

УДК 577.152.7

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСНОВИ МІЖМОЛЕКУЛЯРНОЇ ВЗАЄМОДІЇ КАЛІКС[4]АРЕНУ С-97 ІЗ СУБФРАГМЕНТОМ-1 МІОЗИНУ МІОМЕТРІЯ

© Р. Д. ЛАБИНЦЕВА<sup>1</sup>, А. А. БЕВЗА<sup>1</sup>, О. В. БЕВЗА<sup>1</sup>,  
С. О. ЧЕРЕНОК<sup>2</sup>, В. І. КАЛЬЧЕНКО<sup>2</sup>, С. О. КОСТЕРІН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;  
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Інститут органічної хімії НАН України, Київ;  
e-mail: vik@bpci.kiev.ua

Калікс[4]арен С-97 (зазначено шифр) — це макроциклічна сполука, що має внутрішньомолекулярну високовпорядковану ліпофільну порожнину, утворену чотирма ароматичними кільцями, одне з яких по верхньому вінцю функціоналізовано метиленбісфосфоновою групою. Показано, що ця сполука у концентрації 100 мкМ ефективно інгібує АТР-азну активність субфрагмента-1 міозину міометрія свині; коефіцієнт інгібування  $I_{0,5}$  становить  $83 \pm 7$  мкМ. Водночас, зазначений калікс[4]арен спричинює вірогідне стосовно контролю збільшення ефективного гідродинамічного діаметра субфрагмента-1 міозину, що може свідчити про міжмолекулярне комплексоутворення між каліксареном та голівкою міозину.

Із використанням методів комп'ютерного моделювання (докінг, молекулярна динаміка із залученням ґрід-технологій) з'ясовані структурні основи міжмолекулярної взаємодії калікс[4]арену С-97 із субфрагментом-1 міозину міометрія та участь гідрофобних, електростатичних та  $\pi$ - $\pi$  (стекінг) взаємодій між каліксареном і амінокислотними залишками субфрагмента-1 міозину, окремі з яких розташовані поряд з активним центром АТР-ази.

*Ключові слова:* АТР-аза, субфрагмент-1 міозину, калікс[4]арен С-97, гладенькі м'язи, матка.

**М**іозинова АТР-аза перетворює хімічну енергію, що депонована в макроергічних зв'язках АТР, у механічну зі спрямованим рухом, тому цей ензим ще називають молекулярним мотором [1]. Субфрагмент-1 (голівка, S1) міозину є N-кінцевою частиною важкоголанцюга міозину і складається з двох доменів: N-кінцевого глобулярного моторного (каталітичного) домену, який містить активний центр АТР-ази і ділянку зв'язування актину, та регуляторного домену або важеля (lever-arm), відповідального за рух міозину відносно актину.

У структурі субфрагмента-1 міозину ідентифіковані функціональні субдомени: семискладчата  $\beta$ -структура (амінокислотні залишки 116–127, 170–180, 248–257, 265–271, 458–468 та 671–678), спіраль switch 2 (амінокислотні залишки 469–509), конвертер (амінокислотні залишки 716–772) та шарнір SH2/SH1 (амінокислотні залишки 688–715), які зазнають складних конформаційних перетворень у процесі передачі енергії від АТР-гідролазного центру до актинзв'язувальної поверхні [2].

АТР-зв'язувальна ділянка містить послідовність GLY-GLU-SER-GLY-ALA-GLY-LYS-THR, яка схожа на послідовність, знайдену в активних центрах інших АТР-аз [3]. У формуванні АТР-азного активно-го центру міозину задіяні частково Р-петля, поліпептиди switch 1 та switch 2, приєднані до семискладчатої  $\beta$ -структури, конформація яких чутлива до положення і координації  $\gamma$ -фосфата. АТР-азний центр ідентифікований як кишеня, від якої простягається щілина до актинзв'язувальної поверхні. Коли АТР зв'язується з субфрагментом-1 міозину, кишеня закривається, а щілина розширюється, порушуючи зв'язування субфрагмента-1 з актином, внаслідок чого субфрагмент-1 міозину дисоціює від актину. Коли АТР гідролізується АТР-азом міозину до АДФ та  $P_i$ , актин знову асоціює з субфрагментом-1, що полегшує звільнення з активного центру продуктів гідролізу АТР. Для звільнення неорганічного фосфату з нуклеозидзв'язувальної кишені після гідролізу АТР важлива присутність асоційованого актину, оскільки за його відсутності солевий місток між Arg<sub>238</sub> switch 1

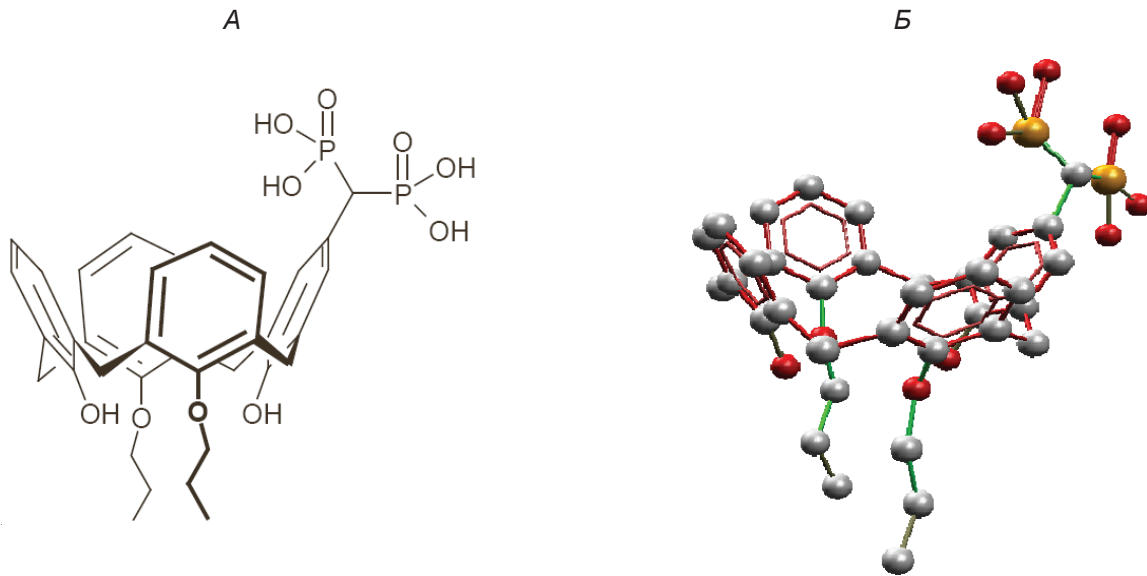


Рис. 1. Структурна формула каліксарену С-97 (А), тривимірна структура молекули калікс[4]арену С-97 (Б)

та Glu<sub>459</sub> switch 2 інгібує звільнення фосфату [2, 4].  $\alpha$ -Спіраль switch 2 передає лінійну силу, що вивільняється внаслідок гідролізу АТР з активного центру на конверторний домен, який перетворює лінійну силу в обертальний момент, що обертає важіль та зумовлює рух міозину по відношенню до актину.

