

# КОМПЬЮТЕРНАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ N-ДЕАЛКИЛИРОВАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО КРАСИТЕЛЯ НИЛЬСКОГО КРАСНОГО ЦИТОХРОМАМИ P450

Фалетров Я.В.<sup>1</sup>, Сивоплясова А.В.<sup>1</sup>, Рудая Е.В.<sup>1</sup>, Белевич Е.И.<sup>2</sup>,  
Костин Д.Г.<sup>2</sup>, Шкуматов В.М.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>НИИ Физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь,  
*biopharm@bsu.by*

<sup>2</sup>Институт биофизики и клеточной инженерии НАНБ, Минск, Беларусь

<sup>3</sup>Химический факультет БГУ, Минск, Беларусь

Нильский красный (9-(диэтиламино)-5Н-бензо[а]феноксазин-5-он, НК) – флуоресцентный краситель, используемый для визуализации «липидных капель» («липидных телец», олеосом) в клетках [1] и гидрофобных полостях белков [2]. Ранее было показано, что цитохром P450 3A4 способен превращать НК в его моно- и ди-N-деэтилированные производные [2]. Так как субстратами P450 3A4 также являются стероиды (тестостерон, прогестерон и некоторые другие) [3], нами предположено, что различные P450 стероидогенеза млекопитающих могут взаимодействовать с НК. С использованием методов биоинформатики проведено сравнение структур цитохромов P450c17, P450scs и P450 3A4, а также оценена вероятная локализация НК в активных центрах этих P450 (таблица 1).

Укладка полипептидных цепей для P450 3A4, P450c17 и P450scs была установлена с использованием программы RAPIDO как практически идентичная, несмотря на большую гомологию аминокислотных последовательностей в случае P450c17 и P450 3A4, оцененной при помощи программы BLAST (таблица 1). Результаты докинга указали на потенциальную способность цитохромов P450c17 и P450scs эффективно связывать НК в активном центре и осуществлять N-деэтилирование этого красителя (таблица 1). Далее была проведена биотрансформация НК четырьмя штаммами *Y. lipolytica* и штаммом *S. cerevisiae* GRF18 YEp5117 $\alpha$ , гетерологично экспрессирующими P450scs и/или P450c17. Методами ВЭЖХ с флуориметрическим, спектрофотометрическим и масс-спектрометрическим детектированием установлено, что N-деэтилирование НК происходило в присутствии дрожжей, экспрессирующих эти P450 (рисунок 1).

Таблица 1 – Параметры компьютерного сравнения первичных и третичных структур P450 3A4, P450c17 и P450scc (столбцы 3 и 4) и моделирования связывания НК в активных центрах P450

1	2	3 (BLAST)	4 (RAPIDO)	5 (Autodock)
Организм	P450 (код PDB)	Схожесть × Покрытие	№ АК; СКВО жест. / гибк.*	№ пп/ E <sub>B</sub> (ккал/моль) / Fe-N (Å)***
<i>Homo sapiens</i>	P450 3A4 (2v0m)	100% × 100%	449; 0,39 / 0,39	№1 / -8,51 / 3,3
<i>Bos taurus</i>	P450c17 (3swz)	44% × 97%	388; 2,40 / 1,10	№5 / -8,37 / 3,5
<i>Bos taurus</i>	P450scc (3mzs)	53% × 44%	393; 2,45 / 1,15	№1 / -9,27 / 3,9

\*№ АК – число совпавших в пространстве аминокислот; СКВО – среднее квадратичное отклонение значения совпадения структур белков в жестком и гибком вариантах; \*\* № пп – порядковый номер конформации из 10 рассчитанных; E<sub>B</sub> – энергия связывания НК в активном центре фермента; Fe-N (Å) – расстояние от Fe гема до N аминокислотной группы НК.

