

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ СУЛЬФАМЕТОКСАЗОЛА С ЦИТОХРОМОМ P450 МИКРОВОДОРОСЛЕЙ

М.С. Темнов, Я.В. Устинская, К.И. Меронюк, А.К. Брянкина, Д.С. Дворецкий

ФГБОУ ВО «Тамбовский государственный технический университет», Тамбов, Россия

Постоянно увеличивающаяся устойчивость патогенных и условно-патогенных бактерий к антибактериальным препаратам, применяемым в медицине – это одна из основных причин смертности людей в мире. При сохранении существующих тенденций прогнозируется, что к 2050 году от антибиотикорезистентности будет погибать до 8 млн людей в год [1]. Большой вклад в отбор бактерий на гены антибиотикорезистентности (более 80 %) вносит сельское хозяйство, в частности, животноводство [2]. Антибактериальные препараты применяют для профилактики и лечения инфекционных заболеваний у домашних животных. Эти вещества добавляют в состав кормов в целях стимуляции роста крупного рогатого скота. Небольшая часть антибактериальных препаратов метаболизируется в организме животного (около 30-40 % в зависимости от вида применяемого препарата), основная же часть выводится, попадает в водные стоки и далее на очистные сооружения. Традиционные биологические агенты (активный ил), которые применяются для очистки сточных вод, плохо утилизируют антибактериальные препараты [3]. В результате в природные экосистемы попадает вода с высоким содержанием таких соединений, что стимулирует естественный отбор бактерий на антибиотикорезистентность. Альтернативным биологическим агентом, который может эффективно утилизировать антибактериальные препараты из сточных вод, являются микроводоросли, которые являются эукариотическими организмами и менее чувствительны к антибактериальным препаратам по сравнению с бактериями активного ила. Микроводоросли, по сравнению с бактериями, имеют гораздо более сложный метаболизм и более совершенные системы детоксикации. Например цитохром P450 (CYP450) – фермент, участвующий во многих метаболических путях утилизации антибактериальных препаратов, у микроводорослей локализован в мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭПР), в то время как у бактерий часто встречается цитоплазматическая гидрофильная форма. У микроводорослей в мембране ЭПР рядом с цитохромом P450 закреплена NADPH-цитохром P450-редуктаза (CPR), которая является источником электронов, которые необходимы для утилизации антибактериальных соединений (рис. 1), в то время как у бактерий требуется рядом с цитохромом P450 наличие рядом в цитоплазме других ферментов – источников электронов, что снижает скорость и эффективность метаболизма антибактериальных соединений.

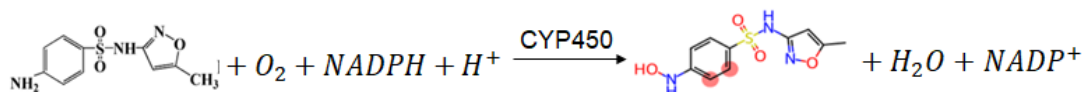


Рисунок 1 – Первая стадия утилизации антибактериального препарата сульфаметоксазола с помощью фермента цитохрома P450

Анализ литературных источников позволил сделать вывод, что в сельском хозяйстве Российской Федерации применяются ципрофлоксацин (50 % остается в сточной воде после очистки активным илом), тетрациклин (20 % остается в сточной воде), линкомицин (50 % остается в сточной воде), хлорамфеникол (40 % остается в сточной воде), сульфаметоксазол (80 % остается в сточной воде), триметоприм (60 % остается в сточной воде).

Проведение экспериментальных исследований процесса утилизации этих антибактериальных препаратов требует значительных затрат времени и материальных ресурсов, целесообразно провести молекулярное моделирование процесса взаимодействия фермента цитохрома P450 микроводорослей и антибактериальных препаратов, что позволит спрогнозировать эффективность процесса утилизации и экспериментально проверить наиболее эффективный вариант.



