

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
Химический факультет

На правах рукописи

Чудин Андрей Алексеевич

Регуляция каталитических свойств галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi*
в системах обращённых мицелл

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н., доцент Кудряшова Е.В.

Москва – 2024

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ ОБ ФЛАВИН-ЗАВИСИМЫХ ОКСИДАЗАХ И ДЕГИДРОГЕНАЗАХ	12
1.1.1. ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ И ПРИРОДНЫЕ ФУНКЦИИ ФЛАВИН-ЗАВИСИМЫХ ОКСИДАЗ И ДЕГИДРОГЕНАЗ	12
1.1.2. ФЛАВИН-ЗАВИСИМЫЕ ОКСИДАЗЫ И ДЕГИДРОГЕНАЗЫ КАК ЛЕКАРСТВЕННЫЕ МИШЕНИ	23
1.2. МИЦЕЛЛЯРНЫЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ ФЕРМЕНТОВ	29
1.2.1. ОСНОВЫ МИЦЕЛЛЯРНОГО ПОДХОДА	29
1.2.2. ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ В ОБРАЩЁННЫХ МИЦЕЛЛАХ	32
1.3. ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗА ИЗ <i>Trypanosoma cruzi</i> И L-ГАЛАКТОНО-1,4-ЛАКТОНДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
1.3.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ	38
1.3.2. ИНГИБИТОРЫ ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ И L-ГАЛАКТОНО-1,4-ЛАКТОНДЕГИДРОГЕНАЗЫ	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	47
2.1. МАТЕРИАЛЫ	47
2.2. МЕТОДЫ	48
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	51
3.1. РАЗРАБОТКА ПОДХОДА К ИЗМЕРЕНИЮ АКТИВНОСТИ TcGAL и AtGALDH С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ ОБРАЩЁННЫХ МИЦЕЛЛ	51
3.2. ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЛИПИДНОЙ МАТРИЦЫ НА АКТИВНОСТЬ TcGAL и AtGALDH В СИСТЕМЕ ОБРАЩЁННЫХ МИЦЕЛЛ	61
3.2.1. ОЛИГОМЕРНЫЙ СОСТАВ AtGALDH В СИСТЕМЕ ОБРАЩЁННЫХ МИЦЕЛЛ АОТ	61
3.2.2. ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНЫХ ДОБАВОК И МИЦЕЛЛОБРАЗУЮЩЕГО ПАВ НА АКТИВНОСТЬ TcGAL И AtGALDH	65
3.3. ИНГИБИТОРНЫЙ АНАЛИЗ TcGAL И AtGALDH: ВЛИЯНИЕ ЛИКОРИНА	72
3.3.1. ОЦЕНКА ИНГИБИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛИКОРИНА В ОТНОШЕНИИ TcGAL	72
3.3.2. ЭФФЕКТ ИНГИБИРОВАНИЯ AtGALDH ЛИКОРИНОМ В ВОДНОЙ СРЕДЕ	73
3.3.3. ИНГИБИРОВАНИЕ AtGALDH И TcGAL ЛИКОРИНОМ В МИЦЕЛЛЯРНОЙ СРЕДЕ	76
3.4. ИНГИБИТОРЫ ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ ИЗ <i>Trypanosoma cruzi</i> НА ОСНОВЕ АЛЛИЛПОЛИАЛКОКСИБЕНЗОЛОВ И ИХ АНАЛОГОВ	79
3.4.1. ВЛИЯНИЕ АЛЛИЛПОЛИАЛКОКСИБЕНЗОЛОВ (АПАБ) И ИХ ТФФ-КОНЬЮГАТОВ НА АКТИВНОСТЬ TcGAL	79
3.4.2. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ КЛАССА АЛЛИЛБЕНЗОЛА И ЕГО АНАЛОГОВ НА АКТИВНОСТЬ TcGAL	88
3.4.3. ВЛИЯНИЕ ХАЛКОНОВ НА АКТИВНОСТЬ TcGAL	89

3.5. ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ АЛЛИЛПОЛИАЛКОКСИБЕНЗОЛОВ НА ОКСИДАЗНУЮ И ДЕГИДРОГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТИ TcGAL И AtGALDH	92
3.6. ЭФФЕКТОРЫ AtGALDH И TcGAL	100
3.6.1. КОЭНЗИМЫ Q1 И Q10 КАК ЭФФЕКТОРЫ AtGALDH	100
3.6.2. ВЛИЯНИЕ 1,4-БЕНЗОХИНОНА И ЕГО АНАЛОГОВ НА АКТИВНОСТЬ ПРИРОДНОЙ И МУТАНТНОЙ ФОРМ AtGALDH	104
3.6.3. ВЛИЯНИЕ 2,6-ДИМЕТОКСИ-БХ И ЕГО АНАЛОГОВ НА АКТИВНОСТЬ TcGAL ..	108
3.6.4. КВЕРЦЕТИН И ДИГИДРОКВЕРЦЕТИН КАК АКТИВАТОРЫ TcGAL	113
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	117
БЛАГОДАРНОСТИ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119

Список сокращений

АЛ – D-арабиноно-1,4-лактон

АОТ – натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты

АПАБ – аллилполиалкоксибензолы

АТМБ – аллилтетраметоксибензол

БХ – 1,4-бензохинон

2,6-диметокси-БХ – 2,6-диметокси-1,4-бензохинон

2,5-дигидрокси-БХ – 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон

ГЛ – L-галактоно-1,4-лактон

ДКЦ – дигидрокверцетин

ДРС – метод динамического рассеивания света

ДТТ – дитиотреитол

ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндифенол

ИК-спектроскопия Фурье – инфракрасная спектроскопия Фурье

КЦ – кверцетин

МЦД – метил-β-циклодекстрин

ПАВ – поверхностно-активные вещество

ТФФ – трифенилфосфоний

ТМФД – тетраметилфенилендиамин

ФМС – феназинметосульфат

ФХ – фосфатидилхолин

ФЭ – 1,2-диолеил-sn-глицерофосфоэтаноламин

ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид

ЭА – электроноакцептор

AtGALDH – L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana*

CoQ₀ – коэнзим Q₀

CoQ₁ – коэнзим Q₁

CoQ₁₀ – коэнзим Q₁₀

TcGAL – галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi*

VAO – ванилилалкогольоксидаза

Введение

Актуальность темы исследования. Мембранные ферменты играют важную роль в живых организмах, и изучение их свойств необходимо для детального понимания путей метаболизма, механизмов регуляции и других аспектов жизни. Однако исследование многих мембранных ферментов затруднено ввиду потери их каталитических свойств в водных растворах, что обуславливает необходимость применения мембраноподобных систем. В качестве таких систем часто используют обращённые мицеллы поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Обращённые мицеллы представляют ценный инструмент для исследования мембранных ферментов и анализа влияния олигомерного состава на каталитические характеристики ферментов. В литературе описано функционирование в мицеллярных системах ряда мембранных ферментов, например кислой фосфатазы и липоамиддегидрогеназы, однако механизмы влияния эффекторов (электроноакцепторов, активаторов и ингибиторов) на активность подобных ферментов требуют дальнейшего изучения.

Важным практическим направлением, связанным с мембранными ферментами, является поиск лекарственных мишеней-ферментов и разработка соответствующих лекарств. В настоящее время активно ведутся поиски лекарств против таких болезней как туберкулёз (молекулярная мишень – липоамиддегидрогеназа), и малярия (дигидрооротатдегидрогеназа).

Галактонолактонооксидаза из одноклеточного паразита *Trypanosoma cruzi* (TcGAL, EC 1.3.3.12), вызывающего болезнь Шагаса – мембранный фермент класса ванилилалкогольдегидрогеназ (VAO), катализирующий финальную стадию синтеза витамина С в *T. cruzi* – антиоксиданта, играющего важную роль для жизнеспособности *T. cruzi*, защищая её от воздействия активных форм кислорода в ходе проникновения в макрофаги хозяина. Поэтому TcGAL является перспективной лекарственной мишенью для лечения трипаносомной инфекции, вызывающей болезнь Шагаса. В настоящее время болезнью Шагаса страдают 7-8 млн человек, ещё 80 млн живут в зонах риска. Для лечения существует лишь два препарата (бензнидазол и нифуртимокс), которые недостаточно эффективны и обладают серьёзным побочным действием. В силу отсутствия галактонолактонооксидазы в организме человека соответствующий ингибитор может рассматриваться как потенциально селективное лекарство против трипаносомной инфекции. TcGAL (молекулярная масса 56,7 кДа) содержит кофактор

флавинадениндинуклеотид (FAD). Каталитический цикл FAD-зависимого TcGAL включает в себя две полу-реакции: восстановительную и окислительную, где в качестве электроноакцептора (ЭА) могут выступать как кислород (оксидазная активность), так и другие соединения (дегидрогеназная активность). TcGAL – оксидаза, которая проявляет также дегидрогеназную активность.

Фермент TcGAL не удастся получить методами генной инженерии в активной и растворимой форме – он образуется в неактивной и нерастворимой форме в виде «телец включения». В нашей лаборатории показано, что получить фермент в активной форме удастся, проводя его рефолдинг в системе обращенных мицелл. Исследование TcGAL осложняется тем, что не разработан эффективный метод определения его активности в мицеллярной системе. Для отработки методик исследования каталитических характеристик TcGAL мы использовали гомологичный фермент растительного происхождения L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназу из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) (Е.С. 1.3.2.3), AtGALDH получается в активной форме после экспрессии в *E. coli*. AtGALDH активен как в водном растворе, так и в мицеллярной системе. AtGALDH – митохондриальный флавофермент из VAO-семейства, имеет близкую к TcGAL молекулярную массу 58,8 кДа и катализирует ту же реакцию синтеза аскорбиновой кислоты в растениях из L-галактоно-1,4-лактона с использованием цитохрома C.

Однако, в отличие от TcGAL, AtGALDH практически не обладает оксидазной активностью (константа скорости реакции с молекулярным кислородом составляет $6 \cdot 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Наличие оксидазной активности у ферментов из VAO-семейства, то есть способность использовать в качестве ЭА кислород, может определяться наличием или отсутствием “привратника”, регулирующего доступ O_2 к кофактору флавины. В качестве “привратника” в случае дегидрогеназ VAO-семейства выступает остаток Ala113. Мутация A113G в AtGALDH создает пространство для молекулярного кислорода, который может достигать и взаимодействовать с локусом N5-C4a восстановленного кофактора FAD. Так, мутантная форма AtGALDH (A113G), в отличие от дикой, проявляет оксидазную активность, как и TcGAL, но при этом функционирует как в мицеллярной, так и в водной средах. AtGALDH и AtGALDH (A113G) в данной работе использовали как модельные ферменты для изучения влияния эффекторов и среды на дегидрогеназную и оксидазную активности.

Таким образом, исследование и регуляция каталитических свойств AtGALDH и TcGAL, с одной стороны, углубляет знания о таких аспектах функционирования мембранных ферментов как влияние эффекторов на каталитическую активность и её

зависимость от состава биомембран (мицеллярной матрицы), и, с другой стороны, позволяет вести целенаправленный поиск ингибиторов TcGAL (потенциальных лекарств против болезни Шагаса).

Степень разработанности темы. Методика определения активности AtGALDH в водной среде основана на спектрофотометрическом определении изменения концентрации цитохрома С или искусственного ЭА (1,4-бензохинона) в ходе реакции. Однако, при работе в обращенных мицеллах цитохром С денатурирует, а при использовании 1,4-бензохинона высока скорость побочных процессов. Ранее в нашей лаборатории была разработана методика рефолдинга TcGAL в обращённых мицеллах и определения активности TcGAL и AtGALDH с использованием 1,4-бензохинона в качестве ЭА. Определены pH-оптимумы TcGAL и AtGALDH. Ингибирование TcGAL и AtGALDH изучалось для ограниченного круга соединений, которые априори токсичны или не селективны (ионы тяжёлых металлов и тиол-модифицирующие агенты). Кроме того, данные по влиянию других эффекторов (активаторов, а также компонентов биомембраны, включая фосфолипиды) и ЭА на активность TcGAL и AtGALDH в литературе не встречаются. Кристаллическая структура AtGALDH, как и TcGAL, в настоящее время не установлена, но имеется теоретическая 3D-модель в базе данных «AlphaFold Protein Structure Database».

Цель исследования. Целью исследования является установление механизмов функционирования галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) в мембраноподобных системах и факторов, влияющих на активность данного фермента в сравнении с гомологичным ферментом, функционирующим в водной среде, L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH). Разработка подхода для проведения ингибиторного анализа позволит проводить поиск эффективных ингибиторов TcGAL для создания потенциального лекарства против болезни Шагаса.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработка надежной и эффективной методики определения активности TcGAL в мицеллярной системе, включая поиск наиболее эффективного электроноакцептора, устойчивого в мицеллярной системе и обеспечивающего высокую скорость ферментативной реакции, высокую чувствительность регистрации сигнала. Сравнительное исследование функционирования в мицеллярной и в водно-буферной системе модельного фермента, AtGALDH, катализирующего ту же реакцию, что и TcGAL, но способного функционировать в водном растворе для исключения эффекта специфического влияния мицелл.

2. Определение влияния состава мицеллярной матрицы (фосфолипидные добавки, природа и структура мицеллообразующего ПАВ) на функционирование TcGAL в сравнении с AtGALDH.

3. Исследование влияния потенциальных эффекторов: флавоноидов и производных 1,4-бензохинона на активность TcGAL и AtGALDH.

4. Разработка подхода для проведения ингибиторного анализа. Поиск эффективных ингибиторов TcGAL и AtGALDH, определение параметров ингибиторов, установление корреляции между структурой ингибиторов и их эффективностью; установление механизма действия ингибиторов TcGAL и AtGALDH.

5. Исследование влияния трифенилфосфониевого заместителя, обеспечивающего селективную доставку биологически активных веществ в митохондрии (за счёт отрицательного трансмембранного потенциала), на эффективность ингибирования TcGAL соединениями класса аллилполиалкоксибензолов.

6. Выявление молекулярных деталей действия ингибиторов, включая изучение степени влияния ингибиторов в отношении оксидазной и дегидрогеназной активностей TcGAL с использованием в качестве контрольных ферментов дегидрогеназу AtGALDH и её мутантную форму (Ala113Gly), которая, как и TcGAL, проявляет как дегидрогеназную, так и оксидазную активность.

Научная новизна. Предложена новая методика определения активности TcGAL и AtGALDH в воде и в мицеллах (АОТ в *n*-октане), основанная на спектрофотометрическом методе с использованием сочетания феназинметосульфата (электроноакцептор) и 2,6-дихлорфенолиндифенола (проявитель аскорбата – продукта реакции). Разработанная методика обладает существенными преимуществами по сравнению с описанными ранее на основе 1,4-бензохинона: высокой чувствительностью регистрации сигнала, отсутствием фона.

Охарактеризовано действие компонентов природных мембран – фосфолипидов (ФЛ) на активность TcGAL и AtGALDH: показано, что 5 % добавки фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина (% w/w) драматически меняют каталитический профиль обоих ферментов. Определены условия (степени гидратации мицелл), где наблюдается усиление активности ферментов. Полученный эффект может быть объяснён снижением плотности отрицательного заряда на границе раздела фаз за счёт положительного заряда амино-групп фосфолипидов, а также влиянием фосфолипидных добавок на структуру и жесткость

мицелл. Кроме того, согласно данным ИК-спектроскопии и поляризации флуоресценции возрастание активности ферментов связано с образованием белок-липидных комплексов.

Изучено действие природных ЭА дыхательной цепи в отношении TcGAL и AtGALDH: показано, что коэнзимы Q₁ и Q₀ могут выступать в качестве ЭА для обоих ферментов, в то время как Q₁₀ является слабым ингибитором AtGALDH. Обнаружено, что структурный аналог коэнзимов, 2,6-диметокси-бензохинон, является наиболее эффективным ЭА для TcGAL и может использоваться для измерения активности TcGAL в отсутствие вспомогательных компонентов (красителя). Установлено, что среди производных 1,4-бензохинона и коэнзимов Q наиболее эффективными являются соединения, несущие метокси-группы (коэнзим Q₀ и 2,6-диметокси-бензохинон).

Впервые найден и исследован ряд эффективных ингибиторов TcGAL и AtGALDH: ликорин и соединения класса терпеноидов (аллилполиалкоксибензолы, АПАБ). Значения IC₅₀ для АПАБ лежат в диапазоне 10-100 мкМ, при этом эффективность этих соединений возрастает при использовании их комплексов с метил-циклодекстрином, повышающим растворимость соединений. Идентифицированы структурные фрагменты (метилендиокси-группа и аллильный радикал), общие для ликорина и АПАБ, которые важны для проявления ингибирующего эффекта. Установлено, что АПАБ оказывают более сильный ингибирующий эффект в отношении оксидазной активности по сравнению с дегидрогеназной. Установлены механизмы ингибирования ферментов исследуемыми ингибиторами: ликорин действует преимущественно по конкурентному механизму, а апиол является неконкурентным ингибитором TcGAL.

Теоретическая и практическая значимость работы. Всестороннее изучение свойств гомологичных ферментов TcGAL и AtGALDH (влияние ЭА, ингибиторов, компонентов природной мембраны) способствует более детальному пониманию функционирования мембранных ферментов и открывает новые пути к регуляции их каталитических свойств.

Практическая значимость исследования состоит в открытии нового класса ингибиторов фермента TcGAL, являющихся потенциальными лекарствами. Идентификация структурных фрагментов, ответственных за ингибирование TcGAL, позволяет вести целенаправленный поиск новых ингибиторов TcGAL, являющегося потенциальной мишенью для лекарств против болезни Шагаса. Изучение влияния различных эффекторов на активность TcGAL также способствует лучшему пониманию функционирования фермента в микроорганизме. Кроме того, полученные результаты

расширяют возможности по поиску лекарственной основы против других болезней, поскольку гомологичные дегидрогеназы рассматриваются как терапевтические мишени для лечения ряда других схожих заболеваний (грибковых, бактериальных, а также вызываемых паразитическими микроорганизмами, например, малярии).

Методология и методы исследования. Для получения каталитически активной формы TcGAL проводили рефолдинг фермента в системе обращённых мицелл АОТ. Измерение активности TcGAL и AtGALDH проводили в системе обращённых мицелл АОТ с использованием комбинации электроноакцептора (феназинметосульфата) и красителя (2,6-дихлорфенолиндофенола). Для изучения влияния липидных компонентов и эффекторов на активность TcGAL и AtGALDH применены методы УФ-видимой спектрофотометрии, ИК-спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии и поляризации флуоресценции. Для исследования влияния природы ПАВ на размер образующихся мицелл и для установления олигомерного состава ферментов использовали методы динамического светорассеивания и седиментационного анализа. Для оценки целесообразности применения AtGALDH в качестве модельного фермента по отношению к TcGAL использовали методы биоинформатики (поиск последовательностей ферментов по базам данных и построение множественных выравниваний).

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработанная методика измерения активности AtGALDH и TcGAL с использованием обращённых мицелл АОТ характеризуется высокой чувствительностью регистрации сигнала и отсутствием фона.

2. Природа мицеллообразующего ПАВ влияет на олигомерный состав AtGALDH и TcGAL: в мицеллах на основе анионного АОТ наблюдается функционирование как мономерной, так и димерной форм фермента; в присутствии катионного ЦТАБ и нейтрального Бридж-96 ферменты функционируют в мономерной форме. Содержание фосфолипидов в составе мицеллярной матрицы значительно влияет на каталитические профили AtGALDH и TcGAL за счет изменения заряда поверхности раздела фаз и образования белок-липидных комплексов.

3. Коэнзимы Q₀, Q₁, 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон и 2,6-диметокси-1,4-бензохинон являются электроноакцепторами TcGAL и AtGALDH. Флавоноиды (кверцетин и дигидрокверцетин) являются активаторами TcGAL.

4. Соединения ряда аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) и ряда аллилбензола являются ингибиторами TcGAL с IC₅₀ = 10-100 мкМ. Аллильная и метокси- группы в

соединениях ряда АПАБ отвечают за усиление ингибирующего эффекта. TcGAL и AtGALDH ингибируются апиолом и ликорином по неконкурентному и конкурентному механизму ингибирования соответственно.

5. Конъюгирование АПАБ с трифенилфосфониевым фрагментом приводит к усилению их ингибиторной способности по сравнению с немодифицированными АПАБ.

6. АПАБ оказывают больший эффект в отношении оксидазной составляющей TcGAL по сравнению с дегидрогеназной, что обуславливает неполное ингибирование TcGAL соединениями АПАБ.

Личный вклад автора. Представленные в работе данные получены лично автором или при непосредственном участии автора на всех этапах комплексного исследования под руководством д.х.н. Кудряшовой Е.В. Автор самостоятельно изучил литературные данные и составил литературный обзор. Автор самостоятельно или при непосредственном участии выполнил все эксперименты, самостоятельно обработал и проанализировал полученные результаты. Автором проведена значительная работа над текстом статей и их представлением. Автор участвовал в переписке с редакторами и рецензентами. В работах, опубликованных в соавторстве, определяющий вклад принадлежит автору. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты диссертационной работы были представлены автором на российских и международных конференциях, в том числе Всероссийской конференции «Поверхностные явления в дисперсных системах» (2023, Москва, Россия), 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (2023, Суздаль, Россия), Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (2022, 2023, 2024, Москва, Россия), Международном конгрессе «Биотехнология: Состояние и перспективы развития» (2021, 2022, Москва, Россия), IX Международной конференции молодых ученых: вирусологов, биотехнологов, биофизиков, молекулярных биологов и биоинформатиков (2022, Новосибирск, Россия), 13-ой Международной конференции «Bionanotox» (2022, Греция), XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2022» (2022, Санкт-Петербург, Россия), Международного конгресса молодых ученых в фармации «Drug research» (2021, Казань, Россия), Всероссийской конференции «Липиды 2021» (2021, Москва, Россия).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", и 12 публикаций в сборниках материалов и тезисов докладов на конференциях.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Общие сведения об флавин-зависимых оксидазах и дегидрогеназах

1.1.1. Принцип действия и природные функции флавин-зависимых оксидаз и дегидрогеназ

Флавин-зависимые оксидазы – ферменты, играющие важную роль в живых организмах и находящие широкое практическое применение в таких областях, как электрохимия (в первую очередь, биосенсоры), биотехнология (производство антибиотиков), и в качестве лекарственных мишеней. Классификация и характеристика данного класса ферментов изложены в работах [1] и [2]. Однако следует заметить, что по своим свойствам оксидазы во многом сходны с дегидрогеназами, которые отличаются от оксидаз, в первую очередь, невозможностью использования кислорода как электроноакцептора (ЭА) (реакция не идет совсем или протекает крайне медленно). При этом оксидазы и дегидрогеназы могут относиться к одному и тому же семейству ферментов, например, к семейству ванилилалкогольоксидаз (VAO-семейство), как в случае гулонолактондегидрогеназы (EC 1.1.3.8) и холестеролоксидазы (EC 1.1.3.6) [3]. Более того, дегидрогеназы могут быть легко переведены в оксидазы при замене всего одной аминокислоты: так, в работе [4] замена Ala113→Gly привела к 400-кратному увеличению оксидазной активности L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (EC 1.3.2.3). Другой наглядный пример родства флавин-зависимых дегидрогеназ и оксидаз – ксантиноксидаза (EC 1.1.7.3.2), которая может быть обратимо переведена в ксантиндегидрогеназу (EC 1.1.7.1.4) за счёт разрыва дисульфидной связи между Cys535 и Cys 992 [5]. Учитывая вышесказанное, рассмотрение флавин-зависимых оксидаз вне контекста их родства с дегидрогеназами представляется неполным. Однако работы, в которых исследуется взаимосвязь этих классов, как правило, посвящены отдельным парам оксидаз и дегидрогеназ и, соответственно, носят частный характер.

Флавин-зависимые оксидазы и дегидрогеназы – ферменты, кофактором которых выступают флавины: флавинадениндинуклеотид (FAD) или флавинмононуклеотид (FMN). Каталитический цикл флавин-зависимых оксидаз и дегидрогеназ состоит из

восстановительной и окислительной полуреакций. В ходе восстановительной полуреакции происходит окисление основного субстрата – перенос гидридного эквивалента с сайта окисления на субстрате на азот в положении 5 кофактора флавина. Так, в случае фермента AtGALDH показано, что кофактор ФАД участвует в электрон-трансферной полу-реакции с переносом двух электронов [6], однако для ряда других ФАД зависимых оксидаз и дегидрогеназ наиболее вероятным механизмом данного переноса является прямой перенос гидрид-иона [7].

После окисления субстрата восстановленный флавин возвращается в исходное состояние за счет переноса электронов на соответствующий акцептор в ходе окислительной полуреакции (рис. 1).

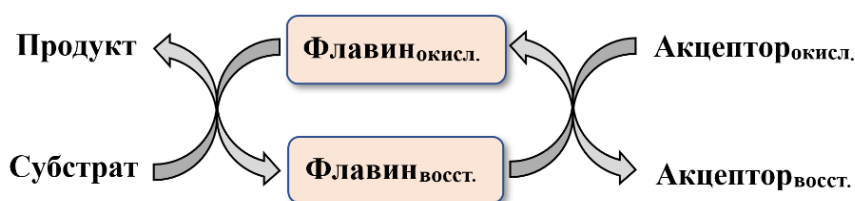


Рисунок 1. Каталитический цикл флавин-зависимых оксидаз и дегидрогеназ. Под акцептором на рисунке подразумевается акцептор электронов.

Оксидазы и дегидрогеназы могут катализировать одну и ту же реакцию, т.е. окисление одного и того же субстрата (например, L-галактоно-1,4-лактона), но используют разные акцепторы электронов: в случае оксидаз в качестве основного ЭА выступает кислород, в то время как дегидрогеназы практически не способны использовать кислород, и в их окислительных полуреакциях участвуют другие акцепторы, такие как 1,4-бензохинон (БХ), феназинметосульфат (ФМС), гексаамминерутений(III) и т.д. Причины такой избирательности в отношении ЭА будут рассмотрены далее.

Отмеченная выше избирательность флавин-зависимых оксидаз по отношению к O_2 приводит к образованию восстановленных форм кислорода, причем в большинстве случаев – токсичной перекиси водорода в качестве побочного продукта. Кроме того, при прямом восстановлении молекулярного кислорода электроны теряются и не могут быть использованы в последующих метаболических стадиях, как в случае дегидрогеназ. В силу вышеуказанных причин флавин-зависимые оксидазы – сравнительно редко встречающиеся ферменты [1].

Несмотря на разную распространенность в природе оксидаз и дегидрогеназ, оба класса ферментов выполняют множество важных функций в живых организмах. Оксидазы могут проявлять антибактериальную и антигрибковую активности [8], участвовать в

синтезе антиоксидантов [9], выполнять физиологические функции [10][11], регулировать клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз [12]. Среди важных функций дегидрогеназ следует выделить выработку энергии в клетках [13], продуцирование активных форм кислорода в тканях (челнок) [14], биоконверсию [15], опосредованное участие в синтезе ДНК [16]. Интересно отметить, что в некоторых процессах (например, в выработке энергии и биоконверсии) могут принимать участие как флаavin-зависимые, так и НАД-зависимые дегидрогеназы. Например, бактерии могут использовать молочную кислоту для синтеза пирувата, задействуя два типа лактатдегидрогеназ: NAD-зависимые и NAD-независимые [17]. Последние являются флаavin-зависимыми и, в свою очередь, могут быть подразделены на два типа в зависимости от используемого кофактора (FAD или FMN).

Все вышеперечисленные функции флаavin-зависимых оксидаз и дегидрогеназ более подробно представлены в табл. 1.

Таблица 1. Функции флаavin-зависимых оксидаз и дегидрогеназ и примеры процессов

Функция	Пример процесса	Фермент	Организм	Ссылка
Антибактериальная и антигрибковая	Синтез пероксида водорода	Глюкозооксидаза (EC 1.1.3.4)	Грибы и насекомые	[8]
Антиоксидантная	Синтез витамина С	Галактонолактонооксидаза (EC 1.3.3.12)	Трипаносомы	[9]
Физиологическая	Контроль уровня D-серина в головном мозге	Оксидаза D-аминокислот (EC 1.4.3.3)	Человек и млекопитающие	[10][11]
Регуляторная	Регулирование клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза	Альтернативная оксидаза (EC 1.10.3.11)	Растение <i>Arabidopsis thaliana</i>	[12]
Энергетическая	Цикл Кребса, электрон-транспортная цепь	Сукцинатдегидрогеназа (EC 1.3.5.1)	Бактерии и эукариоты	[13]
Биоконверсия	Превращение лигноцеллюлозной биомассы в сахара	Целлобиозодегидрогеназа (EC 1.1.99.18)	Растения	[15]
Продуцирование АФК	Синтез АФК в тканях (челнок)	Глицерол-3-фосфатдегидрогеназа (EC 1.1.5.3)	Млекопитающие	[14]
Опосредованное участие в синтезе ДНК	Расщепление глицина, генерирующего метилен-тетрагидрофолат для получения дезокситимидинмонофосфата	Липоамиддегидрогеназа (EC 1.8.1.4)	Организм-паразит <i>Trypanosoma brucei</i>	[16]

Спектр природных функций флавин-зависимых оксидаз и дегидрогеназ включает в себя как относительно простые процессы (например, синтез антиоксидантов), так и довольно сложные (опосредованное участие в синтезе ДНК). Наиболее хорошо изучены такие ферменты, как сукцинатдегидрогеназа (ЕС 1.3.5.1, участвует в дыхательной цепи), моноаминоксидазы (ЕС 1.4.3.4, катаболизм аминовых нейромедиаторов) и саркозиндегидрогеназа (ЕС 1.5.3.1, цикл Кребса, дыхательная цепь), локализованные в митохондриях [18].

Отметим, что ферменты, ответственные за протекание в паразитических организмах таких важных процессов, как синтез антиоксидантов, продуцирование энергии и синтез ДНК, рассматриваются как потенциальные лекарственные мишени. При этом желательно, чтобы в организме человека отсутствовали ферменты, выполняющие эту же функцию (гомологи). Например, дигидрооротатдегидрогеназа (ЕС 1.3.5.2), участвующая в биосинтезе *de novo* пиримидина (основного источника энергии для выживания малярийного паразита), рассматривается как возможная мишень для лекарств против малярии [19].

Факторы, определяющие оксидазную активность. Как указывалось выше, ключевое отличие оксидаз от дегидрогеназ – способность оксидаз использовать кислород в качестве ЭА (в случае дегидрогеназ реакция либо не идет, либо протекает медленно). Хотя в большинстве случаев при переходе от оксидаз к дегидрогеназам имеется тенденция к изменению предпочтений в отношении субстратов (и, соответственно, продуктов реакции) [20], представители обоих классов могут катализировать одну и ту же реакцию и/или принадлежать к одному семейству (рис. 2).

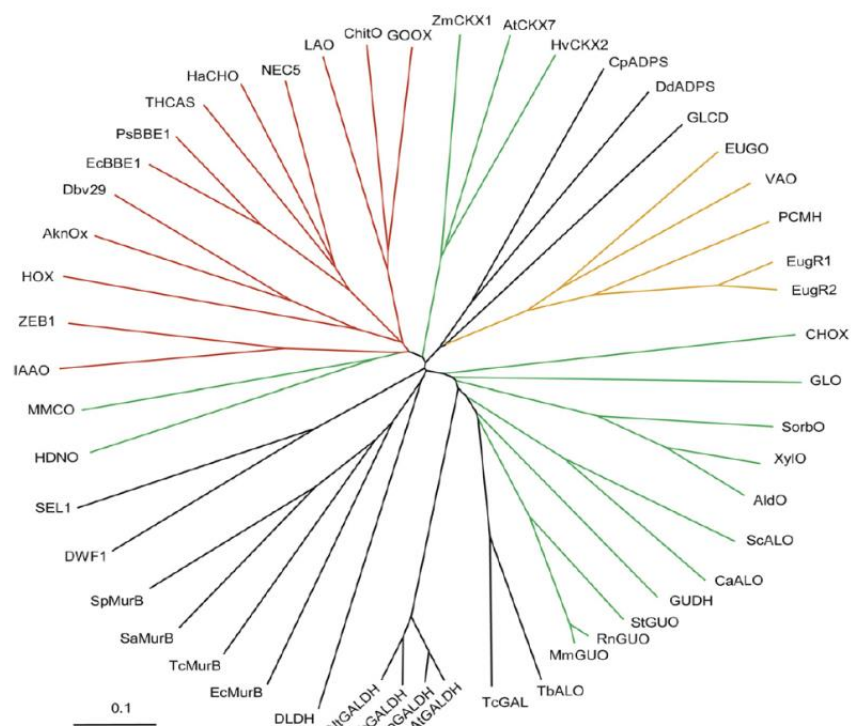


Рисунок 2. Филогенетический анализ представителей VAO-семейства. Филогенетическое дерево было построено из множественного выравнивания последовательностей ClustalX с использованием метода «присоединения соседей» [3].

Например, помимо оксидаз в VAO-семейство также входят четыре L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (GALDH, EC 1.3.2.3, нижняя ветвь на рис. 2), D-лактатдегидрогеназа (DLDH, EC 1.1.1.28) и гулонолактондегидрогеназа (GUDH, EC 1.1.3.8) [3]. Кроме того, значительное сходство активных центров галактонолактонооксидазы (EC 1.3.3.12) из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (EC 1.3.2.3) из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) позволяет использовать последнюю в качестве модельного фермента при изучении влияния эффекторов на TcGAL – потенциальную мишень для лекарств против болезни Шагаса [21].

Обозначенное выше сходство, позволяет исследователям во многих случаях легко осуществлять взаимное превращение дегидрогеназ и оксидаз заменой всего одной аминокислоты. В качестве наглядных примеров можно привести замену Ala113→Gly, превращающую L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназу (EC 1.3.2.3) в оксидазу, и замену Lys269→His, приводящую к утрате оксидазой фруктозиламинокислот (EC 1.5.3) способности использования кислорода (табл. 2). Это позволяет предположить, что наличие характерных аминокислотных остатков – главный фактор, регулирующий оксидазную активность.

Таблица 2. Взаимные превращения дегидрогеназ и оксидаз и соответствующие замены аминокислотных остатков.

Изменение оксидазной активности	Замены аминокислотных остатков	Комментарии	Ссылка
L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа→L-галактоно-1,4-лактонооксидаза	Ala113→Gly	–	[4]
Ксантиндегидрогеназа→ксантинооксидаза	Образование дисульфидной связи между Cys535 и Cys 992	Две формы одного белка в термодинамическом равновесии	[5]
Саркозиноксидаза→сарконзиндегидрогеназа	Lys265→(Ala, Gln, Met – один из остатков)	–	[22]
Оксидаза фруктозиламинокислот→дегидрогеназа фруктозиламинокислот	Lys269→His	–	[23]
Целлобиоздегидрогеназа→целлобиозоксидаза	Asn700→Ser	–	[24]
Фруктозилпептидилоксидаза→фруктозилпептидилдегидрогеназа	Asn47→Ala	–	[25]
Пиранозодегидрогеназа→пиранозооксидаза	His103→Tyr	Разрыв ковалентной связи с FAD	[26]
(2S)-Метилсукцинил-КоА-дегидрогеназа→(2S)-метилсукцинил-КоА-оксидаза	Trp315→Phe, Thr317→Gly и Glu377→Asn	Одновременно три замены	[27]
L-лактатоксидаза→L-лактатдегидрогеназа	Ala96→Leu и Asn212→Lys	Одновременно две замены	[28]

Как показано в работах [4],[5],[27],[29], принадлежность фермента к классу оксидаз или дегидрогеназ может определяться наличием или отсутствием “привратника”, регулирующего доступ кислорода к кофактору флавиину. В качестве “привратника” чаще всего выступает один остаток – так, например, в случае дегидрогеназ VAO-семейства такую роль играет Ala113 [4], а у (2S)-метилсукцинил-КоА-дегидрогеназы (EC 1.3.8.12) эту функцию выполняет Thr317 [27]. Следует отдельно выделить обратимое превращение ксантиндегидрогеназы (EC 1.17.1.4) в оксидазу, поскольку “ворота”, регулирующие доступ кислорода к активному центру, могут легко открываться и закрываться за счет разрыва или

образования дисульфидной связи между остатками Cys535 и Cys992, не требуя замен аминокислот [5]. Ксантиндегидрогеназа (ЕС 1.17.1.4) и ксантиноксидаза (ЕС 1.17.3.2), будучи двумя формами одного белка, фактически находятся в термодинамическом равновесии между собой с относительно низким энергетическим барьером между ними, что иллюстрирует особенно тонкую грань между некоторыми оксидазами и дегидрогеназами.

Кроме непосредственного доступа кислорода к кофактору флавину, контролируемого вышеописанными “воротами”, важную роль играет диффузия O_2 из растворителя в активный центр фермента. Учитывая, что молекулярный кислород имеет довольно гидрофобный характер, логично ожидать, что каналы доступа в ферменте должны быть выстланы гидрофобными остатками. Так, оксидазная активность холестеролоксидазы (ЕС 1.1.3.6) обусловлена наличием не только “ворот” (или “привратника”) [30], но и гидрофобного туннеля, соединяющего активный центр с внешней поверхностью белка [31]. Другой наглядный пример – исследования [32], которые не только продемонстрировали точное совпадение экспериментальных данных с компьютерной моделью гидрофобного канала в $F_{420}H_2$ -оксидазе (ЕС 1.5.3.22), но и показали, что такой канал присутствует во всех структурных гомологах фермента: например, NO-редуктазы из *Moorella thermoacetica*, рубредоксин:кислородоксидоредуктазы из *Desulfovibrio gigas* или флавин-двухжелезосодержащего белка из *Giardia intestinalis* (рис. 3) и что путь O_2 в них общий. Более того, гидрофобные остатки, выстилающие канал, очень хорошо сохраняются в метаногенах и могут быть распространены на другие двухъядерные оксидазы (содержащие два атома металла) [32].

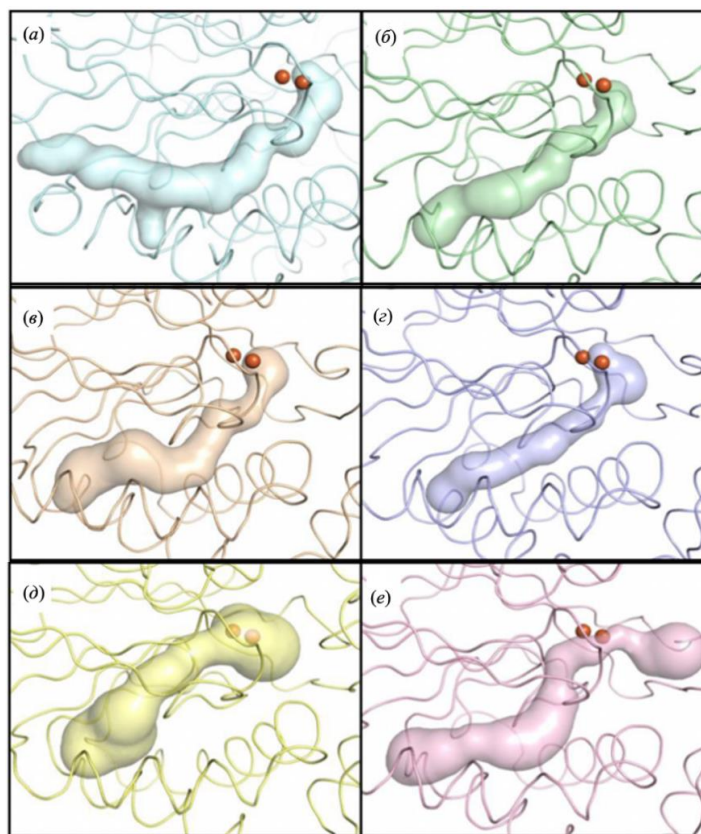


Рисунок 3. Каналы, идентифицированные с помощью программного обеспечения CAVER, в гомологах F₄₂₀H₂-оксидазы (FprA). Белки изображены в ленточном представлении. (a) – FprA из *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (mFprA); (б) – NO-редуктаза из *Moorella thermoacetica*; (в) – рубредоксин:кислородоксидоредуктаза из *Desulfovibrio gigas*; (г) – флавин-двухжелезосодержащий белок из *Giardia intestinalis*; (д) – флавин-двухжелезосодержащий белок из *Thermotoga maritima*; (е) – NO-редуктаза из *Escherichia coli* [32].

В литературе часто выделяют еще один возможный фактор – наличие остатка лизина вблизи азота в положении 5 флавина, что может обуславливать оксидазную активность ряда ферментов. Например, замена Lys265 на один из остатков Ala, Gln, Met приводит к падению оксидазной активности саркозиноксидазы (ЕС 1.5.3.1) более чем в 6000 раз [22], при этом фермент сохраняет способность окислять основной субстрат, т.е. превращается в дегидрогеназу. В случае FAD-зависимой N-метилтриптофаноксидазы (ЕС 1.5.3) замена консервативного остатка Lys259 рядом с азотом в положении 5 флавина также снижает оксидазную активность фермента более чем на три порядка [33]. Результаты, полученные авторами [33], убедительно свидетельствуют о том, что положительный заряд Lys259 играет центральную роль в селективной стабилизации комплекса окисленного фермента с анионом субстрата, и, кроме того, замена Lys259 на нейтральный остаток может снизить окислительно-восстановительный потенциал флавина, способствуя уменьшению оксидазной активности N-метилтриптофаноксидазы (ЕС 1.5.3). Однако заметим, что аналогичная замена лизина на нейтрально заряженные остатки в случае, например, дигидрооротатдегидрогеназы (ЕС 1.3.5.2), практически не влияет на оксидазную

активность фермента [34]. Авторы [35] также считают, что лизин возле азота в положении 5 флавина, являясь важным фактором для активации кислорода у некоторых оксидаз, по-видимому, не оказывает должного эффекта без дополнительных условий.

Электроноакцепторы флавин-зависимых дегидрогеназ: классификация и применение. Хотя оксидазы могут взаимодействовать с искусственными ЭА, такими как ФМС [36], фенотиазин [37] или ДХФИФ [38][39], данный класс ферментов в целом гораздо более активен в присутствии природного ЭА – кислорода, который обычно находится в достаточном количестве в окружающей среде. В связи с этим представляется целесообразным уделить внимание ЭА дегидрогеназ, обладающих гораздо меньшей избирательностью к ЭА по сравнению с оксидазами. Хотя дегидрогеназы, в отличие от оксидаз, как правило, не могут использовать кислород как ЭА, они способны задействовать в качестве ЭА целый спектр различных соединений, начиная от неорганических соединений (например, гексацианоферраты) и заканчивая белковыми молекулами (цитохром *c*). Богатый “арсенал” ЭА дегидрогеназ представляет интерес для таких практических областей, как создание биосенсоров и разработка новых методов определения активности ферментов, например, L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (EC 1.3.2.3) из *Arabidopsis thaliana* [21].

Все ЭА, используемые дегидрогеназами, можно разделить на четыре группы: белки, низкомолекулярные органические соединения, неорганические соединения и полимеры небиологического происхождения (табл. 3).

Таблица 3. Примеры известных электроноакцепторов флавин-зависимых дегидрогеназ

Класс электроноакцептора	Название электроноакцептора	Фермент	Ссылка
Белки	Цитохром <i>c</i>	Цитокининдегидрогеназа (EC 1.5.99.12)	[40]
		L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (EC 1.3.2.3)	[41]
	Плантацианин	Цитокининдегидрогеназа (EC 1.5.99.12)	[40]
Низкомолекулярные органические соединения	ФМС	Глюкозодегидрогеназа (EC 1.1. 99.10)	[42]
		Пролиндегидрогеназа (EC 1.5.5.2)	[43]
	2,2'-Азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфокислота)	Целлобиозодегидрогеназа (EC 1.1.99.18)	[44]
	Хиноны	Дигидрооротатдегидрогеназа (EC 1.3.5.2)	[19]

		L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (ЕС 1.3.2.3)	[41]
	Коэнзимы Q	Дигидрооротатдегидрогеназа (ЕС 1.3.5.2)	[45]
		L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (ЕС 1.3.2.3)	[46]
	ДХФИФ	Сукцинатдегидрогеназа (ЕС 1.3.5.1)	[47]
		Липоамиддегидрогеназа (ЕС 1.8.1.4)	[48]
Неорганические соединения	Гексаамминерутений(III)	Глюкозодегидрогеназа (ЕС 1.1. 99.10)	[42]
	Гексацианоферрат	Целлобиозодегидрогеназа (ЕС 1.1.99.18)	[44]
	Гексацианоферриат	Дигидролипоамиддегидрогеназа (ЕС 1.8.1.4)	[49]
		Глюкозодегидрогеназа (ЕС 1.1. 99.10)	[42]
Полимеры	Окислительно-восстановительный полимер осмия (Os-RP)	Пиранозодегидрогеназа (ЕС 1.1.99.29)	[50]
	Нафтохинон-функционализированный линейный полиэтиленимин (NQ-LPEI)	Глюкозодегидрогеназа (ЕС 1.1. 99.10)	[51]

Белки не только являются природными ЭА дегидрогеназ, но и играют важную роль в переносе электронов в таких биологических процессах, как окислительное фосфорилирование, фотосинтез, метаболические пути (например, цикл Кребса). Однако практическое использование белковых ЭА ограничено ввиду ряда причин, связанных, в том числе, с трудоемкой очисткой белков и сложностями при работе с такими ЭА (например, нанесение на электроды). Тем не менее, описано применение небольших белков в качестве ЭА для биосенсоров, например, цитохрома с для измерения активности целлобиозодегидрогеназы (ЕС 1.1.99.18) [52]. Преимущество использования белковых ЭА по сравнению с искусственными ЭА – их комплементарность по отношению к ферменту, что часто делает биосенсор более селективным. Кроме того, для применения *in vivo* вместо искусственных ЭА следует рассматривать именно белковые соединения, поскольку последние должны быть менее вредными для биологических систем [52].

