

УДК 577.152.41

Сульфоксиды – аналоги L-метионина и L-цистеина как пролекарства против грамположительных и грамотрицательных бактерий

Н. В. Ануфриева¹, Е. А. Морозова¹, В. В. Куликова¹, Н. П. Бажулина¹, И. В. Манухов², Д. И. Дёгтев², Е. Ю. Гнучих², А. Н. Родионов¹, Г. Б. Завильгельский², Т. В. Демидкина^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, 117545, Москва, 1-й Дорожный пр-д, 1

*E-mail: tvd@eimb.ru, tvdemidkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.08.2015

РЕФЕРАТ Проблема резистентности бактерий к антибиотикам требует разработки новых классов антимикробных препаратов широкого спектра действия. Концепция пролекарств позволяет искать новые подходы к получению эффективных препаратов с улучшенными фармакокинетическими и фармакодинамическими свойствами. Известно, что антимикробной активностью обладают тиосульфиды, образующиеся ферментативно из сульфоксидов аминокислот при разрушении клеток растений рода *Allium*. Неустойчивость и высокая реакционная способность тиосульфидов затрудняют их использование как индивидуальных соединений. Предложена фармакологически комплементарная пара: пролекарство – сульфоксид аминокислоты и витамин B6-зависимая метионин- γ -лиаза (МГЛ), метаболизирующая его в организме пациента. Фермент катализирует реакции γ - и β -элиминирования сульфоксидов – аналогов L-метионина и L-цистеина с образованием тиосульфидов. Нами клонирован ген МГЛ из *Clostridium sporogenes*. Методом логнормального разложения спектра холофермента установлены ионные и таутомерные формы внутреннего альдимида МГЛ, получены каталитические параметры рекомбинантного фермента в реакциях γ - и β -элиминирования аминокислот и ряда сульфоксидов. Установлена возможность использования витамин B6-зависимой МГЛ для эффективной конверсии сульфоксидов, выявлена антимикробная активность тиосульфидов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий *in situ*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА пролекарства, витамин B6-зависимые ферменты, клонирование гена метионин- γ -лиазы из *Clostridium sporogenes*, аллиин, аллицин, сульфоксиды аминокислот, грамположительные и грамотрицательные бактерии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПЛФ – пиридоксаль-5'-фосфат; МГЛ – метионин- γ -лиаза; His-tag – полигистидиновый фрагмент; His-tag МГЛ – метионин- γ -лиаза с полигистидиновым фрагментом; *megL* – ген, кодирующий МГЛ *Clostridium sporogenes*; ДТТ – дитиотреитол; NADH – β -никотинамидадениндинуклеотид восстановленный; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.

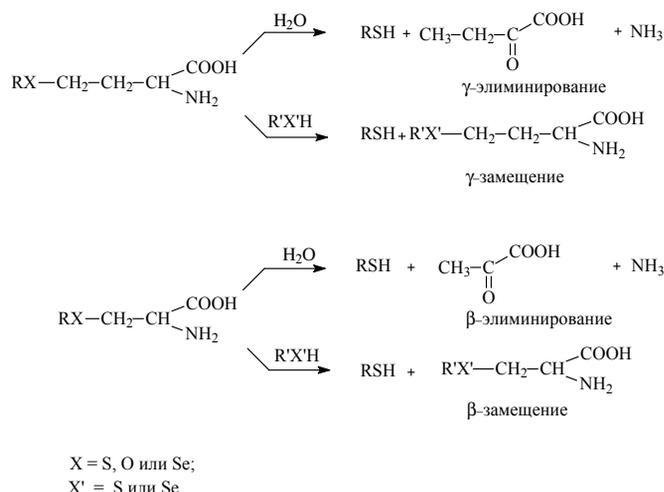
ВВЕДЕНИЕ

Проблема поиска новых антимикробных препаратов с минимальным риском индукции быстрой устойчивости к антибиотикам весьма остро стоит в настоящее время. Многие потенциально эффективные антимикробные средства достаточно быстро деградируют в организме человека и обладают повышенной токсичностью, что затрудняет их применение в концентрации, нужной для терапии. Эту проблему можно решить с помощью концепции пролекарств – препаратов, которые должны подвергнуться метабо-

лизму в организме пациента. Эту концепцию успешно применили в противоопухолевой терапии [1].

