

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ РОБОТИ

УДК 577.151.042

НОВЫЕ НЕПЕПТИДНЫЕ ИНГИБИТОРЫ ФУРИНА

В. К. КИБИРЕВ¹, Т. В. ОСАДЧУК¹, О. Б. ВАДЗЮК², М. М. ГАРАЗД¹

¹Институт биоорганической химии и нефтехимии НАН Украины, Киев;

²Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;

e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua

Родственная субтилизину пропротеинконвертаза человека — фурин — является важнейшей фармацевтической мишенью для синтеза соответствующих ингибиторов, поскольку энзим играет жизненно важную роль в развитии многих заболеваний человека.

Для выявления нового класса низкомолекулярных непептидных ингибиторов фурина проведен скрининг ряда флавоноидов и некоторых природных соединений. Найдено, что гликозилированные флавоноиды: рутин, нарингин, байкалин и метилгесперидин — ингибируют фурин при pH 7,2 обратимо и конкурентно с $K_i \sim 80\text{--}200$ мкМ. Значения K_i определяли по графикам Диксона и/или Эди-Хофсти, используя флуорогенный субстрат *Woc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC*. Хотя исследованные флавоноиды проявляют лишь умеренную ингибиторную активность, они могут быть полезными при разработке более мощных непептидных ингибиторов фурина в будущем.

Ключевые слова: фурин, ингибиторы фурина, флавоноиды, рутин, нарингин, байкалин, метилгесперидин.

Фурин (КФ 3.4.21.75) — наиболее изученный и охарактеризованный энзим, относящийся к семейству пропротеинконвертаз (ПК), является внутриклеточной кальцийзависимой сериновой эндопротеиназой животных. За счет ограниченного расщепления пептидных связей, он способен активировать предшественники различных протеинов: рецепторов, гормонов, факторов роста и дифференциации, протеинов плазмы, энзимов системы свертывания крови и т.д. [1–3]. Помимо этого фурин участвует в процессинге различных бактериальных экзотоксинов, в том числе токсинов сибирской язвы [4, 5] и дифтерии [6], а также в активации гликопротеинов различных вирусов, например, вирусов лихорадки Эбола [7], gp 160 ВИЧ-1 [8], птичьего гриппа [9]. Также хорошо изучена способность фурина активировать предшественники энзимов, участвующих в патогенезе раковых заболеваний [10], болезни Альцгеймера [1–3] и других заболеваний. Поэтому фурин рассматривается как важнейшая фармакологическая мишень для синтеза соответствующих ингибиторов с целью создания на их основе современных лекарственных препаратов [1–3, 11]. В обзоре [12] представлены сведения о необратимых и обратимых ингибиторах фурина пептидной, псев-

допептидной и непептидной природы. В частности, обсуждаются ингибиторы протеиновой природы, которые включают как природные, так и биоинженерные протеины [12]. По мнению автора, особый интерес, однако, представляют низкомолекулярные соединения, так как они более доступны в плане синтеза, менее иммуногенны, метаболически могут быть более устойчивыми и их можно принимать *per os*. Указанными ингибиторами являются полиаргинины, пептидил-хлорметилкетоны, аминометилкетонные или кетометиленовые псевдопептиды, производные некоторых циклических пептидов и другие небольшие пептиды [12]. Для фурина известны также ингибиторы непептидной природы, которые включают производные андрографолида, выделенного из медицинского растения *Andrographis paniculata* [13], комплексы меди или цинка с некоторыми производными пиридина [14] и небольшие молекулы, являющиеся производными 2,5-дидезоксистерптамина [15, 16].

Учитывая субстратную специфичность фурина [17], которая обусловлена присутствием в протеиновых субстратах двух рядом расположенных положительно заряженных остатков —Arg-Arg- или —Lys-Arg-, локализованных во фрагменте последовательности аминокислот —

Arg-X-Lys/Arg-Arg-, представляється несподіваним тим, що незаряджений лактон із *A. paniculata* [13], здатний затримувати протеолітичну активність ферменту. Тщательний скринінг декількох тисяч різних сполучень показав, що інгібіторами фурина є нафтофлуоресцеїн, дикумарол, а також цілий ряд його похідних [18].

