

БИОАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ
BIOORGANIC CHEMISTRYУДК 577.152.28:577.151.042+547.758.5
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-438-455>Поступила в редакцию 26.08.2021
Received 26.08.2021**С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко***Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь***ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ
ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ P1 ЧЕЛОВЕКА И СКРИНИНГ
НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА**

Аннотация. Глутатионтрансфераза P1 человека (GSTP1) играет важную роль во второй фазе биотрансформации ксенобиотиков и в регуляции апоптотических сигнальных путей. Направленный скрининг новых ингибиторов фермента является актуальной задачей, так как избирательное подавление активности GSTP1 в опухолевых клетках может существенно повысить их чувствительность к химиотерапии. Известные методы получения рекомбинантной GSTP1 с гексагистидиновым тэгом в структуре отличаются сложностью, трудоемкостью и значительными потерями активности фермента. С целью создать простую и эффективную систему бактериальной экспрессии бестеговой GSTP1 с нативной структурой и высокой активностью, в настоящей работе проведено клонирование полноразмерного гена *gstp1* в плазмидный вектор pTXB1 с последующей трансформацией клеток *E. coli*. Оптимизированный уровень экспрессии составил 30–32 мг фермента/л среды. С использованием глутатионсодержащих аффинных мембран из бактериального лизата выделен очищенный фермент (выход 75,7 %, удельная активность 102,6 Ед/мг белка). Гомогенность препарата подтверждена данными гель-электрофореза и масс-спектрометрии. Физико-химические и каталитические свойства рекомбинантной GSTP1 практически совпали с таковыми для нативного фермента из эритроцитов. По результатам скрининга *in silico* и *in vitro* выявлены структурные факторы и взаимодействия, определяющие эффективность ингибирования фермента карбо- и N-гетероциклическими лигандами. Установлена предпочтительная ориентация «хороших» ингибиторов в N-сайте GSTP1. Обнаружены новые ингибиторы фермента: 1,10-фенантролин-5,6-дион, ализариновый красный С и индигокармин с величиной IC₅₀ соответственно 31, 16 и 2,3 мкМ. Найденные соединения представляют интерес для создания новых лидерных структур с потенциальной противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: глутатионтрансфераза P1 (GSTP1), клонирование, бактериальная экспрессия, рекомбинантный фермент, кинетические параметры, молекулярный докинг, ингибиторы, индигокармин

Для цитирования. Гилевич, С. Н. Получение и характеристика рекомбинантной глутатионтрансферазы P1 человека и скрининг новых ингибиторов фермента / С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 438–455 <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-438-455>

S. N. Gilevich, Yu. V. Brechka*Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus***PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN GLUTATHIONE
TRANSFERASE P1 AND SCREENING OF NOVEL ENZYME INHIBITORS**

Abstract. Human glutathione transferase P1 (GSTP1) plays an important role in the second phase of xenobiotic biotransformation and in the regulation of apoptotic signal pathways. Directed screening of new enzyme inhibitors is an actual task since selective suppression of GSTP1 activity in tumor cells may substantially increase their sensitivity to chemotherapy. Known methods to obtain recombinant GSTP1 with a hexahistidine tag in the structure are complex, laborious, and suffer from significant losses of the enzyme activity. With the aim to create a simple and effective bacterial expression system for tagless GSTP1 possessing native structure and high activity, in the present work the full-length *gstp1* gene was cloned into the pTXB1 plasmid vector, followed by transformation of *E. coli* cells. The optimized expression level amounted to 30–32 mg of the enzyme per liter of broth. Using glutathione-containing affinity membranes, the purified enzyme was isolated from bacterial lysate with the yield of 75.7 % and specific activity of 102.6 U/mg protein. The enzyme homogeneity was confirmed by gel-electrophoretic and mass-spectrometric data. Physico-chemical and catalytic properties of recombinant GSTP1 practically

coincided with those of the native erythrocytary enzyme. The results of *in silico* and *in vitro* screening allowed to reveal structural factors and interactions determining the efficiency of the enzyme inhibition by carbocyclic and N-heterocyclic ligands. The preferable orientation of “good” inhibitors in the GSTP1 H-site was also established. Three strong enzyme inhibitors were found: 1,10-phenanthroline-5,6-dione, Alizarin Red S, and indigo carmine, with their respective IC_{50} values of 31, 16 and 2.3 μ M. The new inhibitors are of certain interest for the development of novel lead structures with potential antitumor activity.

Keywords: glutathione transferase P1 (GSTP1), cloning, bacterial expression, recombinant enzyme, kinetic parameters, molecular docking, inhibitors, indigo carmine

For citation: Gilevich S. N., Brechka Yu. V. Preparation and characterization of recombinant human glutathione transferase P1 and screening of novel enzyme inhibitors. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya khimichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2021, vol. 57, no. 4, pp. 438–455 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-438-455>

Введение. Глутатионтрансферазы (GST; КФ 2.5.1.18) катализируют реакции конъюгации восстановленного глутатиона (GSH) с различными электрофильными соединениями и играют ключевую роль во второй фазе биотрансформации ксенобиотиков, обеспечивая их детоксикацию и последующую экскрецию из клетки в виде глутатионовых производных. Подсемейство цитозольных GST человека насчитывает 17 изоформ в составе 7 геннезависимых классов, обозначаемых греческими буквами α , μ , π , σ , θ , ω и ζ [1, 2]. Особенно важные каталитические и регуляторные функции выполняет относящаяся к π -классу изоформа P1 (GSTP1). Гиперэкспрессия GSTP1 во многих твердых опухолях и лимфомах сопряжена с формированием множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Уровень экспрессии данной изоформы является одним из прогностических факторов в терапии рака [3]. Фермент также участвует в блокировании апоптотического сигнального пути, образуя комплекс с N-концевой киназой JNK [2].

GSTP1 является гомодимерным глобулярным белком с молекулярной массой мономера 23,2 кДа. По данным рентгеноструктурного анализа, каждый мономер содержит гидрофильный G-сайт для связывания субстрата (GSH) и расположенный рядом, более гидрофобный H-сайт, где связываются косубстраты, ингибиторы и другие амфифильные молекулы [4]. Известные природные и синтетические ингибиторы фермента (куркумин, некоторые флавоноиды, пиперлонгумин, производные этакриновой кислоты и 2,1,3-бензоксадиазола) обладают средней или умеренно высокой ингибирующей силой, но недостаточно селективны в отношении изоформы P1 [5, 6]. Направленный скрининг новых, более специфичных и эффективных ингибиторов фермента из числа конденсированных карбо- и гетероциклических соединений до сих пор остается актуальной задачей, поскольку избирательное подавление активности GSTP1 в опухолевых клетках может существенно повысить их чувствительность к химиотерапии. Такой молекулярный механизм действия имеет новый противоопухолевый препарат канфосфамид, разработанный в США. Канфосфамид представляет собой аналог GSH, модифицированный по остаткам Cys и Gly, и проходит клинические испытания как препарат второй линии терапии [6].

Опубликованные методы выделения нативной GSTP1 из плаценты [7] и эритроцитов [8] имеют ряд недостатков. Недавно нами предложена эффективная процедура очистки эритроцитарной GSTP1 с использованием GSH-содержащих аффинных мембран [9], но она не позволяет получить более 1 мг очищенного фермента за цикл выделения в силу его низкого содержания в исходном материале. Дополнительные сложности при выделении связаны с эндогенным протеолизом, а также с генетическим полиморфизмом ферментного белка в положениях 104 и 113 полипептидной цепи. Для систематического тестирования ингибиторных свойств новых соединений *in vitro* требуется не менее 5–10 мг очищенной GSTP1, откуда следует необходимость получения рекомбинантного фермента.

Из литературы известны два основных варианта экспрессии GSTP1 в клетках *E. coli*: либо с дополнительным гексагистиридиновым пептидом (6xHis-тэг) для последующей очистки методом металлоаффинной хроматографии, либо без тэга, и тогда для выделения используют аффинную хроматографию на колонке с GSH-агарозой. В работе [10] уровень экспрессии GSTP1 с N-концевым 6xHis-тэгом составил 30 мг/л культуральной среды, но более 20 % активности фермента найдено в бактериальном осадке. Другие авторы [11] построили сайт расщепления энтерокиназой (6 аминокислот) между тем же тэгом и последовательностью GSTP1. Несмотря на высокий уровень экспрессии (50–60 мг/л культуральной среды), в осадке обнаружено 27 % активности. После дополнитель-

ных процедур (отщепление тэга, хроматография на колонке с GSH-агарозой) удельная активность фермента в стандартных условиях (72 Ед/мг белка) оказалась меньше максимально возможной (100–110 Ед/мг). Кроме того, интенсивность собственной флуоресценции GSTP1 с тэгом была заметно ниже, чем у фермента без тэга, что указывает на различия в белковом окружении остатков Trp.

Чтобы экспрессировать бестэговую GSTP1, в работе [12] вынужденно исходили из транскрипированной кДНК гена *gstp1*, не содержащей кодоны для N-концевых 34 аминокислот. После оптимизации кодонов недостающий фрагмент ДНК синтезировали химически, встраивали вместе с кДНК в плазмидный вектор и трансформировали им клеточную линию *JM103*. В конечном итоге достигнут очень высокий уровень цитозольной экспрессии высокоактивного фермента (200 мг/л культуральной среды), но по трудоемкости и материалозатратности авторская процедура клонирования, очевидно, далека от оптимальной. С той же целью в работе [13] использовали полноразмерную кДНК из плаценты и сложную, многостадийную методику создания экспрессионного вектора. Уровень цитоплазматической экспрессии GSTP1 в клеточной линии *TOP10* составил 35–50 мг/л среды; 24 % активности обнаружено в периплазме как результат коэкспрессии с молекулярными шаперонами. Очищенный фермент обладал умеренно высокой удельной активностью (81 Ед/мг) и структурной микрогетерогенностью: половина ферментного белка, как выяснилось, содержит дополнительный N-концевой остаток Met.

Цель настоящей работы – создать простую, экономичную и эффективную систему бактериальной экспрессии бестэговой рекомбинантной GSTP1 с нативной структурой, охарактеризовать очищенный фермент по физико-химическим и каталитическим свойствам и провести скрининг *in silico* и *in vitro* для выявления новых, высокоактивных ингибиторов активности фермента из числа конденсированных карбо- и гетероциклических соединений.