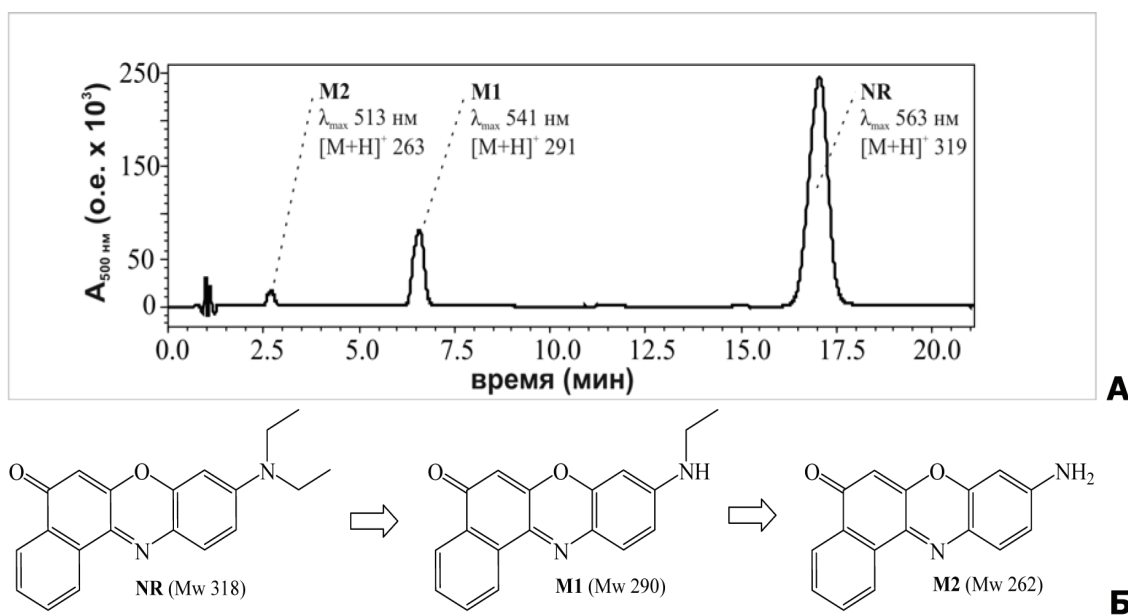


Рисунок 1 – **А** – Хроматографическая кривая, полученная при анализе проб после 48 ч инкубации НК с клетками дрожжей *Y. lipolytica* DE5-54.1, отображающая образование окрашенных флуоресцирующих продуктов биотрансформации НК; указаны максимумы поглощения и  $m/z$  ионов  $[M+H]^+$  (ионизация электроспреем, регистрация положительных ионов с  $m/z$  150-750). **Б** – Схема реакции; приведены условные обозначения веществ и их молекулярные массы

При селективной индукции биосинтеза P450c17 D-галактозой в штамме *S. cerevisiae* YEp5117α наблюдалось двукратное увеличение степени образования продукта M1 за 48 ч биотрансформации по сравнению с контролем, где биосинтез P450c17 был полностью репрессирован глюкозой [4]. Это свидетельствует в пользу способности P450c17 катализировать превращение НК. Дополнительным подтверждением являются ингибирующие эффекты прогестерона или кетоконазола (субстрата и ингибитора P450c17) на образование продуктов M1 и M2 дрожжами *S. cerevisiae* YEp5117α. Кроме того, в случае *Y. lipolytica* в условиях индукции генов «встроенных» белков (рост на среде с 0,5-1,0% этанола) более интенсивное образование продуктов M1 и M2 наблюдалось в случае штаммов DE5-54.1 и DE8-84.1, экспрессирующих P450c17. Поскольку N-деэтилирование НК минорно катализировалось данными дрожжами и в условиях репрессии генов чужеродных белков, то предположено участие собственных цитохромов P450 дрожжей *S. cerevisiae* и *Y. lipolytica* в данном процессе. Установлено, что ферменты Erg5p (стерин C22-десатураза) дрожжей *S. cerevisiae* и ALK5p (алкан-гидроксилаза) дрожжей *Y. lipolytica*, являющиеся цитохромами P450, характеризуются высокими параметрами гомологии с P450 3A4: произведения схожести и покрытия составляют 51% × 46% и 47% × 83%, соответственно, т.е. близки к таковым для P450scс и P450c17. Полученные данные указывают на возможность использования НК для оценки взаимодействия потенциальных лекарственных средств с различными стероид-трансформирующими P450.

### Литература

1. Simple methods to detect triacylglycerol biosynthesis in a yeast-based recombinant system / R.M. Siloto [et al.] // *Lipids*. – 2009. – Vol. 44. – P.963-973.
2. Nile Red Is a Fluorescent Allosteric Substrate of Cytochrome P450 3A4 / J.N. Lampe [et al.] // *Biochemistry*. – 2008. – Vol. 47. – P. 509-516.
3. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochrome P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes / H. Yamazaki and T. Shimada // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1997. – Vol. 346. – P.161–169.
4. Влияние модификаторов биосинтеза стероидов на биотрансформацию прогестерона рекомбинантными микроорганизмами экспрессирующими цитохром P450c17 / В.М. Шкуматов [и др.]// *Биомед. Химия*. - 2006. - Т. 52. - С. 298-308.