

УДК 577.113.6, 577.151.4

ИЗУЧЕНИЕ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ РЕКОМБИНАНТНОЙ β -ЛАКТАМАЗЫ КЛАССА А ТЕМ-1 И ЕЕ ИНГИБИРОВАНИЯ СУЛЬБАКТАМОМ, ТАЗОБАКТАМОМ И КЛАВУЛАНОВОЙ КИСЛОТОЙ

А.М. Луговая, В.Г. Григоренко

(кафедра химической энзимологии; e-mail: luhannam@gmail.com)

Изучен гомогенный препарат рекомбинантного фермента β -лактамазы ТЕМ-1 класса А, используемый в различных экспрессионных конструкциях в качестве гена-маркера для обеспечения устойчивости клеток к ампициллину; определены его кинетические параметры с использованием хромогенного субстрата СЕНТА ($K_M = 22$ мкМ, $V = 0,39$ мкМ/с, $k_{кат} = 31,2$ с⁻¹, $k_{кат}/K_M = 1,4$ мкМ⁻¹·с⁻¹). На основании сравнения определенного в работе значения K_M с литературными данными для нативного фермента ($K_M = 70$ мкМ) показано, что рекомбинантный фермент в 3 раза более специфичен по отношению к субстрату СЕНТА. Установлен конкурентный тип ингибирования рекомбинантной β -лактамазы для сульбактама, тазобактама, клавулановой кислоты. Впервые определены значения констант ингибирования по субстрату СЕНТА для сульбактама, тазобактама и клавулановой кислоты ($K_I(сульбактам) = 0,43$ мкМ, $K_I(тазобактам) = 0,041$ мкМ, $K_I(клавулановая кислота) = 0,046$ мкМ). Показано, что наиболее эффективными ингибиторами для рекомбинантной β -лактамазы являются тазобактам и клавулановая кислота, причем их ингибирующее действие можно считать одинаковым.

Ключевые слова: рекомбинантная β -лактамаза ТЕМ-1, СЕНТА, кинетические параметры, сульбактам, тазобактам, клавулановая кислота, конкурентный тип ингибирования.

Основным фактором, ограничивающим клиническую эффективность антибактериальных препаратов, является способность микроорганизмов вырабатывать устойчивость к их действию. Этот биологический феномен называется антибиотикорезистентностью. Известно несколько механизмов резистентности микроорганизмов к пенициллинам и цефалоспорином, охватывающим более половины всех используемых в настоящее время антибиотиков, однако основным из них является гидролиз антибиотика ферментами β -лактамазами, образующимися в клеточной стенке. β -лактамазы разрушают β -лактамное кольцо, в результате чего антибиотик теряет свою антимикробную активность [1]. Детальное исследование механизмов каталитической активности β -лактамаз позволяет выявить их важнейшие функциональные особенности и является обязательным для описания новых ферментов и изучения их роли в формировании резистентности [2].

Расщепление β -лактамных антибиотиков в растворе обычно сопровождается снижением его оптической плотности в ультрафиолетовом диапазоне, поэтому для

определения активности β -лактамаз наиболее удобен метод спектрофотометрии [2]. Использование хромогенных субстратов (СЕНТА, нитроцефин, цефалоспорины, цефалотин и др.) позволяет работать в видимом диапазоне.

Впервые субстрат СЕНТА был испытан в работе [3] как субстрат для ТЕМ-1 и некоторых других β -лактамаз. Клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам – вещества, эффективно инактивирующие β -лактамазы и не обладающие антибактериальной активностью сами по себе. Они используются в комплексах с антибиотиками. Одним из первых примеров такой комбинации является лекарственное средство “Аугментин”, представляющее смесь клавулановой кислоты и амоксициллина.

В настоящее время в литературе отсутствуют сведения о константах ингибирования для сульбактама, тазобактама и клавулановой кислоты, измеренных при использовании субстрата СЕНТА.