Калікс[4]арен С-97 (зазначено шифр) – макроциклічна сполука, що має внутрішньомолекулярну високовпорядковану ліпофільну порожнину, утворену чотирма ароматичними кільцями, одне з яких по верхньому вінцю функціоналізовано метиленбісфосфоною групою (рис. 1).

Як свідчать дані літератури, субфрагмент-1 є достатньою функціональною частиною молекули міозину тому, що навіть в ізолюваному стані зберігає властивості нативного міозину, а саме – АТР-азну активність та здатність взаємодіяти з актином [5, 6]. У зв'язку з цим постає питання щодо з'ясування закономірностей впливу калікс[4]арену С-97 на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину.

Раніше був встановлений гальмівний вплив каліксарену С-97 на АТР-азну активність актоміозину міометрія (коефіцієнт інгібування  $I_{0,5} = 84 \pm 2$  мкМ) [7].

Мета цієї роботи полягала у визначенні впливу калікс[4]арену С-97 на АТР-азну активність субфрагмента-1 міозину гладенького м'яза матки та у з'ясуванні можливого механізму комплексоутворення між калікс[4]-

ареном і субфрагментом-1 міозину (з використанням методів комп'ютерного моделювання – докінг-аналіз, молекулярна динаміка із залученням ґрид-технологій).

### Матеріали і методи

Синтез та аналіз структури калікс[4]арену С-97 із використанням методів ядерного магнітного резонансу та інфрачервоної спектроскопії проводили у відділі хімії фосфоранів Інституту органічної хімії НАН України. Детальний опис методу синтезу та підтвердження структурної будови каліксарену С-97 [5-біс(дигідроксифосфорил)метил-26,28-дигідрокси-25,27-дипропоксикалікс[4]арен] викладено в роботі [8].

Гладеньком'язовий актоміозин одержували із м'язової тканини матки свині за методом Вагану [9] та Вебер [10] з деякими модифікаціями.

Субфрагмент-1 міозину гладенького м'яза матки одержували шляхом розщеплення актоміозину  $\alpha$ -хімотрипсином за методом Weeds and Taylor [11] із деякими модифікаціями. Реакцію проводили в 50 мМ трис-НСІ, рН 7,5, що містив 0,6 М КСІ, 1 мМ дитіотреїтол, 1 мМ ЕДТА, протягом 18 год при 4 °С; вагове співвідношення актоміозин :  $\alpha$ -хімотрипсин – 200 : 1. Зупиняли реакцію 0,1%-м розчином фенілметилсульфонілфториду. Знесолювали розщеплений матеріал гель-фільтрацією на колонці із Sephadex G-25. Виділення та очищення субфрагмента-1 міозину здійснювали

методом іонообмінної хроматографії на колонці з DEAE-Sepharose CL-6B на хроматографічній системі BioRad (США). Елюцію здійснювали буфером, що містив 50 мМ імідазол (рН 7,2), 2 мМ EDTA, 1 мМ дитіотреїтол (ДТТ); 0,1 мМ азид Na, 0,1 мМ фенолметилсульфонілфториду, із градієнтом KCl від 0 до 0,2 М. Фракція, що містила субфрагмент-1 міозину, виходила з колонки гострим піком за 0,12 М концентрації KCl. Кількість протеїну визначали методом Bradford [12], а також використовуючи криву концентраційної залежності поглинання світла при 280 нм, стандартизовану за сироватковим альбуміном.

Чистоту препарату субфрагмента-1 міозину гладенького м'яза контролювали методом електрофорезу у поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за методом Леммлі [13]. Голівка міозину, згідно з результатами електрофорезу (рис. 2) мала  $M_r \approx 100$  кДа, що відповідає даним літератури [14]. Субфрагмент-1 був ідентифікований за наявністю досить високої АТФ-азної активності у фракції –  $68 \pm 9$  мкмоль  $P_i$ /хв на 1мг протеїну ( $M \pm m$ ,  $n = 8$ ).

Активність АТФ-ази субфрагмента-1 міозину визначали при температурі 37 °С у середовищі інкубації (загальний об'єм 1 мл) такого складу (мМ): трис-НСІ буфер (рН 7,2) – 20, KCl – 100, CaCl<sub>2</sub> – 0,01, MgCl<sub>2</sub> – 5, АТФ – 3 (стандартні умови). Ензиматичну реакцію ініціювали введенням до середовища інкубації аліквоти препарату протеїну, зупиняли реакцію шляхом додавання до інкубаційної суміші 1 мл 20%-ї трихлороцтової кислоти. Кількість протеїну в пробі становила 20 мкг. Тривалість інкубації – 1–2 хв. Контролем на неферментативний гідроліз АТФ слугували проби, в яких протеїн був відсутній. Кількість відщепленого від нуклеозидтрифосфату неорганічного фосфату  $P_i$  під час АТФ-гідролазної реакції визначали за методом Chen [15]. Проби інкубували 20 хв при 37 °С в суміші, що містила 0,42%-й молібдат амонію в 1 н сірчаній кислоті та 10%-ну аскорбінову кислоту у співвідношенні 6 : 1. Поглинання світла реєстрували при 820 нм на спектрофотометрі СФ 2000.

У дослідах з вивчення впливу каліксарену С-97 на активність АТФ-ази ізольованого субфрагмента-1 міозину використовували стандартне середовище інкубації, до якого додавали аліквоти розчину каліксарену у 50 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,2) в початковій концентрації 10 мМ. Кінцева концентрація каліксарену в пробі становила 10 – 100 мкМ. За 100% («нульова точка») приймали значен-

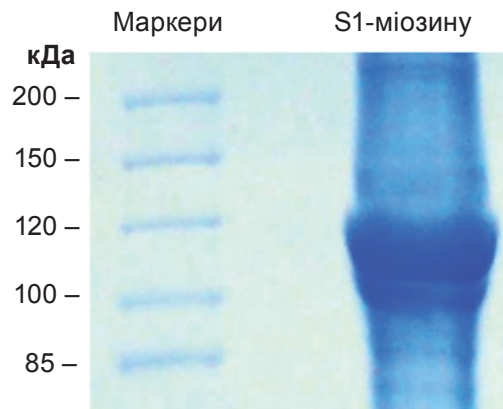


Рис. 2. Електрофореграма препарату субфрагмента-1 міозину міометрія

ня АТФ-гідролазної активності, яку визначали за відсутності каліксарену в середовищі інкубації.

