

УДК 577.15.1

БЕНЗИМИДАЗОЛЫ – КОНКУРЕНТНЫЕ ИНГИБИТОРЫ FAD-СОДЕРЖАЩЕЙ МОНООКСИГЕНАЗЫ

А.А. Захарянц^{1,4}, А.А. Полозников^{2,3,4}, Д.М. Хушпульян^{1,4}, Т.А. Осипова¹,
В.И. Тишков^{1,4,5}, И.Г. Газарян^{1,3}

(¹химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (РФ); ²ФГБУ Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева (РФ); ³Институт им. У.М. Берка, Медицинский колледж Корнельского университета (США); ⁴ООО «Инновации и высокие технологии МГУ» (РФ); ⁵Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (РФ); e-mail: vitishkov@gmail.com)

Бензимидазолы широко используются как антигельминтные препараты, мишенью которых является тубулин. Влияние четырех из них было изучено на хорошо известном и коммерчески доступном ферменте – *para*-оксибензоатгидроксилазе (РНВН), входящей в число FAD-содержащих монооксигеназ класса А, который включает также и FAD-зависимый монооксигеназный домен молекулы MICAL. Продемонстрировано конкурентное ингибирование активности РНВН всеми бензимидазолами (мебендазол, албендазол, фенбендазол, оксибендазол) в микромолярном диапазоне концентрацией в гидроксилазной, но не в нефизиологической NADPH-дегидрогеназной реакции восстановления феррицианида. Характер ингибирования соответствует конкуренции бензимидазолов с *para*-оксибензоатом за нативный фермент, косвенно указывая на упорядоченный механизм связывания субстратов. Моделирование подтверждает выводы, сделанные на основании изучения стационарной кинетики.

Ключевые слова: *para*-оксибензоатгидроксилаза, ингибиторный анализ, окисление *para*-оксибензоата, восстановление феррицианида, компьютерное моделирование.

Список использованных в статье сокращений: РНВН – *para*-оксибензоатгидроксилаза; MICAL – молекула, взаимодействующая с CasL (Molecule Interacting with CasL); FAD – флавинадениндинуклеотид; NADPH – никотинамидадениндинуклеотид фосфат, восстановленная форма; РНВ – *para*-оксибензоат.

Бензимидазолы, такие как албендазол и фенбендазол, являются антигельминтными препаратами, механизм действия которых состоит в ингибировании перестроек тубулина. В организме человека они претерпевают окисление и расщепление с помощью FAD-содержащих монооксигеназ, окисляющих серу до сульфона. Геном человека насчитывает более 60 генов FAD-зависимых монооксигеназ (МОГ), большинство из которых не описаны в индивидуальном состоянии, а их функции неизвестны. Хорошо изученную группу представляют монооксигеназы, которые не специфичны к окисляемому субстрату и наряду с цитохромом P-450 предназначены для расщепления ксенобиотиков. Кинетический механизм МОГ относится к механизму типа «пинг-понг» и включает в себя восстановление FAD с помощью NADPH, связывание и активацию кислорода восстановленным FAD с последующим окислением ксенобиотика [1].

Наряду с FAD-зависимыми монооксигеназами, действующими по механизму «пинг-понг», существуют другие специфические FAD-содержащие монооксигеназы. Они играют важную роль в ор-

ганизме человека, катализируя реакцию по механизму, отличному от механизма «пинг-понг». Например, FAD-зависимые монооксигеназы класса А (по классификации, предложенной недавно в [1]) специфичны к определенным субстратам. Только связывание этих субстратов вызывает конформационные изменения, позволяющие второму субстрату NADPH эффективно связаться с ферментом и восстановить FAD. Таким образом, механизм катализа включает в себя образование тройного комплекса. Различие в константах скорости восстановления FAD с помощью NADPH в отсутствие и в присутствии специфического субстрата составляет пять порядков (140 000 раз [2]). Представлялось интересным выяснить, являются ли антигельминтные бензимидазолы конкурентными субстратами для специфических FAD-содержащих монооксигеназ, каковыми они являются для неспецифических FAD-зависимых монооксигеназ. С этой целью в качестве модельной FAD-содержащей монооксигеназы класса А была выбрана *para*-оксибензоатгидроксилаза из *Pseudomonas* sp. (4-оксибензоат, NADPH, кисло-

род, оксидоредуктаза, РНВН, КФ 1.14.13.2) – фермент, структура и механизм катализа которого изучены достаточно подробно [1–8]. Исследовано ингибирование РНВН в присутствии четырех бензимидазолов, только два из которых (албендазол и фенбендазол) имеют в составе легко окисляющуюся серу, в то время как оксибендазол и мебендазол легко окисляющихся групп не имеют (рис. 1).

