

УДК 577.15+612.853-205

©Коллектив авторов

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ CYP51b1 (СТЕРОЛ-14 α -ДЕМЕТИЛАЗЫ) С ПРОИЗВОДНЫМИ КУМАРИНА

Н.А. Петушкова, А.В. Лисица, В.Ф. Позднев, И.И. Карузина*

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, Погодинская улица, д. 10; эл.почта: natalia.petushkova@ibmc.msk.ru

Предложен метод прямой регистрации активности CYP51b1 (стерол-14 α -деметилазы) с использованием производных кумарина в качестве субстрата. Определение каталитической активности фермента с 7-аминокумарин-4-уксусной кислотой (ACAC) основано на регистрации увеличения флуоресценции ($\lambda_{\text{excitation}} = 360 \text{ nm}$ и $\lambda_{\text{emission}} = 435 \text{ nm}$) при 30°C. Показано, что BMR (флавиновый домен бактериального цитохрома P450BM-3) может служить донором электронов в модельной системе для определения активности CYP51b1. Разработанный метод отличается чувствительностью, точностью, простотой и может быть использован для скрининга ингибиторов стерол-14 α -деметилазы.

Ключевые слова: цитохром P450, стерол-14 α -деметилаза, флуоресценция, производные кумарина, ланостерол.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохром P450-содержащие монооксигеназные системы живых организмов, начиная от бактерий до человека, играют ключевую роль в гидроксировании и метаболических превращениях как эндогенных (холестерин, стероидные гормоны, жирные кислоты, простагландины и др.), так и экзогенных (ксенобиотики, токсины, канцерогены и др.) соединений [1]. Широкая субстратная специфичность и катализ различных типов химических реакций делает цитохром P450 перспективным объектом в создании биореакторов для анализа и поиска новых лекарственных препаратов.

В соответствии с информацией ВОЗ в последние годы в мире возросло количество случаев заболевания туберкулезом: ежегодно заболевает до 9 миллионов человек, из них 3 миллиона умирают от его осложнений. Среди факторов широкого распространения туберкулеза следует выделить появление штаммов *Mycobacterium tuberculosis*, обладающих резистентностью к традиционно используемым противотуберкулезным препаратам.

Одной из перспективных молекулярных мишеней для поиска противотуберкулезных препаратов нового поколения является стерол-14 α -деметилаза *M. tuberculosis* (CYP51b1, CYP51MT) из надсемейства цитохромов P450. CYP51b1 катализирует отщепление 14 α -метиловой группы стероидных субстратов; другие субстраты для этого класса ферментов в настоящее время не известны [2].

В последнее время некоторые формы CYP51 были клонированы и экспрессированы в клетках *Escherichia coli*, что позволило выделить рекомбинатный CYP51b1 в высокоочищенном состоянии и охарактеризовать

* - адресат для переписки

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ СТЕРОЛ-14 α -ДЕМЕТИЛАЗЫ

его каталитические функции. Анализ ферментативной активности CYP51b1 показал, что он обладает способностью превращать стеролы в 14 α -деметилованные продукты [3]. Кроме того, идентичность полных аминокислотных последовательностей бактериального фермента и CYP51 человека составляет 28% [4], что делает возможным использование рекомбинантного CYP51b1 для создания систем первичного скрининга противотуберкулезных препаратов. Однако для большинства реакций, катализируемых CYP51b1, характерна очень низкая скорость. Использование методов ВЭЖХ, совмещенной с масс-спектрометрией, или радиоизотопных методов для определения продукта реакции делает затруднительным проведение широкомасштабных скрининговых исследований [5].

Целью настоящей работы являлось изучение возможности использования производных кумарина для определения ферментативной активности CYP51b1 в реконструированной системе, содержащей цитохром P450 и редокс-партнер.

МЕТОДИКА. В работе использовали следующие производные кумарина: 7-этоксикумарин (ЕСМ), 4-метил-7-гидроксикумарин (МНС), 4-метил-7-аминокумарин (МАС) и 7-аминокумарин-4-уксусная кислота (АСАС) (рис. 1).

