



УДК 577.12

ВЛИЯНИЕ ЭФФЕКТОРОВ НА КАТАЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ГАЛАКТОНОЛАКТОНОКСИДАЗЫ ИЗ *Trypanosoma cruzi*

© 2024 г. А. А. Чудин*, #, Е. В. Кудряшова*, #

* ФГБОУ ВО “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”, химический факультет, Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3

Поступила в редакцию 04.12.2023 г.

После доработки 15.12.2023 г.

Принята к публикации 16.12.2023 г.

Исследовано влияние структуры эффекторов – 1,4-бензохинона, коферментов Q и их структурных аналогов – на активность галактонолактонооксидазы из *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) и гомологичного фермента L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназы из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH). С использованием двух форм AtGALDH – природной (дегидрогеназа) и мутантной (проявляющей оксидазную активность) – выявлена роль 1,4-бензохинона и его аналогов как электроноакцепторов AtGALDH и TcGAL. Установлено, что соединения, содержащие метоксигруппы, являются более эффективными электроноакцепторами для TcGAL (коэнзим Q0, 2,6-диметокси-1,4-бензохинон) по сравнению с соединениями, не обладающими OCH₃-группами (2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон). С применением 2,6-диметокси-1,4-бензохинона как электроноакцептора предложен подход к спектрофотометрическому измерению активности TcGAL по изменению поглощения электроноакцептора в отсутствие дополнительных компонентов (красителя, обесцвечивающегося при взаимодействии с продуктом реакции – аскорбатом). Полученные результаты позволяют проводить более целенаправленный поиск ингибиторов TcGAL, что может рассматриваться как основа для разработки селективных лекарственных средств против болезни Шагаса, вызываемой *T. cruzi*.

Ключевые слова: галактонолактонооксидаза, L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа, электроноакцепторы, эффекторы, коэнзимы, 1,4-бензохинон, *Trypanosoma cruzi*

DOI: 10.31857/S0132342324040128, EDN: MWKENO

ВВЕДЕНИЕ

Галактонолактонооксидаза из одноклеточного паразита *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) – мембранный фермент, катализирующий финальную стадию биосинтеза витамина C – антиоксиданта, жизненно необходимого *T. cruzi* [1]. Этот микроорганизм не способен потреблять витамин C извне и должен синтезировать его самостоятельно. По этой причине ингибиторы TcGAL рассматриваются нами

как основа для разработки селективных лекарственных средств против болезни Шагаса, вызываемой *T. cruzi*, поскольку организм человека не содержит галактонолактонооксидазу [2].

Следует подчеркнуть, что TcGAL не функционирует в водной среде (не принимает нативную конформацию). Поэтому для изучения TcGAL мы ранее разработали методику, позволяющую сворачивать фермент и измерять его активность, используя

Сокращения: TcGAL – галактонолактонооксидаза из *Trypanosoma cruzi*; AtGALDH – L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana*; БХ – 1,4-бензохинон; ЭА – электроноакцептор; ФМС – феназинметосульфат; ДХФИФ – 2,6-дихлорфенолиндофенол; АОТ – натриевая соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты; CoQ0 – коэнзим Q0; CoQ1 – коэнзим Q1.

Автор для связи: (эл. почта: andrew_18@inbox.ru; Helenakoudriachova@yandex.ru).

систему обращенных мицелл ПАВ (АОТ) [3]. Для контроля влияния мицеллярной среды на распределение компонентов реакционной системы и тем самым на каталитическую активность фермента в данной работе использовался гомолог TcGAL – факультативно мембранный фермент L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH), катализирующий ту же реакцию, но проявляющий активность как в мицеллах, так и в воде.

Каталитический цикл AtGALDH и TcGAL состоит из двух полуреакций. В ходе одной из них субстрат (галактонолактон) превращается в продукт (аскорбат), а в ходе другой кофактор флавин (FAD) возвращается в исходное окисленное состояние, отдавая электроны электроноакцептору (ЭА) (рис. 1).

Роль ЭА в случае TcGAL могут играть как кислород, так и другие соединения, т.е. TcGAL обладает одновременно оксидазной и дегидрогеназной активностью [1]. В нашей предыдущей работе [2] мы разработали методику ингибиторного анализа для TcGAL с применением системы обращенных мицелл и выявили ингибиторы терпеноидного ряда (действующие в микромолярных концентрациях). Однако остается неясным, на какую из активностей TcGAL они преимущественно влияют – на дегидрогеназную или оксидазную. Для исследования этого аспекта в данной работе мы изучили влияние ЭА на два типа гомологичного фермента AtGALDH (из растительного источника *A. thaliana*). Так, AtGALDH дикого типа обладает только дегидрогеназной активностью (не может использовать

кислород в качестве ЭА) и представляет собой удобную модель для изучения влияния эффекторов именно на дегидрогеназную активность TcGAL в мицеллярной и водной средах. При этом мутантная форма AtGALDH (замена Ala113Gly [4]) обладает одновременно дегидрогеназной и оксидазной активностью, фермент является аналогом TcGAL, функционирующим как в мицеллах, так и в воде. Перечисленные свойства мутантной формы AtGALDH позволяют использовать ее в качестве контрольной системы при изучении действия ингибиторов, ЭА и других эффекторов в водной и мицеллярной средах.

Природным ЭА для TcGAL и AtGALDH является цитохром *c*, однако он теряет вторичную структуру в обращенных мицеллах [1]. Поэтому цитохром *c* не пригоден для измерения активности TcGAL в мицеллах. Следовательно, в случае мицелл требуются искусственные ЭА, такие как предложенный нами ранее феназинметосульфат (ФМС) [2, 3].

