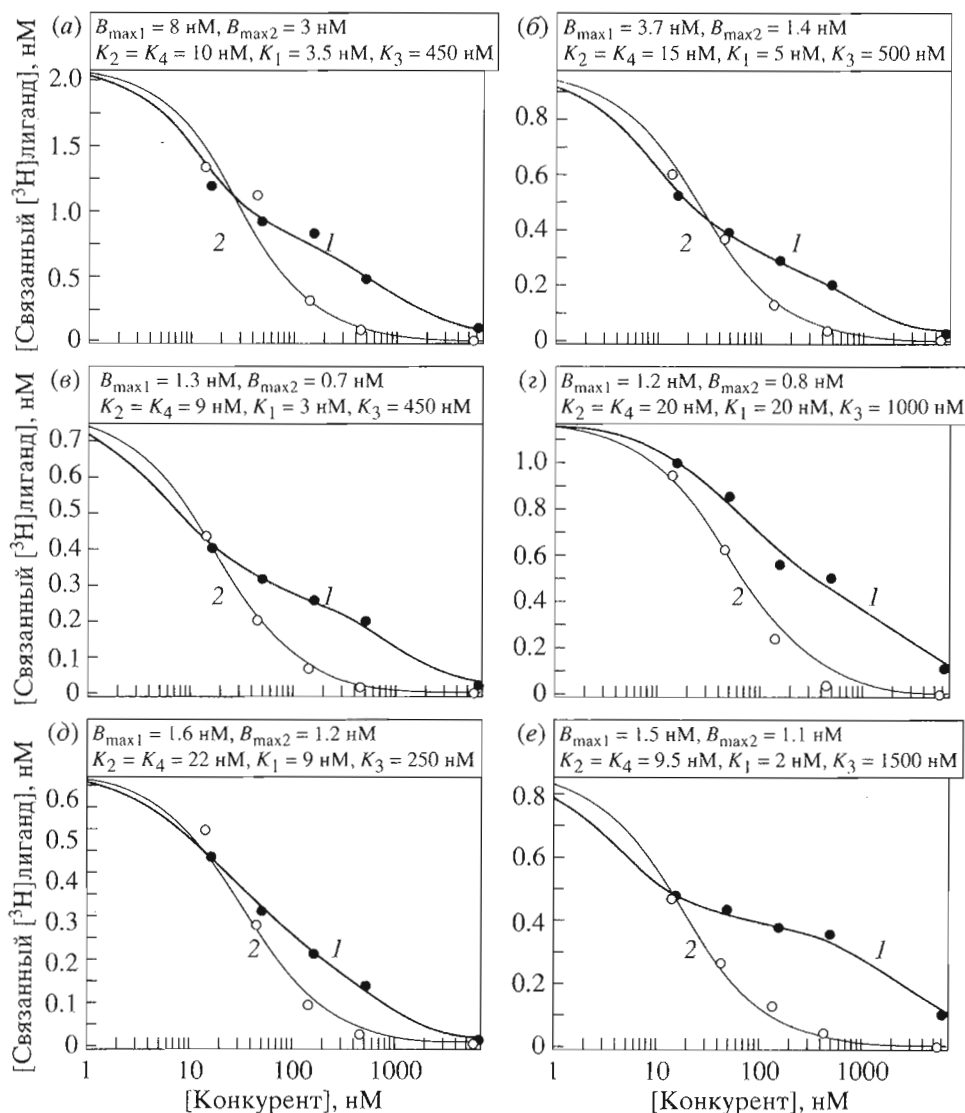
$[^3\text{H}]$ Лиганд	Время преинкубации, ч	$k'_{-1}, 10^4 \text{ c}^{-1}$	$k''_{-1}, 10^5 \text{ c}^{-1}$	$R^{***}$
Прогестерон	1	$6.5 \pm 0.8 (14)^*$	$5.1 \pm 0.5 (14)$	$0.51 \pm 0.04 (6)$
	22	$2.6 \pm 0.3 (3)^{\#}$	$2.5 \pm 0.6 (3)^{\#}$	$0.47 \pm 0.05 (3)$
$16\alpha,17\alpha$ -Циклопентанопрогестерон	1	$7.8 \pm 2.5 (6)$	$9.2 \pm 2.2 (6)$	$0.56 \pm 0.08 (6)$
	22	$4.0 \pm 0.9 (6)^{\#\#}$	$4.7 \pm 1.2 (6)^{\#\#}$	$0.50 \pm 0.11 (6)$

\* Представлены средние величины  $\pm$  ошибка измерений. В скобках – число определений.