Материалы и методы исследования. В работе использовали: фенольный реагент Purezol («Bio-Rad», США); набор для обратной транскрипции ОТ-1 («Синтол», Россия); дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, эндонуклеазы рестрикции *NdeI*, *AseI* и *XhoI*, ДНК-лигазу фага T4, плазмидный вектор pTXB1 («New England BioLabs», США); ДНК-полимеразу Phusion, изопропил- β -D-1-тиога-лактопиранозид (IPTG), набор маркеров молекулярной массы ДНК («Thermo Scientific», США); микроколоночные наборы для выделения ДНК NucleoSpin Gel and PCR Clean-up («Macherey-Nagel», Германия) и Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System («Promega», США); среду Луриа-Бертани (LB, «Condalab», Испания); агарозу для гель-электрофореза (тип А6013), набор белковых маркеров для гель-электрофореза, дитиотреит (DTT), трис(гидроксиэтил)аминометан (трис), акриламид, N,N'-метиленбисакриламид («Sigma-Aldrich», США); DEAE-цефарозу CL-6B («Pharmacia», Швеция); сывороточный альбумин человека (HSA, «Serva», Германия); 1-хлор-2,4-динитробензол (CDNB), GSH («Alfa Aesar», Германия). Остальные реактивы имели квалификацию не ниже «ч. д. а.». 1,10-фенантролин-5,6-дион (phedon), 2,2'-бипиридин-3,3'-дикарбоновую кислоту (bipydc) и дипиридо-[3,2-a:2',3'-c]-феназин (dppz) получали из 1,10-фенантролина (phen) известными методами [14, 15]. 2-Метил-1*H*-имидазо[4,5-*b*]феназин (MIP) синтезировали согласно [16]. Хлороформ и изопропанол перед использованием перегоняли без доступа влаги. Стерильную безнуклеазную воду для работы с нуклеиновыми кислотами получали ультрафильтрацией деионизованной воды на центрифужных фильтрах Amicon Ultra-15 («Millipore», США) с молекулярно-массовым пределом задерживания 10 кДа. Специфичные олигонуклеотидные праймеры синтезированы ОДО «Праймтех» (Беларусь). Получение аффинных мембран с иммобилизованным GSH описано ранее в работе [9].

Выделение суммарной РНК и синтез кДНК. Лейкоцитарную фракцию крови получали, взяв за основу методику [17] с предварительным лизисом эритроцитов. Исходным материалом служила кровь здоровых доноров, стабилизированная цитратом и хранившаяся во льду не более 3 ч после взятия. К 1,5 мл крови в пробирке типа Falcon добавляли 7,5 мл охлажденного лизирующего раствора (155 мМ NH₄Cl, 10 мМ KHCO₃, 0,2 мМ EDTA; pH 7,4). Закрытую смесь выдерживали во льду 20 мин с периодическим переворачиванием. Далее пробы центрифугировали 5 мин при 500 g и 4 °C; темно-красный супернатант (гемолизат эритроцитов) удаляли. Осадок лейкоцитов осторожно ресуспендировали в 3 мл лизирующего раствора и пересаждали в том же режи-

ме. Затем осадок аналогично промывали 3 мл охлажденного стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS). Промытый осадок (объем ~ 50 мкл) немедленно использовали для выделения РНК.

Осадок лейкоцитов суспендировали в 1 мл реагента Purezol, инкубировали 50 мин при комнатной температуре и оставляли на ночь при 2–4 °С. После прогрева (25 °С, 3 мин) и перемешивания на вортексе пробы переносили в стерильные микропробирки. Дальнейшие операции (обработка хлороформом, разделение фаз, осаждение РНК из водной фазы изопропанолом) проводили согласно инструкции к реагенту. Осадок РНК промывали 1 мл 75 %-ного этанола, высушивали на воздухе 5 мин, растворяли в 30 мкл 4 мМ трис-ацетатного буферного раствора (0,1×ТАЕ) и инкубировали 10 мин при 55 °С в твердотельном термостате СН-100 («BioSan», Латвия), после чего немедленно охлаждали раствор в ледяной бане. Полученные препараты анализировали на микрокапельном спектрофотометре NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США). Для консервации к препаратам добавляли 3М ацетат натрия (0,1 объема) и 95 %-ный этанол (3 объема); осажденную РНК хранили при –20 °С в течение 3–6 мес без значительного снижения индекса A_{260}/A_{280} .

Полноразмерную кДНК гена *gstp1* (первую цепь) получали с помощью реакции обратной транскрипции. В реакции использовали 0,4 мкг свежесодержанной лейкоцитарной РНК, обратный геноспецифичный праймер *gstp1r* (структуру см. ниже), а также обратную транскриптазу MMLV из набора ОТ-1. Реакцию проводили в амплификаторе Т-100 «Bio-Rad, США» согласно инструкции к набору и останавливали прогреванием реакционной смеси 5 мин при 92 °С. Охлажденную смесь хранили во льду не более суток.

Амплификация и клонирование гена *gstp1*. Полученную кДНК в составе смеси использовали как матрицу для амплификации гена *gstp1* методом ПЦР. Геноспецифичные олигонуклеотидные праймеры для ПЦР конструировали, исходя из известной нуклеотидной последовательности гена *gstp1* [18]. При этом учитывали вероятность образования праймерами вторичных структур и частоту использования кодонов в процессе трансляции у *E. coli*. Структура прямого праймера *gstp1f* (5'-AGGATTAATGCCCGCCGTACACCGTG-3') содержит сайт рестрикции *AseI* (подчеркнут), перекрывающийся со старт-кодоном АТГ таким образом, что после рестрикции общий динуклеотидный фрагмент АТ сохраняется и обеспечивает функциональность кодона. В структуру обратного праймера *gstp1r* (5'-CATCTCGAGTCACTGTTTCCCGTTGCC-3') непосредственно за триплетом, комплементарным стоп-кодону ТГА, встраивали сайт рестрикции *XhoI* (подчеркнут). ПЦР проводили в амплификаторе Т-100 с помощью ДНК-полимеразы Phusion; фермент брали в количестве 1 Ед/50 мкл смеси. Процесс состоял из следующих этапов: начальная денатурация (95 °С, 2 мин); 35 циклов денатурации (98 °С, 10 с) – отжига (60 °С, 30 с) – элонгации (72 °С, 30 с); заключительная элонгация (72 °С, 10 мин). Продукты ПЦР разделяли методом гель-электрофореза в 1,2 %-ном агарозном геле с добавкой бромида этидия. В каждом опыте проводили положительный и отрицательный контроль амплификации. Фрагменты геля, содержащие целевой ампликон с длиной ~ 650 п. н., визуализировали в трансиллюминаторе, аккуратно вырезали и помещали в стерильные микропробирки для временного хранения во льду. Экстракцию и очистку ДНК из геля проводили с помощью микроколоночного набора NucleoSpin Gel and PCR Clean-up по протоколу производителя. На каждую микроколоночку наносили солюбилизат 3–4 гелей с ампликоном из одного и того же ПЦР-эксперимента. В дальнейшую работу брали препараты очищенной ДНК с величиной индекса $A_{260}/A_{280} \geq 1,70$.

Секвенирование ампликона проводили по методу Сэнгера [19] на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США) с помощью набора реактивов «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» и геноспецифичных праймеров.

Для клонирования использовали плазмидный вектор рТХВ1 (размер 6706 п. н.) с рестрикцией по сайтам *NdeI* и *XhoI* в полилинкерном участке. Так как ген *gstp1* имеет внутренний сайт рестрикции *NdeI* в положениях 536–541 нуклеотидной последовательности [18], рестрикцию ампликона осуществляли по встроенным сайтам *AseI* и *XhoI* (см. выше). Сайт *AseI* в структуре ампликона служит удобной альтернативой *NdeI*; рестрикция по этим сайтам приводит к образованию идентичного «липкого» конца ДНК с одноцепочечным выступом АТ [20]. Расщепление ампликона и вектора проводили раздельно в двух микропробирках, добавляя к тому или иному субстрату (1 мкг ДНК) соответствующие эндонуклеазы рестрикции (по 10 Ед активности каждого фермента). Обе смеси

инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего смесь с ампликоном наносили на микроколонку из набора Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System и выделяли рестрикт по стандартному протоколу. Смесь с вектором дополнительно инкубировали 20 мин при 65 °С и фракционировали электрофорезом в 1 %-ном агарозном геле. Фрагменты геля, содержащие расщепленный вектор, вырезали, переносили в микропробирки и выделяли целевой продукт при помощи того же набора. Ферментативное лигирование очищенных рестриктов проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 77,8 нг вектора, 22,2 нг ампликона и 400 Ед активности ДНК-лигазы фага Т4. Смесь выдерживали 4 ч при 20 °С, а затем хранили не более 5 дней при –20 °С до использования.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* DH5 α полученной лигирующей смесью проводили на фоне KCl, CaCl₂, и MgCl₂ (КСМ-метод), согласно процедуре [21] с незначительными изменениями. В контрольных опытах лигирующую смесь заменяли нативной плазмидой рТХВ1 (положительный контроль) или водой (отрицательный контроль). После трансформации клетки из контрольных и опытных проб высевали в чашки Петри на агаризованную среду LB с добавлением ампициллина (LB-Amp) и инкубировали 18 ч при 37 °С. Колонии трансформантов, предположительно содержащих рекомбинантную плазмиду рТХВ1 со вставкой *gstp1*, использовали для наработки генетического материала. Колонии индивидуально переносили в пробирки с жидкой средой LB-Amp, выращивали ночную культуру и проводили выделение минипрепаратов плазмидной ДНК методом щелочного лизиса [22]. Наличие вставки определяли постановкой ПЦР с геноспецифичными праймерами и гель-электрофорезом полученного амплификата. Целевой продукт ПЦР (~ 650 п. н.) выделяли из фрагментов геля и очищали на микроколонках, как описано выше. Отсутствие мутаций во вставке проверяли автоматическим секвенированием. Далее лучшие минипрепараты дополнительно очищали агарозным гель-электрофорезом и микроколоночной хроматографией. Очищенный рекомбинантный вектор амплифицировали посредством ПЦР с использованием специальных праймеров. Прямой праймер T7univ1f со структурой 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ-3' комплементарен Т7-промотору рТХВ1 и отжигается на расстоянии 70–89 п. н. перед старт-кодоном АТГ (рис. 1). Обратный праймер *intein1r* со структурой

