

Полученные в 2016 году важнейшие результаты

1) Теоретические модели ферментативного катализа для простагландин-Н-синтазы

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. 1). В отсутствие кооперативных взаимодействий (при равенстве соответствующих кинетических констант) кооперативная модель переходит в простейшую одностадийную модель обратимого взаимодействия ингибитора с активным центром мономера.

В рамках модели получено математическое решение, удобное для описания кинетических экспериментов по ассоциации (когда в реакцию 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.

Также было показано, что при определенном соотношении равновесных констант ($K_2 \gg K_1$) порождаемые кооперативной моделью кинетические закономерности (как в состоянии равновесия, так и для кинетики) с высокой точностью описываются гетерогенной моделью (предусматривающей присутствие в реакционной смеси двух форм фермента с константами ингибирования $K_\alpha = K_1/2$, $K_\beta = 2 \cdot K_2$).

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. 2), 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.

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. По результатам работы опубликована статья в журнале Биофизика (2016 г.).

2) Анализ кинетических механизмов ингибирования PGHS для ибупрофена, индометацина, диклофенака, кеторолака

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

Показано, что для индометацина, диклофенака и кеторолака развивающееся во времени взаимодействие фермента с ингибитором может быть адекватно определено путем измерения скорости циклооксигеназной реакции после ее инициирования путем добавления арахидоновой кислоты в реакционную среду, так как относительно медленные процессы диссоциации фермент-ингибиторных комплексов не способны повлиять на соотношения этих комплексов за времена измерения начальной скорости ферментативной реакции, а быстрые обратимые стадии взаимодействия с ферментом для этих ингибиторов отсутствуют. Для ибупрофена такой подход не применим (рис. 4), и для этого ингибитора анализ кинетики взаимодействия осуществляли с поправками на диссоциацию фермент-ингибиторных комплексов.

Показано, что исследуемые ингибиторы полностью обратимы (рис. 5), и для их исследования применимы разработанные нами кинетические схемы. Получены экспериментальные зависимости относительной активности от времени при диссоциации и ассоциации фермента с различными концентрациями ингибиторов (рис. 6) и от концентрации ингибитора в равновесных условиях (рис. 7). Полученные кинетические константы приведены в табл. 1 (для наглядности туда включены и полученные ранее данные для напроксена, описываемые кооперативной моделью). Полученные результаты были опубликованы в журнале Acta Naturae (2 публикации за 2016 г.). Нами показано, что, замедляя начальную скорость реакции, различные ингибиторы по-разному влияют на константу скорости инактивации в процессе реакции и, таким образом, на предельный выход продукта реакции.

Исследованные ингибиторы можно условно разделить на три группы.

1) Кеторолак и индометацин снижают начальную скорость реакции, но почти не изменяют предельный выход продукта реакции. Это можно объяснить сравнимыми временами диссоциации фермент-ингибиторного комплекса в процессе ферментативной реакции и инактивации не связанного с ингибитором фермента в процессе реакции, вследствие чего практически все молекулы фермента имеют возможность проявить каталитическую активность за время протекания реакции.

2) Диклофенак симбатно снижает начальную скорость и предельный выход продукта реакции. Одно из возможных объяснений – кооперация активных центров мономеров фермента при связывании ингибитора и субстрата.

3) Ибупрофен и напроксен в низкой концентрации снижают начальную скорость реакции, но повышают предельный выход продукта реакции. Данный факт может быть объяснён аллостерическими эффектами, а именно уменьшением константы скорости инактивации для одной субъединицы фермента при связывании ингибитора со второй. Для напроксена доказано наличие кооперативности при связывании с PGHS (рис. 8), для ибупрофена наличие кооперативности предполагается.

Для исследования влияния наличия мицеллярной фазы на взаимодействие фермента с ингибиторами 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 PGH-синтазной реакции. Содержание арахидоновой кислоты и твина-20 в экспериментах подбирали таким образом, чтобы сохранить примерно постоянную концентрацию арахидоновой кислоты как в мицеллярной фазе (около 100 мМ), так и в водной фазе. Было показано, что изменение содержания мицеллярной фазы влияет и на скорость связывания ингибитора с ферментом (рис. 9), и на эффективность ингибирования напроксеном в равновесных условиях (рис. 10). 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. Напроксен по отношению к твину, похоже, качественно ведёт себя так же, как и арахидоновая кислота. Исследование влияния соотношения на кинетику PGHS-1 в водно-мицеллярной среде опубликовано в 2016 г. в журнале *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*.

3) Поиск новых ингибиторов простагландин-Н-синтазы методом докинга, проверка *in vitro*

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*) провели минимизацию энергии структур PGHS в программе моделирования молекулярной динамики NAMD в силовом поле CHARMM.