РНВН является модельным ферментом специфических FAD-содержащих монооксигеназ класса А, таких как каталитический домен MICAL, специфически окисляющий актин [9] и играющий важную роль в модификации цитоскелета [10–12], проявляющейся как в навигации аксонов [13], так и в эпителиально-мезенхимной трансформации [14].

Материалы и методы

Все применяемые в работе реактивы изготовлены фирмой «Сигма» (США) и использованы без дополнительной очистки. Проведено предварительное изучение растворимости бензимидазолов: оптимальная процедура растворения включала в себя приготовление 50 мМ раствора в диметилсульфоксиде, его разведение в 50%-м растворе этанола в воде и внесение расчетной аликвоты в реакционную смесь.

Активность измеряли в 50 мМ калий-фосфатном буфере (рН 7,5). Концентрацию активного фермента определяли спектрофотометрически по концентрации FAD, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{450} = 10,2 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [6]. Скорость реакции измеряли по потреблению NADPH ($\epsilon_{440} = 6,22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$) на приборе «Spectramax M5» фирмы «Molecular Devices» (США). Концентрации субстратов варьировали в диапазоне 25–100 мкМ (NADPH) и 25–150 мкМ (*пара*-оксибензоат). Реакцию инициировали добавлением

NADPH. Для измерения диафоразной (NADPH-дегидрогеназной) активности использовали феррицианид (0,5 мМ) и NADPH (50–150 мМ). Измерение активности проводили по обоим субстратам (феррицианид $\epsilon_{420} = 1,04 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$). В расчетах использовали начальную скорость реакции (максимальный наклон кинетической кривой за первые 3 мин реакции). Все измерения проводили троекратно. Анализ ингибирования проводили в координатах Диксона. С помощью программы Discovery Studio 2.5 («Accelrys», США), используя две кристаллические структуры РНВН, осуществляли моделирование со связанным субстратом РНВ (1РВЕ.pdb) и со связанным NADPH (1K0J.pdb).

Результаты и обсуждение

Постадийный каталитический цикл РНВН, представленный на схеме 1, включает в себя упорядоченное присоединение субстратов, РНВ (k_1S) и NADPH (k_2N), восстановление FAD (k_3), диссоциацию NADP (k_4), окисление восстановленного FAD кислородом (k_5), гидрокселирование РНВ с помощью основания В в активном центре фермента (k_6), протонирование и образование окиси-FAD, но уже при участии протонированной формы основания В (ВН) в активном центре фермента (k_7) и, наконец, отщепление гидрокселированного продукта (Р) и молекулы воды (k_8).

Все изученные бензимидазолы оказались ингибиторами фермента при измерении скорости ферментативной реакции по убыли NADPH. Если бы они выступали как конкурентные субстраты, то NADPH продолжал бы расходоваться на их окисление, и при измерении скорости реакции по убыли NADPH падения скорости реакции не должно происходить. Поскольку наблюдается значитель-