Таким чином, на даний час встановлено, що деякі низкомолекулярні незаряджені сполучення здатні знижувати активність фурина [13, 18, 19]. Розширення спектра таких похідних та вивчення їх властивостей та механізму дії дозволить цілеспрямовано синтезувати специфічні інгібітори фурина, метою якої є пошук та дослідження властивостей нових інгібіторів фурина (які не містять позитивного заряду) серед флавоноїдів та ряду інших природних сполучень. Для порівняння досліджено також дію на фурин такого протеїну, як протамісульфат.

Матеріали та методи

Кверцетин та рутин були любезно надані професором хімічного факультету Київського національного університету ім. Тараса Шевченка В. П. Хилей, а інші флавоноїди та ізофлавоноїди – фірмою Eximedlab (Київ). Протамісульфат отримали від професора С. А. Кудинова (Інститут біохімії ім. А. В. Палладина НАН України).

У роботі використовували фурин (2000 од/мл) фірми New England BioLabs та флуорогенний субстрат Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC фірми Bachem (Швейцарія), одна одиниця активності фурина визначається як така кількість ферменту, яка відщеплює 1 пкМ АМК від флуорогенного субстрату за 1 хв в зазначених умовах. Комерційними препаратами є також ЕДТА (Serva, Німеччина), β-меркаптоетанол, НЕРЕС та Brij 35 (Sigma, США), Тритон X-100 (Fluka, Швейцарія). Решта реагентів – вітчизняні препарати кваліфікації хч або чда.

Визначення активності фурина. Аликвоту фурина, що відповідає відщепленню від субстрату 250–300 пкМ/год 7-аміно-4-метилкумарину (АМК), інкубували з Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC (кінцева концентрація 75–250 мкМ) в буфері рН 7,2 (100 мМ НЕРЕС, 1 мМ CaCl₂, 0,5% Тритон X-100 та 1 мМ β-меркаптоетанол) протягом 1–5 год при 37 °С в пробі об'ємом 150 мкл.

Реакцію зупиняли додаванням 1,5 мл ЕДТА (початкової концентрації 5 мМ).

Кількість виділеного при цьому АМК вимірювали на спектрофлуориметрі Signe-4M (виробництво Латвії) при довжині хвилі збудження 380 нм та випромінювання 460 нм.

Здатність досліджуваних сполучень інгібувати фурин вивчали в тому ж буфері, рН 7,2. Аликвоту ферменту зберігали протягом 5–20 мкл досліджуваного сполучення (початкова концентрація 100–600 мкМ) протягом 30 хв при кімнатній температурі. Далі додавали субстрат до кінцевої концентрації 100 або 200 мкМ та проводили реакцію протягом 1–5 год. Розщеплення флуорогенного субстрату зупиняли додаванням розчину ЕДТА, а кількість виділеного АМК визначали, як вказано вище. Значення I₅₀ обчислювали з використанням лінійних графіків залежності величини інгібування від концентрації досліджуваного речовини. При цьому за 100% приймали активність фурина, визначену в середі інкубації в відсутності зазначених сполучень. Величини K_i обчислювали з графіків Диксона та/або Еді-Хофста. Обробку результатів вимірювань та побудову графіків здійснювали за допомогою програм Origin 7.0 та 8.0 (OriginLab). Помилка експерименту не перевищувала 10% вимірюваної величини.

Результати та обговорення

Дослідження властивостей фурина може дати цінну інформацію не тільки для роз'яснення важливих теоретичних питань, пов'язаних з біологією клітки [2], але й для розв'язання ряду практичних проблем, направлених на створення нових лікарських засобів на основі синтетичних інгібіторів ферменту [1–3, 12, 13].

Виконуючи програму пошуку нових інгібіторів фурина, ми звернули увагу на низкомолекулярні сполучення нейтрального характеру, оскільки вивчення їх властивостей дозволить, як ми надіємося, виявити похідні з механізмом дії, відмінним від механізму дії сполучень протеїнової природи.

Враховуючи дані літератури [13, 18, 19], нашу увагу було звернено на флавоноїди та деякі природні сполучення, що містяться в рослинах. Зокреми ми вивчили ряд флавоноїдів (кверцетин, рутин, нарингін та др.), ізофлавоноів (генистеїн, дайдзеїн), еллагову кислоту, дибензофуранове похідне, знайдене в лишайниках, та микотоксин зеараленон. Їх формули представлені на рис. 1.

