

Аннотация

Осуществлено исследование кинетики мембранного фермента PGHS в водно-мицеллярной среде. Учтено распределение субстратов между водной и мицеллярной фазами, получены истинные значения констант Михаэлиса для арахидоновой кислоты и для растворенного кислорода как для мицеллярной, так и водной фаз, оценены значения коэффициента распределения арахидоновой кислоты между гидрофобной фазой и активным центром PGHS и коэффициента распределения арахидоновой кислоты между мицеллярной и водной фазами. На примере ингибитора напроксена показано, что изменение содержания мицеллярной фазы влияет на параметры ингибирования вследствие распределения ингибитора между водной и мицеллярной фазами. Построены теоретические модели ингибирования простагландин-Н-синтазы с учётом кооперативности, многосубстратности, инактивации и бифункциональности фермента. Проведено углубленное исследование кинетических механизмов взаимодействия различных ингибиторов с PGHS с учетом их влияния на инактивацию фермента в процессе реакции. Показано, что все исследованные ингибиторы являются обратимыми, определены равновесные и кинетические константы. Выявлены ингибиторы, способные взаимодействовать с радикалом $Tyr385$ в активном центре фермента. Обнаруженный и исследованный нами ранее кооперативный эффект для ингибитора напроксена нашел свое подтверждение при моделировании с использованием молекулярной динамики. Исследован обнаруженный нами парадоксальный эффект повышения предельного выхода продукта циклооксигеназной реакции на фоне уменьшения начальной скорости в присутствии напроксена, ибупрофена, фенпрофена и толметина. Для других исследованных ингибиторов (индометацин, диклофенак, кеторолак, флурбипрофен, кетопрофен) такой эффект не наблюдается. Проработана гипотеза существования пар синергичных ингибиторов, усиливающих сродство друг друга к ферменту, определены кандидаты в такие ингибиторы для PGHS-1. Продемонстрировано влияние присутствия ингибитора циклооксигеназной реакции на интегральную кинетику катализируемой PGHS-1 пероксидазной реакции (повышение предельного выхода продукта реакции на фоне отсутствия влияния на начальную скорость). Разработана методика поиска потенциальных ингибиторов PGHS методом докинга. Проведён докинг веществ из базы данных ACB Blocks (6150 соединений) с помощью программы SOL. 9 соединений, показавших потенциально наибольшее сродство с PGHS, проверены экспериментально с PGHS-1 из везикулярных желез барана. Для 3 из них ингибирующее действие подтверждено. Все они оказались «быстрыми» и обратимыми ингибиторами. Отработанная процедура поиска новых ингибиторов *in silico* была автоматизирована: определены важные для проведения докинга наиболее подвижные аминокислотные остатки в активном центре фермента, создана и размещена в свободном доступе в интернете программа PDBParser для упрощения подготовки структур к докингу и для анализа результатов докинга. Проведён докинг выборки размером 136 000 веществ из базы ZINC с помощью программы Autodock Vina, в результате чего были отобраны 300 новых потенциальных ингибиторов. Также по результатам докинга осуществлена кластеризация выборки из 31 ингибитора на основании типов взаимодействий с активным центром фермента. Показано, что полученная классификация ингибиторов коррелирует с классификацией по кинетическим свойствам (изменение предельного выхода продукта реакции, кооперативность, скорость связывания фермента с ингибитором).

Результаты, полученные в 2016-2018 гг.

(в скобках – ссылки на файл с приложением)

1) Теоретические модели ингибирования простагландин-Н-синтазы с учётом бифункциональности, многосубстратности, инактивации в ходе реакций, взаимодействия субъединиц димерного белка

Фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS) обладает следующими особенностями:

- структурный гомодимер
- бифункциональность (катализ 2 последовательных реакций – циклооксигеназной и пероксидазной)
- многосубстратность (по 2 субстрата в каждой реакции)
- необратимая инактивация во время протекания обеих реакций

Для правильной обработки экспериментальных данных необходимо использовать теоретические модели, учитывающие перечисленные свойства.

В настоящей работе построена теоретическая модель обратимого взаимодействия ингибитора с активными центрами гомодимерного фермента с учетом возможного кооперативного взаимодействия активных центров фермента (рис. 1а). В отсутствие кооперативных взаимодействий (при равенстве соответствующих кинетических констант) кооперативная модель переходит в простейшую одностадийную модель обратимого взаимодействия ингибитора с активным центром мономера (рис. 1б).

В рамках модели получено математическое решение, удобное для описания кинетических экспериментов по ассоциации (когда в реакцию систему добавляют ингибитор и фермент в свободной от ингибитора форме) и диссоциации (заранее смешивают ингибитор и фермент, инкубируют их в течение времени, достаточного для установления в системе равновесного состояния, после чего быстро разбавляют полученную смесь в реакционной системе) фермент-ингибиторных комплексов, а также для равновесных условий взаимодействия фермента с ингибитором.

Ранее было известно, что в случае отрицательной кооперативности ($K_2 \gg K_1$) порождаемые кооперативной моделью кинетические закономерности в состоянии равновесия с высокой точностью описываются гетерогенной моделью (предполагающей наличие двух форм фермента, связывающихся с ингибитором по простейшей модели с константами ингибирования $K_\alpha = K_1/2$, $K_\beta = 2 \cdot K_2$). В данном проекте было продемонстрировано, что при отрицательной кооперативности гетерогенная модель также хорошо описывает и кинетику взаимодействия ингибитора с ферментом для кооперативной модели. Выведены в общем виде соответствующие численные соотношения между кинетическими константами скорости для кооперативной и гетерогенной моделей (рис. 2).

Для установления каталитического механизма PGHS применили обобщённую двумерную схему одновременного протекания реакций, катализируемых бифункциональным ферментом (рис. 3). Из анализа экспериментальных зависимостей скорости реакции от концентрации субстратов сделали вывод о необратимости некоторых стадий. С учётом иерархии скоростей пероксидазной и циклооксигеназной реакций, двумерная схема упрощается до одномерной, из которой вывели уравнение зависимости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты, кислорода и донора электронов, а также от констант элементарных стадий обеих реакций.

Точность применения равновесного приближения была рассмотрена для общей схемы произвольных многомаршрутных кинетических механизмов.

При расчёте параметров инактивации PGHS возникает проблема разделения причин снижения скорости реакции: вследствие инактивации и (или) вследствие расходования субстрата. На примере общего механизма неразветвленной многосубстратной ферментативной реакции, интермедиаты которой могут подвергаться необратимой инактивации (рис. 4), рассмотрены случаи для различных соотношений характерных времён расходования субстрата и накопления инактивированных форм фермента: а) фермент полностью инактивируется в отсутствие существенного расходования субстрата, последним в ходе реакции можно пренебречь; б) субстрат полностью израсходуется без существенной инактивации фермента, ею в ходе реакции можно пренебречь; в) скорость ферментативной реакции снижается как вследствие инактивации, так и по причине снижения концентрации субстрата.

Используя теорему Тихонова, метод графов и понятия связности интермедиатов, в данной работе вывели и проанализировали уравнения скорости расходования субстрата и инактивации форм фермента в ходе реакции.

Вышеприведенный случай а) позволяет из получаемых экспоненциальных зависимостей находить начальную скорость реакции, константу скорости инактивации фермента в процессе реакции и предельный выход продукта реакции. Случай б) для михаэлисовых ферментов позволяет с помощью преобразований Уокера-Шмидта получать максимальную скорость и константу Михаэлиса, промежуточного случая в) экспериментаторы предпочитали избегать. В настоящей работе, с учетом кинетической иерархии каталитических и инактивационных процессов (для ферментов, число оборотов которых существенно превышает 1), предложен и апробирован (для PGHS) способ преобразования в случае в) интегральных кривых (с учетом знания заранее определенной зависимости скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата) с получением непрерывной зависимости константы скорости инактивации фермента в процессе реакции от концентрации субстрата. Метод применим также для случая одновременного изменения текущих концентраций нескольких субстратов (продуктов) многосубстратной ферментативной реакции.

При расчёте параметров инактивации фермента в ходе реакции необходимо учитывать взаимодействие с ингибитором при его наличии в реакционной системе. Рассмотрели теоретическую схему ингибирования на фоне инактивации в случае как 1-стадийного медленного ингибирования, так и 2-стадийного ингибирования с быстрой и медленной стадиями (рис. 5). В общем случае, зависимость продукта реакции от времени представляет собой сумму двух экспонент с различными показателями, однако если пренебречь обратимостью медленной стадии, то сумма экспонент переходит в одну экспоненту, и из интегральной кривой можно определить наблюдаемую константу скорости инактивации (рис. 6).

2) Анализ кинетического механизма ингибирования PGHS-1 для ингибиторов ибупрофена, индометацина, диклофенака, кеторолака, флурбипрофена, кетопрофена, фенопрофена и толметина

Для исследования использовали фермент PGHS-1 из везикулярных желёз барана. Циклооксигеназную реакцию детектировали по изменению концентрации растворённого кислорода.

Исследована кинетика взаимодействия ингибиторов с ферментом в режимах ассоциации и диссоциации, а также в условиях равновесия. Показано, что исследуемые ингибиторы полностью обратимы (примеры на рис. 7, 8). Получены экспериментальные зависимости относительной активности от времени инкубации фермента с различными ингибиторами (примеры на рис. 9) и от концентрации ингибиторов в равновесных условиях (примеры на рис. 10, 11).

Существенная разница в значениях кинетических констант скорости фермент-ингибиторного взаимодействия позволяет рассматривать ингибиторы как быстрые или как медленные. Для таких медленных ингибиторов, как диклофенак, кеторолак, флурбипрофен, кетопрофен и толметин, показано, что кинетику взаимодействия фермента с ингибитором можно адекватно исследовать путем детектирования скорости циклооксигеназной реакции после ее инициирования арахидоновой кислотой. Для ибупрофена и фенопрофена такой подход не применим, поскольку для ибупрофена показано существенное влияние концентрации арахидоновой кислоты на вид зависимости скорости реакции от времени инкубации (рис. 12), а в случае фенопрофена характерное время взаимодействия фермента с ингибитором сравнимо со временем отклика прибора (рис. 8), поэтому для данных ингибиторов анализировали кинетику взаимодействия с ферментом с соответствующей поправкой.

Для ингибитора индометацина подтверждено наличие быстрой обратимой стадии, проявляющейся при инициации реакции ферментом (рис. 13), а также медленной стадии, проявляющейся при инициации реакции арахидоновой кислотой после инкубации с ингибитором (рис. 9, 12). Таким образом, взаимодействие фермента с индометацином описывается двухстадийной схемой ингибирования. При инициации реакции ферментом индометацин проявляет себя как конкурентный ингибитор, а при инициации субстратом после прединкубации фермента с ингибитором и достижения равновесия - как неконкурентный (рис. 14).

Полученные кинетические константы приведены в табл. 1 (для наглядности туда включены и полученные ранее данные для напроксена, описываемые кооперативной моделью) и табл. 2. Структурные формулы исследованных ингибиторов приведены в табл. 3. Данные по диклофенаку, кеторолаку, флурбипрофену, кетопрофену и фенопрофену описываются простой одностадийной моделью. Для ибупрофена и толметина показано, что взаимодействие с ферментом описывается кооперативной моделью, учитывающей взаимодействие между активными центрами (рис. 11).

3) Описание кинетики взаимодействия фермента с кооперативным ингибитором напроксеном

Для ингибитора напроксена ранее нами было продемонстрировано наличие кооперативности при связывании с PGHS. В этом проекте мы показали, что полученные экспериментальные зависимости одинаково хорошо описываются как кооперативной, так и гетерогенной моделью (рис. 15). Также с помощью критерия Фишера (F-тест) было подтверждено, что и кооперативная, и гетерогенная модели описывают взаимодействие фермента с напроксеном принципиально лучше, чем простая одностадийная модель.

Для исследования влияния наличия мицеллярной фазы на взаимодействие фермента с напроксеном было проведено исследование кинетики PGHS-1 в системе водный буферный раствор – мицеллы твина-20. Также было исследовано влияние изменения содержания детергента (твина-20) на эффективность ингибирования напроксеном циклооксигеназной реакции (остаточную активность при достижении равновесия), а также на скорость связывания фермента с напроксеном в рамках исследования распределения арахидоновой кислоты между фазами и влияния детергента на кинетику

циклооксигеназной и пероксидазной реакций. Было показано, что изменение содержания мицеллярной фазы влияет на эффективность ингибирования напроксеном в равновесных условиях (рис. 16). Эти факты можно интерпретировать, как снижение эффективной концентрации ингибитора при повышении содержания мицеллярной фазы вследствие его разбавления из-за большей растворимости в мицеллярной фазе, чем в водной. Разработанный нами подход даёт возможность получить истинные значения кинетических параметров, не зависящие от содержания мицеллярной фазы. Для взаимодействия фермента с напроксеном истинные значения параметров представлены в табл. 4.