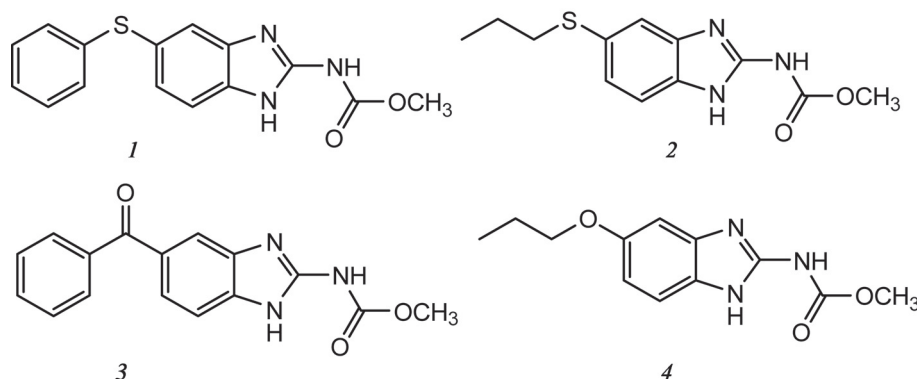
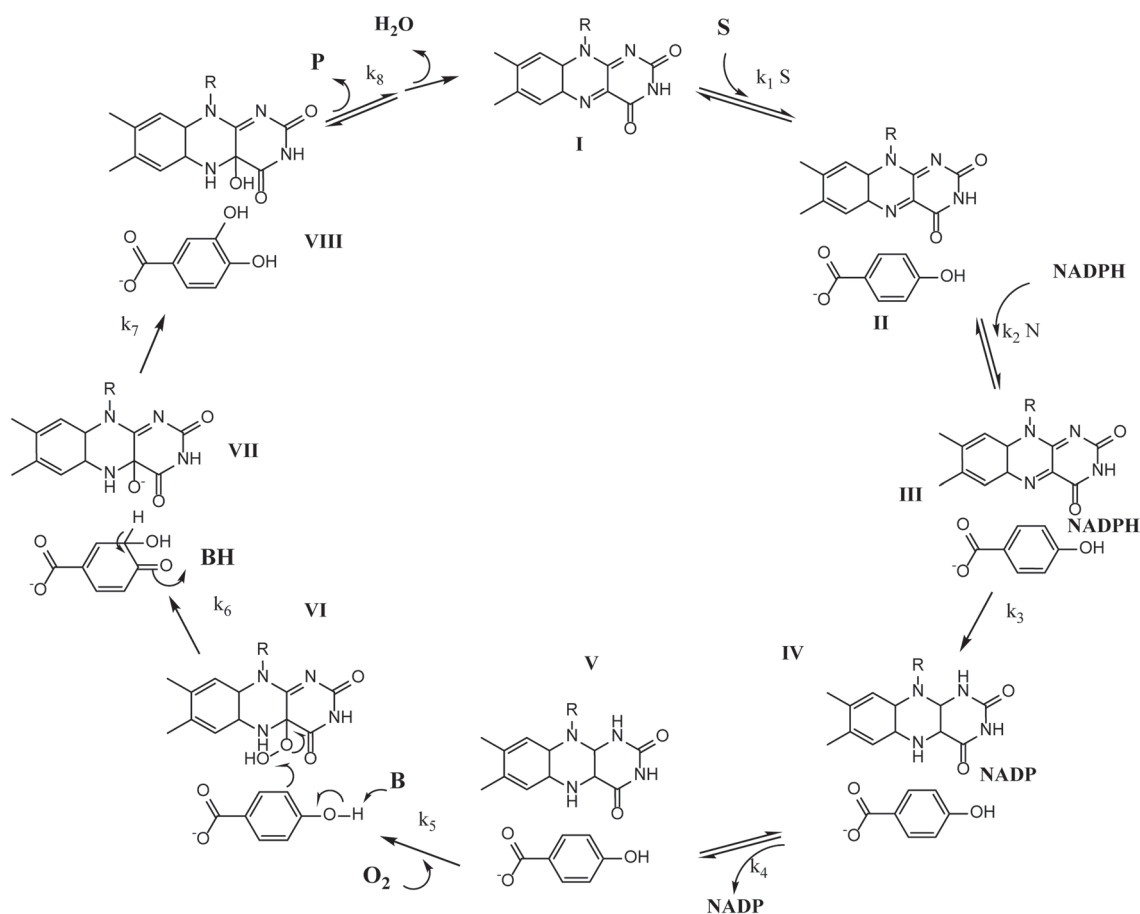


Рис. 1. Структура антигельминтных бензимидазолов: 1 – метил-5-(фенилтио)-2-бензимидазолкарбамат (фенбендазол); 2 – метил-5-(пропилтио)-2-бензимидазолкарбамат (албендазол); 3 – метил-N-(5-бензоил-1H-бензимидазолил)-2-карбамат (мебендазол); 4 – метил(5-пропокси-1H-бензимидазолил)-2-карбамат (оксибендазол)

