

Создание новых флуоресцентных лигандов стероид 7-гидроксилаз человека

Я. В. Фалетров¹, Я. В. Диченко²

¹ НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь,

² Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь, *e-mail: dichenko@iboch.by*

В настоящее время флуоресцентные соединения нашли широкое применение в различных прикладных биологических и биомедицинских исследованиях в качестве удобных инструментов для изучения механизмов функционирования отдельных клеток, органов и организмов на молекулярном уровне. Одной из наиболее часто используемых меток является 7-нитробенз-2-окса-1,3-диазольная (НБД) группа, которая широко применяется для флуоресцентного мечения аминов.

Стероид 7 α -гидроксилазы – группа ферментов цитохромов P450, локализованных в основном в клетках печени и мозга [1] и участвующих в гидроксилировании ряда физиологически важных стероидов, в том числе предшественников желчных кислот, стероидных гормонов и нейростероидов, по 6 или 7 положениям [2]. Точечные аминокислотные замены в структуре данных ферментов приводят к возникновению различных тяжелых заболеваний, среди которых врожденные дефекты печени (летальное заболевание у новорожденных), спастическая параплегия типа 5 (нейродегенеративное заболевание) [3], рак желчного пузыря [4], рак кишечника [5], атеросклероз [6], гиперхолестеринемия [7]. Однако причины возникновения данных заболеваний на молекулярном уровне до настоящего времени не выяснены. В этом смысле использование флуоресцирующих НБД-производных лигандов этих ферментов может быть инструментом для установления механизма влияния точечных мутаций на пространственную структуру стероид 7-гидроксилаз и понимания основ функционирования указанных ферментов в норме и при патологии.

В качестве базовых структур для синтеза новых лигандов стероид 7-гидроксилаз использовали субстраты этих ферментов дегидроэпиандростерон (ДГЭА), прегненолон (ПРЕГ), а также N-гетероциклические производные 4-(1H-1,2,4-триазол-1-илметил)анилин и пиколиламин; соединения спроектированной структуры затем были синтезированы и охарактеризованы с использованием комплекса физико-химических методов анализа (рис.).

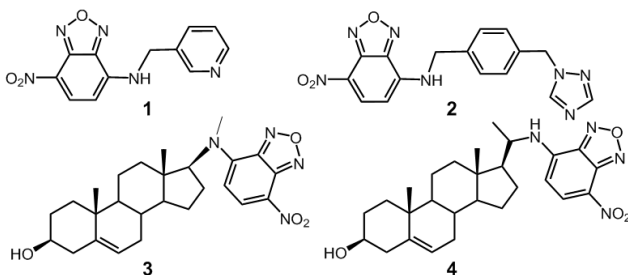


Рис. Структурные формулы исследованных потенциальных лигандов
стероид 7-гидроксилаз

Для выяснения принципиальной возможности разрабатываемых лигандов связываться в активном центре цитохромов P450, данные соединения подвергались процедуре скрининга *in silico*. Установлено, что НБД-производные стероидов и азола обладают высоким сродством к исследуемым белкам, при этом соответствующие величины энергий связывания сравнимы с таковыми для известных субстратов CYP7A1 и CYP7B1 (порядка – 10 ккал/моль). Полученный результат позволяет рассматривать данные соединения в качестве перспективных высокоэффективных флуоресцентных лигандов стероид 7-гидроксилаз человека. Тестирование НБД-производных *in vitro* подтвердило результаты компьютерного анализа и показало, что полученные соединения связываются в активном центре стероид 7-гидроксилаз, причем отличия в связывании НБД-производных разными ферментами позволили охарактеризовать структурные особенности активного центра исследуемых белков.

Таким образом, с использованием методов компьютерного моделирования разработаны новые флуоресцентные лиганды стероид 7-гидроксилаз человека с высокой эффективностью связывающиеся в активном центре ферментов, что позволяет использовать их для анализа свойств этих белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (грант № X16-085).

Список литературы

1. D. W. Russell Annu. Rev. Biochem. (2003) 74 : 137.
2. K. A. Rose [et al.]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 30 : 4925.
3. A. R. Stiles [et al.]. J. Biol. Chem. (2009) 89 : 28485.
4. C. R. Pullinger [et al.]. J. Clinical Investig. (2002) 17 : 109.
5. G. Paumgartner. Lancet (1991) 21 : 1117.
6. S. Tabata [et al.]. Cancer Sci. (2006) 10 : 406.
7. M. K. Hofman [et al.]. Clin. Sci. (Lond.) (2005) 45 : 539.