4) Экспериментальная проверка влияния бифункциональности, многосубстратности, инактивации в ходе реакций, взаимодействия субъединиц димерного белка при ингибировании PGHS

Обнаружено, что все ключевые особенности фермента PGHS (бифункциональность, многосубстратность, димерная структура, инактивация в ходе реакции) проявляются и при исследовании взаимодействия ингибиторов с ферментом.

Было исследовано влияние присутствия ингибиторов на интегральную кинетику циклооксигеназной реакции. Добавление в реакционную смесь напроксена, ибупрофена, фенпрофена, толметина предсказуемо уменьшает наблюдаемую константу скорости инактивации и на первый взгляд парадоксальным образом увеличивает предельный выход продукта реакции (рис. 17, 18). Хорошо доказано, что все ингибиторы циклооксигеназной активности PGHS связываются в циклооксигеназном активном сайте, поэтому подобный эффект может быть объяснен лишь кооперативными взаимодействиями субъединиц в составе димера, вызывающими уменьшение константы скорости инактивации в процессе реакции для субъединицы в составе димера, вторая субъединица которого занята ингибитором.

Добавление флурбипрофена уменьшает наблюдаемую константу скорости инактивации и не изменяет предельный выход продукта реакции (рис. 17). Добавление кеторолака, диклофенака, кетопрофена уменьшает как наблюдаемую константу скорости инактивации, так и предельный выход продукта реакции (рис. 17, 19). Добавление индометацина увеличивает наблюдаемую константу скорости инактивации при инициации реакции ферментом и уменьшает её при инициации реакции субстратом (рис. 20), и в обоих случаях предельный выход продукта реакции не увеличивается при добавлении ингибитора. Если эти свойства заложить в основу классификации, то она совпадёт с классификацией на основании типов взаимодействий в активном центре белка (см. п. 6).

Также исследовано влияние наличия донора электронов (субстрата пероксидазной реакции) на протекание циклооксигеназной реакции в присутствии ингибитора напроксена (рис. 21). В случае ферроцианида калия и адреналина наблюдается эффект вызванного присутствием напроксена повышения предельного выхода продукта реакции. В то же время, в отсутствие донора электронов данный эффект менее выражен. На примере напроксена было показано, как добавление ингибитора циклооксигеназной реакции влияет на протекание пероксидазной реакции (рис. 22). Видно, что присутствие напроксена повышает предельный выход продукта пероксидазной реакции при отсутствии влияния на начальную скорость, то есть уменьшает константу скорости инактивации в процессе реакции. Эффект воспроизводится не только для перекиси водорода, но и для других субстратов пероксидазной реакции (перекиси третбутила, данные не представлены).

5) Поиск новых ингибиторов простагландин-Н-синтазы методом докинга, проверка *in vitro*. Автоматизация процесса поиска

Задача поиска новых ингибиторов циклооксигеназной активности фермента простагландин-Н-синтазы в настоящее время остаётся очень актуальной. Одним из современных методов решения этой задачи является докинг – метод молекулярного моделирования, который позволяет предсказывать конформацию лиганда в активном центре белка-рецептора, используя данные о пространственной структуре белка и химической структуре лиганда.

В ходе работы были получены и проанализированы трёхмерные структуры PGHS из банка данных PDB. Определены структуры, подходящие для проведения докинга (экспериментальные, без мутаций, с кофактором гемом в обеих цепях, содержащие лиганд в циклооксигеназном активном центре, не имеющие разрывов цепи). Для дальнейшей работы выбраны 2 репрезентативные структуры (по одной для каждой изоформы, с ингибитором флурбипрофеном в активном центре). Для релаксации структур (приближения их свойств к свойствам *in vivo*) проводили минимизацию энергии структур PGHS в программе моделирования молекулярной динамики NAMD в силовом поле CHARMM.

С помощью суперкомпьютера МГУ «Ломоносов» был проведён виртуальный скрининг базы лигандов ACB Blocks (6150 соединений). В ходе скрининга проводили докинг соединений из базы с помощью программы SOL. В итоге были отобраны по 10 лучших по значению скоринг-функции веществ для структур PGHS-1 и PGHS-2 соответственно. 9 из 10 лигандов для PGHS-1 (табл. 5) были проверены экспериментально. Лиганды №3, 4, 9 из табл. 5 проявляют достаточно выраженное ингибирующее воздействие. Для всех выявленных ингибиторов активность не зависела от времени инкубации. Присутствие данных веществ в реакционной смеси оказывает различное влияние на интегральную кинетику циклооксигеназной реакции (примеры на рис. 23). При этом концентрация, необходимая для снижения активности в два раза, составила примерно 400 мкМ для веществ №3 и №4, и 2700 мкМ для вещества №9.

Лиганд №3 (DHT-5027 в базе данных ACB blocks) выбрали для более детального исследования (рис. 24). Константа ингибирования (K_i) равна примерно 80 мкМ.

Далее методика проведения докинга была усовершенствована и автоматизирована. Был создан алгоритм подготовки структур к докингу, а также алгоритм выбора структур для скрининга, позволяющий выбрать структуру с лучшим разделением ингибиторов и неингибиторов из тестовой выборки лигандов. Была разработана и размещена в открытом доступе в интернете оригинальная программа PDBParser, позволяющая упростить подготовку структур к докингу (исправление ошибок в файлах формата PDB, корректировка файлов после добавления недостающих атомов, разделение структур на цепи и выделение нативных лигандов), а также проводить анализ результатов.

После этого осуществили докинг соединений из базы ZINC размером 136 000 веществ, а также тестовой выборки известных ингибиторов и неингибиторов с помощью программы Autodock Vina. Для более осознанного отбора новых ингибиторов не только учитывали их сродство к активному центру фермента (по энергии связывания, определяемой в результате докинга), но и разделяли их на группы по ключевым свойствам (химическое строение, контакты с белком) и отбирали вещества группами, в которых содержатся схожие по выбранным критериям соединения. Полученные наборы сортировали по энергии связывания, полученной ранее в результате докинга. Лучшие вещества из всех наборов объединили и отобрали 300 лучших по критерию энергии связывания потенциальных ингибиторов.

6) Разделение ингибиторов на классы на основании типов взаимодействий с активным центром белка, определённых по результатам докинга. Соотнесение полученной классификации с классификацией ингибиторов по кинетическим свойствам

По результатам докинга в настоящей работе осуществили кластеризацию на основании взаимодействий с активным центром белка для выборки из 31 известного ингибитора. Проводили визуализацию взаимодействий лигандов с активным центром фермента с помощью программы PoseView, определяли попарные расстояния между лигандами и проводили иерархическую кластеризацию с помощью программного пакета Scipy.cluster на основании полученной матрицы расстояний. На выходе получили систему вложенных друг в друга кластеров, изображённую в виде дендрограммы на рис. 25.

Наблюдается чёткая корреляция между строением веществ и их распределением по кластерам. Более того, данная кластеризация коррелирует и с кинетическими свойствами ингибиторов. В один кластер попадают ибупрофен, напроксен, фенопрофен и толметин, присутствие которых в реакционной смеси повышает предельный выход продукта циклооксигеназной реакции. Для ибупрофена, напроксена и толметина обнаружено наличие кооперативных взаимодействий при связывании с ферментом. Фенопрофен, как и ибупрофен, является «быстрым» и слабым ингибитором. В другой кластер попадают кеторолак, диклофенак, флурбипрофен и кетопрофен, которые являются гораздо более «медленными» и «сильными» ингибиторами, взаимодействуют с ферментом по простейшей модели, и в их присутствии не повышается предельный выход продукта циклооксигеназной реакции. Индометацин не попадает ни в первый, ни в второй кластер, и для него характерно двухстадийное ингибирование с быстрой стадией (как для фенопрофена и ибупрофена) и медленной стадией (как для кеторолака, диклофенака, флурбипрофена и кетопрофена).

7) Контакты ингибиторов с остатком Tyr385 в активном центре PGHS

На наш взгляд, одним из самых перспективных направлений исследования ингибиторов PGHS является создание ингибиторов нового типа, взаимодействующих с аминокислотными остатками активного центра с образованием новых химических связей. Наиболее интересным в этой связи представляется поиск ингибиторов, способных взаимодействовать с тирозиновым радикалом активной формы фермента. В настоящей работе проанализировали структуры PGHS с различными ингибиторами и определили, как данные лиганды контактируют с Tyr385 (см. табл. 6). Видно, что большинство рассмотренных ингибиторов содержит группы, которые могут находиться в непосредственной близости от тирозинового радикала. Соответственно, на основе данных веществ можно создать их производные, специфически взаимодействующие с радикалом Tyr385 в активном центре PGHS и, возможно, гораздо более эффективно ингибирующие активность фермента, чем существующие аналоги.

8) Проведение молекулярной динамики димерного фермента PGHS в присутствии и в отсутствие связанных с активным центром ингибиторов с учётом влияния наличия мембраны и гема

Важным методом исследования конформационных состояний димерного фермента PGHS и возможных кооперативных эффектов является моделирование с использованием молекулярной динамики. В ходе работы получали трёхмерные структуры PGHS из банка данных PDB, исправляли ошибки в них с помощью программы PDBParser, добавляли

недостающие атомы водорода с помощью программного пакета VMD, встраивали белок в липидную мембрану с помощью сервера CHARMM-GUI, помещали структуры в ячейку (вакуумную, водную или водную с противоионами) с помощью VMD, осуществляли минимизацию энергии в программе NAMD в силовом поле CHARMM и затем проводили свободную динамику в программе NAMD.

Для проверки кооперативности PGHS по напроксену проводили динамику PDB-структуры 3N8W (PGHS-1 из *Ovis aries*) как без ингибитора, так и с ингибитором в активном центре одной из субъединиц (цепи А). Структуры помещали в водную ячейку с противоионами, получали упрощённую RBCG (Residue Based Coarse Grained) модель с помощью VMD для увеличения времени динамики. Свободную динамику проводили в течение 30 наносекунд. Для анализа результатов выбрали по 100 микросостояний на последних этапах динамики для обеих структур. Подсчитали RMSD по тяжёлым атомам цепи В между каждыми двумя выбранными микросостояниями структуры 3N8W без ингибитора, а также между каждым микросостоянием структуры 3N8W без ингибитора и каждым микросостоянием структуры 3N8W с ингибитором в другой субъединице (цепи А). В первом случае среднее значение RMSD составило 1.2 ангстрем, а во втором – 1.7 ангстрем. Из полученных результатов можно сделать вывод, что присутствие ингибитора в одной из субъединиц (цепи А) существенным образом влияет на конформацию другой субъединицы (цепи В), и наличие кооперативного эффекта при ингибировании PGHS напроксеном получает подтверждение методом молекулярной динамики.

9) Поиск пар ингибиторов, синергично усиливающих сродство друг друга к ферменту

Гомодимерная структура фермента PGHS и обнаружение кинетически значимых кооперативных взаимодействий открывает новое направление исследований – поиск пар синергичных ингибиторов этого фермента. В этом случае один ингибитор из такой пары присоединяется к активному центру одного мономера белка, а другой – к активному центру другого мономера (схема показана на рис. 26, для наглядности случаи присоединения молекулы ингибитора к одному из мономеров димера ЕЕ не отделяются друг от друга). Если связывание ингибитора А с димером ЕЕ увеличивает сродство ингибитора В к ферменту (что выражается в меньшем значении константы ингибирования, см. схему), и, соответственно, аналогичное явление наблюдается в обратном случае, то пару ингибиторов А и В можно назвать синергичными.

В литературе эффект синергичного ингибирования PGHS наблюдали при исследовании влияния несубстратных жирных кислот на действие различных ингибиторов. Для изоформы PGHS-1 добавление пальмитиновой кислоты усиливает ингибирование диклофенаком и напроксеном, при этом пальмитиновая кислота сама по себе оказывает незначительный ингибирующий эффект. При инкубации с аспирином или флурбипрофеном добавление различных жирных кислот (пальмитиновая, стеариновая, олеиновая) усиливает эффект ингибирования, а в отсутствие ингибиторов активность также незначительно понижается при добавлении этих кислот. Во всех случаях фермент инкубировали с ингибитором и/или несубстратной жирной кислотой в течение 30 мин, а затем инициировали циклооксигеназную реакцию арахидоновой кислотой.