Была составлена тестовая выборка из 57 веществ (известных ингибиторов и неингибиторов) и проведён докинг с помощью программ AutoDock и SOL. Результаты докинга были ранжированы по значению скоринг-функции (чем оно меньше, тем выше сродство лиганда к белку и вероятнее проявление ингибирующих свойств) (табл. 3). Значение показателя EV (enrichment value), характеризующего качество докинга, составило 0.79 для выборки, ранжированной с помощью AutoDock и 0.91 для выборки, ранжированной с помощью SOL (рис. 11) (для случайной и идеальной выборок EV соответственно равно 0.5 и 1). Для дальнейшей работы использовали программу SOL.

Далее с помощью суперкомпьютера МГУ «Ломоносов» был проведён скрининг базы лигандов ACB Blocks (6150 соединений). 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. 4) были проверены экспериментально. Лиганды №3, 4, 9 из табл. 4 проявляют достаточно выраженное ингибирующее воздействие. Для всех выявленных ингибиторов активность не зависела от времени инкубации (пример на рис. 12). 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. 13). Константа ингибирования (K_i) равна примерно 80 мкМ.

Приложение

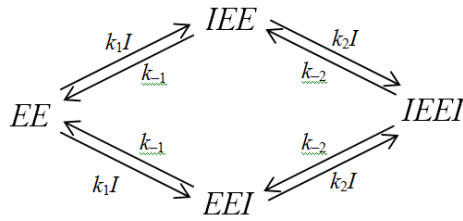


Рис. 1. Модель взаимодействия гомодимерного фермента с ингибитором, учитывающая возможные кооперативные взаимодействия между мономерами.

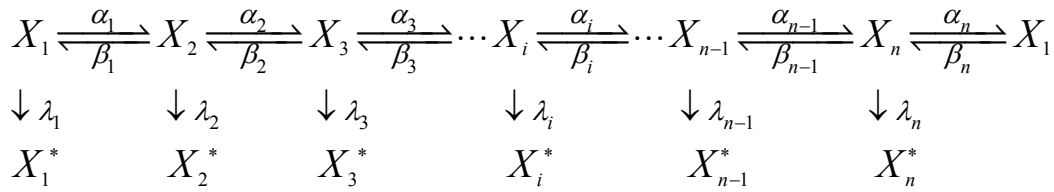


Рис. 2. Общий механизм неразветвленной многосубстратной ферментативной реакции, интермедиаты которой могут подвергаться необратимой инактивации. Здесь X_j ($j = \overline{1, n}$) – каталитически активные промежуточные формы фермента (интермедиаты), X_j^* – инактивированные формы фермента, α_j и β_j ($j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

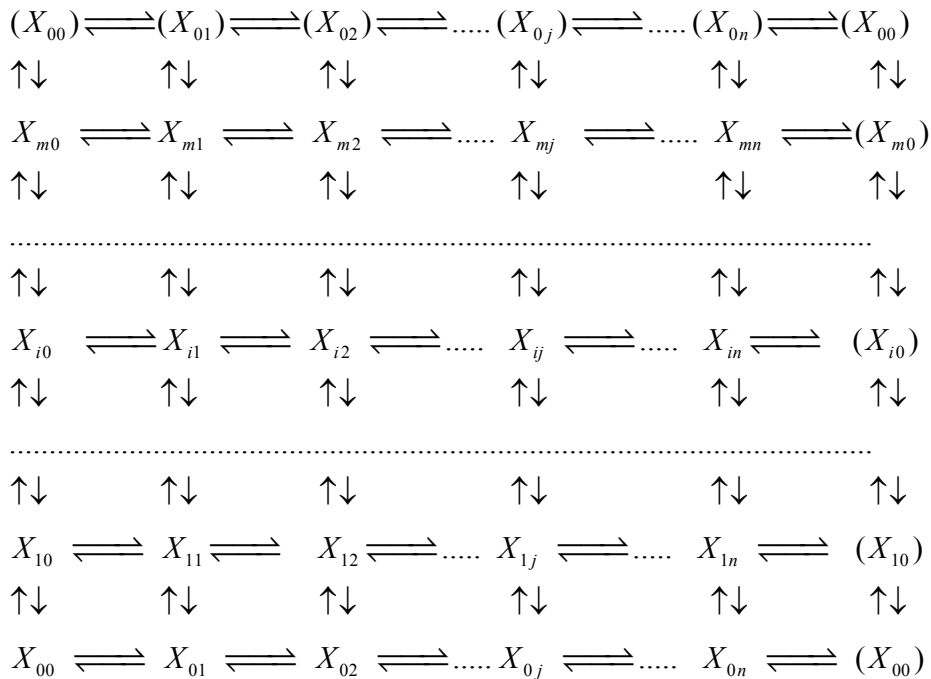


Рис. 3. Обобщённая двумерная схема одновременного протекания двух реакций А и В, катализируемых бифункциональным ферментом. Здесь X_{ij} – промежуточная форма фермента, i – индекс состояния активного центра А, j – индекс состояния активного центра В.