Рисунок 2 – Алгоритм разработки 3-D структуры цитохрома P450

микроводорослей, для которых известен полный геном и, в частности, нуклеотидная последовательность гена цитохрома P450. Наиболее близкородственные штаммы *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-1 (*Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss) - *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8K Shihira & R.W.Krauss (KU948992) - идентичность 100 %, для *Parachlorella kessleri* Krienitz IPPAS C-9 - *Parachlorella kessleri* SAG 211-11g (MN173389) - идентичность 99 %. Для данных штаммов были найдены аминокислотные последовательности белков цитохромов P450 – PRW58538 – для *Chlorella sorokiniana* SAG 211-8K Shihira & R.W.Krauss, AGK38421 – для *Parachlorella kessleri* SAG 211-11g. Далее с помощью программы AlphaFold, выполняющей предсказания пространственной структуры белка, были построены 3D-модели ферментов P450 для *Chlorella sorokiniana* и *Parachlorella kessleri*. После чего в 3D-модели белков был вставлен гем, предварительно вырезанный из 3D-структуры фермента P450 цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 с помощью программы PyMOL. Проверка правильности вставки гема в структуру фермента была осуществлена с помощью программ ChimeraX 1.9 и Chimera 1.19. На первом этапе определялась длина ковалентной связи между железом гема и серой аминокислоты цистеина, находящейся в активном центре фермента; длина такой связи должна лежать в диапазоне 2,25-2,5 Å. Длина связи между железом гема и серой цистеина 504 (CYS 504) цитохрома P450 *Chlorella sorokiniana* – 2,478 Å, а для железа гема и серы цистеина 537 (CYS 537) цитохрома P450 *Parachlorella kessleri* – 2,236 Å. Затем осуществлялась проверка молекул на наличие стерических конфликтов и проводилась процедура энергетической минимизации. После проведения этой процедуры в обеих молекулах отсутствовали стерические конфликты.

После чего осуществлялось сравнение полученных 3D-структур цитохромов P450 с референсной структурой цитохрома P450 цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 (PDB 2VE4) путём попарного совмещения. Сравнение всех пар атомов ферментов микроводоросли *Chlorella sorokiniana* и цианобактерии *Synechocystis sp.* показало значительное различие по величине среднего квадратичного отклонения (Root Mean Square Deviation - RMSD) – 13,67 Å (424 пары сравниваемых атомов). Это значение говорит о глобальных структурных различиях этих ферментов, которые, по-видимому, связаны с адаптацией к разным клеточным условиям (мембранное окружение фермента у микроводорослей, в то время как цитохром P450 расположен в цитоплазме). При этом расчет среднего квадратичного отклонения (RMSD) при сравнении консервативных участков (активных центров) цитохрома P450 микроводорослей и цианобактерии показал высокую консервативность каталитического ядра – 1,17 Å (160 пар сравниваемых атомов), в связи с чем можно предположить, что каталитический механизм ферментов сходен и эволюционно сохранён, несмотря на внешние различия (возможно наличие

На сегодняшний день не существует экспериментально определенной 3D-структуры цитохрома P450 для микроводорослей, в связи с чем она была разработана согласно алгоритму, представленному на рисунке 2, и сравнена с 3D-структурой цитохрома P450 цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC 6803 (PDB 2VE4), как наиболее близкородственного фототрофного микроорганизма, для которого известно пространственное расположение гема – активного центра данного фермента (структура цитохрома P450 этой цианобактерии была определена экспериментально с помощью рентгеноструктурного анализа). На первом этапе были выбраны штаммы из коллекции микроводорослей и цианобактерий Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН *Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-1 (*Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss), *Parachlorella kessleri* Krienitz IPPAS C-9, которые обладают высокой скоростью роста, гибким метаболизмом, а также для которых известны нуклеотидные последовательности р-ПНК: MN 160396 и MN 160319 соответственно. Эти генетические последовательности с помощью инструмента BLAST позволили определить близкородственные штаммы

субстратной специфичности). Сравнение всех пар атомов ферментов микроводоросли *Parachlorella kessleri* и цианобактерии *Synechocystis sp.* (RMSD = 5,057 Å, 426 пар сравниваемых атомов) говорит также о значительных различиях в структуре ферментов. При этом также сохраняется высокая консервативность строения активного центра ферментов (RMSD = 1,203 Å, 246 пар сравниваемых атомов).