Таким образом, по имеющимся данным можно составить следующие пары синергичных ингибиторов для PGHS-1:

- пальмитиновая кислота – с диклофенаком или напроксеном;
- аспирин или флурбипрофен – с пальмитиновой, стеариновой или олеиновой кислотой.

Рисунки и таблицы

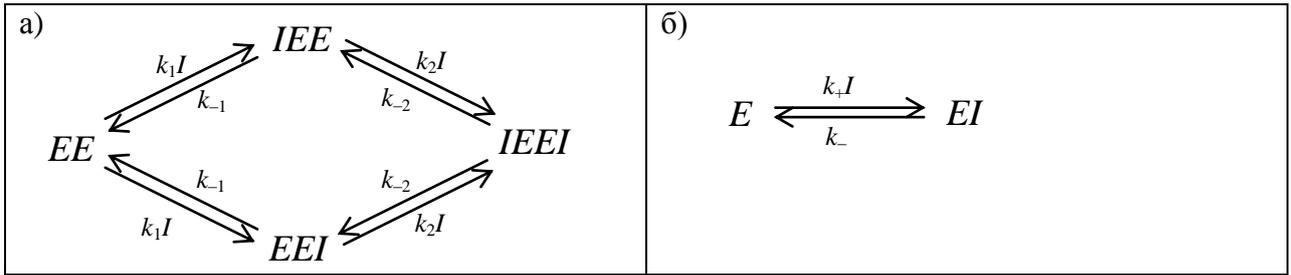


Рис. 1. а) Модель взаимодействия гомодимерного фермента с ингибитором, учитывающая возможные кооперативные взаимодействия между мономерами. б) Простейшая модель независимого обратимого взаимодействия ингибитора с активным центром мономера фермента.



Рис. 2. Схема взаимодействия фермента с ингибитором для кооперативной (слева) и гетерогенной (справа) моделей. Соотношения между элементарными константами: $k_\alpha = 2 \cdot k_1$, $k_{-\alpha} = k_{-1}$, $k_\beta = k_2$, $k_{-\beta} = 2 \cdot k_{-2}$, где k_1, k_2 – элементарные константы скорости ассоциации фермента и ингибитора для кооперативной модели, k_{-1}, k_{-2} – константы скорости диссоциации фермента и ингибитора для кооперативной модели ($K_1 = k_{-1}/k_1$, $K_2 = k_{-2}/k_2$), k_α, k_β – элементарные константы скорости ассоциации фермента и ингибитора для гетерогенной модели, $k_{-\alpha}, k_{-\beta}$ – константы скорости диссоциации фермента и ингибитора для гетерогенной модели ($K_\alpha = k_{-\alpha}/k_\alpha$, $K_\beta = k_{-\beta}/k_\beta$).



Рис. 3. Обобщённая двумерная схема одновременного протекания двух реакций А и В, катализируемых бифункциональным ферментом. Здесь X_{ij} – промежуточная форма фермента, i – индекс состояния активного центра А, j – индекс состояния активного центра В.

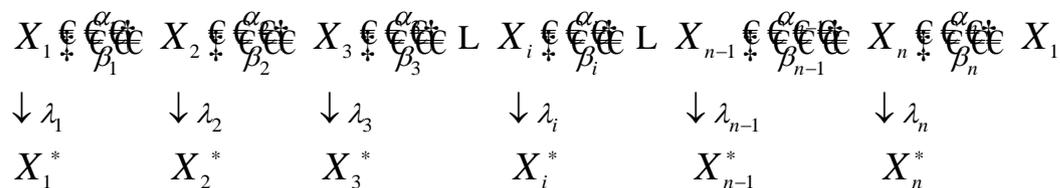


Рис. 4. Общий механизм неразветвленной многосубстратной ферментативной реакции, интермедиаты которой могут подвергаться необратимой инактивации. Здесь X_j ($j = 1, 2, \dots, n$) – каталитически активные промежуточные формы фермента (интермедиаты), X_j^* – инактивированные формы фермента, α_j и β_j ($j = 1, 2, \dots, n$) – константы скорости реакций первого (псевдопервого) порядка для реакций взаимопревращения интермедиатов.

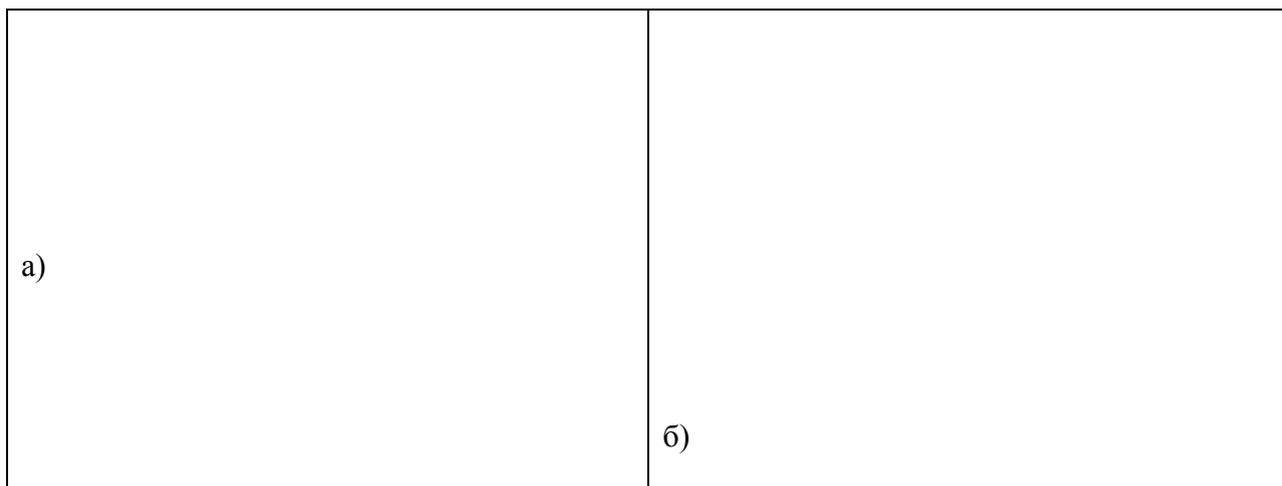


Рис. 5. Схема ингибирования фермента на фоне инактивации в процессе реакции в случае 1-стадийного медленного ингибирования (а) и 2-стадийного ингибирования с быстрой и медленной стадиями (б).

k_1, k_{-1} – константы образования и распада фермент-субстратного комплекса соответственно, k_2 – каталитическая константа (константа образования продукта реакции), λ – константа необратимой инактивации фермент-субстратного комплекса, K_i – константа ингибирования для быстрой стадии ($K_i = \frac{E \cdot I}{EI}$), k_+, k_- – кинетические константы медленной стадии ингибирования.

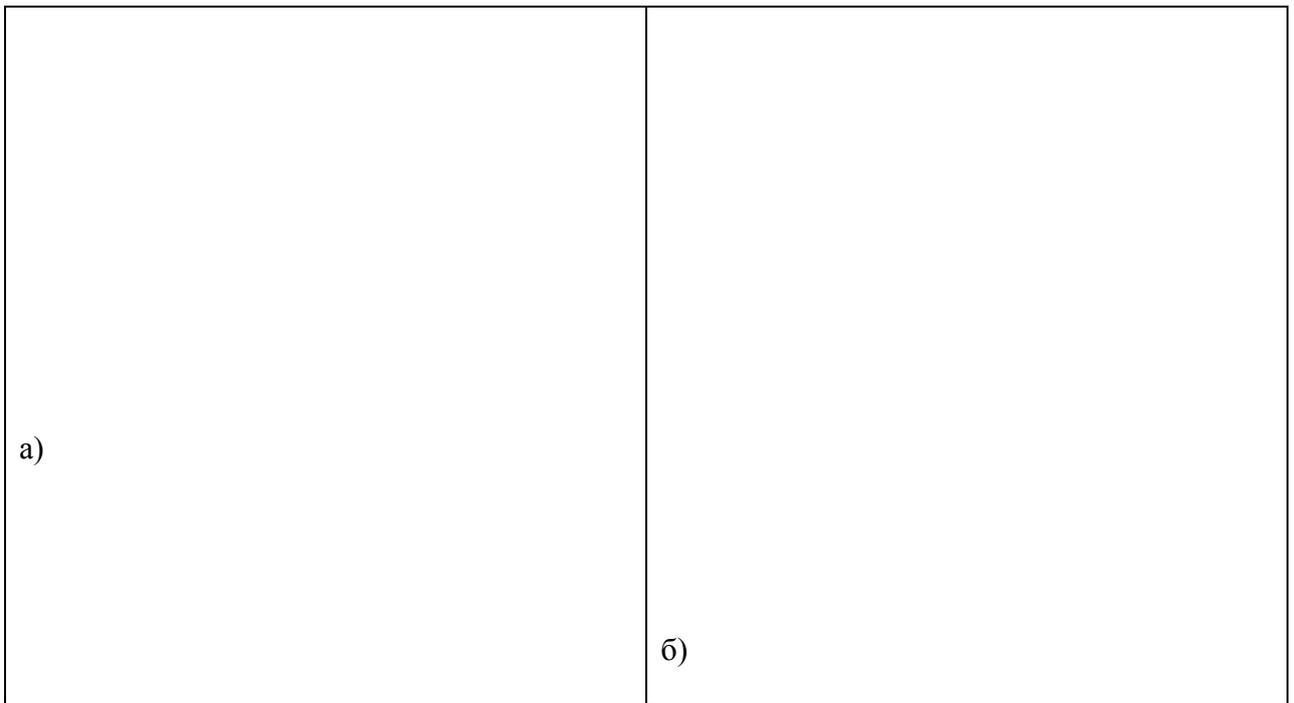


Рис. 6. Зависимость продукта реакции от времени в случае 1-стадийного медленного ингибирования (а) и 2-стадийного ингибирования с быстрой и медленной стадиями (б) при необратимой медленной стадии. V_m – максимальная скорость реакции, K_m – константа Михаэлиса по субстрату S , V_0 – начальная скорость реакции, Λ – наблюдаемая константа инактивации, определяемая из интегральной кривой. Остальные обозначения – см. рис. 5.

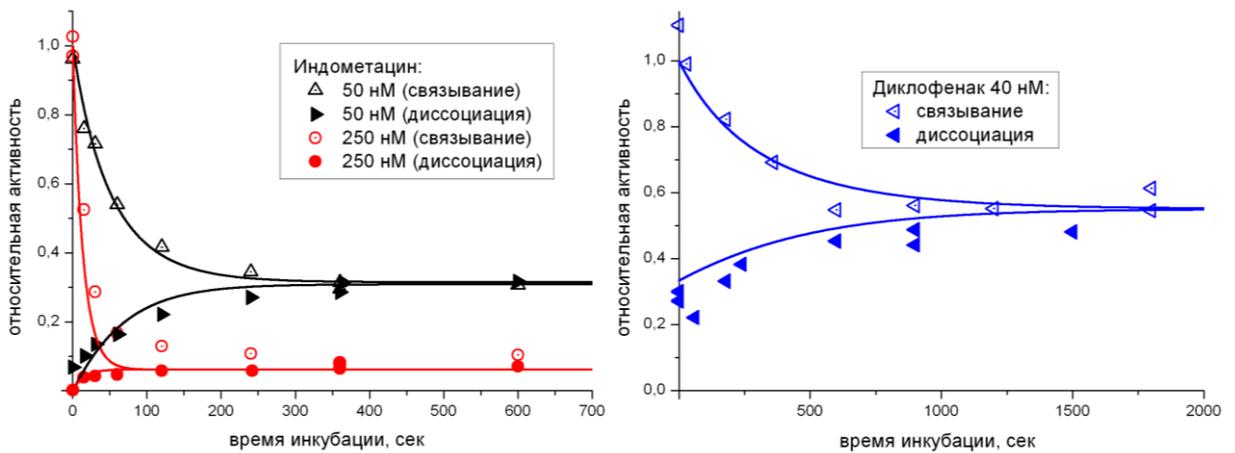


Рис. 7. Зависимость относительной активности PGHS от времени инкубации с индометацином (слева) и диклофенаком (справа) в случае ассоциации и диссоциации фермент-ингибиторного комплекса.