\*\* Доля быстродиссоциирующих комплексов.

$\# P < 0.05$  по сравнению с 1-часовой преинкубацией.

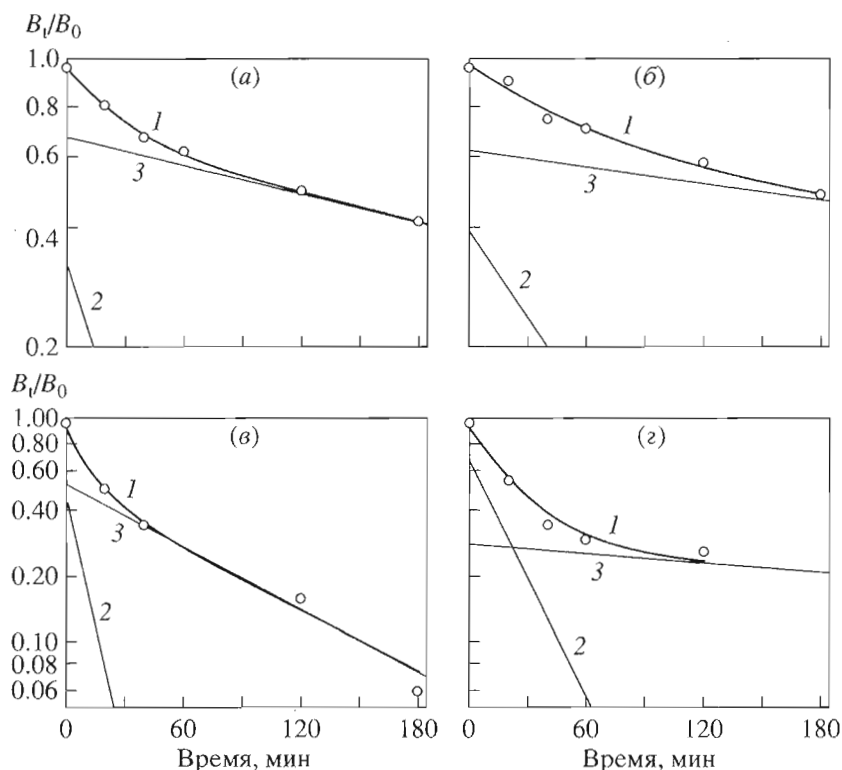
$\#\# P < 0.05$  по сравнению с 1-часовой преинкубацией в парных определениях.



**Рис. 4.** Влияние условий инкубации  $[^3\text{H}]$ - $16\alpha,17\alpha$ -циклопентанопрогестерона на характер ингибирования его связывания белками растворимой фракции матки крысы немеченым прогестероном. (а), (б) – Влияние молибдата: в инкубационную смесь (см. “Эксперимент. часть”) добавляли 20 мМ NaCl (а) или 20 мМ  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (б); время инкубации 5 ч, концентрация  $[^3\text{H}]$ лиганда 4.5 нМ, концентрация белка 2.0 (а) и 1.8 мг/мл (б). (в), (г) – Влияние концентрации  $[^3\text{H}]$ лиганда: концентрация  $[^3\text{H}]$ лиганда составляла 6.6 (в) или 29.9 нМ (г); время инкубации 22 ч, концентрация белка 1.6 мг/мл. (д), (е) – Влияние времени инкубации: время инкубации составляло 5 (д) или 22 ч (е); концентрация  $[^3\text{H}]$ лиганда 7.1 нМ, белка – 1.7 мг/мл. Другие обозначения как на рис. 2.