В представленной работе предложено использовать этот подход для создания эффективной антимикробной терапии с помощью фармакологической пары: пролекарство и биокатализатор, его метаболизирующий. Недавно мы показали, что метионин- γ -лиаза (МГЛ) [КФ 4.4.1.11] из *Citrobacter freundii* катализирует реакцию β -элиминирования небелковой аминокислоты, (\pm)-сульфоксида S-(2-пропенил)-L-цистеина ((\pm)-аллиина), с образованием 2-пропени-

осульфината (аллицина) – природного антибиотика [2]. МГЛ катализирует реакцию γ -элиминирования *L*-метионина с образованием метилмеркаптана, α -кетомасляной кислоты и аммиака. Фермент катализирует реакцию β -элиминирования *L*-цистеина и его *S*-замещенных производных с образованием соответствующих меркаптанов, пировиноградной кислоты и аммиака и реакции замещения у C_{β} - и C_{γ} -атомов *L*-цистеина и *L*-метионина и их аналогов [3, 4]:



МГЛ содержится в грибах [5], *Arabidopsis thaliana* [6], в различных видах бактерий, в том числе в патогенных *Aeromonas* spp. [7], *Clostridium sporogenes* [8], *Porphyromonas gingivalis* [9] и в патогенных простейших *Entamoeba histolytica* [10] и *Trichomonas vaginalis* [11]. Фермент отсутствует у млекопитающих, поэтому может рассматриваться как мишень в патогенах. Такой подход применили с использованием суцидального субстрата фермента. Катализ реакции γ -элиминирования трифторметионина приводил к образованию трифтормеркаптана, спонтанно разлагающегося до дифторида тиоугольной кислоты, который обладает антимикробной активностью в отношении содержащих МГЛ *T. vaginalis* [12], *P. gingivalis* [13], *E. histolytica* [14]. Однако высокая токсичность дифторида тиоугольной кислоты не позволяет использовать трифторметионин как антимикробное средство.

Аллицин, наиболее известный антимикробный и противоопухолевый компонент чеснока, составляет около 70% от общего количества тиосульфидов [15], образующихся в результате реакции β -элиминирования аллиина, катализируемой ПЛФ-зависимой аллииназой [КФ 4.4.1.4] [16] при разрушении чеснока. Антимикробное действие аллицина и других тиосульфидов, образующихся ферментативно при разрушении клеток растений рода *Allium*, во многом объясняется тем, что они окисляют суль-

фгидрильные группы белков/ферментов бактериальных клеток, в то время как клетки животных частично защищены присутствующим в них глутатионом [17]. Противомикробные, противовоспалительные, антиоксидантные и антиканцерогенные эффекты органических сульфосоединений, экстрактов клеток чеснока и лука [18, 19] известны с древнейших времен. Однако отдельные тиосульфиды не используются в медицине из-за их высокой реакционной способности и, как следствие, неустойчивости. Как индивидуальное биологически активное соединение, наиболее подробно изучен только аллицин, обнаружены его противоопухолевые, антиоксидантные, антибактериальные и противогрибковые свойства [20–22].

Способность МГЛ катализировать реакции γ - и β -элиминирования сульфоксида метионина [23] и аллиина [2] с образованием тиосульфидов позволяет применить концепцию пролекарств для разработки нового антимикробного препарата, используя в качестве пролекарств аллиин и другие субстраты-сульфоксиды как источники тиосульфидов *in situ*.

Ранее мы клонировали ген (*megL*) *C. sporogenes*, кодирующий МГЛ с полигистидиновым фрагментом (His-tag) на N-конце полипептидной цепи, определили некоторые кинетические характеристики рекомбинантного фермента (His-tag МГЛ). МГЛ *C. sporogenes* катализировала реакцию γ -элиминирования *L*-метионина с большей скоростью, чем фермент из *C. freundii* [24], и обладала лучшей цитостатической активностью в отношении ряда опухолевых клеток [25].

Скорость расщепления физиологического субстрата *C. sporogenes* МГЛ возрастала в 1.5 раза после отщепления His-tag тромбином. В данной работе мы клонировали ген МГЛ *C. sporogenes* без His-tag. Определены стационарные кинетические параметры реакций γ - и β -элиминирования ряда известных субстратов и сульфоксидов – аналогов цистеина и метионина и спектральные характеристики *C. sporogenes* МГЛ. На твердой среде показана антибактериальная активность смесей, содержащих МГЛ из *C. sporogenes* и *C. freundii* и сульфоксиды аминокислот. Установлено, что кинетические параметры рекомбинантной ПЛФ-зависимой МГЛ делают принципиально возможным использование фермента в конверсии пролекарств – сульфоксидов аминокислот – в тиосульфиды.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы, ферменты

В работе использовали: пиридоксаль-5'-фосфат, *L*-метионин, *L*-цистеин, *L*-гомоцистеин, *L*-норвалин,

L-норлейцин, *L*- α -аминомасляную кислоту, аллиин, *S*-этил-*L*-цистеин, *S*-этил-*L*-гомоцистеин, *L*-аланин, *O*-ацетил-*L*-серин, лактатдегидрогеназу из мышцы кролика, ДТТ, NADH, периодат натрия, этилбромид (Sigma, США); EDTA, протамин-сульфат (Serva, США); лактозу (Panreac, Испания); глюкозу, глицерин, сульфат магния, сульфат аммония, калий фосфорнокислый однозамещенный, натрий фосфорнокислый двузамещенный («Реахим», Россия); дрожжевой экстракт, триптон (Difco, США); DEAE-сефарозу (GE Healthcare, Швеция); *O*-ацетил-*L*-гомосерин получен ацетилированием *L*-гомосерина по описанному ранее методу [26]. 2-Нитро-5-тиобензойная кислота получена согласно [27]. (\pm)-Сульфоксид *L*-метионина получали по стандартной методике [28]. Синтез (\pm)-сульфоксидов *S*-этил-*L*-цистеина и *S*-этил-*L*-гомоцистеина проводили согласно [29–31].