При вивченні концентраційної залежності дії каліксарену С-97 на ензиматичну активність АТФ-ази субфрагмента-1 міозину значення уявного коефіцієнта інгібування  $I_{0,5}$  та коефіцієнт Хілла  $n_H$  розраховували із використанням лінеаризованих графіків Хілла [16] відповідно до емпіричного рівняння  $\lg[(V_0 - V)/V] = -n_H \cdot \lg I_{0,5} + n_H \cdot \lg I$ , де  $V$  – питома ензиматична активність;  $V_0$  – питома ензиматична активність за відсутності в середовищі інкубації інгібітора,  $I$  – концентрація інгібітора в середовищі інкубації. Типове значення коефіцієнта кореляції  $r$  становило 0,97–0,99.

Експерименти з фотон-кореляційної спектроскопії здійснювали (у співпраці з к.т.н. О. Ю. Чунініним) на приладі «ZetaSizer-3» Malvern Instrument (Велика Британія), обладнаному корелятором «Multi computing correlator type 7032 се». Досліджували розчин протеїну (у 50 мМ трис-НСІ буфері, рН 7,2, що містив 0,6 М KCl) при 22 °С в циліндричній оптичній скляній кюветі діаметром 10 мм, яку вводили в лунку лазерно-кореляційного спектрофотометра. Реєстрацію розсіяного від суспензії під кутом 90° лазерного випромінювання проводили, використовуючи гелій-неоновий лазер ЛГН-111 потужністю 25 мВт (довжина хвилі 633 нм). З експериментально одержаної автокореляційної функції за допомогою стандартної комп'ютерної програми PCS-Size mode v.1.61 [17] розраховували функцію розподілу за гідродинамічним діаметром мікрочастинок, які знаходилися в об'ємі вимірювальної кювети. За допомогою фотон-кореляційної спектроскопії визначали середній гідродинамічний діаметр (ГДД)

та функцію розподілу за розміром частинок субфрагмента-1 міозину міометрія, а також частинок, що утворюються внаслідок взаємодії S1-міозину з калікс[4]ареном C-97 (20, 60 та 100 мкМ).

Комп'ютерне моделювання ліганд-рецепторної взаємодії в системі «калікс[4]-арен C-97 – субфрагмент-1 міозину гладенького м'яза» проводили в програмі MVD 4.1.0, в якій реалізовано декілька алгоритмів знаходження оптимального положення ліганду в активному центрі протеїну (з використанням різновиду еволюційного алгоритму) [18]. Власне докінг ліганду (каліксарен C-97) в лігандзв'язувальний центр (ЛЗЦ) субфрагмента-1 міозину було здійснено в умовах повністю іонізованого метиленбісфосфонового фрагмента. Для іона металу ( $Mg^{2+}$ ) використовували стандартні параметри силового поля AMBER [19].

За моделювання взаємодії між калікс[4]-ареном C-97 та субфрагментом-1 міозину міометрія здійснювали т.з. напівгнучкий докінг (із врахуванням рухливості тільки лігандів) і відбирали низку комплексів із найменшою загальною енергією зв'язування лігандів. Розрахунок оптимальної геометрії утворених комплексів та визначення енергетично найвигіднішого розташування каліксарену в просторі молекули міозину проводили із врахуванням вандерваальсових, електростатичних та гідрофобних взаємодій, водневих зв'язків, а також внеску енергії десольватації. У роботі використовували просторову структуру субфрагмента-1 міозину з ідентифікатором – 1B7T в базі даних протеїнів (RSCB Protein Data Bank) [20].

Молекулярну динаміку взаємодії калікс[4]арену C-97 з ЛЗЦ субфрагмента-1 міозину досліджували з використанням силового поля Gromos96 [21]. Модель протеїну «розміщували» у віртуальному осередку (комірці) у формі зрізаного октаедру так, щоб відстань від протеїну до стінок комірки не перевищувала 1,5 нм. Осередок «заповнювали» моделями молекул води (розчинник) – SPC (Single Point Charge). Частину молекул води «замінили» на іони Na і Cl для нейтралізації заряду системи і для моделювання фізіологічного значення іонної сили 0,1. «Врівноваження» молекул розчинника проводили протягом 0,5 нс, при цьому атоми протеїну були «прив'язані» до своїх вихідних координат. Температура становила 298 К, а тиск – 1 атм (за методом Berendsen) [22]. Після «врівноваження» молекул розчинника про-

дили додаткову мінімізацію енергії системи. Власне моделювання методом МД здійснювали з використанням тих самих параметрів, що і «врівноваження» розчинника, за винятком обмеження рухливості атомів протеїну. Координати записували у вихідний файл траєкторії кожні 10 пікосекунд. Рух молекули калікс[4]-арену C-97 у процесі молекулярної динаміки був візуалізований за допомогою програми UCSF Chimera 1.5.3 [23].

Результати досліджень обробляли статистично з використанням *t*-критерію Стьюдента. Статистичний аналіз одержаних даних проводили із залученням загальновідомих методів. Кінетичні та статистичні розрахунки проводили за допомогою пакету стандартних програм.

Експериментальні дослідження здійснювали з використанням наступних реактивів: трис, імідазол, аскорбінова кислота, сироватковий альбумін, EGTA, маркерні протеїни для електрофорезу в SDS-ПААГ (6000–205 000 Да) (Sigma, США), дитіотреїтол (Serva, Німеччина), АТФ, акриламід, (Fluka, Швейцарія), гліцин (Merck, Німеччина), N,N-метиленбісакриламід, N,N,N,N-тетраметилендіамін (Acros organics, Бельгія). Всі розчини, що були використані в досліді, готували на двічі дистильованій воді з електропровідністю меншою за 2  $\mu S$ , яку реестрували за допомогою кондуктометра ОК-102/1 (Угорщина). Концентрацію катіонів дво-валентних металів  $Ca^{2+}$  та  $Mg^{2+}$  визначали титруванням за методом Мора [24].

### Результати та обговорення

*Дослідження методом фотон-кореляційної спектроскопії впливу калікс[4]арену C-97 на величину ефективного гідродинамічного діаметра ізолюваного субфрагмента-1 міозину.* Метод фотон-кореляційної спектроскопії (ФКС) дозволяє виявити розподіл різних молекул та надмолекулярних утворень у розчині за їх розмірами. Для визначення ГДД у ФКС використовується формула Стокса–Ейнштейна, яка справедлива саме для частинок сферичної форми [17, 25]. Визначені цим методом розміри молекул близькі до справжніх тільки для глобулярних протеїнів. У разі, коли форма протеїну далека від сферичної, одержаний гідродинамічний діаметр вважається до-сить умовною величиною.