В качестве перспективных ЭА или эффекторов AtGALDH и TcGAL мы рассматриваем 1,4-бензохинон (БХ, рис. 2а) и его аналоги коэнзимы Q [1, 5], поскольку они являются природными ЭА для ряда мембранных ферментов и играют роль переносчиков электронов в дыхательной цепи у различных организмов. Так, мембраны млекопитающих содержат гомологи CoQn с длинными изопреновыми цепями: у человека это Q10, у грызунов – преимущественно Q9 [6]. У бактерий, например, у *E. coli*, присутствует коэнзим Q8 [7], а у дрожжей (*S. cerevisiae*) имеется более короткий Q6 [6]. Интересно отметить, что коэнзимы с

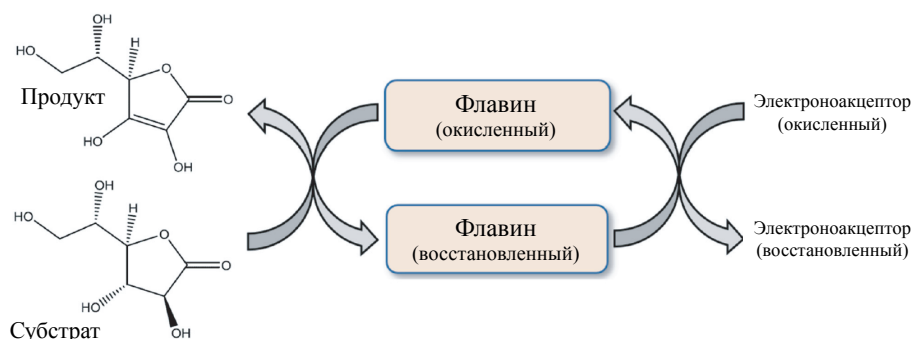


Рис. 1. Каталитический цикл ферментов AtGALDH и TcGAL.

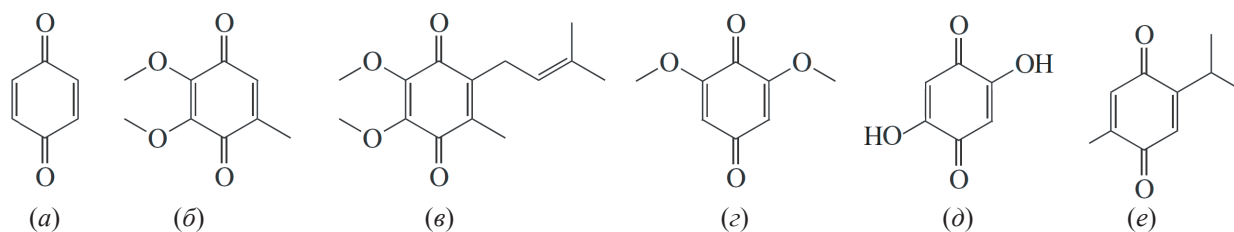


Рис. 2. Структуры 1,4-бензохинона (а) и его аналогов: коэнзима Q0 (б), коэнзима Q1 (в), 2,6-диметокси-1,4-бензохинона (г), 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинона (д) и тимохинона (е).

короткой изопреновой цепью, такие как Q1 и Q2, используются для измерения активности ряда ферментов, таких как сукцинатдегидрогеназа и альтернативная оксидаза, в том числе из трипаносоматид (включая вид *T. brucei*, родственный *T. cruzi*) [8].

В работе мы рассматриваем коэнзимы Q1 и Q0 (CoQ1 и CoQ0), являющиеся структурными аналогами 1,4-бензохинона (БХ). Так, коэнзим CoQ1 отличается от БХ наличием OCH_3 - и CH_3 -групп в бензольном кольце, и, кроме того, CoQ1 имеет изопреновую цепь (рис. 2в). У CoQ0 имеются те же заместители в бензольном кольце, что и у CoQ1, но отсутствует изопреновый фрагмент (рис. 2б).

С точки зрения использования в качестве ЭА для измерения активности AtGALDH и TcGAL (и потенциально других дегидрогеназ) коэнзимы CoQ0 и CoQ1 могут обладать преимуществами по сравнению с ранее исследованным БХ [5, 9]. Так, в шестичленном кольце CoQ1, в отличие от БХ, все атомы водорода замещены на алкильные или метоксигруппы (рис. 2), поэтому CoQ0 и CoQ1 более устойчивы в слабощелочной среде [4], что может способствовать их большей применимости в качестве ЭА для TcGAL с оптимумом активности при pH 8.8.

В литературе высказано предположение о важной роли изопреновой цепи, имеющейся у CoQ1, для электроноакцепторных свойств коэнзимов [10]. Однако согласно нашим данным, коэнзим Q10, обладающий длинной изопреновой цепью (10 звеньев), не является ЭА в случае

AtGALDH, а напротив, оказывает некоторое ингибирующее влияние на фермент [5]. Таким образом, среди коферментов CoQ перспективными представляются CoQ0 и CoQ1 как потенциальные ЭА для TcGAL и AtGALDH.

Помимо коэнзимов, в качестве потенциальных ЭА для TcGAL и AtGALDH можно рассматривать 2,6-диметокси-1,4-бензохинон (рис. 2г), производное 1,4-бензохинона, встречающееся во многих растениях и выступающее в качестве эффективного ЭА таких ферментов, как 1,4-бензохинонредуктаза [11]. Другим перспективным ЭА выступает аналог 2,6-диметокси-1,4-бензохинона – 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон, отличающийся заменой метоксигрупп на гидроксигруппы и их положением (рис. 2д). Электроноакцепторные свойства 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинона 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-1,4-бензохиноном [12]. Наконец, следует выделить тимохинон (рис. 2е), производное 1,4-бензохинона из растительных источников (можжевельник), являющееся электроноакцептором хиноноксидоредуктазы (NQO-1) [13] и объектом повышенного внимания ученых ввиду своих антидиабетических свойств [14–16].

Таким образом, целью данной работы было исследование влияния структуры потенциальных ЭА или эффекторов (1,4-бензохинона и его структурных аналогов) на активность TcGAL и гомологичного фермента AtGALDH.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние 1,4-бензохинона и его аналогов на дегидрогеназную активность AtGALDH.

