

ОРГАНИЧЕСКИЙ ОСМОЛИТ БЕТАИН ЭФФЕКТИВНО НЕЙТРАЛИЗУЕТ ВРЕДНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ДИКЛОФЕНАКА НА СТРУКТУРУ И СТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА

© 2023 г. М. Башируддин*, Н. Ахмед*, Х. Алам Хан*, Ш. Джамал*, #

*Школа наук о жизни Института науки и техники имени Б.С. Абдур Рахмана (Институт Полумесяца), Вандакур, Ченнаи, Тамил-Наду, 600048, Индия

#E-mail: shazja.sls@crenscent.education

Поступила в редакцию 28.01.2022 г.

После доработки 16.02.2022 г.

Принята к публикации 09.11.2022 г.

Понимание физико-химических основ взаимодействия фармакофоров с белками необходимо для выработки стратегии синтеза лекарств направленного действия. В данном исследовании исследовались эффекты нестероидного противовоспалительного средства диклофенака натрия на стабильность и структуру бычьей панкреатической РНКазы А, взятой в качестве модельного фермента, методами тепловой денатурации, кругового дихроизма, собственной флуоресценции и докинга. Поскольку взаимодействие с белком — это важный фармакокинетический параметр вещества, было важно изучить эффект диклофенака натрия на структуру и стабильность белка. При оценке термодинамических параметров наблюдалась дестабилизация РНКазы А в присутствии диклофенака натрия согласно значениям средней точки тепловой денатурации и изменения свободной энергии Гиббса при 25°C, в то время как добавление осмолитов стабилизировало белок. В присутствии диклофенака натрия и осмолита наблюдалось изменение в третичной, но не во вторичной структуре белка. Исследование флуоресценции показало снижение интенсивности, подтверждающее эффект тушения флуоресценции РНКазы А диклофенаком натрия и осмолитами. Метод молекулярного докинга позволил показать участие водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий в связывании РНКазы А с диклофенаком натрия. Активность фермента РНКазы А снижается в присутствии диклофенака натрия, в то же самое время осмолит позволяет восстановить активность, повышая значение константы катализа и снижая величину константы Михаэлиса. Это исследование позволяет создать платформу для применения комбинированной терапии диклофенаком натрия и осмолитами, чтобы уменьшить вредное побочное воздействие диклофенака натрия.

Ключевые слова: РНКазы А; тепловая денатурация; осмолиты; диклофенак.

DOI: 10.31857/S0006302923030043, EDN: FQGCXE

Взаимодействие «лекарство—белок» — важный фармакокинетический параметр лекарства. Показано, что связывание лекарств с различными белками имеет существенное влияние на фармакокинетику веществ, в частности, на скорость метаболизма и почечный клиренс. Для разных лекарств, в частности, для нестероидных противовоспалительных средств показано обратимое связывание с белками плазмы [1]. Подобно другим нестероидным противовоспалительным

средствам, для диклофенака натрия (ДКФ) показано взаимодействие с альбумином и другими белками сыворотки [2]. РНКазы А — это хорошо охарактеризованный глобулярный мономерный белок (длина 124 аминокислотных остатка, молекулярная масса 14.3 кДа) с шестью остатками тирозина и четырьмя присутствующими в норме дисульфидными связями, обеспечивающими стабильность структуры [3]. Вследствие своей стабильной природы РНКазы А широко используется в различных исследованиях стабильности и сворачивания белков [4]. Осмолиты — это низкомолекулярные органические молекулы, для которых показано накопление *in vivo* в ответ на стрессовые условия окружающей среды [5]. Такие осмолиты, как бетаин, полиолы, сахара и полиамины накапливаются в растительных и жи-

Сокращения: ДКФ — диклофенак натрия, T_m — средняя точка тепловой денатурации, ΔG_D° — изменение свободной энергии Гиббса при 25°C, ΔC_p — изменение теплоемкости при постоянном давлении, КД — круговой дихроизм, УФ — ультрафиолетовый, K_m — константа Михаэлиса, k_{cat} — константа катализа.

вотных тканях во время осмотического стресса [6]. Эти осмолиты увеличивают термодинамическую стабильность макромолекул без негативного действия на их нативную функциональную активность [7]. Для них показана способность стабилизировать белки и обращать вспять процессы агрегации и неправильного сворачивания белков [8]. Также они продемонстрировали увеличение стабильности белков путем различных механизмов [9,10]. Действие по типу химического шаперона, характерное для таких осмолитов, как три-метиламин-N-оксид и бетаин, используется для облегчения надлежащего сворачивания рекомбинантных белков, в то время как гуанидин гидрохлорид и мочевины облегчают ренатурацию и активацию телец включения [5]. В данном исследовании были проанализированы эффекты ДКФ на структурные и функциональные свойства РНКазы А. В дальнейшем будут предприняты попытки выяснить, ослабляют ли осмолиты денатурирующее действие ДКФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Лиофилизированный препарат РНКазы А был приобретен в Sigma Chemical Co (США). Диклофенак, какодиловая кислота, глицин, саркозин, бетаин и диализные трубки также приобретались в Sigma Chemical Co (США). KCl приобретали в компании SRL. Все реактивы были аналитической чистоты и использованы без дальнейшей очистки.

Приготовление белкового раствора. Раствор РНКазы А диализовали против 0.1 М KCl (pH 7.0) при 4°C. Стоковый раствор РНКазы А фильтровали через фильтр 0.45 мкм, его концентрацию определяли экспериментально, принимая молярный коэффициент экстинкции ϵ при 277.5 нм за $9800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [11]. Осмолиты готовили на какодильном буферном растворе, pH 7.0. Все растворы для оптических измерений готовили в дегазированном буферном растворе какодиловой кислоты (50 мМ), содержащем 0.1 М KCl. pH измеряли после эксперимента по денатурации, наблюдали незначительное изменение pH (0.00–0.06).