Реакции рестрикции и лигирования проводили с использованием ферментов фирмы Promega (США). В работе использовали «рабочий буфер», рН 8.0, содержащий 100 мМ калий-фосфат, 0.1 мМ ПЛФ, 1 мМ ДТТ и 1 мМ EDTA.

Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) F⁻ *ompT hsdS_B gal dcm* (DE3) (Novagen) был использован для экспрессии гена *C. sporogenes* МГЛ. Штамм *E. coli* K12 AB2463 – *recA*⁻ производное штамма *E. coli* K12, имеет генотип: F⁻, *thr-1 leu-6 proA2 his-4 thi-1 argE3 lacY1 galK2 ara-14 xyl-5 mtl-1 tsx-33 rpsL31 supE44, recA13*. Его использовали для клонирования, наработки и хранения плазмиды. Штамм *C. freundii* ATCC 21434 из American Type Culture Collection (США) любезно предоставлен Р.С. Филлипсом. Штамм 015 *Staphylococcus aureus* любезно предоставлен Ю.Ф. Белым. Плаزمида с геном *D*-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназы любезно предоставлена К. Мураторе.

Клонирование гена МГЛ из *C. sporogenes*

Плазмида pET28a-*megL_sporog* сконструирована на основе плазмиды pET28a, содержащей ген *megL* *C. sporogenes* с полигистидиновым фрагментом (His-tag) и обозначена как pET-28a::*megL_s_HT* [24]. Методом ПЦР получен ампликон (*megL_sporog*), содержащий ген *megL* без His-tag. В качестве матрицы использовали плазмиду pET28a, содержащую ген *megL* с His-tag. В праймерах был предусмотрен сайт рестрикции NcoI (подчеркнут): *megL_sporog*: 5'-CGC-GCGGCAGCCCATGGAGAA-3' (прямой), *megL_sporog*: 5'-CCGGATCTCAGTGGTGGTGGTG-3' (обратный).

Ампликон *megL_sporog* клонировали в векторе pET28a по сайтам NcoI и EcoRI в *recA*⁻ штамме *E. coli* AB2463. Контроль клонирования осуществляли пу-

тем секвенирования вставки. Трансформацию проводили, используя штамм *E. coli* BL21(DE3).

Выращивание биомассы и выделение фермента

Клетки *E. coli* BL21(DE3), содержащие ген МГЛ без His-tag в плазмиде pET28a *megL_sporog*, выращивали на «индуцирующей» среде [32] при 37°C с перемешиванием (180 об/мин) в течение 24 ч. Клетки собирали центрифугированием и хранили при -80°C. Клетки разрушали и освобождали от нуклеиновых кислот как описано ранее [33]. Далее очистку проводили с использованием ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-сефарозой, уравновешенной рабочим буфером. Колонку промывали рабочим буфером, содержащим 100 мМ KCl. Фермент элюировали рабочим буфером, содержащим 500 мМ KCl, концентрировали и диализовали против рабочего буфера. Чистоту препарата проверяли при помощи ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях по методу Лэммли [34]. Концентрацию очищенных препаратов определяли, используя коэффициент $A_{1\%}^{278} = 0.8$ [23].

Определение активности фермента и параметров стационарной кинетики

Активность МГЛ в процессе очистки определяли в реакциях γ - и β -элиминирования, измеряя скорости образования кетокислот в сопряженной реакции с *D*-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназой (реакция γ -элиминирования) или лактатдегидрогеназой (реакция β -элиминирования) по снижению поглощения NADH при 340 нм ($\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и 30°C. Реакционные смеси содержали рабочий буфер, 0.2 мМ NADH, 10 ед. лактатдегидрогеназы или 70 мкг *D*-2-гидроксиизокапроатдегидрогеназы, 30 мМ *S*-этил-*L*-цистеина или 30 мМ *L*-метионина. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1.0 мкМ/мин пирувата (или α -кетобутирата). Удельная активность препаратов фермента, имеющих 95% чистоты, составила 26.8 ед./мг в реакции γ -элиминирования *L*-метионина и 8.32 ед./мг в реакции β -элиминирования *S*-этил-*L*-цистеина.

Стационарные кинетические параметры реакций γ - и β -элиминирования определяли таким же образом, варьируя концентрации субстратов. Полученные данные обрабатывали согласно уравнению Михаэлиса–Ментен с использованием программы EnzFitter. В расчетах использовали величину молекулярной массы субъединицы фермента, равную 43 кДа. Ингибирование реакции γ -элиминирования *L*-метионина различными аминокислотами изучали в условиях, описанных выше, варьируя концентрацию субстратов и ингибиторов в реакционных смесях.