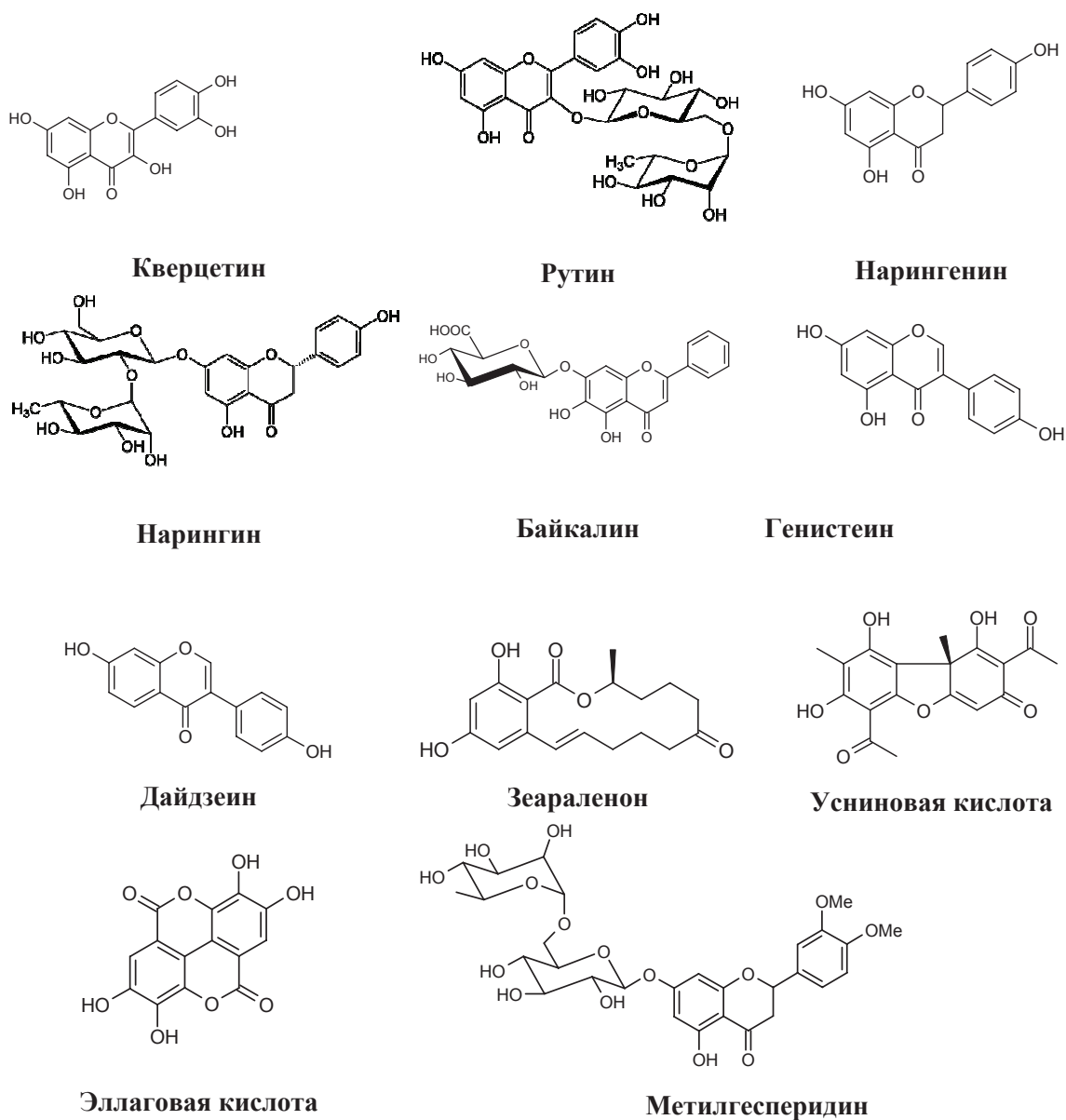


Рис. 1. Названия и химическое строение исследованных соединений

Прежде всего, был осуществлен скрининг этих соединений при их конечной концентрации 0,3 мг/мл. В табл. 1 представлены соответствующие данные.