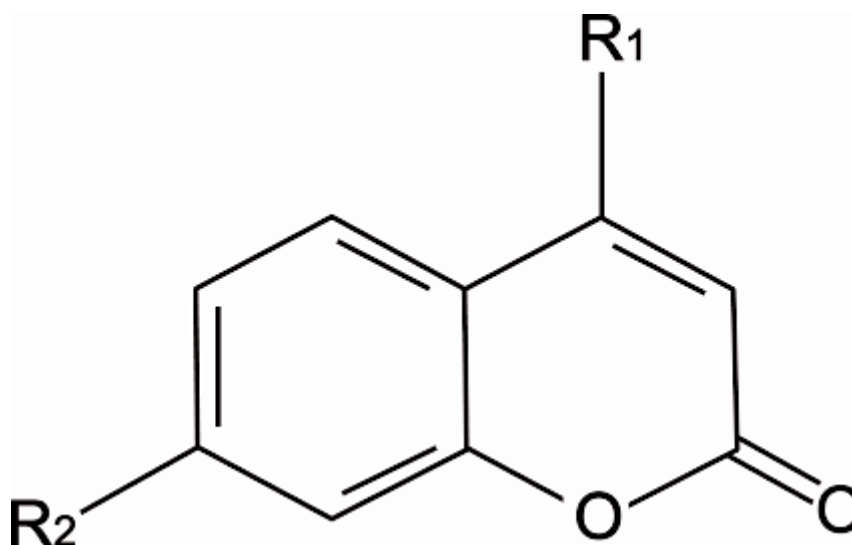


Рисунок 1.

Производные кумарина, используемые в работе.

1. $R_1=H$; $R_2=H$ [Кумарин];
2. $R_1=H$; $R_2=-O-CH_2-CH_3$ [7-этоксикумарин (ЕСМ)];
3. $R_1=CH_3$; $R_2=OH$ [4-метил-7-гидроксикумарин (МНС)];
4. $R_1=CH_3$; $R_2=-NH_2$ [4-метил-7-аминокумарин (МАС)];
5. $R_1=-CH_2-COOH$; $R_2=-NH_2$ [7-аминокумарин-4-уксусная кислота (АСАС)].

CYP51b1 был любезно предоставлен В.М. Говоруном (НИИ физико-химической медицины) [6]. Рекомбинантный BMR был любезно предоставлен Д.Р. Давыдовым (Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, USA).

Окисление производных кумарина определяли при 30 $^{\circ}$ C на спектрофлуориметре Perkin-Elmer LS55 (Великобритания), $\lambda_{\text{excitation}} = 360 \text{ nm}$ и $\lambda_{\text{emission}} = 435 \text{ nm}$. Инкубационная смесь объемом 0,7 мл состояла из 100 мМ HEPES (pH 7,4), содержащего 1 мМ дитиотреитол, 1 мМ ЭДТА и 0,05% Эмульген 913, рекомбинантного CYP51b1 (0,1-0,4 нмоль), редуктазы (0,2-1,0 нмоль) и

свежеприготовленного субстрата, растворенного в ДМСО (конечная концентрация ДМСО в среде инкубации $< 0,5\%$, v/v). Реакцию начинали добавлением $0,5$ мМ раствора NADPH. Сбор и обработку экспериментальных данных осуществляли при помощи пакета программ SpectraLab [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Известно, что производные кумарина, например ЕСМ широко используются для определения ферментативной активности различных форм цитохрома P450 - CYPs 1A1/2, 2A6, 2B6, 2C9 [8-10]. Нами было установлено, что CYP51b1 обладает способностью катализировать окисление всех исследованных производных кумарина – МНС, МАС и АСАС, о чем свидетельствует увеличение флуоресценции после добавления в реакционную смесь NADPH (рис. 2). Скорость ферментативной реакции была линейна в течение 20 мин. и для всех субстратов описывалась схемой Михаэлиса-Ментен. Как видно на рисунке 2 каталитическая активность CYP51b1 с АСАС в качестве субстрата была почти в 2 раза выше, чем для активности с МНС. Исследование кинетических параметров реакции показало, что значение K_m составило 93 мкМ и $V_{max} - 0,243$ единиц флуоресценции/сек для реакции окисления АСАС. В то же время оказалось, что при использовании в качестве субстрата для CYP51b1 - ЕСМ увеличения флуоресценции после добавления NADPH зарегистрировано не было (рис. 2). Кроме того, было обнаружено, что основным ферментом, участвующим в окисления АСАС является CYP51b1, например, CYP2B4 и CYP1A2 демонстрировали скорость окисления 50 мкМ АСАС в 2 раза ниже по сравнению с таковой с CYP51b1.