Эксперименты по денатурации. Исследования тепловой денатурации проводили с помощью спектрофотометра V-730 UV/VIS (Jasco, Япония) с Пельтье-термостатом ETCS-761. Все образцы подвергали тепловой денатурации при температуре от 20 до 85°C со скоростью нагрева 1°C/мин, достаточной для уравнивания системы, и регистрировали поглощение при 287 нм. Данные после тепловой денатурации образцов сохраняли, значения поглощения преобразовывали в разностный коэффициент молярной экстинкции $\Delta\epsilon_\lambda$ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Все кривые индуцированного на-

гревом перехода строили в осях « $\Delta\epsilon$ — температура». Анализ кривых перехода проводили путем параболической аппроксимации, причем величины средней точки тепловой денатурации (T_m) и H_m определяли по этим графикам согласно ранее описанному методу [12]. Значение изменения теплоемкости при постоянном давлении (ΔC_p , ккал/моль/К) было принято за 1.20 ± 0.05 ккал/моль для РНКазы А [13]. Используя значения T_m и ΔH_m , рассчитывали значения $\Delta G_D(T)$ (ΔG_D для произвольной температуры) по уравнению Гиббса–Гельмгольца [12]. Спектры кругового дихроизма (КД) РНКазы А в ближней и дальней ультрафиолетовой (УФ) областях измеряли на спектрополяриметре J-810 (Jasco, Япония) с термостатом PTC-424S. Для снятия спектров КД в дальней УФ-области использовали длину оптического пути 1 мм, для ближней УФ-области — 10 мм. При каждой длине волны среднее значение эллиптичности ($\text{град}\cdot\text{см}^2\cdot\text{дмоль}^{-1}$) преобразовывали сигналом КД [14]. Растворы 10 мкМ ДКФ и 20 мкМ РНКазы А смешивались с 1 М каждого осмолита.

Исследование собственной флуоресценции. Спектры собственной флуоресценции РНКазы А регистрировали при различных концентрациях ДКФ (от 2 до 10 мкМ) по крайней мере в трех повторностях на флуоресцентном спектрометре LS 55 (Perkin Elmer, США). В дальнейшем такие же эксперименты проводили в присутствии 0.1–1.0 М каждого из трех осмолитов и 10 мкМ ДКФ. Использовали концентрацию РНКазы А в 20 мкМ. Спектры эмиссии флуоресценции наблюдали, измеряя собственную флуоресценцию в диапазоне от 290 до 400 нм при длине волны возбуждающего света 278 нм. Ширина щели для возбуждения и эмиссии была равна 5 нм.

Молекулярный докинг. Молекулярный докинг проводили с использованием трехмерной структуры РНКазы А (PDB ID: 1FS3) в программе Autodock 4.2. Файл ДКФ получали из базы данных PubChem (PubChem CID: 5018304) в расширении .sdf и переводили в формат PDB с помощью программы OpenBabel. Заряды к атомам лиганда добавляли по схеме Кольмана. неполярные атомы водорода удаляли («сливали» с тяжелыми атомами), определяли количество торсионных степеней свободы. Расчеты докинга проводили на модели белка, преобразованной следующим образом: необходимые атомы водорода, заряды атомов по схеме Кольмана и параметры сольватации добавляли с помощью программы AutoDock Tools. Использовали ячейку $60 \times 60 \times 60 \text{ \AA}$ точек с шагом $0.375 \text{ \AA}$, сгенерированную в программе AutoGrid. Параметры программы

Таблица 1. Термическая денатурация РНКазы А в присутствии осмолитов и ДКФ при pH 7.0

	T_m , °C	ΔG_D° , ккал·моль ⁻¹)
ДКФ (мкМ)		
0.00	63.0	10.41
05.0	61.5	9.84
10.0	60.0	9.26
Глицин (М)		
0.00	63.0	10.41
0.50	63.6	10.75
1.00	64.4	10.81
Саркозин (М)		
0.00	63.0	10.41
0.50	63.8	10.69
1.00	65.1	11.24
Бетаин (М)		
0.00	63.0	10.41
0.50	64.9	11.14
1.00	66.4	11.59
Глицин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	60.0	9.26
0.50	62.8	10.15
1.00	63.9	10.96
Саркозин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	60.0	9.26
0.50	63.4	10.63
1.00	64.1	11.03
Бетаин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	60.0	9.26
0.50	64.1	10.81
1.00	65.6	11.34

Примечание. По трехкратным измерениям значения максимальных погрешностей от средних значений составляют 0.1–0.6 для T_m и 5–9% для ΔG_D° .

Autodock задавали по умолчанию, для расчета ван-дер-ваальсовых и электростатических термов использовали диэлектрические функции, зависящие от расстояния. Конечные изображения полученных при докинге комплексов получали в программе Discovery Studio 2.5 (Accelrys Software Inc., США).

Определение ферментативной активности. Активность РНКазы А измеряли для определения эффекта ДКФ в отсутствие и в присутствии осмолитов (глицина, саркозина и бетаина). Оценивали кинетические параметры – константу Михаэлиса (K_m) и константу катализа (k_{cat}). Субстрат (2',3'-циклический монофосфат) и фермент (РНКазы А) предварительно инкубировали при требуемой концентрации каждого компонента

раствора (ДКФ, глицина, саркозина и бетаина). Гидролиз субстрата РНКазой А в диапазоне концентраций 0.05–0.50 мг·мл⁻¹ отслеживали по изменению поглощения при 292 нм при температуре $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин на спектрофотометре V-730 UV/VIS. Кинетические параметры (K_m и k_{cat}) рассчитывали по уравнению (1) из графиков Михаэлиса–Ментен, где начальная скорость равна v , а концентрация субстрата – $[S]$.

$$v = V_{\max}[S] / (K_m + [S]). \quad (1)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ

В данном исследовании анализировались разрушительные эффекты ДКФ на структуру и стабильность РНКазы А. Тепловую денатурацию РНКазы А проводили в отсутствие и в присутствии различных концентраций ДКФ при pH 7.0. Изменения были представлены в виде $\Delta\epsilon_{287}$ – разностного коэффициента молярной экстинкции как функции температуры. Кривые тепловой денатурации анализировали для определения значений T_m , представленных в табл. 1, где можно видеть, что ДКФ дестабилизировал белки. Поскольку осмолиты способны стабилизировать белки, оценивали их способность противодействовать дестабилизирующему эффекту ДКФ на структуру и стабильность белка. Для анализа действия осмолитов проводили тепловую денатурацию РНКазы А в присутствии различных концентраций осмолита и 10 мкМ ДКФ; было обнаружено, что, согласно значениям T_m (рис. 1), добавление осмолитов ведет к увеличению стабильности белка.