Для изучения влияния БХ и его производных на дегидрогеназную составляющую TcGAL мы использовали природную форму гомологичного фермента AtGALDH, обладающего только дегидрогеназной активностью. Измерение активности AtGALDH в присутствии каждого потенциального ЭА проводили спектрофотометрически с использованием красителя ДХФИФ, который обесцвечивается при взаимодействии с продуктом реакции – аскорбатом [3].

Полученные зависимости максимальной активности AtGALDH от структуры используемого ЭА в водной и мицеллярной средах представлены на рис. 3. В качестве контроля на рис. 3 приведена активность AtGALDH в присутствии ФМС и красителя ДХФИФ (2,6-дихлорфенолиндофенол), которые использовали в качестве базисной системы в наших предыдущих работах [2, 3, 5].

Обнаружено, что в водной среде 2,6-диметокси-БХ и СоQ0 обеспечивают в 4–5 раз большую активность ($V_{\text{макс}}$) AtGALDH по сравнению с ранее исследованными БХ и СоQ1 [5] (табл. 1). При этом в мицеллярной среде 2,6-диметокси-БХ позволяет достичь более высокого значения $V_{\text{макс}}$ по сравнению с таковым для БХ и СоQ1 (табл. 1).

Отметим, что в обеих средах (водной и мицеллярной) 2,6-диметокси-БХ и СоQ эффективны при низких концентрациях (~0.02–10 мкМ), в то время как БХ и СоQ1 действуют лишь при концентрациях ~2 мМ. Следует учесть и другие ограничения при использовании БХ и СоQ1 как ЭА. Так, при измерении активности AtGALDH по изменению поглощения самого БХ или СоQ1 значительный вклад вносит фоновый сигнал. Кроме того, БХ подвержен окислению в слабощелочной среде при pH-оптимуме фермента в водной и мицеллярной средах [9, 5]. В отличие от БХ и СоQ1, комбинации 2,6-диметокси-БХ и СоQ0 с красителем практически не проявляют фонового сигнала (< 5% от целевого) и функционируют при pH-оптимуме AtGALDH (pH 8.8) (табл. 1).

Наконец, использование 2,6-диметокси-БХ и СоQ0 показывает преимущества не только по сравнению с БХ и СоQ1, но и по сравнению с разработанной нами ранее методикой с использованием ФМС как ЭА [3]. Так, в водной среде максимальная скорость ($V_{\text{макс}}$) в присутствии 2,6-диметокси-БХ или СоQ0 выше в 2 раза по сравнению с ФМС, а в мицеллярной – сопоставима (рис. 3). При этом используемые концентрации 2,6-диметокси-БХ и СоQ0 (0.02–10 мкМ) на несколько порядков ниже таковой для ФМС (120 мкМ [3]).

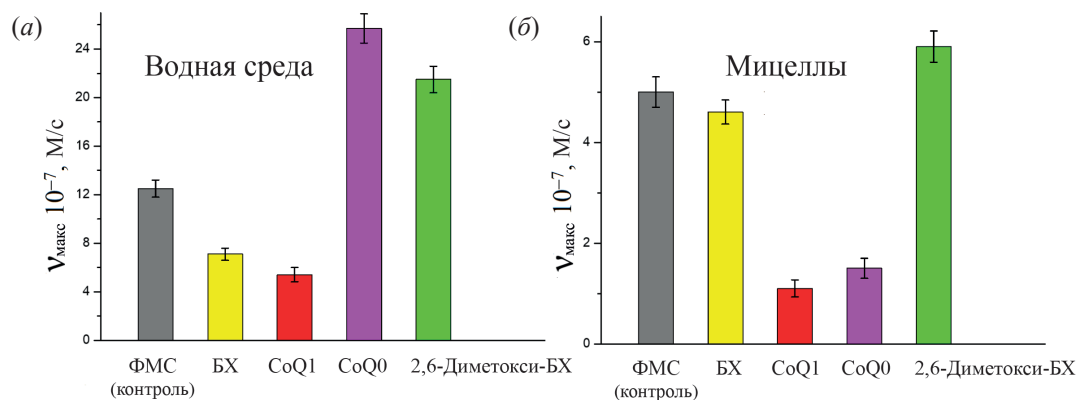


Рис. 3. Максимальная активность природной формы AtGALDH в водной (натрий-фосфатный буфер) (а) и в мицеллярной (0.1 М АОТ в *n*-октане, $W_0 = 22$) (б) средах в зависимости от структуры ЭА в присутствии красителя ДХФИФ. Концентрации: субстрат (1 мМ), ДХФИФ (120 мкМ), AtGALDH (6 нМ). Концентрации ЭА, при которых наблюдалась максимальная активность фермента, указаны в табл. 1.

Таблица 1. Каталитические характеристики 1,4-бензохинона и его аналогов как электроноакцепторов природной формы AtGALDH

Электроноакцептор	AtGALDH (природная форма)							
	Водно-буферный раствор				Мицеллы			
	V_{\max}^{**} , 10^{-7} М/с	фоновый сигнал**, 10^{-7} М/с	pH- оптимум	$[ЭА]_{\text{насыщ}}$, мкМ	V_{\max}^{**} , 10^{-7} М/с	фоновый сигнал**, 10^{-7} М/с	pH- оптимум	$[ЭА]_{\text{насыщ}}$, мкМ
СоQ ₀	25.7	–	8.8	0.016	1.6	–	8.8	0.9
2,6-Диметокси-БХ	21.5	–	8.8	2.3	13.5	–	8.8	14
БХ*	7.1	1.0	7.8	4 000	4.6	0.8	7.8	2 000
СоQ1*	5.4	0.5	7.8	4 000	1.1	0.4	7.8	2 000
ФМС	12.5	–	8.8	120	5.0	–	8.8	120

Примечание: V_{\max} – максимальная активность фермента; $[ЭА]_{\text{насыщ}}$ – концентрация ЭА, при которой наблюдается V_{\max} .

* Данные для БХ и СоQ1 приведены из работы [5].