Голівка міозину, яка є основною функціональною одиницею міозину [26], має округлу грушеподібну форму [5], тому для проведення досліджень щодо дії каліксарену



на скоротливі протеїни методом фотон-кореляційної спектроскопії використовували препарат ізольованого субфрагмента-1 міозину міометрія, при цьому визначали його середній ГДД та функцію розподілу його частинок за розміром. Одержаний субфрагмент-1 міозину містить вузький спектр частинок із градацією розміру приблизно від 10 нм до 50 нм (рис. 3). Проте переважна кількість зареєстрованих частинок ( $\approx 50\%$ ) має розмір близько 20 нм. У незначній кількості присутні також частинки діаметром близько 70 нм та з меншим за 20 нм. Встановлено, що середній (найвірогідніший) ГДД субфрагмента-1 міозину міометрія складає  $22 \pm 3$  нм ( $M \pm m$ ,  $n = 15$ ). Цей розмір відповідає даним літератури [27, 28].

Дослідження концентраційної залежності впливу каліксарену С-97 на гідродинамічні показники частинок субфрагмента-1 міозину показали, що каліксарен у 20 та 60 мкМ концентраціях не спричиняє вірогідних змін ГДД частинок голівки міозину порівняно з контролем, у цьому разі спостерігається лише тенденція до зростання. Тільки за 100 мкМ досліджуваного каліксарену ГДД голівки

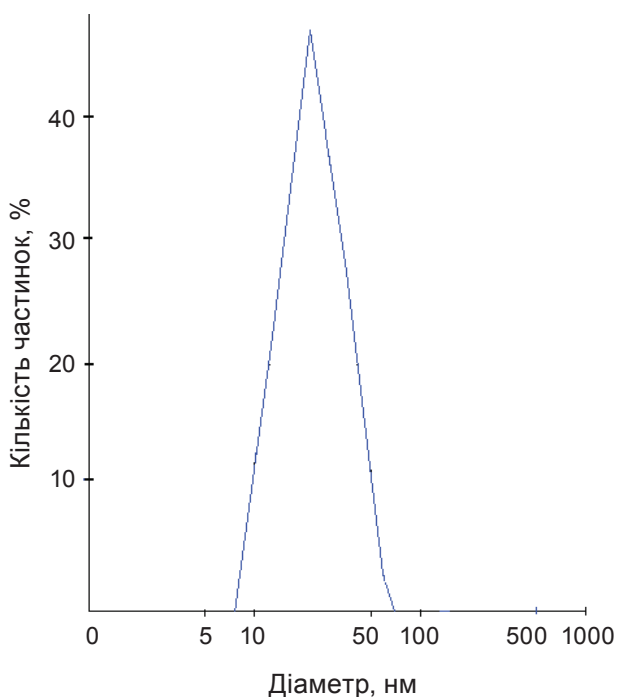


Рис. 3. Розподіл частинок молекул субфрагмента-1 міозину за гідродинамічним діаметром (ГДД). За 100% прийнято кількість частинок, еквівалентний ГДД яких знаходиться в діапазоні від ГДД<sub>min</sub> до ГДД<sub>max</sub> з точністю 0,1% (визначається характеристиками лазерно-кореляційного спектрофотометра)

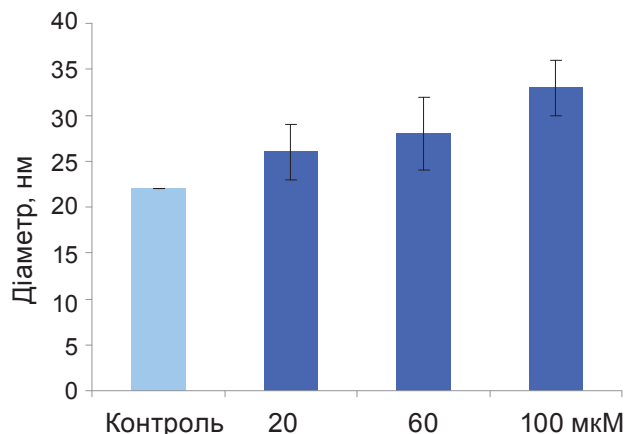


Рис. 4. Вплив різних концентрацій калікс[4]арену С-97 на величину гідродинамічного діаметра субфрагмента-1 міозину ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

міозину вірогідно збільшується порівняно з контролем: від  $22 \pm 3$  нм у контролі до  $33 \pm 3$  нм у досліді (рис. 4). Як контроль було проаналізовано розчин каліксарену С-97 у 50 мМ трис-НСІ рН 7,2 — світлорозсіюючих мікрочастинок у ньому не було виявлено.

Отже, каліксарен С-97 у концентрації 100 мкМ спричиняє вірогідне відносно контролю збільшення ГДД субфрагмента-1 міозину, що може свідчити про комплексоутворення між каліксареном та голівкою міозину.

Дослідження впливу калікс[4]арену С-97 на АТР-азну активність субфрагмента-1 міозину міометрія. При дослідженні концентраційної залежності впливу каліксарену С-97 на активність АТР-ази субфрагмента-1 міозину міометрія виявилось, що каліксарен С-97 в концентрації 10 мкМ майже не впливає на активність АТР-ази. У разі збільшення концентрації ця сполука дозозалежно гальмує АТР-азну активність голівки міозину, і за концентрації 100 мкМ — гальмівний ефект становить  $60 \pm 5\%$  відносно контролю ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ) (рис. 5). Коefіцієнт інгібування згідно з лінеаризованим графіком у координатах Хілла (рис. 3), становить  $I_{0,5} = 83 \pm 7$  мкМ ( $M \pm m$ ,  $n = 5$ ).

За порівняння значень коефіцієнтів інгібування каліксареном С-97 актоміозинового комплексу ( $I_{0,5} = 84 \pm 2$  мкМ) [29] та субфрагмента-1 міозину міометрія ( $I_{0,5} = 83 \pm 7$  мкМ) є очевидним, що голівка міозину виявляє практично однакову з актоміозинним комплексом чутливість до цього каліксарену. Цікаво, що  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТР-аза плазматичних мембран [29] виявляє на кілька порядків більшу чутливість до каліксарену

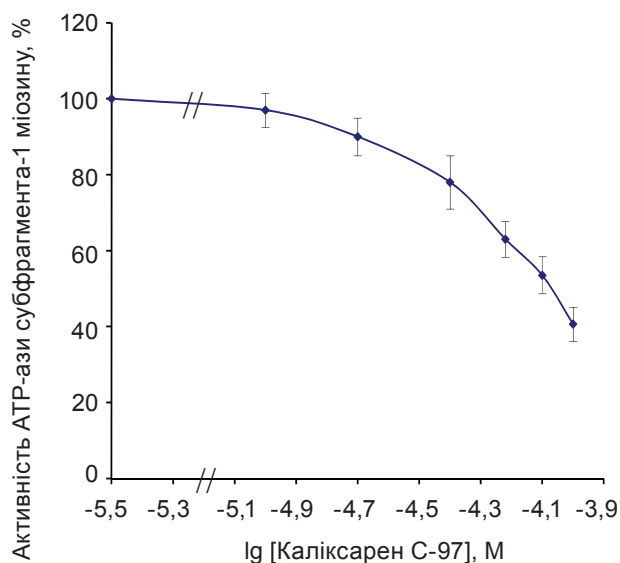


Рис. 5. Каталітичне титрування каліксареном С-97 АТР-ази субфрагмента-1 міозину ( $M \pm t$ ,  $n = 5$ )

С-97 ( $I_{0,5} = 98 \pm 8$  нМ) порівняно з АТР-азою актоміозину [7] та субфрагмента-1 міозину. Це необхідно брати до уваги під час дослідження впливу цих каліксаренів на скоротливу та електричну активність гладеньком'язових клітин.