Сравнение результатов настоящей работы с полученными нами ранее [15–17] данными по изучению кинетики взаимодействия рецептора прогестерона с другими  $16\alpha,17\alpha$ -циклоалкановыми производными прогестерона позволяет сделать вывод, что тип заместителя оказывает дифференцированное влияние на разные элементы конформации рецептора.  $16\alpha,17\alpha$ -Циклогексановый [15] и  $16\alpha,17\alpha$ -циклогексановый [17] заместители индуцируют зависимый от времени переход быстродиссоциирующей формы рецептора в медленнодиссоциирующую. Сходная, но менее выраженная тенденция наблюдается с  $16\alpha,17\alpha$ -циклопропано-

вым заместителем [16].  $16\alpha,17\alpha$ -Циклопентанопрогестерон, таким образом, не укладывается в рамки механистической гипотезы о значении гидрофобности лиганда для трансформации формы рецептора с быстрой кинетикой диссоциации комплексов в медленнодиссоциирующую форму, что, вероятно, связано с упоминавшимися особенностями геометрии этого соединения. В то же время  $16\alpha,17\alpha$ -циклопентановый заместитель, как и другие  $16\alpha,17\alpha$ -циклоалкановые заместители, стимулирует зависимое от времени снижение величин  $k_{-1}$  для диссоциации лиганд-рецепторных



**Рис. 5.** Кинетика диссоциации специфических комплексов [ $^3\text{H}$ ]прогестерона (а, б) и [ $^3\text{H}$ ]-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестерона (в, г) с белками растворимой фракции матки крысы. Время преинкубации составляло 1 (а, в) или 22 ч (б, г). 1 – Экспериментальные данные с рассчитанным трендом, 2 и 3 – расчетные графики для быстро- и медленнодиссоциирующих комплексов.  $B_t$  и  $B_0$  – текущая и исходная концентрации специфически связанного [ $^3\text{H}$ ]лиганда. Концентрации белка: а, б – 2.1; в, г – 1.7 мг/мл, концентрации [ $^3\text{H}$ ]лигандов: а, б – 9.8; в, г – 7.0 нМ. Рассчитанные параметры  $R'$ ,  $k'_{-1}$  ( $10^4 \text{ c}^{-1}$ ) и  $k''_{-1}$  ( $10^5 \text{ c}^{-1}$ ), соответственно, равнялись: а – 0.33, 5.9 и 4.6; б – 0.4, 2.8 и 2.7; в – 0.49, 14.9 и 18.3; г – 0.67, 6.9 и 2.6.

комплексов, таким образом, обеспечивая определенное изменение конформации рецептора.

Из изученных к настоящему времени 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклоалкановых производных прогестерона ингибирование немецким прогестероном связывания [ $^3\text{H}$ ]лигандов белком соответствовало модели “два белка–два лиганда” лишь в случае [ $^3\text{H}$ ]аналога (II) и 6 $\alpha$ -метил[ $^3\text{H}$ ]-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерона [15]. Пока неясно, за счет чего 6 $\alpha$ -метильная группа придает 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрогестерону свойство, сходное со свойством 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопрогестерона. Возможно, эта группа, образуя гидрофобные связи с белком, аллостерически влияет на структуру участка белковой молекулы, окружающего кольцо D стероида.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все использованные реактивы имели квалификацию химически чистые. [1,2,6,7- $^3\text{H}$ ]прогестерон (соединение I) с удельной радиоактивностью 80 Ки/ммоль был приобретен в фирме “Amersham” (Англия). [3',4'- $^3\text{H}$ ]-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклопентанопроге-