Изучение влияния данных веществ на активность фурина показало, что при увеличении их концентрации происходит зависимое от дозы торможение активности энзима. Ингибирование исследуемой реакции наглядно демонстрирует рис. 2, на котором представлено постепенное нарастание интенсивности флуоресценции во время гидролиза флуорогенного субстрата Вос-Arg-Val-Arg-Arg-АМС фурином (кривые 1–5) и отсутствие характерной кривой

флуоресценции даже после 3 часов инкубации пробы с рутином (кривая 6).

Из данных, представленных на рис. 3 ясно, что рутин, несмотря на отсутствие в его молекуле положительного заряда, ингибирует фурин конкурентно. Можно предположить, что и другие исследованные флавоноиды (табл. 1), подобно соединениям, изученным в работах [13, 18], также являются конкурентными ингибиторами фурина, хотя для окончательного вывода требуются дополнительные исследования.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что негликозилированные биофла-

Таблиця 1. Інгибування фурина досліджуваними соединениями*

Исследуемый препарат	Интенсивность флуоресценции, усл. ед.	Ингибирование, %
Без ингибитора	7,52	—
Протаминсульфат	4,17	45
Кверцетин	Выпадает в осадок	
Рутин	3,68	51
Байкалин	3,39	55
Генистеин	Выпадает в осадок	
Нарингенин	Выпадает в осадок	
Нарингин	4,59	39
Дайдзеин	Выпадает в осадок	
Метилгесперидин	3,43	54
Зеараленон	7,35	2
Усниновая кислота	7,53	Не ингибирует
Эллаговая кислота	Выпадает в осадок	

*Примечание. Условия проведения реакции: содержание фурина в пробе 5 ед.; концентрация флуорогенного субстрата 100 мкМ; объем пробы 150 мкл; время предварительной инкубации исследуемого соединения (0,3 мг/мл) с фурином 30 мин при комнатной температуре; продолжительность энзиматической реакции 5 ч при рН 7,2 и температуре 37 °С

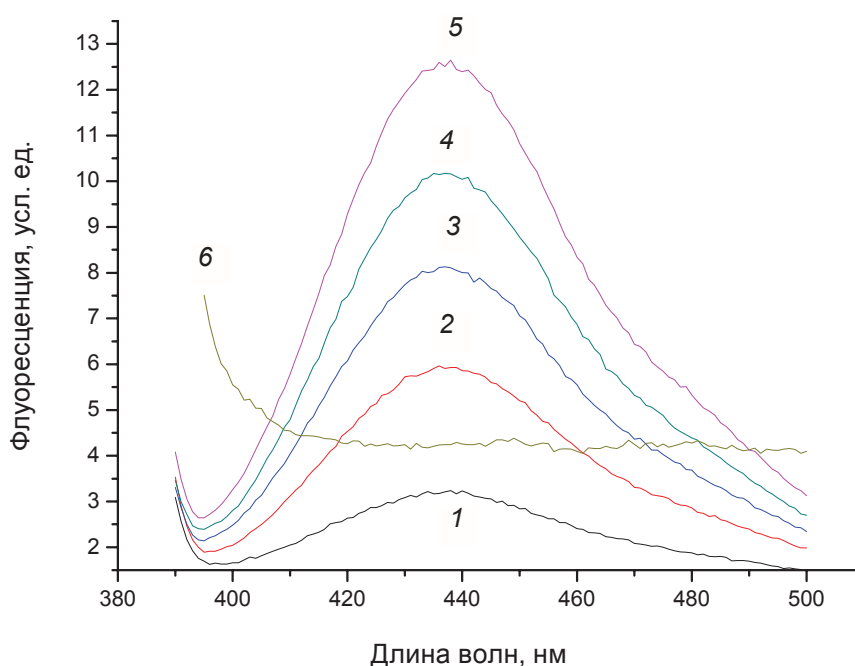


Рис. 2. Інтенсивність флуоресценції при гідролізі флуорогенного субстрата *Вос-Arg-Val-Arg-Arg-AMC* (100 мкМ) фурином (5 ед.) при рН 7,2 і $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$; время реакції: 1 – 30 мин; 2 – 1 час 15 мин; 3 – 2 ч; 4 – 3 ч; 5 – 5 ч; 6 – 3 ч в присутствіи рутіна

воноиды (кверцетин, нарингенин, дайдзеин и генистеин) плохо растворяются в буфере для проведения реакции с фурином. В условиях

эксперимента они выпадают в осадок, что препятствует определению величины их тормозящего действия.