Более широкое распространение получили низкомолекулярные органические ЭА, такие как ФМС, в основном используемые для спектрофотометрического определения

активности ферментов. Так, сочетание ФМС и красителя ДХФИФ за счет обесцвечивания последнего позволяет измерять активность пролиндегидрогеназы (ЕС 1.5.5.2) [43] (рис. 4(а)), L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (ЕС 1.3.2.3) [6] и галактонолактоноксидазы (ЕС 1.3.3.12) [21]. Другие известные ЭА – хиноны и структурные аналоги 1,4-бензохинона, например, коэнзим Q_1 , электроноакцептор L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (ЕС 1.3.2.3), который является переносчиком электронов в метаболических путях и играет важную роль в окислительном фосфорилировании в митохондриях [46]. Интересный пример – определение 1,5-ангидроглюцитола (маркер гликемического контроля у больных сахарным диабетом) с использованием фермента глюкозо-3-дегидрогеназы (ЕС 1.1.99.13) из спор *Halomonas* и тетразолиума-1 в качестве ЭА (рис. 4(б)) [53].

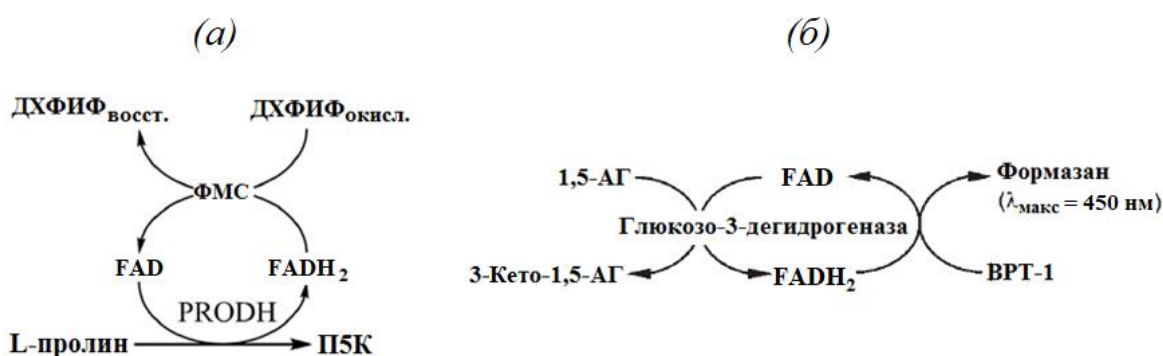


Рисунок 4. (а) – Каталитический цикл пролиндегидрогеназы (PRODH, ЕС 1.5.5.2), сопряженный с восстановлением ДХФИФ, где П5К – 1D-пирролин-5-карбоксилат (адаптировано из работы [43]); (б) – схема определения 1,5-ангидроглюцитола с помощью фермента глюкозо-3-дегидрогеназы (ЕС 1.1.99.13) и тетразолиума-1. Принятые сокращения: 1,5-АГ – 1,5-ангидроглюцитол, 3-кето-1,5-АГ – 3-кето-1,5-ангидроглюцитол, ВРТ-1 – водорастворимый тетразолиум-1 (адаптировано из работы [53]).

Третья группа ЭА – неорганические соединения, которые находят применение в тест-полосках коммерческих глюкометров, такие как гексаамминерутений(III) и гексацианоферриат калия [42]. Схожую роль выполняют полимерные ЭА, выступающие в роли переносчика электронов от биокатализатора к электроду. Например, окислительно-восстановительный нафтохинон-функционализированный линейный полиэтиленимин (NQ-LPEI) в сочетании с глюкозодегидрогеназой (ЕС 1.1. 99.10) из *Aspergillus* позволяет создать ферментативный биоанод, обеспечивающий большие каталитические плотности тока для опосредованного окисления глюкозы при относительно низком потенциале [51]. Другие хорошо изученные представители данного класса акцепторов – полимеры с применением осмия. Так, в работах [50][54] пиранозодегидрогеназа (ЕС 1.1.99.29) из *Agaricus meleagris* (AmPDH) использовалась в сочетании с окислительно-восстановительным полимером осмия (Os-RP, рис. 5) в качестве ЭА, чтобы

продемонстрировать потенциальную возможность применения AmPDH для создания амперометрических биосенсоров.

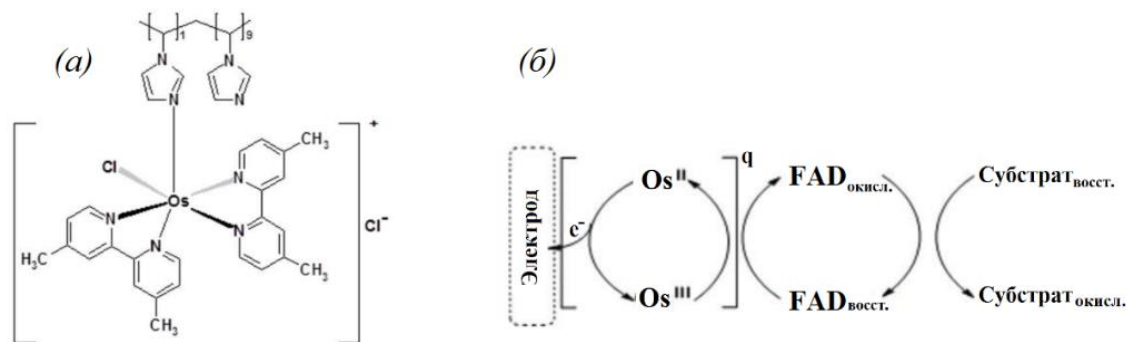


Рисунок 5. (a) – Структура полимера Os-RP [50]; (б) – каталитический цикл пиранозодегидрогеназы (EC 1.1.99.29) из *Agaricus meleagris* с использованием полимера осмия (адаптировано из работы [50]).

1.1.2. Флаavin-зависимые оксидазы и дегидрогеназы как лекарственные мишени

Следует отдельно выделить такое перспективное направление, как разработка лекарств, мишенью которых служат критически важные ферменты, включая оксидазы и дегидрогеназы. Некоторые из потенциальных лекарственных мишеней представлены в табл. 4.

Таблица 4. Флаavin-зависимые оксидазы и дегидрогеназы в качестве лекарственных мишеней.

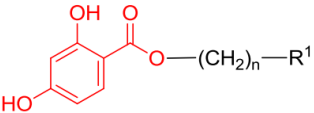
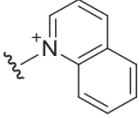
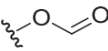
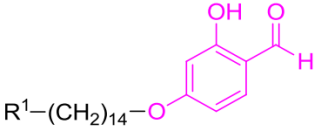
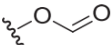
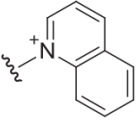
Болезнь	Фермент-мишень	Ингибитор	Комментарий	Ссылка
Различные виды рака (рак предстательной железы, рак легких, рак молочной железы и др.)	Моноаминоксидазы А и В (EC 1.4.3.4)	Халконы, флавоноиды, кумарины и др.	Разработана фармакологическая модель	[55]
Малярия	Дигидрооротатдегидрогеназа (EC 1.3.5.2)	Лефлуномиды	—	[19]
		Фенилзамещенные триазолопиримидины	Показана эффективность на мышцах	[56]
Болезнь Шагаса	Дигидролипоамиддегидрогеназа	2,3-Дифенил-1,4-нафтохинон	Показана эффективность	[57]

	(EC 1.8.1.4)		<i>in vitro</i> и на мышах	
Африканский трипаносомоз	Альтернативная оксидаза (EC 1.10.3.11)	Производные 4-гидроксibenзоата и 4-алкоксибензальдегида	Предполагаемая мишень	[58]
Шизофрения	Оксидаза D-аминокислот (EC 1.4.3.3)	Хлорпромазин и рисперидон	—	[59]
Гиперурикемия*	Ксантинооксидаза (EC 1.17.3.2)	Аллопуринол, фебуксостат, топироксостат	Уже используются в качестве препаратов, снижающих уровень мочевой кислоты	[60]

* Клинический симптом.

Особенно актуальными представляются исследования таких инфекционных заболеваний, против которых существует ограниченное число препаратов, таких как, например, Африканский трипаносомоз, вызываемый микроорганизмом *Trypanosoma brucei*. Цель подобных исследований – поиск новых лекарственных мишеней-ферментов и соответствующих ингибиторов, обладающих селективностью и безопасных для организма человека. Фермент-мишень должен, с одной стороны, выполнять витальную функцию в инфекционном агенте и, с другой стороны, по возможности отсутствовать в организме человека, чтобы обеспечить селективность действия. В случае, например, Африканского трипаносомоза, в роли такой мишени рассматривают альтернативную оксидазу (ТАО) катализирующую реакцию окисления убихинола-1 до убихинона-1, а в качестве перспективной основы для лекарств – производные 4-гидроксibenзоата и 4-алкоксибензальдегида, ингибирующие ТАО при низких концентрациях (вплоть до нескольких нМ, табл. 5) [58].

Таблица 5. Характеристики некоторых ингибиторов альтернативной оксидазы из *T. brucei* (TAO) [58].

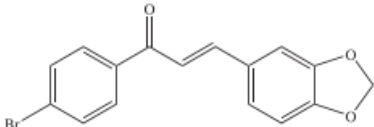
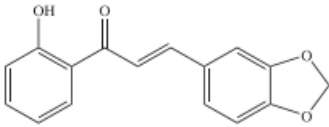
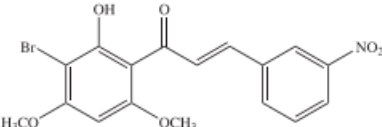
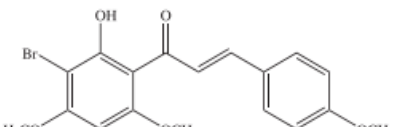
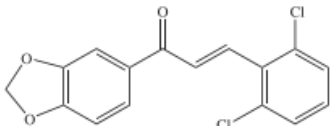
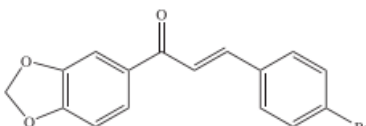
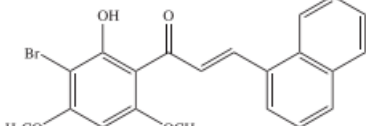
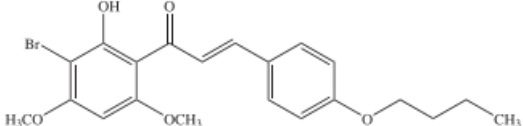
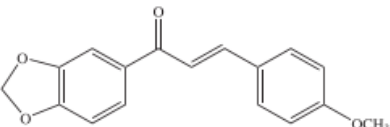
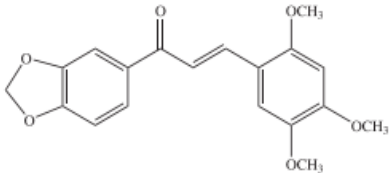
Производные 4-гидроксибензоата			
Структура	n	R ¹	IC ₅₀ , мкМ
	14		1,36 ± 0,06
	12	Br	0,0174 ± 0,0018
	16		0,0144 ± 0,0012
Производные 4-алкоксибензальдегида			
Структура	R ¹		IC ₅₀ , мкМ
	Br		0,073 ± 0,011
			0,33 ± 0,02
	+PPh ₃		0,22 ± 0,01
			1,23 ± 0,02

Другим важным примером является болезнь Шагаса, вызываемая одноклеточным паразитом *Trypanosoma cruzi*, для лечения которой на сегодняшний день используются всего два препарата – бензнидазол и нифуртимокс, при этом оба препарата обладают серьезными побочными эффектами [61]. В случае болезни Шагаса в качестве фермента-мишени рассматривается галактонолактонооксидаза (TcGAL) (EC 1.3.3.12). Этот фермент, катализирующий синтез витамина С в *T. cruzi*, отсутствует в организме человека, при этом *T. cruzi* не может поглощать витамин С извне, поэтому галактонолактонооксидаза (EC 1.3.3.12) – перспективная мишень для анти трипаносомных лекарств [21].

В качестве предполагаемых ингибиторов TcGAL могут рассматриваться, например, халконы – природные соединения растительного происхождения. Так, показано, что ряд халконов из гречишника *Polygonum salicifolium* проявляют анти трипаносомную активность [62] и потенциально применимы для лечения целого ряда трипаносомных инфекций. Следует отметить низкие значения IC₅₀ халконов: так, 2',4'-дигидрокси-6'-метоксихалконы подавляют рост *T. cruzi* в концентрации 20 мкМ и менее [63]. Выраженный анти трипаносомный эффект наблюдается не только у природных, но и у синтетических

халконов ($IC_{50} = 20-80$ мкМ, табл. 6) [64], однако механизм их действия пока не установлен и может быть связан с ингибированием жизненно важных ферментов (например, TcGAL).

Таблица 6. Характеристики некоторых халконов, обладающих анти-трипаносомным эффектом в отношении *T.cruzi* [64].

Структура	IC_{50} , мкМ	Структура	IC_{50} , мкМ
	20		> 100
	45		20
	20		30
	37		82
	35		25

Другой возможной основой для лекарства против болезни Шагаса являются эвгенол, подавляющий рост *T.cruzi* в концентрации 50 мкМ [65], а также его производные (включая изоэвгенол), обладающие не только антитрипаносомной, но и антилейшманиальной активностями в диапазоне концентраций 10-40 мкМ [66]. Авторы [65] также отмечают, что эвгенол и его производные обладают различной эффективностью в отношении разных форм развития трипаносом: так, наиболее эффективными в отношении трипомастиготы оказываются производные изоэвгенола, в то время как амостигота ингибируется ванилином и его ацетил-производным (рис. 6).

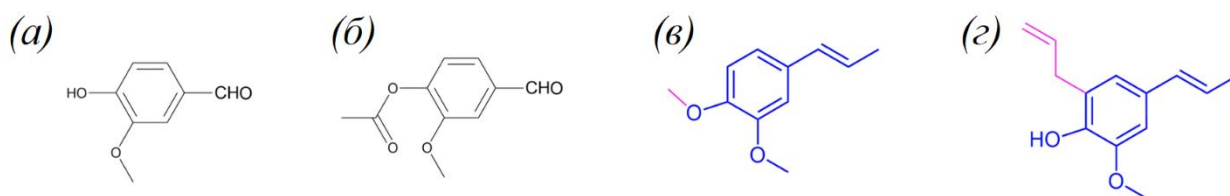


Рисунок 6. Структуры ванилина (а) и его производного ((4-формил-2-метоксифенил)ацетата, (б)) и производных эвгенола (1,2-диметокси-4-[(Е)-проп-1-енил]бензол (в) и 2-аллил-6-метокси-4-[(Е)-проп-1-енил]фенол (г)) [65].

Примечательно, что синтез витамина С (или его аналогов) в других организмах осуществляется ферментами, родственными TcGAL (табл. 7), причем реакцию могут катализировать как оксидазы (например, D-арабиноно-1,4-лактонооксидаза в грибах, ЕС 1.1.3.37), так и дегидрогеназы (L-гулоно-1,4-лактондегидрогеназа у бактерий, ЕС 1.1.3.8). Это, с одной стороны, позволяет разрабатывать не только антитрипаносомные, но и, например, антибактериальные препараты, мишенью которых является L-гулоно-1,4-лактондегидрогеназа (разумеется, в случае неспособности бактерии поглощать витамин С извне). С другой стороны, столь высокое сходство ферментов, ответственных за синтез витамина С, требует тщательного изучения селективности потенциальных лекарств.

Таблица 7. Ферменты, катализирующие финальную стадию синтеза L-аскорбиновой кислоты и ее аналогов в различных организмах.

Организм	Субстрат	Фермент	Продукт
Животные (многоклеточные)	L-гулоно-1,4-лактон	GULO	L-аскорбиновая кислота
Растения	L-галактоно-1,4-лактон	GALDH	L-аскорбиновая кислота
Дрожжи (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	L-арабино-1,4-лактон	ALO	D-эритроаскорбиновая кислота
Грибы	L-арабино-1,4-лактон	ALO	D-эритробовая кислота
Простейшие	L-галактоно-1,4-лактон L-арабино-1,4-лактон	GAL	D-эритроаскорбиновая кислота
Бактерии (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)	L-гулоно-1,4-лактон	GUDH	L-аскорбиновая кислота

Примечание: GULO – L-гулонолактонооксидаза, GALDH – L-галактонолактондегидрогеназа, ALO – D-арабиноно-1,4-лактонооксидаза, GAL – L-галактонолактонооксидаза, GUDH – L-гулоно-1,4-лактондегидрогеназа.

Следует отметить, что некоторые дегидрогеназы могут использоваться как модельные ферменты по отношению к оксидазам. Например, L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа (ЕС 1.3.2.3) из *Arabidopsis thaliana* и галактонолактонооксидаза (ЕС 1.3.3.12) из *Trypanosoma cruzi*, обладая невысокой гомологией в целом, имеют общие аминокислотные остатки в активном центре. Учитывая, что галактонолактонооксидаза (ЕС 1.3.3.12) – фермент, требующий поверхности раздела фаз (липидную матрицу) для

полноценного функционирования, представляется логичным проведение предварительных экспериментов с водорастворимой L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназой (ЕС 1.3.2.3) как модельным белком [21].

Ввиду большей распространенности дегидрогеназ в природе по сравнению с оксидазами [1] логично ожидать, что в случае инфекционных заболеваний мишенями чаще выступают именно дегидрогеназы (малярия, болезнь Шагаса, сонная болезнь и др.). В то же время действие потенциальных лекарств против болезней, вызванных нарушениями в работе организма, может заключаться в подавлении активности оксидаз. Так, моноаминоксидазы (ЕС 1.4.3.4) катализируют катаболизм аминных нейромедиаторов и, как следствие, считаются привлекательными лекарственными мишенями при терапии неврологических расстройств, включая болезни Паркинсона и Альцгеймера [67], а также рассматриваются как потенциальные мишени для противоопухолевых препаратов [55]. Другой важный пример – оксидаза D-аминокислот (ЕС 1.4.3.3), регулирующая концентрацию D-серина и обладающая повышенной активностью у пациентов, страдающих шизофренией. Ингибирование активности оксидазы D-аминокислот считается одним из главных направлений в поисках лекарств против шизофрении, и, более того, в отношении названной оксидазы уже ведутся клинические и доклинические исследования [68].

С точки зрения характеристик самих ингибиторов наибольшее внимание уделяется “токсичности” изучаемых соединений, их IC_{50} в отношении целевого фермента и, реже, механизму их действия (конкурентный, неконкурентный, смешанный). Один из наиболее известных ингибиторов, уже применяемых как лекарство, – это моклобемид, подавляющий активность моноаминоксидазы А (ЕС 1.4.3.4) и используемый для терапии депрессии, болезни Паркинсона и других неврологических заболеваний [59]. Моклобемид обладает низкой токсичностью и невысоким значением $IC_{50} = 6$ мкМ в отношении моноаминоксидазы А, при этом в настоящее время изучаются ингибиторы, в 200 раз более эффективные, такие как 4-метилпиперазинил, действующие по конкурентному механизму [69]. В качестве примера потенциального антиинфекционного лекарства можно привести 2,3-дифенил-1,4-нафтохинон, ингибирующий липоамиддегидрогеназу (ЕС 1.8.1.4) из *T. cruzi*. Данный ингибитор также действует по конкурентному механизму [57]. Далее авторы [70] синтезировали серию производных 1,4-нафтохинона и провели скрининг этих соединений на мышах. Хотя модификации 1,4-нафтохинона в ряде случаев приводили к увеличению токсичности, и эффективность этих соединений была невысокой, результаты, изложенные в работе [70], позволяют вести более целенаправленный поиск потенциальных лекарств против болезни Шагаса на основе производных 1,4-нафтохинона и др. [71].

Следует отметить, что в литературе вопрос о механизме действия ингибиторов в отношении флавин-зависимых дегидрогеназ и оксидаз освещается недостаточно широко. Однако имеющиеся литературные данные, включая обзор [72], посвященный терапевтическому применению конкурентных ингибиторов, говорят о конкурентном механизме как о наиболее предпочтительном в контексте медицинского применения ингибиторов флавин-зависимых оксидаз и дегидрогеназ.

1.2. Мицеллярный подход к изучению ферментов

1.2.1. Основы мицеллярного подхода

Основы мицеллярного подхода берут своё начало в 1943 году, когда Хоар и Шульман впервые предложили концепцию обращённой мицеллы, назвав её «олеопатической гидромицеллой» [73]. Впоследствии было обнаружено, что многие липазы сохраняют высокую активность и даже проявляют «суперактивность» при их включении в обращённые мицеллы [74][75]. Затем в 1977 году впервые была продемонстрирована возможность солюбилизации других ферментов с помощью обращённых мицелл [76] на примере α -химотрипсина, который, как оказалось, может растворяться в органическом растворителе, содержащем ПАВ в системах с крайне низким содержанием воды. В том же году Мартинек К. и его коллеги провели первое исследование каталитической активности пероксидазы и химотрипсина, инкапсулированных в гидратированные обращённые мицеллы, образуемые АОТ [77], что способствовало многочисленным исследованиям в области мицеллярной энзимологии. Отметим, что природные мембраны содержат небислойные липидные структуры (т.н. липидные частицы), построенные по типу обращённых мицелл, заключённых между монослоями двухслойной мембраны (рис. 7) [78]. Таким образом, использование обращённых мицелл позволяет моделировать «биомембранные» условия, в которых соответствующие ферменты функционируют *in vivo*.

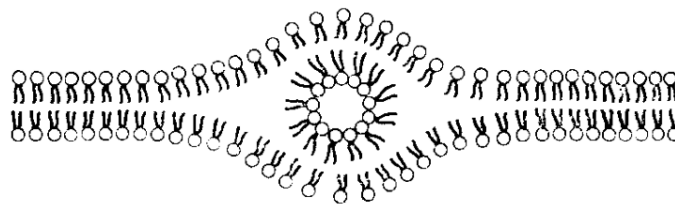


Рисунок 7. Схематическое изображение липидной частицы, заключённой между монослоями бислойной мембраны [78].

В общем случае обращённые мицеллы представляют собой ассоциаты молекул ПАВ, внутренняя часть которых образована полярными «головами», а внешний слой — углеводородными «хвостами» этих молекул (рис. 8) [79].

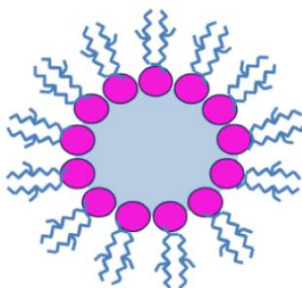


Рисунок 8. Схематическое изображение обращённой мицеллы [79].

Такие мицеллы самопроизвольно образуются в тройной системе, содержащей ПАВ, воду и неполярный органический растворитель. При этом следует учесть, что молекулы ПАВ способны образовывать самые различные надмолекулярные структуры в зависимости от концентрации ПАВ в системе ПАВ-вода-растворитель. Соответственно образование обращённых мицелл происходит только в определённом интервале концентраций ПАВ (рис. 9) [79].

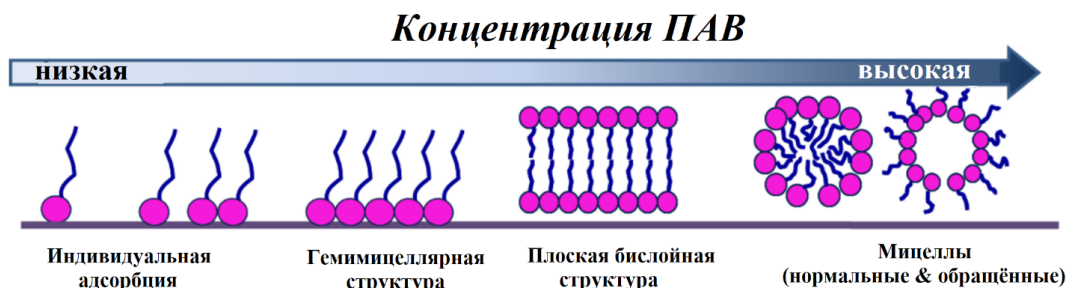


Рисунок 9. Влияние концентрации ПАВ на типичные структуры, образующиеся на границе раздела вода-растворитель (рисунок адаптирован из [79]).

При низких концентрациях молекулы ПАВ существуют в растворе в свободной форме или располагаются на границе раздела фаз по отдельности, при этом поверхностное натяжение изменяется незначительно. Увеличение концентрации ПАВ сопровождается локализацией большего количества молекул на границе раздела фаз и значительного снижения поверхностного натяжения раствора. Эта тенденция сохраняется до тех пор, пока поверхность раздела фаз не станет насыщенной и не начнётся образование мицелл, при этом поверхностное натяжение будет меняться (рис. 9). Минимальная концентрация ПАВ, необходимая для образования мицелл, называется критической концентрации

мицеллообразования (ККМ). Она представляет собой концентрацию свободных или агрегированных молекул ПАВ, находящихся в равновесии с образующими мицеллы, и характерна для каждого ПАВ и тройной системы [80].

В случае обращённых мицелл ключевым параметром является размер внутренней полости, в которой могут быть инкапсулированы белковые молекулы. Размер этой полости можно строго регулировать, варьируя степень гидратации ПАВ (W_0), определяемую как молярное соотношение воды и ПАВ (рис. 10).

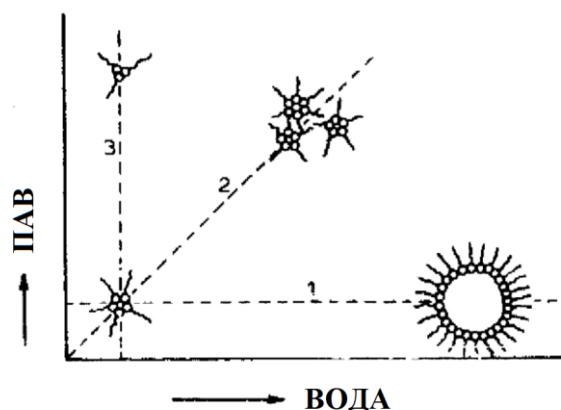


Рисунок 10. Влияние содержания воды и ПАВ на систему обращенных мицелл. (1) – концентрация ПАВ постоянна, $[H_2O]$ увеличивается (степень гидратации W_0 увеличивается): размер мицелл увеличивается, количество мицелл уменьшается; (2) – $[ПАВ]$ и $[H_2O]$ увеличиваются в равной пропорции (значение W_0 постоянно): размеры мицелл остаются постоянными, количество мицелл увеличивается; (3) – $[ПАВ]$ увеличивается, $[H_2O]$ остается постоянным (значение W_0 снижается): размеры мицелл уменьшаются, количество мицелл увеличивается (рисунок адаптирован из [81]).

Варьирование размера полости (т.е. изменение значения W_0) позволяет получить желаемую супрамолекулярную форму белка или его комплексов. Другими словами, мицеллярный подход обеспечивает модуляцию олигомерного состава ферментов, что продемонстрировано для ряда ферментов разных классов [82][83][84]. Кроме получения желаемой олигомерной формы фермента, мицеллярный подход является перспективным для рефолдинга крупных гидрофобных, мультидоменных, мультисубъединичных белков или белков с высоким содержанием дисульфидных мостиков. Действительно, в обращённых мицеллах каждая молекула фермента локализована в индивидуальном компартменте (мицелле), что сводит к минимуму возможность возникновения побочных реакций, таких как агрегация, формирование ненативных дисульфидных мостиков и т.д. Таким образом, обращённые мицеллы являются полезным инструментом для получения нативной конформации многих ферментов и изучения их олигомерных форм.

1.2.2. Функционирование ферментов в обращённых мицеллах

Профиль зависимости каталитической активности от степени гидратации W_0 , как правило, имеет колоколообразный вид. Оптимум активности наблюдается при степенях гидратации W_0 , при которых размер мицеллы соответствует размеру инкапсулированного белка. Считается, что тесный контакт ПАВ с ферментом способствует поддержанию последнего в каталитически активной конформации [48]. Такой контакт может осуществляться при различных расположениях фермента по отношению к границе раздела фаз – в зависимости от природы белка (гидрофильный, поверхностно-активный или гидрофобный) (рис. 11) [85].

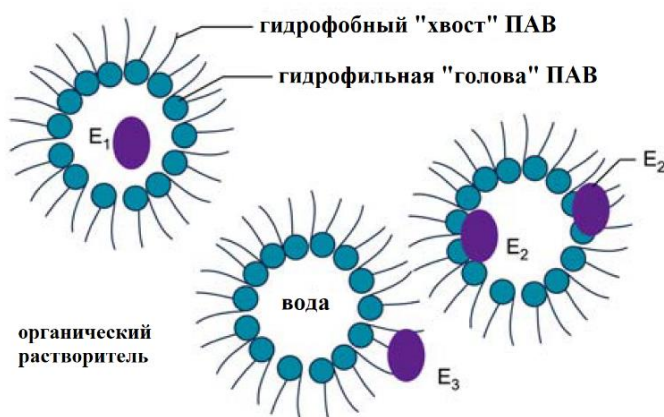


Рисунок 11. Схематическое изображение фермент-содержащей обращённой мицеллы, где E1 - гидрофильный, E2 - поверхностно-активный и E3 - гидрофобный фермент соответственно (рисунок адаптирован из [85]).

При этом молекула белка может сама “выбирать” соответствующее ее природе микроокружение [78]. Как показано на рис. 11, молекула гидрофильного белка избегает прямого контакта как с органическим растворителем, так и с поверхностью внутренней полости мицеллы, локализуясь в водном ядре гидратированной обращенной мицеллы. Поверхностно-активные белки, например липазы, имеют возможность взаимодействовать с поверхностным слоем обращенной мицеллы или даже частично в него погружаться [86]. И, наконец, типичные мембранные ферменты, если это термодинамически выгодно, могут вступать в контакты с органическим растворителем [87].

В случае олигомерных ферментов наблюдается несколько оптимумов каталитической активности. Каждой олигомерной форме соответствует свой оптимум активности. Например, в случае липоамиддегидрогеназы из сердца свиньи (LADH) два пика активности ($W_0 = 19$ и 38) отвечают димеру и тетрамеру (рис. 12 (б)) [48].

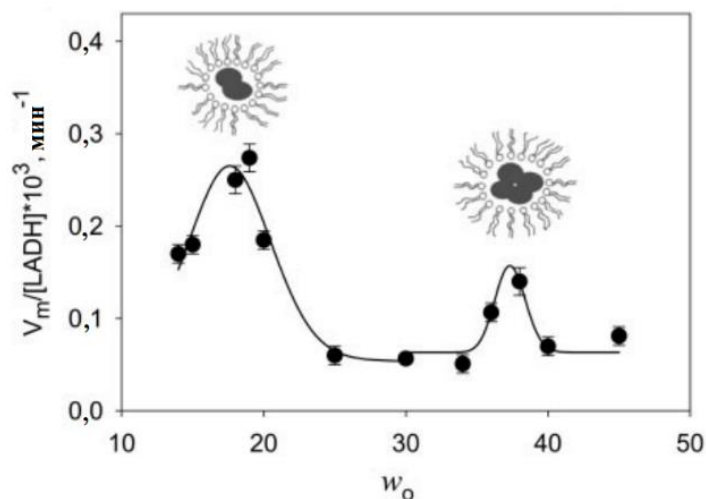


Рисунок 12. Каталитический профиль LADH в системе обращённых мицелл 0,1 М АОТ в н-октане (адаптировано из работы [48]).

Влияние липидов на активность ферментов. Подчёркнём, что представленный на рис. 12 профиль активности получен в тройной системе ПАВ-вода-растворитель (где ПАВ – это АОТ, а растворитель – н-октан). Однако природная мембрана содержит множество различных компонентов. Так, клеточная мембрана в основном состоит из липидных молекул [88], значительную часть которых составляют фосфолипиды, способные оказывать существенное влияние на активность ферментов. Например, авторы [83] продемонстрировали, что добавление всего 2 % фосфатидилинозитола (ФИ) (% масс. от общей массы растворённых ПАВ и липида) к мицеллам АОТ в н-октане драматическим образом меняет профиль каталитической активности кислой фосфатазы: наблюдается смещение оптимумов активности в сторону больших значений W_0 и появление нового максимума, то есть образование тетрамера, отсутствующего в мицеллах АОТ (рис. 13).

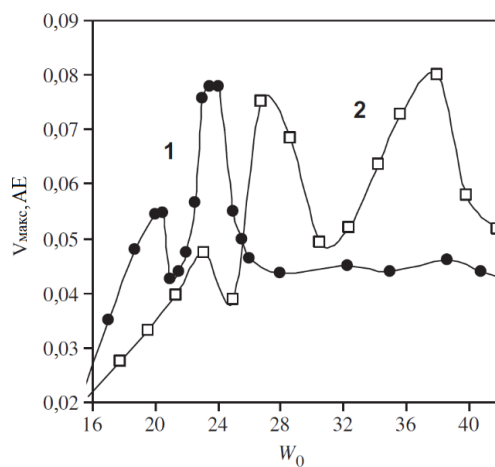


Рисунок 13. Зависимость каталитической активности кислой фосфатазы от степени гидратации W_0 в обращённых мицеллах 0,1 М АОТ в н-октане без добавок (**кривая 1**) и с добавлением 2% (по массе) ФИ (**кривая 2**) (рисунок адаптирован из [83]).

Вышеописанное влияние ФИ на активность кислой фосфатазы можно объяснить образованием комплекса между липидом и ферментом, что приводит к увеличению эффективного размера белка и, соответственно, сдвигу профиля активности фермента в сторону более высоких степеней гидратации W_0 [83].

Кроме образования белок-липидных комплексов, добавление липидов может вызывать дефекты в структуре мицелл ПАВ и влиять на их радиус. Так, фосфатидилхолин (ФХ), обладая объёмной полярной «головной» группой (рис. 14 (а)), склонен к образованию ламеллярных структур (рис. 14 (б)) [88]. Как следствие, добавление ФХ (5-10 % по массе) к мицеллам АОТ приводит одновременно к уменьшению радиуса мицеллы и увеличению размера внутренней полости мицелл АОТ (рис. 14 (в)) [83], что приводит к снижению активности фермента при всех степенях гидратации W_0 .

Таким образом, варьирование липидного состава позволяет регулировать активность мембранных ферментов за счёт образования липид-ферментных комплексов, изменения структуры и жёсткости мембран и формирования различных кластеров.

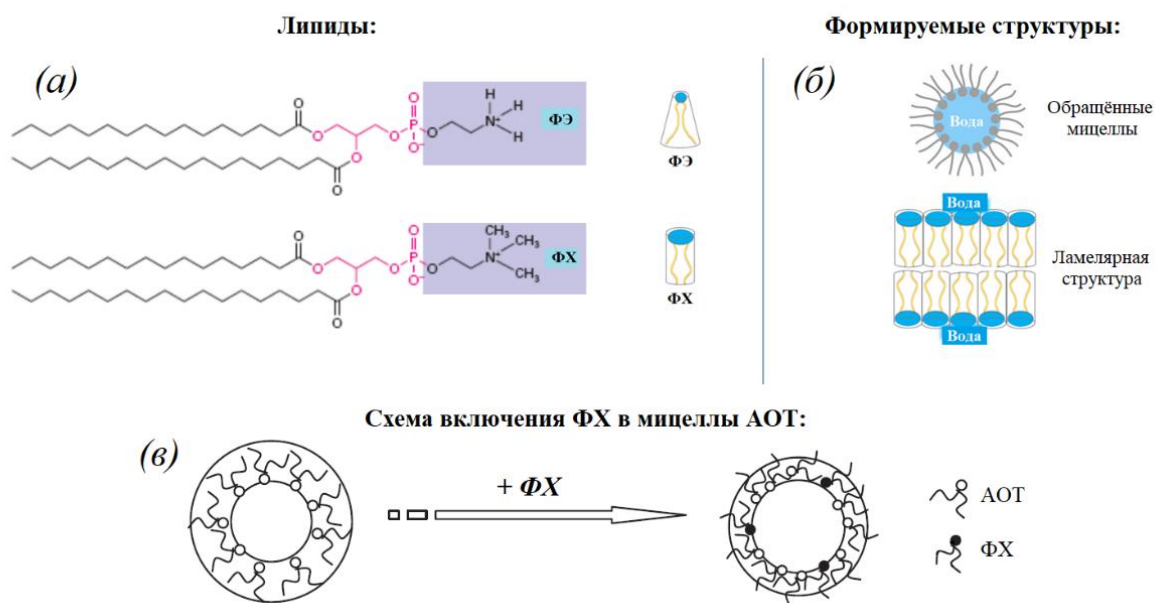


Рисунок 14. (а) – структурные формулы липидов ФХ и ФЭ; (б) – структуры, формируемые ФХ и ФЭ в водной среде (адаптировано из работы [88]); (в) – включение ФХ в мицеллы АОТ в н-октане [83].

Влияние мицеллообразующего ПАВ на активность ферментов. Помимо наличия компонентов мембраны (липидов) важнейшим фактором, влияющим на активность ферментов в мицеллах, является природа самого мицеллообразующего ПАВ: структура

молекулы (конусообразная или цилиндрическая) и её заряд (катионный, анионный или нейтральный ПАВ).

Строение молекулы ПАВ, как и в случае липидов, влияет на структуру, образуемую ПАВ. Например, малая полярная «голова» и объёмные разветвлённые «хвосты» АОТ способствуют образованию обращённых мицелл (рис. 15 (а)), в то время как молекулы ЦТАБ, напротив, обладают большой «головой» и склонны формировать прямые мицеллы (рис. 15 (б)). Наконец, молекулы цилиндрического типа, такие как Бридж-96, склонны формировать ламеллярные структуры (рис. 15 (в)).

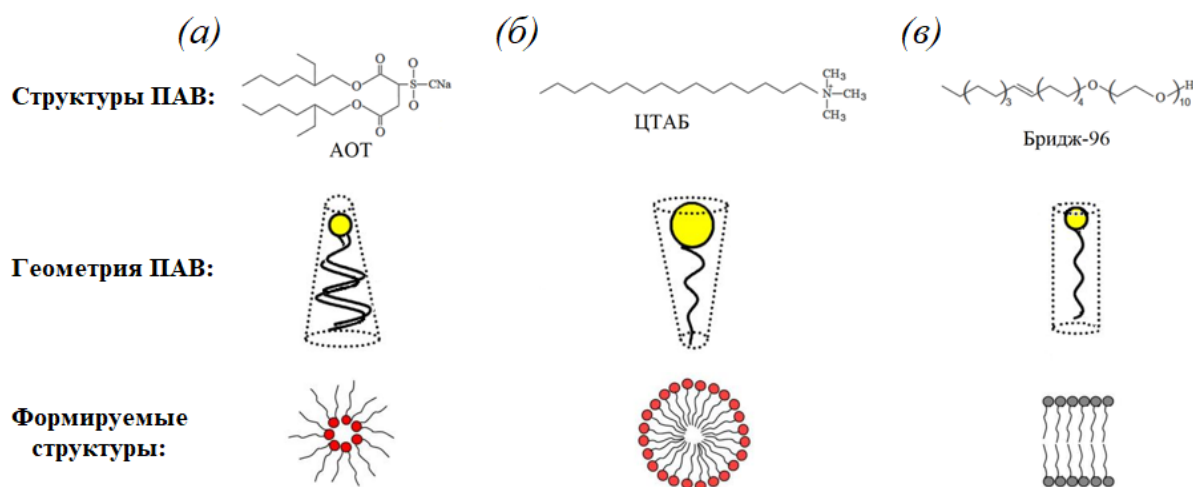


Рисунок 15. (а) – структурные формулы ПАВ; (б) – форма молекул ПАВ; (в) – структуры, формируемые ПАВ.

Тем не менее, несмотря на склонность некоторых ПАВ к образованию структур, отличных от мицелл, такие ПАВ также используются для формирования обращённых мицелл. С этой целью в систему добавляют вспомогательные ПАВ (со-ПАВ) с низкой молекулярной массой, чтобы уменьшить коэффициент изгиба слоя ПАВ и повысить термодинамическую стабильность. Амфифильная природа вспомогательного ПАВ позволяет ему накапливаться преимущественно на границе раздела фаз с последующим включением молекул со-ПАВ в слой, образованный основным ПАВ (рис. 16) [79][85].

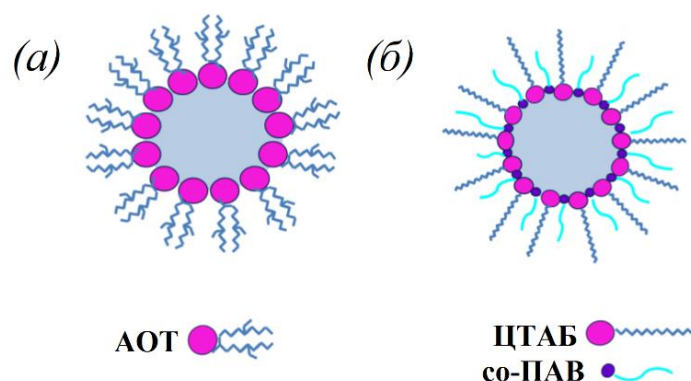


Рисунок 16. Схема строения обращённых мицелл на основе ПАВ (АОТ), склонного к образованию обращённых мицелл (а), и на основе ПАВ (ЦТАБ), требующего наличия со-ПАВ (б) [79].

В качестве примера использования ПАВ, не склонного к образованию обращённых мицелл, можно привести работу [89], авторы которой не только продемонстрировали функционирование пероксидазы хрена в обращённых мицеллах ЦТАБ (н-гексанол в качестве со-ПАВ), но и обнаружили повышенную активность фермента при использовании смешанных мицелл состава «ЦТАБ + Бридж-92» и «ЦТАБ + Бридж-30» (усиление в 2 и 2,5 раза соответственно). Примечательно, что Бридж-30 и Бридж-92 выполняют функцию со-ПАВ, снижая потребность в использовании н-гексанола в качестве со-ПАВ [89].

Другим важным параметром, помимо структуры мицеллообразующего ПАВ, является заряд его молекулы. В отличие от нейтральных ПАВ, ионные ПАВ создают высокий дзета-потенциал на границе раздела фаз, что может влиять на активность ферментов [90]. Например, известно, что активность α -химотрипсина в мицеллах АОТ (анионный ПАВ) значительно ниже по сравнению с таковой в мицеллах ЦТАБ (катионный ПАВ) [91]. Данный эффект объясняется депротонированием Ala149 при взаимодействии с отрицательным зарядом головной группы АОТ, что приводит к кооперативному эффекту: депротонированию Ile16 и разрыву солевого мостика Ile16–Asp194, который обеспечивает каталитически активную конформацию α -химотрипсина [92]. Кроме того, моделирование броуновской динамики показало, что отрицательный потенциал мицелл повышает вероятность образования фермент-субстратного комплекса, а положительный – снижает [93].