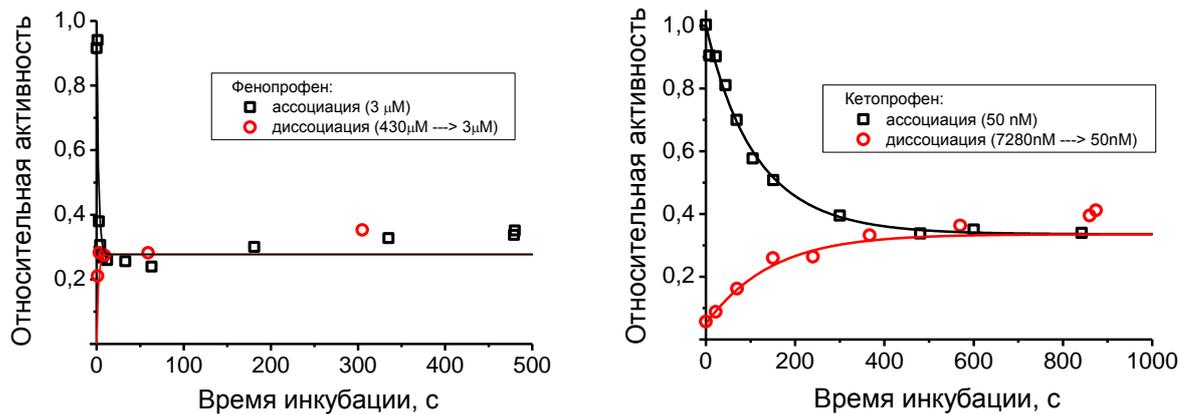


Рис. 8. Зависимость относительной активности PGHS от времени инкубации с фенопрофеном (слева) и кетопрофеном (справа) в случае ассоциации и диссоциации фермент-ингибиторного комплекса.

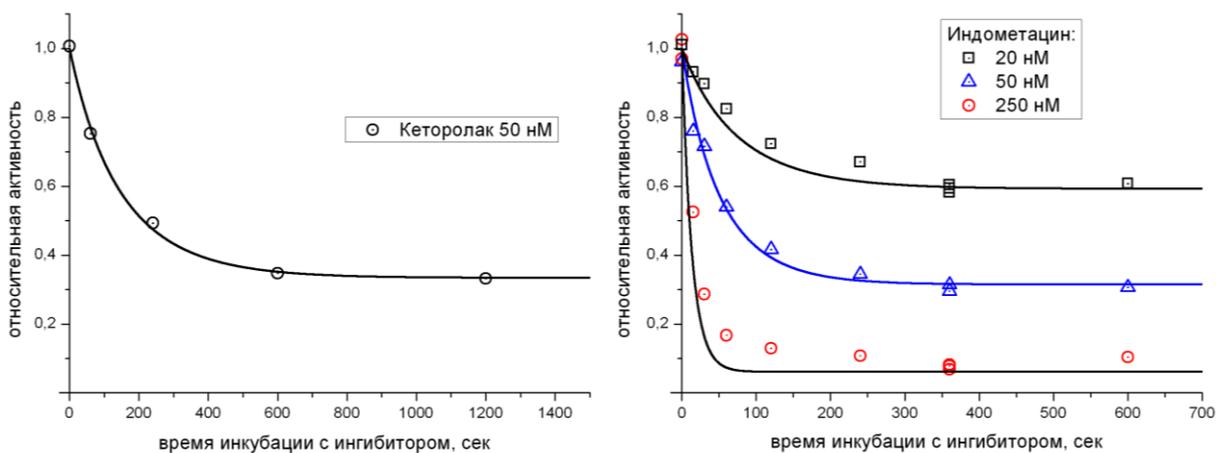


Рис. 9. Зависимость относительной активности PGHS от времени инкубации с кеторолаком (слева) и индометацином (справа) в случае ассоциации.

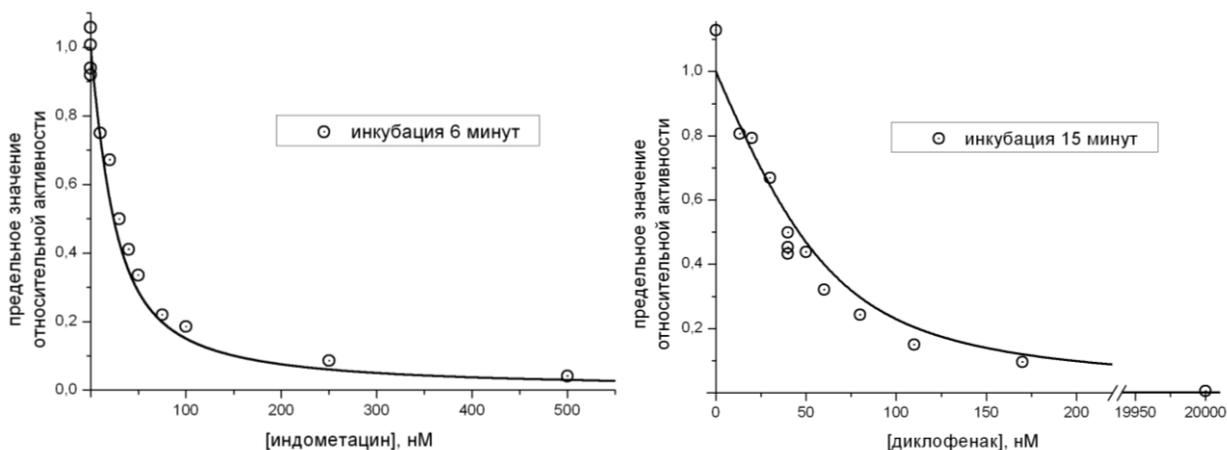


Рис. 10. Зависимость относительной активности PGHS от концентрации ингибитора в равновесных условиях на примере индометацина (слева) и диклофенака (справа).

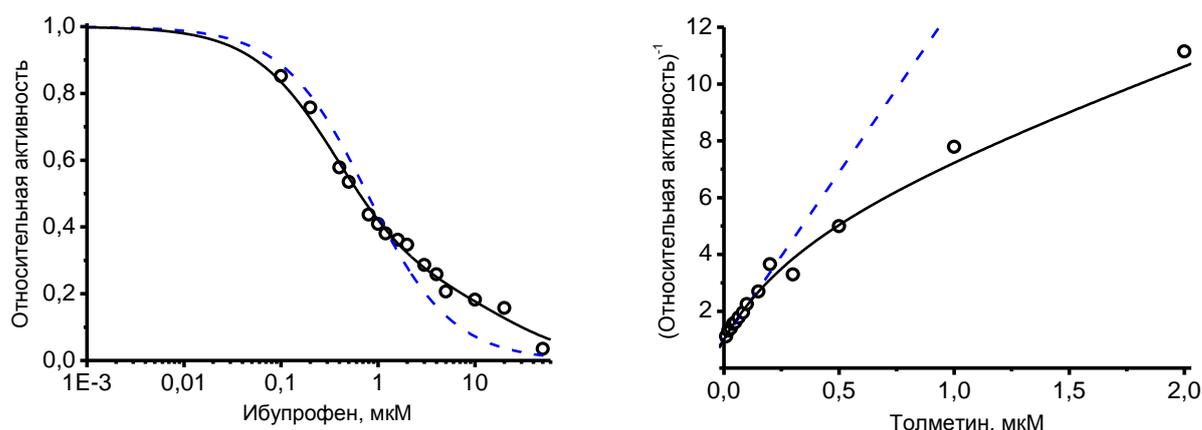


Рис. 11. Зависимость относительной активности PGHS от концентрации ингибитора в равновесных условиях на примере ибупрофена (слева, в полулогарифмических координатах) и толметина (справа, в координатах Диксона). Время инкубации фермента с ингибитором в реакционной ячейке составляло 1 минуту для ибупрофена и 10 минут для толметина. Линии на графике соответствуют аппроксимации экспериментальных данных согласно простейшей модели (рис. 1б, пунктирная линия) и кооперативной модели (рис. 1а, сплошная линия).

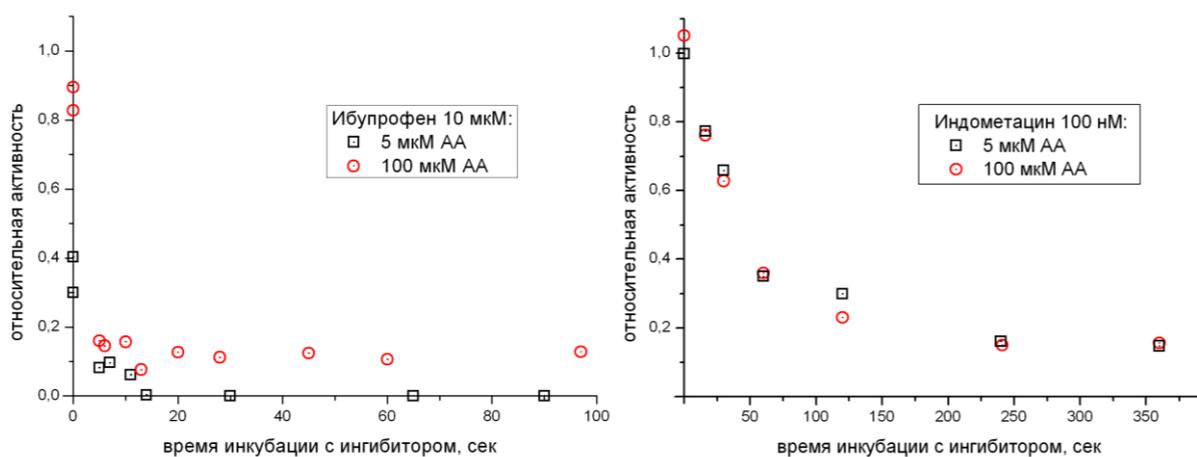


Рис. 12. Зависимость относительной активности PGHS от времени инкубации с ибупрофеном (слева) и индометацином (справа) для разных концентраций субстрата.

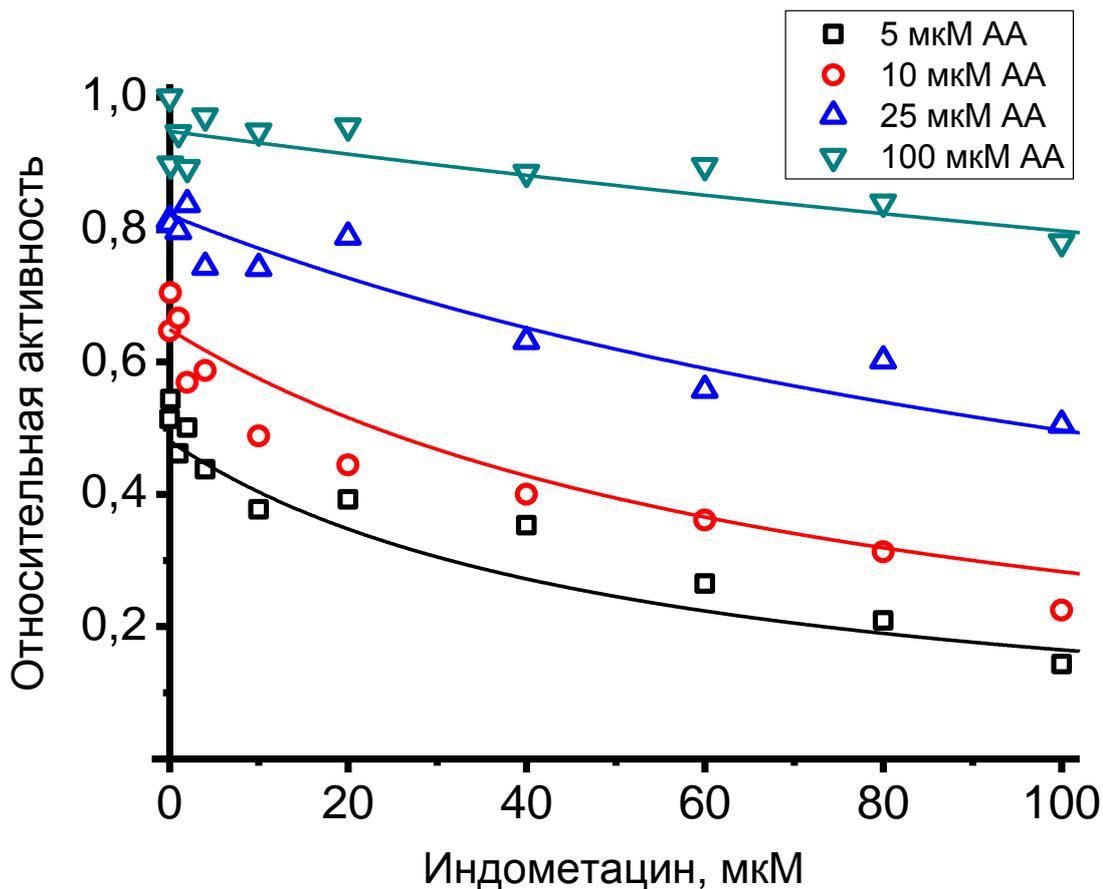


Рис. 13. Зависимость относительной активности PGHS от концентрации индометацина в случае инициации реакции ферментом при различных концентрациях арахидоновой кислоты.