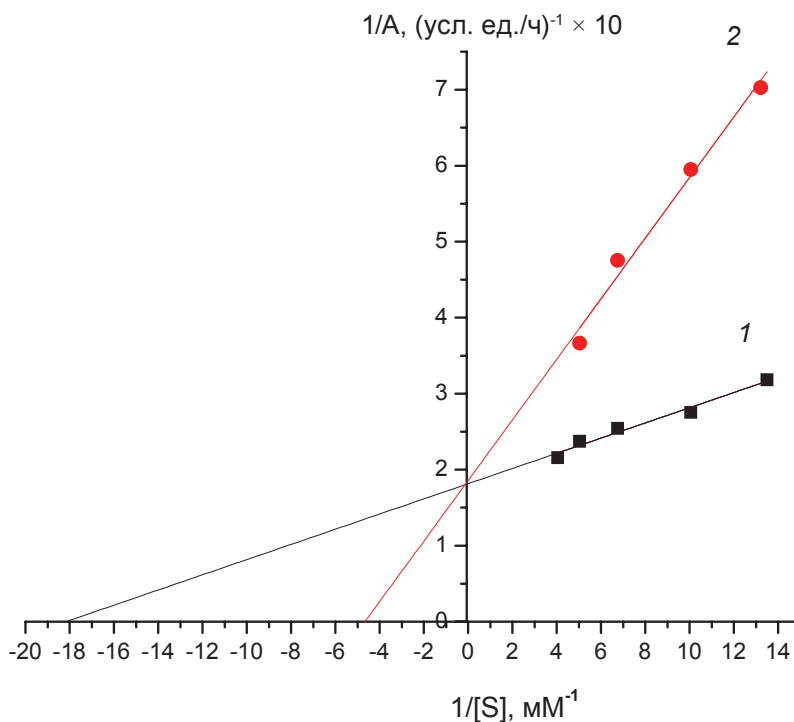


Рис. 3. График Лайнуивера-Бэрка конкурентного ингибирования рутином гидролиза флуорогенного субстрата *Вос-Arg-Val-Arg-Arg-AMC* (75–250 мкМ) фурином (5 ед) при рН 7,2 и $t = 37^\circ\text{C}$; 1 – в отсутствие рутина; 2 – в присутствии рутина (700 мкМ)

Растворимость кверцетина в воде возрастает, как известно, в щелочной среде, поэтому было проведено его тестирование при рН 9,0, хотя при этом значении рН активность энзима снижается более чем в 2 раза по сравнению с его активностью при оптимальных условиях. Оказалось, что при рН 9,0 кверцетин слабо, но отчетливо ингибирует фурин (примерно на 10%). Ранее на культуре клеток было обнаружено, что активность фурина уменьшается в присутствии некоторых природных полифенолов (и кверцетина в том числе), хотя в клетке это может протекать по разным механизмам. Наши эксперименты при рН 9,0 свидетельствуют о том, что кверцетин способен непосредственно взаимодействовать с фурином и влиять тем самым на его активность. Ингибиторную активность нарингенина, дайдзеина, генистеина, а также эллаговой кислоты в этих условиях определить, однако, не удалось, так как в буфере и при рН 9,0 эти вещества не растворяются.

Значения параметров ингибирования (K_i) соединений, указанных в табл. 1, определяли лишь для тех производных, которые в условиях предварительного эксперимента подавляли активность фурина не менее, чем на 40%. Это характерно для рутина, нарингина, байкалина

и метилгесперидина. Полученные значения K_i представлены в табл. 2. Процесс ингибирования фурина флавоноидами изучали, осуществляя инкубацию пробы энзима с исследуемыми соединениями при различной их концентрации. Последующее построение графиков Лайнуивера-Бэрка и/или Эди-Хофсти позволило установить, что, например, рутин ингибирует фурин конкурентно (рис. 3), а торможение нарингином носит смешанный характер (данные не приведены). Следует подчеркнуть, что при фиксированной концентрации ингибитора эффективность торможения ослабевает с увеличением концентрации субстрата. Например, нарингин (670 мкМ) ингибирует фурин на 65%

Таблица 2. Величины констант ингибирования фурина некоторыми из исследуемых соединений

Название соединения	Величина K_i , мкМ
Рутин	160
Нарингин	226
Байкалин	80
Метилгесперидин	150

при концентрації субстрата 75 мкМ, на 54% при концентрації субстрата 150 мкМ і всього лише на 25% при концентрації флуорогенного субстрата 200 мкМ.