Схема 1



Полный каталитический цикл реакции окисления *para*-оксибензоата, катализируемой *para*-оксибензоатгидроксилазой из *Pseudomonas* sp. [1]

ное падение скорости реакции, измеряемой по NADPH, можно заключить, что бензимидазолы являются истинными ингибиторами фермента, а не конкурентными субстратами, как было принято считать в случае албендазола и фенбендазола. Возможно, что даже если они окисляются как субстраты, то продукты их окисления являются ингибиторами фермента. Более того, мебендазол и оксибендазол, не имеющие легко окисляемой серы в составе молекулы, в отличие от албендазола и фенбендазола, также являются конкурентными ингибиторами фермента как по специфическому субстрату, так и по кофактору – NADPH (рис. 2). Обращает на себя внимание тот факт, что значения константы ингибирования, определяемой как точка пересечения прямых в координатах Диксона, зависят от того, варьируют субстрат при фиксированной концентрации кофактора или кофактор при фиксированной концентрации специфического субстрата (рис. 2). Константа ингибирования, определяемая при фиксированной концентрации NADPH, в 2–3 раза меньше, чем при фиксированной концентрации *para*-оксибензоата. При изучении в 1970-е годы стационарного меха-

низма реакции, катализируемой РНВН, его классифицировали как неупорядоченное связывание с образованием тройного комплекса [2]. Можно предположить, что бензимидазолы конкурируют за нативную форму фермента и с субстратом, и с кофактором, однако в этом случае экспериментально определяемая константа ингибирования не должна зависеть от того, какой из субстратов фиксируют, а какой варьируют. Последующие детальные исследования механизма РНВН, включающие работы по мутагенезу и кристаллизации мутантных форм с субстратом или продуктом, позволили уточнить механизм (схема 1). Однозначно показано, что конформационное изменение, сопровождающееся изменением положения флавинового кольца, необходимого для взаимодействия с NADPH, происходит только как результат связывания *para*-оксибензоата [1, 3, 8]. В дальнейшем было показано, что скорость-лимитирующей стадией является диссоциация продукта NADP, протекающая в конце восстановительной полуреакции [3]. На схеме 1 этот процесс представлен как переход IV → V с константой скорости k_4 . Связывание кислорода и окисление *para*-окси-