Цель настоящего исследования – изучение каталитических свойств рекомбинантной β -лактамазы ТЕМ-1 класса А, определение типа ингибирования

сульбактамом, тазобактамом, клавулановой кислотой и соответствующих значений констант ингибирования (K_I); анализ полученных результатов и их сравнение с литературными данными для нативного фермента TEM-1.

Методы

Измерение активности рекомбинантной β -лактамазы

Активность β -лактамазы по субстрату CENTA определяли на спектрофотометре "UV-1602" ("Shimadzu", Япония) при 25°C. Образование хромогенного продукта детектировали при длине волны 405 нм ($\Delta\varepsilon_{405} = 6400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Измерение активности проводили в 50 мМ Na-фосфатном буферном растворе (рН 7,0).

В работе использовали препарат рекомбинантного фермента β -лактамазы (гомогенный по электрофорезу), полученный ранее в лаборатории инженерной энзимологии кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Определение K_M , V и $k_{\text{кат}}$

Раствор субстрата β -лактамазы CENTA (5 мМ в 50 мМ Na-фосфатном буфере; рН 7,0) и аликвоту фермента (10 мкл; 1,2 мкМ) добавляли к 50 мМ натрий-фосфатному буферному раствору (рН 7,0). Общий объем смеси составлял 1 мл. Измерения проводили при начальной концентрации CENTA, равной 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500 мкМ. Значения кинетических параметров (K_M – константа Михаэлиса, V – максимальная скорость реакции) определяли по графикам, где экспериментальные данные представлены в координатах Лайнуивера–Берка и в прямых координатах. Значения начальных скоростей ферментативной реакции определяли по начальному линейному участку кинетической кривой накопления продукта при проведении реакции гидролиза ($k_{\text{кат}} = V/[E_0]$), где $k_{\text{кат}}$ – каталитическая константа скорости реакции, $[E_0]$ – начальная концентрация фермента [4, 5].

Определение K_I

Концентрированные растворы ингибиторов (5 мМ) получали растворением определенной навески реагента в 50 мМ буферном растворе фосфата Na (рН 7,0). Раствор CENTA (5 мМ в 50 мМ Na-фосфатном буфере при рН 7,0), раствор ингибитора и аликвоту фермента (10 мкл) добавляли к 50 мМ Na-фосфатному

буферному раствору (рН 7,0). Общий объем смеси 1 мл. Измерения проводили при начальной концентрации CENTA, равной 10, 20, 30, 50, 100, 150, 200 мкМ. Начальную концентрацию ингибитора подбирали в зависимости от силы ингибирования; для сульбактама она составила 0, 10, 20, 50 мкМ, для клавулановой кислоты – 0; 0,07; 0,15; 0,25; 0,6; 0,8 мкМ, для тазобактама – 0; 0,03; 0,06; 0,2; 0,6 мкМ.

Константы ингибирования определяли по графику, на котором экспериментальные данные представлены в координатах ($K_{M, \text{каж}}$, $[I]$), где $K_{M, \text{каж}}$ – кажущаяся (эффективная) константа Михаэлиса, $[I]$ – концентрация ингибитора [5]. Каждое измерение активности проводили трижды.

Обработка и представление результатов экспериментов

При расчете использовали свободно распространяемое программное обеспечение на операционной системе "Линукс"; пакет прикладных программ (текстовые, табличные, графические) "Open Office 3.01".

Результаты и их обсуждение

На рис. 1, а приведен график зависимости начальной скорости реакции (мкМ/с) от концентрации субстрата. На 1, б представлена данная зависимость в координатах Лайнуивера–Берка.