** Погрешность измерения каталитической активности не превышает 10%.

Учитывая гомологичность AtGALDH и TcGAL, а также наилучшие параметры для 2,6-диметокси-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. Мутантная форма AtGALDH (замена Ala113Gly [4]), как и сам TcGAL, обладает обоими типами активности, что позволяет определить степень влияния ЭА на дегидрогеназную активность по отношению к оксидазной. Кроме того, поскольку AtGALDH функционирует не только в мицеллах, но и в водном растворе, с использованием мутантного типа AtGALDH мы можем изучить роль среды (мицеллы или вода) на свойства эффекторов в отношении целевого TcGAL, функционирующего только в мицеллах.

Влияние 1,4-бензохинона и его аналогов на активность мутантной формы AtGALDH. Для изучения действия эффекторов (1,4-бензохинона и его производных) на мутантную форму AtGALDH (замена Ala113Gly [4]) использовали методику с применением красителя ДХФИФ – проявителя продукта реакции (аскорбата) [3]. Действие таких эффекторов продемонстрировано на рис. 4.

В отличие от AtGALDH дикого типа, в водной среде наиболее сильное воздействие оказывает

БХ, усиливающий активность мутантной формы AtGALDH в 3 раза по сравнению с контролем (без ЭА) (рис. 4). В меньшей степени на активность AtGALDH влияют СоQ₀ и 2,6-диметокси-БХ (усиление активности AtGALDH в 2 раза) и СоQ1 (усиление всего на 20%).

В случае мицелл драматическое воздействие 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. 2.

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 выражено, чем на дегидрогеназную). Это позволяет предположить, что и в случае гомологичного TcGAL наибольшая активность должна наблюдаться для 2,6-диметокси-БХ. Кроме того, для TcGAL в качестве ЭА перспективен СоQ₀, работающий при pH-оптимуме обоих ферментов (pH 8.8), в отличие от БХ и СоQ1.

Влияние 2,6-диметокси-БХ и его аналогов на активность TcGAL. Поскольку БХ и СоQ1 не оптимальны для определения активности фермента (показывают слишком высокую фо-

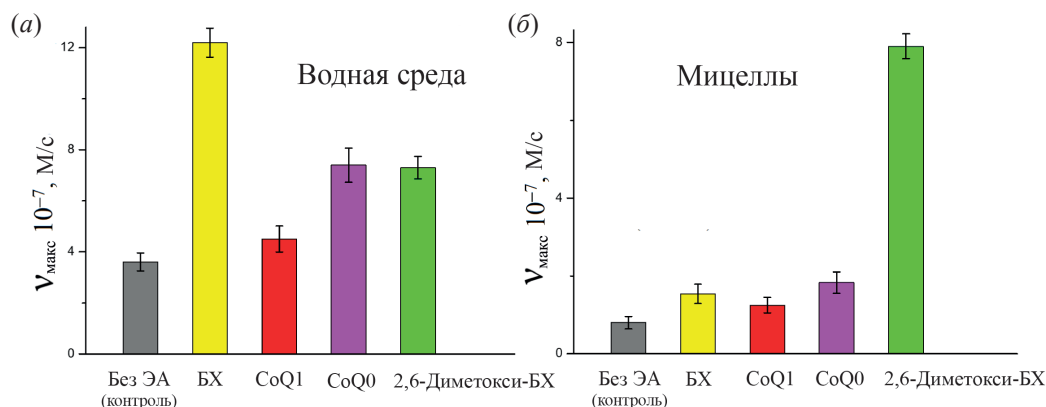


Рис. 4. Максимальная активность мутантной формы AtGALDH в водной (натрий-фосфатный буфер, pH 8.8 для CoQ0 и 2,6-диметокси-БХ и pH 7.8 для CoQ1 и БХ) (a) и мицеллярной (0.1 М АОТ в *n*-октане, pH 8.8 для CoQ0 и 2,6-диметокси-БХ и pH 7.8 для CoQ1 и БХ, $W_0 = 22$) (б) средах в зависимости от структуры ЭА в сочетании с красителем ДХФИФ. Концентрации: субстрат (1 мМ), ДХФИФ (120 мкМ), AtGALDH (6 нМ). Для сравнения указана активность без добавления ЭА.

Таблица 2. Каталитические характеристики эффекторов мутантной формы AtGALDH – 1,4-бензохинона и его аналогов

Эффектор	AtGALDH (мутантная форма, Ala113Gly)							
	водно-буферный раствор				мицеллы			
	C_{50} , мкМ	V_{\max}^* , 10^{-7} М/с	pH	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ	C_{50} , мкМ	V_{\max}^* , 10^{-7} М/с	pH	$[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$, мкМ
БХ	0.5	13	7.8	12.8	1.5	1.4	7.8	20
Q1	5.0	5	7.8	20	3.8	1.3	7.8	10
2,6-ОСН ₃ -БХ	0.4	7.3	8.8	2.1	4.8	7.9	8.8	12
Q0	0.006	7.4	8.8	0.12	0.17	2.1	8.8	0.5

Примечание: C_{50} – концентрация эффектора, вызывающая увеличение активности фермента в 2 раза по сравнению с активностью в отсутствие эффектора; V_{\max} – максимальная активность фермента; $[\text{ЭА}]_{\text{насыщ}}$ – концентрация ЭА, при которой наблюдается V_{\max} .

* Погрешность измерения каталитической активности не превышает 10%.

новую реакцию) при pH-оптимуме TcGAL [5] и оказывают слабое влияние на аналог TcGAL – мутантную форму AtGALDH, то представляется целесообразным изучить действие других производных БХ – 2,6-диметокси-БХ, СоQ1 и тимохинона – на активность TcGAL. Кроме того, интересно изучить влияние замены метокси-групп на гидроксигруппы, имеющиеся, например, у 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинона, электроноакцепторные свойства которого описаны в литературе (является π -акцептором в случае комплекса с переносом заряда [12]). Полученные зависимости максимальной активности TcGAL от

структуры вышеперечисленных потенциальных ЭА в комбинации с красителем представлены на рис. 5.