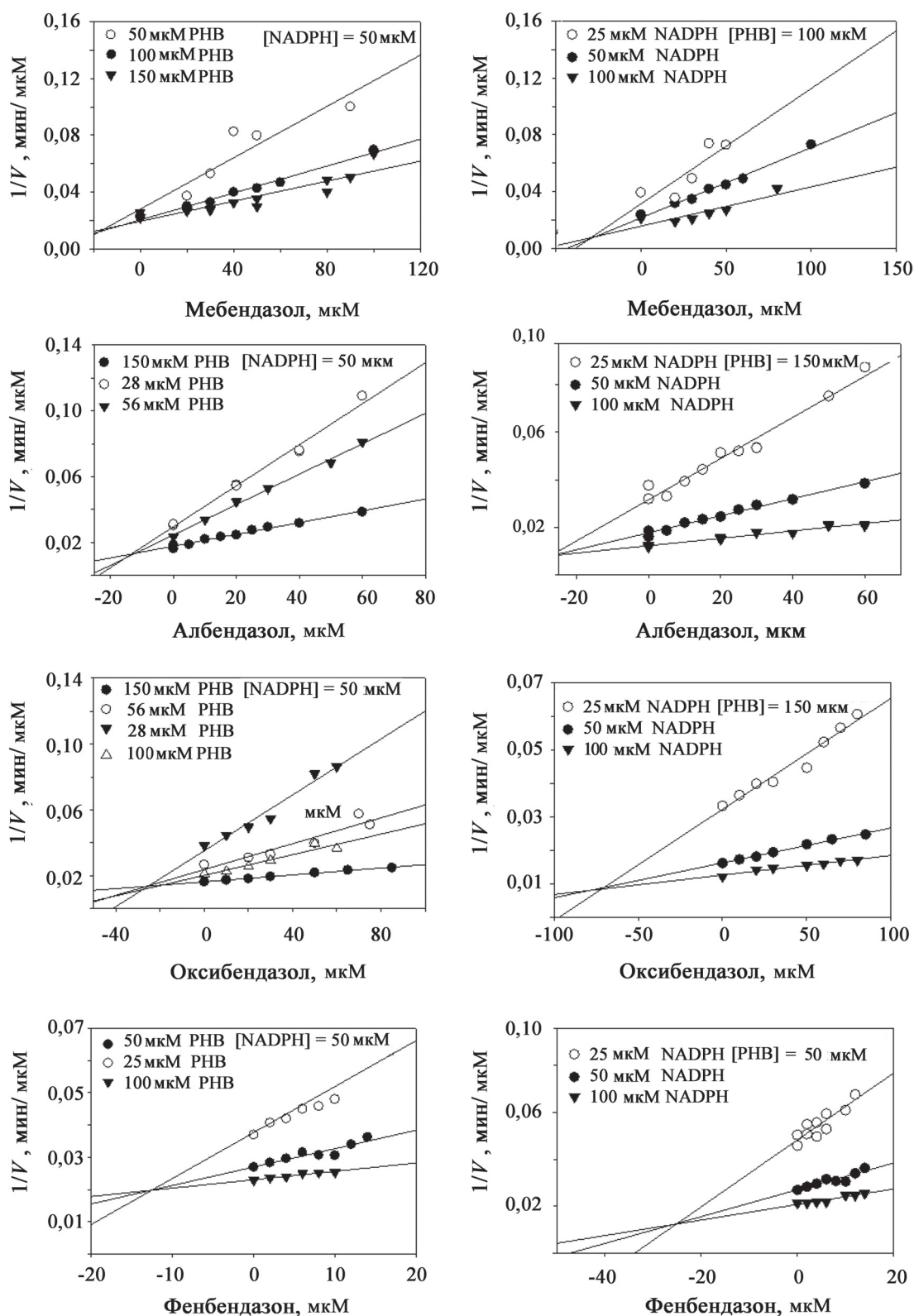
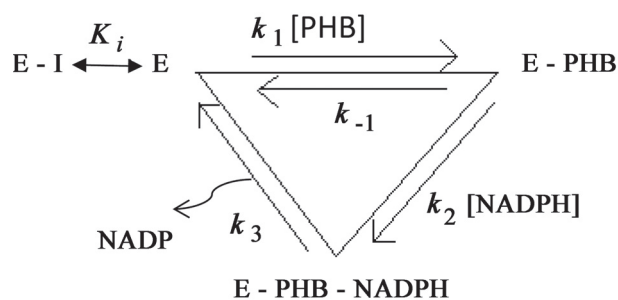


Рис. 2. Ингибирование бензимидазолами окисления *para*-оксибензоата, катализируемого РНВ, в координатах Диксона при варьировании окисляемого субстрата (РНВ) и фиксированной концентрации NADPH (левая колонка) и при варьировании NADPH и фиксированной концентрации *para*-оксибензоата (РНВ) (правая колонка)

бензоата (на схеме 1 стадии k_5 , k_6 , k_7 , k_8) не являются скоростью-лимитирующими стадиями. С учетом всех исследований каталитический цикл фермента можно представить схемой, в которой первым об-

ратимо связывается *para*-оксибензоат (схема 2, стадия k_1), затем связывается NADPH (схема 2, стадия k_2), при этом происходит немедленное восстановление FAD (константу скорости возможно

С х е м а 2



Упрощенный каталитический цикл PNBH: E – фермент, I – ингибитор

определить только для мутантов со значительным падением активности по восстановлению FAD), затем предполагается диссоциация NADP (k_3), после чего происходят окисление FAD и гидроксильное связывание субстрата в 3-положении. Предположение о необходимости диссоциации NADP обусловлено рассмотрением конформационных ограничений, связанных с окислением *para*-оксибензоата [1]. Поскольку константы скорости полуреакции окисления намного превосходят константу скорости лимитирующей стадии всей реакции и диссоциации продукта NADP, а концентрация кислорода является постоянной при стационарных измерениях, стадии отщепления NADPH, окисления субстрата и его отщепления для упрощения объединены в одну, константа скорости которой равна константе скорости лимитирующей стадии (k_3).