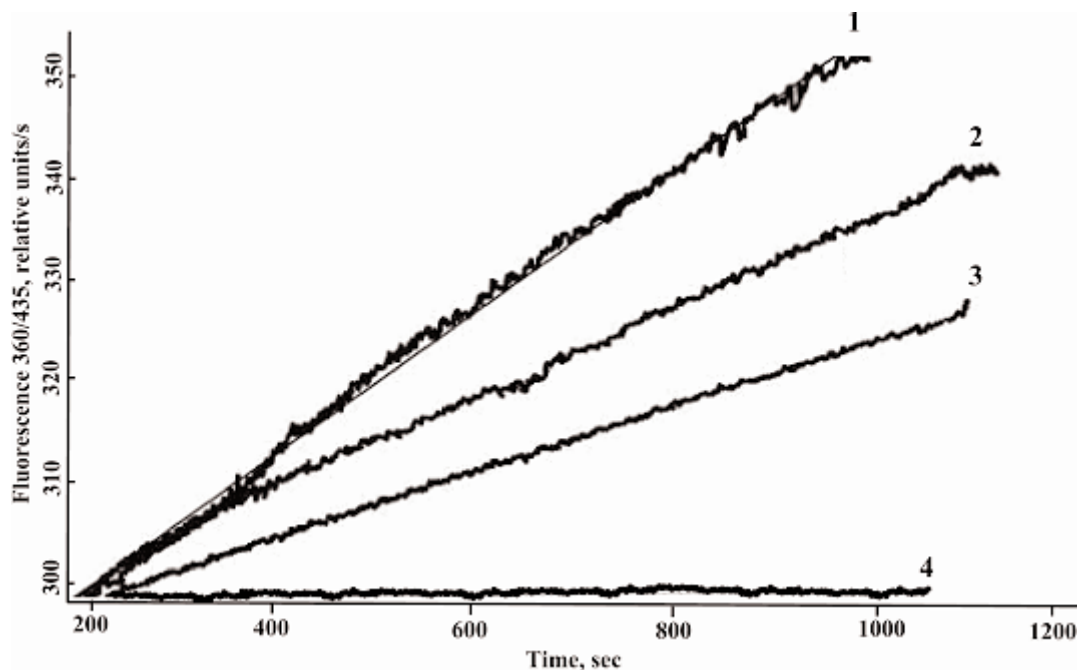


Рисунок 2.

Каталитическая активность рекомбинантного CYP51b1 с производными кумарина в реконструированной системе (см. Методику). 1-АСАС; 2-МАС; 3-МНС; 4-ЕСМ.

Исследование каталитической активности высоко очищенных форм цитохромов P450 требует обязательного присутствия доноров электронов (NADPH) и белков редокс-партнеров. Для большинства цитохромов P450, локализованных в эндоплазматическом ретикулуме, таким партнером является NADPH-цитохром P450 редуктаза [11]. Природные белки-партнеры для CYP51b1