Стабильность белка (ΔG_D°) не определяется только одним показателем T_m , поскольку T_m не является хорошей мерой стабильности белка. Важными параметрами являются также ΔC_p и ΔH_m . Поэтому проводили измерения стабильности белка в контексте ΔG_D° (изменений свободной энергии Гиббса) с помощью ΔC_p (принятой за 1.20 ± 0.05 ккал/моль) и ΔH_m (данные не приведены), результаты представлены в табл. 1. В присутствии ДКФ значение ΔG_D° снижалось при увеличении концентраций ДКФ. Однако это значение в дальнейшем увеличивалось при добавлении осмолитов (рис. 2). Это согласуется с более ранними сообщениями, в которых показывалось, что осмолиты, такие, как сахара, аминокислоты и полиолы, увеличивают ΔG_D° РНКазы А [15, 16].

Для исследования структурных изменений в РНКазе А в отсутствие и в присутствии ДКФ и осмолитов снятие спектров КД проводили в дальней и ближней УФ-областях. КД в дальнем УФ – это метод исследования конформационных изменений в пептидном остове, в то время как КД в

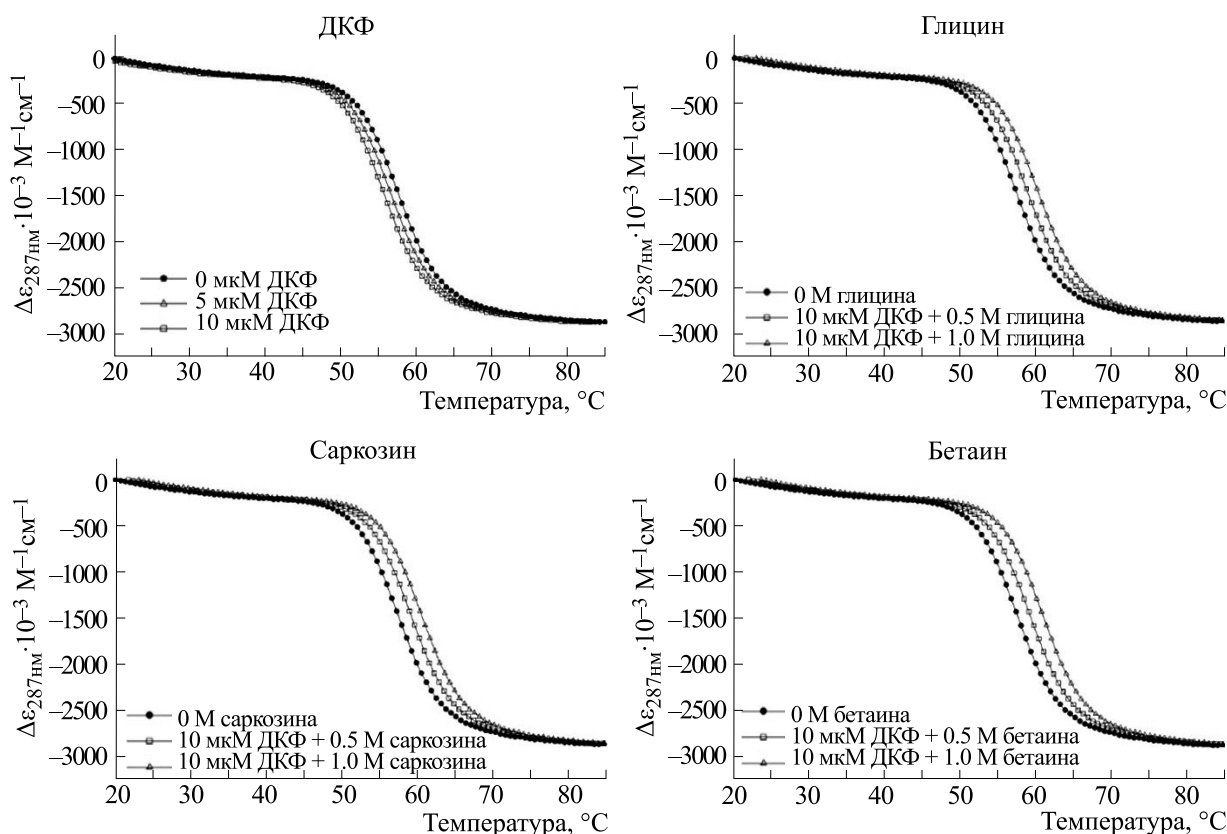


Рис. 1. Характерные профили тепловой денатурации РНКазы А в присутствии разных концентраций ДКФ и осмолитов при pH 7.0.

ближней УФ-области показывает эффект упаковки белка. В конформации остова пептидной цепи изменений (при 222 нм) не было, в то время как в ближней УФ-области наблюдались незначительные изменения КД-спектра после добавления осмолитов (рис. 3).

Тушение флуоресценции вызвано различными молекулярными взаимодействиями, такими, как молекулярные перестройки, реакции в возбужденном состоянии, перенос энергии, статическое и динамическое тушение. Параметр тушения собственной флуоресценции широко используется для изучения механизма взаимодействия белков с лекарствами или лигандами. В данной работе интенсивность эмиссии использовали для анализа взаимодействия между ДКФ и РНКазой А в присутствии различных концентраций осмолитов. Интенсивность эмиссии флуоресценции в диапазоне 290–340 нм после возбуждения светом с длиной волны 278 нм регистрировали при различных концентрациях ДКФ при pH 7.0 (рис. 4). Устойчивое снижение эмиссии флуоресценции наблюдалось с увеличением количества добавленного ДКФ вследствие тушения флуоресценции РНКазы А.