Сравнение цитохромов P450 *Chlorella sorokiniana* и *Parachlorella kessleri* между собой показало, что между молекулами есть значительные структурные различия в третичной структуре - величина среднего квадратичного отклонения (RMSD) для всех 489 пар сравниваемых атомов составляла 8,117 Å. При этом наблюдалась высокая консервативность активных центров ферментов - величина среднего квадратичного отклонения (RMSD) для 275 пар сравниваемых атомов составляла 1,076 Å.

Эти данные позволяют предположить, что ферменты используют сходный механизм катализа (консервативный активный центр), но могут различаться по субстратной специфичности (глобальные структурные различия), что потенциально влияет на спектр утилизируемых ксенобиотиков и эффективность их превращения.

На следующем этапе исследования осуществлялось молекулярное моделирование (молекулярный докинг) процесса взаимодействия цитохромов P450 микроводорослей *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss и *Parachlorella kessleri* Krienitz IPPAS C-9 с антибактериальными веществами ципрофлоксацином, тетрациклином, линкомицином, хлорамфениколом, сульфаметоксазолом и триметопримом. Молекулярное моделирование выполнялось с помощью программы AutoDockTools-1.5.7 [4, 5].

Результаты расчетов, представленные в таблице 1, позволили сделать вывод о том, что цитохром P450 *Chlorella sorokiniana* способен метаболизировать сульфаметоксазол и хлорамфеникол. Энергия взаимодействия (ΔG) данных соединений с ферментом наименьшая, оба соединения попадают в активный центр фермента с образованием водородных связей и гидрофобных взаимодействий

Таблица 1 – Результаты молекулярного моделирования взаимодействия цитохрома P450 *Chlorella sorokiniana* и антибактериальных соединений

Антибактериальное соединение	Энергия связывания ΔG , ккал/моль	Константа диссоциации (K_i), мкмоль/л	Наибольшее число конформаций лиганда в одном кластере (из 100)	Положение лиганда в активном центре (Н-связи и гидрофобные взаимодействия)	RMSD главного кластера, Å
ципрофлоксацин	-7,55	2,95	27	Рядом с активным центром: 2 Н-связи, 11 гидрофобных взаимодействий (нет взаимодействия с гемом)	< 2 Å
тетрациклин	-2,42	16,8	100	В активном центре: 13 гидрофобных взаимодействий (с гемом)	< 2 Å
линкомицин	-6,49	17,52	6	Не в активном центре	< 2 Å
хлорамфеникол (левомицетин)	-6,89	8,88	30	В активном центре: 3 Н-связи, 6 гидрофобных взаимодействий (есть взаимодействие с гемом)	< 2 Å
сульфаметоксазол	-7,55	2,93	94	В активном центре: 2 Н-связи, 11 гидрофобных взаимодействий (есть взаимодействие с гемом)	< 2 Å
триметоприм	-6,17	30,08	17	Не в активном центре	< 2 Å

При этом, учитывая величины энергии связывания и константы диссоциации, а также величину, которая характеризует наибольшее число конформаций лиганда в активном центре, можно сказать, что сульфаметоксазол будет эффективнее метаболизироваться, так как данный лиганд более специфичен к ферменту. Триметоприм, линкомицин, ципрофлоксацин не взаимодействуют с активным центром и не будут утилизироваться данным ферментом. Ципрофлоксацин демонстрирует сопоставимые с сульфаметоксазолом результаты моделирования, но отсутствие контакта с гемом снижает его каталитическую доступность.