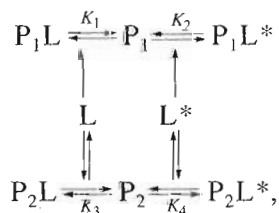
стерон (соединение II, 41 Ки/ммоль) был синтезирован нами каталитическим гидрированием  $\Delta^3$ -двойной связи в кольце D' на заключительной стадии синтеза стероида. Радиохимическую чистоту препаратов контролировали колоночной хроматографией на Sepagone C18 (7 мкм,  $3.3 \times 150$  мм) с использованием для элюции смеси метанол–вода (95 : 5, по объему) со скоростью 0.5 мл/мин, а также ТСХ в системе хлороформ–этиловый эфир (17 : 3, по объему). Немеченый аналог (II) был синтезирован как описано ранее [12]. Промегестон (R5020) был приобретен в фирме “New England Nuclear” (США). Другие стероиды, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), дитиотреит, пропиленгликоль, глицерин и Trisma-основание фирмы “Sigma” (США). Использовали также активированный уголь Norit-A (Serva, ФРГ), декстран-70 (Fluka, Швейцария), бычий сывороточный альбумин (Диа-М, Москва). Буферный раствор с pH 7.5 при 20 $^\circ\text{C}$  имел следующий состав: 10 мМ Трис-НСl, 10 мМ KCl, 0.5 мМ PMSF, 1 мМ дитиотреит, 30% (по объему) глицерин.

В работе использовали половозрелых беспородных самок крыс массой 180–220 г. Животные

получали ежедневные инъекции 1 мкг эстрадиола-17 $\beta$  в 200 мкл пропиленгликоля внутримышечно в течение 4 сут. Через 1 сут после последней инъекции животных забивали декапитацией. Матки извлекали и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  до 2 месяцев. Гомогенизацию ткани и все последующие процедуры проводили при  $0-4^{\circ}\text{C}$ . Ткань измельчали ножницами и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в 5–7 объемах указанного выше буфера. Гомогенат центрифугировали при 50000 g в течение 1 ч. Надосадочную фракцию (цитозоль) с концентрацией белка 2–4 мг/мл использовали немедленно.

Для определения равновесных параметров связывания стероидов белками и анализа характера взаимного ингибирования этого связывания аликвоты цитозоля (100 мкл) инкубировали при  $0-4^{\circ}\text{C}$  в течение 5 или 22 ч с [ $^3\text{H}$ ]лигандом ( $25-40 \times 10^3$  имп/мин, конечная концентрация 5–8 нМ) в отсутствие или в присутствии немеченого одноименного или/и конкурирующего лиганда (конечная концентрация 1.4–6400 нМ) в присутствии 3 мкМ кортизола в суммарном объеме 200 мкл. Несвязанный белками лиганд удаляли обработкой 100 мкл 2% суспензии угля, покрытого декстраном (0.67%), в течение 5 мин с последующим отделением угля центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин. В аликвотах супернатанта (250 мкл) измеряли содержание радиоактивности с использованием сцинтилляционной жидкости ЖС-8 и спектрометра Rackbeta 1217 (LKB, Швеция). Эффективность счета составляла 30%.

Величины равновесной константы диссоциации ( $K$ ) и концентрации связывающих мест ( $B_{\max}$ ) для высокоаффинного связывания [ $^3\text{H}$ ]лигандов рассчитывали с помощью графиков Скэтчарда [18], используя величины количества специфически связанного [ $^3\text{H}$ ]лиганда, получаемые вычитанием количества неспецифически связанного [ $^3\text{H}$ ]лиганда (измеряемого в присутствии избытка (5.65–6.4 мкМ) немеченого лиганда) из количества суммарно связанного лиганда. Тип ингибирования связывания анализировали в двойных обратных координатах [19]. Константу ингибирования ( $K_i$ ) определяли в производных координатах (“наклон–концентрация конкурента”) [20]. Анализ конкуренции двух лигандов за связывающие участки белка проводили, исходя из предположения о наличии в системе двух белков, различающихся по сродству к соединению (I), но не к соединению (II) в соответствии со схемой:



где  $P_1$  и  $P_2$  – неоккупированные формы двух белков,  $L$  и  $L^*$  – несвязанные формы немеченого и меченого лиганда,  $PL$  и  $PL^*$  – лиганд-белковые комплексы,  $K_1 - K_4$  – равновесные константы диссоциации. Приведенной схеме соответствует система уравнений:

$$P_1L = P_1L/K_1$$

$$P_1L^* = P_1L^*/K_2$$

$$P_2L = P_2L/K_3$$

$$P_2L^* = P_2L^*/K_4$$

$$P_1L + P_1 + P_1L^* = B_{\max 1}$$

$$P_2L + P_2 + P_2L^* = B_{\max 2}$$

$$P_1L + L + P_2L = L_0$$

$$P_1L^* + L^* + P_2L^* = L_0^*$$

Решение этой системы позволяет получать значения концентраций всех форм лигандов и белков, представленных на схеме. Численное решение производили с помощью программы, использующей метод Фабиато [21]. Параметры  $B_{\max}$  и  $K$  для меченого лиганда получали с помощью графиков Скэтчарда. Подбирали соотношение двух белков и величины  $K$  для немеченого лиганда, обеспечивающие наилучшее соответствие расчетных графиков экспериментальным данным для количества специфически связанного [ $^3\text{H}$ ]лиганда при варьирующих концентрациях немеченого лиганда. Критерием соответствия служила сумма квадратов отклонений.

Для изучения кинетики диссоциации лиганд-белковых комплексов методом замещения 100 мкл цитозоля инкубировали с [ $^3\text{H}$ ]лигандом (5–8 нМ) и 3 мкМ кортизолом в отсутствие (суммарное связывание) или в присутствии избытка (5.65–6.4 мкМ) одноименного немеченого лиганда (неспецифическое связывание) в суммарном объеме 200 мкл при  $0-4^{\circ}\text{C}$  в течение 1 или 22 ч. К образцам 1-го ряда добавляли избыток одноименного немеченого лиганда и через 0, 20, 40, 60, 120, 180 и 240 мин связанный белками и несвязанный лиганд разделяли обработкой углем (см. выше). Зависимость количества специфически связанного [ $^3\text{H}$ ]лиганда от времени разведения метки анализировали с помощью программы Microcal Origin как сумму двух экспонент с параметрами, соответствующими величинам констант скорости диссоциации ( $k_{-1}$ ) быстро- (индекс ') и медленнодиссоциирующих (индекс ") комплексов и доле этих комплексов в исходном связывании лиганда ( $R'$  и  $R''$ , соответственно).