В таком упрощенном варианте уравнение скорости реакции в присутствии ингибитора I, взаимодействующего с нативной формой фермента E, можно представить двумя способами с разделением переменных (значений концентрации субстрата и кофактора) для облегчения анализа прямых в координатах Диксона ($S = [PHB]$, $N = [NADPH]$):

при фиксированной концентрации NADPH

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{k_{-1} + k_2 N}{k_2 N}\right) \left(\frac{1}{k_1 S}\right) \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) + \frac{1}{k_2 N} + \frac{1}{k_3}, \quad (1)$$

абсцисса точки пересечения прямых в координатах Диксона равна

$$i = -K_i; \quad (1a)$$

при фиксированной концентрации *para*-оксибензоата и вводе его константы диссоциации K_S

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{1}{k_1 S}\right) \left(1 + \frac{i}{K_i}\right) + \frac{1}{k_2 N} \frac{K_S}{S} \left(1 + \frac{S}{K_S} + \frac{i}{K_i}\right) + \frac{1}{k_3}, \quad (2)$$

где $K_S = \frac{k_{-1}}{k_1}$, а абсцисса точки пересечения пря-

мых в координатах Диксона равна

$$i = -K_i \left(1 + \frac{S}{K_S}\right). \quad (2a)$$

При рассмотрении уравнений (1), (2) становится очевидным, что точка пересечения при фиксированной концентрации NADPH соответствует истинной константе ингибирования (1), (1a), а при фиксированной концентрации *para*-оксибензоата константа ингибирования зависит от фиксированной концентрации *para*-оксибензоата (2), (2a), вернее, от отношения его концентрации к константе связывания. Последняя (43 мкМ при pH 6,6) была определена в работе [2] по значительным спектральным изменениям фермента, происходящим при связывании субстрата. Учитывая использование концентраций *para*-оксибензоата в интервале 50–150 мкМ и увеличение константы его связывания с ферментом при повышении pH (в нашем случае pH 7,5) увеличение кажущейся константы ингибирования в 2–3 раза по сравнению с истинной можно считать соответствующей величине фактора $[S]/K_S$. Таким образом, исходя из данных стационарной кинетики, можно предположить, что связывание бензимидазолов предотвращает связывание *para*-оксибензоата. В пользу такого предположения говорит также тот факт, что изученные бензимидазолы не ингибируют неспецифическую реакцию восстановления феррицианида NADPH, катализируемую ферментами этого класса и протекающую по механизму «пинг-понг» (результаты не показаны).

Прежде чем перейти к анализу результатов компьютерного моделирования, следует отметить принципиальный для понимания ситуации момент. А именно, несмотря на долгое и плодотворное изучение фермента, его кристаллическая структура с NADPH так и не была получена, в то время как структуры нативного фермента (1PBE.pdb) и его многих мутантных вариантов со связанным *para*-оксибензоатом хорошо известны. Единственная структура со связанным NADPH была получена для мутантного фермента с заменой Arg220Gln (1K0J.pdb) [7]. Загадочным обстоятельством здесь является положение молекулы NADPH, ориентированной по отношению к молекуле FAD с точностью до наоборот по сравнению с химически разумной ориентацией, вытекающей из данных всех спектральных экспериментов, проведенных на мутантных формах фермента, и факта экспериментального наблюдения комплекса с переносом заряда на нативном ферменте. Мож-