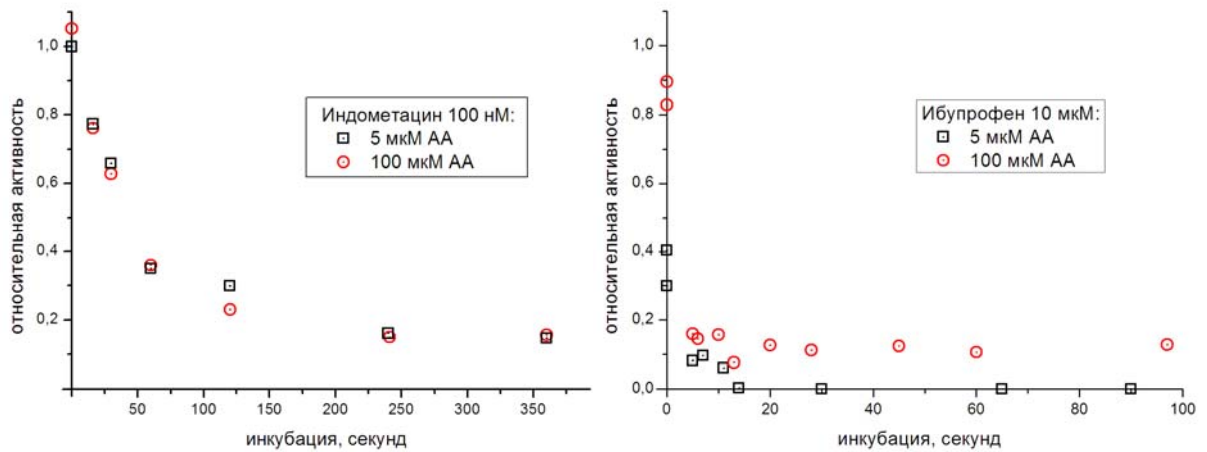


Рис. 4. Зависимость относительной активности PGHS от времени инкубации с индометацином (слева) и ибупрофеном (справа) для разных концентраций субстрата.

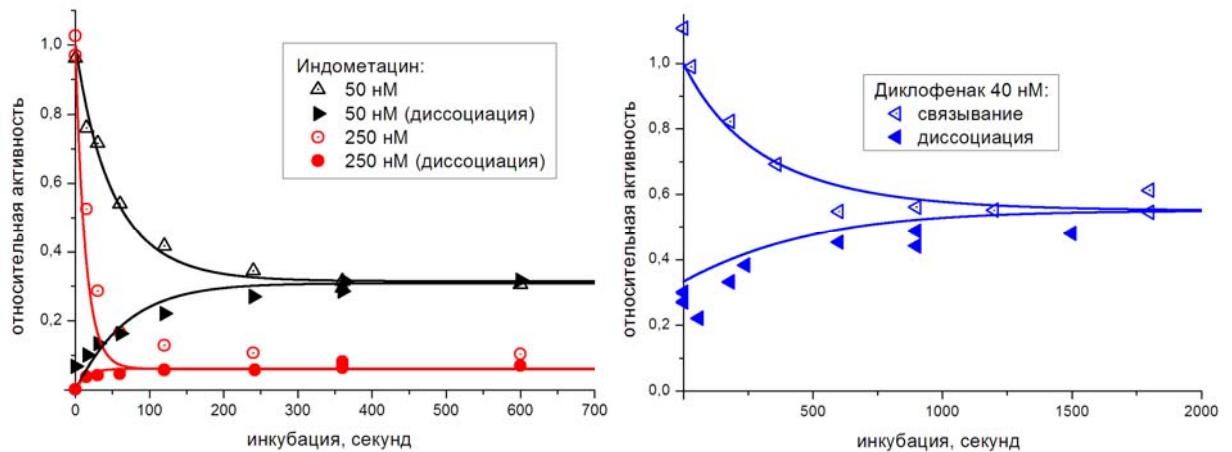


Рис. 5. Зависимость относительной активности PGHS от времени инкубации с индометацином (слева) и диклофенаком (справа) в случае ассоциации и диссоциации фермент-ингибиторного комплекса.