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ СТЕРОЛ-14 α -ДЕМЕТИЛАЗЫ

неизвестны [12]. Ранее было показано, что редуктаза микросом клеток печени крысы обладает способностью восстанавливать CYP51b1 при использовании в качестве субстрата 200 мкМ ланостерола [12]. Мы обнаружили, что редуктаза микросом клеток печени кролика так же может быть использована в качестве белка-партнера для CYP51b1 при измерении ферментной активности с АСАС. Однако в этом случае перенос электронов между редуктазой и цитохромом Р450 возможен только в реконструированной системе в присутствии детергента (Эмульген 913) в среде инкубации [13]. В связи с этим нами была предпринята попытка установить способность растворимого флавинового домена цитохрома Р450ВМ-3 из *Bacillus megaterium* (ВМР) участвовать в переносе электронов на CYP51b1. Известно, что очищенный рекомбинантный ВМР обладает способностью поддерживать активность ВМР, гемового домена цитохрома Р450ВМ-3 [14], и является белком-партнером для мембранных цитохромов Р450 человека, например для CYP3A4 [15]. Нами было установлено, что ВМР может служить донором электронов для CYP51b1 в модельной растворимой системе (рис. 3). Более того, каталитическая активность CYP51b1 с 0,5 мкМ ВМР в системе CYP51b1/ВМР = 1:2 была в 2 раза выше, чем при использовании 0,5 мкМ редуктазы микросом клеток печени кролика (CYP51b1/редуктаза = 1:2).

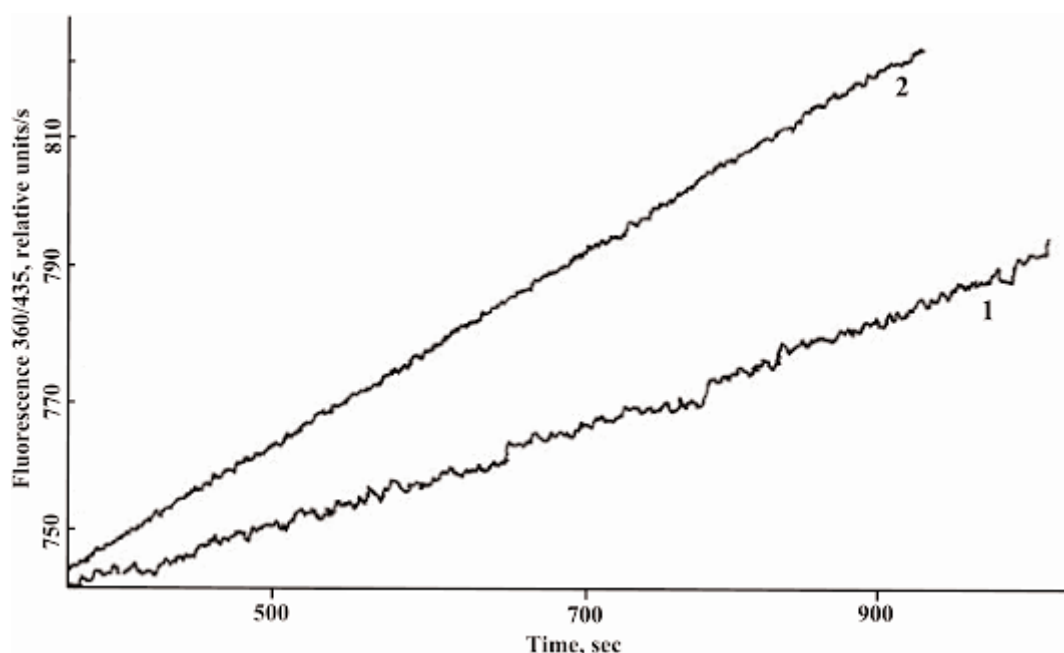


Рисунок 3.

Зависимость каталитической активности рекомбинантного CYP51b1 от типа редуктазы.

Инкубационная смесь содержала 0,21 мкМ CYP51b1, 0,53 мкМ АСАС, 0,01% твин 80, 0,5 мкМ NADPH цитохром Р450 редуктазу кролика (1) или 0,5 мкМ ВМР (2), 0,5 мМ NADPH в общем объеме 0,7 мл 100 mM HEPES (pH 7,4).

В модельной системе CYP51b1/ВМР = 1:2 скорость окисления АСАС снижалась в присутствии 32 мкМ ланостерола (природный субстрат стерол-14 α -деметиلاзы, K_S = 2,2 мкМ) и 36 мкМ итраконазола (ингибитор CYP51b1, K_S = 1,9 мкМ) на 30% и 50%, соответственно. В то же время 36 мкМ кетоконазол (ингибитор CYP51b1 с K_S = 5 мкМ) не оказывал заметного влияния на скорость ферментной реакции. Близкие результаты были получены при исследовании влияния итраконазола на очищенные CYP51 человека и *Candida albicans* в присутствии ланостерола в качестве субстрата [16].