Із лінеаризованих графіків залежності активності АТР-ази субфрагмента-1 міозину від концентрації каліксарену С-97 було розраховано коефіцієнт Хілла ( $n_H$ ), який складає  $1,3 \pm 0,5$  (рис. 6). Отже, можна думати, що з голівкою міозину може зв'язатися, найімовірніше, тільки одна молекула каліксарену С-97.

Таким чином, вплив каліксарену С-97 на АТР-азу скоротливого комплексу може здійснюватись завдяки його здатності зв'язуватись із субфрагментом-1 міозину, тому припускається, що однією з мішеней впливу каліксарену на скоротливий комплекс є голівка міозину.

З'ясування структурних основ між-молекулярної взаємодії калікс[4]арену С-97 із субфрагментом-1 міозину міометрія. Для розуміння молекулярного механізму інгібувального впливу калікс[4]арену С-97 на АТР-азу субфрагмента-1 міозину необхідна інформація щодо просторової структури ензиму в комплексах із субстратом та/або інгібітором. З цією метою було проведено комп'ютерне моделювання взаємодії каліксарену С-97 (як окремого ліганду або разом з АТР) з субфрагментом-1 міозину міометрія у присутності

$Mg^{2+}$  як кофактора (рис. 7, А, Б). Катіон Mg бере участь у зв'язуванні АТР в активному центрі та в процесі його гідролізу.

Завдяки докінгу каліксарену С-97 як окремого ліганду в лігандзв'язувальний центр субфрагмента-1 міозину було встановлено, що у фіксації фосфонатних груп каліксарену можуть бути задіяні залишки  $Asp_{320}$ ,  $Asn_{321}$ ,  $Leu_{676}$  і  $Gln_{678}$  (дані не наведені на рисунку). Каліксаренові фрагменти орієнтуються у простір, утворений, з одного боку, залишками  $Pe_{322}$ ,  $Asn_{238}$  і  $Lys_{677}$ , а з іншого – залишками  $Tyr_{126}$ ,  $Arg_{127}$  і  $Arg_{128}$ . Крім того, позитивно заряджений атом азоту залишку  $Lys_{677}$  знаходиться поряд з атомами кисню метиленбісфосфонатного фрагмента (віддаль між атомом азоту  $Lys_{677}$  та іонізованим атомом кисню фосфонатної групи становить 0,31 нм). Ідентифіковані зв'язки, які беруть участь у зв'язуванні каліксарену С-97 із ділянкою поблизу активного центру субфрагмента-1 міозину, а саме: водневі зв'язки,  $\pi$ - $\pi$ -стекінг взаємодії між ароматичними фрагментами каліксаренової чаші та бензольного кільця  $Tyr_{126}$  голівки міозину, електростатичні взаємодії за участю  $Arg_{127}$ ,  $Arg_{128}$ ,  $Asp_{320}$ ,  $Lys_{677}$ .

За одночасного докінгу лігандів каліксарену С-97 та АТР в ЛЗЦ субфрагмента-1 міозину у присутності  $Mg^{2+}$  показана можливість утворення комплексу каліксарену С-97 з АТР, який зв'язується з ділянкою голівки міозину поблизу активного центру за участю амінокислотних залишків, які дещо відрізняється від встановлених

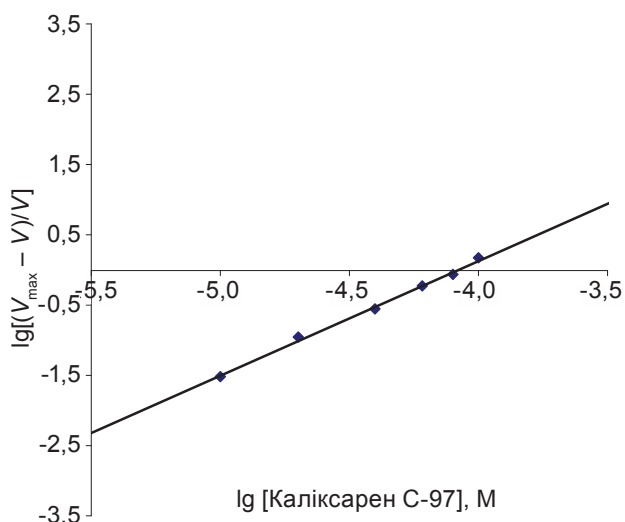


Рис. 6. Лінеаризована у координатах Хілла усереднена крива каталітичного титрування каліксареном С-97 АТР-ази субфрагмента-1 міозину