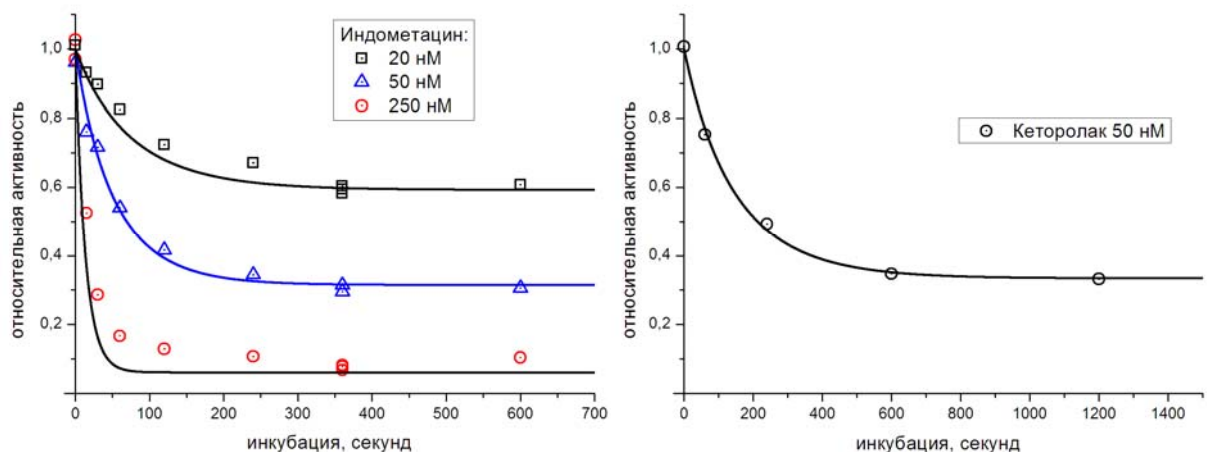


Рис. 6. Зависимость относительной активности PGHS от времени инкубации с индометацином (слева) и кеторолаком (справа) в случае ассоциации.

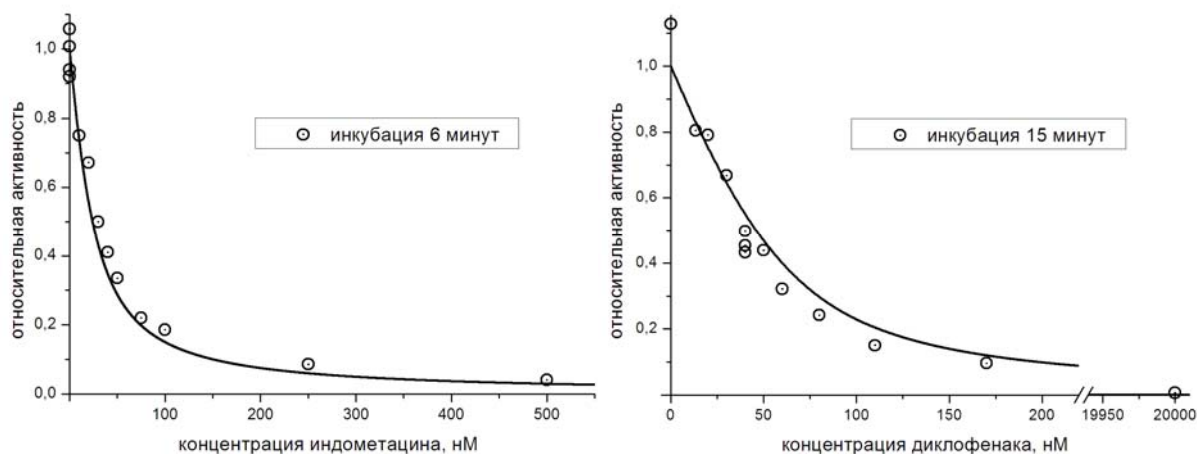


Рис. 7. Зависимость относительной активности PGHS от концентрации ингибитора в равновесных условиях на примере индометацина (слева) и диклофенака (справа).

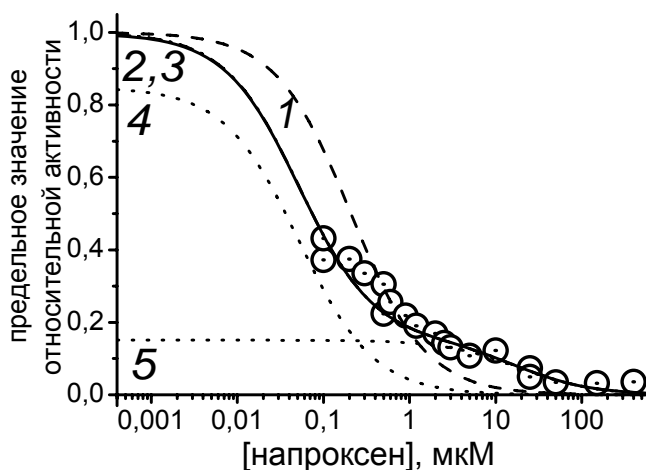


Рис. 8. Зависимость предельного значения относительной активности от концентрации напроксена. Время прединкубации фермента с ингибитором в реакционной ячейке составляло 2 минуты, концентрация арахидоновой кислоты 100 мкМ. Линии на графике соответствуют аппроксимации экспериментальных данных согласно простейшей модели – линия 1, кооперативной и гетерогенной моделей – линии 2 и 3. Для наглядности на графике приведены точечные линии, построенные с использованием уравнения для гетерогенной модели для константы K_α (линия 4) и K_β (линия 5) отдельно для каждого слагаемого, входящего в это уравнение.