Значения констант ингибирования определяли с помощью программы EnzFitter. Данные обрабатывали в координатах Диксона [35].

Спектральные исследования

Спектр поглощения холофермента регистрировали при 25°C на спектрофотометре Cary-50 (Varian, США) в рабочем буфере без ПЛФ. Концентрация фермента – 1.036 мг/мл.

Антимикробная активность препаратов

Ночные культуры *C. freundii* и *S. aureus*, выращенные на среде Лурия–Бертани (LB-среда) при 37°C, разводили в 100 раз в среде LB и растили при 37°C при перемешивании до оптической плотности 0.2–0.3 при 600 нм. Культуры бактерий рассевали на чашки с твердой средой (LB-агар). Смеси МГЛ из разных источников и сульфоксидов аминокислот, предварительно инкубированные при комнатной температуре в течение 1 ч, наносили на диски из фильтровальной бумаги диаметром 12 мм, помещенные на чашки. Концентрации МГЛ из *C. sporogenes* и *C. freundii* и сульфоксидов составляли 10 и 2.5 мг/мл соответственно. Чашки инкубировали в течение 24 ч при 37°C, затем измеряли зоны ингибирования. Контрольные препараты растворов смесей фермента с сульфоксидами сохраняли антибактериальную активность в течение 2 недель.

Определение аллицина

Аллицин, образующийся в смесях, содержащих МГЛ и аллиин, определяли в реакции с 2-нитро-5-тиобензойной кислотой. Смесь МГЛ и аллиина добавляли к 1 мл 0.1 мМ 2-нитро-5-тиобензойной кислоты в 100 мМ калий-фосфатном буфере, содержащем 0.2 мМ ПЛФ, рН 8.0. Смесь инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Молярную концентрацию аллицина рассчитывали по уменьшению оптической плотности при 412 нм, используя значение молярного коэффициента поглощения 2-нитро-5-тиобензойной кислоты при 412 нм, равное 28300 М⁻¹см⁻¹ [27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетические параметры реакций

β- и γ-элиминирования

Ранее [25] мы определили, что отщепление тромбином His-tag от МГЛ *C. sporogenes* приводит к повышению в 1.5 раза активности фермента в физиологической реакции с L-метионином. В данной работе определены параметры стационарной кинетики МГЛ *C. sporogenes* без His-tag в реакции γ-элиминирования пяти субстратов – L-метионина, сульфоксида L-метионина, S-этил-L-гомоцистеина,

сульфоксида S-этил-L-гомоцистеина и O-ацетил-L-гомосерина, в реакции β-элиминирования четырех субстратов – S-этил-L-цистеина, сульфоксида S-этил-L-цистеина, O-ацетил-L-серина и аллиина. В табл. 1 приведены параметры для МГЛ из *C. sporogenes*, для МГЛ из двух других бактериальных источников и His-tag МГЛ *C. sporogenes*.

У МГЛ *C. sporogenes* параметр $k_{кат}$ в реакции γ-элиминирования трех субстратов – L-метионина, S-этил-L-гомоцистеина и сульфоксида L-метионина, оказался в 2–3 раза больше, чем у His-tag МГЛ *C. sporogenes*. Величины K_m для первых двух субстратов оказались близкими, в случае сульфоксида L-метионина величина K_m была несколько больше, чем у His-tag МГЛ.

Фрагмент His-tag не влияет на кинетические параметры реакции β-элиминирования S-этил-L-цистеина, величины $k_{кат}$ и K_m у МГЛ практически такие же, как у His-tag МГЛ. Катализ стадии элиминирования боковой группы субстрата в реакциях γ- и β-элиминирования осуществляется разными кислотными группами фермента. Предполагается, что в реакции β-элиминирования, катализируемой ПЛФ-зависимыми лиазами, такой группой является боковая группа остатка лизина (Lys210 в *C. freundii* МГЛ), связывающего кофермент [36]. В ПЛФ-зависимых реакциях γ-элиминирования и γ-замещения эта роль приписывается консервативному остатку тирозина (Tyr113 в *C. freundii* МГЛ), находящемуся в стекинг-взаимодействии с кольцом кофермента [36]. Это предположение подтверждают данные для мутантной формы МГЛ *Pseudomonas putida* с заменой Tyr114 на Phe [37]. Получены также свидетельства того, что кислотно-основные свойства Tyr113 МГЛ *C. freundii* регулируются триадой Cys115/Tyr113/Arg60 [2]. Arg60 расположен в подвижной N-концевой петле фермента, и атом азота гуанидиновой группы находится на расстоянии водородной связи от гидроксильной группы Tyr113 в трехмерной структуре холофермента [38], в структурах комплексов МГЛ с аминокислотами, моделирующими комплекс Михаэлиса [39], и в пространственной структуре внешнего альдимида фермента с глицином [40]. Фрагмент His-tag может влиять на конформацию N-концевой петли и, следовательно, на взаимное расположение гидроксильной группы Tyr113 и гуанидиновой группы Arg60, что, в свою очередь, может влиять на величину pK_a гидроксильной группы Tyr113. Возможно, этим объясняется увеличение γ-элиминирующей активности МГЛ *C. sporogenes* по сравнению с His-tag МГЛ.

