

Литература

1. Новикова, Л.А. От структуры и функции ферментов биосинтеза стероидов к новым генно-инженерным технологиям / Л.А. Новикова, Я.В. Фалетров, И.Е. Ковалева, Ш. Мауерсбергер, В.Н. Лузиков, В.М. Шкуматов // Успехи биол. химии. 2009. Т. 49. С. 159–208.
2. Panada J. U., Faletrov Y. V., Shkumatov V. M. Synthesis and in silico evaluation of 16 β -azido pregnenolone analogue as a clickable substrate for steroidconverting enzymes // SDRP J. Computat. Chem. Mol. Model. 2016. Vol.1, № 2. epub ahead to print.
3. Porta E. O. Click chemistry decoration of amino sterols as promising strategy to developed new leishmanicidal drugs // Steroids. 2014. Vol. 79. P. 28-36.
4. Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Edimecheva I. P., Kostsin D. G., Rudaya E. V., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2013. Vol. 134. P. 59–66

СИНТЕЗ И *IN SILICO* ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ ТРИПТОФАНА И ПРОЛИНА

Фалетров Я.В.^{1,2}, **Рудая Е.В.**^{1,2}, **Клыковская Д.Г.**², **Пирогова В.В.**², **Завадская О.А.**¹, **Хорецкий М.С.**², **Фролова Н.С.**¹, **Шкуматов В.М.**^{1,2}

¹*НИИ Физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь,*

²*Химический факультет БГУ, Минск, Беларусь*

Аминокислоты являются эссенциальными участниками множества важных биологических процессов, биологическими предшественниками ряда биорегуляторов и структурными компонентами белков и некоторых других биомолекул. Следовательно, химически-модифицированные аминокислоты обладают потенциалом в качестве «молекулярных инструментов» для регуляции или мониторинга этих процессов. Нами были синтезированы флуоресцирующие 7-нитробензофуразан-4-ильные (NBD) производные L- α -аминокислот (АК) пролина, триптофана, аланина и глутаминовой (NBD-Pro, NBD-Trp, NBD-Ala и NBD-Glu) посредством конъюгации NBD-Cl с растворами данных АК согласно [1] с выходами 50-60 %. Структура данных соединений частично подтверждена их опти-

ческими и масс-спектрометрическими свойствами, представленными в таблице 1.

Таблица 1 – свойства синтезированных производных АК

Соединение	NBD-Trp	NBD-Pro [2]	NBD-Ala	NBD-Glu [2]
λ abs, нм* [#]	280, 330, 460	340, 470	340, 470	340, 470
λ em, нм	560	550	560	560
λ ex, нм	315, 410 ^{##}	340, 470	340, 470	340, 470
M, а.е.м.	367	278	252	310
m/z ион и их интерпретация	366 [M-H] ⁻ 733 [2M-H] ⁻ 368 [M+H] ⁺	279 [M+H] ⁺ 391 [M+tfa-H] ⁻	251 [M-H] ⁻	309 [M-H] ⁻

* λ abs, λ em и λ ex – длины волн максимумов поглощения, эмиссии и возбуждения флуоресценции этанольных растворов полученных производных, соответственно; M - молекулярная масса; m/z – соотношение масса/заряд; tfa – трифторуксусная кислота, AcN – ацетонитрил. [#] оптические спектры были записаны на спектрофлуориметре Солар СМ 2203 (РБ) при ширинах щелей 5 нм; масс-спектры записаны на Shimadzu LCMS2020 (Япония) в условиях ионизации электрораспылением как описано [3]. ^{##} может быть обусловлена примесями согласно [4].

Отметим, что в отличие от других исследованных NBD-производных АК, в случае образца полученного NBD-Trp не происходит флуоресценции при облучении УФ светом лампы с максимумом излучения при 365 нм, а также регистрируется расхождение максимумов поглощения и возбуждения флуоресценции при 560 нм (Таблица 1). Слабая флуоресценция NBD-Trp обусловлена близким расположением NBD- и индольного флуорофоров (~0,6 нм) в его структуре [4, 5].

Для биоинформатической *in silico* оценки биологических свойств данных соединений было проведено компьютерное моделирование их взаимодействий с некоторыми белками (докинг), реализующими рецепцию/превращение АК-предшественников или их метаболитов, как описано в работе [4]. В частности, в качестве белков-мишеней были выбраны индоламин 2,3-диоксигеназа человека (код pdb 5ETW), осуществляющая катаболизм Trp и ответственная за регуляцию функций иммунной системы [7] и пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназа дрожжей (код pdb 4OE4), осуществляющая катаболизм Pro и обуславливающая вирулентность опасного патогена грибкового *Cryptococcus neoformans* [8].

Показано, что индольный фрагмент NBD-Trp способен локализоваться вблизи гема 5ETW (рисунок 1).