Как уже было сказано выше, стерол-14 α -деметилаза имеет большое практическое значение как молекулярная мишень для поиска противотуберкулезных препаратов нового поколения. В работе предложен метод флуориметрического определения каталитической активности CYP51b1 (стерол-14 α -деметилаз) в реальном времени с использованием в качестве субстрата 7-аминокумарин-4-уксусной кислоты (ACAC). Преимущество использования производных кумарина состоит в том, что метод регистрации скорости реакции отличается простотой, высокой чувствительностью, воспроизводимостью и возможностью изучения ингибиторного эффекта новых лекарственных препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen: Taylor and Francis, London.
2. Bellamine A., Lepesheva G.I., Waterman M.R. (2004) J. Lipid Res., **45**, 2000-2007.
3. Lepesheva G.I., Waterman M.R. (2007) Biocim. Biophys. Acta, **1770**, 467-477.
4. Podust L.M., Poulos T.L., Waterman M.R. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, 3068-3073.
5. Chu I., Favreau L.V., Soares T., Lin C.C., Nomeir A.A. (2000) Rapid Commun. Mass Spectrom., **14**, 207-214.
6. Shavkunov A.S., Lasarev V.N., Zgoda V.G., Govorun V.M., Levi P., Yansen P., Archakov A.I. (2003) Биомед. химия, **49**, 145-152.
7. Davydov D.R., Deprez E., Hui Bon Hoa G., Knyushko T.V., Kuznetsova G.P., Koen Y.M., Archakov A.I. (1995) Arch. Biochem. Biophys., **320**, 330-344.
8. Yamazaki H., Shimada T. (1999) Xenobiotica, **29**, 231-241.
9. Sai Y., Yang T.Y., Krause K.W., Gonzalez F.J., Gelboin H.V. (1999) Pharmacogenetics, **9**, 229-237.
10. Rendic S. (2002) Drug Metab. Rev., **34**, 84-448.
11. Vermilion J.L., Coon M.J. (1978) J. Biol. Chem., **253**, 8812-8819.
12. Bellamine A., Mangla A.T., Nes W.D., Waterman M.R. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 8937-8942.
13. Blanck J., Behlke J., Jänig G.R., Pfeil D., Ruckpaul K. (1979) Acta Biol. Med. Ger., **38**, 11-21.
14. Boddupalli S.S., Hasemann C.A., Ravichandran K.G., Lu J.V., Goldsmith E.J., Diesenhofer J., Peterson J.A. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 5567-5571.
15. Dodhia V.R., Fantussi A., Gilardi G. (2006) J. Biol. Inorg. Chem., **11**, 903-916.
16. Lamb D.C., Kelly D.E., Waterman M.R., Stromstedt M., Rozman D., Kelly S.L. (1999) Yeast, **15**, 755-763.

Поступила: 01. 03. 2009.

FLUORESCENCE-BASED DETERMINATION OF ENZYME ACTIVITY OF RECOMBINANT CYP51b1 (STEROL 14 α -DEMETHYLASE) WITH COUMARIN DERIVATIVES

N.A. Petushkova, A.V. Lisitsa, V.F. Pozdnev, I.I. Karuzina

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, 119121, Pogodinskaya st., 10, Moscow, Russia; e-mail: Natalia.Petushkova@ibmc.msk.ru

The current investigation was undertaken with the aim to carry out an *in vitro* evaluation of the ability of coumarin derivatives as probe substrates to predict the activity of CYP51b1. The results obtained indicate that 7-aminocoumarin-4-acetic acid (ACAC) can be used to determine the recombinant CYP51b1 activity. Determination of CYP51b1 activity with ACAC is based on the direct registration of fluorescence increasing at 30°C. It was found also that BMR in a simple soluble model system can be used as an electron donor for CYP51B1. Fluorescence-based assay is highly sensitive and can be used for the screening of sterol 14 α -demethylase inhibitors.

Key words: cytochrome P450, sterol 14 α -demethylase, fluorescence, coumarin derivatives, lanosterol.