ингибитор	K_1 нМ	k_1 (мм*с) ⁻¹	K_2 нМ	k_2 (мм*с) ⁻¹	γ	t мин
ибупрофен	770	150				0,5
напроксен	100	84	9200	15	0,31	2
индометацин	15	290				6
кеторолак	16	100				10

Табл.1. Кинетические константы для разных ингибиторов, а также время, достаточное для образования фермент-ингибиторного комплекса (считалось, что по прошествии этого времени система находится в равновесии). Экспериментальные измерения проводили при 25°C в 50 мМ трис-НСl буфере, при pH = 8, 0,1% твин-20, 2 мкМ гемина, 1 мМ ферроцианида калия, 100 мкМ арахидоновой кислоты (АА) и 270 мкМ кислорода.

[tween-20], % V/V	АА, мкМ (на весь объём)	АА, мМ (в мицеллярной фазе)
0,021	20	95,2
0,101	100	99
0,501	500	99,8
1,501	1500	99,9

Табл. 2. Концентрация арахидоновой кислоты в реакционной системе в зависимости от содержания мицеллярной фазы.

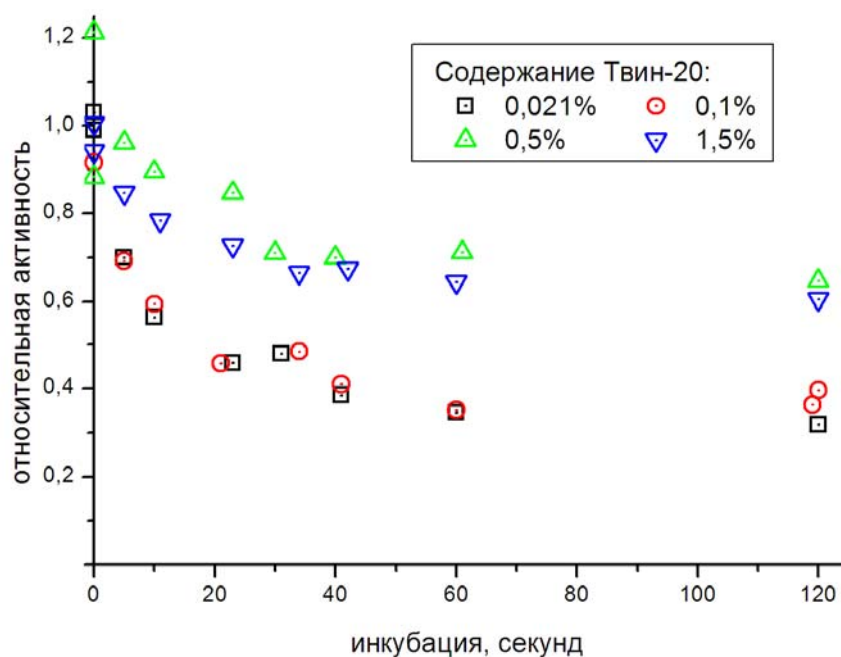


Рис. 9. Зависимость относительной активности PGHS от времени прединкубации для разного содержания детергента.

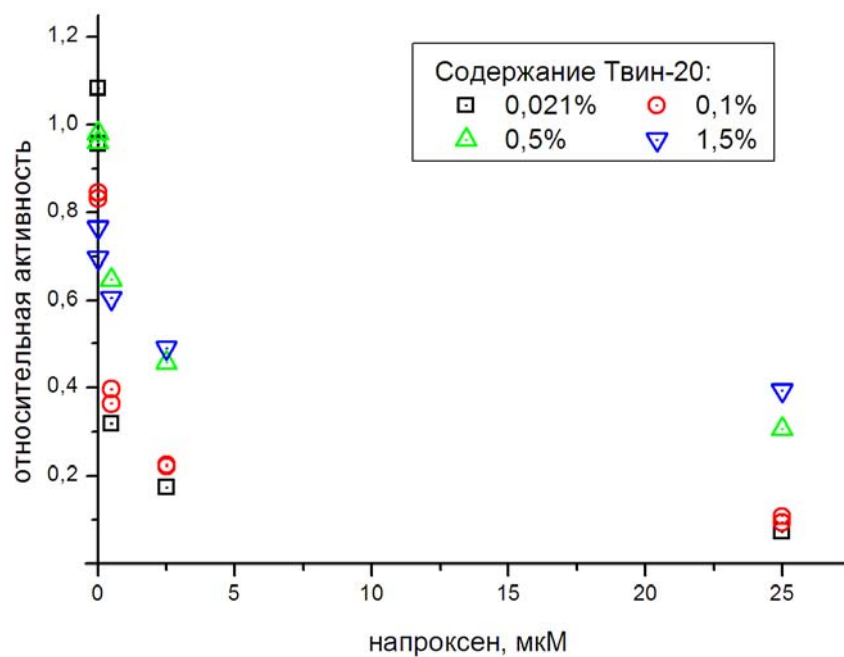


Рис.10. Зависимость относительной активности PGHS от концентрации напроксена для разного содержания детергента. Время инкубации – 2 мин.