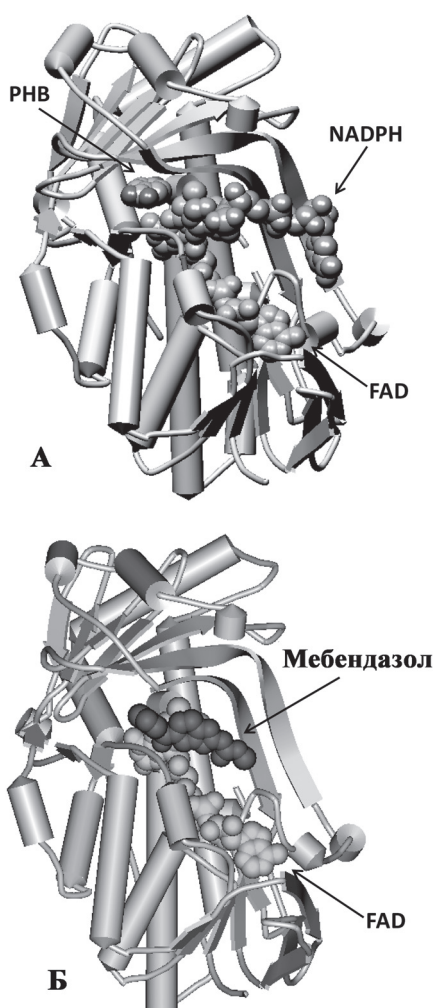


Рис. 3. Моделирование связывания мебендазола с РНВН: А – суперпозиция структур РВЕ1 и 1К0J (взаимное расположение субстратов и FAD в молекуле фермента); Б – докинг мебендазола в области связывания NADPH, показывающий экранирование ингибитором канала, ведущего к центру связывания *para*-оксибензоата

но предположить, что либо реальное положение NADPH при катализе не соответствует кристаллической структуре, полученной для NADPH в мутанте, а молекула на самом деле перевернута, как предполагают в работе [1], либо фермент совершает немислимые конформационные изменения, чтобы пригнуть никотинамидную часть молекулы NADPH к флавину FAD, как обсуждается в [3].

Для того чтобы показать на одной структуре, как расположены *para*-оксибензоат, FAD и NADPH, *para*-оксибензоат из структуры 1PBE (с сохранением координат его расположения по отношению к FAD и молекуле белка) был перенесен на структуру 1K0J (рис. 3, А). Как видно из рис. 3, А, *para*-оксибензоат связывается в полости

активного центра, проникая через канал, расположенный перпендикулярно к кольцу флавина. Несмотря на то что связывание молекулы NADPH в реальном каталитическом цикле может не соответствовать ее ориентации в кристаллической структуре 1K0J, принципиальным для моделирования моментом является расположение аденина в молекуле связанного кофактора. Докинг ингибиторов проводили таким образом, чтобы в центре сферы для докинга находился адениновый фрагмент NADPH в структуре 1K0J. В качестве примера полученных результатов показан докинг мебендазола (рис. 3, Б), где хорошо видно, как бензильная часть мебендазола частично перекрывает канал, ведущий к сайту связывания *para*-оксибензоата.

Таким образом, анализ вариантов связывания бензимидазолов РНВН позволяет понять, почему связывание бензимидазолов, которые имеют в своем составе бензимидазольное кольцо, стерически эквивалентное адениновому кольцу NADPH, конкурируют за связывание не столько с NADPH (который, как обсуждалось выше, может связываться с точностью до наоборот в реальном каталитическом акте), сколько с *para*-гидроксибензоатом, создавая стерическое препятствие для связывания последнего, и таким образом невозможности перехода фермента в то конформационное состояние, которое соответствует активации FAD по отношению к NADPH.