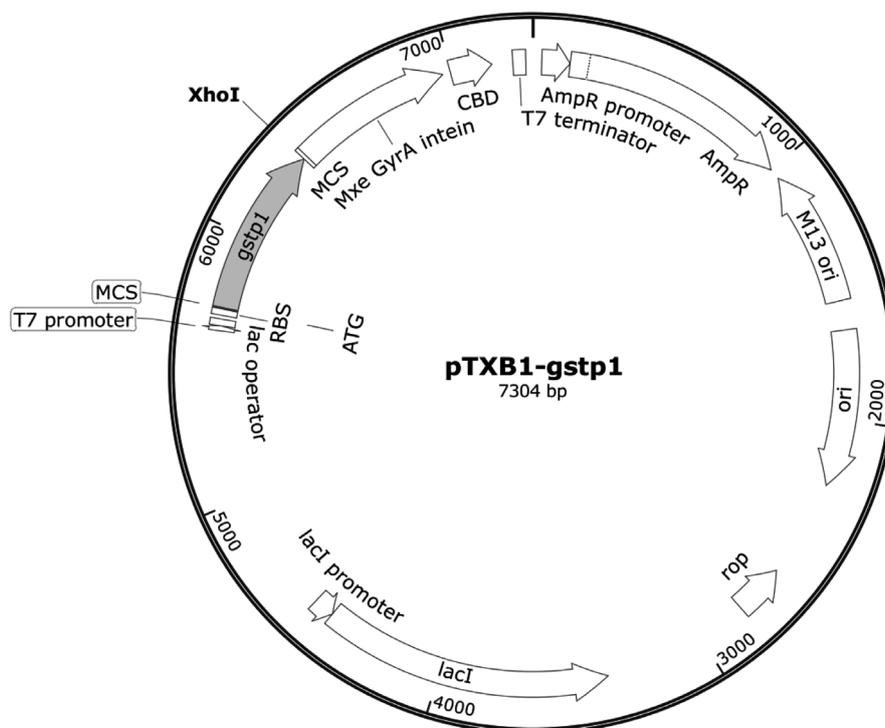


Рис. 1. Генетическая карта рекомбинантного вектора рТХВ1-*gstp1*. Вставка гена *gstp1* в полилинкерный участок (MCS) обозначена серой стрелкой. Размер вектора 7304 п. н.

Fig. 1. Genetic map of the recombinant vector pTXB1-*gstp1*. The insert of *gstp1* gene into the polylinker region (MCS) is designated with a grey arrow. The vector is 7304 bp in size

5'-GATGGCGTTGTCACTGTTG-3' комплементарен интеиновому фрагменту вектора и отжигается на расстоянии 95–113 п. н. после сайта *XhoI* (см. рис. 1).

Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантной GSTP1. Компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) и BL21(DE3)RIPL трансформировали вектором pTXB1-gstpl с помощью КСМ-метода [21]. Рекомбинантные клоны переносили с чашек Петри в жидкую среду LB с антибиотиком (ампициллин для клеток BL21(DE3), ампициллин и хлорамфеникол – для BL21(DE3)RIPL) и выращивали ночную культуру в объеме 5 мл. Затем ночной культурой инокулировали аналогичную среду объемом 100 мл в 500 мл-колбе. Клетки культивировали аэробно при 37 °С с интенсивным встряхиванием (180 об/мин) в шейкере-инкубаторе Multitron Pro («INFORS HT», Швейцария). Когда оптическая плотность культуры при 600 нм достигала 0,5–0,6, вносили индуктор экспрессии IPTG. Условия экспрессии оптимизировали, варьируя концентрацию IPTG (0,2, 0,5 и 1 мМ), а также температуру (20 и 37 °С) и длительность постиндукционного периода. Через 2, 6, 10 и 24 ч после внесения индуктора клетки осаждали центрифугированием 15 мин при 3000 g и 4 °С. Осадок клеток суспендировали в охлажденном 0,1 М КФБ (калий-фосфатный буфер с добавкой 1 мМ EDTA и 1 мМ DTT, pH 6,5) и лизировали под давлением в гомогенизаторе Emulsiflex C5 («Avestin», Канада); лизат осветляли центрифугированием 30 мин при 35000 g и 4 °С. Количество GSTP1 в супернатанте (осветленный лизат) оценивали по активности фермента в реакции конъюгации GSH и CDNB. В специальных опытах осадок лизированных клеток солюбилизировали 0,6 %-ным тритоном X-100 и определяли ферментативную активность солюбилизата таким же образом.

С целью препаративного выделения и очистки рекомбинантную GSTP1 экспрессировали в клетках BL21(DE3)RIPL по оптимизированному протоколу (см. ниже). Осветленный бактериальный лизат (100 мл) концентрировали, обессоливали и переводили в 15 мМ КФБ, используя центрифужные фильтры Amicon Ultra-15 с молекулярно-массовым пределом задерживания 10 кДа. Дальнейшую очистку препарата проводили по процедуре, разработанной ранее для выделения эритроцитарного фермента [9]. Процедура включает анионообменную хроматографию на колонке с DEAE-сефарозой и аффинную хроматографию на картридже с GSH-содержащими мембранами. Условия хроматографии подробно изложены в той же работе.

Определение активности GSTP1. Активность фермента в реакции конъюгации GSH и CDNB определяли на двухлучевом спектрофотометре при pH 6,5 и 25 °С согласно [9]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль S-(2,4-динитрофенил)глутатиона (GDN) за 1 мин. В кинетических экспериментах концентрацию GSH варьировали в диапазоне 0,1–2 мМ на фоне 1 мМ CDNB, а концентрацию CDNB – в диапазоне 0,05–2 мМ на фоне 2 мМ GSH. При изучении влияния циклических лигандов на активность очищенной GSTP1 рабочие растворы водонерастворимых соединений готовили в этаноле или диметилсульфоксиде высокой чистоты. Фермент (15–20 мЕд активности) выдерживали с предполагаемым ингибитором 10 мин при 25 °С и pH 6,5, после чего запускали реакцию внесением растворов GSH и CDNB. Максимальная концентрация органического растворителя в среде инкубации не превышала 5 %, что не влияет на активность GSTP1. Для соединений с явно выраженным ингибиторным действием строили концентрационную зависимость «доза–эффект» и проводили ее нелинейную регрессию в программе Sigmaplot, используя логистическое уравнение сигмоиды с 4 параметрами [23]; из уравнения находили величину IC₅₀ (концентрация полумаксимального ингибирования).

Молекулярный докинг лигандов в активном центре GSTP1. Молекулярный докинг амфифильных карбо- и гетероциклических соединений в лигандсвязывающем центре GSTP1 (H-сайт) проводили *in silico* с помощью программы AutoDock Vina [24]. Белковым рецептором служила трехмерная кристаллическая структура фермента в комплексе с GSH, депонированная в базе данных Protein Data Bank (код 6GSS, [25]). Для подготовки рецептора к жесткому докингу (удаление молекул воды, GSH и других лигандов, ионов, неполярных атомов H) использовали программный пакет AutoDock Tools [24]. Область докинга задавали в форме куба с ребром 24 Å; куб центрировали по координатам атома O фенольной OH-группы остатка Tyr108, экспонированного в H-сайт. Исходные трехмерные структуры лигандов загружали из публичной базы данных PubChem [26]. Подготовку структур к докингу проводили в программных пакетах Vega ZZ [27] и AutoDock Tools следующим образом: 1) редактировали химические связи; 2) присваивали частичный заряд

по Гастайгеру при pH 7,0; 3) минимизировали энергию в силовом поле Amber методом сопряженных градиентов; 4) устанавливали число вращательных степеней свободы. В параметрах файла конфигурации AutoDock Vina повышали интенсивность поиска (exhaustiveness) до уровня 128 и увеличивали максимальное число позиций лиганда до 20; энергетический барьер между наилучшей и наихудшей позициями задавали равным 5 ккал/моль. Результаты докинга визуализировали и анализировали в программном пакете UCSF Chimera [28]. Каждый лиганд докировали трижды и выбирали хорошо воспроизводимые позиции с минимумом энергии, для которых оценивали природу и локализацию взаимодействий с белком, а также степень перекрывания с известными закристаллизованными положениями GSH и GDN в активном центре GSTP1. Позицию, соответствующую ингибиторному поведению лиганда *in vitro*, считали наиболее вероятной.

Аналитические методы. Гель-электрофорез белковых фракций проводили на приборе Mini-Protean Tetra Cell («Bio-Rad», США) по Лэмбли [29] в 13 %-ном полиакриламидном геле на фоне додецилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола. Белковые полосы в гелях окрашивали красителем Coomassie R-250. Концентрацию белка определяли по Бредфорду [30], используя раствор HSA при построении калибровочной кривой.

Для подготовки к трипсинолизу очищенную GSTP1 (0,19 мг белка в 0,35 мл раствора) осаждали 4 объемами ацетона с выдержкой 16 ч при -20°C . Осадок белка собирали центрифугированием, растворяли в 8 М мочеvine, карбоксиметилировали и обрабатывали трипсином по протоколу [31] при соотношении трипсин:белок = 1:25 по массе. Полученные пептиды выделяли на картридже для твердофазной экстракции SampliQ C18 EC («Agilent Technologies», США); N-концевой триптический пептид элюировали 80 %-ным ацетонитрилом с добавкой 0,2 % муравьиной кислоты. Масс-спектры очищенной GSTP1 и триптического пептида регистрировали методом MALDI-TOF с помощью времяпролетного масс-спектрометра Microflex LRF System («Bruker Daltonics», США).

Результаты и их обсуждение. В работе использовали лейкоцитарную фракцию крови как доступный источник генетического материала (РНК) с удовлетворительным уровнем экспрессии гена *gstp1* (25–40 % от уровня экспрессии референсного гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [32]). Выходы суммарной РНК составили 3,1–3,9 мкг/мл крови, что соответствует производительности лучших коммерческих наборов. Целостность РНК подтверждена электрофорезом в 1,2 %-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия; выявлены две четкие полосы рибосомальной 28S- и 18S-РНК с несколько более интенсивной 28S-полосой. В реакцию обратной транскрипции брали РНК с высоким спектрофотометрическим индексом чистоты A_{260}/A_{280} , равным 1,91–2,04. В результате получена полноразмерная кДНК гена *gstp1*, которую амплифицировали с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion и тщательно подобранных геноспецифичных праймеров (их структура приведена выше). На электрофореграммах продуктов ПЦР в 1,2 %-ном агарозном геле обнаружена одна доминантная полоса, соответствующая ампликону *gstp1* с ожидаемой длиной ~ 650 п. н. По данным секвенирования, нуклеотидная последовательность очищенного ампликона, фланкированная сайтами рестрикции *AseI* и *XhoI*, полностью совпадает с первичной структурой гена *gstp1* из базы данных GenBank [18].