Примечательно, что СоQ0 и 2,6-диметокси-БХ в случае TcGAL показывают тенденции, аналогичные наблюдаемым для обеих форм гомологичного AtGALDH в мицеллах (рис. 3–5). Так, СоQ0 функционирует при концентрациях на 1–3 порядка меньше, чем другие ЭА, а наибольшее значение максимальной активности наблюдается в случае 2,6-диметокси-БХ (рис. 5). Отдельно следует отметить тимохинон, который не является ЭА для TcGAL, а напротив, оказывает слабое

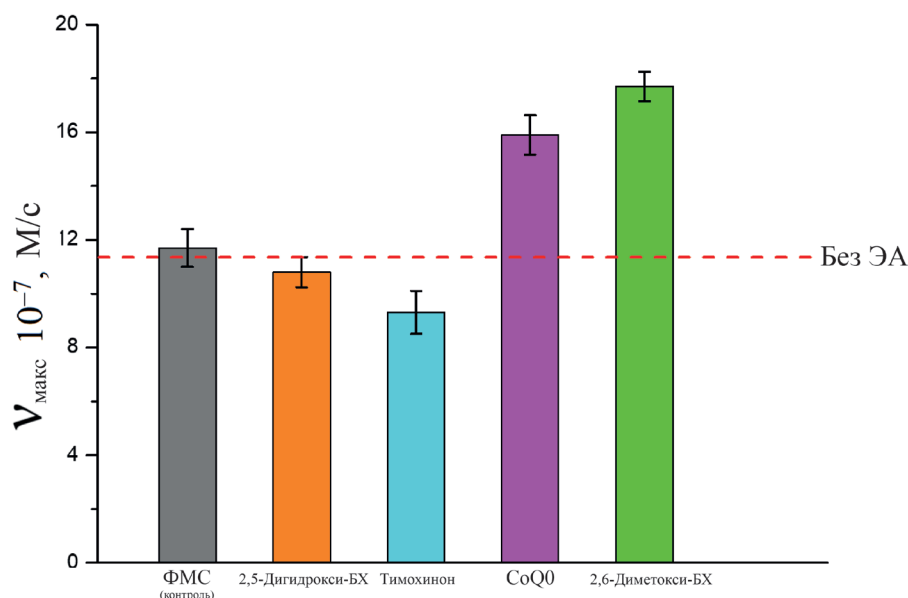


Рис. 5. Зависимость максимальной активности TcGAL в мицеллярной среде (0.1 М АОТ в *n*-октане, pH 8.8, $W_0 = 22$) от структуры эффектора (электроноакцептора) в сочетании с красителем ДХФИФ. Концентрации субстрата (1 мМ), ДХФИФ (120 мкМ) и TcGAL (34 нМ) поддерживались постоянными. Для сравнения показана активность TcGAL в присутствии 120 мкМ ФМС по ранее опубликованным данным [3]. Концентрации эффекторов (электроноакцепторов), при которых наблюдалась максимальная активность фермента: 2,5-дигидрокси-БХ (360 мкМ), тимохинон (200 мкМ), СоQ0 (0.72 мкМ), 2,6-диметокси-БХ (24 мкМ). Концентрация ФМС в контрольных измерениях – 120 мкМ.

ингибирующее действие (20%-ное ингибирование при 200 мкМ тимохинона).

Таким образом, наиболее эффективным ЭА среди изучаемых соединений оказался 2,6-диметокси-БХ при невыраженной фоновой реакции (< 5% от целевой). Столь высокая эффективность 2,6-диметокси-БХ как ЭА позволила нам предположить, что за ходом реакции можно следить и в отсутствие 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 – наиболее эффективный потенциальный 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 и 287 нм в водном растворе и в мицеллах соответственно (рис. 6).