Стабильность обращённых мицелл. Наконец, третьим важным параметром ПАВ является стабильность образующихся мицелл и возможность варьирования степени гидратации W_0 в широком диапазоне значений, что необходимо для изучения каждой олигомерной формы фермента. Этому критерию во многих случаях удовлетворяет анионный АОТ – наиболее часто используемый ПАВ [85], занимающий большую область

существования на фазовых диаграммах [94] (рис. 17 (а), область существования обращённых мицелл L₂ обведена зелёным цветом). Для сравнения на рис. 17 (б) представлены фазовые диаграммы мицелл на основе только ЦТАБ, только Бридж или смешанных мицелл состава «ЦТАБ + Бридж» [89] (красным цветом обведена наибольшая область существования мицелл, обозначенная «clear» и наблюдаемая в случае ЦТАБ). Мицеллы всех перечисленных составов – ЦТАБ, Бридж или «ЦТАБ+Бридж» – занимают гораздо меньшую область существования на фазовых диаграммах в сравнении с АОТ (рис. 17), что, в том числе, ограничивает диапазон реализуемых значений степеней гидратации W_0 .

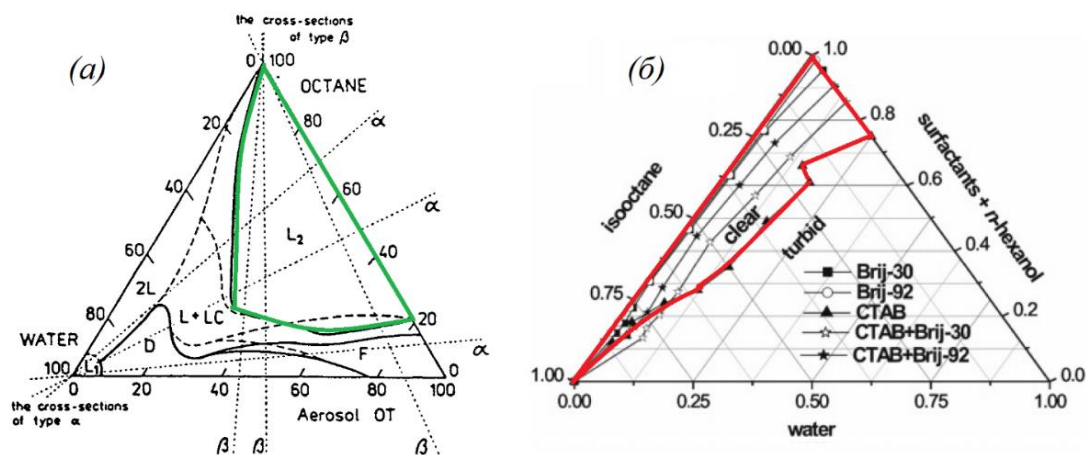


Рисунок 17. Фазовые диаграммы для системы АОТ/октан/вода (а) и для систем ПАВ+н-гексанол/изооктан/вода (б), где ПАВ – один из следующих вариантов: Бридж-30, Бридж-92, ЦТАБ, ЦТАБ + Бридж-30, ЦТАБ + Бридж-92. Рисунки адаптированы из работ [94][89].

Важно отметить, что мицеллы ЦТАБ обладают большей областью существования на фазовых диаграммах по сравнению со смешанными мицеллами (ЦТАБ+Бридж-30 или ЦТАБ+Бридж-92), однако именно в смешанных мицеллах наблюдается повышенная активность пероксидазы хрена (в 2-2,5 выше, чем в мицеллах ЦТАБ, рис. 17 (б)) и снижается необходимость в использовании вспомогательных ПАВ (со-ПАВ). Кроме того, мицеллы смешанного состава гораздо лучше подходят для хранения, например, липазы из *Chromobacterium Viscosum* по сравнению с мицеллами ЦТАБ [89]. Таким образом, при выборе того или иного мицеллообразующего ПАВ следует принимать во внимание сразу множество факторов (стабильность мицелл, активность ферментов, влияние вспомогательных ПАВ и т.д.), поскольку они могут не коррелировать напрямую между собой.

1.3. Галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi* и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana*

1.3.1. Общие сведения

Болезнь Шагаса – заболевание, вызываемое простейшим организмом-паразитом *Trypanosoma cruzi*. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, примерно 6–7 млн человек во всем мире инфицированы *T. cruzi* и ещё 75 млн человек находятся в зоне риска. В настоящее время заболевание лечится всего двумя препаратами: бензнидазолом и нифуртимоксом, которые действуют как про-лекарства, активируясь внутри организма паразита митохондриальной NADH-зависимой нитроредуктазой I-типа. В основе действия обоих препаратов лежит восстановление их нитрогруппы до аминогруппы с образованием различных промежуточных свободных радикалов и электрофильных метаболитов. Однако у данных лекарств есть ряд серьёзных недостатков, в том числе эффективность только на острой или ранней фазе инфекции, побочные эффекты в течение курса приёма и развивающаяся устойчивость паразита к используемым препаратам [61].

Одним из направлений поиска лекарств против болезни Шагаса являются исследования, посвящённые ингибированию биосинтеза соединений, жизненно необходимых *T. cruzi*. Например, авторы [95] рассматривают стерол-14 α -деметилазу, участвующую в биосинтезе стеролов (необходимы для нормального функционирования мембран), как потенциальную мишень для терапии болезни Шагаса. Так, использование противогрибковых азолов, которые блокируют биосинтез стеролов, оказалось очень успешным против одноклеточных паразитов: позаконазол, препарат класса триазолов, в настоящее время вступает в фазу II клинических испытаний для лечения болезни Шагаса.

Перспективным подходом является ингибирование биосинтеза другого жизненно важного для *T. cruzi* соединения – витамина С, антиоксиданта, который трипаносома не может усваивать извне и должна синтезировать самостоятельно. Получаемый таким образом витамин С (и его аналоги) играет важную роль для жизнеспособности *T. cruzi*, защищая её от воздействия активных форм кислорода в ходе проникновения в макрофаги хозяина. Используя ¹⁴C-меченный витамин С авторы [96] показали, что *T. cruzi* не может поглощать витамин С извне ни на одной из стадий своего развития (ни в виде эпимастиготы, ни в виде амастиготы) – таким образом для *T. cruzi* синтез *in vivo* является единственным способом получения витамина С.

В качестве лекарственной мишени в этом случае рассматривается галактонолактонооксидаза (TcGAL) (EC 1.3.3.12), мембранный фермент, катализирующий

финальную стадию синтеза витамина С из L-галактоно-1,4-лактона (или гомолога витамина С, D-эритроаскорбата, из D-арабиноно-1,4-лактона, рис. 18). Ввиду отсутствия галактонолактонооксидазы в организме человека соответствующий ингибитор может рассматриваться как потенциально селективное лекарство против болезни Шагаса [9].

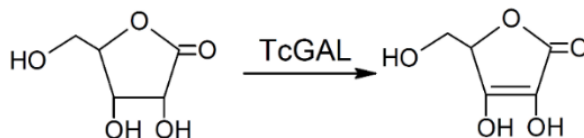


Рисунок 18. Реакция синтеза D-эритроаскорбата из D-арабиноно-1,4-лактона, катализируемая TcGAL.

TcGAL почти одинаково эффективно катализирует реакцию с участием как L-галактоно-1,4-лактона, так и D-арабиноно-1,4-лактона, с небольшим предпочтением в отношении последнего [9]. В обоих случаях реакция протекает в уникальной одномембранной органелле, называемой гликосомой [97].

Хотя пути синтеза витамина С в *T. cruzi* относительно изучены, литературные данные о самом TcGAL весьма ограничены – в том числе из-за отсутствия установленной кристаллической структуры фермента (включая отсутствие структур галактонолактонооксидазы из других организмов) [98]. Как следствие, сведения о природе активного центра TcGAL и механизме катализируемой им реакции также немногочисленны. Тем не менее известно, что TcGAL является FAD-зависимым ферментом [9] и, соответственно, его каталитический цикл включает в себя две полу-реакции: восстановительную и окислительную (раздел 1.1.1., рис. 1), где в качестве ЭА могут выступать как кислород, так и другие соединения. Кроме того, множественное выравнивание аминокислотных последовательностей свидетельствует о консервативности пары Glu–Arg в активном центре у представителей семейства альдонолактонооксидоредуктаз, к которому относится и TcGAL (рис. 19) [99][21].

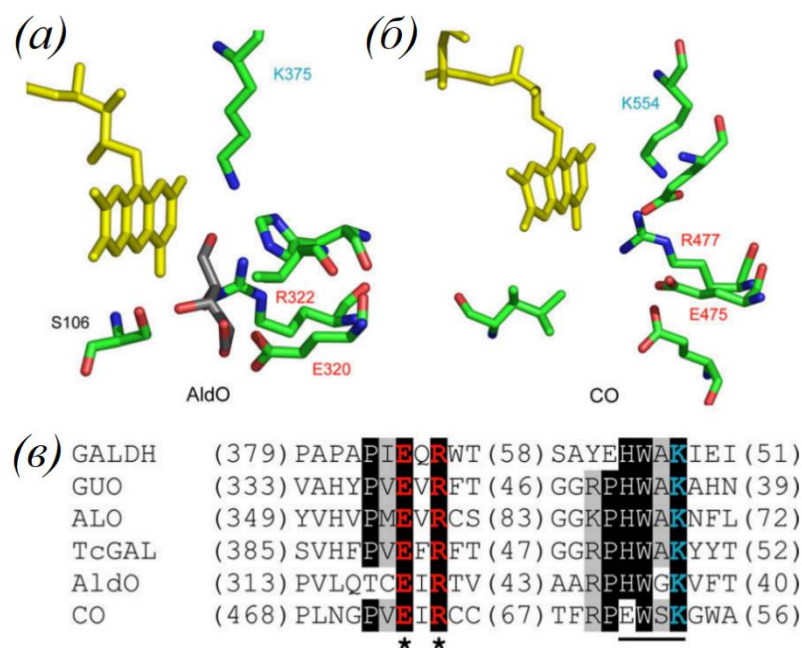


Рисунок 19. Множественное выравнивание последовательностей некоторых представителей альдонолактонооксидоредуктаз, иллюстрирующее наличие общих остатков Glu и Arg (выделены красным) (в), и кристаллические структуры активных центров альдитолоксидазы (а) и холестеролоксидазы (б) (GALDH – L-галактон-1,4-лактон-дегидрогеназа; GUO – L-гулоно-1,4-лактонооксидаза; ALO – D-арабиноно-1,4-лактонооксидаза; TcGAL – галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi*; AldO – альдитолоксидаза; CO – холестеролоксидаза) [99].

Остаток Glu участвует в продуктивном связывании субстрата и может действовать как основание в активации субстрата, в то время как Arg не так важен для катализа, но нужен для стабилизации анионной формы восстановленного кофактора FAD [98]. Кроме того, важную роль в катализе альдонолактонооксидоредуктаз играет остаток Cys, локализованный в сар-домене, что подтверждается инактивацией представителей этого семейства тиол-модифицирующими агентами, например пероксидом водорода. Авторы [98] также предполагают, что остаток Cys, находясь под поверхностью белка и обладая $pK_a = 6,5$, может участвовать в распознавании субстрата.

Наконец, следует отметить ещё один остаток – лизин, характерный для TcGAL и других ферментов семейства альдонолактонооксидоредуктаз (рис. 19 (а), остаток Lys выделен синим) [99]. Хотя мнения исследователей о роли Lys расходятся, некоторые исследователи считают, что наличие остатка лизина вблизи азота в положении 5 флавина может обуславливать оксидазную активность ряда флавин-зависимых ферментов [22][33]. Показано, что замена Lys450 → Gly в случае TcGAL приводит к полной инактивации фермента [96], что, по-видимому, также может говорить о роли лизина в стабилизации комплекса фермента с субстратом.

TcGAL остаётся малоизученным ферментом не только по причине отсутствия установленной кристаллической структуры фермента [98] (что обуславливает ограниченность сведений об активном центре), но и вследствие трудностей, возникающих при получении активной формы фермента и измерении его каталитической активности. Так, авторами [9] описана рекомбинантная экспрессия нативного TcGAL из вектора pBADTcGAL в *E. coli*, где основная масса белка получалась в форме нерастворимых телец включения.

Вышесказанное побудило авторов [9] провести рефолдинг TcGAL с использованием системы обращённых мицелл АОТ, описанной ранее для других ферментов [82]. При этом мицеллы АОТ также являются единственной разработанной системой, в которой удастся проводить измерение активности TcGAL. Отсутствие альтернативных систем (т.е. систем сравнения) осложняет оценку влияния мицеллярной матрицы на свойства TcGAL, поэтому в качестве контроля в экспериментах по TcGAL исследователи используют L-галактон-1,4-лактондегидрогеназу (EC 1.3.2.3) из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) [9] – фермент, катализирующий ту же реакцию, что и TcGAL, и при этом функционирующий не только в мицеллах, но и в водной среде.

AtGALDH представляет собой белок, расположенный во внутренней мембране митохондрий. Несмотря на отсутствие различного трансмембранного сегмента, AtGALDH проявляет себя как интегральный мембранный белок внутренней мембраны и обращен в межмембранное пространство [100]. Будучи митохондриальным мембранным белком, AtGALDH, помимо каталитической функции, также играет важную роль в сборке комплекса I дыхательной цепи [100][101].

Кристаллическая структура AtGALDH, как и TcGAL, в настоящее время не установлена, однако имеется структура митохондриального комплекса I из *Brassica oleracea*, определённая методом криоэлектронной микроскопии [102]. Для иллюстрации на рис. 20 представлена атомная модель промежуточного продукта сборки комплекса I: весь модуль P_D отсутствует, а L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа контактирует с модулем P_P на межмембранной стороне (L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа – GLDH – отмечена красным) [102].

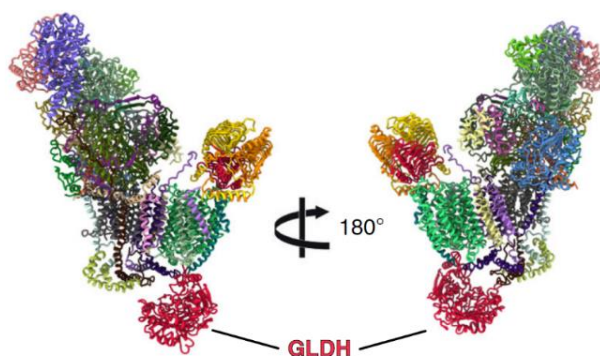


Рисунок 20. Атомная модель промежуточного продукта сборки комплекса I (L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа GLDH отмечена красным) [102], полученная методом криоэлектронной микроскопии. Атомная модель растительного митохондриального комплекса I была встроена в карты высокого разрешения с помощью Coot, Phenix и Chimera. Атомные модели *Y.lipolytica* (6RFR) и *M.musculus* (6G2J) использовались в качестве отправной точки для идентификации и моделирования белков.

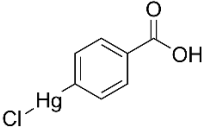
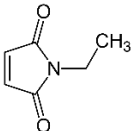
Поскольку AtGALDH и TcGAL являются представителями семейства альдонолактоноксидоредуктаз, то AtGALDH – аналогично TcGAL – является FAD-зависимым ферментом и его каталитический цикл также аналогичен таковому для TcGAL (раздел 1.1.1., рис. 1) за исключением отсутствия возможности использования кислорода в качестве электроноакцептора. Кроме того, AtGALDH содержит консервативные остатки (Glu386 и Arg388 в активном центре, а также Cys340), выполняющие те же функции, что и у TcGAL (см. выше). Однако в отличие от большинства альдонолактоноксидоредуктаз, содержащих гистидин, участвующий в ковалентном связывании FAD, фермент AtGALDH содержит остаток лейцина (Leu56) вместо гистидина, играющий роль как в связывании FAD, так и в катализе [6].

Другим важным остатком является Ala113, играющий роль «привратника», ограничивающего доступ кислорода к кофактору FAD и определяющий принадлежность фермента к классу дегидрогеназ внутри VAO-семейства [4]. Поскольку AtGALDH и TcGAL относятся к VAO-семейству и различаются по возможности использования кислорода как ЭА, то можно сделать вывод о наличии остатка Ala113 у AtGALDH и об отсутствии такового у TcGAL. Примечательно, что замена Ala113 → Gly приводит к 400-кратному усилению оксидазной активности AtGALDH (открывается доступ кислорода к FAD), при этом не влияя на дегидрогеназную активность фермента [4]. Таким образом, мутантный AtGALDH обладает как оксидазной, так и дегидрогеназной активностями, что делает его аналогом TcGAL, который также проявляет обе активности.

1.3.2. Ингибиторы галактонолактонооксидазы и L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы

Поиск ингибиторов TcGAL является важной задачей в контексте рассмотрения фермента как лекарственной мишени при лечении болезни Шагаса, однако литературные данные об ингибиторах TcGAL весьма ограничены и представлены всего четырьмя соединениями (табл. 8) [96].

Таблица 8. Характеристики ингибиторов TcGAL. Концентрация каждого ингибитора 1 мМ [96].

Ингибитор	Процент ингибирования	Структура ингибитора
HgCl ₂	100 ± 0	-
п-хлормеркурибензоат	100 ± 5,0	
N-этилмалеимид	77 ± 2,4	
ZnSO ₄	63 ± 3,2	-

Используя данные ингибиторы (табл. 8), авторы [96] ставили своей целью проверить, играют ли остатки цистеина роль в активности TcGAL. Согласно работе [96] все четыре соединения ингибируют тиоловые группы цистеина, что предполагает важность остатка(ов) цистеина для функционирования TcGAL. Однако ртутьсодержащие HgCl₂ и п-хлормеркибензоат априори токсичны и не могут рассматриваться как потенциальные лекарства, N-этилмалеимид окисляет остатки Cys во всех белках (не только TcGAL), а селективность ZnSO₄ по умолчанию невысокая.

Заметим, что сведения об ингибиторах галактонолактонооксидазы из других организмов также крайне немногочисленны. Так, список ингибиторов галактонолактонооксидазы из *Saccharomyces cerevisiae*, охарактеризованных авторами [103], во многом сходен с набором ингибиторов TcGAL описанных в работе [96] (ионы ртути, N-этилмалеимид, п-хлормеркурифенилсульфонат и др.). При этом в случае неорганических соединений ингибирование наблюдалось при миллимолярных концентрациях, характерных для ингибирования TcGAL солями ртути и цинка [96], в то время как органические ингибиторы действовали при концентрации порядка 0,1 мМ [103]. Интересным является и факт конкурентного ингибирования галактонолактонооксидазы из *Saccharomyces cerevisiae*

L-гулоно- и D-галактоно-1,4-лактонами (ингибирующие концентрации порядка нескольких мМ) [103].

Подчеркнём, что действие всех указанных в литературе ингибиторов TcGAL изучалось в водном растворе, где фермент проявляет лишь остаточную активность (белок не полностью свернут) (табл. 8) [96], поэтому эффект мицеллярной среды (моделирующей мембранные условия) на активность TcGAL трудно напрямую оценить.

Указанные в литературе ингибиторы AtGALDH (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота), H_2O_2 и N-этилмалеимид) являются тиол-модифицирующими агентами, окисляющими Cys340 [41]. Схематично действие этих ингибиторов в отношении AtGALDH показано на рис. 21 на примере пероксида водорода:

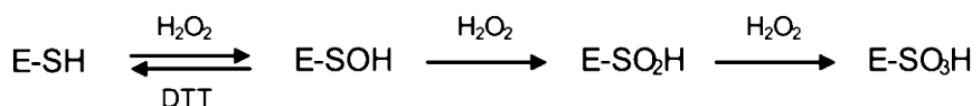
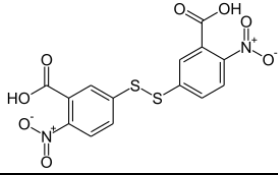
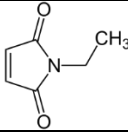
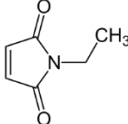
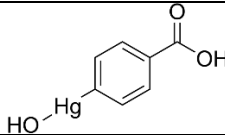
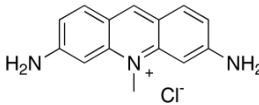
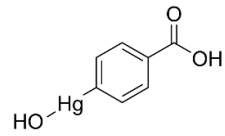
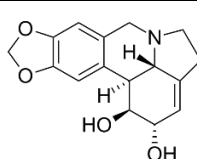
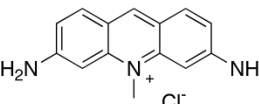
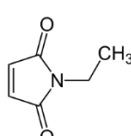
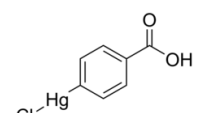


Рисунок 21. Схема инактивации AtGALDH пероксидом водорода, где E-SH, E-SOH, E-SO₂H и E-SO₃H представляют собой сульфгидрильную, сульфеновую, сульфиновую и сульфоновую кислотные формы Cys340 соответственно. ДТТ лишь частично восстанавливает активность AtGALDH [41].

Поскольку список ингибиторов AtGALDH, как и TcGAL, ограничен всего 3-4 соединениями, представляется важным рассмотреть ингибиторы L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из других источников (табл. 9).

Таблица 9. Ингибиторы L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназ из разных источников.

Организм	Ингибитор	Структура	Комментарий	Ссылка
<i>Arabidopsis thaliana</i>	5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная кислота)		Окисление Cys340	[41]
	N-Этилмалеимид			
	H_2O_2	-		
<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	Йодоуксусная кислота		-	[104]
	N-Этилмалеимид			

	п-гидроксимеркури-бензойная кислота			
<i>Ipomoea batatas</i>	Акрифлавин		Ингибирование нивелируется добавлением FAD или FMN	[105]
	п-гидроксимеркури-бензойная кислота		Ингибирование нивелируется добавлением 2-меркаптоэтанола	
	Ликорин		-	[106]
	Ионы Zn ²⁺ или Cu ²⁺	-		
<i>Nicotiana tabacum</i>	Акрифлавин		Ингибирование нивелируется добавлением FAD или FMN	[107]
	N-Этилмалеимид		Полное ингибирование	
	Ионы Zn ²⁺ или Cu ²⁺	-		
	п-хлормеркурибензоат			

Большинство ингибиторов L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы (табл. 9) либо неселективны (тиол-модифицирующие агенты), либо токсичны (ртутьсодержащие соединения, например, п-гидроксимеркури-бензойная кислота). Однако среди ингибиторов AtGALDH можно выделить два соединения, являющихся потенциальными ингибиторами гомологичного TcGAL с перспективной разработки лекарств против болезни Шагаса, а именно - акрифлавин и ликорин.

Акрифлавин – многоцелевой препарат, обладающий антибактериальным, противовирусным, противомаларийным и противогрибковым действием [108], включая ингибирование SARS-CoV-2 посредством подавления активности папаин-подобной протеазы [109]. Имеются свидетельства того, что акрифлавин ингибирует размножение *T.cruzi*, препятствуя репликации кДНК микроорганизма [110], что, по-видимому, является

основным механизмом действия акрифлавина в отношении *T.cruzi*. При этом нельзя исключать комплексное действие акрифлавина, в т.ч. ингибирование различных ферментов, включая TcGAL. Однако размножение *T.cruzi* подавляется акрифлавином при концентрации порядка 50 мкг/мл (190 мкМ) [110], в то время как L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа ингибируется при гораздо более высокой концентрации 1-1.5 мМ [106][107], и, вероятно, гомологичный TcGAL также ингибируется при высоких концентрациях. Таким образом, маловероятно, что ингибирование TcGAL играет первичную роль в подавлении роста *T.cruzi* акрифлавином.

Другое соединение, также проявляющее анти-трипанасомную активность – ликорин, природный алкалоид, обладающий антивирусным, антибактериальным, противовоспалительным и противомаларийным действием [111]. Примечательно, что антитрипанасомную активность проявляет не только ликорин, но и другие алкалоиды из растительного семейства Амариллисовых в диапазоне концентраций 1-100 мкМ, однако механизм действия ликорина неизвестен [112]. При этом ингибирование L-галактоно-1,4-лактона из *Zea mays* наблюдается уже в диапазоне концентраций ликорина 1-10 мкМ, в котором предположительно будет наблюдаться ингибирование гомологичного TcGAL. В случае экспериментального подтверждения ингибирования TcGAL при концентрациях порядка мкМ можно предположить, что ингибирование TcGAL является механизмом действия ликорина в отношении *T.cruzi*.

Таким образом, анализ литературных данных показал, что мембранный фермент TcGAL представляет собой перспективную лекарственную мишень для лечения болезни Шагаса, вызываемой одноклеточным паразитом *T.cruzi*, а гомологичный AtGALDH является удобной моделью для исследования свойств мембранотропных ферментов. Кроме того, TcGAL и AtGALDH обладают высоким сходством активных центров и могут использоваться для изучения и сравнения свойств мембранных ферментов, отличающихся по происхождению (животное и растительное), степени взаимодействия с мембраной (облигаторно или факультативно мембранный фермент) и наличию/отсутствию оксидазной или дегидрогеназной активности. Однако TcGAL остаётся недостаточно исследованным ферментом, в частности, отсутствует установленная кристаллическая структура TcGAL, а список изученных в литературе ингибиторов ограничивается четырьмя соединениями. Влияние компонент природных мембран (фосфолипидов) на TcGAL в литературе также не рассматривается.

С практической точки зрения необходим поиск новых мишеней и соответствующих лекарств для лечения болезни Шагаса, Сонной болезни, лейшмании и других аналогичных

болезней, против которых существует ограниченное число лекарств. Галактонолактонооксидаза (в частности из *T.cruzi*) – одна из таких возможных лекарственных мишеней, поэтому поиск ингибиторов данного фермента является важным предметом исследований.

Вышесказанное обуславливает необходимость детального изучения функционирования TcGAL, в том числе влияния различных эффекторов (ингибиторов, электроноакцепторов, фосфолипидов) на его активность. Данная задача может быть эффективно решена с использованием системы обращённых мицелл, позволяющей проводить рефолдинг TcGAL из телец включения и измерять его активность. В качестве системы сравнения целесообразно использовать гомологичный модельный AtGALDH, который, в отличие от TcGAL, функционирует как в мицеллярной, так и в водной среде, что позволяет дифференцировать влияние мицеллярной матрицы и эффекторов на активность целевого TcGAL.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

L-галактоно-1,4-лактон, D-арабиноно-1,4-лактон, цитохром С бычьего сердца, 2,6-дихлорфенолиндифенол, натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты (АОТ), н-октан, ацетонитрил, боргидрид натрия, цетилтриметиламмоний бромид, Бридж-96, 1,2-диолеил-sn-глицерофосфоэтаноламин, фосфатидилхолин из яичных желтков, метил- β -циклодекстрин, коэнзим Q₀, коэнзим Q₁, 2,6-диметокси-1,4-бензохинон, 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон, компоненты буферных растворов, кверцетин и дигидрокверцетин – Sigma-Aldrich (США), феназинметосульфат, 1,4-бензохинон и дигидрохлорид тетраметилфенилендиамина – Merck (Германия), гидрохлорид ликорина – Aladdin (Китай), коэнзим Q₁₀ – Nanjing Duly Biotech (Китай), эвгенол, аллилтетраметоксибензол и аллилбензол – Acros Organics (Бельгия).

Апиол, диллапиол и миристицин чистотой 98–99% получены высокоэффективной перегонкой CO₂-экстрактов на опытно-промышленной установке в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва, Россия).

Природная и мутантная (замена A113G) формы L-галактон-1,4-лактон дегидрогеназы (EC 1.3.2.3) из *Arabidopsis thaliana* и галактонолактонооксидаза (EC 1.3.3.12) из *Trypanosoma cruzi* были любезно предоставлены проф. W.J.H. van Berkel

(Вагенингенский университет, Вагенинген, Нидерланды). Халконы, конъюгаты апиола, диллапиола и аллилтетраметоксibenзола с трифенилфосфинем, а также пропилтрифенилфосфоний (пропил-ТФФ) были любезно предоставлены сотрудниками ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН (Москва, Россия) [113][114].

2.2. Методы

Рекомбинантная экспрессия AtGALDH. AtGALDH-His6 экспрессировался в клетках *E. coli* BL21(DE3) в виде растворимого цитоплазматического белка. Наиболее высокие уровни экспрессии были обнаружены через 16 часов индукции 0,4 мМ изопропилтио- β -D-галактозидом (IPTG) при 37 °C. Рекомбинантный белок очищали в два последовательных хроматографических этапа с использованием колонок с Ni-NTA-агарозой и Q-сефарозой. Приблизительно 200 мг рекомбинантного белка AtGALDH получается из периодической культуры объемом 12 л, содержащей 58 г клеток (сырой вес). Конечный препарат имел удельную активность 76 Ед/мг.

Рекомбинантная экспрессия TcGAL. Рекомбинантную экспрессию TcGAL из *T. cruzi* проводили в *Escherichia coli*, используя вектор pTrcHisC, содержащий ген TcGAL (из клона *T. cruzi* X10/6). Для продукции фермента, клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие плазмиду pBAD-TcGAL, выращивали в среде Лурия-Бертани (LB), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, до тех пор, пока OD₆₀₀ не достигала ~0,6. Экспрессию TcGAL индуцировали добавлением 0,02% L-арабинозы и инкубацию продолжали в течение 16 ч при 28 °C. Клетки ресуспендировали в 50 мМ Трис-HCl, 5 мМ ДТТ, pH 7,4, с добавлением ингибитора протеазы, 10 мМ MgCl₂ и ДНКазы I, а затем дважды пропускали через предварительно охлажденную ячейку Френч-пресса (SLM Aminco, SLM Instruments, Урбана, Иллинойс, США) при давлении 69 МПа. Полученный гомогенат центрифугировали при 25000 g в течение 30 мин при 4 °C и собирали нерастворимые тельца включения.

Рефолдинг телец включения TcGAL. Нерастворимый материал, собранный после лизиса клеток, промывали 6% Тритоном X-100, содержащим 60 мМ ЭДТА и 1,5 М NaCl, pH 7,0, и растворяли в 6 М гуанидингидрохлориде. Затем денатурант удаляли диализом против 10 мМ фосфата натрия, 1 мМ ДТТ, pH = 8,8. Заключительную стадию диализа проводили против 10 мМ фосфата натрия, pH 8,8, для удаления избытка ДТТ. После диализа получали мутную суспензию агрегированного белка. Эту суспензию вводили в систему обращённых мицелл вода-АОТ-н-октан, содержащую 0,4 М АОТ, и интенсивно встряхивали. Степень гидратации $W_0 = 30$ достигалась добавлением 25 мМ фосфата натрия, pH 8,8. Растворы окисленного и восстановленного глутатиона (10 мМ GSSG и 30 мМ GSH)

в 10 мМ фосфате натрия, pH 8,8, смешивали и аликвоту объемом 10 мкл добавляли к 1 мл раствора 0,4 М АОТ в октане. Рефолдинг фермента инициировали смешиванием 1 мл мицеллярного раствора, содержащего глутатионы, с 200 мкл мицеллярного раствора TcGAL и аликвотой (10 мкл) раствора кофактора FAD в воде (10-кратный молярный избыток по отношению к концентрации фермента). Полученный раствор встряхивали, получая прозрачную систему, содержащую TcGAL. Конечная концентрация белка в мицеллах составляла 1–2 мг/мл.

Измерение каталитической активности TcGAL и AtGALDH. Кинетические измерения (определение активности ферментов) проводили на спектрофотометре Ultrospec 2100 pro «Amersham biosciences» (Питтсбург, Пенсильвания, США) с термостатируемым кюветным отделением (все измерения проводились при 25 °C). Данные записывали и обрабатывали с помощью программы Datalyse 3.70. За ходом реакции следили по изменению поглощения реакционной системы, обусловленным либо обесцвечиванием 120 мкМ красителя ДХФИФ при взаимодействии с продуктом реакции (измерения проводили при длинах волн 550 нм и 600 нм в мицеллярной и водной средах, соответственно), либо восстановлением одного из электроноакцепторов, который также менял свою окраску в ходе реакции. Концентрации всех реагентов варьировались в зависимости от целей проведения экспериментов, описываемых в соответствующих разделах, за исключением постоянных концентраций ферментов (6 нМ и 34 нМ для AtGALDH и TcGAL, соответственно). В качестве субстратов для AtGALDH и TcGAL использовали L-галактоно-1,4-лактон и D-арабиноно-1,4-лактон, соответственно. В качестве ЭА использовали соединения различной природы (природные и искусственные). В качестве среды использовали или комбинированный фосфатно-боратный буфер (25 мМ фосфат натрия и 10 мМ борат натрия) или мицеллы состава вода-ПАВ-н-октан на основе различных ПАВ (АОТ, ЦТАБ, Бридж-96). Статистический анализ полученных данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента и программного обеспечения Statistica 9.0 (StatSoft, Талса, Оклахома, США).

Получение комплексов включения диллапиола, аллилтетраметоксибензола и миристицина с метил-β-циклодекстрином. Комплексы включения с МЦД (1 : 2 по молям) готовили при смешивании 2–5 мг соответствующего АПАБ и 25–50 мг МЦД с последующим суспендированием в 50 мкл ацетонитрила и инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

УФ-спектры растворов регистрировали на Ultrospec 2100 pro «Amersham biosciences» (Питтсбург, Пенсильвания, США) с термостатируемым кюветным отделением

(все измерения проводились при 25 °C). Данные записывали и обрабатывали с помощью программы Datalyse 3.70.

ИК-спектры растворов в режиме нарушенного полного внутреннего отражения регистрировали с помощью прибора Bruker Tensor 27, оснащённым детектором МСТ, охлаждаемым жидким азотом («Bruker», Германия). Образцы помещали в термостатируемую ячейку BioATR-II с элементом ZnSe ATR («Bruker»). ИК-спектры регистрировали в диапазоне 900–3000 см⁻¹ со спектральным разрешением 1 см⁻¹. Для каждого спектра накапливалось 50 сканов и усреднялось. Спектральные данные обрабатывались с использованием программной системы Bruker Opus 8.2.28 («Bruker»), которая включает коррекцию базовой линии и атмосферную компенсацию.

Седиментационный анализ олигомерных форм AtGALDH. Седиментационный анализ проводили на аналитической ультрацентрифуге Beckman E («Beckman», США), снабжённой фотоэлектрическим сканирующим устройством с монохроматором и мультиплексором, при скорости 40 000 об./мин. Для установления олигомерного состава AtGALDH были изучены мицеллярные растворы фермента (0,1 мг/мл) при степенях гидратации $W_0 = 21$ и $W_0 = 28$, соответствующих функционированию мономерной и димерной форм. Сканирование мицелл, содержащих белок, проводили при длине волны 450 нм. Коэффициенты седиментации пустых мицелл определяли в независимых экспериментах при 405 нм с добавлением 2,4-динитрофенола для окрашивания мицелл. Коэффициенты седиментации рассчитывали с использованием программы SediFit из полученных экспериментальных кривых. Молекулярную массу AtGALDH рассчитывали по стандартной методике, используя формулу:

$$M_p = M_0 \left(\frac{S_p}{S_0} - 1 \right) (1 - \rho V_0), \quad (1)$$

где M_0 – молекулярная масса мицелл без фермента (пустых), S_p и S_0 – коэффициенты седиментации фермент-содержащих и пустых мицелл, соответственно, V_0 – парциальный молярный объём пустых мицелл в растворителе с плотностью ρ .

Метод динамического рассеивания света. Измерения динамического рассеяния света проводились на оборудовании Zetasizer Nano S («Malvern Instruments Ltd.», Великобритания) с использованием гелий-неонового лазера (4 мВт) при длине волны 633 нм.

Метод поляризации флуоресценции. Для оценки взаимодействия AtGALDH с ФХ определяли зависимость поляризации флуоресценции AtGALDH в присутствии различных концентраций ФХ, регистрируя интенсивность на флуоресцентном спектрометре Varian Cary Eclipse («Agilent Technologies», США) при длине волны возбуждения 450 нм и длине волны испускания 530 нм, характерных для FAD-содержащих систем. Концентрацию AtGALDH поддерживали постоянной (2,5 мкМ), концентрацию ФХ варьировали в диапазоне 0–6 мМ в комбинированном фосфатно-боратном буфер (25 мМ фосфат натрия и 10 мМ борат натрия) (рН 8,8).

Множественное выравнивание белковых последовательностей. Выравнивание последовательностей ферментов проводили с помощью программы Clustal Omega (с использованием базы данных UniProt).

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Разработка подхода к измерению активности TcGAL и AtGALDH с использованием системы обращённых мицелл

Исследование электроноакцепторных свойств 1,4-бензохинона. Одноклеточный организм-паразит *Trypanosoma cruzi* не способен усваивать L-аскорбиновую кислоту из окружающей среды [96], поэтому синтезирует ее из гексоз. Последняя стадия биосинтеза аскорбата в трипаносоме катализируется ферментом галактонолактонооксидазой (TcGAL). Ингибитор этого фермента может стать эффективным и нетоксичным для человека лекарством от трипаносомной инфекции, потому что у человека отсутствует фермент, отвечающий за синтез аскорбиновой кислоты. Фермент TcGAL не удастся получить методами генной инженерии в активной и растворимой форме – он образуется в неактивной и нерастворимой форме в виде «телец включения» (inclusion bodies) [9]. Получить фермент в активной форме можно, если провести его рефолдинг в системе обращенных мицелл, являющихся модельными системами митохондриальных мембран (мембраны митохондрий часто содержат небислойные липидные структуры, представляющие собой ассоциаты молекул липидов, построенные по типу обращённых мицелл). Однако выделить фермент из мицеллярной системы в водную фазу не удастся, поскольку это мембрано-зависимый фермент и в водной среде не поддерживает нативную конформацию.

Поиск ингибиторов для TcGAL осложняется тем, что не разработан эффективный метод определения его активности в обращенных мицеллах. В данной работе в качестве контрольного фермента использовали гомологичный фермент растительного

происхождения из *Arabidopsis Thaliana* (AtGALDH), катализирующий ту же самую реакцию, при этом он активен как в водной фазе [6], так и в мицеллярной среде. Этот фермент получается в активной и полностью растворимой форме после экспрессии в *E. coli*. AtGALDH обладает сходными параметрами и субстратной специфичностью.

В случае исследуемых ферментов TcGAL и AtGALDH в ходе изучаемой реакции происходит окисление субстрата за счёт отнятия от него двух электронов, при этом восстанавливаются либо две молекулы одноэлектронного акцептора (цитохром С), либо одна молекула двухэлектронного (1,4-бензохинон) (рис. 22).

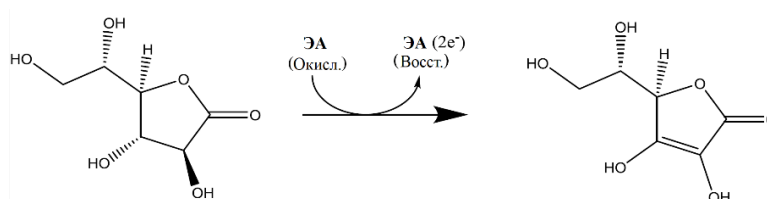


Рисунок 22. Реакция, катализируемая AtGALDH и TcGAL.

Методики определения активности AtGALDH в водной среде, описанные в литературе, основаны на спектрофотометрическом определении изменения концентрации цитохрома-С или бензохинона в ходе реакции. Однако, при работе в обращенных мицеллах цитохром С теряет электроноакцепторные свойства [9], а при использовании искусственного акцептора 1,4-бензохинона (БХ) высока скорость побочных процессов, особенно при щелочных значениях pH около 8,8, соответствующих каталитическому оптимуму фермента. Поэтому требуется подобрать более подходящий электроноакцептор, с которым будет возможна надежная и чувствительная регистрация ферментативной реакции в системе обращенных мицелл ПАВ. Важно выявить и другие факторы, влияющие на протекание ферментативной реакции в обращенных мицеллах: концентрацию ПАВ, степень гидратации и состав обращенных мицелл. При этом требуется добиться максимальной чувствительности регистрации скорости реакции при минимальном вкладе побочных процессов.

Для установления оптимальных условий использования БХ как электроноакцептора AtGALDH исследовали зависимости скоростей основной (в присутствии AtGALDH) и фоновой (без AtGALDH) реакции от pH в водной и мицеллярной средах. Скорости реакций определяли по изменению поглощения раствора на длине волны $\lambda = 290$ нм (разница коэффициентов молярного поглощения окисленной и восстановленной форм БХ $\epsilon_{290} = 2\ 300$ М⁻¹ см⁻¹ для обеих сред. Полученные зависимости представлены на рис. 23.

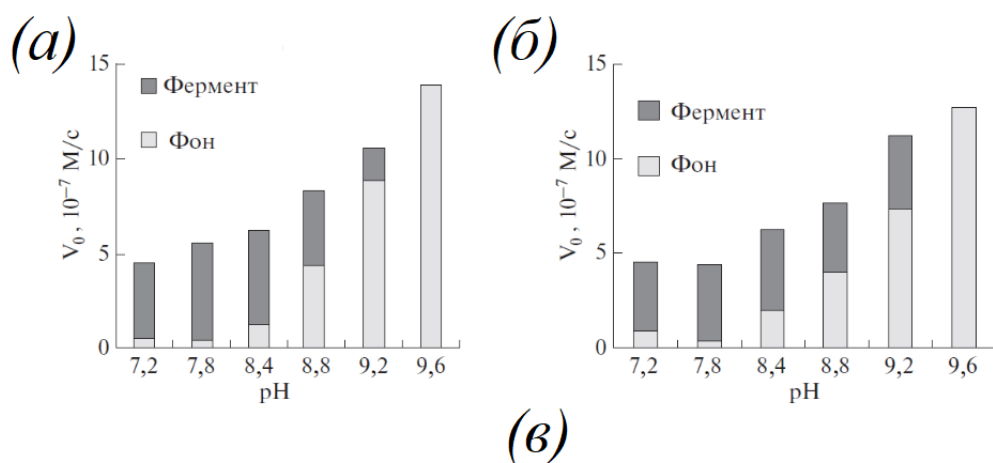


Рисунок 23. Скорости побочной (Фон) и ферментативной (Фермент) реакций при варьировании pH (**а**) – в комбинированный фосфатно-боратный буфер (25 мМ фосфат натрия и 10 мМ борат натрия), (**б**) – в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в н-октане, $W_0 = 22$), (**в**) – соотношение скоростей в исследованных средах. Условия: $[\text{ГЛ}] = 1 \text{ мМ}$, $[\text{БХ}] = 0,2 \text{ мМ}$, $[\text{AtGALDH}] = 6 \text{ нМ}$, $\lambda = 290 \text{ нм}$, $T = 25^\circ\text{C}$.

Установлено, что pH 7,8 является оптимальным для использования БХ в качестве электроноакцептора AtGALDH как в водной, так и в мицеллярной средах. При повышении pH наблюдается резкое снижение отношения скоростей основной и фоновой реакций в обеих средах, вплоть до превалирования фоновой реакции над основной при pH 9,6. Эти результаты согласуются с данными, полученными в работе [9], авторы которой связывают ухудшение свойств БХ с его авто-окислением при щелочных значениях pH. При этом авторы [9] использовали данный ЭА при pH 7,2, в то время как полученные нами pH-зависимости свидетельствуют о возможности использования БХ при pH 7,8, что соответствует более близким к оптимальным условиям функционирования AtGALDH. Дальнейшая оптимизация по использованию БХ как ЭА AtGALDH состояла в исследовании зависимости эффективности ЭА от его концентрации при выбранном pH (рис. 24).

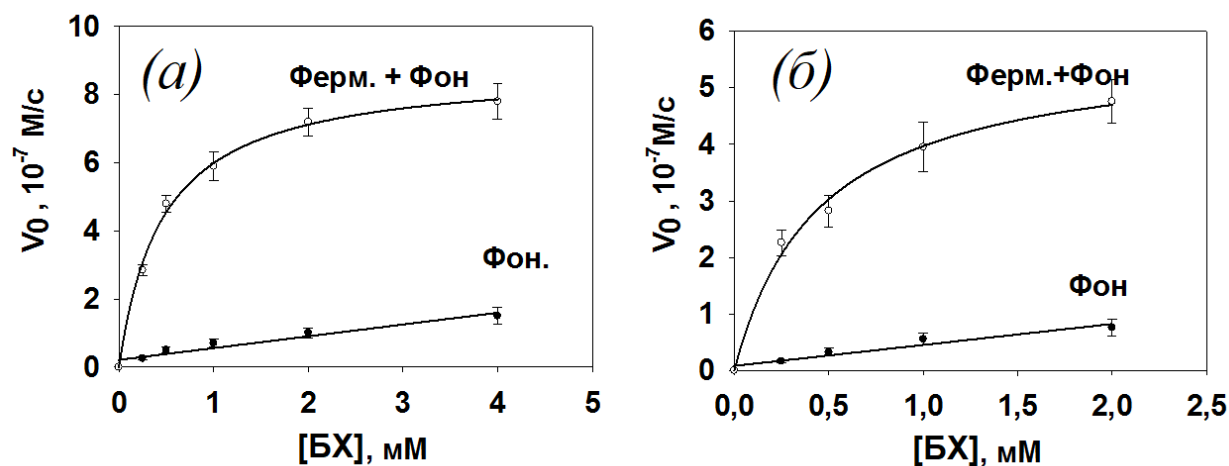


Рисунок 24. Сравнение скоростей ферментативной и фоновой реакции в зависимости от концентрации БХ (а) – в водной фазе (рН 7,8), (б) – в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в н-октане, $W_0 = 22$, рН буфера 7,8). Условия: $[ГЛ] = 1$ мМ, $[AtGALDH] = 6$ нМ, $T = 25^\circ\text{C}$, $\lambda = 290$ нм.