В заключение можно отметить, что ингибиторный анализ, проведенный в настоящей работе, является дополнительным доказательством упорядоченного механизма связывания субстратов у FAD-зависимых монооксигеназ класса А. Именно к этому классу относится и FAD-содержащий монооксигеназный домен MICAL, активация катализа которым наблюдается только при связывании F-актина. Поскольку MICAL отвечает за перестройки актина, а бензимидазолы блокируют перестройки тубулина, то обнаружение ингибирования бензимидазолами модельного фермента класса А FAD-зависимых монооксигеназ (РНВН) ставит вопрос о возможном влиянии бензимидазолов на катализ FAD-содержащим монооксигеназным доменом MICAL, а следовательно, на перестройку актина (в дополнение к их известному влиянию на тубулин). Проводимые в настоящее время исследования рекомбинантного FAD-содержащего монооксигеназного домена в нашей лаборатории позволят ответить на этот вопрос в самом ближайшем будущем.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-01909).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Crozier-Reabe K., Moran G.R. // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13. P. 15601.
2. Husain M., Massey V. // *J. Biol. Chem.* 1979. Vol. 254. P. 6657.
3. Entsch B., Cole L.J., Ballou D.P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. Vol. 433. P. 297.
4. Hosokawa K., Stanier R.Y. // *J. Biol. Chem.* 1966. Vol. 241. P. 2453.
5. Howell L. G., Spector T., Massey V. // *J. Biol. Chem.* 1972. Vol. 247. P. 4340.
6. Berkel W. van, Westphal A., Eschrich K., Eppink M., Kok A. de // *Eur J Biochem/FEBS.* 1992. Vol. 210. P. 411.
7. Wang J., Ortiz-Maldonado M., Entsch B., Massey V., Ballou D., Gatti D. L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. Vol. 99. P. 608.
8. Westphal A. H., Matorin A., Hink M.A., Borst J.W., Berkel W. van, Visser A.J. // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281. P. 11074.
9. Zucchini D., Caprini G., Pasterkamp R. J., Tedeschi G., Vanoni M.A. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2011. Vol. 515. P. 11.
10. Hung R.J., Pak C.W., Terman J.R. // *Science.* 2011. Vol. 334. P. 1710.
11. Hung R.J., Spaeth C.S., Yesilyurt H.G., Terman J.R. // *Nature cell biology.* 2013. Vol. 15. P. 1445.
12. Hung R.J., Yazdani U., Yoon J., Wu H., Yang T., Gupta N., Huang Z., Berkel W. van, Terman J.R. // *Nature.* 2010. Vol. 463. P. 823.
13. Lee B.C., Peterfi Z., Hoffmann F.W., Moore R.E., Kaya A., Avanesov A., Tarrago L., Zhou Y., Weerapana E., Fomenko D.E., Hoffmann P.R., Gladyshev V.N. // *Molecular cell.* 2013. Vol. 51. P. 397.
14. Lundquist M.R., Storaska A.J., Liu T.C., Larsen S.D., Evans T., Neubig R.R., Jaffrey S.R. // *Cell.* 2014. Vol. 156. P. 563.

Поступила в редакцию 01.08.15

BENZIMIDAZOLES AS COMPETITIVE INHIBITORS OF FAD-DEPENDENT MONOOXYGENASE

A.A. Zakhariants, A.A. Poloznikov, D.M. Hushpulian, T.A. Osipova, V.I. Tishkov, I.G. Gazaryan

(Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University)

Benzimidazoles represent the drugs targeting tubulin and widely used to treat intestinal parasites. Four benzimidazoles were tested with the well-characterized and commercially available bacterial para-hydroxybenzoate hydroxylase (PHBH), which belongs to the group of FAD-dependent monooxygenases class A including such enzymes as FAD-containing monooxygenase domain of MICAL. PHBH was shown to be competitively inhibited by all four benzimidazoles (mebendazole, albendazole, fenbendazole, oxibendazole) in the micromolar range in the hydroxylase reaction, but not in the non-physiological NADPH-dehydrogenase reaction of ferricyanide reduction. Inhibition pattern is consistent with benzimidazoles competing with para-hydroxybenzoate for the resting state of the enzyme, indirectly indicating the ordered mechanism of substrate binding. Modeling studies support the conclusions derived from steady-state kinetics.

Key words: para-hydroxybenzoate hydroxylase, ferricyanide reduction, inhibition analysis, computer modeling, docking.

Сведения об авторах: Захарянц Арпеник Ашотовна – аспирант кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, мл. науч. сотр. ООО «Иновации и высокие технологии МГУ»; Полозников Андрей Александрович – зав. лабораторией биохимии и энзимологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ст. науч. сотр. ООО «Иновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; Хушпульян Дмитрий Михайлович – мл. науч. сотр. кафедры радиационной химии МГУ имени М.В. Ломоносова, ст. науч. сотр. ООО «Иновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; Осипова Татьяна Алексеевна – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук; Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, генеральный директор ООО «Иновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com); Газарян Ирина Георгиевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ имени М.В. Ломоносова, сотр. Института им. У.М. Берка, Медицинский колледж Корнельского университета, США, докт. хим. наук, профессор.