Амплифицированный ген *gstp1* клонировали в коммерчески доступный плазмидный вектор рТХВ1 с умеренной копийностью (~ 20 копий/клетку). Вектор содержит ген устойчивости к ампициллину и предназначен для IPTG-индуцируемой экспрессии целевых генов в *E. coli* под контролем сильного промотора бактериофага T7 и *lac*-оператора (рис. 1). Согласно производителю, рекомбинантный белок экспрессируется без дополнительных N-концевых аминокислот, но может быть получен с C-концевым тэгом в виде небольшого белка интеина, имеющего сродство к хитину. Чтобы удалить тэг, химерный белок адсорбируют на хитиновой колонке и расщепляют действием DTT активированную связь между C-концевым аминокислотным остатком целевого белка и N-концевым остатком Cys интеина, причем выходы в реакции расщепления значительно варьируют [33]. В настоящей работе интеиновый фрагмент ДНК вектора не экспрессировали, так как существует возможность получить бестэговую рекомбинантную GSTP1 напрямую, исключив дополнительные стадии химической или ферментативной модификации первичного продукта экспрессии, и использовать для выделения фермента аффинный сорбент с иммобилизо-

ванным GSH. Поэтому в создаваемой генетической конструкции стоп-кодон располагали между вставкой *gstp1* и сайтом рестрикции *XhoI*, который предшествует интеиновому фрагменту (рис. 1).

Раздельную рестрикцию вставки и вектора, очистку рестрикетов и их лигирование проводили согласно рекомендациям производителей ферментов и микроколониальных наборов. Массовое соотношение вектор/вставка в реакции лигирования составляло 3,5:1. При трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5 α полученной лигирующей смесью на чашках с отрицательным и положительным контролем выявлено 0 и более 100 колоний соответственно. На чашках с опытными пробами обнаружено 4–40 колоний в зависимости от концентрации клеток, взятых в опыт. Клоны, предположительно содержащие рекомбинантную плазмиду со вставкой, подращивали в ночной культуре и выделяли минипрепараты плазмидной ДНК. В 5 из 9 минипрепаратов наличие вставки подтвердилось постановкой ПЦР с геноспецифичными праймерами и гель-электрофорезом амплификата. После выделения и очистки суммарный выход целевого продукта ПЦР (650 п. н.) составил 2,8 мкг ДНК. Автоматическим секвенированием доказано, что ДНК-последовательность вставки не содержит мутаций и соответствует наиболее распространенному аллелю дикого типа *gstp1a* [34]. Чтобы проверить целостность полилинкера и прилегающих к нему участков, лучшие минипрепараты после дополнительной очистки амплифицировали методом ПЦР с использованием пары встречных векторспецифичных праймеров T7univ1f и intein1r, которые отжигаются на ДНК-мишенях, расположенных по разные стороны от полилинкера; структура праймеров приведена выше. Электрофореграммы амплификатов, полученных для нативной плазмиды рТХВ1 и рекомбинантного вектора рТХВ1-*gstp1*, представлены на рис. 2. В первом случае амплифицируется небольшой фрагмент ДНК с длиной ~ 230 п. н., близкой к расчетной величине (228 п. н.). Во втором случае размер ампликона значительно больше (~ 880 п. н.), что обусловлено наличием вставки *gstp1* с длиной ~ 650 п. н. По данным автоматического секвенирования, нуклеотидная последовательность амплифицированного участка совпала с ожидаемой.

Эксперименты по бактериальной экспрессии рекомбинантной GSTP1 проводили на лизогенных клеточных линиях *E. coli* BL21(DE3) и BL21(DE3)RIPL; вторая линия обогащена транспортными РНК для редких кодонов, требуемых при трансляции мРНК генов млекопитающих. Обнаружено, что в отсутствие индуктора (IPTG) экспрессия не происходит. Установлены оптимальные условия

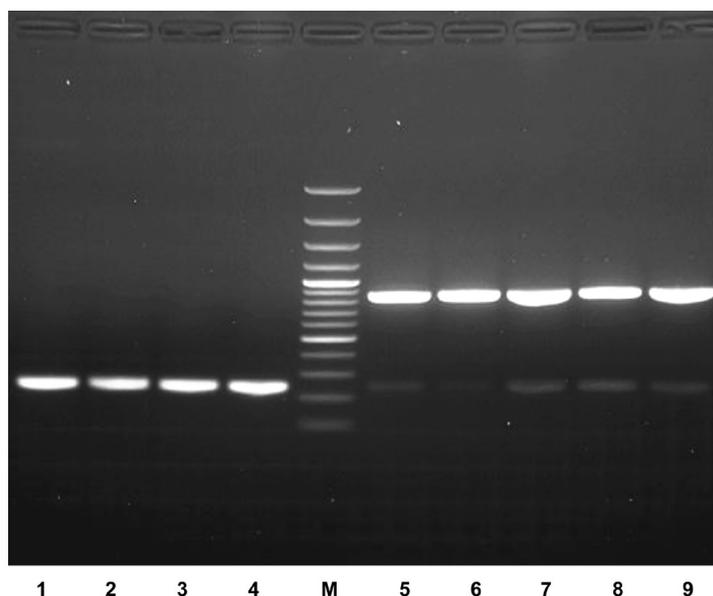


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации нативного и рекомбинантного вектора с использованием векторспецифичных праймеров. Обозначения треков: 1–4 – нативный вектор рТХВ1; 5–9 – рекомбинантный вектор рТХВ1-*gstp1*; М – маркер молекулярной массы ДНК (100–3000 п. н.). Агарозный гель (1,2 %) с бромидом этидия

Fig. 2. Electrophoregrams of PCR amplification products for the native and recombinant vector with the use of vector-specific primers. Track designations: 1–4 – native vector pTXB1; 5–9 – recombinant vector pTXB1-*gstp1*; M – DNA molecular mass marker (100–3000 bp). Agarose gel (1.2 %) with ethidium bromide

экспрессии: 0,5 мМ концентрация IPTG; температура индукции 37 °С; длительность инкубации с индуктором 24 ч. Существенно то, что почти весь рекомбинантный фермент экспрессируется при 37 °С в цитозоле как растворимый белок; в осадке лизированных клеток выявлено лишь 6–10 % активности. При оптимальных условиях уровень экспрессии GSTP1 клетками BL21(DE3) достигает 200–300 Ед/л среды; с учетом удельной активности чистого фермента (~100 Ед/мг) данная величина соответствует концентрации ферментного белка, равной 2–3 мг/л среды. У линии BL21(DE3)R1PL аналогичный показатель на порядок выше и составляет 30–32 мг фермента/л среды. Достигнутый в настоящей работе уровень экспрессии бестэговой GSTP1 не уступает лучшим зарубежным данным для фермента, экспрессированного с гексагистиридиновым тэгом [10, 11].

Результаты очистки рекомбинантной GSTP1 из осветленного бактериального лизата суммированы в табл. 1. Общий выход очищенного фермента составил 75,7 %. Полученный препарат обладает высокой удельной активностью (102,6 Ед/мг белка). Найденная величина очень близка к максимальным литературным значениям активности нативной и рекомбинантной GSTP1 – соответственно 104,5 и 112 Ед/мг белка [9, 10].

Т а б л и ц а 1. Схема очистки рекомбинантной GSTP1 из 100 мл осветленного лизата

Table 1. Scheme of recombinant GSTP1 purification from 100 ml of clarified lysate

Стадия очистки	Общий белок, мг	Активность, Ед	Удельная активность, Ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Осветленный лизат	30,6	314,2	10,3	1	100
DEAE-сефароза	3,34	288,5	86,4	8,4	91,8
Аффинный картридж	2,32	237,9	102,6	10,0	75,7

Таким образом, нами успешно осуществлена бестэговая гетерологическая экспрессия гена *gstp1* в клетках *E. coli*. Впервые получены миллиграммовые количества очищенного высокоактивного препарата рекомбинантной GSTP1, что позволяет развернуть структурно-функциональное исследование ферментного белка и провести направленный скрининг новых ингибиторов фермента с потенциальной противоопухолевой активностью.

Электрофореграммы белковых фракций, полученных в ходе очистки фермента, представлены на рис. 3. Как выяснилось, исходный материал содержит значительное количество (~ 10 %) целевого продукта экспрессии и примесные бактериальные белки (трек 1). Очищенный препарат GSTP1 имеет чистоту не менее 98 % (трек 3). Электрофоретическая подвижность основной белковой зоны соответствует ожидаемой молекулярной массе 23 кДа. Гомогенность очищенного фермента также подтверждена масс-спектрометрией MALDI-TOF. Наряду с главным пиком протонированного молекулярного иона (M+H)⁺ с величиной $m/z = 23350$ в спектре имеются минорные пики, соответствующие дважды протонированной молекуле (M+2H)²⁺, а также протонированным димерным и тримерным молекулярным ассоциатам (2M+H)⁺ и (3M+H)⁺ (рис. 4, а). Сигналы от примесных белков практически отсутствуют. Экспериментальное значение молекулярной массы, найденное масс-спектрометрическим методом, равно 23349 Да, что с точностью 7 Да соответствует расчетной массе 23356 Да для продукта экспрессии доминантного аллеля *gstp1a*, содержащего аминокислотные остатки Ile105 и Ala114 [34], а также N-концевой остаток Met.