Для идентификации сайта связывания ДКФ в РНКазе А и остатков, участвующих в этом взаимодействии, проводили расчеты молекулярного

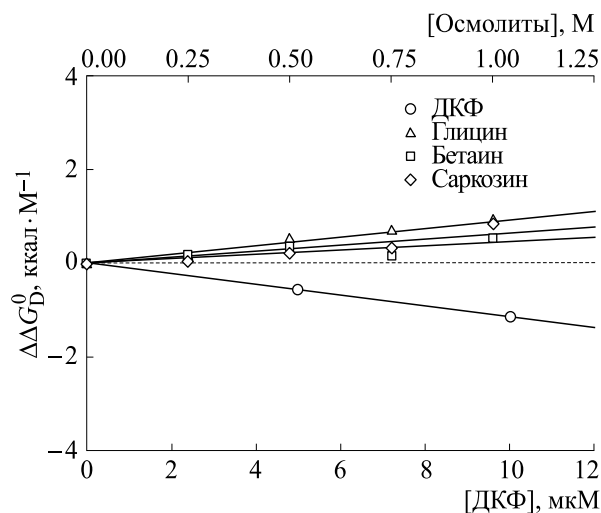


Рис. 2. Графики зависимости $\Delta\Delta G_D^0$ от концентрации осмолита в присутствии глицина (Δ), бетаина ($\square$), саркозина ($\diamond$) и ДКФ ($\circ$).

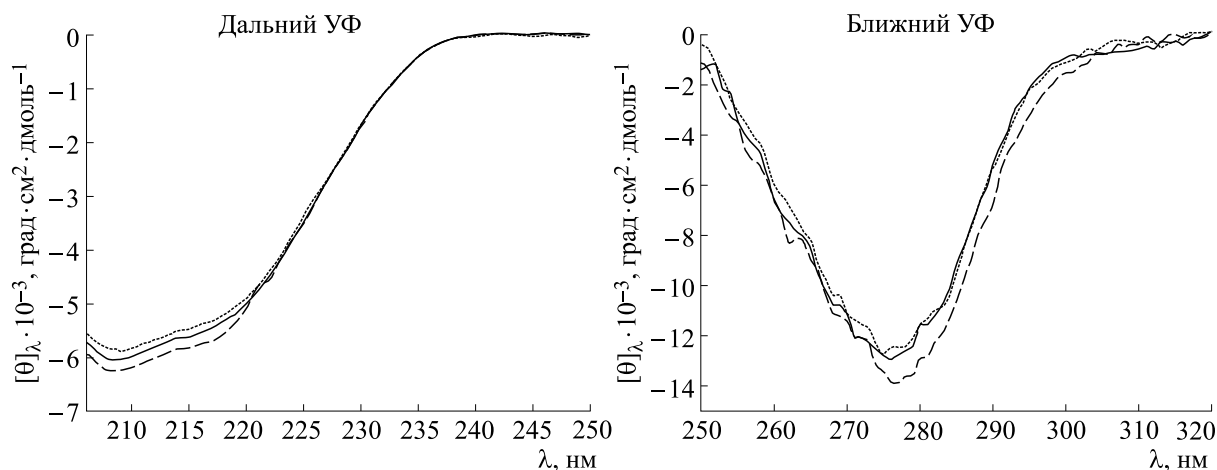


Рис. 3. Изменения вторичной и третичной структуры РНКазы А в присутствии осмолитов (бетаина) и ДКФ при pH 7.0. Символы обозначают РНКазу А (точки), РНКазу А + 10 мкМ ДКФ (пунктир), РНКазу А с 10 мкМ ДКФ и 1М бетаином (сплошная линия) для графиков в ближнем и дальнем УФ. Из осмолитов представлены данные только для бетаина для большей ясности восприятия.

докинга в программе AutoDock 4.2, были получены изображения финальных комплексов после докинга.

Поскольку структура определяет стабильность, стабильность также должна быть отражена в структуре белка. Измерения активности проводили для оценки k_{cat} и K_m РНКазы А при pH 7.0 при 25°C. Сначала эксперименты проводили при разных концентрациях ДКФ. Было обнаружено, что ДКФ увеличивает значения K_m , в то время как значения k_{cat} уменьшались. В отсутствие других растворенных веществ значения кинетических параметров РНКазы А согласуются с данными в более раннем сообщении [16]. В дальнейшем, при добавлении разных осмолитов и 10 мкМ ДКФ, было показано снижение K_m и увеличение k_{cat} .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Было обнаружено, что ДКФ дестабилизирует РНКазу А в дозо-зависимой манере, что может быть видно по снижению значений T_m в табл. 1 и сдвигу кривых денатурации на рис. 1. Предыдущие исследования показали увеличения доли связанной с белком фракции во время взаимодействия ДКФ с альбумином [17]. Также для ДКФ была показана способность связываться с белками плазмы крови и дестабилизировать их [2]. Осмолиты стабилизируют белок и увеличивают значения T_m . Механизм стабилизации осмолитами может быть связан с предпочтительным исключением осмолитов из белковых доменов, в то время как предпочтительное связывание денатурирующего агента вносит вклад в механизм де-

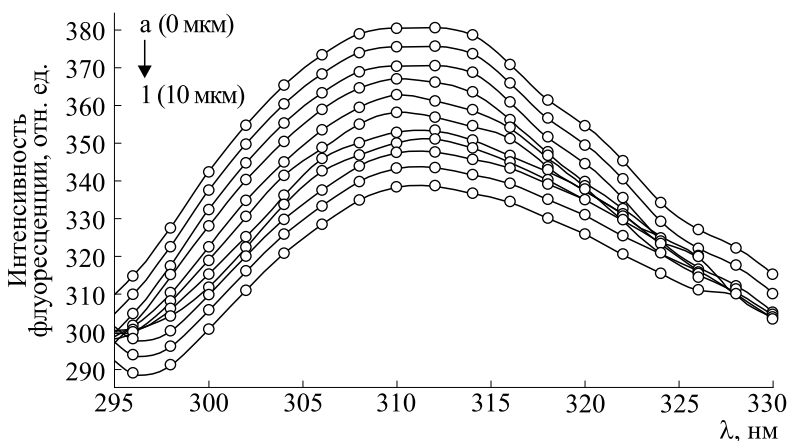


Рис. 4. Тушение флуоресценции РНКазы А, индуцированное ДКФ. Концентрация РНКазы А составляла 20 мкМ. Концентрации ДКФ были в диапазоне от 0 до 10 мкМ с шагом 1 мкМ. Собственную флуоресценцию белка определяли в 0.05 М какодилатном буферном растворе при pH 7.0 и 25°C, длина волны возбуждающего света составляла 278 нм.