Полученные зависимости свидетельствуют о том, что интервал концентраций БХ 1-2 мМ в водной и мицеллярной среде является оптимальным ввиду наибольшего соотношения скоростей основной и фоновой реакций.

Однако использование БХ в мицеллярных системах имеет ряд недостатков: низкая чувствительность, недостаточная разница коэффициентов молярного поглощения окисленной и восстановленной форм, функционирование при рН, отличном от рН-оптимума ферментов (AtGALDH и TcGAL) и необходимость учёта вклада фоновой реакции.

Наиболее перспективный способ оптимизировать систему – выбор подходящего ЭА, поскольку скорость ферментативной реакции и чувствительность ее регистрации в основном зависят от параметров акцептора электронов, таких как его устойчивость в мицеллярной среде, K_M и $V_{\max}$ для акцептора в данной ферментативной реакции и изменение коэффициента молярного поглощения при восстановлении.

Таким образом для разработки подхода к определению активности TcGAL и AtGALDH варьировали основные параметры, влияющие на протекание исследуемой ферментативной реакции в воде и в системе обращенных мицелл: структуру ЭА, состав обращенных мицелл ПАВ и оптимальные концентрации реагентов.

Выбирать акцептор можно среди природных и искусственных веществ. Исследуемые ферменты локализованы в митохондриях (AtGALDH) и в гликосомах (TcGAL), в которых функционируют следующие основные акцепторы электронов: кислород, NAD^+ , цитохромы, коэнзимы Q_{1-10} , а также метаболиты из цикла Креббса [115].

AtGALDH не может использовать кислород и NAD^+ [6] в качестве акцептора электронов, FAD содержится в активном центре обоих ферментов, а цитохром С является естественным ЭА обоих ферментов, однако он денатурирует в системе обращённых мицелл (модель мембраны) вследствие диссоциации гема, что предполагает рассмотрение ряда других ЭА.

При определении ферментативной активности дегидрогеназ и оксидаз исследователи применяют искусственные акцепторы электронов (ЭА): ФМС [42], тетразолиум-1 [53], БХ [8] и др. Принцип метода основан на спектрофотометрическом определении изменения поглощения ЭА при переходе их из окисленной формы в восстановленную. В плане перехода к мицеллярным системам, данный метод применим для работы в различных растворителях, если система гомогенна и оптически прозрачна в требуемом спектральном интервале.

Исследование спектральных свойств электроноакцепторов AtGALDH. Исходя из анализа литературных данных, перспективными ЭА для измерения активности модельного AtGALDH (и, соответственно, целевого TcGAL) как в водной, так и в мицеллярной средах являются ФМС и тетраметилфенилендиамин (ТМФД) (используемого, например, для измерения пероксидазной активности [116]). Для выяснения применимости данных ЭА необходимо определить разницу коэффициентов молярного поглощения окисленной и восстановленной форм конкретного ЭА – чем выше разница, тем чувствительнее разрабатываемый подход к измерению активности.

Спектры окисленных и восстановленных форм данных ЭА, а также БХ, представлены на рис. 25.

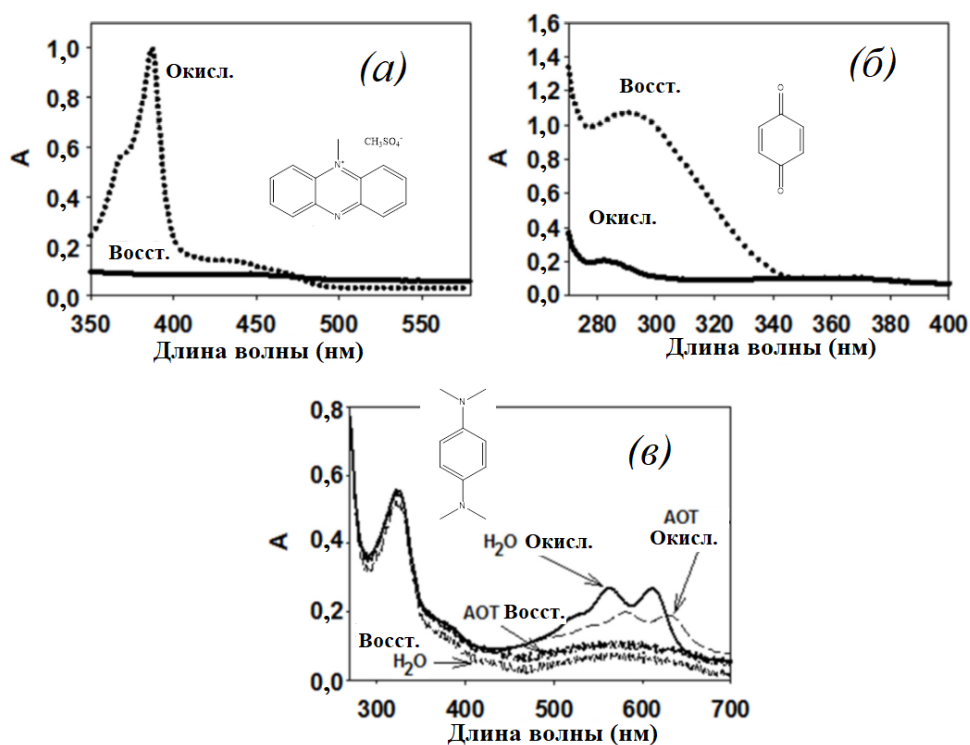


Рисунок 25. Спектры окисленных и восстановленных форм ЭА: **(а)** - 50 мкМ ФМС (мицеллы); **(б)** - 200 мкМ БХ (мицеллы); **(в)** – 25 мкМ ТМФД (водная фаза и мицеллы). Состав мицелл – 0,1 М АОТ в *n*-октаноле (с добавлением необходимого объема водно-буферного раствора для получения степени гидратации $W_0 = 23$, при которой наблюдается один из оптимумов активности AtGALDH [9]).

Восстановленные формы ЭА получали добавлением 5-кратного мольного избытка NaBH_4 . В качестве контроля проводили измерения спектров с вышеуказанными ЭА в водном растворе, а также сравнивали с базовой системой на основе цитохрома С. Для иллюстрации влияния среды на спектральные свойства ЭА на рис. 25 (б) показаны спектры ТМФД в обеих системах — водной и мицеллярной (АОТ).

На основе полученных спектров окисленной и восстановленной форм для каждого ЭА была выбрана длина волны, при которой наблюдается наибольшая разница в поглощении (и, соответственно, максимальная разница в молярных коэффициентах поглощения) окисленной и восстановленной форм ЭА в обращённых мицеллах. Затем на этих длинах волн измеряли поглощение окисленной и восстановленной форм ЭА при различных концентрациях ЭА и определяли разницу молярных коэффициентов поглощения окисленной и восстановленной форм для каждого ЭА ($\epsilon_{\text{окисл-восст}}$). Оптимальные длины волн для водной (контроль) и мицеллярной сред, а также рассчитанные различия молярных коэффициентов поглощения приведены в табл. 10.

Цитохром С и БХ (в водной среде) использовали в качестве контроля в экспериментах с ФМС и ТМФД. Рассчитанные различия молярных коэффициентов

поглощения окисленной и восстановленной форм этих ЭА (цитохрома С и БХ) хорошо коррелируют с приведенными в работе [9].

Таблица 10. Параметры электроноакцепторов AtGALDH и красителя ДХФИФ в водной фазе (контроль) и мицеллярной средах (0,1 М АОТ в н-октане, степень гидратации $W_0 = 23$).

ЭА	Среда	Длина волны (нм)	$\epsilon_{\text{окисл-восст}}^{***}, \text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$	$\epsilon_{\text{окисл}}^{**}, \text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$	$\epsilon_{\text{восст}}^{**}, \text{М}^{-1}\text{см}^{-1}$
Цитохром С *	Вода *	550	21 000	7 200	28 200
БХ	Мицеллы	290	2 300	750	3 050
	Вода	290	2 300	800	3 100
ФМС	Мицеллы	388	25 000	27 100	2 100
	Вода	388	25 000	26 800	1 800
ДХФИФ	Мицеллы	550	11 900	14 300	2 400
	Вода	600	20 600	21 700	1 100
ТМФД	Мицеллы	605	7 800	12 200	4 400
	Вода	590	8 400	11 500	3 100

* Не работает в системе обращённых мицелл.

** Параметры $\epsilon_{\text{окисл-восст}}$, $\epsilon_{\text{окисл}}$ и $\epsilon_{\text{восст}}$ имеют максимальные значения погрешности 10%.

*** Разностный молярный коэффициент поглощения окисленной и восстановленной форм ЭА.

Рассчитаны разностные молярных коэффициентов поглощения окисленной и восстановленной форм ФМС и ТМФД в системе обращённых мицелл АОТ. Разница молярных коэффициентов поглощения в случае ФМС была одинаковой в обеих средах ($25\,000\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ в водной и мицеллярной средах), хотя в случае ТМФД разницы молярных коэффициентов поглощения несколько отличались (8400 и $7800\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ в водной и мицеллярной системе соответственно).

Среди искусственных ЭА, представленных в табл. 10, наибольшее значение разницы молярных коэффициентов поглощения наблюдалось у ФМС ($25\,000\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ при 388 нм), что могло бы обеспечивать наилучшее определение активности AtGALDH (более высокую чувствительность). Однако эффективность ЭА с точки зрения измерения активности фермента также сильно зависит от соотношения скоростей основной и фоновой (в отсутствие фермента) реакций, что стало предметом дальнейшего изучения.

Для увеличения результирующего коэффициента молярного поглощения мы предложили использование сочетания ЭА и специального индикатора (красителя) для детекции формирования продукта в видимой области. Мы использовали комбинации ФМС и красителя ДХФИФ: не являясь ЭА для AtGALDH, ДХФИФ меняет свою окраску,

реагируя с образующимся в ходе реакции аскорбатом (рис. 26), поэтому за процессом можно следить спектрофотометрически при длине волны 600 нм, где не вносят вклад в спектр ароматические соединения [9].

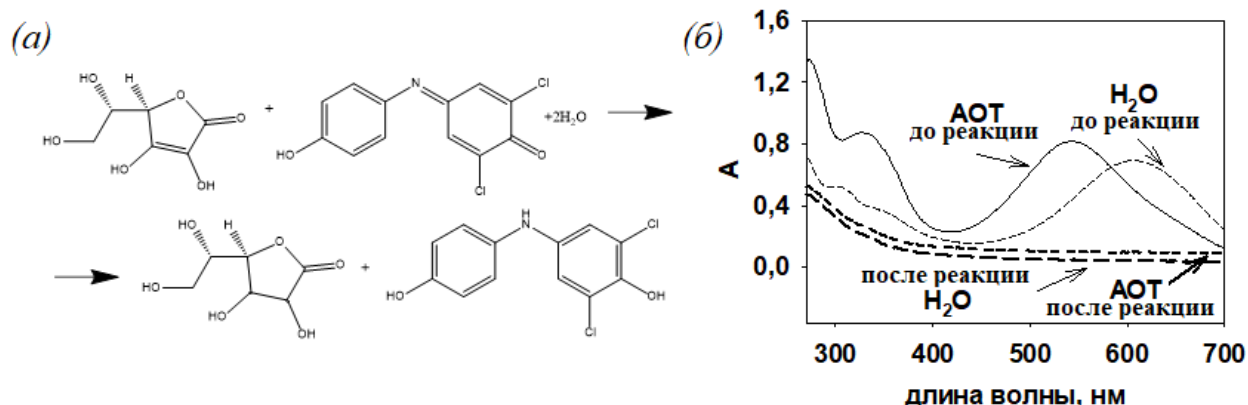


Рисунок 26. (а) – реакция аскорбата с красителем ДХФИФ, **(б)** – спектры 120 мкМ ДХФИФ до и после реакции с 1 мМ аскорбатом.

Сравнение каталитических параметров электроноакцепторов AtGALDH. Для оценки применимости изученных ЭА были определены основные каталитические параметры систем, в том числе соотношение скоростей основной и фоновой реакций, максимальная начальная скорость, константы Михаэлиса K_M (для основного и второго субстрата). Скорость основной реакции для каждого ЭА рассчитывали как разницу скоростей в присутствии и в отсутствие AtGALDH (фоновый сигнал). Для определения K_M для субстрата и ЭА (второго субстрата), а также максимальной скорости была проведена серия экспериментов с поочередным изменением концентрации каждого из субстратов и проанализированы соответствующие графики в координатах Лайнуивера–Берка (рис. 27). Для каждого ЭА pH обеих сред (водной и мицеллярной) составлял 8,8 (что соответствует оптимуму pH AtGALDH [117]), за исключением БХ, для которого было выбрано значение pH 7,8 (более щелочная среда вызывает автоокисление данного ЭА [40] и приводит к снижению отношения сигнал/шум). Примеры графиков, использованных для расчета каталитических параметров, приведены на рис. 27.

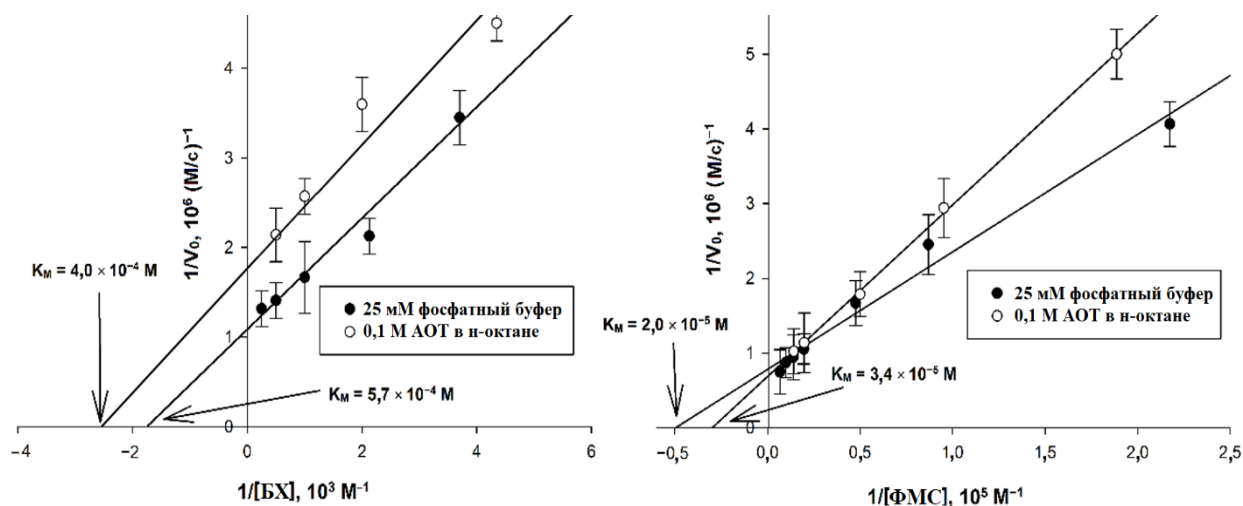


Рисунок 27. Двойные обратные координат для систем с использованием БХ и ФМС (с различной концентрацией ЭА), для которых использовались среды с рН 7,8 и 8,8 соответственно. Условия: [AtGALDH] = 6 нМ, [ГЛ] = 1 мМ. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

Рассчитанные каталитические параметры, а также оптимальные длины волн и соответствующие разницы молярных коэффициентов поглощения окисленной и восстановленной форм изучаемых ЭА представлены в табл. 11.

Таблица 11. Параметры изучаемых ЭА в водных и мицеллярных средах. Условия: [AtGALDH] = 6×10^{-9} М. В экспериментах по определению K_M для ЭА: [ГЛ] = 1 мМ. Концентрации ЭА: [цитохром С] = 2–150 мкМ, [БХ] = 0,1–4 мМ, [ТМФД] = 0,1–8 мМ, [ФМС] = 2–150 мкМ в водной фазе и [ФМС] = 1–70 мкМ в мицеллярной среде соответственно. В экспериментах по определению K_M для ГЛ: [ГЛ] = 0,1–2 мМ, концентрации ЭА: [цитохром С] = 100 мкМ, [БХ] = 2 мМ для БХ, [ТМФД] = 25 мкМ, [ФМС] = 50 мкМ, а также [ФМС] = 70 мкМ и [ДХФИФ] = 100 мкМ при их совместном использовании.

ЭА	Среда	K_M (ЭА), мМ	K_M (субстрат), мМ	$V_{\max}$, мкМ/с	$V_{\max}/V_{\text{фон}}$	$\epsilon_{\text{окисл-восст}} \cdot 10^3, \text{ М}^{-1}\text{см}^{-1} (\lambda, \text{ нм})$
Цитохром С	Водная фаза	$0,071 \pm 0,002$	$0,17 \pm 0,01$	$1,3 \pm 0,1$	460	21 (550)
1,4-бензохинон	Водная фаза	$0,57 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,04$	7	2,3 (290)
	Мицеллы	$0,40 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,03$	$0,52 \pm 0,07$	6	2,3 (290)
Тетраметилфенилендиамин	Водная фаза	$1,0 \pm 0,1$	$0,20 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,03$	2,7	8,4 (590)
	Мицеллы	$2,7 \pm 0,2$	$0,27 \pm 0,03$	$2,6 \pm 0,3$	13	7,8 (605)
ФМС	Водная фаза	$0,022 \pm 0,003$	$0,21 \pm 0,02$	$1,3 \pm 0,1$	6	25 (388)

	Мицеллы	$0,034 \pm 0,002$	$0,23 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,2$	10,7	25 (388)
ФМС + 2,6- дихлорфе- нолиндо- фенол	Мицеллы	$0,028 \pm 0,001$	$0,21 \pm 0,02$	$1,2 \pm 0,1$	160	11,9 (550)

*Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

Использование предлагаемых ЭА (ТМФД и ФМС) даёт преимущества по сравнению с БХ: обладая примерно одинаковым соотношением сигнал/шум (за исключением комбинации ФМС и ДХФИФ), эти ЭА позволяют проводить измерения при рН-оптимуме AtGALDH (рН 8,8). Кроме того, сравнение БХ и других изучаемых ЭА показало, что БХ имеет наименьшую разницу молярных коэффициентов поглощения окисленной и восстановленной форм. Наибольшая разница молярных коэффициентов поглощения как в водной, так и в мицеллярной средах наблюдалась в случае ФМС ($25\,000\text{ М}^{-1}\text{см}^{-1}$ при 388 нм). Однако полученные данные свидетельствуют о том, что ФМС, несмотря на наибольшую разницу молярных коэффициентов поглощения (по сравнению с другими ЭА из табл. 11), менее эффективен для определения активности AtGALDH в обращённых мицеллах по сравнению с комбинацией ФМС и ДХФИФ ввиду меньшего соотношения аналитического и фонового сигналов (соотношения равны 10,7 и 160 соответственно, при этом разницы молярных коэффициентов поглощения отличаются всего в 2 раза).

Чтобы сравнить ЭА по другим параметрам и, соответственно, выяснить, какие ЭА наиболее подходят для определения активности AtGALDH в системе обращённых мицелл, следует отметить, что среда (водная или мицеллярная) не оказывает существенного влияния на K_M как в случае ЭА (табл. 11), так и в случае основного субстрата (наблюдаемые незначительные различия в K_M могут быть связаны с перераспределением субстрата между водной и органической фазами). Однако в мицеллярной среде возможно незначительное увеличение соотношения сигнал/шум (для ФМС и ТМФД). Как K_M (субстрат), так и $V_{\text{макс}}$ для исследованных ЭА различались незначительно (средние значения составляли $2 \cdot 10^{-4}\text{ М}$ и $1 \cdot 10^{-6}\text{ М/с}$, соответственно), тогда как K_M (ЭА) находилось в диапазоне 10^{-3} – 10^{-5} М (наименьшее и наибольшее значение составляют $2,0 \cdot 10^{-5}\text{ М}$ и $2,7 \cdot 10^{-3}\text{ М}$ для ФМС и ТМФД, соответственно).

При сопоставимых значениях K_M (для основного субстрата и для ЭА) и $V_{\text{макс}}$ предпочтение следует отдать ЭА, обладающему одновременно наибольшей разницей молярных коэффициентов поглощения окисленной и восстановленной форм и

максимальным соотношением скоростей основной и фоновой реакций (сигнал/шум). Среди исследуемых ЭА этому требованию удовлетворяет комбинация ФМС и красителя ДХФИФ (все остальные ЭА, за исключением самого ФМС без красителя, имеют меньшую разницу коэффициентов поглощения, а сам ФМС имеет небольшое соотношение сигнал/шум). Кроме того, значение K_M для этой комбинации (как и для ФМС в отдельности) также является одним из самых низких среди изучаемых ЭА.

На основании полученных данных были предложены следующие условия для измерения каталитической активности AtGALDH: pH 8,8, в качестве ЭА использование 120 мкМ ФМС в сочетании с 120 мкМ красителем ДХФИФ (длина волны 550 нм в мицеллярной среде и 600 нм в водной среде), концентрация L-галактоно-1,4-лактона 0,1-1 мМ. Учитывая сходство (гомологичность) TcGAL и AtGALDH, этот подход был применен для измерения активности TcGAL в дальнейших исследованиях с использованием 1 мМ D-арабиноно-1,4-лактона вместо L-галактоно-1,4-лактона.

Разработанный нами подход имеет ряд преимуществ по сравнению с описанным ранее [9], поскольку предложенная комбинация ФМС и ДХФИФ может применяться при оптимальных значениях pH TcGAL и AtGALDH и обеспечивает высокое соотношение скоростей основной и фоновой реакций (соотношение сигнал/фон = 160). Кроме того, метод может быть применен и для ряда других дегидрогеназ с использованием тех же ЭА или их аналогов (например, в случае пирролохинолинхинон глюкозодегидрогеназы [118] или липоамиддегидрогеназы [48]).

3.2. Влияние состава липидной матрицы на активность TcGAL и AtGALDH в системе обращённых мицелл

3.2.1. Олигомерный состав AtGALDH в системе обращённых мицелл АОТ

Следует заметить, что активность мембранотропных ферментов TcGAL и AtGALDH может зависеть не только от структуры выбранного ЭА, но и от состава мицеллярной матрицы, моделирующей природное мембранное окружение этих ферментов. Ключевым параметром системы обращённых мицелл являются размеры их внутренней полости, которые можно регулировать, варьируя степень гидратации W_0 , определяемую мольным соотношением воды и ПАВ [78]. Максимальная активность ферментов в мицеллярных системах наблюдается при степени гидратации W_0 , когда размер внутренней полости мицеллы соответствует геометрическим параметрам сольбилизируемого фермента.

Зависимости каталитической активности ферментов в системах обращённых мицелл, как правило, имеют колоколообразный вид с максимумами активности при значениях степени гидратации W_0 , при которых ферменты функционируют в той или иной олигомерной форме (мономер, димер и т.д.) [48][83]. Зависимости каталитической активности AtGALDH и TcGAL от степени гидратации в мицеллах AOT с применением ФМС в качестве ЭА (здесь и далее при изучении состава мицеллярной матрицы использовали ФМС) также имеют профиль с двумя оптимумами активности (зависимости на рис. 28 (а) и (б)), которые предположительно соответствуют активности функционированию этих ферментов в виде мономерной и димерной форм.

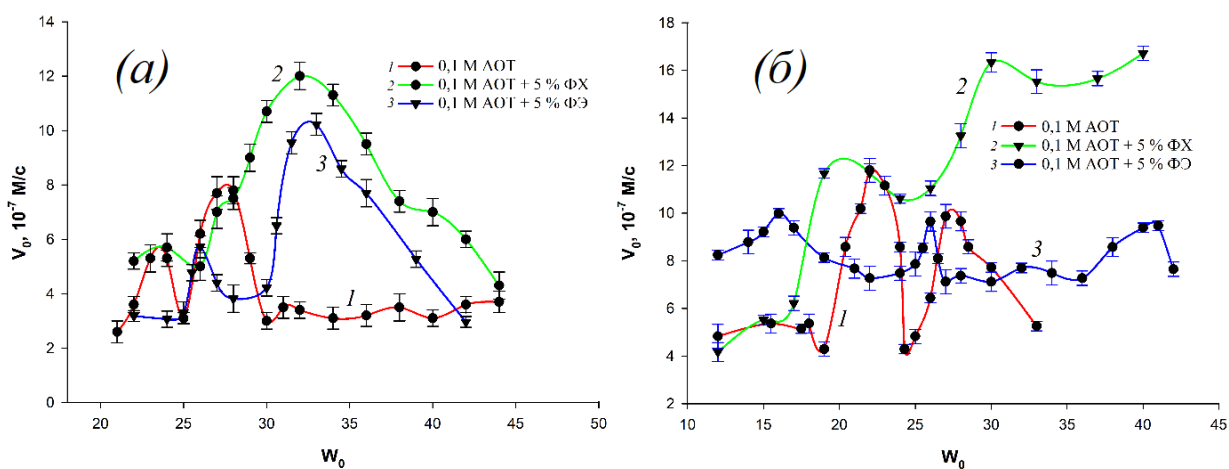


Рисунок 28. Профили каталитической активности AtGALDH (а) и TcGAL (б) в системе обращённых мицелл 0,1 М АОТ в н-октаноле в отсутствие липидов, при добавлении 5 % ФХ и при добавлении 5 % ФЭ. Условия: [ФМС] = 120 мкМ, [ДХФИФ] = 120 мкМ, [AtGALDH] = 6 нМ, [TcGAL] = 34 нМ, [ГЛ] = [АЛ] = 1 мМ, pH 8,8, λ = 550 нм, 25 °С.

Для подтверждения этого предположения использовали седиментационный анализ. На рис. 29 представлены седиментограммы образцов AtGALDH-содержащих мицелл при степенях гидратации $W_0 = 21$, где наблюдается первый оптимум активности, и при $W_0 = 28$, предположительно, в области существования димерной формы (где мономерная форма заведомо отсутствует).

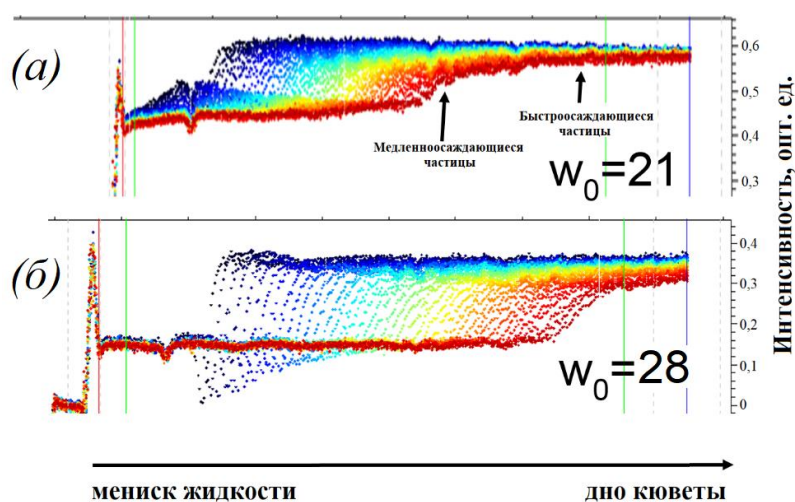


Рисунок 29. Экспериментальные седиментационные кривые для мицелл, содержащих AtGALDH, при степенях гидратации $W_0 = 21$ (а) и 28 (б). Горизонтальная ось показывает расстояние между мениском жидкости и дном ячейки.

На седиментограммах AtGALDH наблюдаются две выраженные ступени у каждой из кривых. Нижняя ступень (медленно оседающие частицы) – ближе к мениску жидкости – соответствует «пустым» мицеллам. Верхняя ступень (быстро осаждающиеся частицы) – ближе ко дну кюветы – представляет собой белок-содержащие мицеллы. Каждая кривая записывалась в определенное время ($t_n > t_{n-1} > \dots > t_3 > t_2 > t_1$, где t_n соответствует синей кривой, а t_1 – красной кривой). Общая продолжительность измерений 60 мин. Коэффициенты седиментации S_p и S_0 при степенях гидратации $W_0 = 21$ и 28 для фермент-содержащих и пустых мицелл определены согласно уравнению [119]:

$$M_p = M_0 \left(\frac{S_p}{S_0} - 1 \right) (1 - \rho V_0), \quad (1)$$

С применением эмпирической формулы (1) исходя из значений коэффициентов седиментации S_p , определили молекулярную массу фермента M_p , для степени гидратации 21 и 28 (табл. 12).

Таблица 12. Параметры AtGALDH-содержащих и пустых мицелл, рассчитанные по данным седиментационного анализа.

W_0	S_p	S_0	$1-\rho V$	M_0 , кДа	M_p , кДа
21	29 ± 1	17 ± 1	$0,353 \pm 0,005$	251 ± 11	66 ± 5
28	46 ± 2	32 ± 1	$0,341 \pm 0,002$	739 ± 17	111 ± 9

Примечание. Обозначения как для уравнения (1).

Рассчитанная молекулярная масса фермента M_p при $W_0 = 28$ примерно в 2 раза превышает рассчитанное значение M_p при $W_0 = 21$. Это подтверждает предположение о том,

что оптимумы на профиле каталитической активности соответствуют наличию в системе мономерной и димерной форм. Молекулярная масса фермента – 58,8 кДа, однако известно, что фермент имеет вытянутую вдоль одной из осей структуру [9], поэтому незначительное увеличение кажущейся массы при степени гидратации, соответствующей мономеру, является закономерным. Таким образом, показано, что в мицеллярной системе AtGALDH может существовать в двух различных олигомерных формах (при $W_0 = 21\text{--}22$ функционирует мономер, при $W_0 \geq 28$ – димер). Отметим, что в водной фазе фермент AtGALDH функционирует только в мономерной форме – как показано методом гельфильтрационной хроматографии [6].

Для подтверждения полученных данных седиментационного анализа мы рассчитали экспериментальные радиусы предполагаемой мономерной и димерной форм для AtGALDH и TcGAL, исходя из их профилей каталитической активности (рис. 28, (а) и (б), зависимости, выделенные красным) по эмпирическому уравнению [120]:

$$r_p(\text{\AA}) = r_m(\text{\AA}) = 1,5 \cdot W_0 + 4 \quad (2)$$

где r_m - внутренний радиус мицелл, r_p - максимальный радиус белка (половина длины наибольшей оси белка). Рассчитанные нами, согласно уравнению (2), радиусы предполагаемых мономерной ($r_p = 38,5 \text{ \AA}$) и димерной ($r_p = 44,5 \text{ \AA}$) форм для AtGALDH близки по значению к ранее найденным из 3D-моделирования для TcGAL [9] ($r_p = 36,5 \text{ \AA}$ и $r_p = 47 \text{ \AA}$ для мономера и димера, соответственно) (табл. 13).

Таблица 13. Сравнение радиусов для AtGALDH и TcGAL.

Форма	r_p^* , А (AtGALDH)	r_p , (теор.) А (TcGAL)**	r_p^* , А (TcGAL)
Мономер	$38,5 \pm 0,3$	36,5	$37,5 \pm 0,2$
Димер	$44,5 \pm 0,2$	47,0	$45 \pm 0,3$

* Рассчитаны с использованием уравнения (2)

**Литературные данные (радиусы TcGAL, рассчитанные согласно 3D-моделированию) [9]

Полученные результаты подтверждают наше предположение о функционировании AtGALDH и TcGAL в мицеллах АОТ в виде двух олигомерных форм (мономерной и димерной).

3.2.2. Влияние липидных добавок и мицеллообразующего ПАВ на активность AtGALDH и TcGAL

Основными липидными компонентами митохондриальных мембран *T. cruzi* являются фосфолипиды ФХ и ФЭ, вместе составляющие более 70% от общего количества фосфолипидов [122][123]. ФХ характеризуется объёмной полярной «головной» группой и склонен к образованию ламеллярных структур. В то же время ФЭ склонен образовывать сферические обращённо-фазовые структуры (обращённые мицеллы) [83]. Степень кривизны в случае ФЭ меньше чем в мицеллах АОТ, поскольку у АОТ гидрофобная часть шире. Помимо геометрии молекул, ФХ и ФЭ различаются также по степени выраженности заряда аминогруппы: ФХ несёт положительный заряд холиновой группы (четвертичная амино-группа, в которой атомы водорода замещены на метильные группы), в то время как амино-группа ФЭ имеет $pK_a = 9,6$ и при слабощелочных $pH\ 8,0$ также положительно заряжена [124].

В работе для исследования влияния ФХ и ФЭ на активность AtGALDH и TcGAL использовали системы 0,1 М АОТ, содержащие 5% ФХ или ФЭ (масс. %). Известно, что даже малые концентрации липидов (2%) могут усиливать или подавлять активность ферментов в несколько раз, как показано нами ранее на примере кислой фосфатазы в системах обращённых мицелл АОТ [83]. Обнаружено, что добавление каждого из липидов драматически изменяет профиль зависимости каталитической активности AtGALDH от степени гидратации, по-разному влияя на активность фермента (рис. 28, (а)).

Добавление ФХ приводит к увеличению активности обоих ферментов и к размытию пика при высоких степенях гидратации ($W_0 > 30$). В то же время добавление ФЭ по-разному влияет на TcGAL и AtGALDH. В случае AtGALDH добавление ФЭ приводит к аналогичному размытию пика в области $W_0 = 30-35$, как и в случае добавления ФХ к TcGAL. В случае TcGAL при добавлении ФЭ наблюдается дополнительный оптимум активности при $W_0 = 40$. (рис. 28, (б)).

Наблюдаемое возрастание активности AtGALDH и TcGAL в присутствии ФХ может быть связано со снижением плотности отрицательного заряда АОТ на поверхности раздела фаз. Включение ФХ в мицеллярную систему может способствовать лучшему взаимодействию фермента с поверхностью раздела фаз (меньше степень отталкивания фермента от отрицательной поверхности раздела фаз, образованной АОТ, и высокое сродство фермента с мембранным фосфолипидом). Кроме того, заряд мицеллярной матрицы может влиять на стабилизацию той или иной формы кофактора в активном центре.

Так, положительный заряд в области вблизи локуса N1-C2 изоаллоксази- нового кольца флавина у AtGALDH может стабилизировать анионную форму двухэлектронного восстановленного флавина [6].

Ранее было показано, что включение фосфолипидов, несущих заряженные аминокислоты, в мицеллярную систему может играть существенную роль при взаимодействии мембранотропных ферментов с мицеллярной матрицей: например, в случае кислой фосфатазы добавление фосфолипидов, склонных снижать плотность отрицательного заряда и тем самым повышать локальный pH вблизи поверхности раздела фаз, снижает активность фермента [83].

Помимо влияния заряда следует учитывать и возможное изменение размеров мицелл АОТ в присутствии ФХ или ФЭ. Например, в литературе отмечается, что 10%-ная добавка ФХ уменьшает радиус мицелл АОТ (примерно в 1,5 раза) [83]. Однако в нашем случае диаметры мицелл АОТ в присутствии 5% ФХ или 5% ФЭ (определённые методом ДРС) не изменены по отношению к исходной системе АО, и изменение диаметра мицелл можно считать несущественным фактором в плане влияния на активность AtGALDH и TcGAL. (рис. 30).

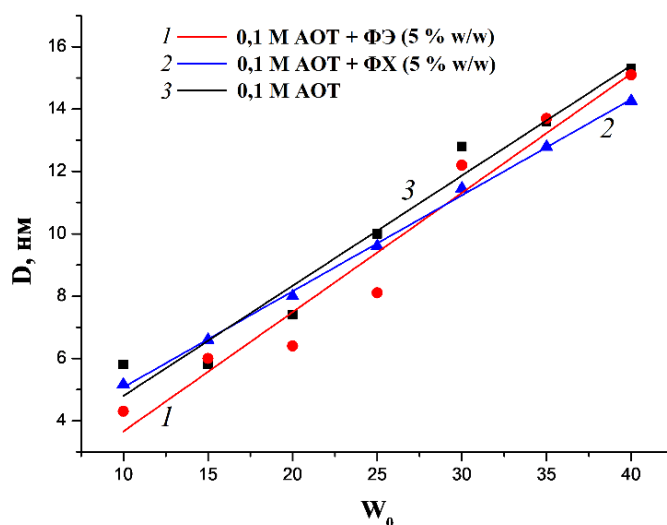


Рисунок 30. Зависимости диаметра мицелл от степени гидратации по данным ДРС. Мицеллы АОТ с добавлением ФЭ или ФХ (5% w/w) и мицеллы АОТ без липидных добавок – прямые (1), (2) и (3) соответственно.

Другим возможным фактором может быть образование тетрамерной формы AtGALDH и TcGAL (при $W_0 > 30$). На основании анализа ряда ферментов в литературе приводится корреляция между молекулярной массой фермента M_6 и оптимальной степенью гидратации $W_{0, \text{опт}}$ в мицеллах АОТ, описываемая эмпирическим уравнением [120]:

$$W_{0, \text{опт}} = 0,5 \sqrt[3]{M_6} - 2,7 \quad (3)$$

Исходя из этого уравнения, ожидаемая степень гидратации $W_{0, \text{опт}}$ для предполагаемого тетрамера AtGALDH с $M_p = 264$ кДа составляет 30 и более (30–34 – в нашем случае).

С другой стороны, можно предположить, что оптимум активности AtGALDH при $W_0 = 30\text{--}34$ может быть обусловлен образованием липопротеидных комплексов различного состава, которые были обнаружены и для других мембранотропных ферментов (в т.ч. для кислой фосфатазы [83]). В пользу этого предположения говорит сильная размытость пика при $W_0 = 30\text{--}34$, в то время как для тетрамерной формы было бы характерно наличие более узкого оптимума, как, например, для тетрамеров лактатдегидрогеназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [125].

Учитывая сходство TcGAL и AtGALDH, а именно: высокую гомологию (консервативность) активных центров TcGAL и AtGALDH [21], общую катализируемую реакцию и общий ЭА, близкие размеры мономерной и димерной форм ферментов и сходство каталитических профилей в мицеллах АОТ, можно предположить, что оптимум активности при $W_0 = 30\text{--}34$ в случае TcGAL, также, как и в случае AtGALDH, соответствует функционированию тетрамерной структуры фермента и/или формированию липопротеидного комплекса. Формирование таких комплексов может быть установлено различными подходами, включая такой распространённый метод как ИК-спектроскопия.

Изучение связывания AtGALDH с ФХ методом ИК-спектроскопии. Образование белок-липидного комплекса AtGALDH–ФХ было изучено по влиянию фермента на ИК-спектр ФХ (рис. 31).

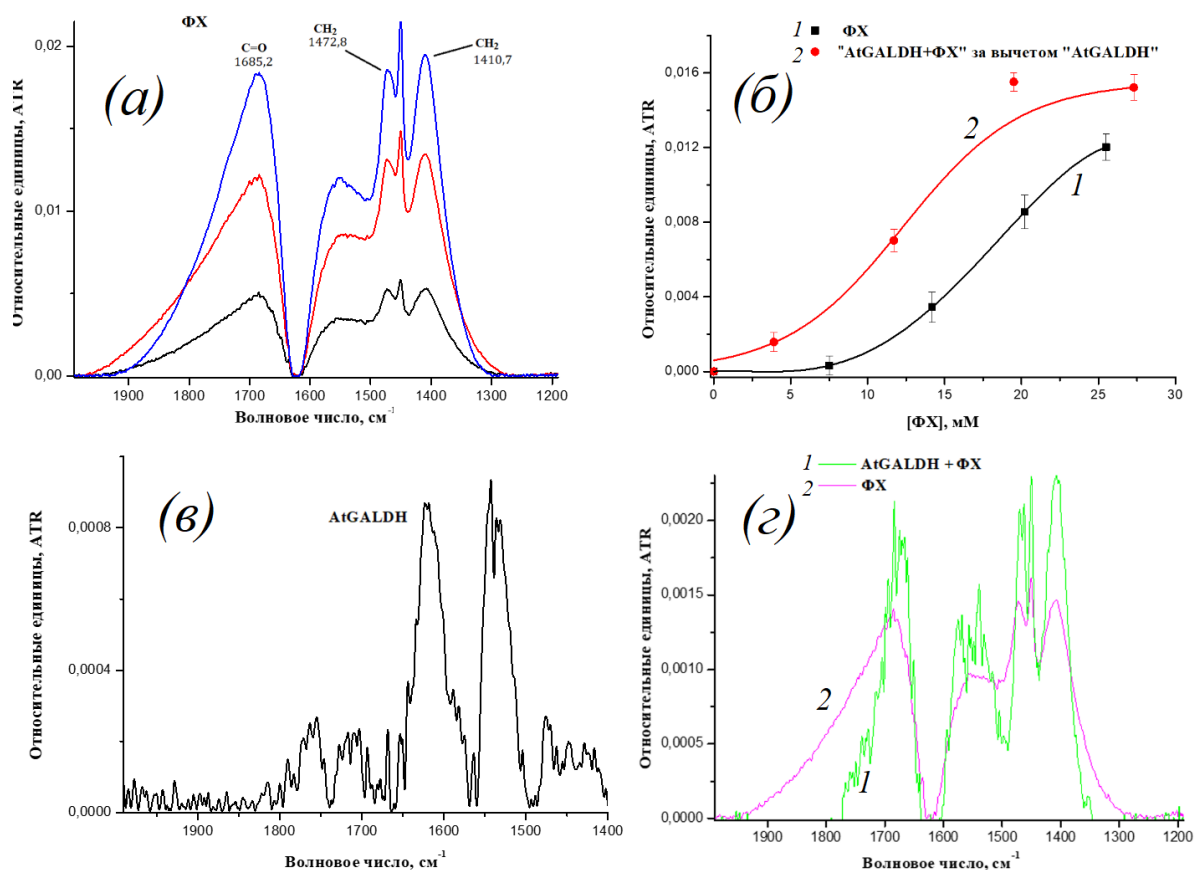


Рисунок 31. (а) - ИК-спектры водных растворов 10–25 мМ ФХ, (б) – Поглощение при 1550 см^{-1} для водных растворов 0–25 мМ ФХ (кривая 1) и смеси 70 мкМ AtGALDH и 0–27 мМ ФХ за вычетом фонового спектра AtGALDH (кривая 2), (в) – ИК-спектр 70 мкМ водного раствора AtGALDH, (г) – Сравнение спектра смеси AtGALDH (70 мкМ) и ФХ (4 мМ) за вычетом фонового спектра AtGALDH (кривая 1) со спектром водного раствора ФХ (4 мМ, кривая 2).

В ИК-спектре ФХ наблюдаются аналитические пики, соответствующие валентным колебаниям карбонильной группы ($\text{C}=\text{O}$) при 1685 см^{-1} и деформационным колебаниям CH_2 -группы при 1472 и 1411 см^{-1} . ИК-спектр фермента содержит классические полосы поглощения: амид 1 и амид 2 в интервалах 1500–1600 и 1600–1700 см^{-1} , характерные для белков [126]. В присутствии фермента форма ИК-спектра ФХ значительно отличается от спектра исходного ФХ, что указывает на связывание AtGALDH с ФХ. Наибольшие различия в спектрах ФХ и комплекса AtGALDH–ФХ наблюдаются в области карбонильной группы при 1680 см^{-1} и при 1550 см^{-1} (двойные связи остатков жирных кислот) (рис. 31, (г)). Эти различия обусловлены тем, что $\text{C}=\text{O}$ и CH_2 -группы жирнокислотных остатков в ФХ меняют своё микроокружение в присутствии фермента, что указывает на связывание фермента на поверхности раздела фаз липид (ФХ)-вода. На рис. 31, (б) представлена зависимость интенсивности пиков при 1550 см^{-1} от концентрации ФХ для свободного фосфолипида и ФХ в присутствии AtGALDH (за вычетом фонового спектра AtGALDH).

Разный ход кривых указывает на образование комплекса AtGALDH–ФХ: при отсутствии взаимодействия между AtGALDH и ФХ ожидалось бы совпадение кривых (рис. 31, (г)).