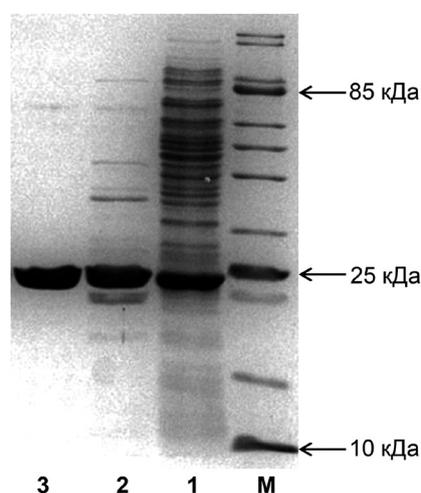


Рис. 3. Электрофореграммы стадий очистки рекомбинантной GSTP1. Обозначения трекков: 1 – осветленный лизат; 2 – препарат фермента после DEAE-сефарозы; 3 – очищенный фермент; M – маркерные белки с указанием молекулярной массы. Полиакриламидный гель (13 %) с додецилсульфатом натрия и 2-меркаптоэтанолом

Fig. 3. Electrophoregrams of recombinant GSTP1 purification steps. Track designations: 1 – clarified lysate; 2 – enzyme preparation after DEAE-sepharose; 3 – purified enzyme; M – marker proteins with molecular mass indicated. Polyacrylamide gel (13 %) containing sodium dodecyl sulfate and 2-mercaptoethanol

Fig. 3. Electrophoregrams of recombinant GSTP1 purification steps. Track designations: 1 – clarified lysate; 2 – enzyme preparation after DEAE-sepharose; 3 – purified enzyme; M – marker proteins with molecular mass indicated. Polyacrylamide gel (13 %) containing sodium dodecyl sulfate and 2-mercaptoethanol

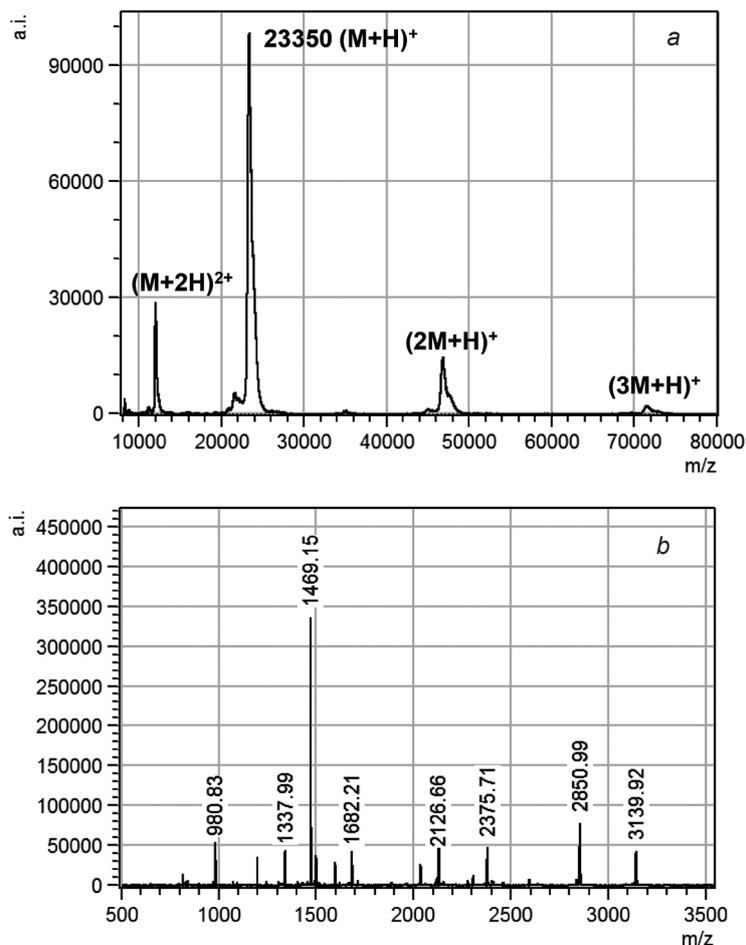


Рис. 4. Масс-спектры (MALDI-TOF) очищенной GSTP1 (*a*) и N-концевого пептида, полученного трипсинолизом ферментного белка (*b*)

Fig. 4. Mass-spectra (MALDI-TOF) of purified GSTP1 (*a*) and N-terminal peptide obtained by trypsinolysis of the enzyme protein (*b*)

Наличие N-концевого Met доказано в специальном эксперименте по трипсинолизу рекомбинантной GSTP1 с последующей масс-спектрометрической идентификацией N-концевого триптического додекапептида Met-Pro-Pro-Tyr-Thr-Val-Val-Tyr-Phe-Pro-Val-Arg (рис. 4, *b*). Расчетная величина m/z для протонированного молекулярного иона $(M+H)^+$ этого пептида составляет 1469,77. Экспериментальное значение m/z основного пика в спектре MALDI-TOF оказалось равным 1469,15, что практически совпадает с расчетным в пределах погрешности измерений. Следовательно, в выбранных нами условиях экспрессии N-концевой Met не отщепляется бактериальной метионинаминопептидазой и представляет собой единственное, незначительное структурное отличие рекомбинантного фермента от нативного. В то же время ферментный препарат, полученный в настоящей работе, выгодно отличается от литературного аналога [13] отсутствием структурной микрогетерогенности по N-концевой аминокислоте.

Каталитические свойства рекомбинантной GSTP1 изучали при pH 6,5 и 25 °C в реакции конъюгации GSH и CDNB. Параметры стационарной кинетики определяли, варьируя начальную концентрацию одного из субстратов при фиксированной начальной концентрации второго субстрата. Установлено, что для каждого субстрата экспериментальная зависимость начальной скорости реакции от его концентрации описывается гиперболой, согласно уравнению Михаэлиса–Ментен (рис. 5). Экспериментальные величины константы Михаэлиса K_M и каталитической константы k_{cat} по обоим субстратам, рассчитанные из графиков, приведены в табл. 2. Найденные значения оказались весьма близки к аналогичным показателям для нативного фермента из эритроцитов [9]; во всех случаях разница составляет менее 15%. Результаты свидетельствуют о том,

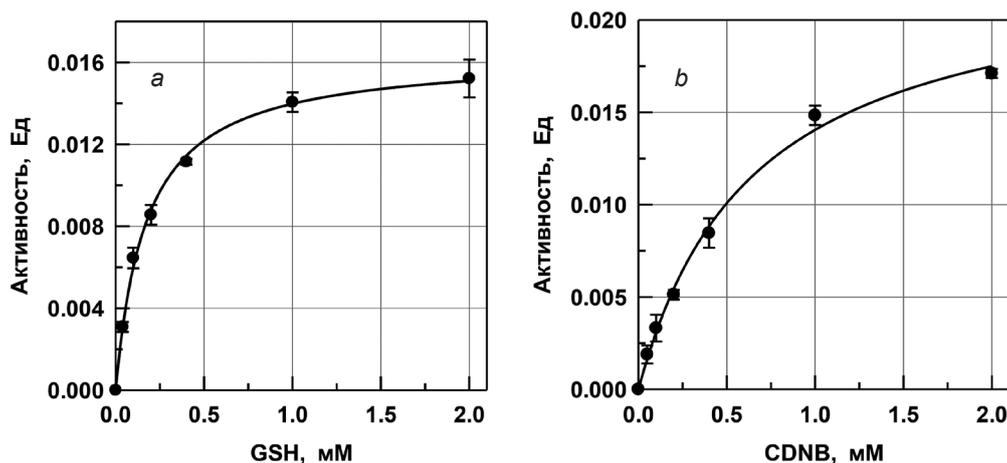


Рис. 5. Зависимость активности рекомбинантной GSTP1 от концентрации GSH и CDNB (соответственно кривые *a* и *b*)

Fig. 5. Dependence of recombinant GSTP1 activity on the concentration of GSH and CDNB (curves *a* and *b*, respectively)

что в ходе экспрессии происходит корректный фолдинг рекомбинантной GSTP1. По основным физико-химическим и каталитическим характеристикам полученный нами препарат практически идентичен нативному ферменту.

Т а б л и ц а 2. Кинетические параметры рекомбинантной и нативной GSTP1 в реакции конъюгации GSH и CDNB

Table 2. Kinetic parameters of recombinant and native GSTP1 in the conjugation reaction of GSH with CDNB

Субстрат	Рекомбинантная GSTP1		Нативная GSTP1 [9]	
	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹
GSH	0,17	40,9	0,19	47,8
CDNB	0,65	57,9	0,68	54,3

Характерными отличиями Н-сайта GSTP1 от аналогичных сайтов других цитозольных GST являются более крупный размер и частичная гидрофильность [35]. Логично предположить, что высоким сродством к Н-сайту могут обладать амфифильные моно- или полициклические ароматические молекулы подходящего размера с заместителями, способными к образованию водородных связей. Поэтому предварительный отбор возможных ингибиторов фермента проводили из числа коммерчески доступных и стабильных ароматических или гетероароматических соединений (рН- и комплексонометрические индикаторы, красители, лабораторные реактивы) с моно-, би-, три- или тетрациклической структурой и амфифильными свойствами. Критерии отбора были следующими: 1) наличие атомов или функциональных групп, обеспечивающих малую или умеренную растворимость в воде при нейтральных значениях рН; 2) соответствие правилам Липински [36] и Вебера [37] для орально биодоступных молекул (допускалось несоответствие только по одному пункту из каждого набора правил). В результате найдено более 50 структурно разнообразных соединений-кандидатов; 9 из них представляют различные классы карбо- и гетероциклов и были отобраны для тестирования ингибиторной активности *in silico* и *in vitro*. Кроме того, в исследование включили замещенный имидазофеназин МІР и ряд производных рhen, так как ингибирование GSTP1 конденсированными N-гетероциклами изучено недостаточно.

Установлено, что небольшие молекулы моно- и бициклических лигандов (синапиновая и хинальдиновая кислоты, 2-меркаптобензотиазол, 4-(2-пиридилазо)резорцин, 8-гидроксихиолин) в концентрации 100 мкМ не ингибируют GSTP1 (табл. 3). По данным молекулярного докинга, эти же лиганды либо связываются вне Н-сайта, либо занимают только его часть, не создавая стерических препятствий для катализа. Как оказалось, хинальдиновая кислота ускоряет реакцию на 36 %, вероятно, за счет образования водородной связи между карбоксилатной группой лиганда

Таблица 3. Влияние некоторых карбо- и гетероциклических соединений на *in vitro* активность GSTP1 и расчетная энергия их связывания с ферментом *in silico*Table 3. Effect of some carbo- and heterocyclic compounds on the *in vitro* GSTP1 activity and calculated energy of their binding to the enzyme *in silico*

Соединение	Концентрация, мкМ	Активность GSTP1, % к контролю ¹	Свободная энергия связывания $E_{св}$, ккал/моль ²
Синапиновая кислота (анион)	100	103,1	-5,6
2-меркаптобензотиазол	100	96,7	-5,4
4-(2-пиридилазо)резорцин	100	104,1	-6,9 ³
8-гидроксихинолин	100	101,9	-5,7
Хинальдиновая кислота (анион)	100	136	-6,4
Патентный синий VF (анион)	100	85,6	-7,9
MIP	100	54,1	-8,0
Галлоцианин (цвиттер-ион)	100	34,5	-7,5
Phen	100	96,7	-6,2
Bipydca (дианион)	100	103,0	-5,5
Dppz	20	101,3	-7,9
Phedon	20	64,7	-6,4
ARS ⁴ (анион)	20	42,1	-8,1
Индигокармин (дианион)	20	11,7	-9,3

Примечание. ¹Среднее арифметическое из двух независимых определений. ²Оценка методом молекулярно-докинга *in silico*. ³Связывание вне Н-сайта. ⁴Ализариновый красный С. Расшифровка остальных сокращенных названий дана в разделе «Материалы и методы».