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

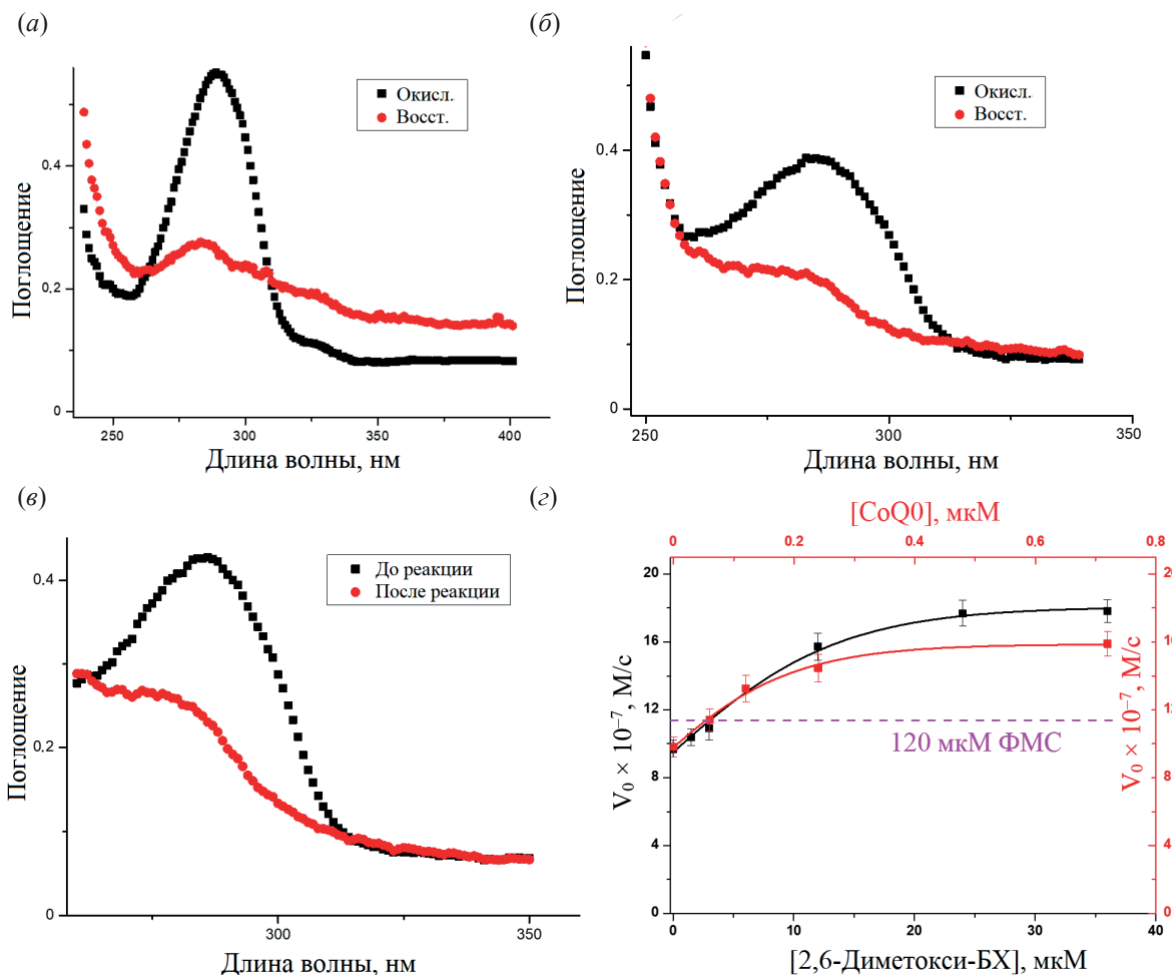


Рис. 6. (а) – Спектры окисленной и восстановленной форм 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ в натрий-фосфатном буфере, рН 8.8); (б) – спектры окисленной и восстановленной форм 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ в мицеллярной среде (0.1 М АОТ в *n*-октане, $W_0 = 22$, рН 8.8); (в) – спектры реакционной смеси (1 мМ D-арабиноно-1,4-лактон, 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ) в мицеллярной среде (0,1 М АОТ в *n*-октане, $W_0 = 22$) до и после протекания реакции (добавления 34 нМ ТсГАЛ); (г) – зависимость активности ТсГАЛ от концентрации 2,6-диметокси-БХ (без красителя) и от концентрации СоQ0 (в комбинации с 120 мкМ ДХФИФ), в качестве базовой линии указана активность ТсГАЛ при комбинации 120 мкМ ФМС и 120 мкМ ДХФИФ.

разницу ($\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}}$) (табл. 3), которая составляет 13 900 (для водного раствора) и 4 600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (для мицеллярной системы). Большое значение параметра $\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}}$ в мицеллярной среде по сравнению с незамещенным БХ и ФМС с разностными коэффициентами поглощения 3050 и 2100 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ соответственно [3] говорит о возможности применения 2,6-диметокси-БХ для измерения активности ТсГАЛ по расходу ЭА в процессе реакции.

Используя найденное значение $\epsilon_{\text{окисл}} - \epsilon_{\text{восст}} = 4\,600 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (табл. 3), мы определили макси-

мальную активность ТсГАЛ в присутствии 24 мкМ (в насыщении по 2,6-диметокси-БХ, рис. 6г). Оказалось, что найденное значение ($17.8 \times 10^{-7} \text{ M/c}$) в 1.5 раза выше активности в случае комбинации ФМС и красителя (контрольной системы), использовавшейся нами ранее для изучения ТсГАЛ [2, 3]. Следовательно, 2,6-диметокси-БХ – эффективный ЭА для ТсГАЛ, позволяющий надежно регистрировать активность ТсГАЛ.

Таким образом, разработан улучшенный подход к измерению активности ТсГАЛ с использованием 2,6-диметокси-БХ (24 мкМ) в ка-

Таблица 3. Спектрофотометрические параметры 2,6-диметокси-БХ в водной (PBS, pH 8.8) и мицеллярной (0.1 М АОТ в октане, $W_0 = 22$) средах

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

честве ЭА, который не требует использования дополнительных агентов (красителя).

Ингибиторный анализ TcGAL с применением 2,6-диметокси-1,4-бензохинона в качестве электроноакцептора. В наших предыдущих работах было продемонстрировано применение методики измерения активности TcGAL с использованием комбинации ФМС и красителя ДХФИФ для ингибиторного анализа TcGAL [2, 3]. В настоящей работе мы изучили возможность применения подхода с использованием 2,6-диметокси-БХ как ЭА (в отсутствие красителя) для ингибиторного анализа TcGAL. Для этого изучили действие двух соединений, аллилбензола и аллилтетраметоксибензола, которые проявляли ингибирующий эффект в отношении TcGAL в случае методики, разработанной нами ранее, с

ФМС и красителем ДХФИФ [2] (рис. 7). 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 [2].

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 [2]. Эффективность изученных ингибиторов коррелирует для ФМС и 2,6-диметокси-БХ, а также для системы, содержащей CoQ0 как ЭА и краситель ДХФИФ (рис. 7). Следовательно, использование 2,6-диметокси-БХ в отсутствие красителя позволяет надежно регистрировать ингибирование TcGAL.