Сравнение ферментов из трех бактериальных источников (табл. 1) – *P. putida*, *C. freundii* и *C. spo-*

Таблица 1. Кинетические параметры реакций γ - и β -элиминирования*

Субстрат	МГЛ <i>C. sporogenes</i>			His-tag МГЛ <i>C. sporogenes</i> **			МГЛ <i>C. freundii</i> ***			МГЛ <i>P. putida</i> ****		
	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{\text{кат}}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{\text{кат}}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{\text{кат}}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹	$k_{\text{кат}}$, с ⁻¹	K_M , мМ	$k_{\text{кат}}/K_M$, М ⁻¹ с ⁻¹
L-Met	21.61	0.60	3.60×10^4	9.86	0.43	2.28×10^4	6.2	0.7	8.85×10^3	48.6	0.90	5.4×10^4
(\pm)-L-MetO	21.66	11.39	1.90×10^3	8.59	7.89	1.09×10^3	8.12	4.65	1.75×10^3	-	-	-
S-Et-L-Hcy	21.31	0.24	8.87×10^4	7.05	0.27	2.54×10^4	6.78	0.54	1.25×10^4	33.4	0.27	1.23×10^5
(\pm)-S-Et-L-HcyO	0.48	0.60	8.0×10^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-Ac-L-Hse	37.26	3.18	1.17×10^4	-	-	-	2.1	2.91	7.21×10^2	78.0	2.22	3.51×10^4
S-Et-L-Cys	6.53	0.43	1.52×10^4	6.3	0.358	1.76×10^4	5.03	0.17	2.96×10^4	5.79	0.48	1.21×10^4
(\pm)-S-Et-L-CysO	1.39	0.33	4.21×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-Ac-L-Ser	5.31	8.01	6.6×10^2	-	-	-	2.13	4.28	4.98×10^2	-	-	-
(\pm)-Аллиин	11.43	1.43	7.99×10^3	-	-	-	5.9	4.7	1.26×10^3	-	-	-

*Ошибка не превышала 10%.

**Данные [25].

***Данные [2, 23, 33].

****Данные [37].

rogenes, показало, что сродство как к физиологическому субстрату, так и к его аналогам практически одинаково. Каталитические эффективности реакции γ -элиминирования L-метионина у МГЛ *C. sporogenes* и *P. putida* близки, а величина $k_{\text{кат}}/K_M$ у МГЛ *C. freundii* несколько меньше. Кинетические параметры реакции β -элиминирования S-этил-L-цистеина у трех ферментов очень близки.

МГЛ *C. sporogenes* катализирует реакцию γ -элиминирования сульфоксида L-метионина с каталитической эффективностью на порядок большей, чем в реакции γ -элиминирования сульфоксида S-этил-L-гомоцистеина. Скорость реакции β -элиминирования сульфоксида S-этил-L-цистеина, катализируемой ферментом, в 15 раз меньше скорости реакции γ -элиминирования сульфоксида L-метионина, но за счет большего сродства МГЛ *C. sporogenes* к этому субстрату каталитическая эффективность практически одинакова. В реакциях с сульфоксидами аминокислот наиболее эффективно фермент катализирует реакцию β -элиминирования аллиина.

Фермент из *C. sporogenes* более эффективно катализирует реакцию γ -элиминирования сульфоксида L-метионина, чем МГЛ *C. freundii* (величины $k_{\text{кат}}$ больше в 2.5 раза). Скорость расщепления аллиина МГЛ *C. sporogenes* почти в 2 раза больше, чем у фермента *C. freundii*, сродство к субстрату в 3 раза, а эффективность катализа в 6.3 раза выше.

Аминокислоты с неразветвленной боковой цепью ингибировали реакцию γ -элиминирования L-метионина по конкурентному типу. В табл. 2 приведены константы ингибирования МГЛ из *C. sporogenes*, *C. freundii* и *P. putida*. У всех этих ферментов наблюдается улучшение связывания с увеличением количества метиленовых групп в аминокислотах с неразветвленной боковой цепью, что, вероятно, объясняется гидрофобным характером активных центров фермента из *P. putida* [41] и *C. freundii* [38]. Возможно, значительное возрастание сродства при переходе от L-норвалина к L-норлейцину у фермента из трех источников и близкие значения величин K_i L-норлейцина и K_M для L-метионина