Изучение связывания AtGALDH с ФХ методом поляризации флуоресценции. Метод поляризации флуоресценции, применяемый для количественной оценки реакций ассоциации белков с лигандами [84], основан на увеличении поляризации флуорофора при его связывании с другими молекулами за счёт снижения скорости вращения флуорофора. В настоящей работе метод был использован для изучения связывания AtGALDH с ФХ путём слежения за флуоресценцией FAD, кофактора фермента, в качестве флуорофора. Наблюдаемое тушение флуоресценции FAD-кофактора, а также увеличение поляризации AtGALDH при возрастании концентрации ФХ (рис. 32, (а) и (б)) свидетельствуют об образовании комплекса AtGALDH–ФХ. Аналогичное возрастание поляризации флуоресценции описано в литературе для связывания аполипопротеина А1 с ФХ [127].

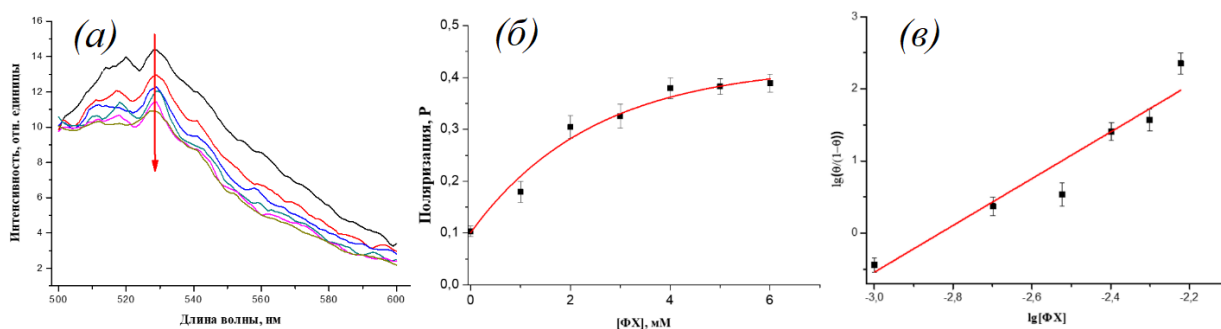


Рисунок 32. Спектры флуоресценции смеси AtGALDH (2,4 мкМ) и ФХ ($\lambda(\text{возб.}) = 450 \text{ нм}$), стрелкой показано увеличение концентрации ФХ от 0 до 6 мМ **(а)**; поляризация флуоресценции P смеси AtGALDH (2,4 мкМ) и ФХ (1–6 мМ) ($\lambda(\text{возб.}) = 450 \text{ нм}$, $\lambda(\text{эмис.}) = 530 \text{ нм}$) **(б)**; обработка данных по поляризации флуоресценции в координатах Хилла **(в)**. Условия: [AtGALDH] = 2,4 мкМ, [ФХ] = 1–6 мМ, водная фаза, pH 8,8, $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Полученную зависимость поляризации флуоресценции от концентрации ФХ (рис. 32, (б)) обрабатывали в двойных логарифмических координатах (линейная форма эмпирического уравнения Хилла (4)) (рис. 32, (в)), широко использующихся для обработки экспериментальных данных по связыванию лигандов с биологическими объектами (ферментами, рецепторами и др.) [128].

$$\lg \left(\frac{\theta}{1 - \theta} \right) = n * \lg[\text{ФХ}] - n * \lg K_{0,5}, \quad (4)$$

где $\theta = (P_{\text{образца}} - P_{\text{min}})/(P_{\text{max}} - P_{\text{min}})$.

Определённый из графиков на рис. 32 параметр Кд, (кажущаяся константа диссоциации), оценивается как 2 мМ, а наименьшее число центров связывания $n = 3$. Таким образом, данные, полученные методом поляризации флуоресценции, говорят об эффекте комплексообразования фермента с ФХ, что объясняет появление размытых оптимумов (при $W_0 > 30$) в случае добавления ФХ и ФЭ в профили каталитической активности AtGALDH и TcGAL.

Влияние мицеллообразующего ПАВ на активность TcGAL и AtGALDH. Активность мембранотропных ферментов в системах обращённых мицелл существенно зависит от природы ПАВ – нейтральной, катионной или анионной, и структурных особенностей формирующихся мицелл. Также имеет значение наличие относительно широкой области существования мицелл на фазовых диаграммах: в случае узкой области изучать фермент можно лишь в ограниченном интервале значений степени гидратации W_0 [129].

В представленной работе изучено функционирование TcGAL и AtGALDH в мицеллах на основе нейтрального и катионного ПАВ на примере Бридж-96 и ЦТАБ. В случае как TcGAL, так и AtGALDH (рис. 33) при использовании нейтрального ПАВ Бридж-96 или смешанных мицелл, содержащих ЦТАБ, в профилях активности обоих ферментов наблюдается один основной пик при низких степенях гидратации ($W_0 < 20$), то есть регистрируется функционирование только мономерной формы.

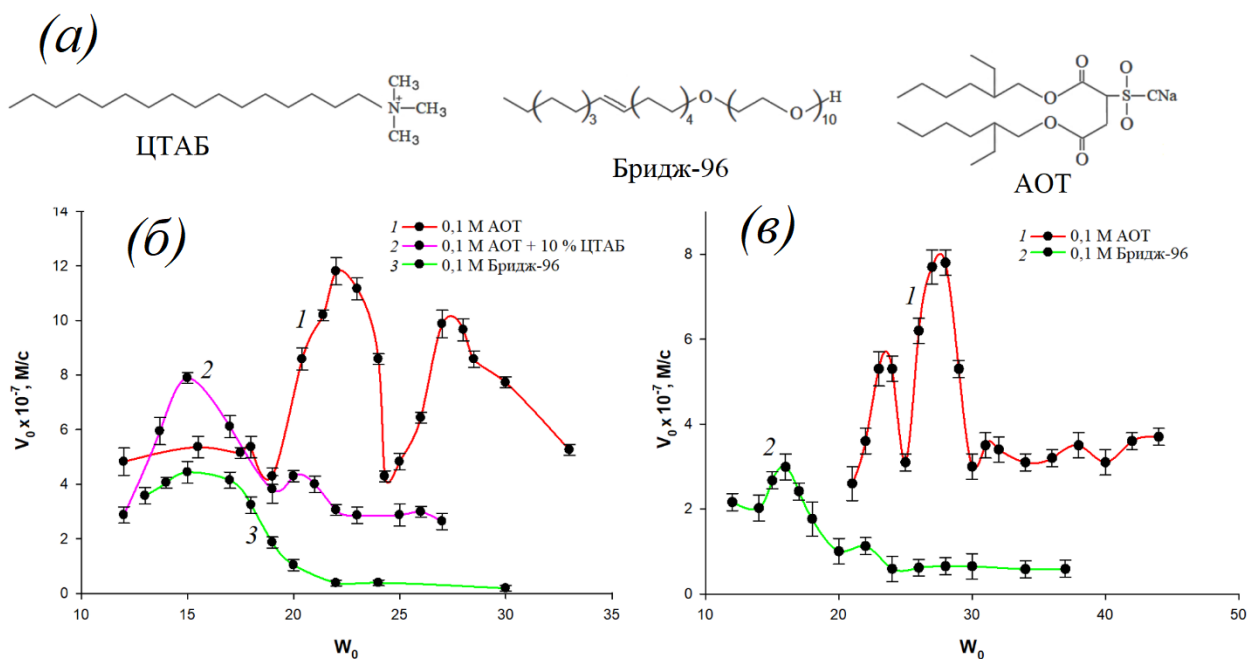


Рисунок 33. Влияние природы мицеллообразующего ПАВ (а) на активность TcGAL (б) и AtGALDH (в) в системах обращённых мицелл. Условия общие для (б) и (в): [ФМС] = [ДХФИФ] = 120 мкМ, pH 8,8, $\lambda = 550$ нм, 25 °С. Условия для (б): [AtGALDH] = 6 нМ, [ГЛ] = 1 мМ, условия для (в): [TcGAL] = 34 нМ, [АЛ] = 1 мМ.

Отметим, что стабильные фермент-содержащие мицеллы на основе Бридж-96 формируются при низких степенях гидратации ($W_0 < 20$), при более высоких W_0 наблюдается фазовое расслоение системы [130].

Наблюдаемая активация мономерной формы TcGAL при $W_0 = 15$ (в случае ЦТАБ-содержащих мицелл), вероятно, как и в случае ФХ и ФЭ, обусловлена положительным зарядом ЦТАБ («разбавляющим» отрицательный заряд поверхности раздела фаз у АОТ). Усиление ферментативной активности в ЦТАБ-содержащих мицеллах наблюдалось и ранее для других ферментов – тирозиназы и холестеролоксидазы, в случае которых в диапазоне $W_0 = 10\text{--}20$ использование мицелл на основе ЦТАБ обеспечивало большую активность фермента по сравнению с мицеллами АОТ [131][132]. Следует отметить, что разница во влиянии ЦТАБ и липидов ФХ и ФЭ обусловлена склонностью к образованию различных надмолекулярных структур этих ПАВ: в силу геометрических характеристик ЦТАБ (объёмная полярная голова и узкий гидрофобный «хвост»; рис. 33, (а)) склонен к образованию прямых мицелл в среде с преобладанием водной фазы, в то время как ФХ и ФЭ имеют тенденцию к образованию ламеллярной структуры и обращённых мицелл, соответственно. Таким образом, изменение активности фермента в присутствии ЦТАБ объясняется влиянием ЦТАБ на структуру обращённых мицелл АОТ: локальным изменением радиуса кривизны и формированием дефектов в мицеллярной матрице (существенно в большей степени, чем в случае ФХ и ФЭ).

Полученные данные говорят о существенном влиянии липидной матрицы на функционирование мембранотропных ферментов TcGAL и AtGALDH. Установлено, что в присутствии фосфолипидных добавок (ФХ и ФЭ) в мицеллярных системах происходят существенные изменения в профилях активности обоих ферментов за счёт изменения плотности заряда мицеллярной матрицы и изменения олигомерной структуры и радиуса кривизны мицелл. Наблюдается формирование липопротеидных комплексов, реализация более оптимальной конформации ферментов и т.д. Обнаружено, что активность TcGAL и AtGALDH сильно зависит от природы мицеллообразующего ПАВ: смешанные мицеллы на основе анионного и катионного ПАВ (АОТ + ЦТАБ) повышают активность фермента при $W_0 = 15$, однако при более высоких значениях W_0 наблюдается снижение каталитической активности. Различие во влиянии ЦТАБ и липидов обусловлено склонностью ЦТАБ в силу геометрии молекулы к образованию прямых мицелл (у ФХ и ФЭ – ламеллярная структура и обращённые мицеллы), что нарушает структуру обращённых мицелл АОТ и локально изменяет радиус кривизны мицелл.

3.3. Ингибиторный анализ TcGAL и AtGALDH: влияние ликорина

3.3.1. Оценка ингибирующей активности ликорина в отношении TcGAL

Проведённые выше исследование свойств ряда ЭА для TcGAL и AtGALDH и изучение влияния состава мицеллярной матрицы (добавки фосфолипидов и варьирование природы ПАВ) позволяют использовать как основу для скрининга потенциальных ингибиторов TcGAL (возможных лекарств против болезни Шагаса и Сонной болезни). В качестве отправной точки был выбран ликорин, использующийся в качестве лекарственного средства и известный как высокоспецифичный ингибитор L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ из различных источников, таких как *Ipomoea batatas* [106] и *Zea mays* [133]. Для предварительной оценки применимости ликорина как ингибитора TcGAL представляется логичным сравнить аминокислотные последовательности вышеописанных дегидрогеназ с последовательностями TcGAL и AtGALDH, изучаемых в настоящей работе.

Выполнив множественное выравнивание TcGAL, AtGALDH и двух L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ из *Ipomoea batatas* и *Zea mays*, соответственно (последние два ингибируются ликорином [106][133]), мы обнаружили наличие общих остатков Glu и Arg в активных центрах ферментов (обведены красным на рис. 34) и высокое сходство окружения этих аминокислотных остатков (сходные положения выделены на рис. 34 темным и светло-серым цветом, соответственно). Кроме того, имелся консервативный остаток Cys (обведен красным на рис. 34), который, как показано авторами [41], также играет важную роль в катализе L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы.

AtGALDH	400	-----LALDPLNDVHVAKVNOAEAEFWKKSEGYRVGWSDEILGFTICGGQQWVSESCFP	452
IbGALDH	374	-----LALDPLNTDHSVKKTNQAEAEFWKKSEGYRVGWSDEILGFTICGGHQWVSETCFP	426
ZmGALDH	373	-----LALDPLDKDHVVKINKAEAEYWKSEGYRMGWSDEILGFTICGGQQWVSENCFP	425
TcGAL	305	HGVVQAALAAATFYPMQPYINRAYRKIFYSAFEVQYGTPIECFTFTCLFKQWACEWAVD	364
AtGALDH	453	AGTLANPSMKDLEYIEELKKLIEKEAIPAPAPTECRWTARSKSPISPAFSTSEDDIFSVV	512
IbGALDH	427	AGTLSPSKMKDLEFIEQLMQLIEKESIPAPAPTECRWTACSKSLMSPAYSSVDDIFSVV	486
ZmGALDH	426	TGTLAKPSMKDLIDYIDKLLQLIEKEEIPAPGPTECRWTARSKSPMSPASSSEDDVFSVV	485
TcGAL	365	A-----SKATEAFALREMTASENFVSFVFVFFFTDADKTALSPAAG-----RKTCTI	413

Рисунок 34. Выравнивание множественных последовательностей AtGALDH, TcGAL и двух L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ из *Ipomoea batatas* (IbGALDH) и *Zea mays* (ZmGALDH), выполненное с помощью Clustal Omega. Используемые номера доступа: AtGALDH, Q9SU56; IbGALDH, Q9ZWJ1; ZmGALDH, A0A3L6FX76; TcGAL, A0A2V2VEI5.

Для выявления наиболее гомологичных ферментов (как изучаемых в данной работе, так и описанных в литературе) также провели попарное выравнивание (используя те же номера доступа, что приведены в описании к рис. 34). Таким образом, AtGALDH демонстрирует идентичность последовательности 53,8 и 73 % в отношении ZmGALDH и IbGALDH соответственно.

Иными словами, AtGALDH и две описанные в литературе L-галактон-1,4-лактондегидрогеназы (ZmGALDH и IbGALDH) не только имеют общие остатки в активном центре, но и обладают высокой степенью гомологии в целом – это позволяет предположить, что AtGALDH, как и ZmGALDH и IbGALDH, также ингибируется ликорином. В то же время TcGAL показал лишь 13,6 и 16,9 % идентичности последовательностей в отношении ZmGALDH и IbGALDH. Однако высокая степень гомологии вблизи активных центров этих ферментов (рис. 34) позволяет предположить возможное ингибирующее действия ликорина и в отношении TcGAL.

Таким образом, на основании вышеизложенного сходства последовательностей можно ожидать аналогичное ингибирующее действие ликорина на активность AtGALDH и TcGAL. Отметим, что IC_{50} в случае ZmGALDH и IbGALDH составлял приблизительно 2 и 68 мкМ соответственно [133][106], поэтому можно предположить, что значения IC_{50} в случае AtGALDH и TcGAL будут примерно такого же порядка.

3.3.2. Эффект ингибирования AtGALDH ликорином в водной среде

Исследование влияния ликорина на активность AtGALDH проводили с использованием ингибитора в интервале концентраций от 0 до 680 мкМ (рис. 35), поскольку согласно литературным данным для дегидрогеназ из *Zea mays* и *Ipomoea batatas* (табл. 14) ингибирующие концентрации ликорина обычно составляют от нескольких десятков до сотен мкМ [106][133].

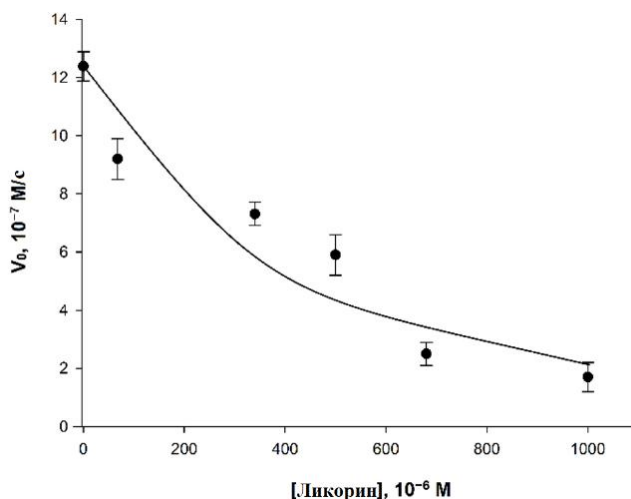


Рисунок 35. Зависимость начальной скорости (V_0) от концентрации ликорина. Условия: [ФМС] = [ДХФИФ] = 120 мкМ, [AtGALDH] = 6 нМ, [ГЛ] = 1 мМ, водная фаза, pH 8,8. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

Для AtGALDH наблюдаемый эффект ингибирования менее выражен, чем для L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ из других источников (табл. 14). Например, L-галактон-1,4-лактондегидрогеназа из *Ipomoea batatas* уже полностью теряет активность при концентрации ликорина 340 мкМ [106], тогда как ингибирующее действие ликорина в отношении AtGALDH составляет лишь 45% (при той же концентрации ингибитора).

Таблица 14. Сравнение ингибирующего действия ликорина на активность L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ из различных источников при ≈ 50 и 90% ингибировании.

Источник L-галактоно-1,4- лактондегидрогеназы	Ингибирование, %	[Ликорин], мкМ	Ссылка
<i>Zea mays</i>	50	2	[133]
<i>Ipomoea batatas</i>	43	68	[106]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	52	500	Данная работа
<i>Zea mays</i>	91	10	[133]
<i>Ipomoea batatas</i>	86	170	[106]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	86	800	Данная работа

Тем не менее, учитывая высокую специфичность ингибитора [133] и его относительно низкую токсичность, а также тот факт, что ликорин является одобренным препаратом [134], ингибирующий эффект ликорина представляется достаточно значимым для дальнейшего изучения его действия на активность AtGALDH в моделях мембран (например, в системе обращённых мицелл AOT).

Механизм ингибирования AtGALDH ликорином. Хотя ликорин известен как ингибитор L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ из различных источников, в литературе отсутствуют данные, описывающие механизм его ингибирования этих ферментов (в т.ч. гомологичных AtGALDH и TcGAL). Авторы [135] полагают, что механизм ингибирования галактонолактонооксидазы ликорином является неконкурентным, поскольку он быстро образует стабильную связь с ферментом (подавление синтеза аскорбата из галактонолактона *in vivo*). Однако эти данные относятся к оксидазам и не могут быть обобщены на L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы, включая AtGALDH. Таким образом, механизм ингибирования L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназ (в том числе из *Arabidopsis thaliana*) ликорином ранее не был описан и изучается в данной работе впервые.

Для установления механизма ингибирования AtGALDH ликорином измеряли активность (начальную скорость) AtGALDH при концентрациях L-галактоно-1,4-лактона в

диапазоне 0,12–1,01 мМ при фиксированных концентрациях ингибитора (0, 0,5 и 1 мМ) в водной фазе (8,8).

Установлено, что ингибирование ликорином влияет как на K_M , так и на $V_{\max}$, причем в неодинаковой степени, что указывает на смешанный механизм ингибирования. На основании полученных данных были рассчитаны каталитические параметры систем (табл. 15), в том числе K_I и K_I' – константы ингибирования, описывающие конкурентную и неконкурентную компоненты ингибирования соответственно, а также так называемая приведенная константа ингибирования $K_{I(\text{приведенная})}$, определяемая как [136]:

$$K_{I(\text{приведенная})} = \frac{K_I K_I'}{K_I + K_I'}$$

Таблица 15. Каталитические параметры систем для определения механизма ингибирования AtGALDH ликорином. Условия: [ликорин] = 0–1 мМ, [AtGALDH] = 6 нМ.

[Ликорин]*, мМ	K_M (субстрат), мМ	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	$k_{\text{кат}}/K_M$, (мМ ⁻¹ · с ⁻¹)	K_I' , мМ	K_I , мМ	$K_{I(\text{приведенная})}$, мМ
0	0,063 ± 0,007	205 ± 6	$3,3 \times 10^3$	0,237 ± 0,031	0,017 ± 0,02	0,016 ± 0,02
0,5	0,220 ± 0,021	125 ± 4	$5,7 \times 10^2$			
1	0,665 ± 0,086	40 ± 1	6,0			

* Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

**в качестве примера из всего диапазона концентраций приводятся три значения концентрации ликорина (0, 0,5 и 1 мМ)

Учитывая соотношение K_I и K_I' , можно сделать вывод, что конкурентная составляющая преобладает над неконкурентной. Другими словами, ликорин действует как смешанный конкурентный ингибитор (что также подтверждается увеличением K_M и снижением $V_{\max}$) согласно классификации, приведенной в работе [137]. В литературе отсутствуют данные о константах ингибирования L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ (в том числе AtGALDH) ликорином, поэтому указанные в табл. 15 константы определены впервые, что может пролить свет на некоторые аспекты ингибирования L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ ликорином.

Принимая во внимание сходство AtGALDH и ряда других ферментов (см. раздел 3.3.1), можно предположить аналогичный (смешанный) механизм ингибирования L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ из других источников, а также гомологичного TcGAL ликорином.

3.3.3. Ингибирование AtGALDH и TcGAL ликорином в мицеллярной среде

Поскольку TcGAL является мембранным ферментом, целесообразно изучить ингибирование модельного AtGALDH с использованием мембранной модели – системы обращённых мицелл AOT, в которой мы проводим рефолдинг TcGAL из телец включения и для которой разработали методику определения активности.

Для изучения ингибирования AtGALDH использовали 0,1 М AOT в н-октане, проводя эксперименты при степени гидратации W_0 в диапазоне 24–44 с добавлением необходимого объёма водной фазы и используя постоянную концентрацию ликорина (800 мкМ) (рис. 37). Для сравнения на рис. 37 также представлены результаты измерений в отсутствие ликорина при различной степени гидратации W_0 .

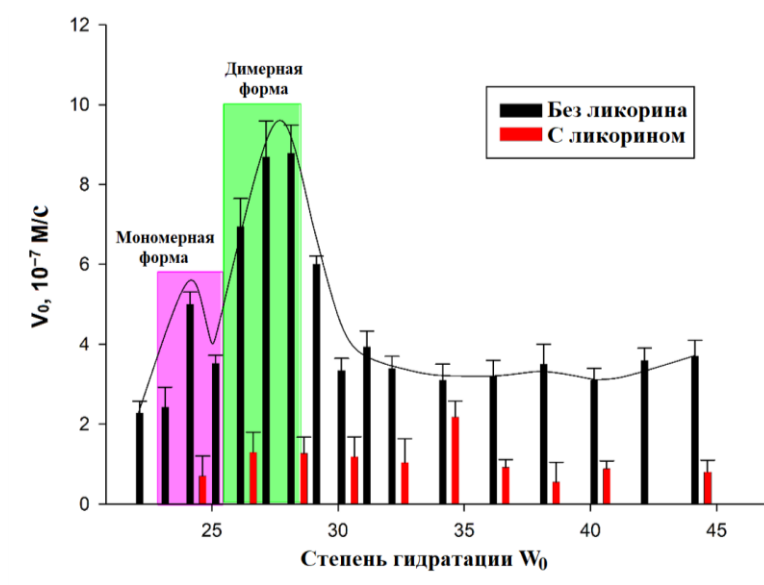


Рисунок 37. Зависимость активности AtGALDH от степени гидратации W_0 в отсутствие и в присутствии 700 мкМ ликорина. Мономерная и димерная формы ферментов наблюдались при степенях гидратации $W_0 = 23$ –25 и 26–28 соответственно. Условия: [AtGALDH] = 6 нМ, [ГЛ] = 1 мМ. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

Установлено, что эффект ингибирования ликорином существенно зависит от степени гидратации W_0 : ингибирование более выражено в случае тех значений W_0 , при которых наблюдаются оптимумы активности AtGALDH в отсутствие ликорина (оптимумы, соответствующие мономерным и димерным формам выделены на рис. 37 розовым и зеленым цветом). Например, 86 % ингибирование наблюдается при значении $W_0 = 28$, соответствующему димерной форме AtGALDH. Однако заметим, что активность AtGALDH снижается примерно до одной и той же величины (≈ 14 мкМ/с) при всех степенях гидратации W_0 .

Полученные результаты демонстрируют, что ликорин ингибирует AtGALDH как в водной, так и в мицеллярной среде (мембранная модель), то есть проявляет ингибирующие свойства вне зависимости от используемой среды. Учитывая, что AtGALDH существует в водной среде в мономерной форме, следует сравнить ингибирование в водном растворе и в мицеллярных средах при $W_0 = 24$, соответствующем мономерной форме AtGALDH. В обоих случаях наблюдается одинаковый процент ингибирования: 87% в водной среде и 86% в системе обращённых мицелл (концентрация ликорина в обеих средах 700 мкМ). В то же время мономерные и димерные формы в мицеллярных средах также ингибировались ликорином в одинаковой степени (86% при 700 мкМ ликорина).

Учитывая вышеописанные результаты, а также гомологию AtGALDH и TcGAL и факт подавления роста *T. cruzi* ликорином [112], можно предположить аналогичное влияние ликорина на активность TcGAL в мицеллярной среде. Для проверки ингибирования TcGAL ликорином были проведены две серии экспериментов (рис. 38) с варьированием концентрации ликорина при степенях гидратации $W_0 = 22$ и $W_0 = 28$, соответствующих оптимумам активности фермента и функционированию мономерной и димерной форм [9].

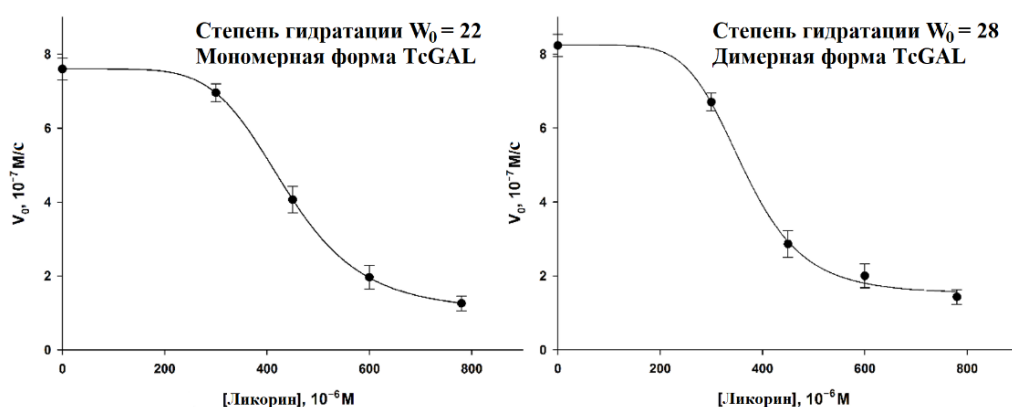


Рисунок 38. Ингибирование TcGAL ликорином при степенях гидратации $W_0 = 22$ и $W_0 = 28$. Условия: $[\text{TcGAL}] = 34 \text{ нМ}$, $[\text{АЛ}] = 1 \text{ мМ}$. Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение трёх независимых экспериментов.

В диапазоне концентраций ликорина 0–300 мкМ в случае TcGAL наблюдается «лаг-фаза», отсутствующая в случае AtGALDH. Ингибирование активности TcGAL является значительным только при концентрации ликорина около 300 мкМ и выше, тогда как активность AtGALDH подавлялась уже при 60 мкМ ликорина. Описанное явление нельзя объяснить распределением ликорина между водной и мицеллярной средами, поскольку для AtGALDH не наблюдается лаг-фазы в мицеллярной системе. Однако умеренное и сильное

ингибирование в системе обращённых мицелл АОТ наблюдались примерно при одинаковой концентрации ликорина как в случае TcGAL, так и в случае AtGALDH (например, ингибирование 50 и 80%, табл. 16).

Таблица 16. Сравнение ингибирующего действия ликорина в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в н-октане, степень гидратации $W_0 = 22$). Условия: [AtGALDH] = 6 нМ, [TcGAL] = 34 нМ, [ГЛ] = [АЛ] = 1 мМ.

Фермент	Ингибирование, %	[Ликорин], мкМ
TcGAL	10	300
	50	450
	80	780
AtGALDH	10	60
	50	500
	80	680

Можно заключить, что эффект ингибирования TcGAL ликорином достаточно значимый, хотя и менее выражен при низких концентрациях ликорина, как в случае L-галактон-1,4-лактондегидрогеназ (в том числе изучаемой в данной работе AtGALDH). Тем не менее, 50% ингибирование наблюдалось примерно при одинаковой концентрации ликорина (450–500 мкМ) в мицеллярной среде как для TcGAL, так и для AtGALDH.

Причины такого различия в ингибировании TcGAL и AtGALDH при относительно низких концентрациях ликорина (< 300 мкМ) до конца не ясны. Мы предположили, что TcGAL как мембранный фермент может взаимодействовать с поверхностью раздела фаз, поэтому активный центр фермента менее доступен для ликорина. Другая возможная причина заключается в том, что оксидазная активность TcGAL не ингибируется ликорином (а для AtGALDH, в отличие TcGAL, оксидазная активность не выражена).

Таким образом, представленный мицеллярный подход позволяет изучать ингибирование AtGALDH и TcGAL, включая установление механизма и параметров ингибирования, что для названных ферментов ранее не проводилось. Эффективность подхода для анализа ингибирования AtGALDH и TcGAL продемонстрирована на примере ликорина, ингибирующего ряд дегидрогеназ из различных источников (например, из *Ipomoea batatas* и *Zea mays* [106][133]). Установлен смешанный конкурентный механизм ингибирования AtGALDH ликорином в водной среде.

Однако ликорин ингибирует TcGAL лишь при сравнительно высоких концентрациях (более 300 мкМ), в то время как его действие в отношении самой *T. cruzi* проявляется уже

при 1 мкМ [112]. Эта разница заставляет предположить, что ингибирование TcGAL не является основным механизмом действия ликорина в отношении *T. cruzi*.

3.4 Ингибиторы галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* на основе аллилполиалкоксибензолов и их аналогов

3.4.1. Влияние аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) и их ТФФ-конъюгатов на активность TcGAL

Хотя ингибирование TcGAL не является основным механизмом действия ликорина в отношении *T. cruzi*, ингибирование TcGAL (как фермента-мишени) может лежать в основе действия других соединений, имеющих общие с ликорином структурные фрагменты и обладающих анти-трипаносомной активностью. Такие соединения могут представлять собой основу для разработки лекарств против болезни Шагаса.

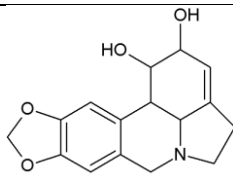
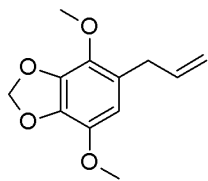
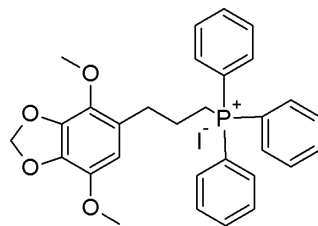
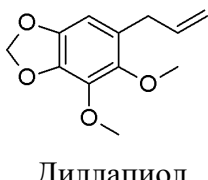
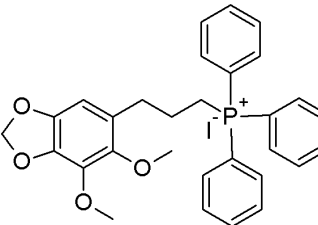
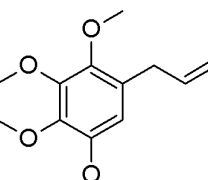
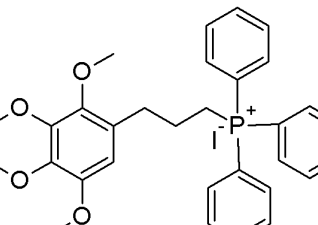
Перспективным классом соединений в качестве предполагаемых ингибиторов TcGAL являются халконы, содержащие общий бензодиоксольный фрагмент. Показано, что ряд соединений группы халконов из гречишника *Polygonum salicifolium* проявляют антитрипаносомную активность [62] и потенциально применимы для лечения целого ряда трипаносомных инфекций. В настоящей работе рассматривается группа халконов, некоторые представители которой, например, 2',4'-дигидрокси-6'-метоксихалконы, подавляют рост *T. cruzi* в концентрации 20 мкМ и менее [63].

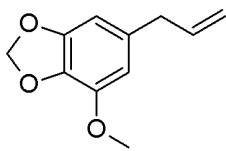
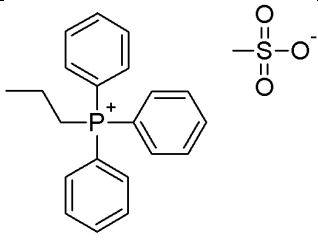
В качестве другой перспективной группы соединений в представленной работе рассматриваются природные аллилполиалкоксибензолы (АПАБ), выделенные из растительных источников (например, *Anethum graveolens* L. и *Petroselinum sativum* Hoffm.), обладающие разнообразной биологической активностью, в том числе противовоспалительной, противомикробной и др. [114][138]. В частности, диллапиол (основной компонент экстракта листьев *Piper aduncum*) обладает антилейшманиозной активностью с $IC_{50} = 60$ мкМ [139]. Можно предположить, что диллапиол и, возможно, другие АПАБ будут проявлять антитрипаносомную активность.

В работе изучено влияние на TcGAL следующих АПАБ: апиола, диллапиола, миристицина, аллилтетраметоксибензола (АТМБ), эвгенола, эстрагола, аллилбензола, различающихся количеством и положением метоксигрупп и наличием метилendioкси-группы, а также их конъюгатов с ТФФ (табл. 17).

Следует отметить, что ингибирующий эффект АПАБ начинает проявляться уже при концентрациях порядка 20–50 мкМ, что на порядок ниже, чем для ликорина (300 мкМ) (рис. 39 и табл. 17).

Таблица 17. Ингибирование TcGAL ликорином и АПАБ. Среда: мицеллы 0,1 М АОТ в н-октане (степень гидратации $W_0 = 22$, соответствующая мономерной форме TcGAL).

Соединение		Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ	
 Ликорин		450	
Аллилполиалкоксибензолы			
Соединение	Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ	Соединение	Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ
 Апиол	50	 ТФФ–апиол	95
 Диллапиол	20	 ТФФ–диллапиол	35
 АТМБ	65	 ТФФ–АТМБ	40

 Миристицин	130	 Пропил–ТФФ	275
---	-----	--	-----

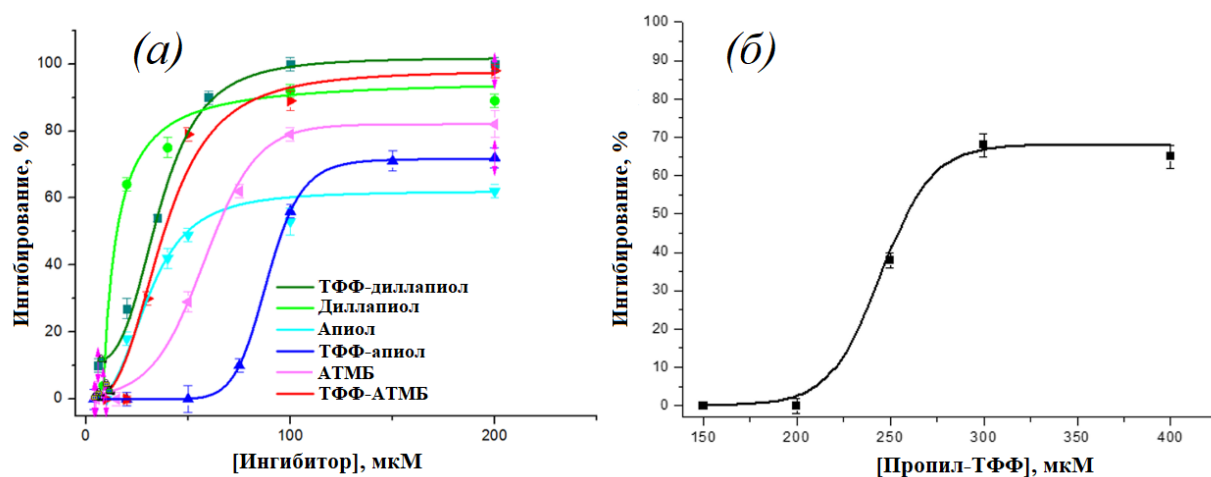


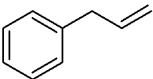
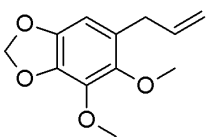
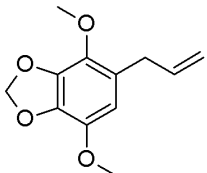
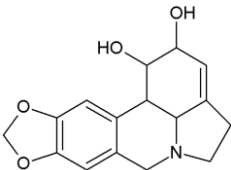
Рисунок 39. Ингибирующий эффект TcGAL соединениями класса АПАБ. **(а)** – Сравнение ингибирующего эффекта диллапиола, ТФФ–диллапиола, АТМБ, ТФФ–АТМБ, апиола и ТФФ–апиола; **(б)** – зависимость ингибирующего эффекта от концентрации пропил–ТФФ.

При сравнении диллапиола, апиола, миристицина и АТМБ, различающихся числом и положением метокси-групп (табл. 17), корреляции между количеством метокси-групп и активностью ингибитора не выявлено. Однако, наибольший ингибирующий эффектом среди АПАБ оказывает диллапиол. Апиол и сходный с ним по положению боковых метокси-групп АТМБ оказывают сравнимое ингибирующее действие (значения IC_{50} составляют 50 мкМ и 65 мкМ соответственно), что свидетельствует о не обязательном наличии метилendioкси-группы для подавления активности TcGAL. Миристицин, содержащий три метокси-заместителя в бензольном кольце, характеризуется значительно более высоким значением IC_{50} по сравнению с тетразамещёнными АПАБ. Полученные данные указывают на то, что на ингибирование влияет аллильный фрагмент и донорно-акцепторные и стерические факторы заместителя в аллилбензоле.

Следует отметить, что $IC_{50} = 20$ мкМ, найденное для диллапиола в отношении TcGAL, сопоставимо с IC_{50} данного соединения в отношении *Leishmania brasiliensis* (относящейся к трипаносоматидам) (60 мкМ согласно [139], таблица 18). С учётом распределения ингибитора в самих клетках и большей доступности ингибитора для фермента в экспериментах *in vitro* более низкое значение IC_{50} диллапиола в отношении

самого фермента представляется логичным. Полученные данные указывают на то, что TcGAL, вероятно, является ферментом-мишенью, на который действует данный ингибитор в организме трипаносоматид.

Таблица 18. Сравнение ингибирования TcGAL и AtGALDH некоторыми изучаемыми соединениями с литературными данными по ингибированию *T.cruzi* и родственных организмов.

Ингибитор	Структура	IC ₅₀ для микро-организма, мкМ	IC ₅₀ для TcGAL, мкМ	IC ₅₀ для AtGALDH, мкМ
Аллилбензол		> 25*	60	-
Диллапиол		60**	20	-
Апиол		-	50	35
Ликорин		0,7***	450	500

*для изомера аллилбензола (*транс*-пропенилбензол) согласно данным [63]

** согласно данным [139]

*** согласно данным [112]

Рассуждения, приведённые выше касательно диллапиола, могут быть распространены и на аллилбензол, поскольку его ближайший изомер, *транс*-пропенилбензол, подавляет рост *T.cruzi* при концентрации не ниже (> 25 мкМ), чем значение IC₅₀ = 60 мкМ в случае TcGAL (табл. 18). Поэтому в случае аллилбензола TcGAL также может являться ферментом-мишенью при действии этого соединения на *T.cruzi*.

Наконец, следует отметить близкие значения IC₅₀ для TcGAL и AtGALDH в случае одних и тех же ингибиторов: например, для апиола IC₅₀ в случае TcGAL составляет 50 мкМ, а в случае AtGALDH – 35 мкМ (табл. 18). На основании такого сходства значений IC₅₀ можно сделать вывод о том, что AtGALDH подходящая модель для предварительной оценки ингибирующих свойств соединений в отношении TcGAL.

Определение механизма ингибирования TcGAL апиолом. Поскольку аллилполиалкоксибензолы оказались более эффективными ингибиторами TcGAL по сравнению с ликорином, представляется целесообразным изучение механизма действия данных соединений и сопоставление с таковым для ликорина, для которого нами был установлен смешанный тип ингибирования [21]. Механизм действия АПАБ на TcGAL изучали на примере апиола, обладающего умеренным ингибирующим эффектом ($IC_{50} = 50$ мкМ). Определены каталитические параметры исследуемых систем: константа Михаэлиса $K_M = 0,14$ мМ по D-арабиноно-1,4-лактону и константа ингибирования $K_I' = 0,043$ мМ (табл. 19).

Таблица 19. Каталитические параметры систем, использованных для определения механизма ингибирования TcGAL апиолом. Условия: $[АЛ] = 0,25-1$ М, $[апиол] = 0-50$ мкМ, $[TcGAL] = 34$ нМ.

$[Апиол], \text{мкМ}$	$K_M (АЛ), \text{мМ}$	$k_{cat}/K_M \cdot 10^3 (\text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1})$	$K_I, \text{мМ}$
0	0,14	2,9	$0,043 \pm 0,003$
30		1,8	
50		1,4	

Из полученных данных следует, что при увеличении концентрации ингибитора константа Михаэлиса остаётся неизменной, в то время как значение k_{cat} снижается, что соответствует неконкурентному типу ингибирования. Таким образом, установлен неконкурентный механизм ингибирования TcGAL апиолом с константой ингибирования $K_I = 0,043$ мМ (табл. 19), что хорошо соотносится с параметром $IC_{50} = 50$ мкМ (табл. 17).

Влияние ТФФ-конъюгатов аллилполиалкоксибензолов на активность TcGAL. Антитрипаносомный эффект потенциальных ингибиторов *T. cruzi* может быть усилен посредством модификации АПАБ, в частности, их конъюгирования с трифенилфосфонием (ТФФ), обеспечивающим селективную доставку биологически активных веществ в митохондрии за счёт внутреннего отрицательного трансмембранного потенциала [114]. Известно, что аккумуляция конъюгатов ряда соединений с ТФФ в митохондриях позволяет усилить их антибактериальную активность, что, в частности, показано в отношении *Bacillus subtilis* [140].

Согласно литературным данным [114], конъюгирование ТФФ с биологически активными молекулами обеспечивает селективную доставку последних в митохондрии, поэтому конъюгирование ТФФ с апиолом и диллапиолом – ингибиторами митохондриального мембранного фермента TcGAL – могло бы усилить ингибирующий

эффект. Оказалось, что максимальный процент ингибирования TcGAL ТФФ-конъюгатами апиола и диллапиола на 10–15% выше, чем немодифицированными молекулами (рис. 39, (а)). Конъюгирование АТМБ с ТФФ приводит и к заметному снижению IC_{50} . Интересно, что сам пропил-ТФФ (контрольный образец) также оказывает ингибирующий эффект в отношении TcGAL с $IC_{50} = 275$ мкМ (табл. 17 и рис. 39, (б)), то есть в гораздо более высокой концентрации, чем АПАБ (IC_{50} порядка 50–70 мкМ). Предположительно, ТФФ в основном влияет на распределение ингибитора в мицеллярной системе и его пространственную ориентацию на поверхности раздела фаз, где располагается TcGAL. Положительный заряд ТФФ может способствовать концентрированию конъюгатов на отрицательно заряженной поверхности раздела фаз, образованной молекулами АОТ.

Распределение АПАБ и их ТФФ-конъюгатов в системе обращённых мицелл. Для выяснения расположения и пространственной ориентации функциональных групп изучаемых ингибиторов в мицеллах использован метод ИК-спектроскопии Фурье. На рис. 41 представлены ИК-спектры диллапиола, АТМБ, пропил-ТФФ и ТФФ-диллапиола в системе обращённых мицелл АОТ и в контрольных системах «водная фаза» (вода-этанол) и «органическая фаза» (октан).