Как упоминалось выше, расщепление β -лактамных антибиотиков в растворе обычно сопровождается снижением оптической плотности в ультрафиолетовом диапазоне, что позволяет спектрофотометрически определять активность β -лактамаз [2]. Использование хромогенных субстратов (CENTA, нитроцефин, цефалоспорины, цефалотин и др.) позволяет работать в видимом диапазоне. Впервые субстрат CENTA был испытан в работе [3] как субстрат для TEM-1 и некоторых других β -лактамаз. В настоящей работе были получены следующие значения кинетических параметров для рекомбинантной β -лактамазы: $K_M = 22 \text{ мкМ}$, $V = 0,39 \text{ мкМ/с}$, $k_{\text{кат}} = 31,2 \text{ с}^{-1}$, $k_{\text{кат}}/K_M = 1,4 \text{ мкМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

Измеренная величина K_M для рекомбинантной β -лактамазы по синтетическому хромогенному субстрату CENTA составляет 22 мкМ, что в 3,2 раза ниже значения, приведенного в работе [3]; значение $k_{\text{кат}}/K_M = 1,4$, что близко к значению отношения для нативного фермента, что позволяет говорить об их схожей каталитической эффективности для субстрата CENTA. Численные расхождения в значениях констант Михаэлиса можно объяснить ами-

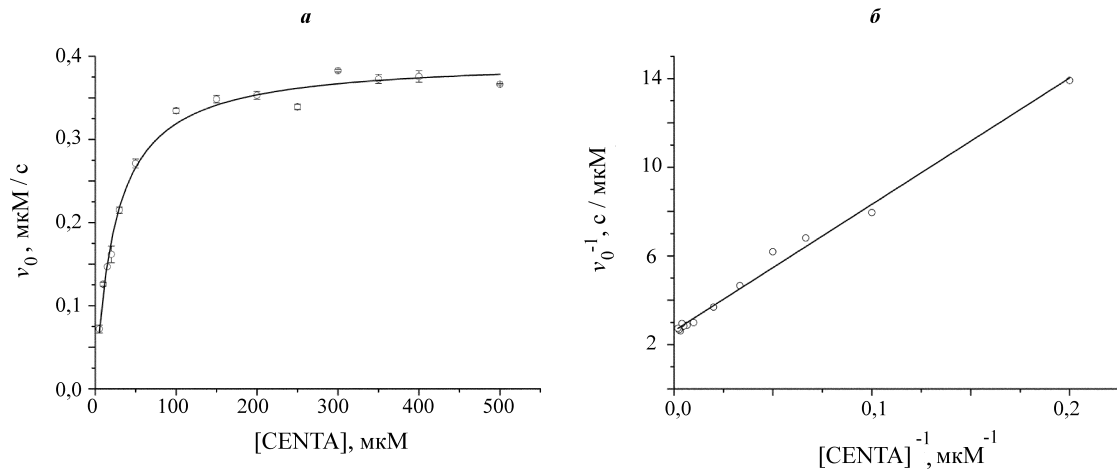


Рис. 1. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза субстрата β -лактамазы (мкМ/с) от концентрации субстрата (а), зависимость начальной скорости реакции гидролиза субстрата β -лактамазы CENTA (мкМ/с) от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера–Берка ($1/v_0, 1/[S_0]$), где v_0 – начальная скорость реакции; $[S_0]$ – начальная концентрация субстрата (б)