и тиольной группой GSH, что облегчает депротонирование последней. Некоторые три- и тетрациклические лиганды (триарилметановый краситель патентный синий VF, галлоцианин, протяженная тетрациклическая система MIP) слабо или умеренно ингибируют фермент с величиной IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) > 50 мкМ. Выявлены также новые, более эффективные ингибиторы GSTP1 ($IC_{50} < 50$ мкМ): phedon, ARS и индигокармин.

Согласно моделированию *in silico*, молекула phedon располагается в Н-сайте фермента так, что карбонильный кислород при атоме C5 образует водородные связи с ОН-группой Tyr108 и NH-группой Gly205 (рис. 6). Одно из пиридиновых колец лиганда и бензольное кольцо Phe8 лежат в параллельных плоскостях и сближены на расстояние 3,6 Å, что обеспечивает их π - π взаимодействия (стэкинг). Кроме того, комплекс стабилизируется гидрофобными взаимодействиями phedon с Trp38 и Val35; участие Trp38 в связывании лигандов Н-сайтом ранее не было отмечено в литературе. Позиция phedon частично перекрывается с закристаллизованным положением GDN в активном центре GSTP1, что коррелирует с выявленным *in vitro* наличием ингибиторных свойств у данного лиганда. По экспериментальной величине IC_{50} (31 мкМ) phedon близок к кемпферолу и кверцетину – природным флавоноидным ингибиторам GSTP1 средней силы [38]. В то же время незамещенный phen и некоторые его производные (дианион bipydca с неплоской структурой, а также пентациклический ДНК-интеркалятор dppz с Т-образной формой молекулы) в концентрации 20–100 мкМ не ингибируют фермент. Указанные соединения связываются *in silico* в Н-сайте слабее (bipydca) или прочнее (dppz), чем phedon, и тоже взаимодействуют с Phe8 путем стэкинга, но при этом их позиции не перекрывают закристаллизованные положения GSH и GDN, что согласуется с отсутствием ингибирования. Так как phedon является редокс-активным гетероциклическим *o*-хиноном, дополнительно проверяли возможность его химической реакции с GSH или GSTP1 при определении активности фермента. Для этого соответствующие бинарные смеси инкубировали 10–120 мин при pH 6,5 и 25 °C и анализировали их состав методами масс-спектрометрии (MALDI-TOF, ESI-QTOF) и спектрофотометрии. Как выяснилось, phedon не образует прочных ковалентных аддуктов с GSTP1 или GSH, но медленно окисляет тиольную группу трипептида с образованием дисульфида GSSG и 1,10-фенантролин-5,6-диола (phedol), который в свою очередь реокисляется на воздухе, генерируя phedon и H₂O₂. Также обнаружено, что 20 мкМ phedol и 100 мкМ H₂O₂ в стандартных условиях определения активности не ингибируют GSTP1,

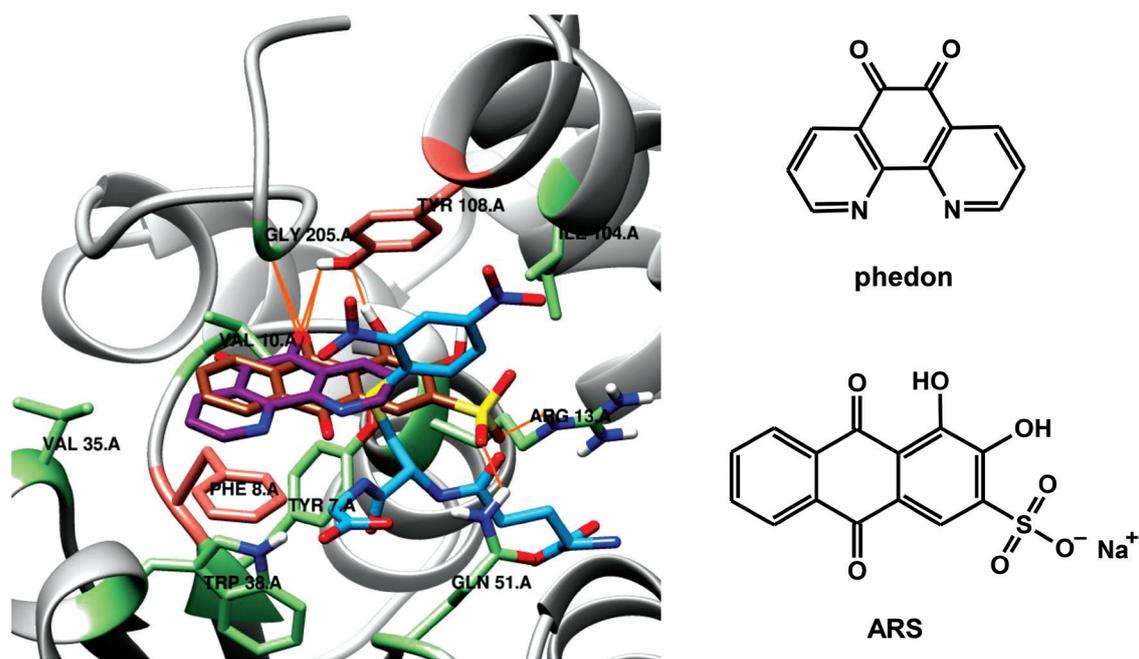


Рис. 6. Предпочтительные ориентации phedon и ARS в H-сайте GSTP1, найденные *in silico*. Атомы С показаны пурпурным (phedon), коричневым (ARS), персиковым (боковые цепи Phe8 и Tyr108), светло-зеленым (боковые цепи других аминокислотных остатков) и голубым цветом (GDN); оранжевые линии – водородные связи лигандов с белковым окружением. Справа – структурные формулы лигандов

Fig. 6. Preferable orientations of phedon and ARS in the H-site of GSTP1 found *in silico*. Carbon atoms are colored in purple (phedon), brown (ARS), peach (side chains of Phe8 and Tyr108), light green (side chains of other amino acid residues), and cyan (GDN); orange lines are hydrogen bonds of the ligands with protein environment. To the right are given structural formulas of the ligands

а конверсия GSH в GSSG во всех случаях не превышает 3 %; это позволяет исключить не прямые механизмы ингибирования фермента.

Антрахиноновый краситель ARS ингибирует GSTP1 заметно сильнее, чем phedon: экспериментальное значение IC_{50} равно 16 мкМ. Результаты докинга указывают на более прочное связывание ARS в H-сайте фермента; расчетная величина E_{cb} (–8,1 ккал/моль) по модулю значительно превышает аналогичный параметр для phedon (табл. 3). Полученный *in silico* комплекс GSTP1-ARS стабилизирован пятью водородными связями (рис. 6): две из них образует карбонильный кислород при атоме C10 ARS – с OH-группой Tyr108 и NH-группой Gly205, две другие связывают сульфатные атомы O с Gln51 (амид в боковой цепи) и Arg13 (гуанидиновая группа), еще одна локализована между OH-группой лиганда (при атоме C4) и одноименной группой Tyr108. В образование комплекса также вносят вклад стэкинг-взаимодействия с Phe8 и гидрофобные взаимодействия с Val10 и Ile104. Ориентация ARS в комплексе явно вступает в стерический конфликт с динитрофенильной группой GDN и в меньшей степени с GSH, что согласуется с ингибиторной активностью лиганда *in vitro*.

Среди всех изученных соединений максимальная (по модулю) расчетная величина E_{cb} , равная –9,3 ккал/моль, найдена у индигокармина (5,5'-дисульфоиндиго). В предпочтительной ориентации *in silico* лиганд занимает практически весь H-сайт и проксимальную часть G-сайта, образуя 4 водородные связи с белковым окружением (рис. 7): карбонильный кислород при атоме C3 связан с OH-группой Tyr108, атомы O одной из сульфатных групп лиганда – с гуанидиновой группой Arg13 и боковой амидной группой Gln51 (2 связи), а атом O другой сульфатной группы – с NH-группой Val35. Следует отметить существенное сходство комплексов индигокармина и ARS по локализации водородных связей лиганд–белок, а также по наличию стэкинг-взаимодействий с Phe8 и гидрофобных взаимодействий с участием Val10 и Ile104. Позиция, занимаемая индигокармином, стерически блокирует связывание продукта ферментативной реакции (GDN) в пространстве между Tyr108, Ile104 и Arg13, что позволило прогнозировать ингибиторные свойства

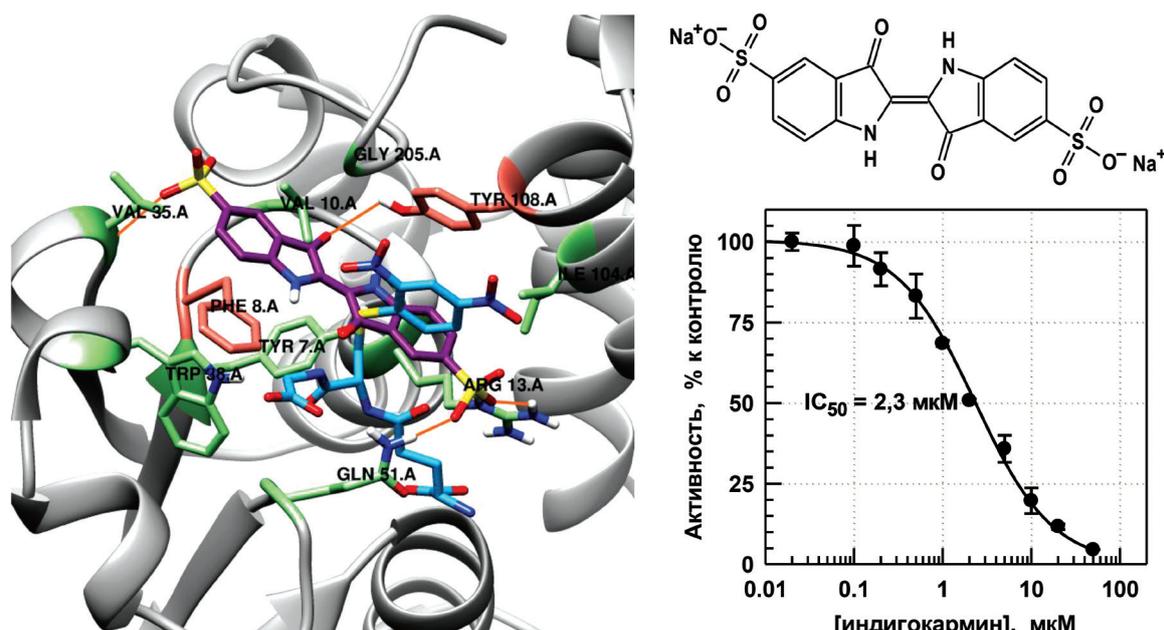


Рис. 7. Слева – предпочтительная ориентация индигокармина в Н-сайте GSTP1, найденная *in silico*. Атомы С лиганда показаны пурпурным цветом, остальные элементы окрашены как на рис. 6. Справа – структурная формула лиганда и кривая ингибирования фермента *in vitro*