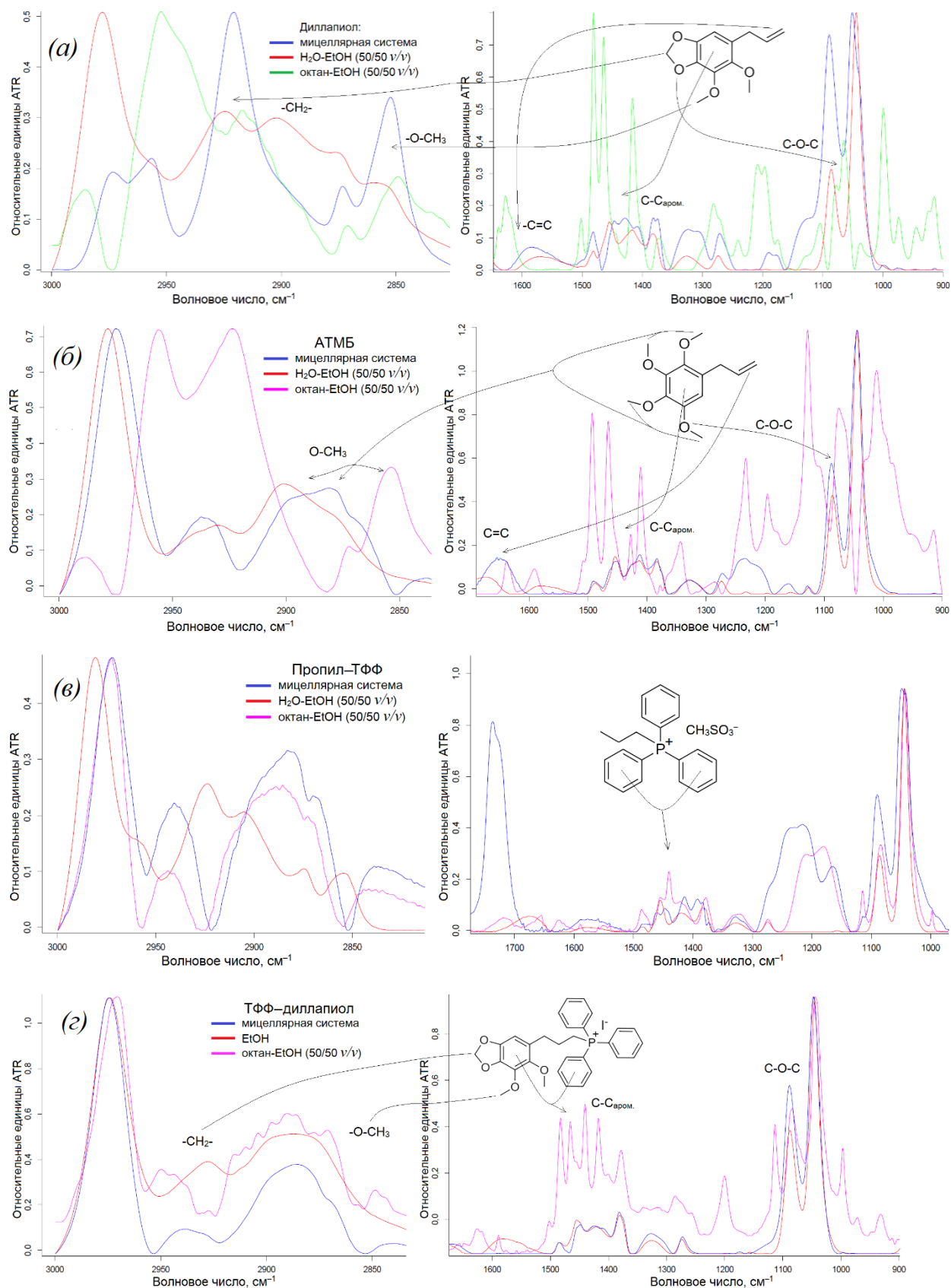
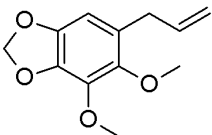
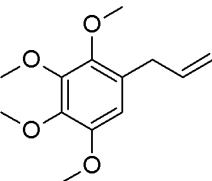
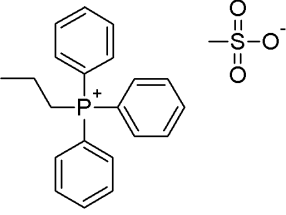
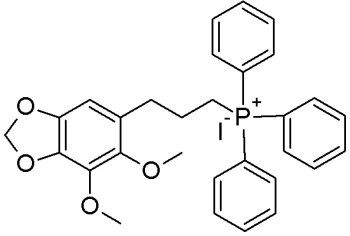
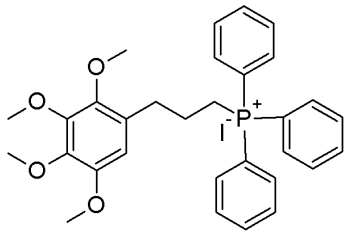


Рисунок 41. ИК-спектры Фурье в режиме НПВО в мицеллах, водно-этанольном, октан-этанольном окружении: диллапиола (а); АТМБ (б), пропил-ТФФ (в), ТФФ-диллапиол (г). ИК-спектры нормированы на интенсивность мажорного пика. $T = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Система обращённых мицелл: 0,1 М АОТ в октане ($W_0 = 22$)

В табл. 20 указаны положения характеристических пиков функциональных групп и их преимущественное микроокружение.

Таблица 20. Положения характеристических пиков в ИК-спектрах диллапиола, АТМБ, пропил–ТФФ, ТФФ–диллапиола, ТФФ–АТМБ; соответствие функциональных групп и их микроокружения в мицеллах АОТ.

Соединение	Функциональ- ная группа	Положение характеристического пика в ИК-спектре, см ⁻¹			Вывод о расположении функциональной группы и молекулы
		октан- этанол 50/50 (v/v)	вода- этанол 50/50 (v/v)	мицеллы АОТ	
 Диллапиол	O–CH ₂ –O	2917	2924	2921	метилендиокси-группа в большой степени ориентирована внутрь мицелл и гидрофильное окружение
	=C–O–C	1065	1045	1051	
	–O–CH ₃	2848,5	2858	2853	ароматическое ядро расположено на поверхности раздела фаз
	C–C ароматические	1464	1448	1454	
 АТМБ	Ph–CH ₂ – CH=CH ₂	2956	2930	2937	преимущественно внутри мицелл АОТ; ароматические группы частично внутри мицелл и частично между гидрофобными CH ₂ - цепями ПАВ
	–O–CH ₃	2924	2901	2880– 2900	
	C–C ароматические	1492 и 1466	1488,5 и 1449– 1456	1491– 1488 и 1454	
 Пропил–ТФФ	C–C ароматические	1421	1414– 1420	1413	молекула расположена в основном на поверхности раздела фаз между гидрофобными цепями ПАВ
		1440 и 1455	1455	1448 и 1458– 1462	

 ТФФ–диллапиол*	O–CH ₂ –O	2937– 2952	2927– 2932 (2928)	2927– 2947	молекулы на поверхности раздела фаз и внутри мицелл; метилендиокси-группа ориентирована внутрь мицелл, а положительно заряженный ТФФ электростатически взаимодействует с сульфогруппами АОТ
	=C–O–C	1082– 1087	1086 (1088)	1088	
	–O–CH ₃	2848	–	2840	
	Ph–CH ₂ –CH ₂ – CH ₂ –PPh ₃	2970	2981 (2974)	2981	
	C–C ароматические	1502 1455 и 1465	1485 1448– 1457	1485 1448	
 ТФФ–АТМБ	=C–O–C	1086	1089 (1088)	1069 и 1113	тетраметоксибензольный фрагмент на поверхности раздела фаз ТФФ радикал на поверхности раздела фаз и частично в октане
	–O–CH ₃	2855	2900 (2880– 2900)	2855 и 2873	
	Ph–CH ₂ –CH ₂ – CH ₂ –PPh ₃	2993 и 2957	2980 (2974)	2990 и 2957	
	C–C ароматические	1467	1482– 1488	1467 и 1495	

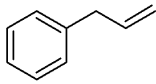
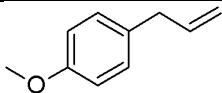
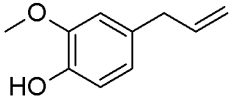
В мицеллярной системе микроокружение метилендиокси-группы и метоксигрупп диллапиола (рис. 41, а), а также тетраметоксибензольного фрагмента АТМБ (рис. 41, (б)) в большей степени соответствует водной фазе, следовательно, в системе обращённых мицелл АОТ данные соединения направлены во внутреннюю полость мицелл. Аллильный радикал данных ингибиторов закорен на поверхности раздела фаз, окружён гидрофобными цепями мицелл, согласно изменениям в полосе при 1645 см^{–1}, характерной для колебаний С=С аллильной группы. Пропил–ТФФ (рис. 41, (в); контрольное соединение) в мицеллах распределён между водной и органической фазой. ТФФ–диллапиол (рис. 41, (г)): микроокружение молекулы в мицеллярной системе соответствует в большей степени водной фазе (табл. 20), что обуславливает высокую степень загрузки ТФФ–диллапиол внутрь мицелл и их относительно высокую подвижность, вероятно, поэтому ТФФ–диллапиол не превосходит по ингибирующей способности сам диллапиол (но максимальный процент ингибирования у ТФФ–диллапиола повышен за счёт более

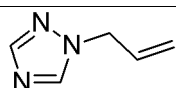
выгодного распределения вещества в мицеллах). Положение пиков ТФФ–АТМБ в мицеллярной системе (табл. 20) свидетельствует о том, что окружение тетраметоксибензола – преимущественно гидрофильное, а ТФФ-фрагмент расположен на поверхности раздела фаз, что обуславливает заякоривание в мицеллярной матрице и пространственную ориентацию ТФФ–АТМБ в сравнении с АТМБ. Усиление ингибирующего действия АТМБ после конъюгирования с ТФФ может быть обусловлено локализацией мембранного фермента TcGAL на поверхности раздела фаз. В случае исходного диллапиола эффект заякоривания в мицеллярной матрице не выражен.

3.4.2. Влияние ингибиторов класса аллилбензола и его аналогов на активность TcGAL

Отметим, что АПАБ и ликорин обладают разной эффективностью как ингибиторы TcGAL. Соединения ряда АПАБ, в отличие от ликорина, содержат аллильный фрагмент, что позволяет предположить важную роль этой группы в ингибировании TcGAL. Для изучения роли аллильной группы в ингибировании TcGAL мы исследовали влияние на TcGAL аллилбензола и его аналогов, которые как и АПАБ содержат аллильную группу, но в отличие от АПАБ не содержат метилен-диокси-группы и могут не содержать метокси-групп (как аллилбензол), что позволяет изучить роль аллильной группы в отсутствии других боковых заместителей или фрагментов (табл. 21 и рис. 42).

Таблица 21. Ингибирование TcGAL соединениями ряда аллилбензола. Среда: мицеллы 0,1 М АОТ в н-октане (степень гидратации $W_0 = 22$, соответствующая мономерной форме TcGAL).

Аллилбензол и его аналоги	
Соединение	Ингибирование TcGAL, IC ₅₀ , мкМ
 Аллилбензол	60
 Эстрагол	20
 Эвгенол	10



1-аллил-1,2,4-триазол

75

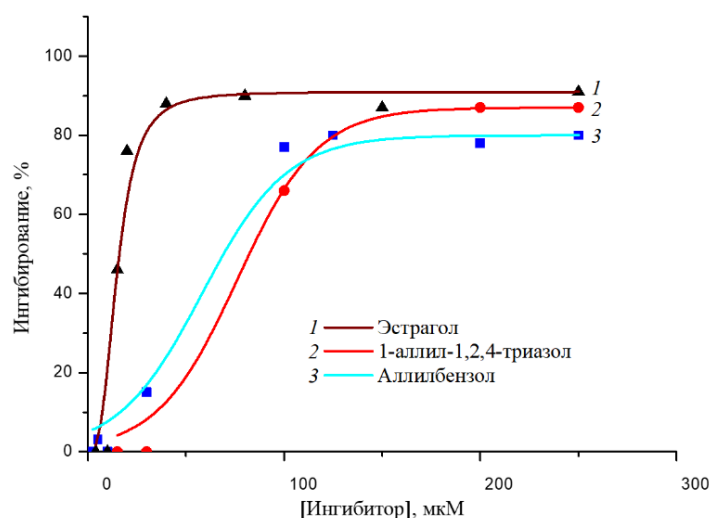


Рисунок 42. Сравнение ингибирующих эффектов аллилбензола, 1-аллил-1,2,4-триазола и эстрагола.

Найдено, что значение IC_{50} для аллилбензола сравнимо с таковым для апиола (60 и 50 мкМ соответственно), это говорит о важной роли аллильной группы в ингибировании TcGAL даже при отсутствии метилendioкси-группы. Значения IC_{50} для 1-аллил-1,2,4-триазола и апиола также сопоставимы (75 мкМ и 50 мкМ соответственно), что тоже подтверждает значимую роль именно аллильной части молекулы в ингибировании TcGAL.

Наиболее эффективными ингибиторами TcGAL в ряду аллилбензола оказались эстрагол и эвгенол ($IC_{50} = 20$ и 10 мкМ соответственно). Сравнение IC_{50} аналогов аллилбензола и представителей АПАБ позволяет предположить важную роль аллильного фрагмента для ингибирования TcGAL даже при отсутствии метилendioкси-группы.

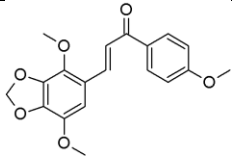
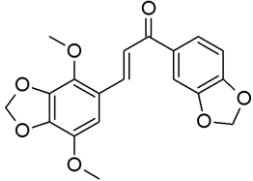
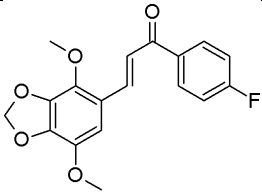
3.4.3. Влияние халконов на активность TcGAL

Представляется важным также более детальное изучение роли метилendioкси-группы в ингибировании этого фермента при отсутствии аллильной группы. С этой целью исследовали действие на TcGAL ряда халконов, содержащих метилendioкси-группу как с метоксигруппами, так и без них (табл. 22).

Поскольку многие халконы подавляют рост *T. cruzi* в достаточно низкой концентрации (порядка 20 мкМ) [63], мы предположили, что такие соединения в сопоставимой концентрации также будут способны ингибировать TcGAL.

Однако влияние исследованных халконов на TcGAL оказалось довольно слабым – максимальный эффект составил не более 25% в концентрации 500 мкМ для 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4'-метоксихалкона (табл. 22).

Таблица 22. Ингибирование TcGAL халконами. Среда: мицеллы 0,1 М АОТ в н-октане (степень гидратации $W_0 = 22$, соответствующая мономерной форме TcGAL).

Халконы	
Соединение	Ингибирование TcGAL
 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4'-метоксихалкон	макс. ингибирование $\approx 25\%$ (при 500 мкМ)
 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4',5'- метилендиоксихалкон	макс. ингибирование $\approx 16\%$ (при 500 мкМ)
 2,5-диметокси-3,4-метилендиокси-4'-фторхалкон	нет ингибирования

Следует отметить, что некоторые из описанных в литературе халконов, проявляющих анти-трипанасомные свойства [64] (табл. 6, раздел 1.1.2), имеют похожую на наши халконы структуру (наличие метилен-диокси- и метокси-групп), однако их IC_{50} в отношении *T. cruzi* составляет всего 20-100 мкМ, в то время как наши халконы почти не оказывают влияние на активность TcGAL. Вероятно, угнетение роста трипаносомы

халконами может происходить по другому механизму (мишень неизвестна), не через ингибирование TcGAL.

Таким образом, можно предположить, что при отсутствии аллильного радикала метилендиокси-группа вносит слабый вклад в ингибирование TcGAL. Отметим, однако, что исследованные халконы отличаются от аллилполиалкоксибензолов «довеском» в виде ещё одного замещённого бензольного кольца, что может мешать взаимодействию с TcGAL.

Таким образом, впервые найден класс ингибиторов галактонолактонооксидазы TcGAL из *T. cruzi*, которая катализирует финальную стадию синтеза витамина С в трипаносомах и рассматривается как потенциальная мишень для разработки лекарств против трипаносомных инфекций. Обнаружено, что АПАБ (апиол, диллапиол) и аллилбензолы (эвгенол, эстрагол) эффективно ингибируют TcGAL в диапазоне концентраций 20–50 мкМ. По литературным данным, диллапиол в сопоставимой концентрации 60 мкМ угнетает рост *L. brasiliensis* [139], что может свидетельствовать об ингибировании TcGAL как о ключевом механизме противопаразитарного действия диллапиола в отношении трипаносоматид. Также интересно отметить, что, согласно [65], близкий изомер эвгенола – изоэвгенол – обладает сопоставимым $IC_{50} = 51$ мкМ в отношении самой *T. cruzi*. Таким образом, есть основания предполагать, что TcGAL представляет собой молекулярную мишень, возможно, не единственную, на которую действуют соединения класса АПАБ. Ранее было известно, что ряд соединений данного класса обладают противопаразитарным эффектом, но данные об их механизме действия и клеточной мишени отсутствовали. Полученные данные указывают на важную роль аллилбензольного фрагмента в ингибировании TcGAL. В то же время метилендиокси-группа, общая для ликорина, АПАБ и ряда халконов, не является необходимой для воздействия на этот фермент.

Интересно, что бензодиоксольный фрагмент является единственным общим структурным компонентом для целого ряда алкалоидов, включая ликорин, проявляющих антитрипаносомную активность с IC_{50} в диапазоне 0,5–200 мкМ, но в основном их противопаразитарное действие наблюдается либо при концентрациях около 60 мкМ, как у кринина, либо при 1 мкМ, как у ликорина [112]. При этом IC_{50} ликорина (450 мкМ) в отношении TcGAL значительно выше. Эти данные указывают на возможное участие бензодиоксольного фрагмента (или метилендиокси-группы) в угнетении роста *T. cruzi*, но конкретная мишень (фермент) не установлена.

Для понимания действия АПАБ и их аналогов в отношении TcGAL важно определить, на какую из активностей – оксидазную или дегидрогеназную – влияют изучаемые ингибиторы, поскольку TcGAL, в отличие от «истинных» оксидаз и дегидрогеназ, проявляет оба типа активностей. В случае обнаружения корреляций между структурой ингибитора и его влиянием на каждую из активностей открываются новые возможности по целенаправленному поиску ингибиторов TcGAL, а также их модификации.

3.5. Влияние ингибиторов аллилполиалкоксибензолов на оксидазную и дегидрогеназную активности TcGAL и AtGALDH

Исследование влияния АПАБ на активность природной и мутантной форм AtGALDH. Поскольку TcGAL проявляет как оксидазную (по кислороду), так и дегидрогеназную активность (в присутствии ЭА, отличных от кислорода, например ФМС, рис. 43), то важно определить на какой из видов активности TcGAL (оксидазную или дегидрогеназную) влияют ингибиторы АПАБ и как это зависит от структуры ингибитора.

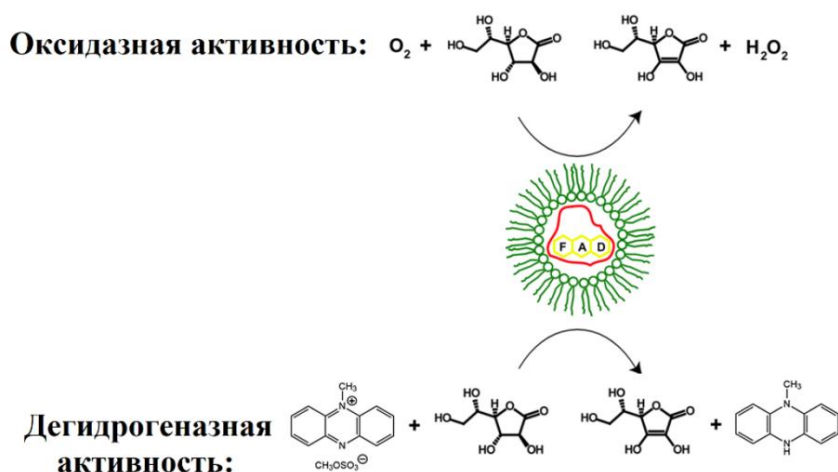


Рисунок 43. Иллюстрация оксидазной и дегидрогеназной активностей TcGAL. Красным контуром обозначен TcGAL, находящийся в мицелле (выделена зелёным цветом). В случае дегидрогеназной активности в качестве ЭА – для примера – приведён ФМС (в качестве ЭА могут выступать и другие ЭА).

Для выяснения этого аспекта мы исследовали влияние АПАБ на каталитическую активность фермента AtGALDH (гомологичного TcGAL) для природной (дегидрогеназной) и мутантной (обладает дегидрогеназной и оксидазной активностями, замена A113G) форм в мицеллярной и водной средах. Подчёркнём, что в измерениях по изучению ингибирования мутантной формы AtGALDH не добавляли ЭА, поэтому мутантный

AtGALDH проявлял только оксидазную активность, используя в качестве ЭА кислород окружающей среды (другими словами, мутантная форма AtGALDH выступала как «чистая» оксидаза).

Согласно литературным [4] данным мутация A113G в AtGALDH создает пространство для молекулярного кислорода, который может достигать и реагировать с локусом N5-C4a восстановленного кофактора FAD. Создаваемое таким образом пространство, вероятно, приводит к появлению достаточно большой полости, чтобы вместить молекулу O₂. Кристаллическая структура AtGALDH (как и TcGAL) пока не установлена, поэтому в качестве иллюстрации на рис. 44 приведена 3D-структура активного центра алдитолоксидазы (гомолога AtGALDH), где в структурно-консервативном положении находится остаток Ala105, препятствующий доступу кислорода к флавину.

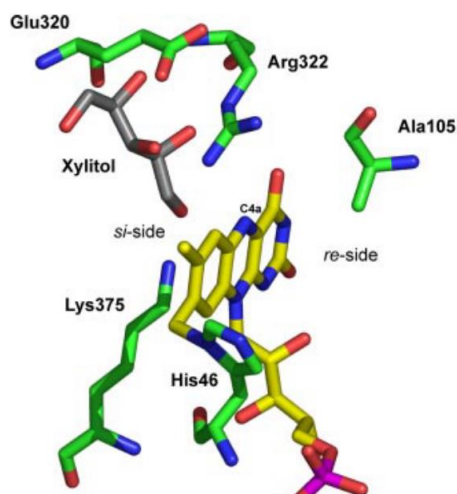


Рисунок 44. Структура активного центра алдитолоксидазы (в комплексе с ксилитолом), гомолога L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы [4].

Отметим, что мутация A113G также снижает восстановительный потенциал AtGALDH (the midpoint reduction potential) примерно на 20 мВ, однако столь небольшое снижение потенциала не может объяснить наблюдаемое увеличение оксидазной активности. Кинетические измерения в стационарном состоянии с кислородом и цитохромом *c* позволяют предположить, что в варианте A113G скорость-лимитирующей стадией во время катализа является повторное окисление кислородом, а не восстановление флавина или высвобождение продукта, как это типично для флавопротеиноксидаз. Изучение кинетики обеих форм AtGALDH также показало, что повторное окисление AtGALDH дикого типа состоит из одной фазы, тогда как окисление варианта A113G состоит из двух фаз: быстрой фазы, соответствующую повторному окислению флавина и второй, более медленной фазы, природа которой остаётся неясной [4]. Другой

особенностью мутантного AtGALDH является образование перекиси водорода в результате повторного окисления флавина ферментом, в то время как в случае AtGALDH дикого типа этого не наблюдается.

Следует подчеркнуть, что L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) – фермент, гомологичный TcGAL, и катализирующий ту же реакцию (превращение L-галактоно-1,4-лактона в аскорбат). Согласно результатам, описанным в разделе 3.3.1, AtGALDH и TcGAL имеют высокую степень сходства аминокислотных последовательностей в области активного центра, содержат в нем общие аминокислотные остатки Glu и Arg, а также остаток Cys, играющий важную роль в катализе этими ферментами. Описанное сходство позволяет использовать AtGALDH как модельный по отношению к TcGAL, в том числе для исследования влияния АПАБ на оксидазную и дегидрогеназную активности TcGAL.

В качестве исходной системы на рис. 45 (а) показан ингибирующий эффект TcGAL в мицеллах при насыщающих концентрациях ингибиторов. В случае TcGAL ингибирующий эффект для всех АПАБ лежит в диапазоне 80–90% (рис. 45 (а)), за исключением апиола, для которого степень ингибирования составляет 60%.

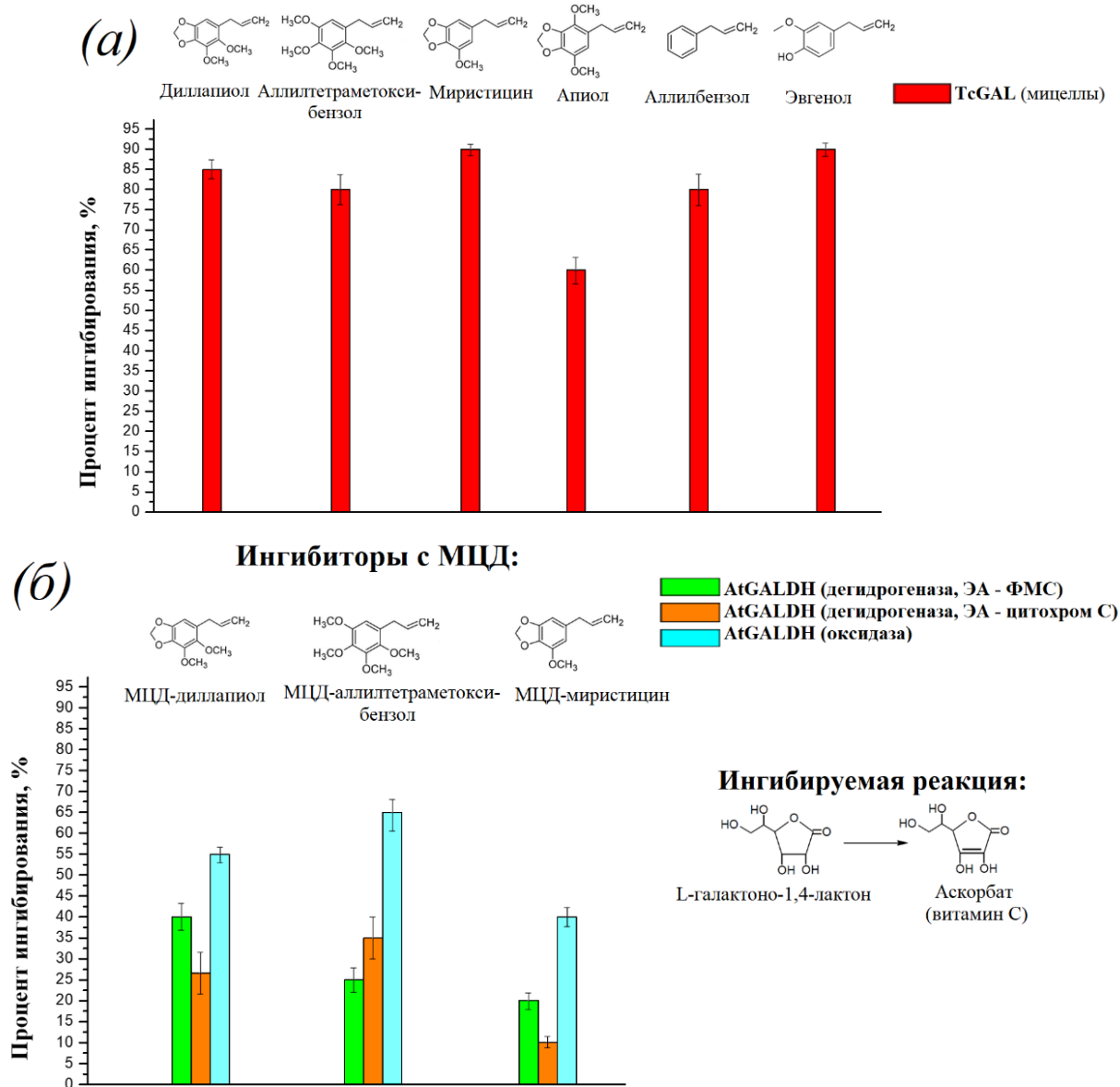


Рисунок 45. (а) – Влияние АПАБ на активность TcGAL в системе обращенных мицелл (0.1 М АОТ в октане, $W_0 = 22$); **(б)** – влияние АПАБ в комплексе с МЦД на активность AtGALDH (оксидазной и дегидрогеназной форм) в водной фазе (рН 8,8). Условия: [АЛ] = [ГЛ] = 1 мМ, [ФМС] = 120 мкМ, [ДХФИФ] = 120 мкМ, [цитохром С] = 50 мкМ, [АПАБ] = 500 мкМ, [AtGALDH] = 6 нМ, [TcGAL] = 34 нМ.

В отличие от TcGAL, в мицеллярной системе обе формы AtGALDH практически не подвержены ингибированию АПАБ (менее 10%, рис. 45 (б)), что, видимо, обусловлено пространственным разделением фермента и ингибитора в мицеллах. Согласно нашим данным, ингибиторы из ряда АПАБ концентрируются на границе раздела фаз, в то время как AtGALDH распределен по всему объёму мицелл, что снижает локальную концентрацию АПАБ вблизи AtGALDH (по сравнению с ситуацией с TcGAL, который находится на поверхности раздела фаз) [71].

В водной среде АПАБ также слабо влияют на активность обеих форм AtGALDH (не более 10%, данные не представлены), что может быть связано с низкой растворимостью АПАБ в воде [138].

Одним из способов повышения растворимости АПАБ является их конъюгирование с метилциклодекстрином (МЦД). Так, согласно литературным данным, использование МЦД позволяет получать комплексы включения гость-хозяин с ароматическими соединениями [141]. Соединения ряда АПАБ также способны формировать комплексы включения, как показано методами ИК- и УФ-спектроскопии в случае, например, эвгенола и апиола (рис. 46) [138] и в случае комплексов МЦД с диллаполом, АТМБ и миристицином [142] (значения констант диссоциации K_D комплексов АПАБ с МЦД 10^{-3} – 10^{-4} М [138][142]). Как показано в работах нашей лаборатории, образование комплексов включения между МЦД и АПАБ значительно повышает растворимость последних [141][142].

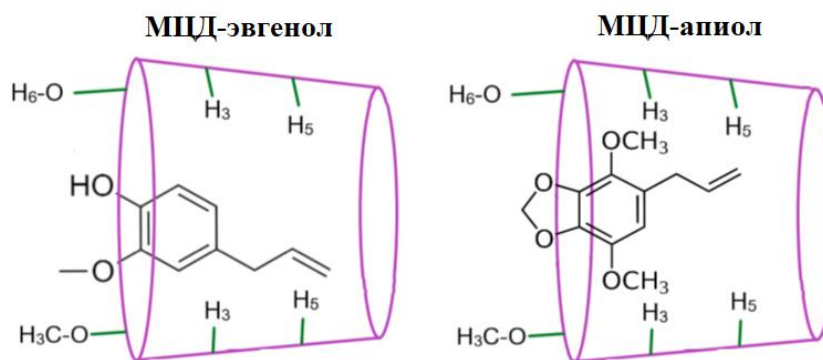


Рисунок 46. Схематичное изображение комплексов включения МЦД-эвгенол и МЦД-апиол (адаптировано из работы [138]).

Найдено, что в случае комплексов АПАБ с МЦД наблюдается существенное усиление эффективности ингибирования обеих форм AtGALDH (рис. 45 (б)) по сравнению с не модифицированными АПАБ.

Наиболее сильное влияние на обладающую оксидазной активностью форму AtGALDH среди комплексов АПАБ-МЦД оказывает АТМБ, который характеризуется наибольшим количеством метокси-групп. В случае формы AtGALDH с дегидрогеназной активностью наиболее эффективен комплекс диллапиол-МЦД. Исходя из структур комплексов АПАБ с МЦД и их эффективности в отношении этой формы AtGALDH можно сделать вывод, что важную роль играет наличие диметокси-фрагмента и мета-положение метокси-групп.

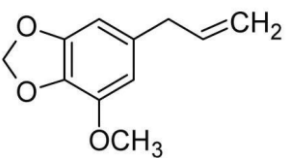
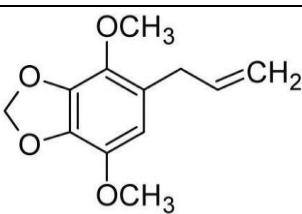
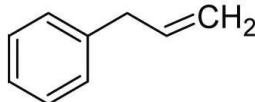
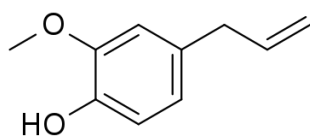
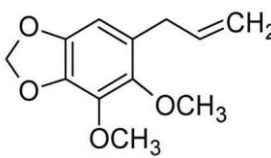
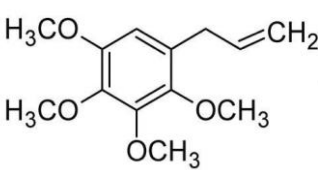
Подчеркнем, что для всех изученных ингибиторов форма AtGALDH с оксидазной активностью ингибируется комплексами АПАБ с МЦД на 15–50% сильнее, чем форма с дегидрогеназной. На основании полученных результатов можно заключить, что в случае TcGAL, обладающего как оксидазной так и дегидрогеназной активностями, соединения ряда АПАБ оказывают большее влияние на оксидазную активность. Это объясняет неполное ингибирование TcGAL соединениями ряда АПАБ за счёт наличия остаточной дегидрогеназной активности. При этом сам МЦД не оказывает влияния на активность AtGALDH или TcGAL, что исключает роль МЦД как ингибитора изучаемых ферментов. Учитывая высокую гомологию галактонолактонооксидаз из разных источников, можно предположить, что АПАБ также действуют преимущественно на оксидазную активность этих ферментов, что позволяет вести более целенаправленный поиск ингибиторов TcGAL и родственных ферментов – потенциальных лекарственных мишеней.

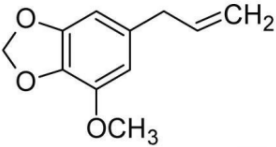
Исследования влияния АПАБ на активность AtGALDH в зависимости от используемого ЭА. Как показано в предыдущем разделе, ингибирующее действие АПАБ в отношении TcGAL проявляется в ингибировании как дегидрогеназной, так и оксидазной активностей (с большим влиянием на последнюю). При этом, в отличие от оксидазной активности, в случае дегидрогеназной активности возможно использование различных ЭА. Такая возможность варьирования природы ЭА позволяет выяснить - связано ли ингибирование дегидрогеназной активности с действием АПАБ на целевую полу-реакцию (с участием основного субстрата) и/или полу-реакцию с участием электроноакцептора. Напомним, что каталитический цикл AtGALDH (и TcGAL) включает в себя две полу-реакции – одну с участием основного субстрата и вторую – с участием ЭА, возвращающего кофактор фермента в исходное (окисленное) состояние (рис. 1, раздел 1.1.1). Таким образом, подавление активности AtGALDH может быть связано с ингибированием той и/или другой полу-реакции (то есть ингибирование целевой реакции и/или блокирование взаимодействия фермента с ЭА).

Если подавление активности фермента связано с ингибированием функции ЭА, то варьирование природы ЭА может повлиять на эффективность ингибирования AtGALDH. Использование водной среды (рН 8.8) позволило нам изучить ингибирование дегидрогеназы AtGALDH соединениями АПАБ как в случае природного ЭА – цитохрома С, так и в случае искусственного ЭА – низкомолекулярного ФМС. Следует отметить, что ФМС – низкомолекулярный неспецифический ЭА, в то время как цитохром С – природный ЭА белковой природы, в отношении которого ингибиторы могут проявлять самые разные эффекты.

Соединения ряда АПАБ – диллапиол, АТМБ, миристицин, апиол и аллилбензол – при насыщающих концентрациях почти не оказывают влияния на активность AtGALDH при использовании ФМС как ЭА (ингибирование менее 10%), в то время как в случае цитохрома С апиол и аллилбензол снижают активность AtGALDH на 22 и 15% соответственно (табл. 23).

Таблица 23. Сравнение ингибирующего эффекта АПАБ и их МЦД-конъюгатов в отношении дегидрогеназной формы AtGALDH с использованием природного (цитохром С) и искусственного (ФМС) электроноакцепторов. Условия: [ГЛ] = 1 мМ, [цитохром С] = 50 мкМ, [ФМС] = [ДХФИФ] = 120 мкМ, [AtGALDH] = 6 нМ, [АПАБ] = 500 мкМ, водная фаза (рН 8,8).

Название	Структура (без МЦД)	Процент ингибирования, %	
		ФМС + краситель ДХФИФ	Цитохром С
Миристицин (без МЦД)		Не ингибирует	Не ингибирует
Апиол (без МЦД)		Не ингибирует	22
Аллилбензол (без МЦД)		Не ингибирует	15
Эвгенол		25	Не ингибирует
МЦД-диллапиол		40	Не ингибирует
МЦД-тетраметокси-аллилбензол		25	35

МЦД-миристицин		20	10
----------------	---	----	----

Это можно объяснить тем, что апиол и аллилбензол склонны связываться с цитохромами и блокировать их функцию (продемонстрировано для цитохромов P450 [143]), что, по-видимому, наблюдается и в нашей работе при использовании цитохрома С.

В случае комплексов диллапиола, АТМБ и миристицина с МЦД, наблюдается более эффективное ингибирование дегидрогеназной активности AtGALDH, при этом ингибирующий эффект мало зависит от используемого ЭА (цитохром С или ФМС), так как специфику связывания ингибиторов с гидрофобными участками цитохрома С мы во многом исключили за счет присутствия МЦД. Полученные данные указывают на то, что исследуемые ингибиторы (в комплексе с МЦД) оказывают влияние на полу-реакцию именно с участием основного субстрата, а не на действие ЭА.

Таким образом, при изучении TcGAL и двух форм AtGALDH обнаружено более выраженное влияние ингибиторов АПАБ на активность мутантной формы AtGALDH, проявляющей в условиях измерений только оксидазную активность, по сравнению с природной формой, обладающей исключительно дегидрогеназной активностью. Учитывая гомологию AtGALDH и TcGAL, это позволяет предположить большее влияние АПАБ на оксидазную активность TcGAL по сравнению с дегидрогеназной. При этом наблюдается тенденция, согласно которой ингибиторы, которые сильнее ингибируют мутантную форму AtGALDH, эффективнее ингибируют и TcGAL (исходя из IC₅₀ для АПАБ, измеренных в отношении TcGAL [71]). Например, в отношении обоих ферментов – TcGAL и мутантной формы AtGALDH – диллапиол и АТМБ более эффективны, а миристицин – наименее эффективен. Это может указывать на разные сайты фермента, задействованные в ингибировании оксидазной и дегидрогеназной активности. Использование МЦД в качестве агента, повышающего растворимость ингибиторов в воде и обеспечивающее их равномерное распределение в системе, усиливает снижение активности обеих форм AtGALDH.

3.6. Эффекторы AtGALDH и TcGAL

3.6.1. Коэнзимы Q₁ и Q₁₀ как эффекторы AtGALDH

Для детального понимания функционирования AtGALDH и TcGAL и возможности их регуляции необходимо исследовать не только ингибиторы данных ферментов, представленные нами выше, но и электроноакцепторы и активаторы. Коэнзимы Q₁ и Q₁₀ (CoQ₁ и CoQ₁₀) представляют собой аналоги БХ, содержащие одно и десять изопреновых звеньев соответственно, являются переносчиками электронов в дыхательной цепи и играют важную роль в окислительном фосфорилировании в митохондриях. Кроме того, эти коэнзимы могут выступать как поглотители свободных радикалов, таким образом предотвращая окислительное повреждение митохондриальных мембран. Мембраны млекопитающих обычно содержат гомологи CoQ_n с длинными изопреновыми цепями: у людей это Q₁₀, у грызунов это в основном Q₉. У бактерий, например, *E. coli*, присутствует коэнзим Q₈. Изопреновая цепь делает Q₁₀ чрезвычайно гидрофобным, удерживая его в мембране и исключая любую возможность его диссоциации в митохондриальный матрикс, в то время как Q₁ с одним изопреновым звеном является сравнительно гидрофильным соединением.

В шестичленном кольце CoQ₁, в отличие от БХ, все атомы водорода замещены на алкильные или метокси-группы, поэтому CoQ₁ более устойчив в щелочной среде [144], что, предположительно, должно способствовать его большей эффективности в качестве электроноакцептора AtGALDH. Коэнзим, CoQ₁₀, благодаря длинному гидрофобному углеводородному фрагменту способен проникать в клеточные мембраны. Как следствие, CoQ₁₀ практически нерастворим в воде, однако хорошо растворим в системе АОТ-вода-октан (обращённые мицеллы), поэтому этот кофермент также представляет интерес как эффектор AtGALDH.

Ввиду структурного сходства БХ и CoQ₁ было выдвинуто предположение о возможной способности последнего выступать в качестве эффектора AtGALDH. Обнаружено, что спектры окисленной и восстановленной форм CoQ₁ имеют одинаковый вид в водной и мицеллярной средах, что позволяет спектрофотометрически регистрировать переход из окисленной формы в восстановленную при одной длине волны $\lambda = 285$ нм в обеих средах (рис. 47).

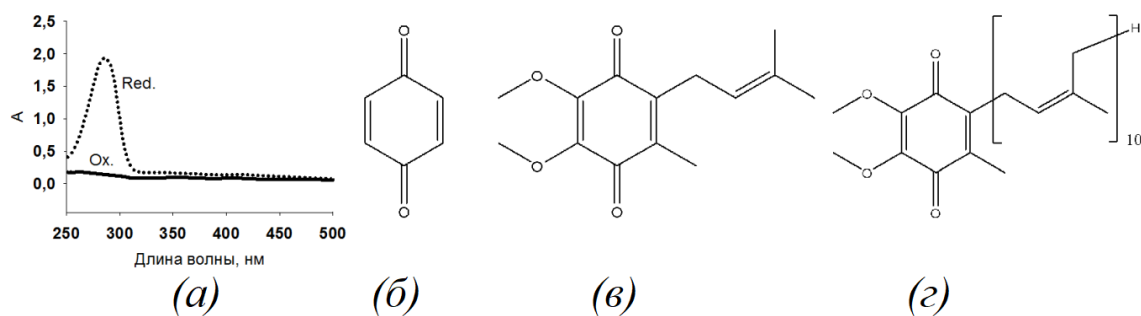


Рисунок 47. (а) – Спектры восстановленной (Red.) и окисленной (Ох.) форм CoQ₁ в 0,1 М АОТ ($W_0 = 22$, 0,7 мМ CoQ₁, pH 7,8, $T = 25^\circ\text{C}$); структуры (б) – БХ, (с) – CoQ₁, (д) – CoQ₁₀.

В обеих средах разница коэффициентов молярного поглощения окисленной и восстановленной форм $\epsilon_{285} = 2\,600\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$ близка к таковой для БХ ($\epsilon_{290} = 2\,300\text{ М}^{-1}\text{ см}^{-1}$).

Учитывая, что CoQ₁ является производным БХ, и, как следствие, также имеет тенденцию к усилению побочных реакций в сильнощелочных средах, мы исследовали зависимости активности AtGALDH от концентрации CoQ₁ при pH 7,8, оптимальным для БХ (рис. 48).

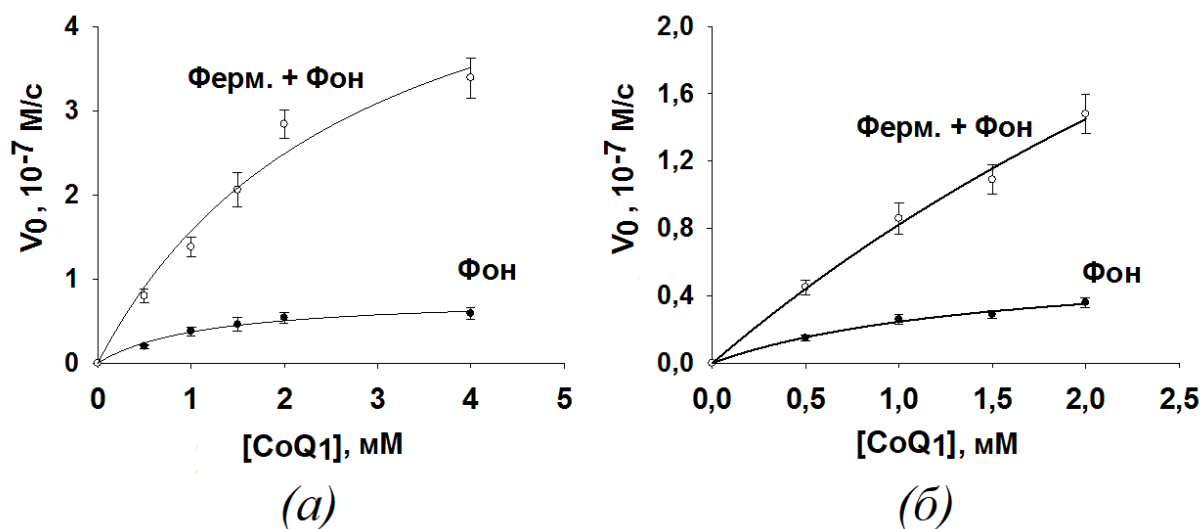


Рисунок 48. Сравнение скоростей ферментативной и фоновой реакции в зависимости от концентрации CoQ₁. (а) – в водной фазе (pH 7,8), (б) – в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в н-октано, $W_0 = 22$, pH 7,8). Условия: $[\text{ГЛ}] = 1$, $[\text{AtGALDH}] = 6\text{ нМ}$, $T = 25^\circ\text{C}$, $\lambda = 285\text{ нм}$.