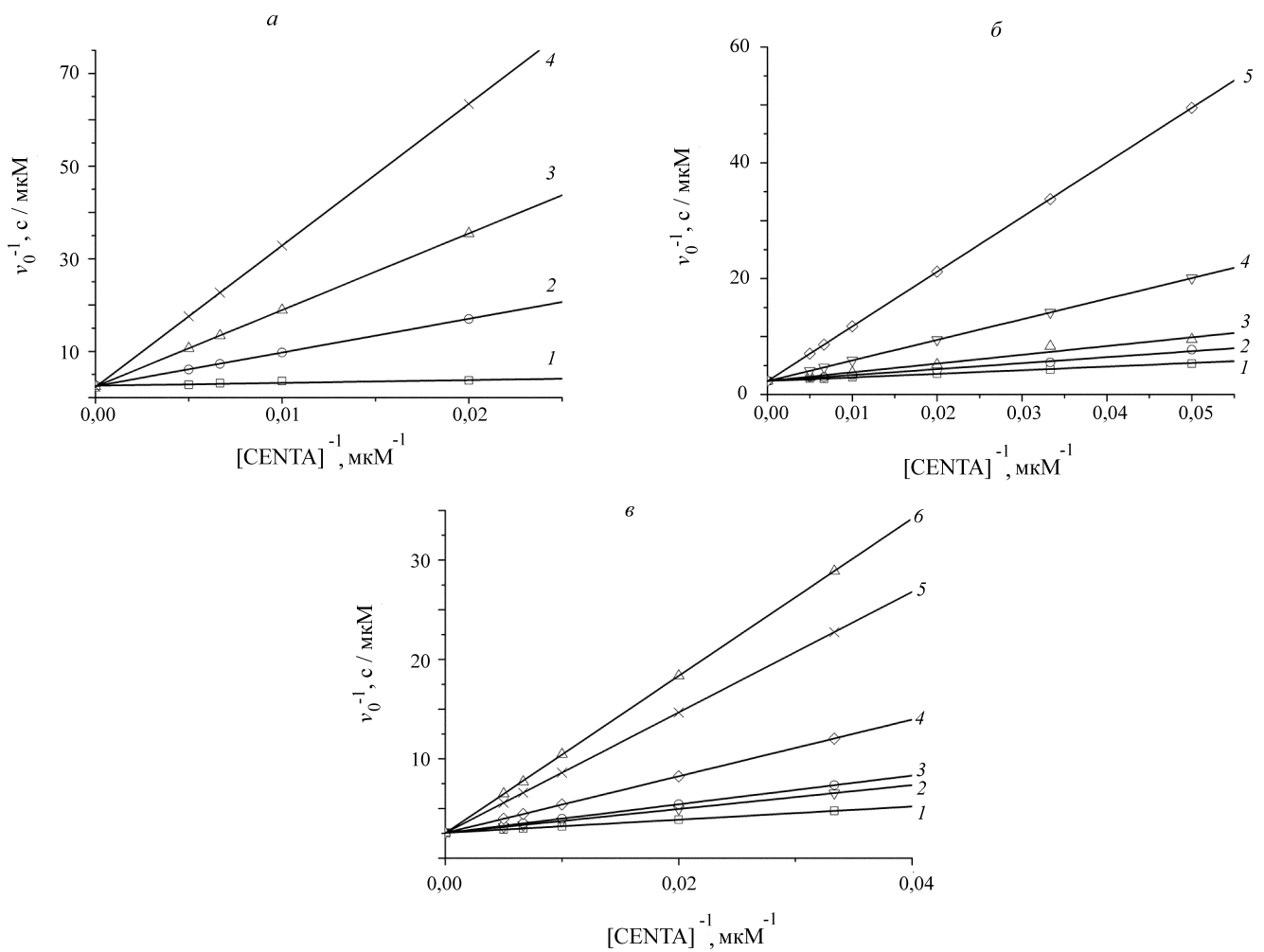


Рис. 2. Зависимость начальной скорости реакции гидролиза субстрата β -лактамазы CENTA (мкМ/с) от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера–Берка ($1/v_0, 1/[S_0]$) при разных концентрациях ингибитора (мкМ): а – сульбактама (1 – 0; 2 – 10; 3 – 30; 4 – 50); б – тазобактама (1 – 0; 2 – 0,03; 3 – 0,06; 4 – 0,20; 5 – 0,60); в – клавулановой кислоты (1 – 0; 2 – 0,07; 3 – 0,15; 4 – 0,25; 5 – 0,60; 6 – 0,80)

нокислотным полиморфизмом в первичной структуре β -лактамазы TEM-1. Так, в нашем случае в положении 82 находится Val, а по информации банка данных – Ile. Возможны также влияния различных посттрансляционных модификаций.