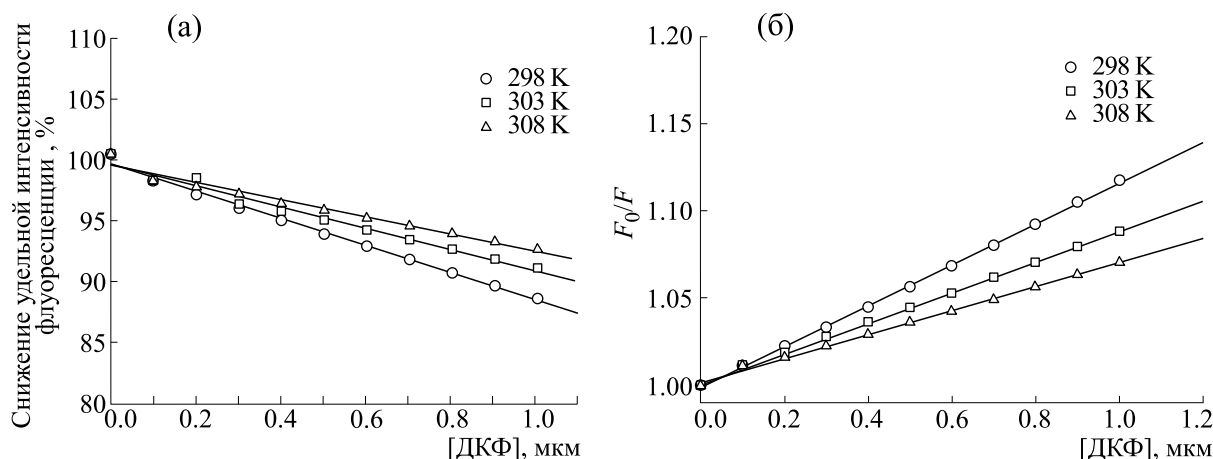


Рис. 5. Индуцированное ДКФ тушение флуоресценции РНКазы А при 298 К (○), 303 К (□) и 310 К (Δ): (а) — снижение удельной интенсивности флуоресценции на длине волны 308 нм, (б) — график Штерна–Фольмера для взаимодействий РНКазы А — ДКФ.

стабилизации [18, 19]. Таким образом, стабилизация или дестабилизация белка зависят от эффектов предпочтительного исключения или предпочтительного связывания [20]. Можно заключить, что снижение T_m белка в присутствии ДКФ обусловлено эффектом предпочтительного связывания, ведущим к дестабилизации белка, в то время как увеличение T_m при добавлении осмолитов вызвано эффектами предпочтительного исключения, в результате приводящими к стабилизации белка. Эффект вещества, сопутствующего белку в растворе, может быть объяснен его эффектом на равновесие денатурации $N \leftrightarrow D$ в нативных условиях, что может быть охарактеризовано параметром ΔG_D° (значение изменения энергии Гиббса (ΔG_D) в отсутствие сопутствующих веществ при 25°C). Эта энергия позволяет предсказать большую предпочтительность взаимодействия полярных групп остова полипептидной цепи с полярными группами осмолитов по сравнению с взаимодействиями остова с неполярными группами осмолитов [21]. Примерно то же самое касается термодинамики преимущественного взаимодействия со стабилизирующими или дестабилизирующими осмолитами [22–24]. Более того, зависимость ΔG_D° от концентрации сопутствующих веществ (ДКФ и осмолитов) линейна, что было показано ранее [25]. Среди всех проанализированных осмолитов бетаин показал максимальный стабилизирующий эффект (как по T_m , так и по ΔG_D°). Это было показано в более ранних работах [22, 23]. Защитный эффект бетаина может быть отнесен к сильному эффекту предпочтительной гидратации [24]. Упаковка хромофорных групп (тирозина или фенилаланина) может быть более плотной в присутствии осмолитов по сравнению с ДКФ.

Последовательное снижение собственной флуоресценции наблюдалось с увеличением количества добавляемого ДКФ, что вызвано тушением флуоресценции РНКазы А. У ДКФ было показано наличие трех тушащих групп, поэтому он обладает высокой эффективностью как тушитель [25]. Три остатка тирозина (Tyr-25, Tyr-73, Tyr-97) расположены в глубине белка [26]. Такой результат показал, что остаток Tyr сместился в менее гидрофобное окружение. Для исследования термодинамики связывания ДКФ (рис. 5) эксперименты по тушению проводили при различных температурах (298, 303 и 308 К). Наблюдалось снижение удельной интенсивности флуоресценции, после чего данные анализировали по уравнению Штерна–Фольмера [27]:

$$F_0/F = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q], \quad (2)$$

где F_0 и F — интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии ДКФ (тушителя), K_{SV} — константа Штерна–Фольмера, $[Q]$ — молярная концентрация ДКФ, k_q и τ_0 — константа скорости бимолекулярной реакции тушения и время жизни флуоресценции белка в отсутствие тушителя соответственно (табл. 2).