Использование CoQ₁ в мицеллярной среде лимитировано его ограниченной растворимостью, его оптимальной концентрацией является 2 мМ, что также ограничивает достижимую максимальную скорость реакции. По этой причине не удалось корректно определить значение K_M для CoQ₁ в мицеллярной среде (указано в табл. 24 значком *). В то же время в водной среде наиболее целесообразно применение 4 мМ CoQ₁ ввиду

наибольшего соотношения скоростей основной и фоновой реакций. В табл. 24 приведены кинетические параметры реакций при использовании БХ и CoQ₁ в качестве ЭА AtGALDH, где V_{Макс} – максимальная скорость ферментативной реакции за вычетом фоновой, V_{Фон} – скорость фоновой реакции.

Таблица 24. Сравнение характеристик электроноакцепторов AtGALDH: 1,4-бензохинона и CoQ₁ в водной среде и мицеллярной системе.

БХ			CoQ ₁		
Параметр	Среда		Параметр	Среда	
	Водная	Мицеллярная (W ₀ = 22)		Водная	Мицеллярная (W ₀ = 22)
K _М (БХ), М	$(3,5 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(3,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	K _М (CoQ ₁), М	$(3,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$	*
V _{Макс} , М/с	$(7,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-7}$	$(4,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-7}$	V _{Макс} , М/с	$(5,4 \pm 0,7) \cdot 10^{-7}$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-7*}$
V _{Фон} , М/с	$(1,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-7}$	$(7,6 \pm 0,9) \cdot 10^{-8}$	V _{Фон} , М/с	$(5,4 \pm 0,4) \cdot 10^{-8}$	$(3,6 \pm 0,3) \cdot 10^{-8}$
V _{Макс} / V _{Фон}	7	6	V _{Макс} / V _{Фон}	10	3
pH	7,8	7,8	pH	7,8	7,8
ε _(Ox-Red) , М ⁻¹ см ⁻¹ (λ, нм)	2 300 (290)	2 300 (290)	ε _(Ox-Red) , М ⁻¹ см ⁻¹ (λ, нм)	2 600 (285)	2 600 (285)

Исходя из соотношения скоростей основной и фоновой реакций, можно сделать вывод, что CoQ₁ – более подходящий ЭА для AtGALDH по сравнению с БХ (соотношения 10 и 7 соответственно) в водной среде, но менее эффективный в мицеллярной (3 и 6 соответственно). При этом остальные параметры данных ЭА (разницы коэффициентов молярного поглощения окисленных и восстановленных форм и каталитические параметры) отличаются незначительно.

Предполагалось, что CoQ₁₀, отличаясь от CoQ₁ только наличием фрагмента из девяти изопреновых звеньев, также обладает электроноакцепторными свойствами в отношении AtGALDH. Однако, несмотря на значительную разницу коэффициентов молярного поглощения окисленной и восстановленной форм ($\epsilon = 9\,900 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при $\lambda = 275 \text{ нм}$), CoQ₁₀ не проявил себя как ЭА AtGALDH как при pH 7,8 (оптимум для БХ и CoQ₁), так и при pH-оптимуме AtGALDH (pH 8,8).

Однако обнаружено, что CoQ₁₀ существенно влияет на профиль активности AtGALDH в системе обращенных мицелл AOT (рис. 49).

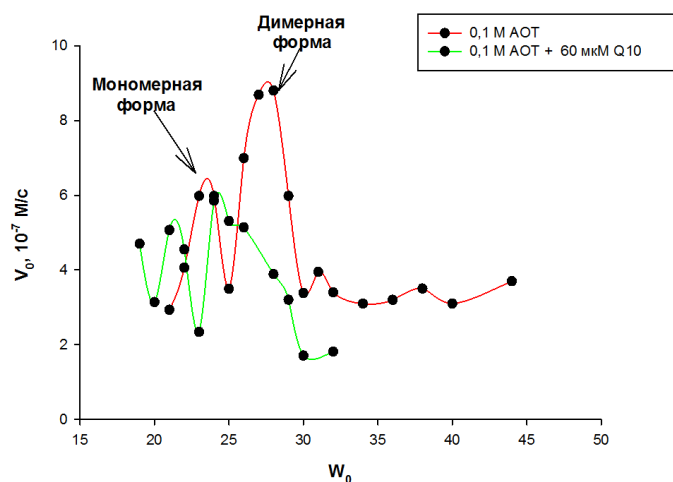


Рисунок 49. Зависимости активности AtGALDH от степени гидратации W_0 в системе обращённых мицелл АОТ (рН 8,8) в присутствии CoQ₁₀ (60 мкМ) и в его отсутствии. Максимальная погрешность определения параметров не более 10%. Условия: [ГЛ] = 1 мМ, [ФМС] = [ДХФИФ] = 120 мкМ, [AtGALDH] = 6 нМ, T = 25°C, λ = 550 нм.

Установлено, что CoQ₁₀ влияет на олигомерный состав фермента в мицеллярной системе: так, при $W_0 > 26$ (в области существования димерной формы фермента по данным седиментационного анализа) оптимума активности в мицеллярной системе не наблюдается, в то время как эффект CoQ₁₀ в отношении мономерной формы AtGALDH ($W_0 = 23\text{--}24$) не выражен. Этот эффект может быть связан с влиянием CoQ₁₀ как на структуру мицеллярной матрицы (за счет включения CoQ₁₀ в монослой ПАВ), так и на сам фермент, подавляя его межсубъединичные взаимодействия. Подобные эффекты влияния состава системы на олигомерный состав фермента наблюдали и в случае кислой фосфатазы [83]. Таким образом, добавление CoQ₁₀ позволяет регулировать олигомерный состав AtGALDH (препятствует образованию димерной формы и способствует функционированию мономерной), и, тем самым, варьировать каталитические и структурные свойства фермента.

Таким образом, согласно результатам исследования свойств коэнзимов Q₁ и Q₁₀, несмотря на их структурное сходство с БХ, только CoQ₁ проявляет электроноакцепторные свойства, превосходящие таковые для БХ в водной среде, но немного уступающие в мицеллярной системе. CoQ₁₀, напротив, не обладает электроноакцепторными свойствами в отношении AtGALDH, однако позволяет регулировать олигомерный состав данного фермента (в концентрациях 60 мкМ CoQ₁₀). Полученные результаты позволяют заключить, что с помощью CoQ₁ можно определять активность AtGALDH в водной и мицеллярной средах, в то время как обнаруженная способность CoQ₁₀ влиять на профиль активности AtGALDH, являющаяся гомологом TcGAL, позволяет рассматривать CoQ₁₀ как

потенциальный агент для регуляции олигомерного состава, а именно препятствующего формированию димерной формы фермента TcGAL.

3.6.2. Влияние 1,4-бензохинона и его аналогов на активность природной и мутантной форм AtGALDH (A113G)

Ранее в разделе 3.5. оксидазная и дегидрогеназная активности обсуждались в контексте изучения ингибирования TcGAL (обладающего обоими типами активности) с целью выяснить причины эффективности тех или иных ингибиторов TcGAL. Однако следует заметить, что другие эффекторы, в том числе ЭА, также могут различаться по степени воздействия на каждую из активностей.

Как было установлено нами ранее, БХ и его производные, коэнзимы Q, оказывают выраженное влияние на активность AtGALDH и гомологичного TcGAL. Однако остается неясным на какую из активностей TcGAL они преимущественно влияют – на дегидрогеназную или оксидазную.

Для исследования данного аспекта в данной работе мы изучаем влияние ЭА на две формы гомологичного фермента AtGALDH (из растительного источника *Arabidopsis thaliana*): природную и мутантную, различающиеся по наличию оксидазной активности, что подробно описано в разделе 3.5.1.

Помимо коэнзимов Q₁ и Q₁₀, интерес представляет CoQ₀, отличающийся от остальных коэнзимов отсутствием изопреновой цепи, а также другие производные БХ, различающиеся наличием и положением метокси- и гидроксигрупп (рис. 50).

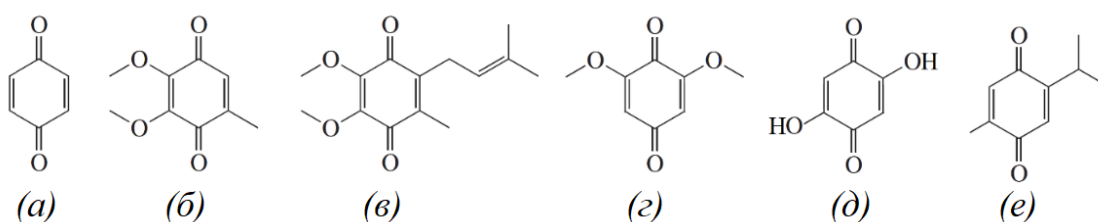


Рисунок 50. Структуры БХ (а) и его аналогов: CoQ₀ (б), CoQ₁ (в), 2,6-диметокси-1,4-бензохинона (г), 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинона (д) и тимохинона (е).

Например, 2,6-диметокси-БХ (рис. 50 (г)), встречающийся во многих растениях и выступающий в качестве эффективного ЭА таких ферментов как 1,4-бензохинонредуктаза [145]. Другим перспективным ЭА выступает аналог 2,6-диметокси-БХ – 2,5-дигидрокси-БХ (рис. 50 (д)), электроноакцепторные свойства которого описаны в литературе: например, данное соединение выступает в роли π -акцептора в случае комплекса с переносом заряда, который образуется между 2-амино-4-метокси-6-метилпиримидином и 2,5-дигидрокси-БХ

[146]. Наконец, следует выделить тимохинон (рис. 50 (е)), производное БХ из растительных источников (можжевельник), являющееся ЭА хиноноксидоредуктазы (NQO-1) [147] и объектом повышенного внимания учёных ввиду своих анти-диабетических свойств [148][149][150].

Кроме того, следует подчеркнуть, что эффекторы TcGAL могут оказывать неодинаковое влияние на оксидазную и дегидрогеназную активности TcGAL, что может влиять на их эффективность. Таким образом, влияние коэнзимов Q и аналогов БХ в отношении оксидазной и дегидрогеназных составляющих TcGAL является важным предметом исследований.

Влияние 1,4-бензохинона и его аналогов на активность природной формы AtGALDH.
Для изучения влияния БХ и его производных на дегидрогеназную составляющую TcGAL мы использовали природную форму дегидрогеназу AtGALDH.

Полученные зависимости максимальной активности AtGALDH от структуры используемого ЭА в водной и мицеллярной средах представлены на рис. 51. В качестве контроля на рис. 51 указана активность AtGALDH в присутствии ФМС и красителя ДХФИФ, которые использовались как основная система.

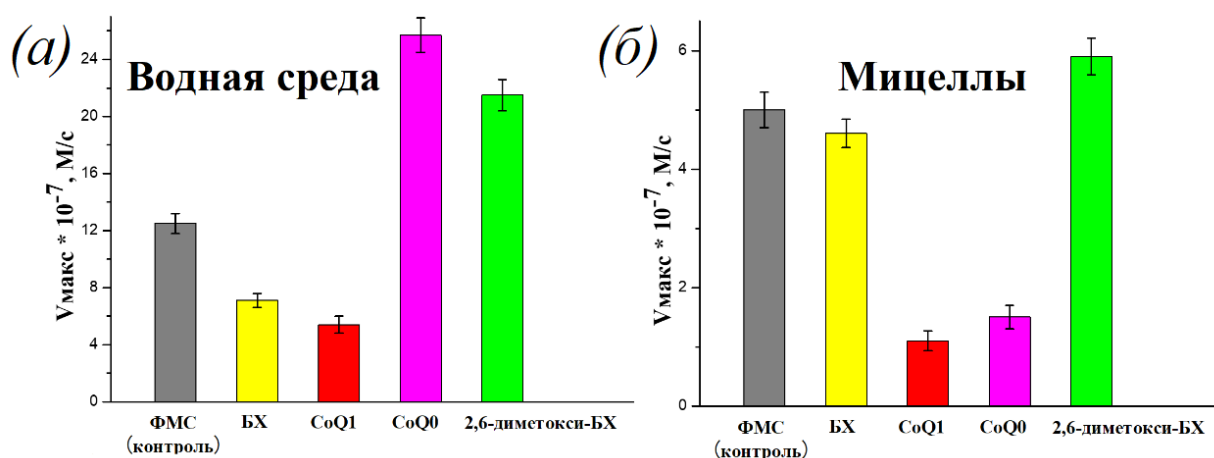


Рисунок 51. Максимальная активность AtGALDH дикого типа в водной (а) и в мицеллярной (0,1 М АОТ в н-октане, $W_0 = 22$) (б) средах в зависимости от структуры ЭА в присутствии красителя ДХФИФ. Условия: [ГЛ] = 1 мМ, [ДХФИФ] = 120 мкМ, [AtGALDH] = 6 нМ. Концентрации ЭА, при которых наблюдалась максимальная активность фермента, указаны в таблице 11.

Итоговые характеристики всех соединений ряда БХ (часть из которых была показана в таблице 24 в ходе отдельного обсуждения) продемонстрированы в таблице 25. Обнаружено, что в водной среде 2,6-диметокси-БХ и CoQ₀ обеспечивают в 4-5 раз большую максимальную активность AtGALDH по сравнению с ранее исследованными БХ и CoQ₁ [46] (табл. 25). При этом в мицеллярной среде 2,6-диметокси-БХ обеспечивает более высокую макс. скорость по сравнению с таковой для БХ и CoQ₁ (табл. 25).

Таблица 25. Каталитические характеристики БХ и его аналогов как электроноакцепторов дикой формы AtGALDH. $V_{\text{макс}}$ и $[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$ - максимальная активность фермента и концентрация ЭА, при которой она наблюдается (соответственно).

AtGALDH (дикий)									
Водная фаза					Мицеллы				
ЭА	$V_{\text{макс}}^*$, 10^{-7} М/с	Фон*, 10^{-7} М/с	pH-оптимум	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ	ЭА	$V_{\text{макс}}^*$, 10^{-7} М/с	Фон*, 10^{-7} М/с	pH-оптимум	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ
CoQ ₀	25,7	-	8,8	0,016	CoQ ₀	1,6	-	8,8	0,9
2,6-диметокси-БХ	21,5	-	8,8	2,3	2,6-диметокси-БХ	13,5	-	8,8	14
БХ	7,1	1,0	7,8	4 000	БХ	4,6	0,8	7,8	2 000
CoQ ₁	5,4	0,5	7,8	4 000	CoQ ₁	1,1	0,4	7,8	2 000
ФМС	12,5	-	8,8	120	ФМС	5,0	-	8,8	120

* погрешность измерения каталитической активности не превышает 10 %.

Отметим, что в обеих средах (водной и мицеллярной) 2,6-диметокси-БХ и CoQ₀ эффективны при низких концентрациях (порядка 0,01 – 10 мкМ), в то время как БХ и CoQ₁ действуют лишь при концентрациях порядка 2 мМ. Кроме того, в отличие от БХ и CoQ₁ комбинации 2,6-диметокси-1,4-БХ и CoQ₀ с красителем практически не проявляют фоновых сигнала (менее 5 % от целевого) и функционируют при pH-оптимуме AtGALDH (pH 8,8) (табл. 25).

Наконец, использование 2,6-диметокси-БХ и CoQ₀ показывает преимущества не только по сравнению с БХ и CoQ₁, но и по сравнению с разработанной нами ранее методикой с использованием ФМС как ЭА [21]. Так, в водной среде макс. скорость в присутствии 2,6-диметокси-БХ или CoQ₀ выше в 2 раза по сравнению с ФМС, а в мицеллярной – сопоставима (рис. 51). При этом используемые концентрации 2,6-диметокси-БХ и CoQ₀ (0,01-10 мкМ) на несколько порядков ниже таковой для ФМС (120 мкМ [21]).

Влияние 1,4-бензохинона и его аналогов на активность мутантной формы AtGALDH. Учитывая гомологичность AtGALDH и TcGAL и наилучшие параметры для 2,6-диметокси-1,4-БХ как ЭА в мицеллах для дегидрогеназы AtGALDH, можно предположить,

что 2,6-диметокси-БХ как ЭА будет наиболее эффективен и для TcGAL. Однако, как упоминалось выше, TcGAL обладает одновременно дегидрогеназной и оксидазной активностями, а дикий тип AtGALDH – только дегидрогеназной. Поэтому представляет интерес исследовать мутантную форму AtGALDH, как и сам TcGAL, обладает обоими типами активности, что позволяет определить степень влияния ЭА на дегидрогеназную активность по отношению к оксидазной, и, кроме того, изучить влияние среды (вода и мицеллы) на эффективность ЭА. Действие БХ и его производных в отношении мутантной формы AtGALDH продемонстрировано на рис. 52.

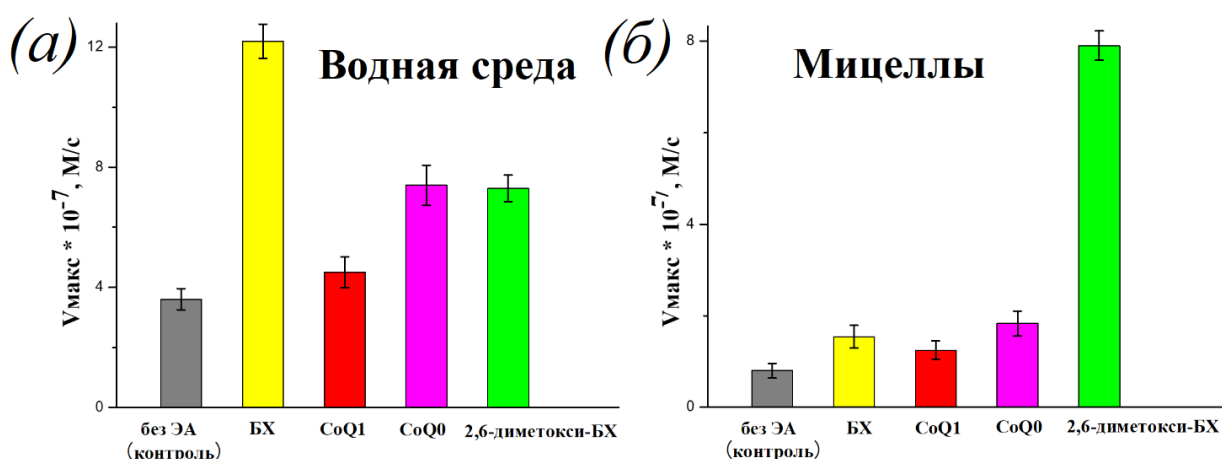


Рисунок 52. Максимальная активность AtGALDH мутантного типа в водной фазе (рН 8,8 для CoQ₀ и 2,6-диметокси-1,4-БХ и рН 7,8 для CoQ₁ и БХ) (а) и в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в н-октане, рН 8,8 для CoQ₀ и 2,6-диметокси-1,4-БХ и рН 7,8 для CoQ₁ и БХ, W₀ = 22) (б) в зависимости от структуры ЭА в сочетании с красителем ДХФИФ. Условия: [ГЛ] = 1 мМ, [ДХФИФ] = 120 мкМ, [AtGALDH] = 6 нМ. Для сравнения на рисунке указана активность без добавления ЭА.

В отличие от AtGALDH дикого типа в водной среде наибольший эффект на активность мутантной формы AtGALDH оказывает БХ, усиливающий в 3 раза по сравнению с отсутствием ЭА (рис. 52). В меньшей степени на активность AtGALDH оказывают влияние CoQ₀ и 2,6-диметокси-БХ (усиление активности AtGALDH в 2 раза) и CoQ₁ (усиление всего на 20 %). А в случае мицелл драматическое влияние оказывает 2,6-диметокси-БХ, усиливающий активность мутантной формы AtGALDH в 10 раз. В то же время остальные соединения усиливают активность фермента лишь в 2 раза. Каталитические характеристики исследуемых эффекторов в отношении мутантной формы AtGALDH представлены в табл. 26.

Таблица 26. Каталитические характеристики эффекторов мутантной формы AtGALDH: БХ и его аналогов. Под C50 подразумевается концентрация эффектора, вызывающая увеличение активности фермента в два раза по сравнению с активностью в отсутствии эффектора, где $V_{\text{макс}}$ и $[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$ - максимальная активность фермента и концентрация ЭА, при которой она наблюдается (соответственно).

AtGALDH (мутант, Ala113Gly)									
Водная фаза					Мицеллы				
ЭФ	C50, мкМ	$V_{\text{макс}}^*$, 10^{-7} М/с	pH	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ	ЭФ	C50, мкМ	$V_{\text{макс}}^*$, 10^{-7} М/с	pH	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ
БХ	0,5	13	7,8	12,8	БХ	1,5	1,4	7,8	20
CoQ ₁	5,0	5	7,8	20	CoQ ₁	3,8	1,3	7,8	10
2,6- диметокси- БХ	0,4	7,3	8,8	2,1	2,6- диметокси- БХ	4,8	7,9	8,8	12
CoQ ₀	0,006	7,4	8,8	0,12	CoQ ₀	0,17	2,1	8,8	0,5

Сравнивая результаты, полученные для дикой и мутантной форм AtGALDH, следует подчеркнуть, что в мицеллах обе формы наиболее активны в присутствии 2,6-диметокси-БХ (его влияние на оксидазную активность более выражена, чем на дегидрогеназную). Это позволяет предположить, что и в случае гомологичного TcGAL наибольшую активность должна наблюдаться для 2,6-диметокси-БХ. Кроме того, перспективным ЭА для TcGAL является CoQ₀, работающий при pH-оптимуме обоих ферментов (pH 8,8) - в отличие от БХ и CoQ₁.

3.6.3. Влияние 2,6-диметокси-БХ и его аналогов на активность TcGAL

Поскольку БХ и CoQ₁ не оптимальны для определения активности фермента (показывают слишком высокую фоновую реакцию) при pH-оптимуме TcGAL [46] и оказывают слабое влияние на аналог TcGAL – мутантную форму AtGALDH, то представляется целесообразным изучить действие других производных БХ на активность TcGAL: 2,6-диметокси-БХ, CoQ₁, оказавших наибольший эффект в отношении AtGALDH, и тимохинона, не обладающего метокси-группами в отличие от 2,6-диметокси-БХ и CoQ₁. Кроме того, интересно изучить влияние замены метокси-групп на гидроксигруппы,

имеющиеся, например, у 2,5-дигидрокси-БХ, электроноакцепторные свойства которого описаны в литературе (является π -акцептором в случае комплекса с переносом заряда [146]). Полученные зависимости максимальной активности TcGAL от структуры вышеперечисленных потенциальных ЭА в комбинации с красителем представлены на рис. 53.

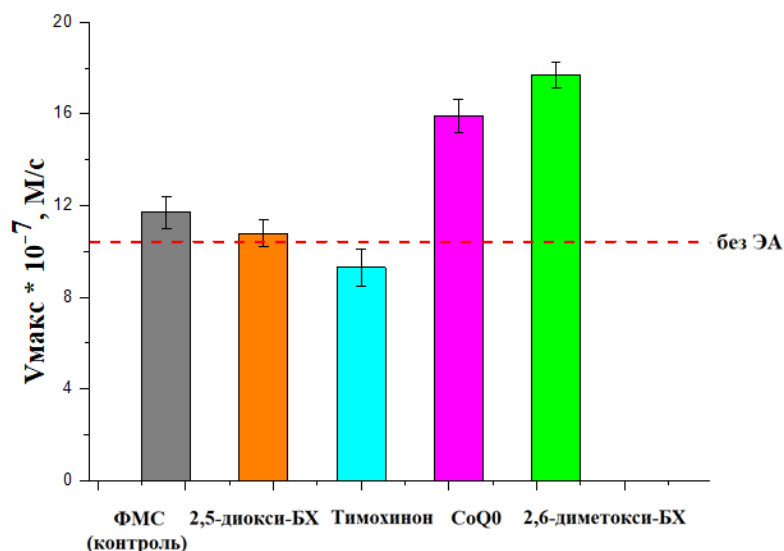


Рисунок 53. Зависимость максимальной активности TcGAL в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в н-октане, pH 8,8, $W_0 = 22$) от структуры ЭА в сочетании с красителем ДХФИФ. Условия: $[\text{АЛ}] = 1 \text{ мМ}$, $[\text{ДХФИФ}] = 120 \text{ мкМ}$, $[\text{TcGAL}] = 34 \text{ нМ}$. Для сравнения показана активность TcGAL в присутствии 120 мкМ ФМС по данным [21]. Концентрации ЭА, при которых наблюдалась максимальная активность фермента: $[\text{2,5-диокси-БХ}] = 360 \text{ мкМ}$, $[\text{тимохинон}] = 200 \text{ мкМ}$, $[\text{СоQ}_0] = 0,72 \text{ мкМ}$, $[\text{2,6-диметокси-БХ}] = 24 \text{ мкМ}$, в контрольных измерениях $[\text{ФМС}] = 120 \text{ мкМ}$.

Примечательно, что СоQ₀ и 2,6-диметокси-БХ в случае TcGAL показывают тенденции, аналогичные наблюдаемым для обеих форм гомологичного AtGALDH в мицеллах (рис. 51-53). Так, СоQ₀ функционирует при концентрациях на 1-3 порядка меньше, чем другие ЭА, а наибольшее значение макс. активности наблюдается в случае 2,6-диметокси-БХ (рис. 53). Отдельно следует отметить тимохинон, который не является ЭА для TcGAL, а напротив оказывает слабое ингибирующее действие (20 % ингибирование при 200 мкМ тимохинона).

Таким образом, наиболее эффективным ЭА среди изучаемых соединений оказывается 2,6-диметокси-БХ при невыраженной фоновой реакции (менее 5% от целевой). Столь высокая эффективность 2,6-диметокси-БХ как ЭА позволила нам предположить, что за ходом реакции можно следить и в отсутствии красителя (ДХФИФ), если 2,6-диметокси-БХ обладает достаточной разницей коэффициентов молярного поглощения окисленной и восстановленной форм.

Разработка подхода к измерению активности TcGAL без красителя с применением 2,6-диметокси-1,4-бензохинона в качестве электроноакцептора. Использование в мицеллах дополнительных реагентов, в том числе красителя ДХФИФ, желательно сводить к минимуму ввиду ограниченного объема водной фазы и возможного влияния красителя на другие компоненты системы. Установив, что 2,6-диметокси-БХ является наиболее эффективным потенциальным ЭА для TcGAL, мы исследовали возможность применения данного ЭА для определения активности TcGAL без использования красителя (ДХФИФ). Спектры окисленной и восстановленных форм 2,6-диметокси-БХ имеют наибольшую разницу в поглощении при длине волны 285 нм и 287 нм в водном растворе и в мицеллах соответственно (рис. 54).

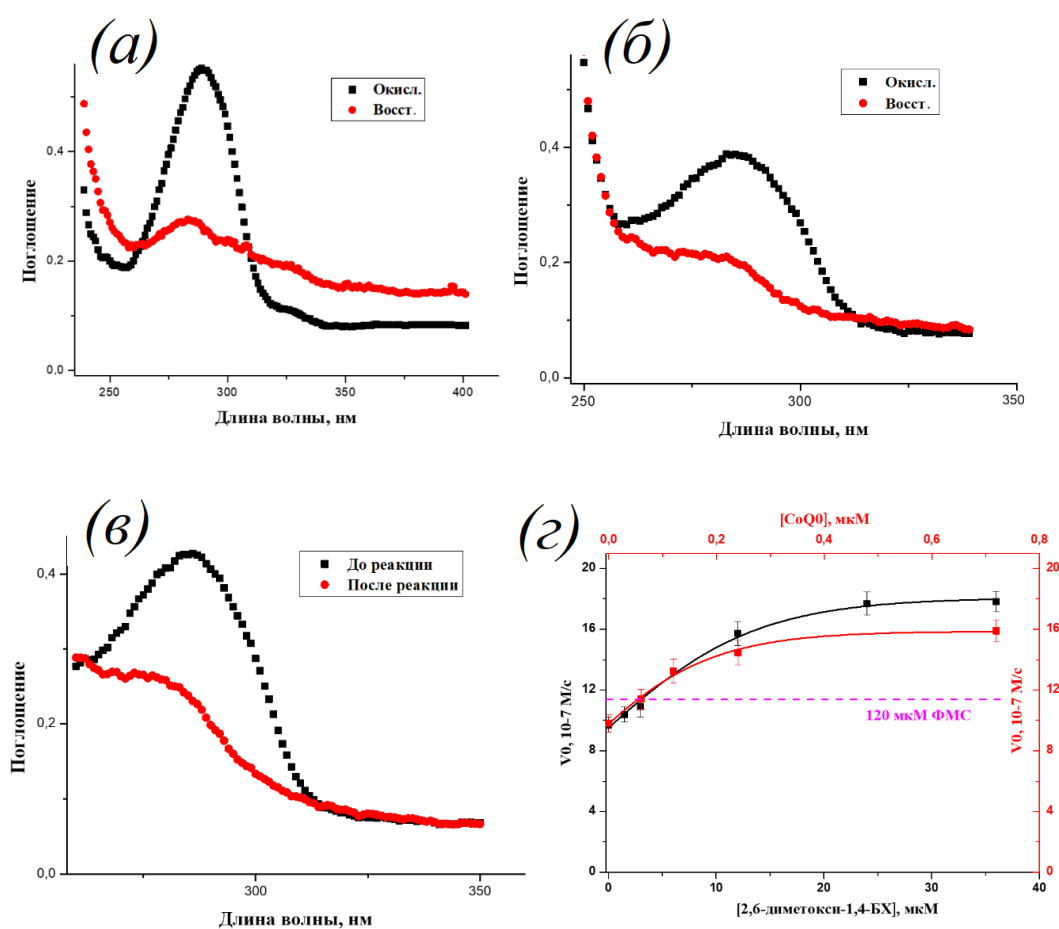


Рисунок 54. Спектры окисленной и восстановленной форм 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ в водном растворе (рН 8,8) (а), спектры окисленной и восстановленной форм 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в н-октане, $W_0 = 22$, рН водного буфера 8,8) (б), спектры реакционной смеси ($[Al] = 1$ мМ, $[2,6\text{-диметокси-БХ}] = 25$ мкМ) в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в н-октане, $W_0 = 22$) до и после протекания реакции (добавления 30 нм TcGAL) (в), зависимость активности TcGAL от концентрации 2,6-диметокси-БХ (без красителя) и от концентрации CoQ₀ (в комбинации с 120 мкМ ДХФИФ); в качестве базовой линии указана активность TcGAL при комбинации $[ФМС] = 120$ мкМ и $[ДХФИФ] = 120$ мкМ (г).

Спектры поглощения реакционной смеси (содержащей все необходимые компоненты) до и после реакции (рис. 54 (в)) также имеют вид, аналогичный спектрам окисленной и восстановленной форм 2,6-диметокси-БХ в водной среде и мицеллярной средах (рис. 54 (а) и (б)). Это свидетельствует о том, что 2,6-диметокси-БХ расходуется в ходе реакции, то есть является именно ЭА для ТсGAL, а не, например, аллостерическом эффектором.

Варьируя концентрацию 2,6-диметокси-БХ в водной и мицеллярной средах мы определили коэффициенты молярного поглощения окисленной и восстановленной форм 2,6-диметокси-БХ и их разницу ($\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}}$) (табл. 27), составляющие 13 900 (для водного раствора) и 4 600 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (для мицеллярной системы).

Таблица 27. Спектрофотометрические параметры 2,6-диметокси-БХ в водной фазе (рН 8,8) и в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в октане, $W_0 = 22$).

Среда	Длина волны, нм	$\epsilon_{\text{окисл}}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{восст}}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}}, \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$
Водная фаза	285	22 600	8 700	13 900
Мицеллы	287	9 200	4 600	4 600

Большее значение параметра $\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}}$ в мицеллярной среде, по сравнению с незамещенным БХ и ФМС с разностными коэффициентами поглощения 3 050 и 2100 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ соответственно [21] говорит о возможности применения 2,6-диметокси-БХ для измерения активности ТсGAL по расходу ЭА в процессе реакции.

Используя найденное значение $\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}} = 4\,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (табл. 27), мы определили максимальную активность ТсGAL в присутствии 25 мкМ (в насыщении по 2,6-диметокси-БХ, рис. 54 (г)). Оказалось, что найденное значение ($28,7 \cdot 10^{-7} \text{ M/s}$) в 2,5 раза выше активности в случае комбинации ФМС и красителя (контрольной системы), использовавшейся нами ранее для изучения ТсGAL [71][21]. Следовательно, 2,6-диметокси-БХ является эффективным ЭА для ТсGAL, позволяющим надёжно регистрировать активность ТсGAL. Таким образом, разработан улучшенный подход к измерению активности ТсGAL с использованием 2,6-диметокси-БХ (24 мкМ) в качестве ЭА, который не требует использования дополнительных агентов (красителя).

Ингибиторный анализ ТсGAL с применением 2,6-диметокси-1,4-бензохинона в качестве электроноакцептора. В наших предыдущих работах было продемонстрировано использование методики измерения активности ТсGAL с использованием комбинации

ФМС и красителя ДХФИФ для ингибиторного анализа ТсGAL [71][21]. В настоящей работе мы изучили возможность применения подхода с использованием 2,6-диметокси-БХ как ЭА (в отсутствии красителя) для ингибиторного анализа ТсGAL. Для этого изучили действие двух соединений, аллилбензола и АТМБ, которые ранее проявляли ингибирующий эффект в отношении ТсGAL в случае методики разработанной нами ранее с ФМС и красителем ДХФИФ [71] (рис. 55). Для оценки эффективности обоих ингибиторов в случае 2,6-диметокси-БХ была выбрана концентрация 200 мкМ, соответствующая максимальному эффекту обоих соединений в случае системы, содержащей ФМС и краситель [71].

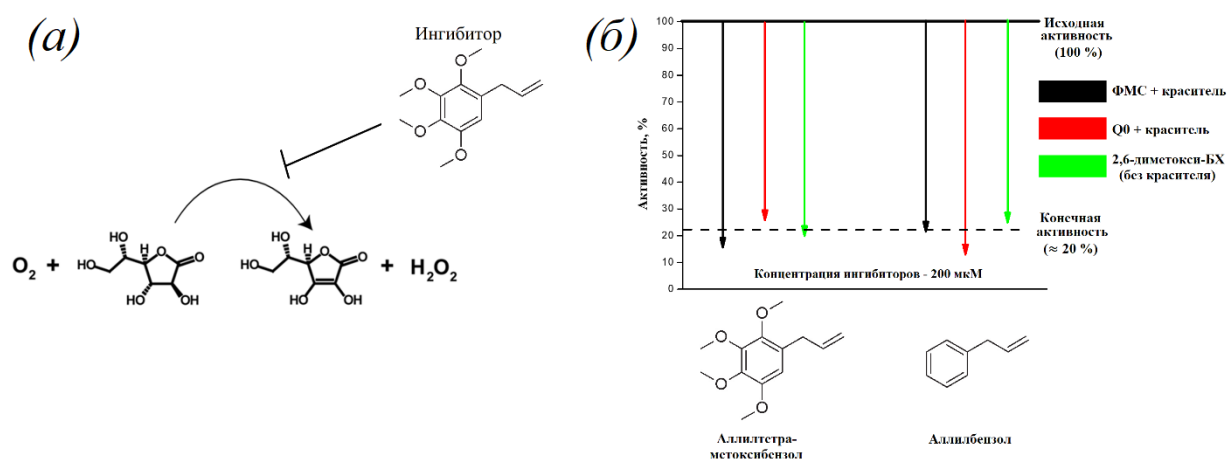


Рисунок 55. Схема ингибирования целевой реакции (а), сравнение ингибирующего эффекта АТМБ и аллилбензола для краситель-содержащих систем (комбинация красителя ДХФИФ и ФМС или CoQ_0 как ЭА) и системы без красителя (2,6-диметокси-БХ как ЭА) (б). Условия: [ДХФИФ] = 120 мкМ, [АЛ] = 1 мМ, [2,6-диметокси-БХ] = 24 мкМ, [ФМС] = 120 мкМ, CoQ_0 = 0,72 мкМ, [АТМБ] = [аллилбензол] = 200 мкМ.

Оказалось, что ингибирующий эффект при использовании 2,6-диметокси-БХ как ЭА действительно наблюдался, как и в случае ранее использованной методики с применением ФМС и красителя [71]. Эффективность изученных ингибиторов коррелирует для ФМС и 2,6-диметокси-БХ, а также для системы, содержащей CoQ_0 как ЭА и краситель ДХФИФ (рис. 55). Следовательно, использование 2,6-диметокси-БХ в отсутствии красителя позволяет надёжно регистрировать ингибирование ТсGAL.

Таким образом, найдены новые ЭА для ТсGAL ряда БХ (конзимы Q_0 , Q_1 , 2,5-дигидрокси-БХ, 2,6-диметокси-БХ и тимохинон) и выявлено влияние структуры ЭА на активность ТсGAL. Так, установлено, что соединения, содержащие метокси-группы, являются более эффективными электроноакцепторами для ТсGAL (CoQ_0 , 2,6-диметокси-БХ) по сравнению с соединениями, не обладающими ОСНЗ-группами (2,5-дигидрокси-бензохинон, тимохинон).

При исследовании двух форм AtGALDH (природной и мутантной) обнаружено, что в водной среде более «чувствительной» (наибольшая разница в значениях активности) к выбору эффектора является природная (дегидрогеназная) форма. В то же время в мицеллах более чувствительной является мутантная форма AtGALDH (суммарная дегидрогеназная и оксидазная активности), активность которой более резко возрастает при использовании 2,6-диметокси-БХ. По-видимому, и в случае трипаносомального фермента - TcGAL функционирующего в мицеллах, 2,6-диметокси-БХ оказывает влияние на оба типа активности (дегидрогеназную и оксидазную).

С применением 2,6-диметокси-БХ в качестве ЭА разработан новый подход к измерению активности TcGAL, обладающий преимуществами по сравнению с ранее предложенным [21]. Так, новый подход не требует применения красителя и, кроме того, обеспечивает в 2,5 раза большую активность фермента при меньшей (в 5 раз) концентрации ЭА. Продемонстрирована возможность использования нового подхода для ингибиторного анализа TcGAL, что является ещё одним шагом в поиске ингибиторов данного фермента (потенциальных лекарств против болезни Шагаса [71]).

3.6.4. Кверцетин и дигидрокверцетин как активаторы TcGAL

Влияние кверцетина и дигидрокверцетина на активность TcGAL. Помимо коэнзимов Q, повышенный интерес вызывают такие соединения как кверцетин и дигидрокверцетин, поскольку все названные соединения играют важную роль в живых организмах и являются одобренными лекарственными препаратами (то есть нетоксичны), что повышает их шанс на использование как лекарственной основы против болезни Шагаса.

Кверцетин (КЦ) и дигидрокверцетин (ДКЦ) (рис. 56) – природные соединения группы флавоноидов, обладающие широким спектром фармакологических свойств, начиная от противовоспалительной и антиоксидантной активностей и заканчивая противовирусным действием (включая лечение коронавирусной инфекции ближневосточного респираторного синдрома) [151][152][153].

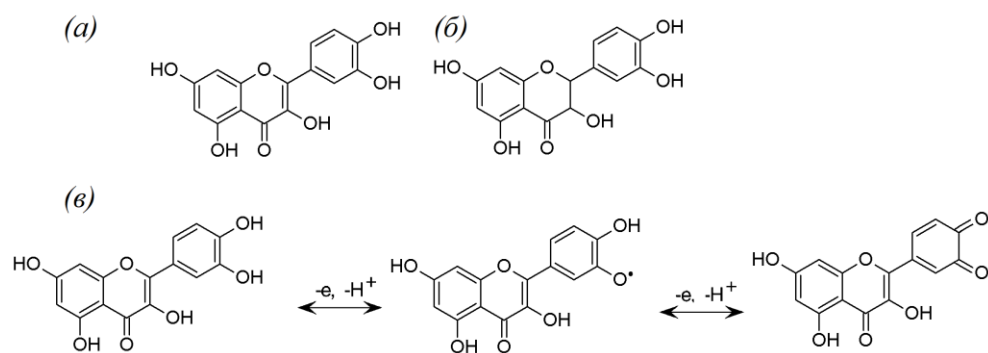


Рисунок 56. (а) и (б) - структуры КЦ и ДКЦ соответственно, (в) – схема взаимного превращения восстановленной и окисленной форм.

Являясь биологически активными соединениями, КЦ и ДКЦ оказывают действие на ферменты, выполняющие важную роль в живых организмах. Так, КЦ подавляет активность ксантиоксидазы, лекарственной мишени при лечении гиперурикемии, и является перспективной основой для разработки лекарства [154]. Флавоноиды могут не только подавлять, но усиливать каталитическую активность ферментов: например, показано, что ДКЦ повышает активность АТФ-фосфогидролазы, что обуславливает его противовоспалительную активность [155].

Известно, что КЦ и его аналоги ингибируют рост *T.cruzi* [156], при этом подавляют активность жизненно важных для микроорганизма ферментов, например Е-NTPДазы [157]. Не исключено, что механизм действия КЦ и ДКЦ в отношении *T.cruzi* может включать в себя воздействие на другие важные ферменты, в частности, галактонолактонооксидазу (TcGAL).

В настоящей работе обнаружено, что добавление в реакцию систему КЦ или ДКЦ не подавляет, а напротив усиливает активность TcGAL (табл. 28), что может быть следствием действия этих соединений как активаторов фермента, либо как ЭА (выполняющих роль второго субстрата).

Таблица 28. Каталитические параметры КЦ и ДКЦ для TcGAL и AtGALDH.

Фермент	Эффектор	$V_{\max}, 10^{-7}$ М/с	$K_{\text{связ}}^*,$ мкМ
TcGAL	КЦ	28 ± 2	192 ± 4
	ДКЦ	24 ± 3	147 ± 6
AtGALDH	ФМС	12 ± 2	28 ± 1
	БХ	5 ± 1	400 ± 30
	Цитохром С	13 ± 2	71 ± 2

* наблюдаемая константа связывания эффектора

По сравнению с другими соединениями, усиливающими активность TcGAL, КЦ и ДКЦ имеют преимущества: возможность использования в мицеллах (природный ЭА, цитохром С, денатурирует в мицеллах [9]), отсутствие фоновой реакции при концентрациях до 400 мкМ, функционирование при рН-оптимуме фермента 8,8 (в отличие от БХ [9], работающего при рН = 7,2). Кроме того, КЦ и ДКЦ имеют преимущества по сравнению с искусственными ЭА, описанными для модельного фермента AtGALDH: так, КЦ и ДКЦ обеспечивают в 2 раза более высокую максимальную каталитическую активность по сравнению с ФМС и БХ и в 5 раз – по сравнению с цитохромом С (табл. 27). В то же время значения $K_{связ}$ у КЦ и ДКЦ выше, чем для ФМС и цитохрома С, однако ниже, чем у БХ в 2,5 раза (табл. 28).

Механизм действия кверцетина и дигидрокверцетина на активность TcGAL. Для выяснения роли КЦ и ДКЦ (активаторы или ЭА) получены УФ-спектры КЦ (или ДКЦ) до и после полного восстановления $NaBH_4$ и УФ-спектры реакционной смеси, содержащей КЦ или ДКЦ (до и после реакции) (Рис. 58 (а) и (б)). Исходный (чёрный) спектр соответствует восстановленной форме КЦ [158] [159]. Красный спектр на рис. 58 (а) соответствует анион-радикалу в положении 3'-7 (согласно литературным данным, где приводится расчётный спектр [158], рис. 58 (в), спектр указанный зелёной стрелкой), поэтому можно сделать вывод, что восстановление КЦ (или ДКЦ) с помощью $NaBH_4$ приводит к образованию этого анион-радикала.