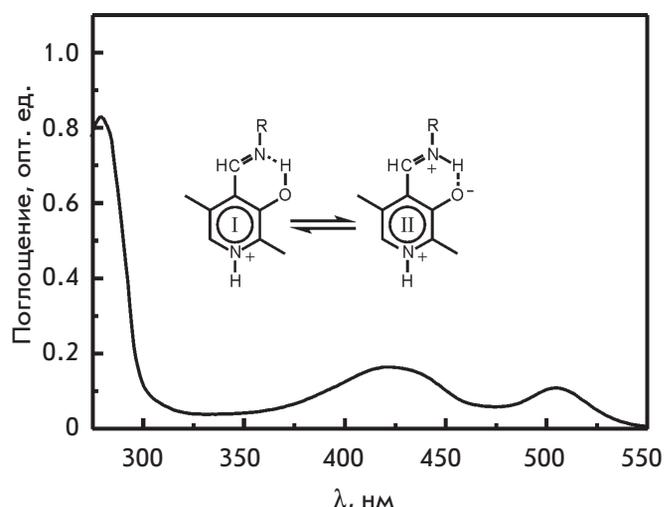


Рис. 1. Спектр поглощения холофермента МГЛ *C. sporogenes*

Таблица 2. Ингибирование реакции γ -элиминирования *L*-метионина*

Аминокислота	K_i , мМ		
	<i>C. freundii</i> **	<i>C. sporogenes</i>	<i>P. putida</i> ***
<i>L</i> -Ala	3.4	1.5	5.1
<i>L</i> -Abu	8.3	2.0	8.4
<i>L</i> -Nva	4.7	1.9	3.0
<i>L</i> -Nle	0.6	0.37	0.5

*Ошибка не превышала 10%.

**Данные [23].

***Данные [43].

Таблица 3. Параметры полос спектра поглощения внутреннего альдимины *C. sporogenes* МГЛ

Структура	E , эВ	$\nu \times 10^{-3}$, cm^{-1}	λ , нм	$\epsilon \times 10^{-3}$, $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$W \times 10^{-3}$, cm^{-1}	ρ	f	n , %
II ¹	2.92	23.53	425.0	10.46	3.58	1.58	0.22	64.7
II ^{<}	3.24	26.15	382.4	7.76	4.00	1.37	0.02	7.5
I	3.63	29.28	341.5	9.44	3.65	1.23	0.03	10.0
II [⊥]	3.79	30.56	327.2	10.27	3.47	1.29	0.01	5.6
II ^{2*}	4.28	34.55	289.4	5.98	5.06	1.20	0.18	
*	4.46	35.99	277.9	6.70	4.70	1.50	0.26	

*Экспериментальная информация об этих полосах недостаточна.

Примечание. E – энергия электронного перехода; ν – волновое число; λ – длина волны; ϵ – коэффициент молярного поглощения; W – полуширина; ρ – асимметрия; f – сила осциллятора; n – содержание таутомеров и конформеров. Содержание ПЛФ в ферменте – 87.8%. Надстрочные индексы (1, 2) относятся к первому и второму электронным переходам структуры II. Надстрочные индексы ([⊥], ⁾ относятся к двум конформерам структуры II (конформер с альдиминной связью, находящейся в плоскости, перпендикулярной плоскости пиридинового цикла, и конформер с альдиминной связью, частично выведенной из плоскости пиридинового кольца, но сохраняющей сопряжение и водородную связь между альдиминным азотом и 3'-оксигруппой кофермента).

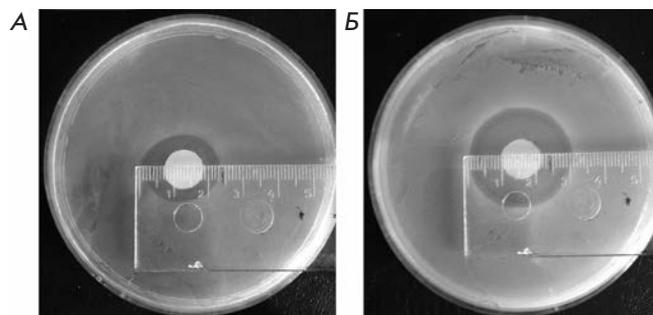


Рис. 2. Диффузия в агаре по методу Кирби–Бауэра [44]. На диск наносили смесь *C. sporogenes* МГЛ (10 мг/мл) и аллиина (2.5 мг/мл) в 100 мМ калий-фосфатном буфере. А – культура *C. freundii*. Б – культура *S. aureus*

и *S*-этил-*L*-цистеина объясняются наличием «кармана» для метильной группы аминокислот в активных центрах МГЛ.

Спектральные характеристики фермента

Спектр поглощения холофермента МГЛ *C. sporogenes* (рис. 1) при pH 8.0 сходен со спектром МГЛ *C. freundii* [23] с преобладающей полосой в области 422–425 нм, принадлежащей внутреннему альдимины в форме кетонамина (рис. 1, структура II). Как и у His-tag МГЛ *C. sporogenes* [24], спектр содержит интенсивную полосу поглощения с максимумом в области 502–505 нм, которую в спектрах комплексов ПЛФ-зависимых ферментов с аминокислотами и модельными соединениями приписывают хиноидному интермедиату [42].