Анализ результатов, представленных на рис. 2, а, б, в позволяет говорить о конкурентном ингибировании для рекомбинантной β -лактамазы сульбактамом, тазобактамом и клавулановой кислотой. Данный факт отражает структурное сходство трех изученных ингибиторов с гидролизуемыми субстратами β -лактаманых антибиотиков (пенициллины и цефалоспорины). Рассчитанные по экспериментальным данным константы ингибирования составляют 0,43; 0,041 и

0,046 мкМ для сульбактама, тазобактама и клавулановой кислоты соответственно. Опубликованные значения констант ингибирования для TEM-1 составляют (мкМ) 0,45 (субстрат–пенициллин) для сульбактама [6]; 0,014 (субстрат–нитроцефин) для тазобактама [7], 0,07 (субстрат–пенициллин) для клавулановой кислоты [6].

Полученные и литературные значения констант ингибирования совпадают по порядку величины. Для рекомбинантной β -лактамазы самыми эффективными ингибиторами являются тазобактам и клавулановая кислота как обладающие наименьшими значениями K_I , причем значения констант ингибирования практически совпадают.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП “Национальная технологическая база” на 2007–2011 годы (контракт ГП/07/442/НТБ/К).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fink A.L. // *Pharmaceutical Research*. 1985. 2. N 2. P. 55.
2. Эйдельштейн М.В. // *Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия*. 2001. 3. № 3. С. 223.
3. Vebro C., Moali C., Mahy F. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. 45. N 6. P. 1868.
4. Корниш-Боуден Э. *Основы ферментативной кинетики*. М., 1979. С. 36, 80.
5. Березин И.В., Мартинек К. *Основы физической химии ферментативного катализа*. М., 1977. С. 216.
6. Delaire M., Labia R., Samama J.-P., Masson J.-M. // *J. Biol. Chem.* 1992. 267. N 29. P. 20600.
7. Caporale B., Franceschini N., Perilli M. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. 48. N 9. P. 3579.

Поступила в редакцию 20.01.10

STUDY OF CATALYTIC PROPERTIES OF RECOMBINANT CLASS A TEM-1 β -LACTAMASE AND ITS INHIBITION BY SULBACTAM, TAZOBACTAM AND CLAVULANIC ACID

A.M. Luhavaya, V.G. Grigorenko

(Division of Chemical Enzymology)

In this work was studied homogeneous preparation of recombinant class A TEM-1 β -lactamase; kinetic parameters obtained with chromogenic substrate CENTA are as follows: $K_M = 22 \mu\text{M}$, $V = 0,39 \mu\text{M/s}$, $k_{cat} = 31,2 \text{ s}^{-1}$, $k_{cat}/K_M = 1,4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Based on the comparison of determined Michaelis constant ($K_M = 22 \mu\text{M}$) with literature data it is approved that recombinant enzyme is about 3 times more specific against CENTA than the native one ($K_M = 70 \mu\text{M}$). It was ascertained competitive type of inhibition for sulbactam, tazobactam and clavulanic acid. For the first time the inhibition constants for recombinant β -lactamase TEM-1 with CENTA as a substrate for sulbactam, tazobactam, clavulanic acid ($K_{I(\text{sulbactam})} = 0,43 \mu\text{M}$, $K_{I(\text{tazobactam})} = 0,041 \mu\text{M}$, $K_{I(\text{clavulanic acid})} = 0,046 \mu\text{M}$) have been determined. It was shown that tazobactam and clavulanic acid are the most effective inhibitors for the recombinant β -lactamase as having the least value of K_I and their inactivation influence can be accepted as identical.

Key words: recombinant β -lactamase TEM-1, CENTA, kinetic parameters, sulbactam, tazobactam, clavulanic acid, competitive type of inhibition.

Сведения об авторах: Луговая Анна Михайловна – студентка 4 курса кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (luhannam@gmail.com); Григоренко Виталий Георгиевич – науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (vitaly.grigorenko@gmail.com).