Концентрацию белка измеряли окраской ку-масси [22]. Разведения стероидов и инкубацию проводили в кварцевых пробирках, покрытых 3% бычьим сывороточным альбумином. Все измерения проводили в 2 параллельных образцах. Ошибка измерений не превышала 5% от среднего. Все эксперименты воспроизводили не менее 2 раз.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают признательность В.А. Селиванову (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет) за любезно предоставленную программу анализа результатов измерений конкуренции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-32760).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Остин К., Шорт Р.* Гормональная регуляция размножения у млекопитающих: Пер. с англ. М.: Мир, 1987.
2. *Бабичев В.Н.* Нейроэндокринная регуляция репродуктивной системы. Пущино: ОНТИ ПНЦ РАН, 1995.
3. *Йен С.С.К., Джаффе Р.Б.* Репродуктивная эндокринология в 2-х томах: Пер. с англ. М.: Медицина, 1998.
4. *Wei L.L., Norris B.M., Baker C.J.* // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997. V. 62. P. 287–297.
5. *Peluso J.J., Pappalardo A.* // *Biol. Reprod.* 1998. V. 58. P. 1131–1137.
6. *Zhang X., Jeyakumar M., Petukhov S., Bagchi M.K.* // *Mol. Endocrinol.* 1998. V. 12. P. 513–524.
7. *Gass E.K., Leonardt S.A., Nordeen S.K., Edwards D.P.* // *Endocrinology.* 1998. V. 139. P. 1905–1919.
8. *Zajchowski D.A., Webster L., Humm R., White F.A. 3rd, Simmons S.J., Bartholdi M.* // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1997. V. 62. P. 373–383.
9. *Williams S.P., Sigler P.B.* // *Nature.* 1998. V. 393. P. 392–396.
10. *Левина И.С., Камерницкий А.В.* // *Хим.-фарм. журн.* 1990. Т. 24. С. 31–39.
11. *Розен В.Б., Смирнов А.Н.* Рецепторы и стероидные гормоны. М.: Изд-во Московского ун-та, 1981.
12. *Levina I.S., Kamernitzky A.V., Fanchenko N.D., Simonov V.I.* // *Endokrinologie.* 1982. V. 80. S. 266–274.
13. *Камерницкий А.В., Левина И.С.* // *Хим.-фарм. журн.* 1991. Т. 25. С. 4–16.
14. *Simons S.S., Jr.* // *Molecular Biology of Steroid and Nuclear Hormone Receptors* / Ed. Freedman L.P. Boston; Basel; Berlin: Birkhauser, 1997. P. 35–104.
15. *Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Левина И.С., Камерницкий А.В.* // *Биохимия.* 1998. Т. 61. С. 1279–1287.
16. *Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Левина И.С., Камерницкий А.В.* // *Бюлл. экспер. биол. мед.* 1998. Т. 125. С. 532–534.
17. *Смирнов А.Н., Покровская Е.В., Шевченко В.П., Левина И.С., Камерницкий А.В.* // *Пробл. эндокринологии.* 1998. Т. 44. С. 37–40.
18. *Scatchard G.* // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1949. V. 51. P. 660–672.
19. *Hughes T.R., Klotz I.M.* // *Meth. Biochem. Analysis.* 1956. V. 3. P. 265–300.
20. *Dixon M.* // *Biochem. J.* 1972. V. 129. P. 197–202.
21. *Fabiato A.* // *Methods Enzymol.* 1988. V. 157. P. 378–417.
22. *Bradford M.M.* // *Analyt. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.

## Pentacyclic Analogues of Steroids: Interaction of 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Cyclopentanoprogesterone with Proteins of the Rat Uterus

A. N. Smirnov<sup>#</sup>, E. V. Pokrovskaya\*, V. P. Shevchenko<sup>\*\*</sup>,  
I. S. Levina<sup>\*\*\*</sup>, and A. V. Kamernitskii<sup>\*\*\*</sup>

\*Moscow State University, Biology Faculty, Moscow, 119899 Russia

\*\*Institute for Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

\*\*\*Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Using <sup>3</sup>H-labeled derivatives, kinetic parameters of specific binding of progesterone (I) and 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -cyclopentanoprogesterone (II) to proteins of the uterus soluble fraction in rats were measured. It was shown that their affinities to proteins are comparable ( $K$  10.5  $\pm$  2.4 and 6.7  $\pm$  3.4 nM for (I) and (II), respectively, upon 22 h incubation). The unlabeled compound (II) can displace [<sup>3</sup>H]progesterone from complexes with the protein with a concentration-independent efficiency corresponding to the ratio of  $K$  values for compounds (I) and (II). At the same time, the efficiency of the unlabeled progesterone in the displacement of [<sup>3</sup>H]compound (II) from protein complexes fell with an increase in the progesterone concentration. The concentration of high-affinity sites of [<sup>3</sup>H]compound (II) exceeded by 1.5 to 2 times the concentration of sites for [<sup>3</sup>H]progesterone. Dynamics of dissociation of proteins complexes of [<sup>3</sup>H]progesterone and [<sup>3</sup>H]compound (II) had a two-phase character with a decrease in the dissociation rate constants for both phases as the times of exposition of [<sup>3</sup>H]ligands to proteins grew. The ratio of slow- and fast-dissociating ligand-receptor complexes was thereby unchanged. These data suggest the presence in the rat uterus soluble fraction of two types of proteins differing in the capacity to recognize the additional five-membered ring D' in the steroid molecule.

*Key words:* protein receptor; protein analogues; binding specificity; binding kinetics

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 939-3678, fax: +7 (095) 939-4309; e-mail: smirnov\_an@hotmail.com.