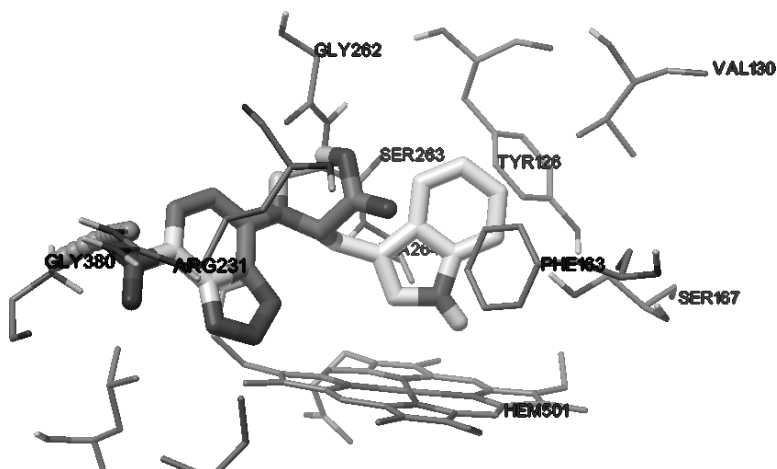


Рисунок 1. Модель субстратоподобной локализации NBD-Trp (показан жирными линиями) в активном центре индоламин 2,3-диоксигеназы

Расчетные величины энергий связывания ($E_{св}$) для NBD-Trp и Trp составили -8,90 и -5,85 ккал/моль, соответственно, что указывает на возможность эффективной конкуренции между NBD-Trp с данным природным субстратом за взаимодействие с данным ферментом. Разрушение индольного фрагмента будет способствовать увеличению квантового выхода флуоресценции [4]. Аналогично, $E_{св}$ для NBD-Pro, NBD-Glu и Pro (предшественника природного субстрата) в активном центре 4OE4 составили -7,01, -5,96 и -5,93 ккал/моль, соответственно. NBD-Ala проявлял меньшую аффинность (большие $E_{св}$) к активным центрам этих ферментов. При инкубации NBD-Pro с клетками дрожжей *Yarrowia lipolytica*, культивируемых на богатой питательной среде, наблюдалось уменьшение концентрации данного соединения на 40 % в течение 24 ч инкубации при начальной концентрации 20 мкМ, что свидетельствует о возможности его утилизации клетками дрожжей.

Полученные данные свидетельствуют о перспективности экспериментальных исследований данных NBD производных в качестве флуоресцирующих субстратов ферментов метаболизма АК.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант X15ИНД 003) и задания ГПНИ «Химические технологии и материалы».

Литература

1. Kuru E. et al. Synthesis of fluorescent D-amino acids and their use for probing peptidoglycan synthesis and bacterial growth *in situ* // Nature Protocols. – 2015. – Vol. 10. – P. 33–52.
2. Фалетров Я. В., Хорецкий М. С., Завадская О. А., Рати Б., Фролова Н. С., Рудая Е. В., Шкуматов В. М. Синтез флуоресцентно-меченых аминокислот – потенциальных антималярийных агентов // Вестник БГУ. –2016. (в печати).
3. Faletrov Y. V., Bialevich K. I., Edimecheva I. P., Kostsin D. G., Rudaya E. V., Slobozhanina E. I., Shkumatov V. M. 22-NBD-cholesterol as a novel fluorescent substrate for cholesterol-converting oxidoreductases // J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. – 2013. – Vol. 134. – P. 59–66.
4. Watanabe N., Toyo'oka T., Imai K. HPLC electrochemical fluorometric detection of amino acids including tryptophan using 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-оха-1,3-diazole // Biomed Chromatogr. – 1987. – Vol. 2. – P. 99-103.
5. Albani J.R. New insights in the interpretation of tryptophan fluorescence : origin of the fluorescence lifetime and characterization of a new fluorescence parameter in proteins: the emission to excitation ratio // J Fluoresc. 2007. – Vol. 17. – P. 406-417.
6. Mbongue J.C. *et al.* The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity // Vaccines (Basel). – 2015. – Vol. 3. – P. 703–729.
7. Lee I. R. *et al.* Reactive oxygen species homeostasis and virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* requires an intact proline catabolism pathway // Genetics. – 2013. – Vol. 194. – P. 421–433.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ ГИСТИДИН-СОДЕРЖАЩИХ ДИПЕПТИДОВ МЕТОДОМ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ

Юркова И.Л., Шендикова Е.Н.

*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
yurkovail@bsu.by*

Активные формы кислорода (АФК) (HO^\cdot , $\text{O}_2^{\cdot-}$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2 , HClO) в биосистемах играют ключевую роль в развитии многих патологических процессов, а также в сигнальной трансдукции. АФК идентифицируют