Fig. 7. To the left is given preferable orientation of indigo carmine found *in silico*. Carbon atoms of the ligand are shown in purple, other elements are colored as on Fig. 6. To the right are the ligand structural formula and the *in vitro* enzyme inhibition curve

данного соединения. Как показали эксперименты *in vitro*, индигокармин в микромолярных концентрациях сильно ингибирует GSTP1 (рис. 7). Значение IC_{50} , рассчитанное из кривой ингибирования, составляет 2,3 мкМ. По силе ингибирования индигокармин примерно вдвое превосходит этакриновую кислоту – известный ингибитор фермента с величиной IC_{50} , равной 4,9 мкМ [39]. Полученные результаты впервые демонстрируют способность индигоидных соединений эффективно ингибировать GSTP1. Так как индигокармин практически не связывается с альбумином и другими белками сыворотки крови человека при $pH \geq 5$ [40], ингибирование GSTP1 данным соединением, по-видимому, имеет специфический характер.

Известно, что моно- и полиароматические лиганды, связываясь в Н-сайте GSTP1, могут взаимодействовать по механизму стэкинга с Tyr108 или Phe8 [4]. Лиганды первой группы, которые подобно GDN и этакриновой кислоте взаимодействуют с Tyr108, заведомо будут создавать стерические препятствия для катализа и ингибировать GSTP1 более или менее эффективно. Лиганды второй группы, взаимодействующие с Phe8, не обязательно будут обладать ингибиторными свойствами. Для лигандов этой группы в настоящей работе выявлены особенности молекулярной архитектуры, присущие «хорошим» ингибиторам: 1) три- или тетрациклическая ароматическая или гетероароматическая структура с вытянутой формой молекулы и ее максимальной длиной 14–15 Å; 2) карбонильная или гидроксильная группа ближе к центру молекулы, способная к образованию водородной связи с Tyr108; 3) один или два отрицательно заряженных (или полярных) заместителя, расположенных на противоположных концах молекулы и способных образовать водородные связи с остатками из числа Arg13, Val35 и Gln51.

Заключение. Нами создана экономичная и эффективная система бактериальной экспрессии бестэговой рекомбинантной GSTP1 человека в клетках *E. coli*. Разработана несложная процедура выделения фермента из бактериального лизата с использованием глутатионсодержащих аффинных мембран. Впервые получены миллиграммовые количества очищенной GSTP1, что позволяет развернуть структурно-функциональное исследование ферментного белка. Высокий уровень экспрессии соответствует лучшим мировым показателям и, в отличие от зарубежных аналогов, позволяет нарабатывать очищенный фермент с нативной бестэговой структурой и высокой удель-

ной активностью (≥ 100 Ед/мг белка). В результате проведенных исследований *in silico* и *in vitro* выявлены структурные факторы и взаимодействия, определяющие эффективность ингибирования фермента карбо- и N-гетероциклическими лигандами. Получены новые научные данные о предпочтительной ориентации «хороших» ингибиторов в активном центре GSTP1. Обнаружены новые ингибиторы фермента: phedon, ARS и индигокармин с величиной IC_{50} соответственно 31, 16 и 2,3 мкМ. Найденные соединения, в особенности индигокармин, представляют интерес для создания новых лидерных структур с потенциальной противоопухолевой активностью. Результаты работы могут найти применение в научно-исследовательских лабораториях молекулярно-биологического и биохимического профиля. Очищенная GSTP1 также может использоваться как биоаналитический реагент в диагностических тест-системах для оценки токсичности различных ксенобиотиков.

Список использованных источников

1. Wu, B. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery / B. Wu, D. Dong // Trends Pharmacol. Sci. – 2012. – Vol. 33, N 12. – P. 656–668. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.007>
2. Калинина, Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // Успехи биол. хим. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.
3. Townsend, D. M. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance / D. M. Townsend, K. D. Tew // Oncogene. – 2003. – Vol. 22, N 47. – P. 7369–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
4. The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site) / A. J. Oakley [et al.] // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 291, N 4. – P. 913–926. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3029>
5. Mathew, N. Glutathione S-transferase (GST) inhibitors / N. Mathew, M. Kalyanasundaram, K. Balaraman // Expert Opin. Ther. Patents. – 2006. – Vol. 16, N 4. – P. 431–444. <https://doi.org/10.1517/13543776.16.4.431>
6. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases / N. Allocati [et al.] // Oncogenesis. – 2018. – Vol. 7, N 1. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
7. Mannervik, B. Glutathione Transferase (Human Placenta) / B. Mannervik, C. Guthenberg // Methods Enzymol. – 1981. – Vol. 77. – P. 231–235. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77030-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77030-7)
8. Awasthi, Y. C. Purification and characterization of a new form of glutathione S-transferase from human erythrocytes / Y. C. Awasthi, S. V. Singh // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – Vol. 125, N 3. – P. 1053–1060. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(84\)91390-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)91390-1)
9. Гилевич, С. Н. Получение высокоактивной глутатион-S-трансферазы P1-1 из эритроцитов человека с помощью аффинных мембран и свойства очищенного фермента / С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко, К. Ю. Рипинская // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 66–79.
10. Chang, M. Expression and purification of hexahistidine-tagged human glutathione S-transferase P1-1 in *Escherichia coli* / M. Chang, J. L. Bolton, S. Y. Blond // Protein Expr. Purif. – 1999. – Vol. 17, N 3. – P. 443–448. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1149>
11. Wu, Y. Expression, purification and functional analysis of hexahistidine-tagged human glutathione S-transferase P1-1 and its cysteinyl mutants / Y. Wu, J. Shen, Z. Yin // Protein J. – 2007. – Vol. 26, N 6. – P. 359–370. <https://doi.org/10.1007/s10930-006-9043-2>
12. High-level bacterial expression of human glutathione transferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA / R. H. Kolm [et al.] // Protein Expr. Purif. – 1995. – Vol. 6, N 3. – P. 265–271. <https://doi.org/10.1006/prep.1995.1034>
13. Battistoni, A. Cytoplasmic and periplasmic production of human placental glutathione transferase in *Escherichia coli* / A. Battistoni [et al.] // Protein Expr. Purif. – 1995. – Vol. 6, N 5. – P. 579–587. <https://doi.org/10.1006/prep.1995.1076>
14. Denisova, A. S. Synthesis of bifunctional ligands based on azaheterocycles and fragments of 12-crown-4 / A. S. Denisova [et al.] // Russ. J. Org. Chem. – 2005. – Vol. 41, N 11. – P. 1690–1693. <https://doi.org/10.1007/s11178-006-0020-1>
15. Kleineweischede, A. Synthesis of amino- and bis(bromomethyl)-substituted bi- and tetradentate N-heteroaromatic ligands: building blocks for pyrazino-functionalized fullerene dyads / A. Kleineweischede, J. Mattay // Eur. J. Org. Chem. – 2006. – Vol. 2006, N 4. – P. 947–957. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200500548>
16. On the synthesis of pyrazino[2,3-b]phenazine and 1H-imidazo[4,5-b]phenazine derivatives / A. M. Amer [et al.] // Monatsh. Chem. – 1999. – Vol. 130, N 10. – P. 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/PL00010183>
17. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy / T. E. Witzig [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2002. – Vol. 8, N 5. – P. 1085–1091.
18. Homo sapiens full open reading frame cDNA clone RZPDo834C083D for gene GSTP1, glutathione S-transferase pi; complete cds; without stopcodon [Electronic resource] // The National Center for Biotechnology Information. – 2016. – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/47496668>. – Date of access: 19.04.2017.
19. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – Vol. 74, N 12. – P. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
20. Design, expression, and purification of a Flaviviridae polymerase using a high-throughput approach to facilitate crystal structure determination / K. H. Choi [et al.] // Protein Sci. – 2004. – Vol. 13, N 10. – P. 2585–2692. <https://doi.org/10.1110/ps.04872204>