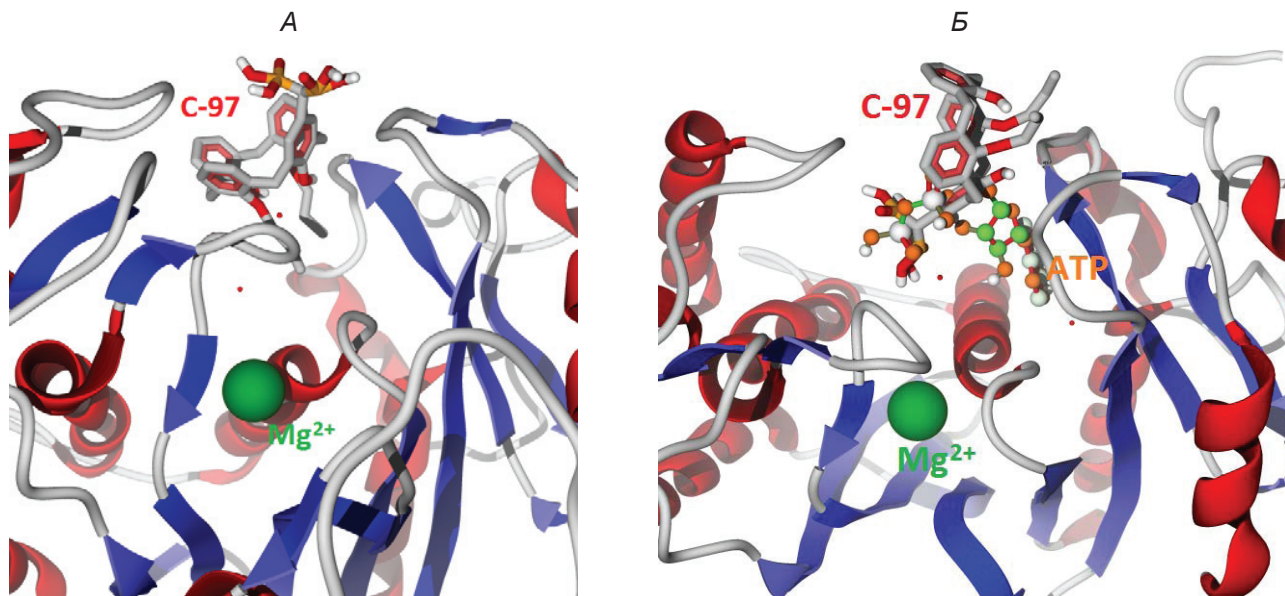


Рис. 7. Докінг в активну ділянку субфрагмента-1 молекули міозину калікс[4]арену С-97 як окремого ліганду (А) та одночасно пари лігандів «С-97 – АТР» (Б) у присутності  $Mg^{2+}$  як кофактора

під час докінгу каліксарену С-97 як окремого ліганду. При цьому змінюється просторове положення каліксарену С-97 в лігандзв'язувальному центрі голівки міозину; молекула калікс[4]-арену, взаємодіючи з молекулою АТР, своїм метиленбісфосфонатним залишком орієнтується в бік активного центру. У зв'язуванні комплексу «калікс[4]арен С-97 – АТР» з ділянкою поблизу активного центру субфрагмента-1 міозину беруть участь водневі зв'язки,  $\pi$ - $\pi$ -стекінг взаємодії між ароматичними кільцями каліксаренової чаші та бензольного кільця Tyr<sub>126</sub> і Tyr<sub>132</sub> голівки міозину, електростатичні взаємодії за участю Arg<sub>127</sub>. Досить близько до атомів кисню фосфонатних груп знаходяться залишки Asn<sub>238</sub> та Asn<sub>321</sub>, які можуть утворювати водневі зв'язки у разі взаємодії з фосфонатними групами ліганду. Очевидно також, що наявність гідрофобної платформи функціоналізованого калікс[4]арену С-97 може сприяти закріпленню його на гідрофобних ділянках у центрі зв'язування субстрату.

У таблиці наведено амінокислотні залишки активного центру субфрагмента-1 міозину міометрія, які беруть участь у взаємодії з калікс[4]ареном С-97 та комплексом «каліксарен С-97 – АТР». Встановлені залишки Tyr<sub>126</sub>, Arg<sub>127</sub>, Leu<sub>676</sub> та Lys<sub>677</sub>, що задіяні у фіксації фосфонатних груп каліксарену С-97, згідно з даними літератури, входять до складу семискладчатої  $\beta$ -структури субфрагмента-1 міозину, яка приєднана до поліпептидних

ділянок switch 1 та switch 2. Ці поліпептиди беруть безпосередню участь у формуванні активного центру АТР-ази [2]. Тому є очевидним, що взаємодія каліксарену С-97 з субфрагментом-1 міозину в ділянці, яка знаходиться поряд з АТР-азним центром міозину, буде впливати на його конформацію, а отже і на процес гідролізу АТР, каталізований субфрагментом-1 міозину.

*Амінокислотні залишки субстратзв'язувального домену субфрагмента-1 міозину, які беруть участь у зв'язуванні калікс[4]арену С-97 у разі його докінгу як окремого ліганду та за докінгу одночасно пари лігандів «С-97 – АТР» у присутності  $Mg^{2+}$  як кофактора*

| C-97 + Mg          | C-97 + ATP+Mg      |
|--------------------|--------------------|
| Tyr <sub>126</sub> | Asn <sub>124</sub> |
| Arg <sub>127</sub> | Pro <sub>125</sub> |
| Arg <sub>128</sub> | Tyr <sub>126</sub> |
| Asn <sub>238</sub> | Arg <sub>127</sub> |
| Asp <sub>320</sub> | Tyr <sub>132</sub> |
| Asn <sub>321</sub> | Glu <sub>184</sub> |
| Ile <sub>322</sub> | Asn <sub>185</sub> |
| Leu <sub>676</sub> | Asn <sub>238</sub> |
| Lys <sub>677</sub> | Asn <sub>321</sub> |
| Gln <sub>678</sub> | Ile <sub>322</sub> |



Отже, результати, одержані методом молекулярного докінгу, вказують на те, що, по-перше, калікс[4]арен С-97 може зв'язуватись із субфрагментом-1 міозину в області, наближеній до активного центру, спричиняючи конформаційні зміни в ньому; по-друге, калікс[4]арен С-97 здатен утворювати комплекс з АТР ще до його взаємодії із протеїном, що ускладнює доступ нуклеозидтрифосфату до АТР-зв'язувальної ділянки. Обидва варіанти взаємодії каліксарену С-97 із субфрагментом-1 можуть бути причиною інгібуєної дії цього калікс[4]арену на АТР-азну активність субфрагмента-1 міозину міометрія.

Метод докінгу не враховує рухливості S1-міозину та лігандів, яка може спостерігатися в реальних умовах. Тому для перевірки результатів, одержаних методом докінгу, ми провели дослідження взаємодії калікс[4]арену С-97 з лігандзв'язувальним центром субфрагмента-1 міозину методом молекулярної динаміки із врахуванням рухливості як рецептора (субфрагмент-1 міозину), так і ліганду.

При дослідженні динаміки зміни положення молекули каліксарену С-97 в лігандзв'язувальному центрі субфрагмента-1 міозину визначено залежність відхилення атомів від початкового стану в часі, яке характеризується зміною значень відстаней (в нм) між центрами мас каліксарену та найближчим амінокислотним залишком (Asn<sub>321</sub>). При цьому отримали траєкторію (в інтервалі 4 нс) зміни положення калікс[4]арену С-97 в лігандзв'язувальному центрі субфрагмента-1 міозину. Аналіз відхилень показав, що початкове місцеположення каліксарену С-97 помітно змінюється, починаючи приблизно з 1 нс: конформаційна рухливість каліксарену збільшується, а потім знову зменшується, що корелює зі зміною відстані між центрами мас каліксарену та Asn<sub>321</sub>. Це свідчить про те, що за взаємодії каліксарену С-97 з голівкою міозину спостерігається зміна положення каліксарену в часі. Оскільки загальна енергія системи «каліксарен С-97 – субфрагмент-1 міозину», яка була встановлена в процесі молекулярної динаміки, дещо падає, ймовірно, що в ході молекулярної динаміки калікс[4]арен С-97 займає більш енергетично вигідну позицію у лігандзв'язувальному центрі субфрагмента-1 міозину. Встановлено, що молекула каліксарену С-97 змістилася по відношенню до амінокислотного залишку Asn<sub>320</sub> приблизно на 1,81 Å та положення калікс[4]арену С-97 в остаточному місці зв'язування є енергетично стабільним.