№ п/п	Тип	dG, ккал/моль	№ п/п	Тип	dG, ккал/моль
1	MAX	-10,2	1	MAX	-6,8
2	NOT	-9,8	2	MAX	-6,7
3	MAX	-9,6	3	MAX	-6,6
4	NOT	-9,5	4	MAX	-6,6
5	MAX	-9,5	5	MAX	-6,5
6	MAX	-9,5	6	MAX	-6,4
7	MAX	-9,3	7	MAX	-6,3
8	MAX	-9,3	8	MAX	-5,9
9	MAX	-9,0	9	MAX	-5,8
10	NOT	-8,9	10	MAX	-5,7
11	MAX	-8,9	11	MAX	-5,6
12	MAX	-8,7	12	MAX	-5,2
13	MAX	-8,7	13	MAX	-4,9
14	MAX	-8,4	14	NOT	-4,9
15	MAX	-8,4	15	MAX	-4,6
16	MAX	-8,4	16	MAX	-4,5
17	MAX	-8,4	17	NOT	-4,4
18	MAX	-8,4	18	MAX	-4,0
19	MAX	-8,4	19	MAX	-3,9
20	MAX	-8,1	20	MAX	-3,9
21	MAX	-8,0	21	MAX	-3,7
22	MAX	-7,9	22	MAX	-3,7
23	MAX	-7,9	23	MAX	-3,6
24	MAX	-7,5	24	MAX	-3,6
25	MAX	-7,4	25	MID	-3,5
26	MAX	-7,2	26	MAX	-3,5
27	NOT	-6,8	27	MID	-3,5
28	MAX	-6,7	28	MAX	-3,3
29	MAX	-6,7	29	MID	-3,3
30	NOT	-6,3	30	MAX	-3,2
31	NOT	-6,1	31	MID	-3,1
32	MAX	-6,0	32	MAX	-2,9
33	NOT	-5,7	33	NOT	-2,9
34	MAX	-5,6	34	NOT	-2,8
35	MAX	-5,4	35	MID	-2,6
36	NOT	-5,3	36	NOT	-2,4
37	NOT	-5,3	37	NOT	-2,4
38	MID	-5,1	38	NOT	-2,3
39	MID	-4,8	39	NOT	-2,3
40	MID	-4,5	40	NOT	-2,3
41	NOT	-4,3	41	NOT	-2,2
42	NOT	-3,8	42	NOT	-2,2
43	NOT	-3,7	43	NOT	-2,0
44	NOT	-3,4	44	MID	-2,0
45	NOT	-3,2	45	NOT	-2,0
46	NOT	-3,1	46	NOT	-2,0
47	MID	-3,1	47	NOT	-1,9
48	MID	-3,1	48	NOT	-1,8
49	NOT	-2,9	49	NOT	-1,7
50	NOT	-2,6	50	MAX	-1,5
51	NOT	-2,4	51	NOT	-1,4
52	MID	-2,3	52	NOT	-1,4
53	NOT	-2,3	53	NOT	-1,0
54	NOT	-2,2	54	MAX	-0,8
55	NOT	-2,1	55	NOT	-0,6
56	NOT	-1,8	56	NOT	1312,2
57	NOT	-1,7	57	NOT	2305,7

Табл. 3. Ранжирование тестовой выборки лигандов по результатам докинга с помощью программы Autodock (слева) и SOL (справа). Синим выделены известные ингибиторы, оранжевым – известные неингибиторы. Чем меньше значение скоринг-функции dG, тем выше ранг (номер в таблице).