После протекания реакции наблюдались лишь незначительные изменения в УФ-спектрах (рис. 58 (б)), которые проявлялись в виде небольшого пика при 425 нм, который также возникает на рис. 58 (а) после восстановления КЦ с помощью $NaBH_4$. Такая небольшая разница означает, что в ходе реакции восстанавливается лишь небольшая часть КЦ (или ДКЦ).

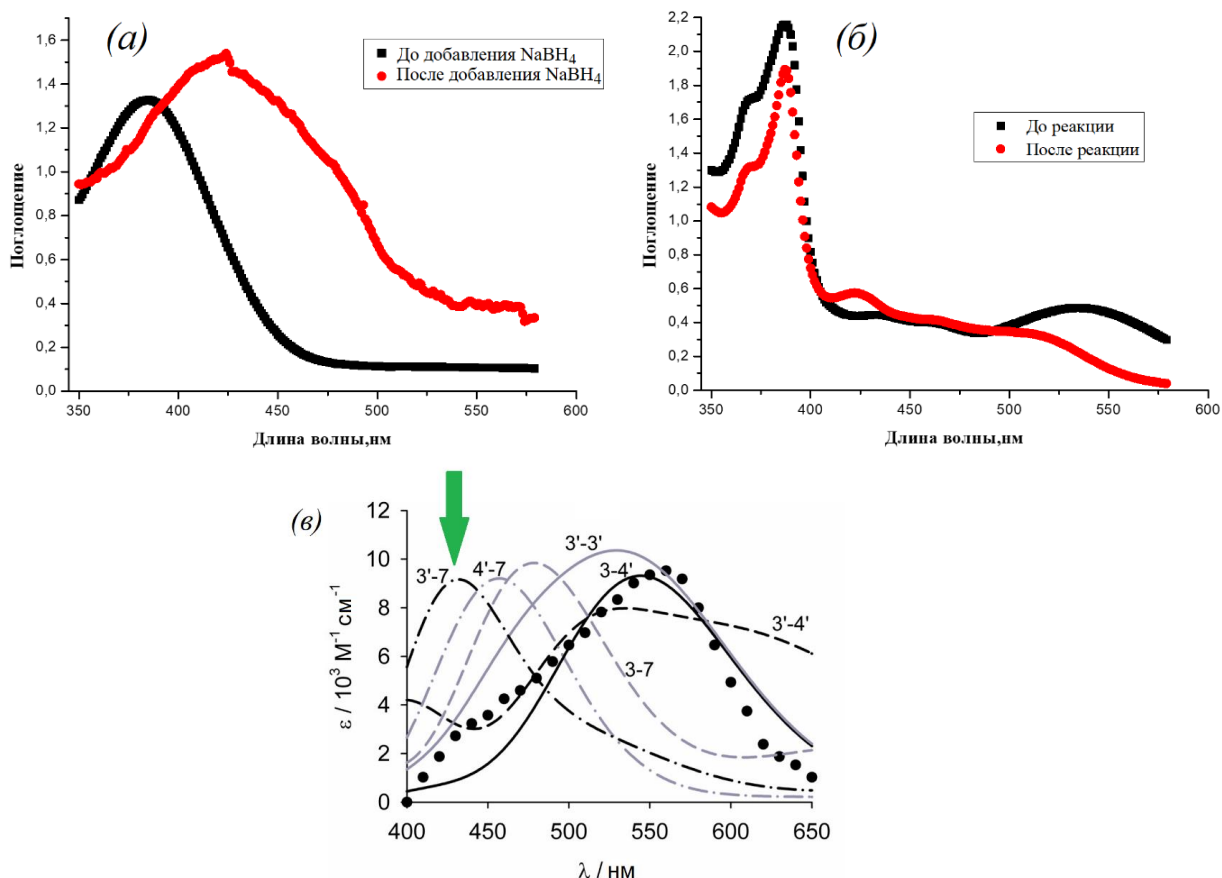


Рисунок 58. (а) - УФ-спектры КЦ в воде до и после добавления избытка NaBH₄, T = 25 С, (б) – Спектры реакционной смеси (до и после реакции, 5 минут). Условия: [КЦ] = 200 мкМ, [АЛ] = 1 мМ, [ДХФИФ] = 120 мкМ, [ТсGAL] = 34 нМ. Среда: 0,1 М АОТ в октоне, W₀ = 22, рН 8,8, T = 25 С, (в) – расчётные спектры для анион-радикалов КЦ в воде [158].

На основании полученных данных можно сделать вывод, что КЦ и ДКЦ действуют скорее как активаторы ТсGAL. Таким образом, впервые обнаружено, что представители флавоноидов (кверцетин и дигидрокверцетин) усиливают активность ТсGAL. В целом флавоноидные антиоксиданты, используемые в фармакологии из-за своей антиоксидантной активности для поддержки функции сердечной мышцы, представляются подходящими активаторами дегидрогеназ и оксидаз как растительного (AtGALDH), так и животного (ТсGAL) происхождения.

Заключение

В результате проделанной работы разработана эффективная методика определения активности TcGAL и AtGALDH в системе обращённых мицелл АОТ, что позволило исследовать влияние электроноакцепторов и эффекторов на активность данных ферментов и – в рамках практического приложения – провести скрининг потенциальных ингибиторов TcGAL. Впервые найдены классы эффективных ингибиторов TcGAL – аллилполиалкоксibenзолы и соединения ряда аллилбензола, ингибирующие фермент при концентрациях 10-100 мкМ. Некоторые из этих соединений (например, диллапиол) подавляют рост микроорганизма *T. cruzi* в том же диапазоне концентраций, что позволяет рассматривать TcGAL как мишень для лекарств против болезни Шагаса. С использованием двух форм гомологичного AtGALDH, природной и мутантной, установлены конкурентный и неконкурентный механизмы ингибирования TcGAL ликорином и апиолом соответственно. Полученные результаты проливают свет на многие аспекты функционирования TcGAL и AtGALDH и могут использоваться для целенаправленного поиска ингибиторов TcGAL, являющихся основной для разработки лекарств.

Основные результаты и выводы

1. Разработана методика измерения активности AtGALDH и TcGAL с использованием обращённых мицелл АОТ с применением комбинации электроноакцептора (феназинметосульфата) и красителя (2,6-дихлорфенолиндофенола). Данная методика характеризуется высокой чувствительностью, отсутствием фонового сигнала и устойчивостью электроноакцептора в мицеллярной системе.

2. Обнаружено выраженное влияние состава мицеллярной матрицы на активность AtGALDH и TcGAL: включение фосфолипидов фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина в мицеллярную систему приводит к изменению профиля активности за счёт снижения плотности отрицательного заряда на границе раздел фаз, а также за счёт формирования липопротеидных комплексов.

3. Установлено, что природа мицеллообразующего ПАВ влияет на олигомерный состав AtGALDH и TcGAL: в мицеллах АОТ для обоих ферментов наблюдаются два оптимума активности, которые соответствуют функционированию мономерной и димерной форм. В присутствии катионного ЦТАБ и нейтрального Бридж-96 в мицеллярной системе ферменты функционируют в мономерной форме.

4. Обнаружено, что коэнзимы Q₀, Q₁, 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон и 2,6-диметокси-1,4-бензохинон усиливают активность TcGAL и AtGALDH, являясь электроноакцепторами. Использование 2,6-диметокси-1,4-бензохинона как электроноакцептора обеспечивает наиболее высокую максимальную скорость реакции по сравнению со всеми остальными изученными производными 1,4-бензохинона. Обнаружено, что флавоноиды, кверцетин и дигидрокверцетин, являются активаторами TcGAL.

5. Разработан подход к проведению ингибиторного анализа TcGAL. Найдены эффективные ингибиторы TcGAL ряда аллилполиалкоксибензолов (АПАБ) и ряда аллилбензола с IC₅₀ = 10-100 мкМ и идентифицированы структурные фрагменты АПАБ, значимые для ингибирования. Аллильная и метокси- группы важны для усиления ингибирующего эффекта TcGAL. Установлены неконкурентный и конкурентный механизмы ингибирования TcGAL и AtGALDH апиолом и ликорином соответственно.

6. Обнаружено, что конъюгаты АПАБ с трифенилфосфониевым фрагментом обладают более высоким ингибирующим действием по сравнению с немодифицированными АПАБ за счет концентрирования АПАБ на границе раздел фаз несущей отрицательный заряд.

7. Сравнительное изучение действия ингибиторов на TcGAL и на модельный фермент AtGALDH (с дегидрогеназной активностью), и его мутантную форму Ala113Gly (с оксидазной активностью), показало, что аллилполиалкоксибензолы в большей степени влияют на оксидазную активность изученных ферментов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.х.н., проф. Кудряшовой Е.В. за чуткое руководство и всестороннюю помощь и поддержку на протяжении всей совместной научной работы.

Автор благодарен внутреннему рецензенту д.х.н. проф. Гладилину А.К. и оппонентам д.х.н. Марквичевой Е.А., д.б.н. проф. Шумянцевой В.В. и к.х.н. доц. Сыбачину А.В. за внимательное рассмотрение работы и ценные комментарии.

Автор благодарит зав. кафедрой д.х.н., проф. Клячко Н.Л. и весь коллектив кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова и отдельно коллектив научной группы «Спектроскопия биополимеров» за плодотворную

научную работу, продуктивные обсуждения и дружеское участие на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Автор благодарит к.х.н. доц. Белогурову Н.Г. за продуктивные обсуждения и моральную поддержку, к.х.н. Сакодынскую И.К. за помощь и ценные замечания при оформлении автореферата и документов.

Автор выражает благодарность сотрудникам ИОХ РАН, д.х.н. Семенову В.В. и к.х.н. Крылову С.С., за продуктивное обсуждение работы в контексте выбора перспективных ингибиторов.

Автор выражает сердечную благодарность своим родителям за постоянную моральную поддержку, без которой не состоялось бы написание работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Dijkman Willem P., De Gonzalo Gonzalo, Mattevi Andrea, Fraaije Marco W.* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013. V. 97. P. 5177–5188. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4925-7>
2. *Martin Caterina, Binda Claudia, Fraaije Marco W., Mattevi Andrea.* // Enzymes 2020. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.enz.2020.05.002>
3. *Leferink Nicole G.H., Heuts Dominic P.H.M., Fraaije Marco W., van Berkel Willem J.H.* // Arch. Biochem. Biophys. 2008. V. 474. P. 292–301. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.01.027>
4. *Leferink Nicole G.H., Fraaije Marco W., Joosten Henk Jan, Schaap Peter J., Mattevi Andrea, van Berkel Willem J.H.* // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 4392–4397. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808202200>
5. *Nishino Tomoko, Okamoto Ken, Eger Bryan T., Pai Emil F., Nishino Takeshi.* // FEBS J. 2008. V. 275. P. 3278–3289. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06489.x>
6. *Leferink Nicole G.H., Van Den Berg Willy A.M., Van Berkel Willem J.H.* // FEBS J. 2008. V. 275. P. 713–726. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x>
7. *Ewing Tom A.* // Mechanistic and biocatalytic enzymology of flavoprotein oxidases. PhD thesis, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. 2018.
8. *Wong Chun Ming, Wong Kwun Hei, Chen Xiao Dong.* // Appl. Microbiol. Biotechnol.

2008. V. 78. P. 927–938. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1407-4>
9. *Kudryashova Elena V., Leferink Nicole G.H., Slot Ilse G.M., Van Berkel Willem J.H.* // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 2011. V. 1814. P. 545–552.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.001>
 10. *Pollegioni Loredano, Sacchi Silvia, Murtas Giulia.* // *Front. Mol. Biosci.* 2018. V. 5. P. 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00107>
 11. *Pollegioni L., Piubelli L., Sacchi S., Pilone M. S., Molla G.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2007. V. 64. P. 1373–1394. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6558-4>
 12. *Vishwakarma Abhaypratap, Tetali Sarada Devi, Selinski Jennifer, Scheibe Renate, Padmasree Kollipara.* // *Ann. Bot.* 2015. V. 116. P. 555–569.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcv122>
 13. *Rizwan Mohamed, Rasheed Haroon Al, Tarjan Gabor.* // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2018. V. 142. P. 1564–1570. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0285-RS>
 14. *Mráček Tomáš, Drahotka Zdeněk, Houštěk Josef.* // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2013. V. 1827. P. 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.014>
 15. *Nghi Do Huu, Kellner Harald, Büttner Enrico, Huong Le Mai, Duy Le Xuan, Giap Vu Dinh, Quynh Dang Thu, Hang Tran Thi Nhu, Verberckmoes An, Diels Ludo, Liers Christiane, Hofrichter Martin.* // *Appl. Biol. Chem.* 2021. V. 64. .
<https://doi.org/10.1186/s13765-021-00637-y>
 16. *Roldán Angela, Comini Marcelo A., Crispo Martina, Krauth-Siegel R. Luise.* // *Mol. Microbiol.* 2011. V. 81. P. 623–639. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07721.x>
 17. *Augustiniene Ernesta, Malys Naglis.* // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-06028-7>
 18. *Tolomeo Maria, Nisco Alessia, Leone Piero, Barile Maria.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1–32. <https://doi.org/10.3390/ijms21155310>
 19. *Singh Anju, Maqbool Mudasir, Mobashir Mohammad, Hoda Nasimul.* // *Eur. J. Med. Chem.* 2017. V. 125. P. 640–651. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.085>
 20. *Jabłońska Jagoda, Tawfik Dan S.* // *Protein Sci.* 2022. V. 31. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1002/pro.4310>
 21. *Chudin Andrey A., Kudryashova Elena V.* // *Analytica* 2022. V. 3. P. 36–53.

<https://doi.org/10.3390/analytica3010004>

22. Zhao Guohua, Bruckner Robert C, Jorns Marilyn Schuman. // 2008. P. 9124–9135.
23. Kim Seungsu, Nibe Eri, Ferri Stefano, Tsugawa Wakako, Sode Koji. // *Biotechnol. Lett.* 2010. V. 32. P. 1123–1129. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0267-z>
24. Sygmund Christoph, Santner Paul, Krondorfer Iris, Peterbauer Clemens K., Alcalde Miguel, Nyanhongo Gibson S., Guebitz Georg M., Ludwig Roland. // *Microb. Cell Fact.* 2013. V. 12. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-38>
25. Ferri Stefano, Nibe Eri, Miyamoto Yusuke, Kim Seungsu, Tsugawa Wakako, Koji Sode. // *ECS Trans.* 2019. V. 35. P. 113–116.
26. Krondorfer Iris, Lipp Katharina, Brugger Dagmar, Staudigl Petra, Sygmund Christoph, Haltrich Dietmar, Peterbauer Clemens K. // *PLoS One* 2014. V. 9. P. 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091145>
27. Burgener Simon, Schwander Thomas, Romero Elvira, Fraaije Marco W., Erb Tobias J. // *Molecules* 2018. V. 23. . <https://doi.org/10.3390/molecules23010068>
28. Hiraka Kentaro, Kojima Katsuhiko, Tsugawa Wakako, Asano Ryutaro, Ikebukuro Kazunori, Sode Koji. // *Biosens. Bioelectron.* 2020. V. 151. P. 111974. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111974>
29. Piubelli Luciano, Pedotti Mattia, Feindler-boeckh Susanne, Pilone Mirella S, Oxidase Cholesterol. // 2008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802321200>
30. Yue Kimberley Q, Ghisla Sandro, Vrielink Alice. // 2001. V. 276. P. 30435–30441. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104103200>
31. Chen Lin, Lyubimov Artem Y, Brammer Leighanne, Vrielink Alice, Sampson Nicole S. // 2008. P. 5368–5377.
32. Engilberge Sylvain, Wagner Tristan, Carpentier Philippe, Girard Eric, Shima Seigo. // *Chem. Commun.* 2020. V. 56. P. 10863–10866. <https://doi.org/10.1039/d0cc04557h>
33. Bruckner Robert C., Winans Jennifer, Jorns Marilyn Schuman. // *Biochemistry* 2011. V. 50. P. 4949–4962. <https://doi.org/10.1021/bi200349m>
34. Chaiyen Pimchai, Fraaije Marco W., Mattevi Andrea. // *Trends Biochem. Sci.* 2012. V. 37. P. 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.06.005>
35. McDonald Claudia A., Fagan Rebecca L., Collard François, Monnier Vincent M., Palfey

- Bruce A. // J. Am. Chem. Soc. 2011. V. 133. P. 16809–16811.
<https://doi.org/10.1021/ja2081873>
36. N. Appaji Rao, Morimitsu Nishikimi, Kunio Yagi. // Biochim. Biophys. Acta 1972. V. 276. P. 350–362.
 37. Shumakovich G. P., Dubova L. G., Byzova N. A., Yaropolov A. I., Bachurin S. O. // Elektrokhimiya 2004. V. 40. P. 1111–1119.
 38. Shumakovich G. P., Shleev S. V., Morozova O. V., Gonchar M. V., Yaropolov A. I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. V. 43. P. 15–20. <https://doi.org/10.1134/S0003683807010024>
 39. Tittmann K., Golbik R., Ghisla S., Hubner G. // Biochemistry 2000. V. 39. P. 10747–10754. <https://doi.org/10.1021/bi0004089>
 40. Frébortová Jitka, Fraaije Marco W., Galuszka Petr, Šebela Marek, Peč Pavel, Hrbáč Jan, Novák Ondřej, Bilyeu Kristin D., English James T., Frébort Ivo. // Biochem. J. 2004. V. 380. P. 121–130. <https://doi.org/10.1042/BJ20031813>
 41. Leferink Nicole G.H., Van Duijn Esther, Barendregt Arjan, Heck Albert J.R., Van Berkel Willem J.H. // Plant Physiol. 2009. V. 150. P. 596–605.
<https://doi.org/10.1104/pp.109.136929>
 42. Loew Noya, Tsugawa Wakako, Nagae Daichi, Kojima Katsuhiko, Sode Koji. // Sensors (Switzerland) 2017. V. 17. . <https://doi.org/10.3390/s17112636>
 43. Avila Carla Cristi, Mule Simon Ngao, Rosa-Fernandes Livia, Viner Rosa, Barisón María Julia, Costa-Martins André Guilherme, de Oliveira Gilberto Santos, Teixeira Marta Maria Geraldine, Marinho Claudio Romero Farias, Silber Ariel Mariano, Palmisano Giuseppe. // Genes (Basel). 2018. V. 9. . <https://doi.org/10.3390/genes9080413>
 44. Ludwig Roland, Ozga Magdalena, Zámocký Marcel, Peterbauer Clemens, Kulbe Klaus D., Haltrich Dietmar. // Biocatal. Biotransformation 2004. V. 22. P. 97–104.
<https://doi.org/10.1080/10242420410001692787>
 45. Camila M. Clemente, Tatiana Pineda, M. Lina Yepes, Yulieth Upegui, A., Daniel Allemandi, M. Sara Robledo, Soledad Ravetti. // Arch. Pharm. (Weinheim). 2022. V. 355. . <https://doi.org/10.1002/ardp.202100432>
 46. Чудин А.А., Кудряшова Е.В. // Биотехнология 2022. V. 38. P. 80–85.
<https://doi.org/10.56304/S0234275822040068>

47. *Jardim-Messeder Douglas, Caverzan Andréia, Rauber Rafael, de Souza Ferreira Eduardo, Margis-Pinheiro Márcia, Galina Antonio.* // *New Phytol.* 2015. V. 208. P. 776–789. <https://doi.org/10.1111/nph.13515>
48. *Klyachko Natalia L., Shchedrina Valentina A., Efimov Alexander V., Kazakov Sergey V., Gazaryan Irina G., Kristal Bruce S., Brown Abraham M.* // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 16106–16114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414285200>
49. *Batista Ana P., Kletzin Arnulf, Pereira Manuela M.* // *FEMS Microbiol. Lett.* 2008. V. 281. P. 147–154. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01082.x>
50. *Killyéni Anikó, Yakovleva Maria E., Macaodha Domhnall, Conghaile Peter Ó, Gonaus Christoph, Ortiz Roberto, Leech Dónal, Popescu Ionel Catalin, Peterbauer Clemens K., Gorton Lo.* // *Electrochim. Acta* 2014. V. 126. P. 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.08.069>
51. *Milton Ross D.* // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1504. P. 193–202. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6499-4_15
52. *Silveira Célia M., Almeida M. Gabriela.* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. P. 3619–3635. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6786-4>
53. *Hama Fuji Tetsuro, Tsugawa Wakako, Sode Koji.* // *J. Clin. Lab. Anal.* 2002. V. 16. P. 299–303. <https://doi.org/10.1002/jcla.10054>
54. *Tasca Federico, Timur Suna, Ludwig Roland, Haltrich Dietmar, Volc Jindrich, Antiochia Riccarda, Gorton Lo.* // *Electroanalysis* 2007. V. 19. P. 294–302. <https://doi.org/10.1002/elan.200603740>
55. *Aljanabi Reem, Alsous Lina, Sabbah Dima A., Gul Halise Inci, Gul Mustafa, Bardaweel Sanaa K.* // *Molecules* 2021. V. 26. . <https://doi.org/10.3390/molecules26196019>
56. *Gujjar Ramesh, Marwaha Alka, Mazouni Farah El, White John, White Karen L., Creason Sharon, Shackelford David M., Baldwin Jeffrey, Charman William N., Buckner Frederick S., Charman Susan, Rathod Pradipsinh K., Phillips Margaret A.* // *J. Med. Chem.* 2009. V. 52. P. 1864–1872. <https://doi.org/10.1021/jm801343r>
57. *Ramos Enrique I., Garza Kristine M., Krauth-Siegel R. L., Bader Julia, Martinez Luiz E., Maldonado Rosa A.* // *J. Parasitol.* 2009. V. 95. P. 461–466. <https://doi.org/10.1645/GE-1686.1>
58. *Ebiloma Godwin U., Ayuga Teresa Díaz, Balogun Emmanuel O., Gil Lucía Abad,*

- Donachie Anne, Kaiser Marcel, Herraiz Tomás, Inaoka Daniel K., Shiba Tomoo, Harada Shigeharu, Kita Kiyoshi, de Koning Harry P., Dardonville Christophe.* // Eur. J. Med. Chem. 2018. V. 150. P. 385–402. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.075>
59. *Jortzik Esther, Wang Lihui, Ma Jipeng, Becker Katja.* // Methods Mol. Biol. 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0452-5_7
 60. *Cicero Arrigo F.G., Fogacci Federica, Cincione Raffaele Ivan, Tocci Giuliano, Borghi Claudio.* // Med. Princ. Pract. 2021. V. 30. P. 122–130. <https://doi.org/10.1159/000512178>
 61. *García-Huertas Paola, Cardona-Castro Nora.* // Biomed. Pharmacother. 2021. V. 142. P. 112020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112020>
 62. *Zheoat Ahmed M., Alenezi Samya, Elmahallawy Ehab Koth, Ungogo Marzuq A., Alghamdi Ali H., Watson David G., Igoli John O., Gray Alexander I., de Koning Harry P., Ferro Valerie A.* // Pathogens 2021. V. 10. P. 1–9. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020175>
 63. *Aponte José C., Verástegui Manuela, Málaga Edith, Zimic Mirko, Quiliano Miguel, Vaisberg Abraham J., Gilman Robert H., Hammond Gerald B.* // J. Med. Chem. 2008. V. 51. P. 6230–6234. <https://doi.org/10.1021/jm800812k>
 64. *Borchhardt Deise M., Mascarello Alessandra, Chiaradia Louise Domeneghini, Nunes Ricardo J., Oliva Glaucius, Yunes Rosendo A., Andricopulo Adriano D.* // J. Braz. Chem. Soc. 2010. V. 21. P. 142–150. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000100021>
 65. *Morais Thiago R., Conserva Geanne A.Alves, Varela Marina T., Costa-Silva Thais A., Thevenard Fernanda, Ponci Vitor, Fortuna Ana, Falcão Amílcar C., Tempone Andre G., Fernandes João Paulo S., Lago João Henrique G.* // Sci. Rep. 2020. V. 10. P. 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62352-w>
 66. *Carvalho Diogo Teixeira, Teixeira Melissa, Luelmo Sara, Santarém Nuno, Pinto Eugénia, Cordeiro-da-Silva Anabela, Sousa Emília.* // Mar. Drugs 2023. V. 21. . <https://doi.org/10.3390/md21110551>
 67. *Singh Ram, Geetanjali, Sharma Naveen.* // Chem. Biol. Lett. 2014. V. 1. P. 33–39.
 68. *Szilágyi Bence, Ferenczy György G., Keserű György M.* // Expert Opin. Drug Discov. 2018. V. 13. P. 973–982. <https://doi.org/10.1080/17460441.2018.1524459>
 69. *Can Nafiz nc, Osmaniye Derya, Levent Serkan, Sa Sağlık Begüm Nurpelin, Inci Beril, Ilgin Sinem, Özkay Yusuf, Kaplancikli Zafer Asim.* // Molecules 2017. V. 22. .

<https://doi.org/10.3390/molecules22081381>

70. *Lara Leonardo S., Lechuga Guilherme C., Moreira Caroline Dos S., Santos Thaís B., Ferreira Vitor F., da Rocha David R., Pereira Mirian C.S.* // *Molecules* 2021. V. 26. .
<https://doi.org/10.3390/molecules26020423>
71. *Чудин А.А., Злотников И.Д., Крылов С.С., Семенов В.В., Кудряшова Е.В.* // *Биохимия* 2023.
72. *Bjelaković Gordana, Stojanović Ivana, Bjelaković Goran B.* // *Med. Biol.* 2002. V. 9. P. 363.
73. *T.P. Hoar, J.H. Schulman.* // *Nature* 1943. V. 152. P. 102–103.
<https://doi.org/10.1038/152102a0>
74. *HANAHAN D. J.* // *J. Biol. Chem.* 1952. V. 195. P. 199–206.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50890-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50890-0)
75. *Misiorowski Ronald L., Wells Michael A.* // *Biochemistry* 1974. V. 13. P. 4921–4927.
<https://doi.org/10.1021/bi00721a007>
76. *Luisi Pier Luigi, Henninger Frank, Joppich Markus, Dossena Arnaldo, Casnati Giuseppe.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977. V. 74. P. 1384–1389.
[https://doi.org/10.1016/0006-291X\(77\)90595-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(77)90595-2)
77. *Martinek K., Levashov A.V., Klyachko N.L., Berezin I.V.* // *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 1977. V. 236. P. 920–923.
78. *Хмельницкий Ю. Л., Левашов А. В., Левашов А. В., Мартинек К.* // *Успехи химии* 1984. V. 53. P. 545–565.
79. *Arsene Melania Liliana, Răut Iuliana, Călin Mariana, Jecu Maria Luiza, Doni Mihaela, Gurban Ana Maria.* // *Processes* 2021. V. 9. P. 1–43. <https://doi.org/10.3390/pr9020345>
80. *Held Paul.* // *BioTek Instruments Rep.* 2014.
81. *Martinek Karel, Klyachko N. L., Kabanov A. V., Khmelnitsky Yu L., Levashov A. V.* // *BBA - Biomembr.* 1989. V. 981. P. 161–172. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90024-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90024-2)
82. *Vinogradov Alexei A., Kudryashova Elena V., Levashov Andrei V., Van Dongen Walter M.A.M.* // *Anal. Biochem.* 2003. V. 320. P. 234–238. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00384-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00384-1)

83. *Kudryashova E. V., Bronza V. L., Vinogradov A. A., Kamyshny A., Magdassi S., Levashov A. V.* // J. Colloid Interface Sci. 2011. V. 353. P. 490–497.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.09.072>
84. *Кудряшова Е В, Гладиллин А К, Левашов А В.* // Успехи биологической химии 2002. V. 42. P. 257–294.
85. *Liang Yunshan, Yuan Xingzhong, Zeng Guangming, Zhong Hua, Li Hui, Wang Weiwei.* // Sci. China Chem. 2011. V. 54. P. 715–723. <https://doi.org/10.1007/s11426-011-4266-2>
86. *Измайлова В.Н., Ямпольская Г.П., Сумм Б.Д.* // 1998. Химия, Москва.
87. *Клячко Н.Л., Пшежецкий А.В., Кабанов А.В., Вакула С.В., Мартинек К.* // Биологические мембраны 1990. V. 7. P. 467–472.
88. *Kulkarni C.V.* // Encycl. Biophys. 2013. In *Encyclopedia of Biophysics* (1st ed.), Gordon C. K. Roberts (ed.). Springer, Heidelberg, 975–983. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-16712-6>
89. *Shome Anshupriya, Roy Sangita, Kumar Prasanta.* // Langmuir 2007. V. 23. P. 4130–4136.
90. *Orlich Bernhard, Schomäcker Reinhard.* // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2002. V. 75. P. 185–208. https://doi.org/10.1007/3-540-44604-4_6
91. *Walde Peter, Peng Qiaoqian, Fadnavis Nitin W, Battistel Ezio, Luis Pier Luigi.* // 1988. V. 409. P. 401–409.
92. *Almeida Fábio C. L., Valente Ana Paula, Chaimovich Hernan.* // Biotechnol. Bioeng. 1998. V. 59. P. 360–363. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0290\(19980805\)59:3<360::aid-bit12>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0290(19980805)59:3<360::aid-bit12>3.0.co;2-i)
93. *Ermakova Elena A., Zakhartchenko Natalia L., Zuev Yuri F.* // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2008. V. 317. P. 297–302.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.10.027>
94. *Gupte Anagha, Nagarajan R., Kilara Arun.* // Dev. Food Sci. 1995. V. 37. P. 1–74.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4501\(06\)80154-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4501(06)80154-8)
95. *Lepesheva Galina I., Villalta Fernando, Waterman Michael R.* // Adv. Parasitol. 2011. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00004-6>
96. *Logan Flora J., Taylor Martin C., Wilkinson Shane R., Kaur Harparkash, Kelly John M.* //

- Biochem. J. 2007. V. 407. P. 419–426. <https://doi.org/10.1042/BJ20070766>
97. *Irigoin Florencia, Cibils Lucía, Comini Marcelo A., Wilkinson Shane R., Flohé Leopold, Radi Rafael.* // Free Radic. Biol. Med. 2008. V. 45. P. 733–742.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.028>
98. *Leferink Nicole G.H., Berkel Willem J.H. van Berkel.* // Methods Mol. Biol. 2014. V. 1146. P. 95–111. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0452-5>
99. *Leferink Nicole G.H., Jose Mac Donald F., van den Berg Willy A.M., van Berkel Willem J.H.* // FEBS Lett. 2009. V. 583. P. 3199–3203.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.09.004>
100. *Schimmeyer Joram, Bock Ralph, Meyer Etienne H.* // Plant Mol. Biol. 2016. V. 90. P. 117–126. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0400-4>
101. *Pineau Bernard, Layoune Ouardia, Danon Antoine, De Paepe Rosine.* // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 32500–32505. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805320200>
102. *Soufari Heddy, Parrot Camila, Kuhn Lauriane, Waltz Florent, Hashem Yaser.* // Nat. Commun. 2020. V. 11. . <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18814-w>
103. *Bleeg Henry S., Christensen Flemming.* // Eur. J. Biochem. 1982. V. 127. P. 391–396.
104. *Østergaard Jens, Persiau Geert, Davey Mark W., Bauw Guy, Van Montagu Marc.* // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 30009–30016. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.48.30009>
105. *Ôba, Kazuko, Ishikawa Seiko, Nishikawa Masumi, Mizuno Hiroko, Yamamoto Tomoko.* // J. Biochem. 1995. V. 117. P. 120–124.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124697>
106. *Imai Tsuyoshi, Karita Shuichi, Shiratori Gen Ichi, Hattori Miyo, Nunome Tsukasa, Ôba Kazuko, Hirai Masashi.* // Plant Cell Physiol. 1998. V. 39. P. 1350–1358.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a029341>
107. *Yabuta Yukinori, Yoshimura Kazuya, Takeda Toru, Shigeoka Shigeru.* // Plant Cell Physiol. 2000. V. 41. P. 666–675. <https://doi.org/10.1093/pcp/41.6.666>
108. *El-Masry Amal A., Zeid Abdallah M.* // BMC Chem. 2023. V. 17. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s13065-023-00979-2>
109. *Napolitano Valeria, Dabrowska Agnieszka, Schorpp Kenji, Mourão André, Barreto-Duran Emilia, Benedyk Malgorzata, Botwina Pawel, Brandner Stefanie, Bostock Mark,*

- Chykunova Yuliya, Czarna Anna, Dubin Grzegorz, Fröhlich Tony, Hölscher Michael, Jedrysik Malwina, Matsuda Alex, Owczarek Katarzyna, Pachota Magdalena, Plettenburg Oliver, Potempa Jan, Rothenaigner Ina, Schlauderer Florian, Slys Klaudia, Szczepanski Artur, Greve-Isdahl Mohn Kristin, Blomberg Bjorn, Sattler Michael, Hadian Kamyar, Popowicz Grzegorz Maria, Pyrc Krzysztof.* // *Cell Chem. Biol.* 2022. V. 29. P. 774-784.e8. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2021.11.006>
110. *Manchester Thiago, Cavalcanti Danielle Pereira, Zogovich Marcelo, De Souza Wanderley, Motta Maria Cristina Machado.* // *Parasitology* 2013. V. 140. P. 1422–1431. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001029>
 111. *Cao Zhifei, Yang Ping, Zhou Quansheng.* // *Sci. China Chem.* 2013. V. 56. P. 1382–1391. <https://doi.org/10.1007/s11426-013-4967-9>
 112. *Martinez-Peinado Nieves, Cortes-Serra Nuria, Torras-Claveria Laura, Pinazo Maria Jesus, Gascon Joaquim, Bastida Jaume, Alonso-Padilla Julio.* // *Parasites and Vectors* 2020. V. 13. P. 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04171-6>
 113. *Semenov Victor V., Tsyganov Dmitry V., Semenova Marina N., Chuprov-Netochin Roman N., Raihstat Mikhail M., Konyushkin Leonid D., Volynchuk Polina B., Marusich Elena I., Nazarenko Vera V., Leonov Sergey V., Kiselyov Alex S.* // *J. Nat. Prod.* 2016. V. 79. P. 1429–1438. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00173>
 114. *Tsyganov Dmitry V., Samet Alexander V., Silyanova Eugenia A., Ushkarov Vladimir I., Varakutin Alexander E., Chernysheva Natalia B., Chuprov-Netochin Roman N., Khomutov Andrey A., Volkova Anna S., Leonov Sergey V., Semenova Marina N., Semenov Victor V.* // *ACS Omega* 2022. V. 7. P. 3369–3383. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05515>
 115. *Unden G., Bongaerts J.* // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1997. V. 1320. P. 217–234. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(97\)00034-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(97)00034-0)
 116. *Christ-Hazelhof E., Nugteren D. H.* // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* 1979. V. 572. P. 43–51. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(79\)90198-X](https://doi.org/10.1016/0005-2760(79)90198-X)
 117. *Schertl Peter, Sunderhaus Stephanie, Klodmann Jennifer, Gergoff Grozeff Gustavo E., Bartoli Carlos G., Braun Hans Peter.* // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 14412–14419. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305144>
 118. *Komkova Maria A., Orlov Alexei K., Galushin Andrei A., Andreev Egor A., Karyakin Arkady A.* // *Anal. Chem.* 2021. V. 93. P. 12116–12121.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02664>

119. *Levashov A.V., Khmel'nitsky Y.L., Klyachko N.L., Chernyak V.Y., Martinek K.* // *Anal. Biochem.* 1981. V. 118. P. 42–46.
120. *Levashov Andrey V, Klyachko Natalia L.* // *Methods Biotechnol.* 2001. V. 15. P. 575–586. Retrieved from <https://doi.org/10.1385/1-59259-112-4:575%0Ahttps://doi.org/10.1385/1-59259-112-4:575%0Ahttps://link.springer.com/content/pdf/10.1385%2F1-59259-112-4%3A575.pdf>
121. *Biasutti María A., Abuin Elsa B., Silber Juana J., Correa N. Mariano, Lissi Eduardo A.* // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2008. V. 136. P. 1–24.
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.07.001>
122. *de Azevedo-Martins Allan C., Ocaña Kary, de Souza Wanderley, de Vasconcelos Ana Tereza Ribeiro, Teixeira Marta M.G., Camargo Erney P., Alves João M.P., Motta Maria Cristina M.* // *Pathogens* 2022. V. 11. . <https://doi.org/10.3390/pathogens11010041>
123. *Oliveira M. M., Timm S. L., Costa S. C.G.* // *Comp. Biochem. Physiol. -- Part B Biochem.* 1977. V. 58. P. 195–199. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(77\)90109-2](https://doi.org/10.1016/0305-0491(77)90109-2)
124. *Tsui F. C., Ojcius D. M., Hubbell W. L.* // *Biophys. J.* 1986. V. 49. P. 459–468.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(86\)83655-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(86)83655-4)
125. *Levashov A. V., Ugolnikova A. V., Ivanov M. V., Klyachko N. L.* // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1997. V. 42. P. 527–534. <https://doi.org/10.1080/15216549700202931>
126. *Chatterley Adam S., Laity Peter, Holland Chris, Weidner Tobias, Woutersen Sander, Giubertoni Giulia.* // *Molecules* 2022. V. 27. . <https://doi.org/10.3390/molecules27196275>
127. *Jonas Ana, Drengler Susan M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977. V. 78. P. 1424–1430.
128. *Lolkema Juke S., Slotboom Dirk Jan.* // *J. Gen. Physiol.* 2015. V. 145. P. 565–574.
<https://doi.org/10.1085/jgp.201411332>
129. *Azimi Maryam, Nafissi-Varcheh Nastaran, Faramarzi Mohammad Ali, Aboofazeli Reza.* // *Iran. J. Pharm. Res.* 2016. V. 15. P. 441–452.
130. *Kabanov Alexander V., Nametkin Sergey N., Levashov Andrey V.* // *FEBS Lett.* 1990. V. 267. P. 236–238. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80933-A](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80933-A)
131. *Yang Zhen, Robb Donald A.* // *Biocatal. Biotransformation* 2005. V. 23. P. 423–430.

<https://doi.org/10.1080/10242420500387433>

132. *Gupte Anagha, Nagarajan R., Kilara Arun.* // *Ind. Eng. Chem. Res.* 1995. V. 34. P. 2910–2922. <https://doi.org/10.1021/ie00047a045>
133. *Arrigoni O., De Gara L., Paciolla C., Evidente A., De Pinto M. C., Liso R.* // *J. Plant Physiol.* 1997. V. 150. P. 362–364. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(97\)80134-4](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(97)80134-4)
134. *Mu Hong Mei, Wang Ren, Li Xiao Dan, Jiang Yu Mei, Peng Feng, Xia Bing.* // *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 2010. V. 65 C. P. 458–462. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-7-807>
135. *Tommasi F., De Gara L.* // *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 1990. V. 66. P. 953–60.
136. *Evtugyn Gennady.* // <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40241-8>
137. *Lloyd Matthew D.* // 2021. V. 0. P. 40–45. <https://doi.org/10.1042/bio>
138. *Zlotnikov Igor D., Belogurova Natalya G., Krylov Sergey S., Semenova Marina N., Semenov Victor V., Kudryashova Elena V.* // *Pharmaceuticals* 2022. V. 15. . <https://doi.org/10.3390/ph15070861>
139. *Parise-Filho Roberto, Pasqualoto Kerly Fernanda Mesquita, Magri Fátima Maria Motter, Ferreira Adilson Kleber, Da Silva Bárbara Athayde Vaz Galvão, Damião Mariana Celestina Frojuello Costa Bernstorff, Tavares Maurício Temotheo, Azevedo Ricardo Alexandre, Auada Aline Vivian Vatti, Polli Michelle Carneiro, Brandt Carlos Alberto.* // *Arch. Pharm. (Weinheim).* 2012. V. 345. P. 934–944. <https://doi.org/10.1002/ardp.201200212>
140. *Iaubasarova I. R., Khailova L. S., Nazarov P. A., Rokitskaya T. I., Silachev D. N., Danilina T. I., Plotnikov E. Y., Denisov S. S., Kirsanov R. S., Korshunova G. A., Kotov1 E. A., Zorov D. B., Antonenko Y. N.* // *Biochem.* 2020. V. 85. P. 1578–1590.
141. *Скуредина А.А., Копнова Т.Ю., Ле-Дейген И.М., Кудряшова Е.В.* // *Вестник Московского университета. Серия “Химия”* 2020. V. 61. P. 16–24.
142. *Zlotnikov Igor D., Krylov Sergey S., Semenova Marina N., Semenov Victor V., Kudryashova Elena V.* // *Pharmaceuticals* 2023. V. 16. . <https://doi.org/10.3390/ph16121651>
143. *Budzinski J. W., Foster B. C., Vandenhoek S., Arnason J. T.* // *Phytomedicine* 2000. V. 7. P. 273–282. [https://doi.org/10.1016/S0944-7113\(00\)80044-6](https://doi.org/10.1016/S0944-7113(00)80044-6)

144. *Saul Stephanie, Pasioka Bastian, Gulaboski Rubin, Bogeski Ivan, Mirc Valentin, Hoth Markus, Haeri Haleh H, Stefova Marina, Stanoeva Jasmina Petreska, Kappl Reinhard.* // 2013. P. 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep01865>
145. *Laskowski Marta J., Dreher Kate A., Gehring Mary A., Abel Steffen, Gensler Arminde L., Sussex Ian M.* // *Plant Physiol.* 2002. V. 128. P. 578–590.
<https://doi.org/10.1104/pp.010581>
146. *Alghanmi Reem M.* // *J. Chem.* 2019. V. 2019. . <https://doi.org/10.1155/2019/1743147>
147. *Detremmerie Charlotte, Vanhoutte Paul M., Leung Susan.* // *Acta Pharm. Sin. B* 2017. V. 7. P. 401–408. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.06.003>
148. *Manal Abdulllah Alduwish.* // *Am. J. Life Sci.* 2017. V. 5. P. 52.
<https://doi.org/10.11648/j.ajls.20170502.13>
149. *Gray Joshua P., Burgos Delaine Zayasbazan, Yuan Tao, Seeram Navindra, Rebar Rebecca, Follmer Rebecca, Heart Emma A.* // *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 2016. V. 310. P. E394–E404. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00250.2015>
150. *Shaukat Arslan, Zaidi Arsalan, Anwar Haseeb, Kizilbash Nadeem.* // *Front. Nutr.* 2023. V. 10. . <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1126272>
151. *Yang Dengyu, Wang Tiancheng, Long Miao, Li Peng.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020. V. 2020. . <https://doi.org/10.1155/2020/8825387>
152. *Orlova S. V., Tatarinov V. V., Nikitina E. A., Sheremeta A. V., Ivlev V. A., Vasil'ev V. G., Paliy K. V., Goryainov S. V.* // *Pharm. Chem. J.* 2022. V. 55. P. 1133–1137.
<https://doi.org/10.1007/s11094-022-02548-8>
153. *Rajesh R Udaya, Dhanaraj Sangeetha.* // *Arab. J. Chem.* 2023. V. 16. P. 104881.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104881>
154. *Xue Hui, Xu Meng, Gong Deming, Zhang Guowen.* // *Food Front.* 2023. P. 1643–1665.
<https://doi.org/10.1002/fft2.287>
155. *Jain Shweta, Vaidya Ankur.* // *Pharmacol. Res. - Mod. Chinese Med.* 2023. V. 7. P. 100240. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100240>
156. *Tasdemir Deniz, Kaiser Marcel, Brun Reto, Yardley Vanessa, Schmidt Thomas J., Tosun Fatma, Rüedi Peter.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. V. 50. P. 1352–1364.
<https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1352-1364.2006>

157. *Ribeiro Isadora Cunha, Moraes João Victor Badaró de, Mariotini-Moura Christiane, Polêto Marcelo Depolo Nancy da Rocha Torres, Pavione Raissa Barbosa de Castro, Miranda Izabel Luzia, Sartori Suêlen Karine, Alves Kryssia Lohayne Santos, Bressan Gustavo Costa Raphael de Souza Vasconcellos, Meyer-Fernandes José Roberto, Diaz-Muñoz Gaspar, Fietto Juliana Lopes Rangel.* // *Purinergic Signal*. 2023.
<https://doi.org/10.1007/s11302-023-09974-7>
158. *Amorati Riccardo, Baschieri Andrea, Cowden Adam, Valgimigli Luca.* // *Biomimetics* 2017. V. 2. P. 6–9. <https://doi.org/10.3390/biomimetics2030009>
159. *Wybranowski T., Kruszewski S.* // *Acta Phys. Pol. A* 2014. V. 125. P. 57–60.
<https://doi.org/10.12693/APhysPolA.125.A-57>