Значения K_{SV} во всех случаях имели порядок 10^4 M^{-1} , что отражает существенное взаимодействие между РНКазой А и ДКФ, которое может быть ответственно за реализацию механизма тушения. Так, значительное взаимодействие между человеческим сывороточным альбумином и имипенемом — основа механизма тушения [28]. Линейное снижение тушения при различных температурах указывает на существование только одного типа механизма тушения флуоресценции РНКазы А — либо статического, либо динамического. Также значение углового коэффициента

Таблица 2. Константы тушения Штерна–Фолмера и параметры связывания для взаимодействия РНКазы А и ДКФ при разных температурах

Температура, К	$K_{SV} \cdot 10^4, \text{М}^{-1}$	$k_q \cdot 10^{13}, \text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$	$K_a \cdot 10^4, \text{М}^{-1}$	n	R^2
298	2.21	0.65	4.64	1.01	0.9959
303	1.69	0.45	3.24	1.00	0.9931
308	1.04	0.33	2.38	1.02	0.9968

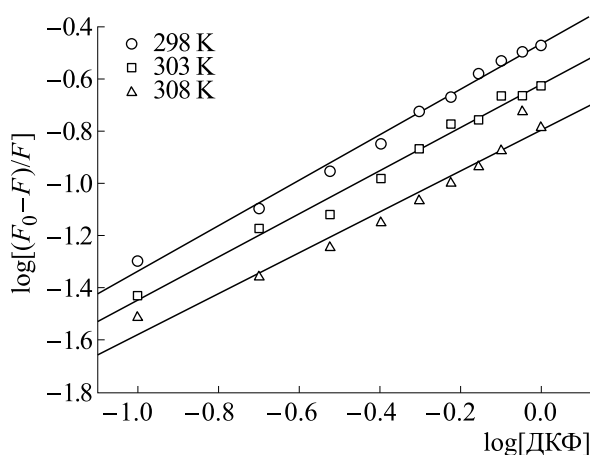
показывает присутствие только одного типа эквивалентного сайта связывания ДКФ. Отношение K_{SV} и τ_0 определяло значения k_q при различных температурах (табл. 2), значение τ_0 для РНКазы А было принято за $3.5 \cdot 10^{-9}$ с [29]. Результирующие значения k_q ($10^{13} \text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$) были существенно выше, чем максимальная динамическая константа тушения ($10^{10} \text{М}^{-1}\text{с}^{-1}$). Это свидетельствует, что ДКФ-зависимое тушение происходило в результате образования комплекса. Процесс тушения хорошо описан вычислительно, он сильно зависит от температуры [28]. При высоких температурах динамическое тушение увеличивается вследствие более быстрой диффузии, а статическое тушение уменьшается вследствие диссоциации слабо ассоциированных комплексов. Таким образом, снижение K_{SV} и k_q позволяет предположить, что тушение флуоресценции РНКазы А в присутствии ДКФ происходит скорее за счет образования комплекса, а не за счет динамического тушения. Далее, значения константы связывания (K_a) и количества сайтов связывания (n) рассчитывали с применением уравнения Штерна–Фольмера, модифицированного следующим образом [30]:

$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_a + n \log[Q]. \quad (3)$$

По рис. 6 и табл. 2 можно видеть линейный характер температурной зависимости $\log[(F_0 - F)/F]$ от $\log[Q]$, угловые коэффициенты и свободные слагаемые равны n и $\log K_a$ соответственно. Здесь константа связывания РНКазы А и ДКФ была равна $K_a = 4.64 \cdot 10^4 \text{М}^{-1}$ при 298 К, в молекуле РНКазы А имел место только один сайт связывания ДКФ.

Из результатов докинга можно заключить, что ДКФ связывается с РНКазой А и специфично взаимодействует с остатками Lys-41 и Phe-120 (рис. 7). Далее, результаты докинга показали, что во взаимодействии РНКазы А с ДКФ принимают участие водородные связи (с Lys-41, Phe-120, His-12 и Gln-11) и ван-дер-ваальсовы контакты (с Asp-121 и His-119) (рис. 7). Остатки, вовлеченные в связывание субстрата (Thr-45 и Ser-123 в «пиримидиновом» сайте и Gln-69, Asn-71 и Glu-111 в «пуриновом» сайте) и каталитические остатки (His-12 и His-119; Lys-7, Lys-41, Lys-66; Phe-120, Asp-121, Gln-11), а также ряд других остатков могут участвовать в поддержании целостности активного центра и определяют расположение молекул воды.

В термодинамическом равновесии, если смещение происходит вследствие дестабилизации РНКазы А диклофенаком что показано значениями ΔG_D° [нативное состояние $\leftrightarrow$ денатурирован-

**Рис. 6.** Модифицированные графики Штерна–Фольмера для тушения флуоресценции РНКазы А ДКФ при 298 К (○), 303 К (□) и 310 К (Δ).