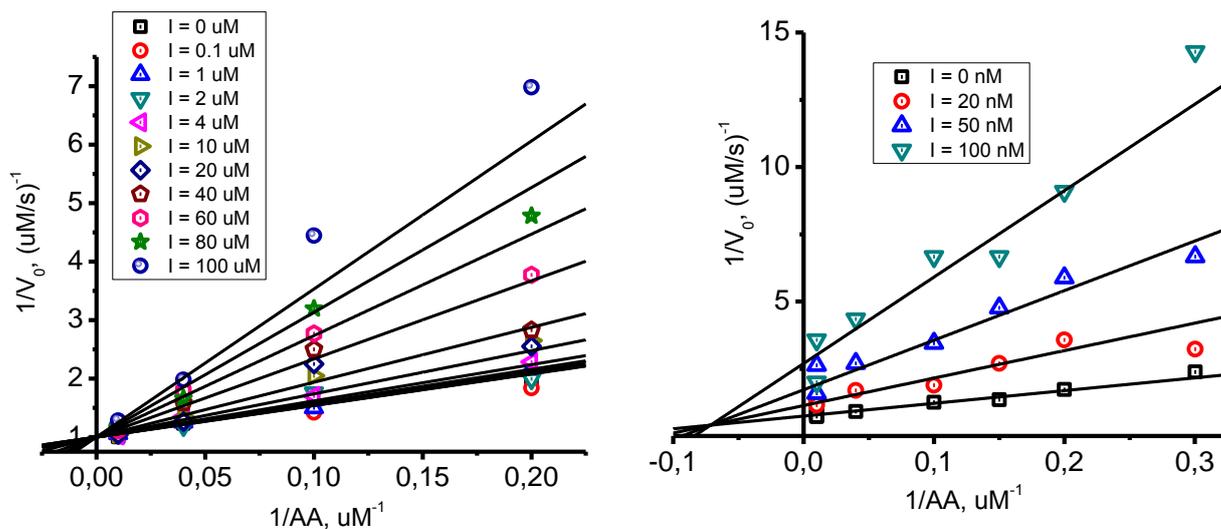


Рис. 14. Зависимости начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах в случае инициации реакции

ферментом (слева) и субстратом после прединкубации фермента с ингибитором и достижения равновесия (справа). Данные аппроксимированы по модели смешанного ингибирования:

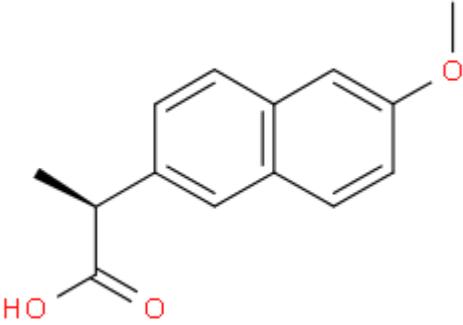
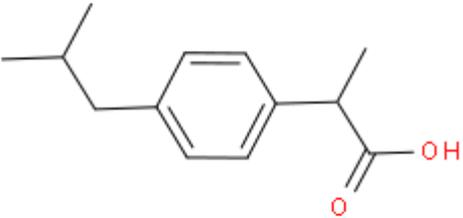
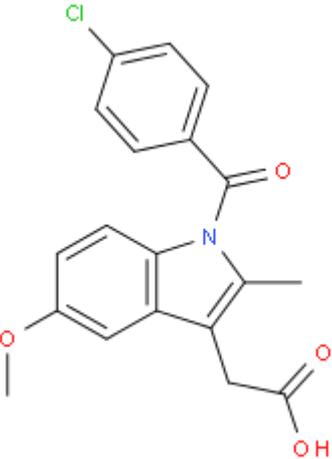
ингибитор	K_1 (нМ)	k_+ (($\mu\text{M}\cdot\text{c}$) ⁻¹)	k_- (c^{-1})	K_2 (нМ)	γ
Напроксен	100	0.084	$8.40\cdot 10^{-3}$	9200	0.307
Ибупрофен	736	0.087	$6.40\cdot 10^{-2}$	10980	0.454
Кеторолак	23	0.070	$1.61\cdot 10^{-3}$		
Диклофенак	16	0.040	$6.40\cdot 10^{-4}$		
Флурбипрофен	7	0.72	$4.82\cdot 10^{-3}$	-	-
Кетопрофен	19	0.12	$2.28\cdot 10^{-3}$	-	-
Фенопрофен	1147	0.12	0.138	-	-
Толметин	122	0.075	$9.15\cdot 10^{-3}$	1291	0.279

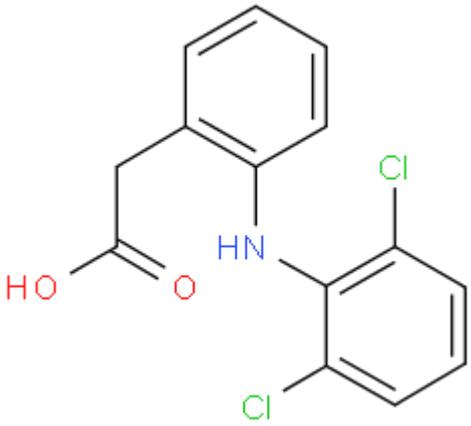
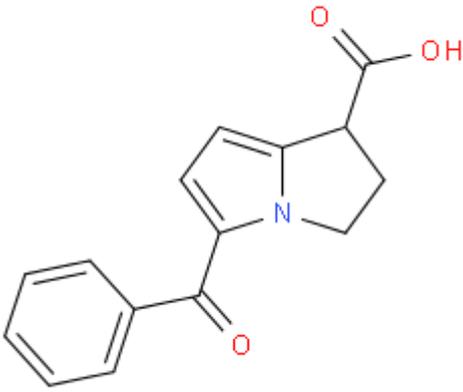
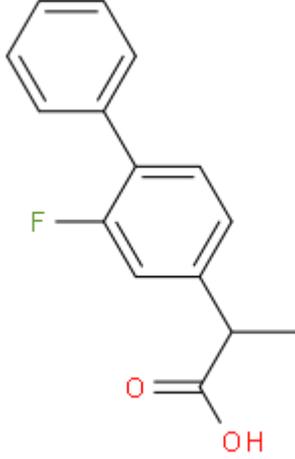
Табл. 1. Кинетические константы для различных ингибиторов. Для простой модели: k_+ , k_- – элементарные константы скорости ассоциации и диссоциации фермент-ингибиторного комплекса ($K_1 = k_-/k_+$). Для кооперативной модели (равновесные условия): K_1 , K_2 – равновесные константы диссоциации фермент-ингибиторного комплекса для взаимодействия ингибитора с димером фермента, свободным от ингибитора, и с димером, один из активных центров которого занят ингибитором, соответственно; k_1 , k_{-1} – элементарные константы скорости ассоциации и диссоциации комплекса ЕЕИ или ИЕЕ ($K_1 = k_{-1}/k_1$) γ – отношение активности свободного мономера в составе димера, один из активных центров которого занят ингибитором, к активности мономера в составе димера, свободного от ингибитора. Экспериментальные измерения проводили при 25°C в 50 мМ трис-НСl буфере, рН = 8.0, 0,1% твин-20, 2 мкМ гемина, 1 мМ ферроцианида калия, 100 мкМ арахионовой кислоты (АА) и 270 мкМ кислорода.

K_i , мкМ	k_+ , c^{-1}	k_- , c^{-1}
27	7.83	$4.35\cdot 10^{-3}$

Табл. 2. Кинетические константы для ингибитора индометацина. Обозначения – см. рис. 5б. Условия измерения – см. табл. 1.

Ингибитор	Формула	Название
-----------	---------	----------

<p>Напроксен</p>		<p>2-(6-Methoxy-2-naphthyl) propanoic acid</p>
<p>Ибупрофен</p>		<p>2-(4-Isobutylphenyl) propanoic acid</p>
<p>Индометацин</p>		<p>[1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]acetic acid</p>

<p>Диклофенак</p>		<p>{2-[(2,6-Dichlorophenyl) amino]phenyl}acetic acid</p>
<p>Кеторолак</p>		<p>5-Benzoyl-2,3-dihydro-1H-pyrrolizine-1-carboxylic acid (трис соль)</p>
<p>Флурбипрофен</p>		<p>2-(2-Fluoro-4-biphenyl) propanoic acid</p>

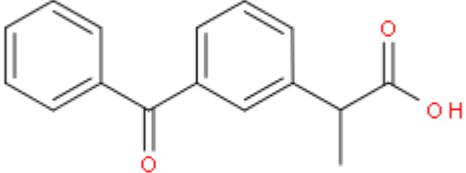
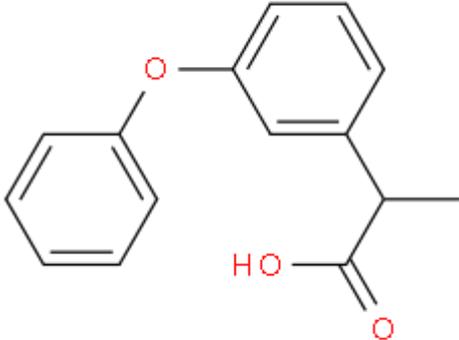
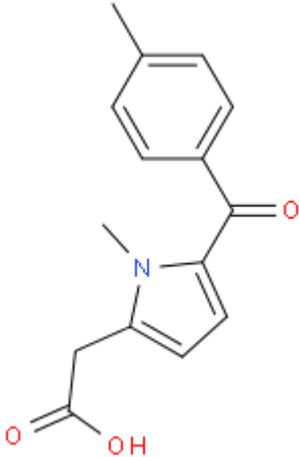
Кетопрофен		2-(3-Benzoylphenyl) propanoic acid
Фенопрофен		2-(3-Phенохуphenyl)propanoic acid (кальциевая соль)
Толметин		[1-Methyl-5-(4-methylbenzoyl)-1H-имидрол-2-yl]acetic acid (натриевая соль)

Табл. 3. Структуры известных ингибиторов, исследованных в данном проекте.

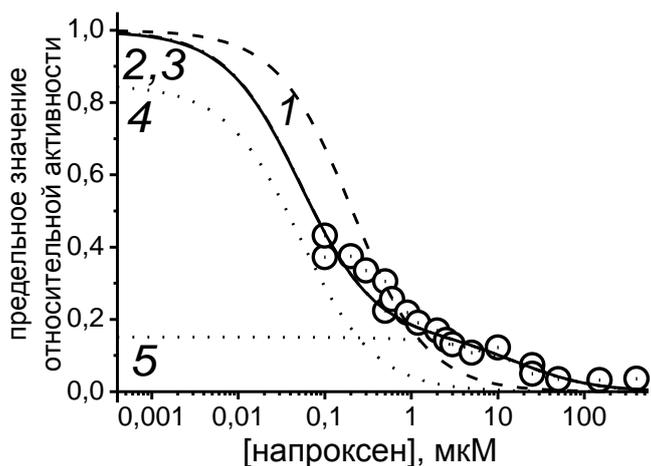


Рис. 15. Зависимость предельного значения относительной активности от концентрации напроксена. Время прединкубации фермента с ингибитором в реакционной ячейке составляло 2 минуты, концентрация арахидоновой кислоты 100 мкМ. Линии на графике соответствуют аппроксимации экспериментальных данных согласно простейшей модели (рис. 16) – линия 1, кооперативной и гетерогенной моделей (рис. 2) – линии 2 и 3. Для наглядности на графике приведены точечные линии, построенные с использованием уравнения для гетерогенной модели для константы K_a (линия 4) и K_b (линия 5) отдельно для каждого слагаемого, входящего в это уравнение.