Таблица 4. Ингибирование культур клеток бактерий смесями, содержащими МГЛ и сульфоксиды аминокислот

Сульфоксид аминокислоты	Зона ингибирования, мм ²			
	МГЛ <i>C. freundii</i>		МГЛ <i>C. sporogenes</i>	
	<i>C. freundii</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. freundii</i>	<i>S. aureus</i>
(±)-Аллиин	380	754	254	754
(±)-L-MetO	452	491	177	227
(±)-S-Et-L-CysO	314	491	254	314
(±)-S-Et-L-HcyO	254	415	227	227

Разложение спектра холофермента с использованием логнормальных кривых в области 300–500 нм проводили согласно [23]. В табл. 3 приведены параметры полос поглощения, полученные в результате разложения. Внутренний альдимин, помимо кетонамина (рис. 1, структура II, $\epsilon = 10410 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$), описывается минорными структурами, енольным таутомером (рис. 1, структура I) и двумя конформерами кетонамина, с альдиминной связью, перпендикулярной плоскости кольца кофермента (поглощает в области 380 нм), и с альдиминной связью, частично выведенной из плоскости кольца, но сохраняющей сопряжение с π -электронами кофактора и водородную связь между альдиминным азотом и 3'-оксигруппой ПЛФ (поглощает в области 327–328 нм). Ионная форма внутреннего альдимина и таутомерное равновесие практически такие же, как у МГЛ *C. freundii*. Идентификация поглощения в области 502–505 нм нуждается в дополнительных исследованиях.

Антимикробная активность смесей МГЛ *C. freundii* и *C. sporogenes* с сульфоксидами аминокислот

Антибактериальная активность смесей МГЛ из двух источников с сульфоксидами аминокислот проверена на культурах бактерий – грамположительной *S. aureus* и грамотрицательной *C. freundii* (табл. 4). Все смеси показали бактериостатический эффект в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Наиболее значительный эффект наблюдали для культуры *S. aureus* (рис. 2). Бактериостатический эффект был сравним с ингибированием роста бактериальных клеток канамицином. Зоны ингибирования канамицином (0.05 мг) и смесью,

содержавшей 0.04 мг аллицина, на культуре *C. freundii* составили 314 и 346 мм².

Таким образом, полученные данные показали, что клонированный фермент эффективно катализирует конверсию сульфоксидов аминокислот в тиосульфиды. Это позволяет предположить, что фармакологическая пара МГЛ и сульфоксид может обеспечить образование тиосульфидов в количествах, достаточных для терапевтических целей.

ВЫВОДЫ

МГЛ катализирует реакции γ - и β -элиминирования сульфоксидов – аналогов метионина и цистеина – с каталитическими эффективностями, сравнимыми с эффективностями реакций γ - и β -элиминирования этих аминокислот.

На твердой среде показано, что смеси МГЛ с сульфоксидами перспективны как антимикробные средства против грамположительных и грамотрицательных бактерий *in situ*.

Наибольший бактериостатический эффект смеси МГЛ с сульфоксидами аминокислот оказывают на грамположительную бактерию *S. aureus*, и бактериостатический эффект аллицина, полученного *in situ*, сравним с эффектом канамицина. ●

Авторы благодарят Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов за предоставленную возможность клонирования гена метионин- γ -лиазы из *Clostridium sporogenes*.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект № 15-14-00009).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wentworth P., Datta A., Blakey D., Boyle T., Partridge L.J., Blackburn G.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 799–803.
- Morozova E.A., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Kulikova V.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2014. V. 70. № 11. P. 3034–3042.
- Tanaka H., Esaki N., Soda K. // Enzyme Microb. Technol. 1985. V. 7. P. 530–537.
- Фалеев Н.Г., Троицкая М.В., Ивойлов В.С., Карпова В.В., Беликов В.М. // Прикладная биохимия и микробиология. 1994. Т. 30. № 3. С. 458–463.
- El-Sayed A.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 86. P. 445–467.