Значення K_i вичисляли, як правило, по графікам, побудованим в координатах Діксона [20]. Предварительно определяли также величину K_m хромогенного субстрата в используемых нами условиях проведения ферментативной реакции (см. раздел Материалы и методы). Значение K_m получили равным 55 мкМ, что совпадает с величиной 51,6 – 57 мкМ, опубликованной в работе [21].

Принимая во внимание субстратную специфичность фурина, изучали также ингибиторный эффект протаминсульфата – протеина, молекула которого обогащена остатками положительно заряженного аргинина. Проведенная работа показывает, что протаминсульфат действительно способен ингибировать фурин.

Использованные нами флавоноиды проявляют умеренную ингибиторную активность и по сравнению с другими изученными нейтральными низкомолекулярными соединениями [18-19] являются более слабыми ингибиторами фурина. Исследование свойств непептидных ингибиторов может, однако, привести к созданию соединений, которые будут специфически взаимодействовать с активным или аллостерическим центром фермента, индуцируя в его молекуле определенные конформационные изменения, обуславливающие снижение активности фурина. Создание именно аллостерических ингибиторов ПК (в том числе и фурина) является, по мнению авторов работы [22], магистральным направлением поиска новых специфических ингибиторов указанных ферментов.

Итак, проведенная работа показала, что рутин, нарингин и некоторые другие гликозильированные флавоноиды, не имеющие в молекуле положительного заряда, способны взаимодействовать с фурином и ингибировать его конкурентно с величиной K_i , находящейся в пределах ~ 80–200 мкМ. Конкуренция исследованных соединений с субстратом свидетельствует о том, что флавоноиды непосредственно связываются с активным центром фермента. Хотя механизм такого взаимодействия пока не совсем ясен, можно предположить, что торможение обусловлено как гидрофобными взаимодействиями остова молекулы флавоноидов, так и образованием водородных связей между гидроксильными группами гликозильированного

фрагмента и остатками аминокислот активного центра фурина. В пользу этого предположения свидетельствует работа [13], в которой показано, что гликозилирование андрографолида обуславливает рост его ингибиторной активности. Различия в эффективности торможения фурина в исследованных соединениях зависят, по-видимому, от способа ориентации в пространстве их гликозидных группировок, обеспечивающих точную «подгонку» молекулы флавоноида к ферменту и ее наиболее продуктивное взаимодействие со связывающим центром фурина.

Авторы глубоко признательны проф. Смирновой И. В. за постоянный интерес к работе и за помощь в приобретении фурина и ряда других реагентов и препаратов.

НОВІ НЕПЕПТИДНІ ІНГІБІТОРИ ФУРИНУ

*В. К. Кібіреві¹, Т. В. Осадчук¹,
О. Б. Вадзюк², М. М. Гаразд¹*

¹Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України, Київ;

²Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: kibirev@bpci.kiev.ua

Споріднена субтилізину пропротейнконвертаза людини – фурин – є найважливішою фармацевтичною мішенню для створення відповідних інгібіторів, оскільки фермент відіграє життєво важливу роль у розвитку багатьох захворювань людини.

Для виявлення нового класу низкомолекулярних непептидних інгібіторів фурину здійснено скринінг низки флавоноїдів та деяких природних сполук. Знайдено, що глікозильовані флавоноїди: рутин, нарингін, байкалін та метилгесперидин інгібують фурин при рН 7,2 зворотно і конкурентно з $K_i \sim 80\text{--}200$ мкМ. Величини K_i визначали із графіків у координатах Діксона або Еді-Хофсті, використовуючи флуорогенний субстрат Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC. Хоча досліджувані флавоноїди виявляють лише помірну інгібіторну активність, вони можуть бути корисними для розробки більш потужних непептидних інгібіторів фурину в майбутньому.