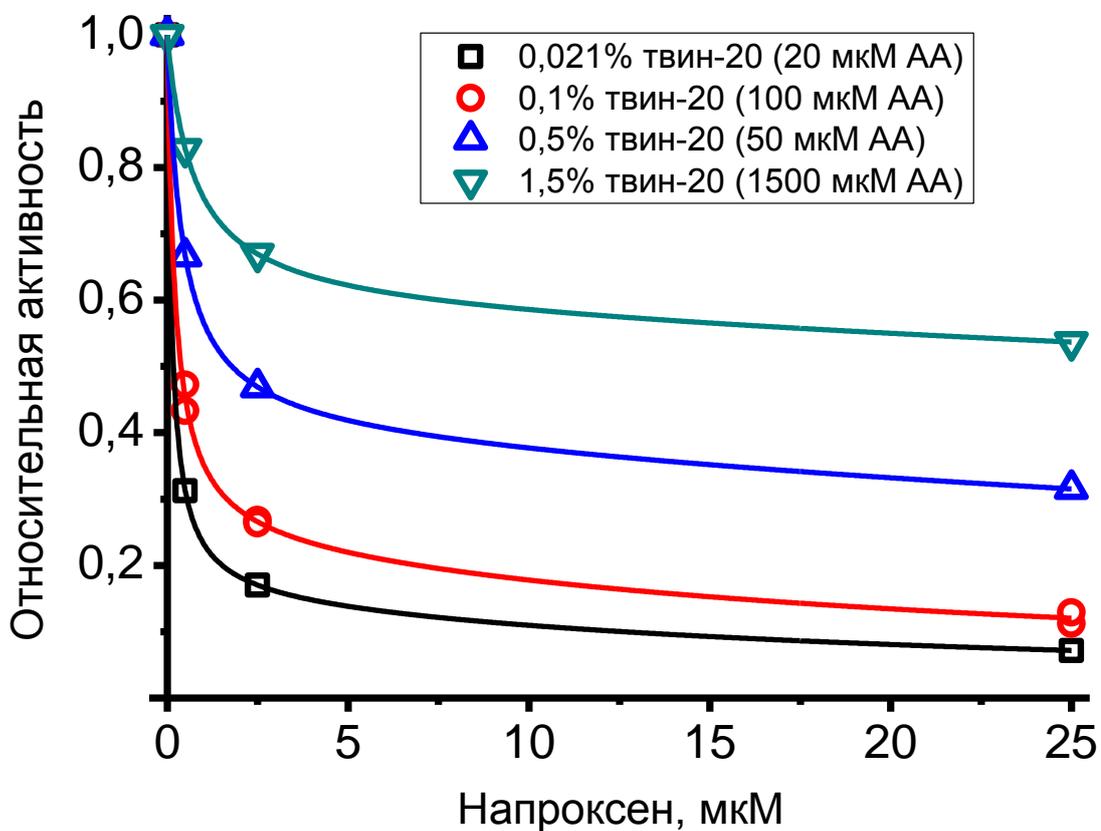


Рис. 16. Зависимость относительной активности PGHS от концентрации напроксена при различном содержании детергента (твина-20) в реакционной среде. Время инкубации с ингибитором составляет 2 мин, это время достаточно для практического достижения равновесия. Линии на графике соответствуют аппроксимации экспериментальных данных согласно кооперативной модели (рис. 1а).

К ₁ , мкМ	К ₂ , мкМ	γ	P
190	5100	0.79	>> 5000

Табл. 4. Истинные значения кинетических констант взаимодействия PGHS с напроксеном в мицеллярной фазе. К₁, К₂ - равновесные константы диссоциации комплекса фермента с ингибитором (рис. 1а), γ - отношение активности свободного мономера в комплексе ИЕЕ (или ЕЕИ) к активности мономера в комплексе ЕЕ, $I = \frac{I_0 \cdot P}{1 + P \cdot \alpha}$ - концентрация напроксена в мицеллярной фазе (I₀ – общее содержание напроксена в системе (показано на оси абсцисс), P – коэффициент распределения напроксена между мицеллярной и водной фазами, α – объёмная доля мицелл в системе).

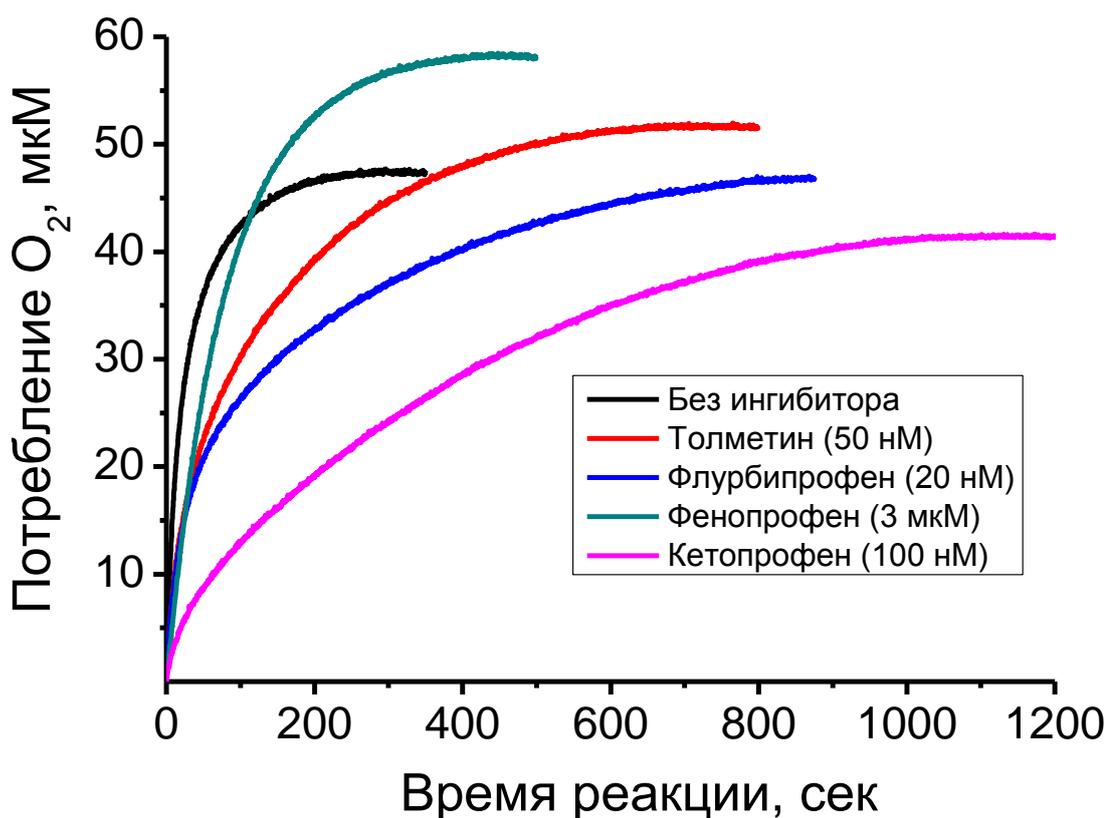


Рис. 17. Кинетика циклооксигеназной реакции в отсутствие и в присутствии различных ингибиторов. Реакцию инициировали добавлением арахидоновой кислоты после 900 сек инкубации фермента в ячейке с ингибитором (это время является достаточным для практического достижения равновесия) или без ингибитора. Рассчитанный предельный выход продукта реакции: без ингибитора – 47 мкМ, в случае толметина (50 нМ) – 52 мкМ,

в случае флурбипрофена (20 нМ) – 48 мкМ, в случае фенопрофена (3 мкМ) – 59 мкМ, в случае кетопрофена (100 нМ) – 41 мкМ.

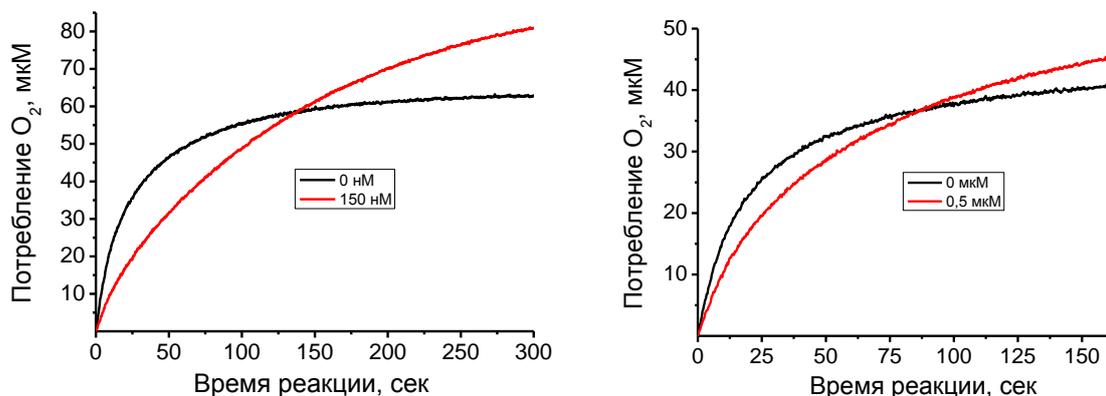


Рис. 18. Кинетика циклооксигеназной реакции в отсутствие и в присутствии напроксена (слева) и ибупрофена (справа). Реакцию инициировали добавлением арахидоновой кислоты после 180 сек инкубации фермента с ингибитором в случае добавления напроксена и после 60 сек инкубации в случае добавления ибупрофена (эти времена являются достаточными для практического достижения равновесия). Рассчитанный предельный выход продукта реакции: в случае напроксена – 63 мкМ (без ингибитора) и 93 мкМ (при 150 нМ ингибитора), в случае ибупрофена – 42 мкМ (без ингибитора) и 51 мкМ (при 0,5 мкМ ингибитора).

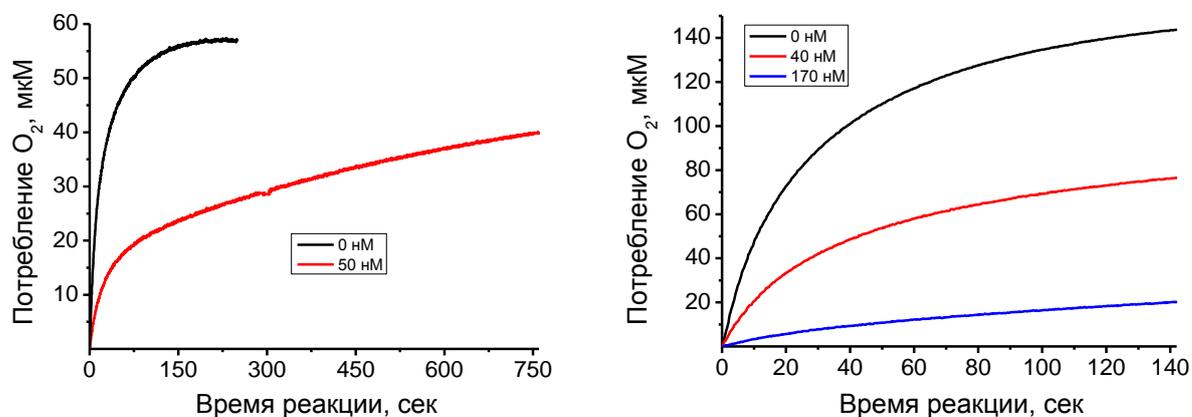


Рис. 19. Кинетика циклооксигеназной реакции в отсутствие и в присутствии кеторолака (слева) и диклофенака (справа). Реакцию инициировали добавлением фермента в отсутствие ингибитора либо добавлением арахидоновой кислоты после 1200 сек инкубации фермента с кеторолаком (слева), добавлением арахидоновой кислоты после 900 сек инкубации фермента с диклофенаком или инкубации фермента без ингибитора (справа) (эти времена являются достаточными для практического достижения равновесия). Рассчитанный предельный выход продукта реакции: в случае кеторолака – 57 мкМ (без ингибитора) и 49 мкМ (при 50 нМ ингибитора), в случае диклофенака – 151 мкМ (без ингибитора), 86 мкМ (при 40 нМ ингибитора), 40 мкМ (при 170 нМ ингибитора).