6. Goyer A., Collakova E., Shachar-Hill Y., Hanson A.D. // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. P. 232–242.
7. Nakayama T., Esaki N., Lee W.-J., Tanaka I., Tanaka H., Soda K. // *Agric. Biol. Chem.* 1984. V. 48. P. 2367–2369.
8. Kreis W., Hession C. // *Cancer Res.* 1973. V. 33. P. 1862–1865.
9. Yoshimura M., Nakano Y., Yamashita Y., Oho T., Saito T., Koga T. // *Infection Immunity.* 2000. V. 68. P. 6912–6916.
10. Tokoro M., Asai T., Kobayashi S., Takeuchi T., Nozaki T. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 42717–42727.
11. Lockwood B., Coombs G. // *Biochem. J.* 1991. V. 279. P. 675–682.
12. Coombs G.H., Mottram J.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. P. 1743–1745.
13. Yoshimura M., Nakano Y., Koga T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 292. P. 964–968.
14. Sato D., Kobayashi S., Yasui H., Shibata N., Toru T., Yamamoto M., Tokoro G., Ali V., Soga T., Takeuchi T., Suematsu M., Nozaki T. // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010. V. 35. № 1. P. 56–61.
15. Han J., Lawson L., Han G., Han P. // *Anal. Biochem.* 1995. V. 225. P. 157–160.
16. Stoll A., Seebeck E. // *Adv. Enzymol.* 1951. V. 11. P. 377–400.
17. Rabinkov A., Miron T., Konstantinovski L., Wilchek M., Mirelman D., Weiner L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1379. P. 233–244.
18. Rose P., Whiteman M., Moore P.K., Zhu Y.Z. // *Nat. Prod. Rep.* 2005. V. 22. P. 351–368.
19. Lynett P.T., Butts K., Vaidya V., Garrett G.E., Pratt D.A. // *Org. Biomol. Chem.* 2011. V. 9. P. 3320–3330.
20. Hirsch K., Danilenko M., Giat J., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M., Mirelman D., Levy J., Sharoni Y. // *Nutr. Cancer.* 2000. V. 38. P. 245–254.
21. Shadkchan Y., Shemesh E., Mirelman D., Miron T., Rabinkov A., Wilchek M., Osherov N. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2004. V. 53. P. 832–836.
22. Curtis H., Noll U., Störmann J., Slusarenko A.J. // *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 2004. V. 65. P. 79–89.
23. Морозова Е.А., Бажулина Н.П., Ануфриева Н.В., Мамаева Д.В., Ткачев Я.В., Стрельцов С.А., Тимофеев В.П., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В. // *Биохимия.* 2010. Т. 75. С. 1272–1280.
24. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Ануфриева Н.В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Демидкина Т.В. // *ДАН.* 2012. Т. 445. С. 187–193.
25. Морозова Е.А., Куликова В.В., Яшин Д.В., Ануфриева Н.В., Анисимова Н.Ю., Ревтович С. В., Котлов М.И., Белый Ю.Ф., Покровский В.С., Демидкина Т.В. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5. № 3 (18). С. 96–102.
26. Nagai S., Flavim M. // *J. Biol. Chem.* 1967. V. 242. P. 3884–3895.
27. Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Weiner L., Wilchek M. // *Anal. Biochem.* 1998. V. 265. P. 317–332.
28. Mitsudome T., Takahashi Y., Mizugaki T., Jitsukawa K., Kaneda K. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. V. 53. № 32. P. 8348–8351.
29. Frankel M., Gertner D., Jacobson H., Zilkha A. // *J. Chem. Soc.* 1960. P. 1390–1393.
30. Briggs W.H., Xiao H., Parkin K.L., Shen C., Goldman I.L. // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. № 11. P. 5731–5735.
31. Waelsch H., Owades P., Miller H.K., Borek E. // *J. Biol. Chem.* 1946. V. 166. P. 273–281.
32. Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 207–234.
33. Манухов И.В., Мамаева Д.В., Морозова Е.А., Растрогруев С.М., Фалеев Н.Г., Демидкина Т.В., Завильгельский Г.Б. // *Биохимия.* 2006. V. 71. P. 454–463.
34. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.
35. Dixon M. // *Biochem. J.* 1953. V. 55. P. 170–171.
36. Clausen T., Huber R., Laber B., Pohlenz H.D., Messerschmidt A. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 262. P. 202–224.
37. Inoe H., Inagaki K., Adachi N., Tamura T., Esaki N., Soda K., Tanaka H. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000. V. 64. P. 2336–2343.
38. Nikulin A., Revtovich S., Morozova E., Nevskaya N., Nikonov S., Garber M., Demidkina T. // *Acta Crystallography, Section D.* 2008. V. 64. P. 211–218.
39. Ревтович С.В., Морозова Е.А., Хурс Е.Н., Закомырдина Л.Н., Никулин А.Д., Демидкина Т.В., Хомутов Р.М. // *Биохимия.* 2011. Т. 76. С. 690–698.
40. Revtovich S.V., Faleev N.G., Morozova E.A., Anufrieva N.V., Nikulin A.D., Demidkina T.V. // *Biochimie.* 2014. V. 101. P. 161–167.
41. Motoshima H., Inagaki K., Kumasaka T., Furuichi M., Inoue H., Tamura T., Esaki N., Soda K., Tanaka N., Yamamoto M., et al. // *J. Biochem.* 2000. V. 128. P. 349–354.
42. Metzler C.M., Harris A.G., Metzler D.E. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 4923–4933.
43. Esaki N., Nakayama T., Sawada S., Tanaka H., Soda K. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. P. 3857–3862.
44. Bauer A.W., Kirb W.M.M., Sherris J.C., Turck M. // *Am. J. Clin. Pathol.* 1966. V. 36. P. 493–496.