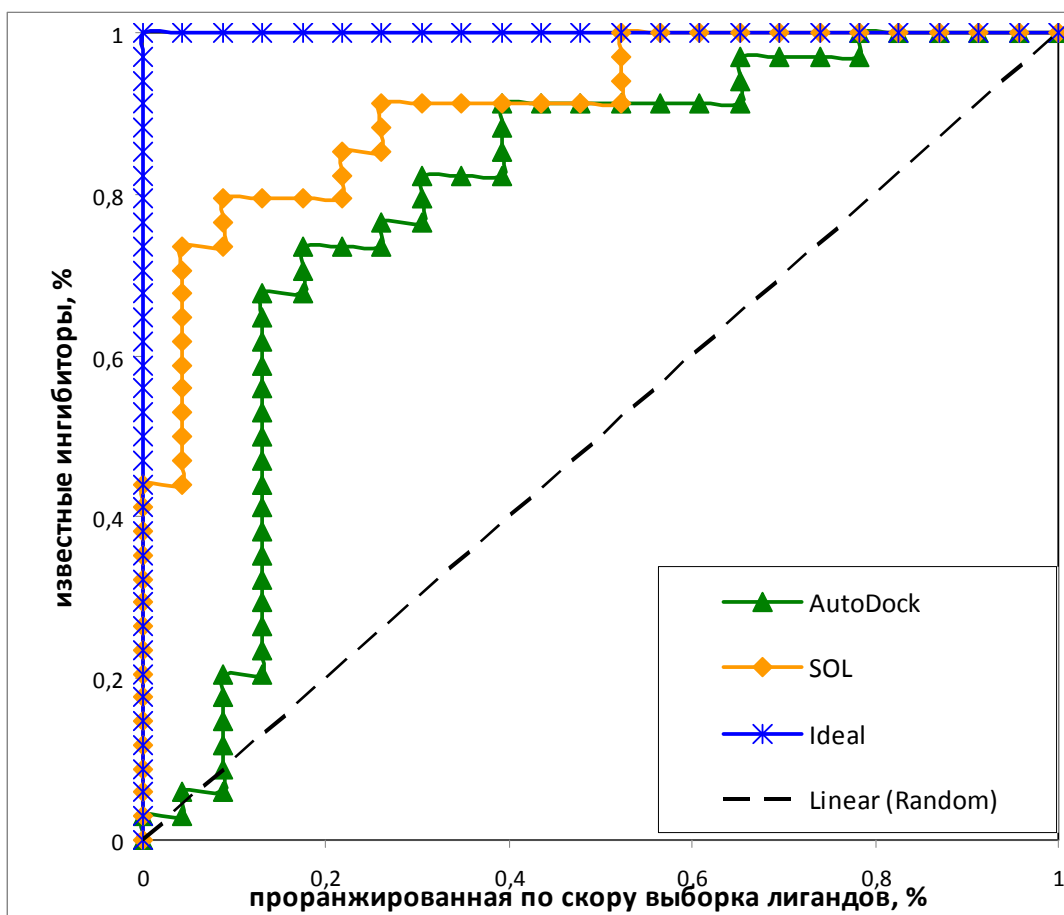
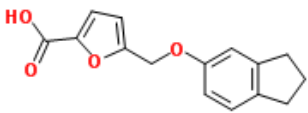
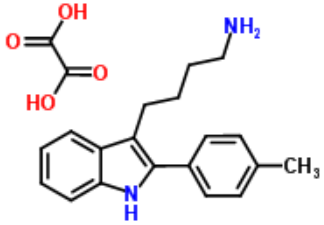
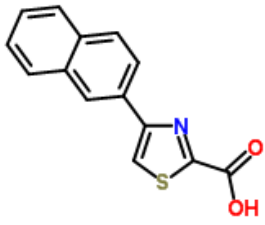
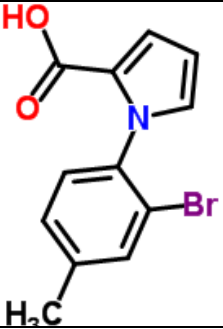
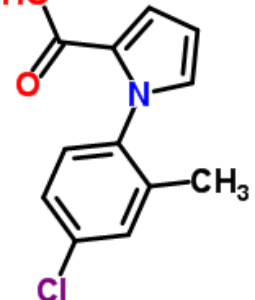


Рис. 11. Сравнение качества докинга для Autodock и SOL на примере тестовой выборки. По осям абсцисс и ординат – доля известных неингибиторов и ингибиторов от их общего числа соответственно для произвольного количества лигандов, взятого с начала ранжированной выборки (см. табл. 3). Например, для идеальной выборки (синим) в начале должны идти только ингибиторы, а далее – только неингибиторы. Значение показателя EV (enrichment value) равняется площади под графиком.

№	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-yl)oxy)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	

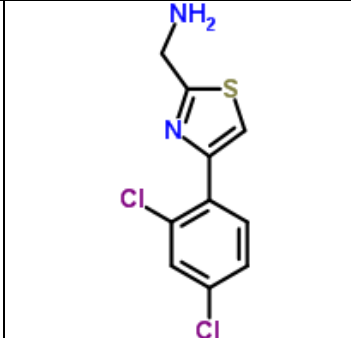
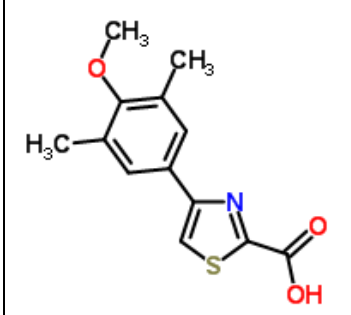
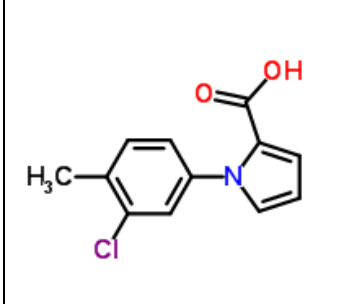
7	TMA-0015 (ACB blocks) 4376502 (ChemSpider ID) ZINC03709646 (ZINC ID)	-6,24407	[4-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazol-2-yl]methanamine	
8	CTZ-0060 (ACB blocks) 21468116 (ChemSpider ID) ZINC12404817 (ZINC ID)	-6,23549	4-(4-methoxy-3,5-dimethylphenyl)-1,3-thiazole-2-carboxylic acid	
9	2PA-0039 (ACB blocks)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