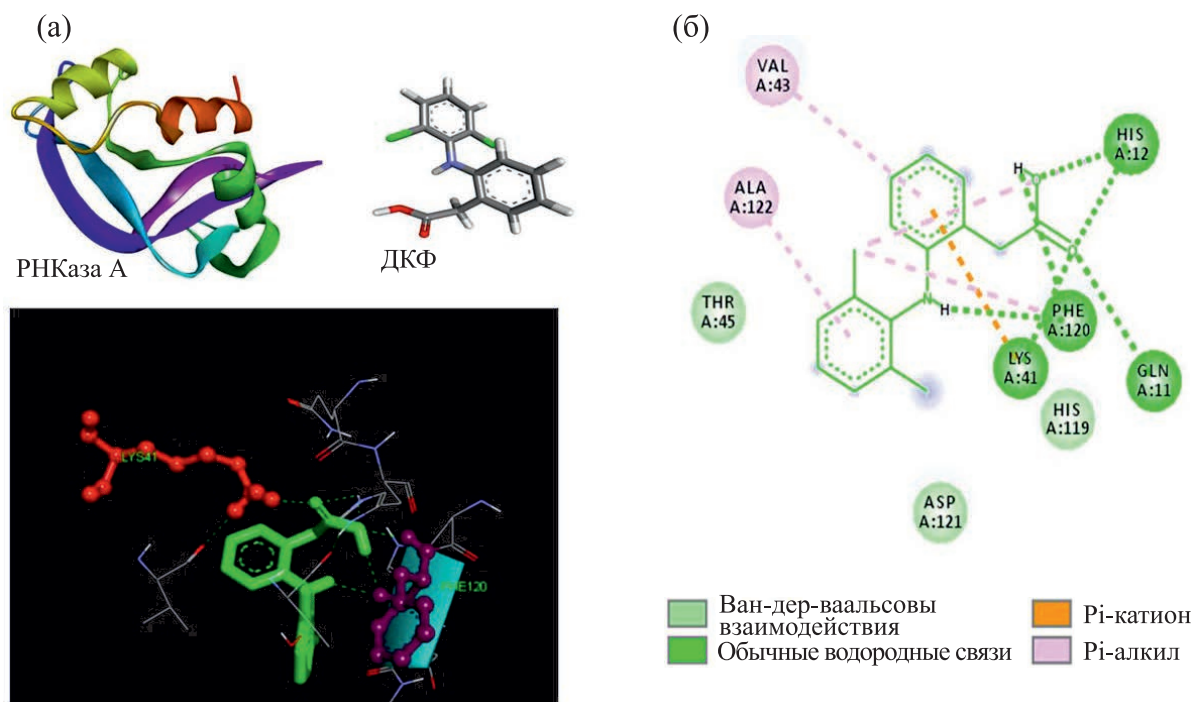


Рис. 7. Молекулярный докинг ДКФ с трехмерной структурой РНКазы А (PDB ID: 1FS3). (а) – Молекулярный докинг ДКФ на трехмерную структуру РНКазы А (1FS3); (б) – результаты докинга ДКФ с РНКазой А (1FS3) в формате ligplot (двумерная развертка).

ное состояние], то параметры активности ферментов тоже меняются. Смещение термодинамического равновесия вправо означает способность ДКФ связываться с ферментом [31]. Эти наблюдения полностью согласуются с ранее опубликованными данными по другим белкам [32].

Было обнаружено (см. табл. 3), что ДКФ увеличивает значения K_m , в то же время уменьшая значения k_{cat} , а при последующем добавлении различных осмолитов K_m уменьшалась, а k_{cat} — увеличивалась.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании изучался механизм связывания ДКФ с РНКазой А в присутствии различных осмолитов и был показан его эффект на конформацию и стабильность РНКазы А. Структура и стабильность РНКазы А нарушаются при связывании ДКФ. Более того, связывание ДКФ с РНКазой А в присутствии осмолитов позволяет утверждать, что осмолиты стабилизируют белок. Для бетаина показан более существенный эффект, чем для двух других осмолитов. Данные результаты приводят к следующим умозаключениям: 1) присутствие ДКФ ведет к уменьшению стабильности белка в контексте как T_m , так и ΔG_D° , 2) добавление осмолитов к ДКФ ведет к увеличению стабильности белка, согласно значениям T_m

и ΔG_D° , 3) ДКФ влияет на третичную структуру белка, хотя на вторичную структуру подобное действие обнаружено не было, а осмолиты помогают восстановить структуру. Можно сделать вывод, что ДКФ дестабилизировал РНКазу А без каких-либо изменений в конформационном и структурном аспектах, а осмолиты предотвращают дестабилизирующий эффект ДКФ. Таким образом, может быть сделан вывод, что взаимодействие белка с лекарственным веществом в присутствии этих осмолитов может приводить к уменьшению высвобождения ДКФ до некоторой степени, что могло бы влиять на дозозависимость ответа на ДКФ в организме. Значит, связывание лекарства с белком в комбинации с осмолитами — важный критерий, к которому следует относиться с должным вниманием.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность д-ру А.Н. Наганатхану из Индийского технологического института Мадраса за помощь в проведении УФ-КД-исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа была поддержана грантом SERB (грантодержатель — факультет науки и технологий, грантодатель — правительство Индии, номер

Таблица 3. Параметры активности РНКазы А в присутствии и в отсутствие ДКФ и осмолитов при pH 7.0 и 25°C

	$k_{\text{cat}}, \text{с}^{-1}$	$K_m, \text{мМ}$
ДКФ (мкМ)		
0.00	3.44 ± 0.03	0.99 ± 0.05
5.00	3.18 ± 0.02	1.14 ± 0.06
10.00	3.00 ± 0.04	1.35 ± 0.02
Глицин (М)		
0.00	3.44 ± 0.03	0.99 ± 0.05
0.50	3.13 ± 0.10	1.05 ± 0.05
1.00	3.06 ± 0.10	1.07 ± 0.07
Саркозин (М)		
0.00	3.44 ± 0.03	0.99 ± 0.05
0.50	3.71 ± 0.11	0.80 ± 0.05
1.00	4.21 ± 0.14	0.58 ± 0.03
Бетаин (М)		
0.00	3.44 ± 0.03	0.99 ± 0.05
0.50	3.37 ± 0.11	0.99 ± 0.04
1.00	3.62 ± 0.12	0.83 ± 0.06
Глицин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	3.00 ± 0.04	1.35 ± 0.02
0.50	3.06 ± 0.04	1.24 ± 0.07
1.00	3.13 ± 0.01	1.13 ± 0.04
Саркозин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	3.00 ± 0.04	1.35 ± 0.02
0.50	3.29 ± 0.01	1.26 ± 0.02
1.00	3.41 ± 0.03	1.15 ± 0.02
Бетаин (М) + 10 мкМ ДКФ		
0.00	3.00 ± 0.04	1.35 ± 0.02
0.50	3.47 ± 0.07	1.29 ± 0.07
1.00	3.52 ± 0.02	1.19 ± 0.01

Примечание. Эти значения были получены из ферментативных измерений после интенсивного диализа в течение 24 ч, каждое значение представляет собой среднюю величину из трех измерений $\pm$ ошибка среднего.