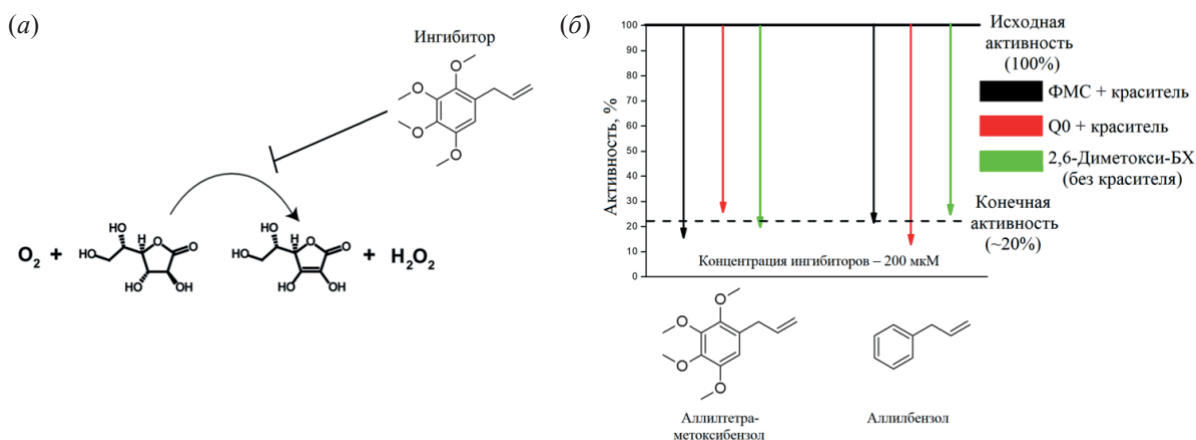


Рис. 7. (а) – Схема ингибирования целевой реакции; (б) – сравнение ингибирующего эффекта аллилтетраметоксибензола и аллилбензола для краситель-содержащих систем (комбинация красителя ДХФИФ и ФМС или Q0 как ЭА) и системы без красителя (2,6-диметокси-БХ как ЭА). Концентрации веществ: 120 мкМ ДХФИФ, 1 мМ АР (субстрат), 34 нМ TcGAL, 24 мкМ 2,6-диметокси-БХ, 120 мкМ ФМС и 0.72 мкМ Q0, 200 мкМ аллилтетраметоксибензола и 200 мкМ аллилбензола. Среда: 0.1 М АОТ в *n*-октане, $W_0 = 22$.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты. В работе использовали L-галактоно-1,4-лактон, D-арабиноно-1,4-лактон, 2,6-дихлорфенолиндофенол, натриевую соль ди-2-этилгексилового эфира сульфоянтарной кислоты (АОТ), коэнзим Q1, коэнзим Q0, 2,6-диметокси-1,4-бензохинон, 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинон, *n*-октан, ацетонитрил (Sigma-Aldrich, США); феназинметосульфат и 1,4-бензохинон (Merck, Германия); аллилтетраметоксибензол и аллилбензол (Acros Organics, Бельгия). L-галактоно-1,4-лактондегидрогеназа из *Arabidopsis thaliana* была любезно предоставлена проф. W.J.H. van Berkel (Вагенингенский университет, Вагенинген, Нидерланды).

Получение рекомбинантных белков AtGALDH и TcGAL, рефолдинг телец включения TcGAL. Экспрессию рекомбинантных белков AtGALDH (EC 1.3.2.3) и TcGAL (EC 1.3.3.12) в *E. coli* проводили согласно методике, описанной ранее [1, 9]. AtGALDH-His6 экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) в виде растворимого цитоплазматического белка. Для продукции фермента TcGAL использовали клетки *E. coli* BL21 (DE3), несущие плазмиду pBAD-TcGAL. TcGAL формировал нерастворимые тельца включения. Рефолдинг TcGAL проводили согласно методике, описанной нами ранее [1]. Суспензию телец включения, собранных после лизиса клеток, промывали 6%-ным раствором Triton X-100, содержащим 60 мМ ЭДТА и 1.5 М NaCl (pH 7.0), и растворяли в 6 М гуанидинхлориде. Затем гуанидинхлорид удаляли диализом против 10 мМ фосфата натрия (pH 8.0). После диализа суспензию агрегированного фермента вносили в систему обращенных мицелл вода–АОТ–октан. Растворы окисленного и восстановленного глутатиона (10 мМ GSSG и 30 мМ GSH) в 10 мМ фосфате натрия (pH 8.0) смешивали, аликвоту (10 мкл) добавляли к 1 мл мицеллярного раствора фермента в 0.4 М АОТ. Рефолдинг фермента инициировали добавлением 10 мкл раствора FAD в воде (10-кратный молярный избыток по отношению к ферменту). Сворачивание и конечную концентрацию фермента в мицеллах контролировали методом КД-спектроскопии с

использованием КД-спектрометра J-815 (Jasco, Япония).

Каталитическая активность AtGALDH и TcGAL. Для спектрофотометрического определения активности обоих ферментов использовали систему обращенных мицелл ПАВ, 0.1 М АОТ в *n*-октане (степень гидратации $W_0 = 22$), описанную нами ранее [3], с небольшими изменениями. Для измерения активности ферментов использовали комбинацию одного из потенциальных ЭА (1,4-бензохинон или его производные) и 120 мкМ водный раствор ДХФИФ в качестве красителя, обесцвечивающегося при образовании продукта реакции при длине волны 550 нм. Запасные растворы ЭА (CoQ0, CoQ1, 2,6-диметокси-1,4-бензохинона и 2,5-дигидрокси-1,4-бензохинона) готовили в DMSO. Поглощение измеряли с помощью спектрофотометра Ultrospec-2100pro (Amersham Biosciences, США). В качестве субстратов использовали L-галактоно-1,4-лактон в случае AtGALDH и D-арабиноно-1,4-лактон в случае TcGAL. Концентрации субстратов составляли 1 мМ, ферментов TcGAL (34 нМ) и AtGALDH (6 нМ). Для построения графиков и статистической обработки данных с использованием *t*-критерия Стьюдента применяли программу SigmaPlot 11.1. Значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Ингибиторный анализ TcGAL. При разработке подхода к ингибиторному анализу использовали ЭА без красителя, добавляя один из исследуемых ингибиторов (аллилбензол или тетраметоксиаллилбензол) в реакционную среду. В качестве контрольной системы использовали систему, содержащую 120 мкМ ФМС и 120 мкМ ДХФИФ, описанную нами ранее [2]. Эффективность ингибиторов при использовании предлагаемого подхода в сравнении с методикой с применением красителя оценивали по ингибирующему эффекту при насыщающих концентрациях ингибиторов (200 мкМ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружены новые ЭА для TcGAL ряда 1,4-бензохинона (конзимы Q0, Q1, 2,5-дигидрокси-БХ

и 2,6-диметокси-БХ) и выявлено влияние структуры ЭА на активность TcGAL. Так, установлено, что соединения, содержащие метоксигруппы, являются более эффективными электроноакцепторами для TcGAL (коэнзим Q0, 2,6-диметокси-БХ) по сравнению с соединениями, не имеющими ОСН₃-групп (2,5-дигидрокси-БХ, а также тимохинон, являющийся слабым ингибитором TcGAL).