Табл. 4. Вещества из списка лучших находок программы SOL по результатам скрининга лигандов из базы ACB Blocks для минимизированной структуры PGHS-1 (код PDB – 1EQH).

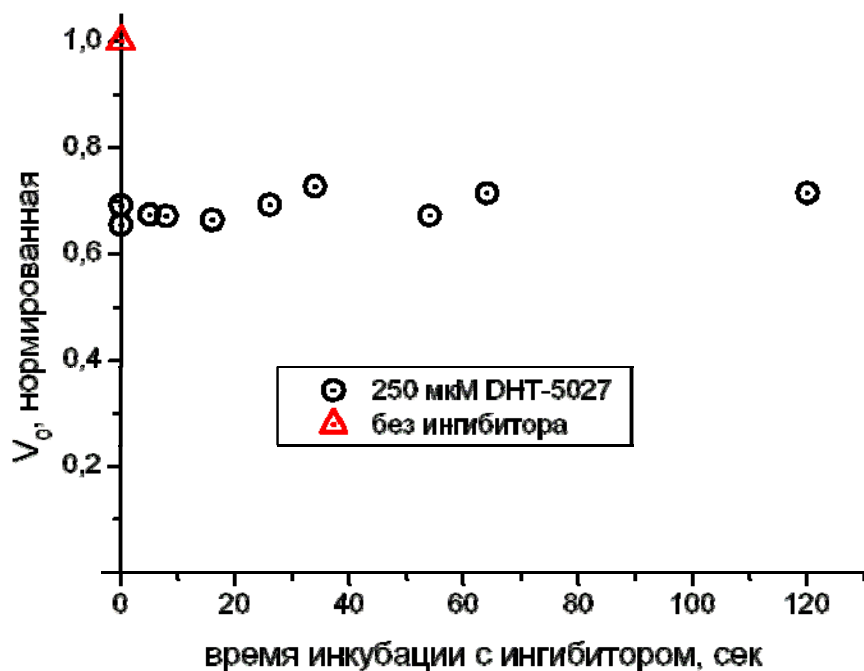


Рис. 12. Зависимость относительной активности PGHS от времени инкубации с DHT-5027.

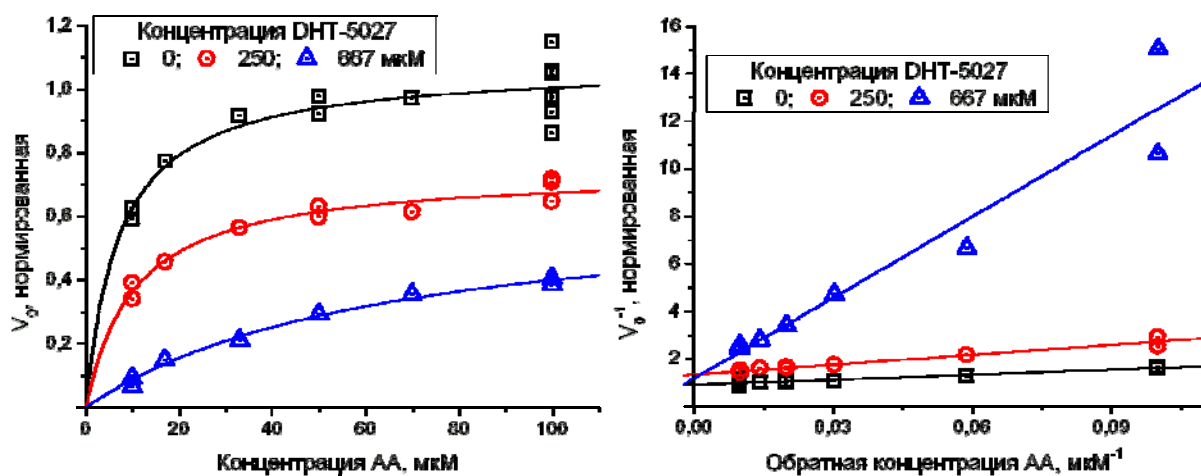


Рис. 13. Зависимость относительной активности PGHS от концентрации субстрата (арахионовой кислоты) при различных концентрациях DHT-5027. Реакция инициировалась добавлением фермента.