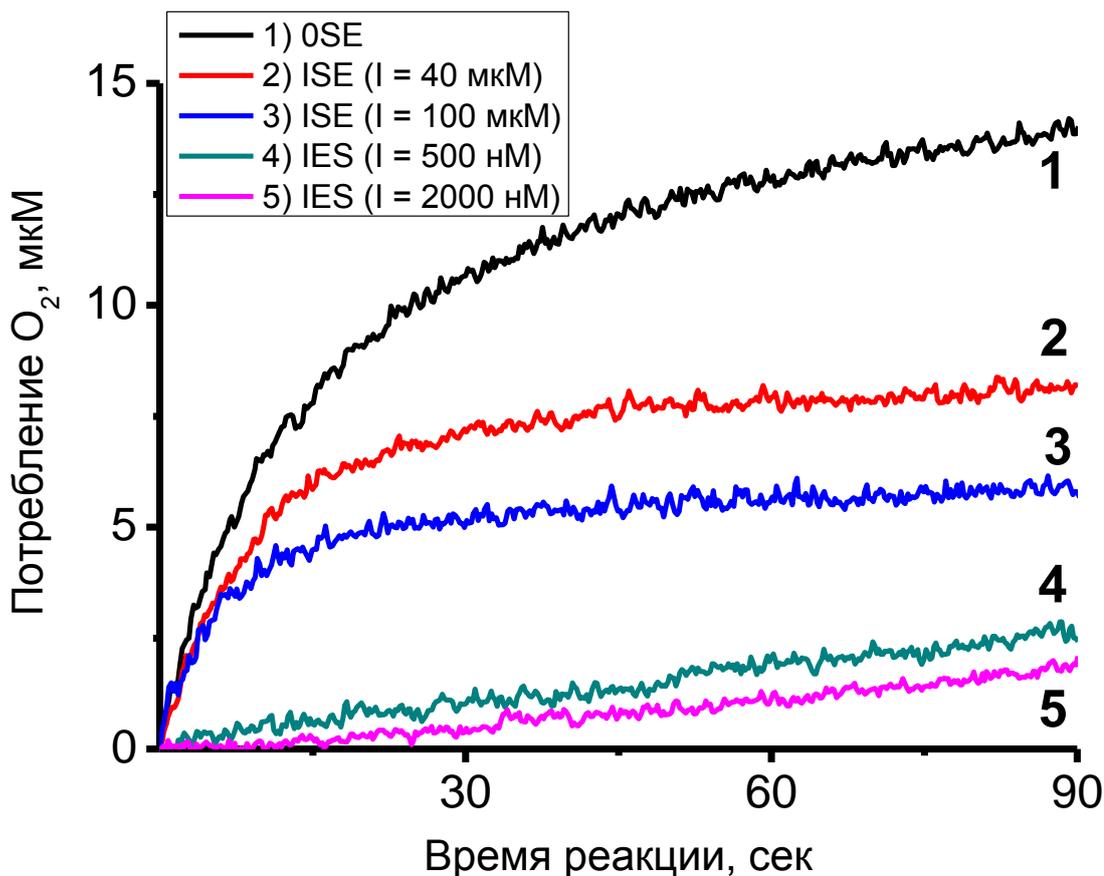


Рис. 20. Кинетика циклооксигеназной реакции в отсутствие (1) и в присутствии индометацина (2-5). Реакцию инициировали добавлением фермента (1-3) или добавлением арахидоновой кислоты после 360 сек инкубации фермента с ингибитором (это время является достаточным для практического достижения равновесия) (4-5). Рассчитанные значения наблюдаемой константы скорости инактивации: 1 – 0.094 с^{-1} (без ингибитора), 2 – 0.11 с^{-1} (40 мкМ индометацина, инициация ферментом), 3 – 0.23 с^{-1} (100 мкМ индометацина, инициация ферментом), 4 – $5.9 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ (500 нМ индометацина, инициация субстратом), 5 – $4.2 \cdot 10^{-12} \text{ с}^{-1}$ (2000 нМ индометацина, инициация субстратом).

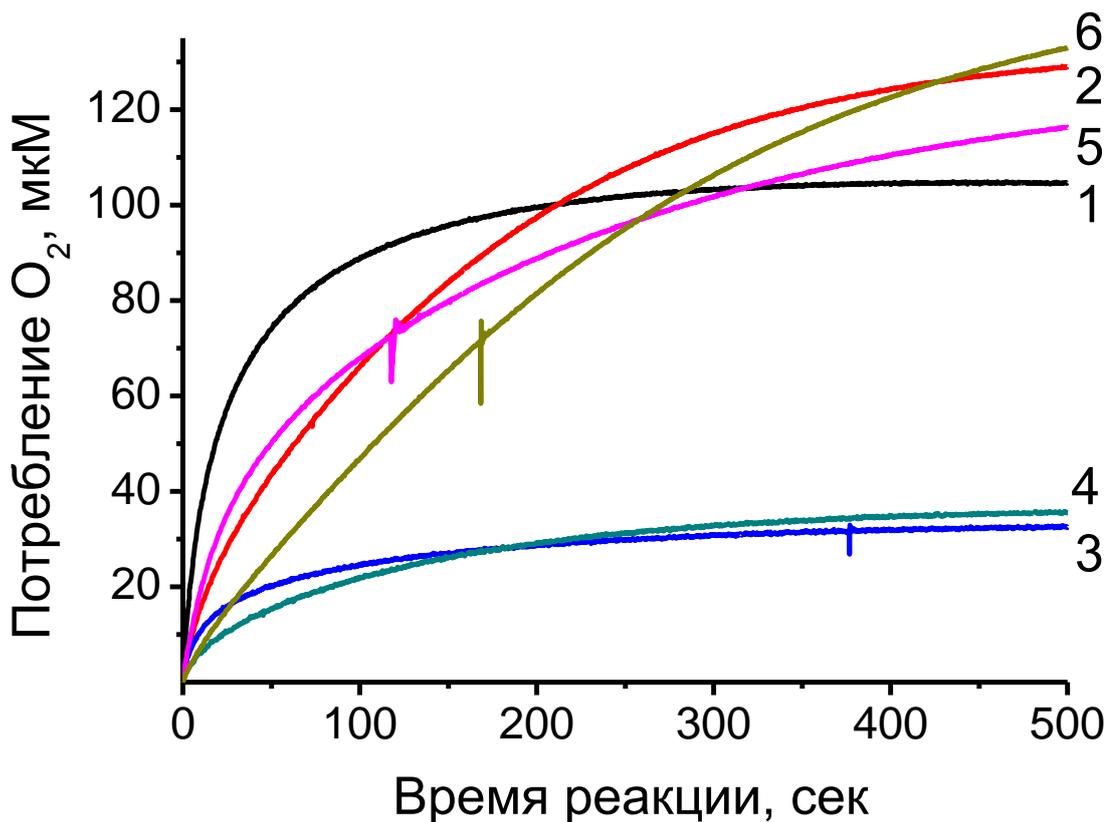


Рис. 21. Кинетика циклооксигеназной реакции в отсутствие и в присутствии ингибитора напроксена для различных доноров электронов. 1, 2 – реакция в присутствии 1 мМ ферроцианида калия. 3, 4 – реакция в отсутствие донора. 5, 6 – реакция в присутствии 1 мМ адреналина. 1, 3, 5 – реакция без ингибитора. 2, 4, 6 – реакция в присутствии 150 нМ напроксена. В ячейку добавляли 90 нМ фермента (1-4) и 42 нМ (5-6). Реакцию инициировали добавлением арахидоновой кислоты после 180 сек инкубации фермента с ингибитором (это время является достаточным для практического достижения равновесия).

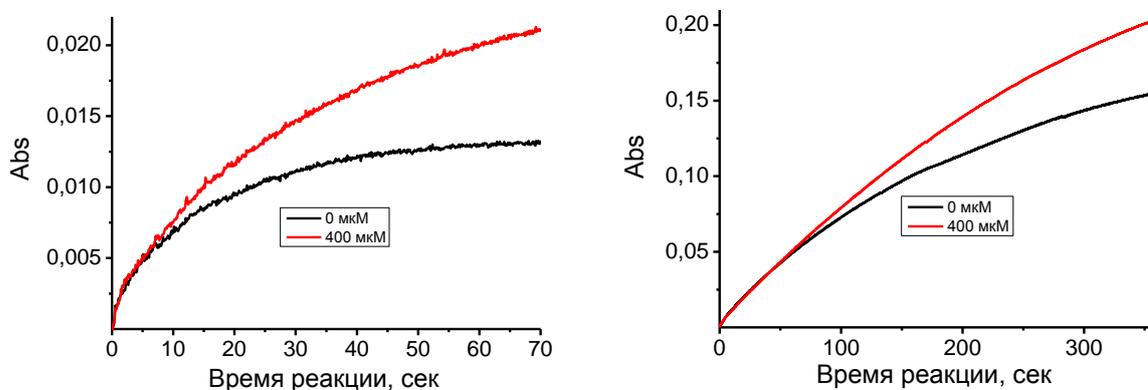


Рис. 22. Кинетика пероксидазной реакции в отсутствие ингибитора и в присутствии 400 мкМ напроксена. Концентрация перекиси водорода – 50 мкМ, концентрация TMPD (донора электронов) – 2,5 мкМ (слева) и 20 мкМ (справа).

№	Номера в базах данных	dG, ккал/моль	название	Формула
1	2PA-0051 (ACB blocks) 21468305 (ChemSpider ID) ZINC12404886 (ZINC ID)	-6,51761	1-(4-bromo-2-methylphenyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid	
2	MIX-0308 (ACB blocks) 633806 (ChemSpider ID) ZINC00133424 (ZINC ID)	-6,49251	5-[(2,3-dihydro-1H-inden-5-yloxy)methyl]-2-furoic acid	
3	DHT-5027 (ACB blocks) 21467935 (ChemSpider ID) ZINC03690220 (ZINC ID)	-6,41046	4-[2-(4-methylphenyl)-1H-indol-3-yl]butan-1-amine oxalate	
4	CTZ-0051 (ACB blocks) 21468172 (ChemSpider ID) ZINC12404819 (ZINC ID)	-6,37824	4-(2-naphthyl)-1,3-thiazole-2-carboxylic acid	
5	2PA-0014 (ACB blocks) 21468272 (ChemSpider ID) ZINC12404888 (ZINC ID)	-6,35891	1-(2-bromo-4-methylphenyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid	

6	2PA-0383 (ACB blocks) 21468335 (ChemSpider ID) ZINC12404887 (ZINC ID)	-6,30283	1-(4-chloro-2-methylphenyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic acid	
7	TMA-0015 (ACB blocks) 4376502 (ChemSpider ID) ZINC03709646 (ZINC ID)	-6,24407	[4-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanamine	
8	CTZ-0060 (ACB blocks) 21468116 (ChemSpider ID) ZINC12404817 (ZINC ID)	-6,23549	4-(4-methoxy-3,5-dimethylphenyl)-1,3-thiazole-2-carboxylic acid	
9	2PA-0039 (ACB blocks) 21468377 (ChemSpider ID) ZINC12404855 (ZINC ID)	-6,20524	1H-pyrrole-2-carboxylic acid, 1-(3-chloro-4-methylphenyl)-	

Табл. 5. Вещества из списка лучших находок программы SOL по результатам скрининга лигандов из базы ACB Blocks для минимизированной структуры PGHS-1 (код PDB – 1EQH), проверенные *in vitro* на наличие ингибирующих свойств.

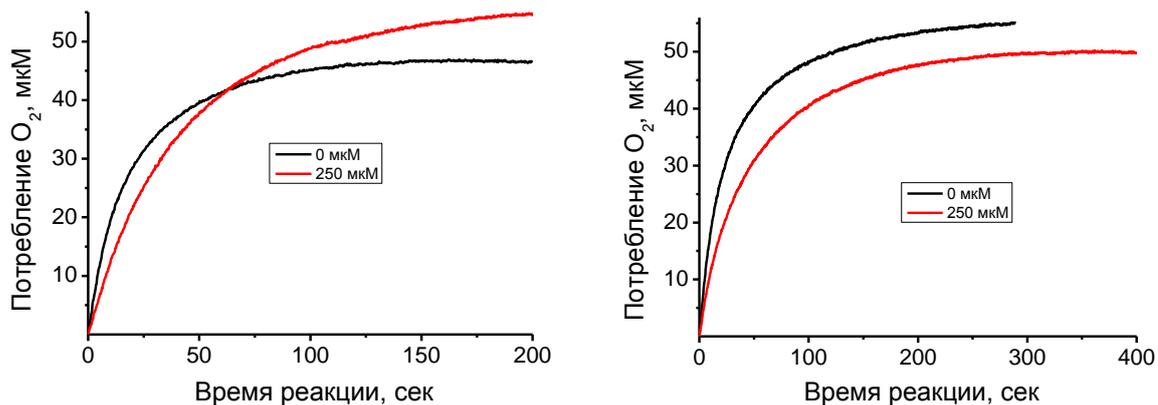


Рис. 23. Кинетика циклооксигеназной реакции в отсутствие и в присутствии ингибиторов DHT-5027 (слева, №3 в табл. 5) и CTZ-0051 (справа, №4 в табл. 5). Реакцию инициировали добавлением фермента.