При исследовании двух форм AtGALDH (природной и мутантной) обнаружено, что в водной среде более “чувствительна” (наибольшая разница в значениях активности) к выбору эффектора природная (дегидрогеназная) форма. В то же время в мицеллах более чувствительна мутантная форма AtGALDH (сочетание дегидрогеназной и оксидазной 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 подходом [3]. Так, новый подход не требует применения красителя и, кроме того, обеспечивает в 1.5 раза большую активность фермента при меньшей (в 5 раз) концентрации ЭА. Продемонстрирована возможность использования нового подхода для ингибиторного анализа TcGAL. Это еще один шаг в поиске ингибиторов данного фермента, которые могут рассматриваться в качестве основы для разработки лекарственных средств против болезни Шагаса, вызываемой *T. cruzi* [2].

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования (КД-спектрометр J-815, Jasco, Япония) по программе развития МГУ им. М.В. Ломоносова.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kudryashova E.V., Leferink N.G.H., Slot I.G.M., Van Berkel W.J.H. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2011. V. 1814. P. 545–552.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.03.001>
2. Chudin A.A., Zlotnikov I.D., Krylov S.S., Semenov V.V., Kudryashova E.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2023. V. 88. P. 131–141.
<https://doi.org/10.31857/S0320972523010074>
3. Chudin A.A., Kudryashova E.V. // *Analytica*. 2022. V. 3. P. 36–53.
<https://doi.org/10.3390/analytica3010004>
4. Leferink N.G.H., Fraaije M.W., Joosten H.J., Schap P.J., Mattevi A., van Berkel W.J.H. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 4392–4397.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M808202200>
5. Чудин А.А., Кудряшова Е.В. // *Биотехнология*. 2022. Т. 38. С. 80–85.
<https://doi.org/10.56304/S0234275822040068>
6. Hiji A.K., Kébir H., Hekimi S. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 41013–41018.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M305034200>
7. Hernández-Camacho J.D., García-Corzo L., Fernández-Ayala D.J.M., López-Lluch G., Navas P. // *Antioxidants*. 2021. V. 10. P. 1785.
<https://doi.org/10.3390/antiox10111785>
8. Čermáková P., Kovalinka T., Ferenczyová K., Horváth A. // *Parasite*. 2019. V. 26. P. 17.
<https://doi.org/10.1051/parasite/2019017>
9. Leferink N.G.H., Van Den Berg W.A.M., Van Berkel W.J.H. // *FEBS J.* 2008. V. 275. P. 713–726.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06233.x>
10. Ameixa J., Arthur-Baidoo E., Pereira-da-Silva J., Onćák M., Ruivo J. C., Varella M. T.do N., Ferreira da Silva F., Denifl S. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2023. V. 21. P. 346–353.
<https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.12.011>
11. Laskowski M.J., Dreher K.A., Gehring M.A., Abel S., Gensler A.L., Sussex I.M. // *Plant Physiol.* 2002. V. 128. P. 578–590.
<https://doi.org/10.1104/pp.010581>
12. Alghanmi R.M. // *J. Chem.* 2019. V. 2019. 1743147.
<https://doi.org/10.1155/2019/1743147>

13. *Detremmerie C., Vanhoutte P.M., Leung S.* // Acta Pharm. Sin. B. 2017. V. 7. P. 401–408.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.06.003>
14. *Manal A.A.* // Am. J. Life Sci. 2017. V. 5. P. 52–56.
<https://doi.org/10.11648/j.ajls.20170502.13>
15. *Gray J.P., Burgos D.Z., Yuan T., Seeram N., Rebar R., Follmer R., Heart E.A.* // Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2016. V. 310. P. E394–E404.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00250.2015>
16. *Shaukat A., Zaidi A., Anwar H., Kizilbash N.* // Front. Nutr. 2023. V. 10. P. 10:1126272.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1126272>

Impact of Effectors on the Catalytic Activity of Galactonolactone Oxidase from *Trypanosoma cruzi*

A. A. Chudin^{*,#} and E. V. Kudryashova^{*,#}

[#] E-mail: andrew_18@inbox.ru; Helenakoudriachova@yandex.ru

^{*} Chemical Department, Lomonosov Moscow State University,
Leninskie gory 1/3, Moscow, 119991 Russia

The influence of the structure of the effectors, 1,4-benzoquinone, coenzymes Q and their structural analogues, on the activity of galactonolactone oxidase from *Trypanosoma cruzi* (TcGAL) and the homologous enzyme L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtGALDH) was studied. Using two forms of AtGALDH, natural (dehydrogenase) and mutant (exhibiting oxidase activity), the role of 1,4-benzoquinone and its analogs as electron acceptors of AtGALDH and TcGAL was revealed. It has been established that compounds containing methoxy groups are more effective electron acceptors for TcGAL (coenzyme Q0, 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone) compared to compounds without OCH₃ groups (2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinone). Using 2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone as an electron acceptor, an approach to the spectrophotometric measurement of TcGAL activity by changes in the absorption of the electron acceptor in the absence of additional components (a dye that becomes colorless when interacting with the reaction product, ascorbate) is proposed. The results obtained allow for a more targeted search for TcGAL inhibitors, which can be considered as the basis for the development of selective drugs against Chagas disease caused by *T. cruzi*.

Keywords: galactonolactone oxidase, L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, electron acceptors, effectors, coenzymes, 1,4-benzoquinone, *Trypanosoma cruzi*