Анализ результатов молекулярного моделирования взаимодействия цитохрома P450 *Parachlorella kessleri* Krienitz IPPAS C-9 с антибактериальными веществами (таблица 2), позволяет сделать вывод о том, что фермент способен метаболизировать триметоприм, хлорамфеникол и сульфаметоксазол.

Таблица 2 – Результаты молекулярного моделирования взаимодействия цитохрома P450 *Parachlorella kessleri* и антибактериальных соединений

Антибактериальное соединение	Энергия связывания ΔG , ккал/моль	Константа диссоциации (K_i), мкмоль/л	Наибольшее число конформаций лиганда в одном кластере (из 100)	Положение лиганда в активном центре (Н-связи и гидрофобные взаимодействия)	RMSD главного кластера, Å
ципрофлоксацин	-5,7	66,14	45	Не в активном центре	< 2 Å
тетрациклин	-5,72	63,74	50	Рядом с активным центром: 2 Н-связи, 8 гидрофобных взаимодействий	< 2 Å
линкомицин	-4,53	475,92	16	Не в активном центре	< 2 Å
хлорамфеникол (левомицетин)	-6,91	6,97	18	В активном центре: 4 Н-связи, 6 гидрофобных взаимодействий (есть взаимодействие с гемом)	< 2 Å
сульфаметоксазол	-6,59	14,87	53	В активном центре: 4 Н-связи, 10 гидрофобных взаимодействий (есть взаимодействие с гемом)	< 2 Å
триметоприм	-7,3	4,45	44	В активном центре: 5 Н-связей, 7 гидрофобных взаимодействий (есть взаимодействие с гемом)	< 2 Å

Все три соединения попадают в активный центр фермента с образованием водородных связей и гидрофобных взаимодействий. Данные молекулярного моделирования позволяют сделать вывод, что триметоприм ($\Delta G = -7,3$ ккал/моль, $K_i = 4,45$ мкмоль/л) образует наиболее стабильный комплекс с цитохромом P450 *Parachlorella kessleri*, что предполагает его эффективный метаболизм. Хлорамфеникол и сульфаметоксазол также демонстрируют значимое связывание, но вероятно будут метаболизироваться медленнее, чем триметоприм. Линкомицин, тетрациклин и ципрофлоксацин не взаимодействуют с активным центром.

Проведенный анализ позволяет заключить, что для цитохрома P450 штамма *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W.Krauss (*Chlorella vulgaris* Beijer IPPAS C-1) основными кандидатами для экспериментального изучения каталитической активности являются сульфаметоксазол и хлорамфеникол — эти соединения демонстрируют наивысшее сродство к активному центру фермента; для штамма *Parachlorella kessleri* Krienitz IPPAS C-9 наиболее перспективны триметоприм, сульфаметоксазол и хлорамфеникол, что подтверждается их стабильным связыванием и низкими значениями K_i .

Литература

1. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis / Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F. et al. // The Lancet. 2022. Vol. 399. Issue 10325. P. 629–655.
2. Global trends in antimicrobial use in food animals / Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M. et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015. Vol. 112. № 18. P. 5649–5654. doi: 10.1073/pnas.1503141112
3. Antibiotic resistance response of activated sludge to sulfamethoxazole: insights from the intracellular and extracellular DNA fractions / Martínez-Quintela M., Calderón-Franco D., van Loosdrecht M.C.M. et al. // Environmental Science: Water Research & Technology. 2024. Vol. 10. P. 1406–1420.
4. Часовских Н.Ю. Биоинформатика: учебник. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 352 с.
5. Молекулярный докинг как метод компьютерного моделирования взаимодействия лиганда с белком: учеб.-метод. пособие / Шилов Б.В., Савченко А.Ю., Дубовик Н.С., Гармаш А.А. М.: НИЯУ МИФИ, 2022. 28 с. URL: <https://e.lanbook.com/book/355556> (дата обращения: 04.08.2025).