Дослідження зміни кількості водневих зв'язків між каліксареном С-97 і амінокислотними залишками лігандзв'язувального центру субфрагмента-1 міозину у часі (в інтервалі 4 нс) (рис. 8) виявило, що в середньому кількість водневих зв'язків, які задіяні у взаємодії каліксарену С-97 з голівкою міозину, залишається незмінною. Вірогідно, що рухомою силою зміни положення каліксарену С-97 у часі в ході молекулярної динаміки є оптимізація гідрофобних та електростатичних взаємодій.

Із використанням 4 нс молекулярної динаміки було також визначено амінокислотні залишки, які беруть участь у зв'язуванні калікс[4]арену із ділянками лігандзв'язувального центру субфрагмента-1 міозину міометрія (рис. 9). Це Tyr<sub>126</sub>, Arg<sub>127</sub>, Leu<sub>676</sub> та Lys<sub>677</sub>. Вони задіяні у фіксації фосфонатних груп каліксарену С-97, які, згідно з даними літератури [2], знаходяться поряд з активним центром АТР-ази. Ці результати загалом добре корелюються з даними, отриманими методом докінгу, наведеними вище.

Результати, одержані методами комп'ютерного моделювання, розширили наші уявлення щодо структурних основ міжмолекулярної взаємодії каліксарену С-97 із субфрагментом-1 міозину міометрія. Зокрема, з'ясована участь гідрофобних, електростатичних та π-π-стекинг взаємодій між каліксареном та амінокислотними залишками субфрагмента-1 міозину, окремі з яких розташовані поряд з активним центром АТР-ази.

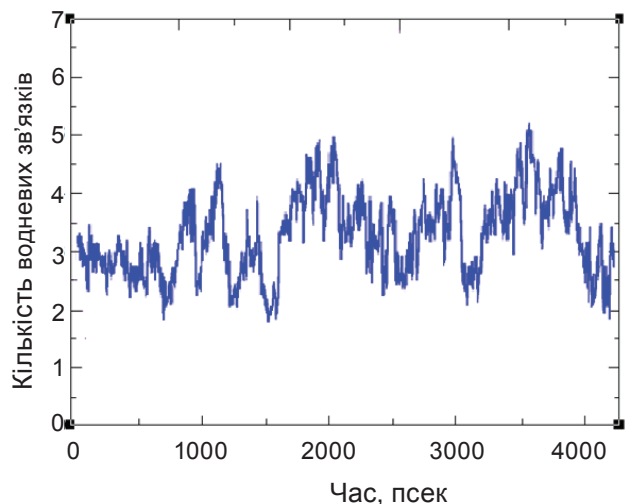


Рис. 8. Встановлення кількості водневих зв'язків, що утворюються між калікс[4]ареном С-99 і амінокислотними залишками лігандзв'язувального центру субфрагмента-1 міозину в часі



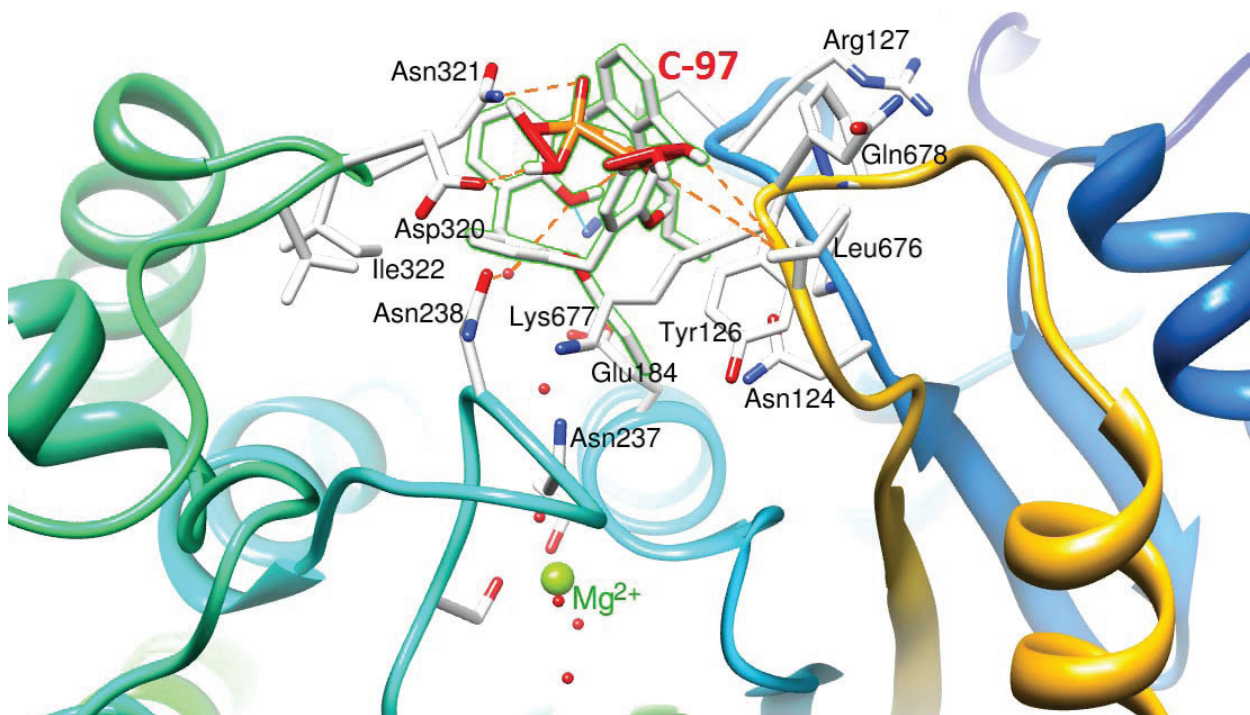


Рис. 9. Зв'язування C-97 в лігандзв'язувальному центрі субфрагмента-1 міозину, визначене за допомогою 4 нс молекулярної динаміки. Амінокислотні залишки, які беруть участь у зв'язуванні C-97 з ЛЗЦ субфрагмента-1 міозину. Пунктиром показано Н-зв'язки між амінокислотними залишками субфрагмента-1 та інгібітором. Також у взаємодії C-97 із голівкою міозину беруть участь  $\pi$ - $\pi$  (стекінг) взаємодії та електростатичні зв'язки

Отже, калікс[4]арен C-97 ефективно інгібує АТР-азну активність субфрагмента-1 міозину. Ця сполука спричинює вірогідне стосовно контролю збільшення гідродинамічного діаметра голівки міозину, що може свідчити про комплексоутворення між каліксареном та голівкою міозину. З використанням методів комп'ютерного моделювання встановлені амінокислотні залишки, гідрофобні та електростатичні сили, що беруть участь у взаємодії калікс[4]арену C-97 із субфрагментом-1 міозину міометрія. Одержані результати дозволяють припустити, що однією з мішеней впливу каліксарену на скоротливий комплекс є голівка міозину.