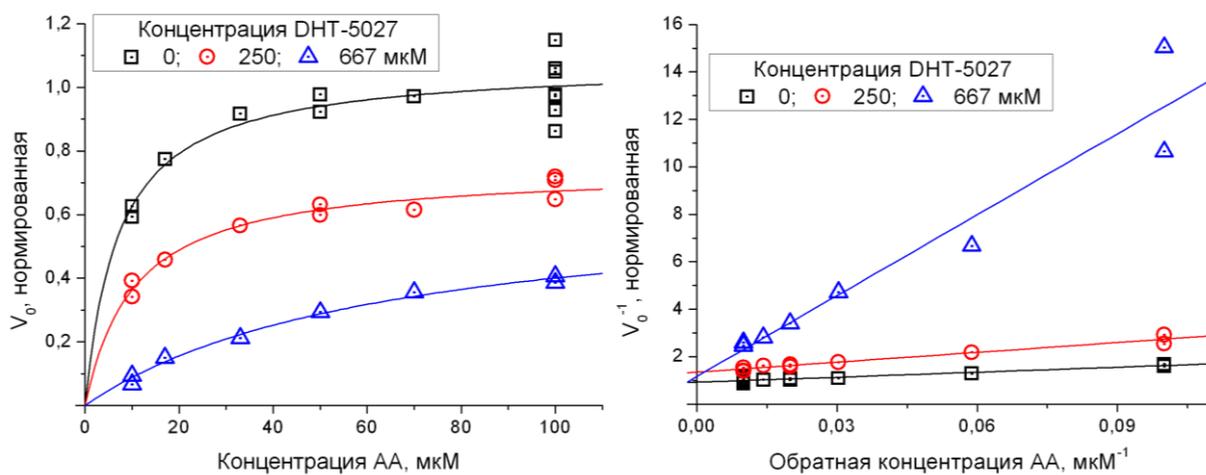


Рис. 24. Зависимость начальной скорости PGHS от концентрации субстрата (арахиновой кислоты) при различных концентрациях DHT-5027 (№3 в табл. 5). Реакция инициировалась добавлением фермента.

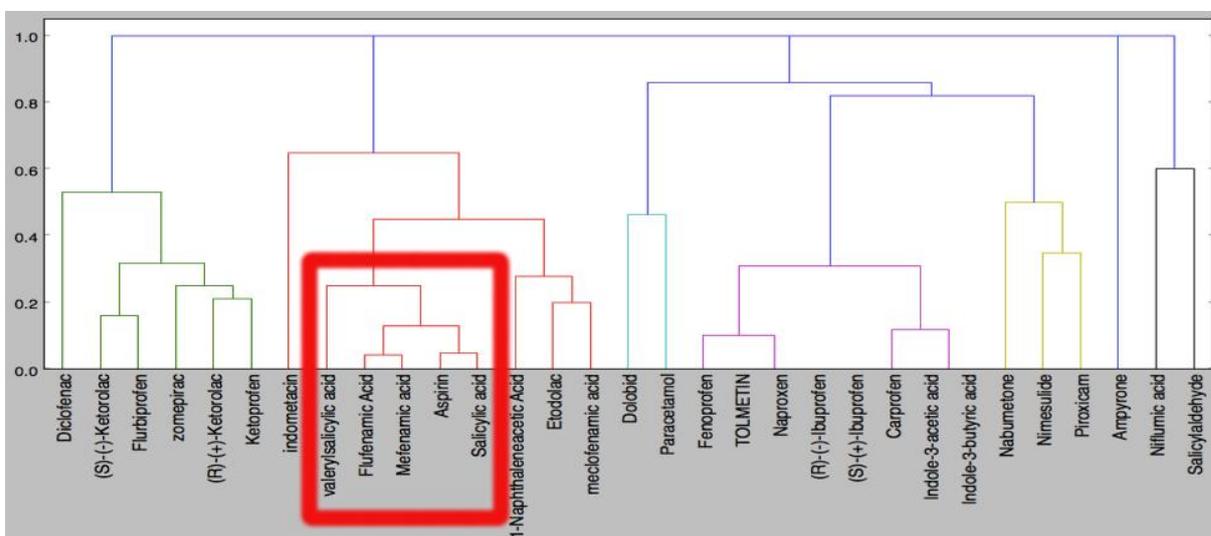
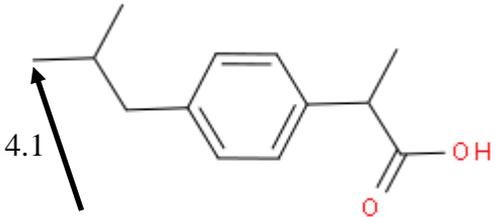
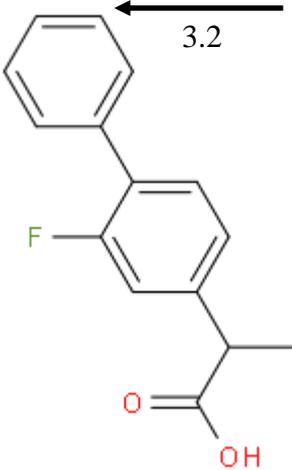
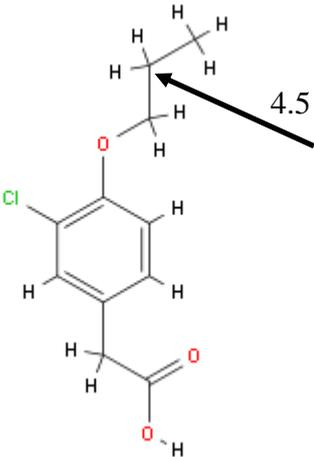
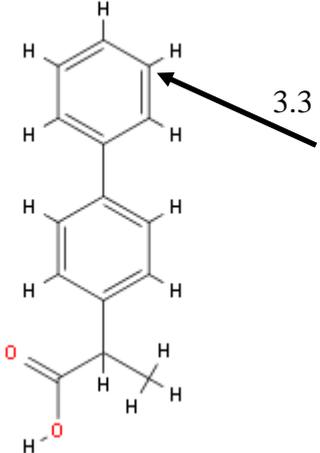
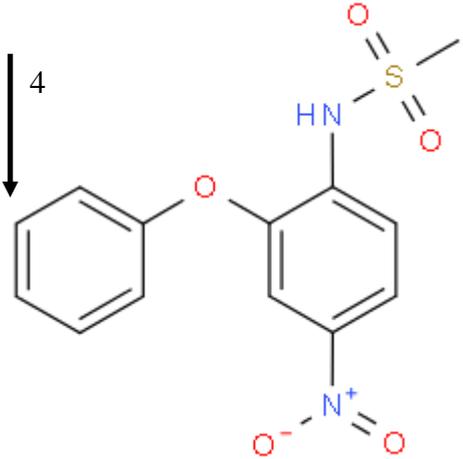
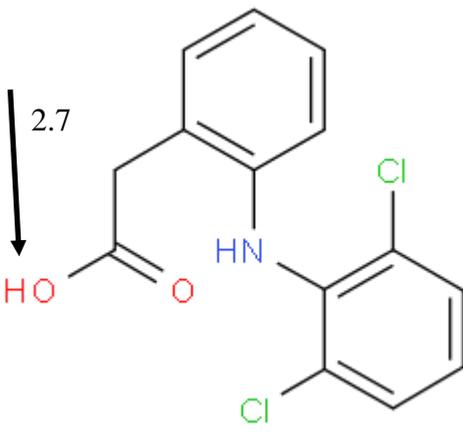


Рис. 25. Дендрограмма, полученная в результате иерархической кластеризации лигандов на основании сходства их связей с активным центром. Высота ветвей, соединяющих кластеры (лиганды), соответствует расстоянию между кластерами (лигандами). Отсутствие ветви, отходящей от лиганда, означает нулевое расстояние между ним и соседом (соседями). Красной рамкой выделен «кластер аспирина».

Структура (PDB ID)	Ингибитор	Формула (стрелочками указаны атомы, находящиеся рядом с кислородом фенольной группы Tyr385, цифрами указано расстояние между ними в ангстремах)
1EQG	Ibuprofen	 <p>The diagram shows the chemical structure of Ibuprofen. A black arrow points from the carboxylate oxygen atom to a specific carbon atom in the propyl chain, with the number 4.1 written next to it, indicating the distance in Angstroms.</p>
1EQH	Flurbiprofen	 <p>The diagram shows the chemical structure of Flurbiprofen. A black arrow points from the carboxylate oxygen atom to a phenyl ring, with the number 3.2 written next to it, indicating the distance in Angstroms.</p>
1HT8	(3-chloro-4-propoxy-phenyl)-acetic acid	 <p>The diagram shows the chemical structure of (3-chloro-4-propoxy-phenyl)-acetic acid. A black arrow points from the carboxylate oxygen atom to a hydrogen atom on the propoxy group, with the number 4.5 written next to it, indicating the distance in Angstroms.</p>

1Q4G	2-(1,1'-biphenyl-4-yl)propanoic acid	 <p>The structure shows two phenyl rings connected at their 1-positions. The top ring has a hydrogen atom at the 2-position, which is indicated by an arrow and the number 3.3. The bottom ring is connected to a propanoic acid chain at its 4-position.</p>
3N8X	Nimesulide	 <p>The structure consists of a central benzene ring with an ether linkage (-O-) to another benzene ring on the left. On the right, there is a sulfonamide group (-NH-SO₂-) and a nitro group (-NO₂).</p>
3N8Y	Diclofenac	 <p>The structure features a central benzene ring with a propionic acid side chain (-CH₂-CH₂-COOH) and a 2,6-dichlorophenylamino group (-NH-C₆H₃(Cl)₂) attached to it.</p>

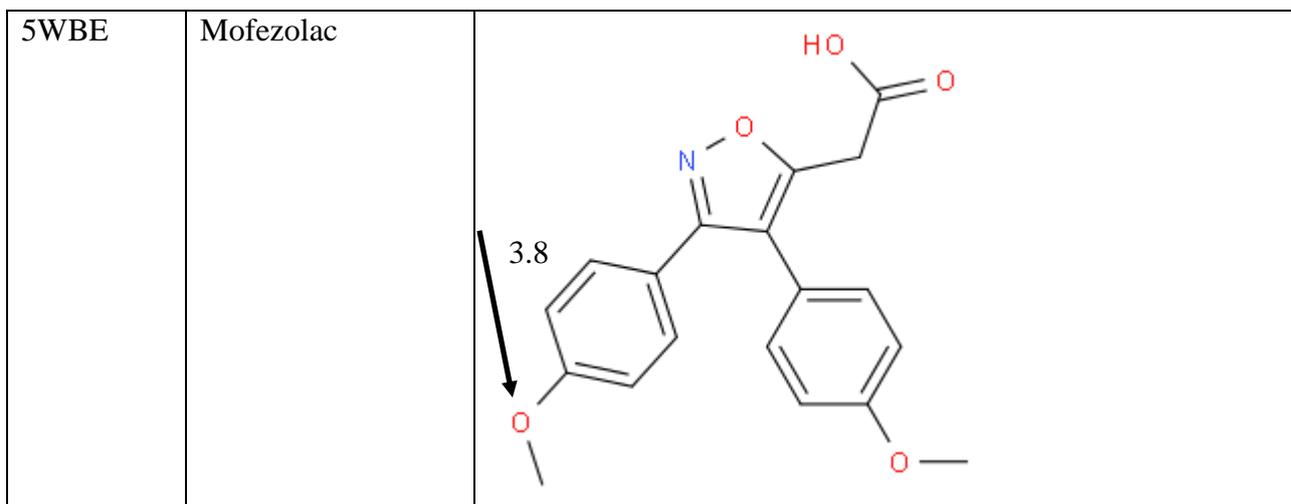


Табл. 6. Контакты ингибиторов с Tyr385 в активном центре PGHS.

a)	б)
----	----

Рис. 26. а) Модель синергичного ингибирования PGHS. K_A – константа ингибирования димера ЕЕ ингибитором А. K_B – константа ингибирования димера ЕЕ ингибитором В. K_{AA} , K_{AB} – константы ингибирования комплекса АЕЕ ингибиторами А и В соответственно. K_{BA} , K_{BB} – константы ингибирования комплекса ЕЕВ ингибиторами А и В соответственно. б) Условия синергичности ингибиторов А и В.