гранта SB/YS/LS-38/2014). М.Б. является получателем финансирования от факультета науки и технологий.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. H. Lin, D. M. Cocchetto, and D. E. Duggan, Clin. Pharmacokinet., **12** (6), 402 (1987). DOI: 10.2165/00003088-198712060-00002
2. K. K. H. Chan, K. H. Vyas, and K. D. Brandt, J. Pharm. Sci., **76** (2), 105 (1987). DOI: 10.1002/jps.2600760204
3. J. Santoro, C. González, M. Bruix, et al., J. Mol. Biol., **229** (3), 722 (1993). DOI: 10.1006/jmbi.1993.1075
4. R. T. Raines, Chem. Rev., **98** (3), 1045 (1998). DOI: 10.1021/cr960427h
5. S. H. Khan, N. Ahmad, F. Ahmad, and R. Kumar, IUBMB Life., **62** (12), 891 (2010). DOI: 10.1002/iub.406
6. J. Giri, Plant Signal. Behav., **6** (11), 1746 (2011). DOI: 10.4161/psb.6.11.17801
7. P. Yancey, M. Clark, S. Hand, et al., Science, **217** (4566), 1214 (1982). DOI: 10.1126/science.7112124
8. M. Auton and D. W. Bolen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102** (42), 15065 (2005). DOI: 10.1073/pnas.0507053102
9. S. N. Timasheff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99** (15), 9721 (2002). DOI: 10.1073/pnas.122253999
10. A. J. Saunders, P. R. Davis-Searles, D. L. Allen, et al., Biopolymers, **53** (4), 293 (2000). DOI: 10.1002/(SI-CI)1097-0282(20000405)53:4<293::AID-BIP2>3.0.CO;2-T
11. I. Haque, R. Singh, F. Ahmad, and A. A. Moosavi-Movahedi, FEBS Lett., **579** (18), 3891 (2005). DOI: 10.1016/j.febslet.2005.06.005
12. A. Sinha, S. Yadav, R. Ahmad, and F. Ahmad, Biochem. J., **345** (Pt 3), 711 (2000). DOI: 10.1042/bj3450711
13. R. Singh, I. Haque, and F. Ahmad, J. Biol. Chem., **280** (12), 11035 (2005). DOI: 10.1074/jbc.M410716200
14. Y. H. Chen, J. T. Yang, and H. M. Martinez, Biochemistry, **11** (22), 4120 (1972). DOI: 10.1021/bi00772a015
15. N. K. Poddar, Z. A. Ansari, R. K. B. Singh, et al., Biophys. Chem., **138** (3), 120 (2008). DOI: 10.1016/j.bpc.2008.09.013
16. S. Jamal, N. K. Poddar, L. R. Singh, et al., FEBS J., **276** (20), 6024 (2009). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07317.x
17. S. K. Dutta, S. K. Basu, and K. K. Sen, Indian J. Exp. Biol., **44** (2), 123 (2006).
18. K. Gekko and S. N. Timasheff, Biochemistry, **20** (16), 4667 (1981). DOI: 10.1021/bi00519a023
19. Y. Liu and D. W. Bolen, Biochemistry, **34** (39), 12884 (1995). DOI: 10.1021/bi00039a051
20. T. Arakawa, Y. Kita, and J. F. Carpenter, Pharm. Res., **8** (3), 285 (1991). DOI: 10.1023/a:1015825027737
21. T. O. Street, D. W. Bolen, and G. D. Rose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **103** (38), 13997 (2006). DOI: 10.1073/pnas.0606236103
22. L. R. Singh, T. A. Dar, S. Rahman, et al., Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics, **1794** (6), 929 (2009). DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.02.005
23. S. Knapp, R. Ladenstein, and E. A. Galinski, Extremophiles, **3** (3), 191 (1999). DOI: 10.1007/s007920050116

24. P. Prasanthan and N. Kishore, *J. Mol. Liq.*, **278**, 477 (2019). DOI: 10.1016/j.molliq.2019.01.071
25. E. Fernandes, T. B. Soares, H. Gonçalves, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **19** (11), 3411 (2018). DOI: 10.3390/ijms19113411
26. M. Noronha, J. C. Lima, E. Paci, et al., *Biophys. J.*, **92** (12), 4401 (2007). DOI: 10.1529/biophysj.106.093625
27. J. R. Lakowicz and G. Weber, *Biochemistry*, **12** (21), 4161 (1973). DOI: 10.1021/bi00745a020
28. M. T. Rehman, H. Shamsi, and A. U. Khan, *Mol. Pharm.*, **11** (6), 1785 (2014). DOI: 10.1021/mp500116c
29. N. Barboy and J. Feitelson, *Photochem. Photobiol.*, **26** (6), 561 (1977). DOI: 10.1111/j.1751-1097.1977.tb07533.x
30. M. Sharma, K. Chauhan, R. Shivahare, et al., *J. Med. Chem.*, **56** (11), 4374 (2013). DOI: 10.1021/jm400053v
31. X. Du, Y. Li, Y. L. Xia, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **17** (2), 144 (2016). DOI: 10.3390/ijms17020144
32. S. Khan, Z. Bano, L. R. Singh, et al., *PLoS One*, **8** (9), e72533 (2013). DOI: 10.1371/journal.pone.0072533

The Organic Osmolyte Betaine Effectively Counteracts the Deleterious Effect of Diclofenac on Protein Structure and Stability

M. Basheeruddin*, N. Ahmed*, Kh.A. Khan*, and Sh. Jamal*

**School of Life Sciences, B.S. Abdur Rahman Crescent Institute of Science & Technology, Vandalur, Chennai, Tamil Nadu, 600048 India*

Understanding the physicochemical properties of pharmacy and the concept of pharmacophore is essential to devise guidelines for the synthesis of target-oriented drugs. In the present study, thermal denaturation, circular dichroism, intrinsic fluorescence, and docking were employed for studying the effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug, diclofenac sodium, on the stability and structure of bovine pancreatic ribonuclease (RNase A) taken as a model of an enzyme. Since drug-protein interaction is an important pharmacokinetic parameter of a drug, it was deemed significant to study the effects of diclofenac on protein structure and stability. When the thermodynamic parameters were assessed, it was shown that RNase-A was destabilized in the presence of diclofenac sodium in terms of T_m and ΔG_D° , while the addition of osmolytes stabilized the protein. In the presence of diclofenac sodium and osmolyte, there was a change in a tertiary structure of the protein but not in its secondary structure. Spectral results revealed a decrease in fluorescence intensity confirming fluorescence quenching of RNase-A by diclofenac sodium and osmolytes. Molecular docking analysis suggested that hydrogen bonds and Van der Waals are involved in the binding of RNase-A to diclofenac sodium. The RNase-A activity is decreased in the presence of diclofenac sodium while osmolyte can restore the RNase-A activity and the indices k_{cat} increase and K_m values decrease. This study presents new combination of drug therapy comprising diclofenac sodium and osmolytes to reduce the risk of adverse effects of diclofenac sodium.

Keywords: RNase-A, thermal denaturation, osmolytes, diclofenac