21. Gateway recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames ORFeomes / A. J. Walhout [et al.] // *Methods Enzymol.* – 2000. – Vol. 328 – P. 575–592. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)28419-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)28419-x)
22. Engebrecht, J. Minipreps of plasmid DNA / J. Engebrecht, R. Brent, M. A. Kaderbhai // *Current protocols of molecular biology* / eds. F. M. Ausubel [et al.]. – Wiley, 2003. – Ch. 1.6. – P. 1.6.1.–1.6.2. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0106s15>
23. Motulsky, H. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting / H. Motulsky, A. Christopoulos. Oxford: Oxford University Press, 2004. – 351 p.
24. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite / S. Forli [et al.] // *Nat. Protocols.* – 2016. – V. 11, N 5. – P.905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>
25. 6GSS. Human glutathione s-transferase p1-1, complex with glutathione [Electronic resource] // RCSB Protein Data Bank. – Mode of access: <https://www.rcsb.org/structure/6gss>. – Date of access: 14.10.2016.
26. PubChem Compound Database [Electronic resource]. – Mode of access: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>. – Date of access: 28.01.2020.
27. Pedretti, A. VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. / A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli // *J. Mol. Graph. Model.* – 2002. – Vol. 21, N 1. – P. 47–49. [https://doi.org/10.1016/s1093-3263\(02\)00123-7](https://doi.org/10.1016/s1093-3263(02)00123-7)
28. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen [et al.] // *J. Comput. Chem.* – 2004. – Vol. 25, N 13. – P. 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
29. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
30. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
31. Shotgun analysis of membrane proteomes using a novel combinative strategy of solution-based sample preparation coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Y. Lin [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2012. – Vol. 901, N 1. – P. 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.035>
32. GSTP1 mRNA expression in human circulating blood leukocytes is associated with GSTP1 genetic polymorphism / E. Reszka [et al.] // *Clin. Biochem.* – 2011. – Vol. 44, N 13. – P. 1153–1155. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.05.024>
33. pTXB1 vector [Electronic resource] // BioLabs. – Mode of access: <https://international.neb.com/products/n6707-ptxb1-vector#Protocols,Manuals&Usage>. – Date of access: 28.01.2018.
34. Glutathione S-transferase P1: gene sequence variation and functional genomic studies / A. M. Moyer [et al.] // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, N 12. – P. 4791–4801. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6724>
35. Structure and function of the xenobiotic substrate-binding site and location of a potential non-substrate-binding site in a class π glutathione S-transferase / X. Ji [et al.] // *Biochemistry* – 1997. – Vol. 36, N 32. – P. 9690–9702. <https://doi.org/10.1021/bi970805s>.
36. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski [et al.] // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 1997. – Vol. 23, N 1–3. – P. 3–25. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
37. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates / D. F. Veber [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2002. – Vol. 45, N 12. – P. 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
38. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells / J. J. van Zanden [et al.] // *Biochem. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 67, N 8. – P. 1607–1617. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.12.032>
39. FDA-approved drugs and other compounds tested as inhibitors of human glutathione transferase P1-1 / Y. Musdal [et al.] // *Chem. Biol. Interact.* – 2013. – Vol. 205, N 1 – P. 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.06.003>
40. Zhang, X. Fluorometric method for the microdetermination of protein using indigo carmine / X. Zhang, F. Zhao, K. Li // *Microchem. J.* – 2001. – Vol. 68, N 1. – P. 53–59. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(00\)00177-6](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00177-6)

References

1. Wu B., Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2012, vol. 33, no. 12, pp. 656–668. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.007>
2. Kalina E. V., Chernov N. N., Novichkova M. D. Role of glutathione, glutathione reductase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*, 2014, vol. 79, no. 13, pp. 1562–1583. <https://doi.org/10.1134/s0006297914130082>
3. Townsend D. M., Tew K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 47, pp. 7369–7375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
4. Oakley A. J., Lo Bello M., Nuccetelli M., Mazzetti A. P., Parker M. W. The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *Journal of Molecular Biology*, 1999, vol. 291, no. 4, pp. 913–926. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3029>
5. Mathew N., Kalyanasundaram M., Balaraman K. Glutathione S-transferase (GST) inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2006, vol. 16, no. 4, pp. 431–444. <https://doi.org/10.1517/13543776.16.4.431>
6. Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., Federici L. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 2018, vol. 7, article no. 8. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>

7. Mannervik B., Guthenberg C. Glutathione Transferase (Human Placenta). *Methods Enzymology*, 1981, vol. 77, pp. 231–235. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)77030-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77030-7)
8. Awasthi Y. C., Singh S. V. Purification and characterization of a new form of glutathione S-transferase from human erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, vol. 125, no. 3, pp. 1053–1060. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(84\)91390-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)91390-1)
9. Gilevich S. N., Brechka Yu. V., Ripinskaya K. Yu. Preparation of highly active human erythrocyte glutathione-S-transferase P1-1 using affinity membranes, and properties of the purified enzyme. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2017, no. 2, pp. 66–79 (in Russian).
10. Chang M., Bolton J. L., Blond S. Y. Expression and purification of hexahistidine-tagged human glutathione S-transferase P1-1 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 1999, vol. 17, no. 3, pp. 443–448. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1149>
11. Wu Y., Shen J., Yin Z. Expression, purification and functional analysis of hexahistidine-tagged human glutathione S-transferase P1-1 and its cysteinyl mutants. *Protein Journal*, 2007, vol. 26, no. 6, pp. 359–370. <https://doi.org/10.1007/s10930-006-9043-2>
12. Kolm R. H., Stenberg G., Widersten M., Mannervik B. High-level bacterial expression of human glutathione transferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA. *Protein Expression and Purification*, 1995, vol. 6, no. 3, pp. 265–271. <https://doi.org/10.1006/prep.1995.1034>
13. Battistoni A., Mazzetti A. P., Petruzzelli R., Muramatsu M., Federici G., Ricci G., Lo Bello M. Cytoplasmic and periplasmic production of human placental glutathione transferase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 1995, vol. 6, no. 5, pp. 579–587. <https://doi.org/10.1006/prep.1995.1076>
14. Denisova A. S., Degtyareva M. B., Dem'yanchuk E. M., Simanova A. A. Synthesis of bifunctional ligands based on azaheterocycles and fragments of 12-crown-4. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2005, vol. 41, no. 11, pp. 1690–1693. <https://doi.org/10.1007/s11178-006-0020-1>
15. Kleineweischede A., Mattay J. Synthesis of amino- and bis(bromomethyl)-substituted bi- and tetradentate N-heteroaromatic ligands: building blocks for pyrazino-functionalized fullerene dyads. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006, vol. 2006, no. 4, pp. 947–957. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200500548>
16. Amer A. M., El-Bahnasawi A. A., Mahran M. R. H., Lapib M. On the synthesis of pyrazino[2,3-b]phenazine and 1H-imidazo[4,5-b]phenazine derivatives. *Chemical Monthly*, 1999, vol. 130, no. 10, pp. 1217–1225. <https://doi.org/10.1007/PL00010183>
17. Witzig T. E., Bossy B., Kimlinger T., Roche P. C., Ingle J. N. et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clinical Cancer Research*, 2002, vol. 8, no. 5, pp. 1085–1091.
18. Homo sapiens full open reading frame cDNA clone RZPDo834C083D for gene GSTP1, glutathione S-transferase pi; complete cds; without stopcodon. *The National Center for Biotechnology Information*. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/47496668> (accessed 19 April 2017).
19. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
20. Choi K. H., Groarke J. M., Young D. C., Rossmann M. G., Pevear D. C. et al. Design, expression, and purification of a Flaviviridae polymerase using a high-throughput approach to facilitate crystal structure determination. *Protein Science*, 2004, vol. 13, no. 10, pp. 2585–2692. <https://doi.org/10.1110/ps.04872204>
21. Walhout A. J., Temple G. F., Brasch M. A., Hartley J. L., Lorson M. A. et al. Gateway recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames ORFeomes. *Methods in Enzymology*, 2000, vol. 328, pp. 575–592. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)28419-x](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)28419-x)
22. Engebrecht J., Brent R., Kaderbhai M. A. Minipreps of plasmid DNA. Ausubel F. M. (ed.) [et al.] *Current protocols of molecular biology*. Wiley, 2003, ch. 1.6, pp. 1.6.1–1.6.2. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0106s15>
23. Motulsky H., Christopoulos A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*. Oxford University Press, 2004. 351 pp.
24. Forli S., Huey R., Pique M. E., Sanner M. F., Goodsell D. S. et al. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 2016, vol. 11, no. 5, pp. 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>
25. 6GSS. Human glutathione s-transferase p1-1, complex with glutathione. *RCSB Protein Data Bank*. Available at: <https://www.rcsb.org/structure/6gss> (accessed 14 October 2016).
26. *PubChem Compound Database*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed 28 January 2020).
27. Pedretti A., Villa L., Vistoli G. VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2002, vol. 21, no. 1, pp. 47–49. [https://doi.org/10.1016/s1093-3263\(02\)00123-7](https://doi.org/10.1016/s1093-3263(02)00123-7)
28. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M. et al. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>
29. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

30. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
31. Lin Y., Liu H., Liu Z., Wang X., Liang S. Shotgun analysis of membrane proteomes using a novel combinative strategy of solution-based sample preparation coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2012, vol. 901, no. 1, pp. 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.035>
32. Reszka E., Jabłonowski Z., Wiczorek E., Gromadzińska J., Sosnowski M. et al. GSTP1 mRNA expression in human circulating blood leukocytes is associated with GSTP1 genetic polymorphism. *Clinical Biochemistry*, 2011, vol. 44, no. 13, pp. 1153–1155. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.05.024>
33. pTXB1 vector. *BioLabs*. Available at: <https://international.neb.com/products/n6707-ptxb1-vector#Protocols,Manuals&Usage> (accessed 28 October 2018).
34. Moyer A. M., Salavaggione O. E., Wu T.-Y., Moon I., Eckloff B. W. et al. Glutathione S-transferase P1: gene sequence variation and functional genomic studies. *Cancer Research*, 2008, vol. 68, no. 12, pp. 4791–4801. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6724>
35. Ji X., Tordova M., O'Donnell R., Parsons J. F., Hayden J. B. et al. Structure and function of the xenobiotic substrate-binding site and location of a potential non-substrate-binding site in a class π glutathione S-transferase. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, no. 32, pp. 9690–9702. <https://doi.org/10.1021/bi970805s>
36. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, vol. 23, no. 1–3, pp. 3–25. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
37. Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H.-Y., Smith B. R., Ward K. W. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, vol. 45, no. 12, pp. 2615–2623. <https://doi.org/10.1021/jm020017n>
38. van Zanden J. J., Geraets L., Wortelboer H. M., van Bladeren P. J., Rietjens I. M. et al. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 2004, vol. 67, no. 8, pp. 1607–1617. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.12.032>
39. Musdal Y., Hegazy Y. M., Aksoy Y., Mannervik B. FDA-approved drugs and other compounds tested as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *Chemico-Biological Interactions*, 2013, vol. 205, no. 1, pp. 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.06.003>
40. Zhang X., Zhao F., Li K. Fluorometric method for the microdetermination of protein using indigo carmine. *Microchemical Journal*, 2001, vol. 68, no. 1, pp. 53–59. [https://doi.org/10.1016/S0026-265X\(00\)00177-6](https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00177-6)

Информация об авторах

Гилевич Сергей Нилович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gilevich@iboch.by

Бречко Юлия Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: julia-brechko@yandex.ru

Information about the authors

Syargey N. Gilevich – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, acad. Kuprevich str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gilevich@iboch.by

Yuliya V. Brechka – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, acad. Kuprevich str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: julia-brechko@yandex.ru