Ключові слова: фурин, інгібітори фурину, флавоноїди, рутин, нарингін, байкалін, метилгесперидин.

NEW NON-PEPTIDE INHIBITORS OF FURIN

V. K. Kibirev¹, T. V. Osadchuk¹,
O. B. Vadzyuk², M. M. Garazd¹

¹Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry,
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

²Palladin Institute of Biochemistry, National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: kibirev@bpki.kiev.ua

Summary

Furin, a human subtilisin-related proprotein convertase, is the most important pharmaceutical target because it plays a vital role in development of numerous disease processes. To identify a new class of small non-peptide inhibitors of furin we performed a study of several flavonoids and some natural products. Glycosylated flavonoids: rutin, naringin, baicalin and methylhesperidin were shown to inhibit furin at pH 7.2 reversibly and competitively with $K_i \sim 80\text{--}200 \mu\text{M}$. The K_i values were derived from Dixon and/or Eadie-Hofstee plots using fluorogenic substrate Boc-Arg-Val-Arg-Arg-AMC. Although studied flavonoids display only a temperate furin inhibition, they may serve as a great potential for the future development of more potent non-peptide inhibitors against furin.

Key words: furin, inhibitors of furin, flavonoids, rutin, naringin, baicalin, methylhesperidin.

1. Nakayama K. // *Biochem J.* — 1997. — **327**, N 3. — P. 625–635.
2. Thomas G. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* — 2002. — **3**, N 10. — P. 753–766.
3. Кибирев В. К., Осадчук Т. В., Радавский Ю. Л. // *Укр. біохім. журн.* — 2007. — **79**, № 6. — С. 5–18.
4. Molloy S. S., Bresnahan P. A., Leppla S. H. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 23. — P. 16396–16402.
5. Klimpel K. R., Molloy S. S., Thomas G., Leppla S. H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1992. — **89**, N 21. — P. 10277–10281.
6. Tsuneoka M., Nakayama K., Hatsuzawa K. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1993. — **268**, N 35. — P. 26461–26465.
7. Volchkov V. E., Feldmann H., Volchkova V. A. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1998. — **95**, N 10. — P. 5762–5767.
8. Hallenberger S., Bosch V., Angliker H. et al. // *Nature.* — 1992. — **360**, N 6402. — P. 358–361.
9. Walker J. A., Molloy S. S., Thomas G. et al. // *J. Virol.* — 1994. — **68**, N 2. — P. 1213–1218.
10. Khatib A.-M., Siegfried G., Chrétien M. et al. // *Amer. J. Pathol.* — 2002. — **160**, N 6. — P. 1921–1935.
11. Bergeron F., Leduc R., Day R. // *J. Mol. Endocrin.* — 2000. — **24**, N 1. — P. 1–22.
12. Basak A. // *J. Mol. Med.* — 2005. — **83**, N 11. — P. 844–855.
13. Basak A., Cooper S., Roberge A. G. et al. // *Biochem. J.* — 1999. — **338**, N 1. — P. 107–113.
14. Podsiadlo P., Komiyama T., Fuller R. S., Blum O. // *J. Biol. Chem.* — 2004. — **279**, N 35. — P. 36219–36227.
15. Jiao G.-S., Cregar L., Wang J. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — **103**, N 52. — P. 19707–19712.
16. Worachartcheewan A., Nantasenamat C., Naenna T. et al. // *Europ. J. Med. Chem.* — 2008. — **44**, N 4. — P. 1664–1673.
17. Hosaka M., Nagahama M., Kim W.-S. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1991. — **266**, N 19. — P. 12127–12130.
18. Komiyama T., Coppola J. M., Larsen M. J. et al. // *Ibid.* — 2009. — **284**, N 23. — P. 15729–15738.
19. Coppola J. M., Hamilton C. A., Bhojani M. S. et al. // *Analyt. Biochem.* — 2007. — **364**, N 1. — P. 19–29.
20. Dixon M. // *Biochem. J.* — 1953. — **55**, N 1. — P. 170–171.
21. Hatsuzawa K., Nagahama M., Takahashi S. et al. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, N 23. — P. 16094–16099.
22. Fugère M., Day R. // *TRENDS Pharmacol. Sci.* — 2005. — **26**, N 6. — P. 294–301.

Получено 11.12.2009