Автори вдячні к.т.н. Чуніхіну О. Ю. за допомогу під час виконання досліджень на лазерно-кореляційному спектрофотометрі.

Роботу було виконано за фінансової підтримки цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій», проект №13/1(4)-31/10.

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ  
ОСНОВЫ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНОГО  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КАЛИКС[4]-  
АРЕНА С-97 С СУБФРАГМЕНТОМ-1  
МИОЗИНА МИОМЕТРИЯ**

*Р. Д. Лабынцева<sup>1</sup>, А. А. Бевза<sup>1</sup>, А. В. Бевза<sup>1</sup>,  
С. А. Черенок<sup>2</sup>, В. И. Кальченко<sup>2</sup>,  
С. А. Костерин<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А. В. Палладина  
НАН Украины, Киев;  
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Институт органической химии  
НАН Украины, Киев;

Каликс[4]арен С-97 (указан шифр) — макроциклическое соединение, имеющее внутримолекулярную высокоупорядоченную липофильную полость, образованную четырьмя ароматическими кольцами, одно из них по верхнему ободу функционализировано метиленбисфосфоновой группой. Показано, что это соединение в концентрации 100 мкМ эффективно ингибирует АТФ-азную активность субфрагмента-1 миозина миометрия свиньи; коэффициент ингибирования  $I_{0,5}$  составляет  $83 \pm 7$  мкМ. Вместе с тем, указанный каликс[4]арен вызывает достоверное по отношению к контролю увеличение эффективного гидродинамического диаметра субфрагмента-1 миозина, что может свидетельствовать о межмолекулярном комплексообразовании между каликс[4]ареном и головкой миозина.

С использованием методов компьютерного моделирования (докинг, молекулярная динамика с привлечением грид-технологий) выяснены структурные основы межмолекулярного взаимодействия каликс[4]арена С-97 с субфрагментом-1 миозина миометрия, участие гидрофобных, электростатических и  $\pi$ - $\pi$  (стэкинг) взаимодействий между каликсареном С-97 и аминокислотными остатками субфрагмента-1 миозина; некоторые из них находятся рядом с активным центром АТФ-азы.

**Ключевые слова:** АТФ-аза, субфрагмент-1 миозина, каликс[4]арен С-97, гладкие мышцы, матка.

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL  
BASES OF THE INTERMOLECULAR  
INTERACTION OF CALIX[4]ARENE  
C-97 WITH MYOSIN SUBFRAGMENT-1  
OF MYOMETRIUM**

*R. D. Labyntseva<sup>1</sup>, A. A. Bevza<sup>1</sup>, O. V. Bevza<sup>1</sup>,  
S. O. Cherenok<sup>2</sup>, V. I. Kalchenko<sup>2</sup>,  
S. O. Kosterin<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Palladin Institute of Biochemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: kinet@biochem.kiev.ua;

<sup>2</sup>Institute of Organic Chemistry, National  
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: vik@bpci.kiev.ua

**S u m m a r y**

Calix[4]arene C-97 (code is shown) is the macrocyclic compound which has lipophilic intramolecular highly-structured cavity formed by four aromatic cycles, one of which on the upper rim is modified by methylene bisphosphonic group. It was shown that calix[4]arene C-97 (100  $\mu$ M) efficiently inhibits ATPase activity of myosin subfragment-1 from pig myometrium, the inhibition coefficient  $I_{0,5}$  being  $83 \pm 7$   $\mu$ M. At the same time, this compound at 100  $\mu$ M concentration significantly increases the effective hydrodynamic diameter of myosin subfragment-1, that may be indicative of intermolecular complexation between the calix[4]arene and myosin head.

Computer simulation methods (docking, molecular dynamics, involving the Grid) have been used to clarify structural basis of the intermolecular interaction of calix[4]arene C-97 with myosin subfragment-1 of the myometrium; participation of hydrophobic, electrostatic and  $\pi$ - $\pi$  (stacking) interactions between calix[4]arene C-97 and amino acid residues of myosin subfragment-1, some of them being located near the active site of the ATPase has been found out.

**Key words:** ATPase, myosin subfragment-1, calix[4]arene C-97, smooth muscle, uterus.

1. *Khataee H. R., Khataee. A. R. // Digest J. Nanomater. Biostruct. — 2009. — 4, N 4. — P. 613–621.*

2. *Burghardt T. P., Neff K. L., Wieben E. D. et al.* // BMC Genomics. – 2010. – **11**. – P. 172. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/172>.
3. *Bárány M., Bárány K.* Biochemistry of Smooth Muscle Contraction / Ed. Bárány M. – Chicago: Academic Press. – 1996. – 418 p.
4. *Kaliman I. A., Grigorenko B. L., Shadrina M. S., Nemukhin A. V.* // Phys. Chem. Chem. Phys. – 2009. – **11**. – P. 4804–4807.
5. *Попов Е. М., Демин В. В., Шибанова Е. Д.* Проблема белка. – **2**: Пространственное строение белка / Под ред. Т. И. Сорокина. – М: Наука, 1996. – 480 с.
6. *Левицкий Д. И.* // Биохимия. – 2004. – **69**, № 11. – С. 1447–1462.
7. *Бевза А. А., Лабинцева Р. Д., Родік Р. В. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2009. – **81**, № 6. – С. 49–58.
8. *Solovyov A. V., Cherenok S., Tsybaly I. et al.* // Heteroatom Chemistry. – 2001. – **12**. – P. 58–67.
9. *Bárány M., Bárány K., Gaetijens M., Balin G.* // Arch. Biochem. Biophys. – 1966. – **113**, N 1. – P. 205–211.
10. *Weber A.* // Biochem. Biophys. Acta. – 1956. – **19**, N 2. – P. 345–351.
11. *Weeds A. G., Taylor R. S.* // Nature. – 1975. – **257**, N 1. – P. 54–56.
12. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. – 1976. – **72**, N 1. – P. 248–282.
13. *Laemmly U. K.* // Nature (London). – 1970. – **227**, N 7. – P. 680–685.
14. *Iwane A. H., Kitamura K., Tokunaga M. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1997. – **230**, N 1. – P. 76–80.
15. *Chen P. S., Toribara Jr., T. Y., Warner H.* // Analyt. Chem. – 1956. – **28**, N 11. – P. 1756–1758.
16. *Курганов В. И.* Аллостерические ферменты. – М.: Наука, 1978. – 248 с.
17. *Merkus H. G.* Particle Size Measurements. Fundamentals, Practice, Quality. – Springer. – 2009. – 533 p.
18. *Storn R. M., Price K.* // J. Glob. Optim. – 1997. – N 11. – P. 341–359.
19. *Case D. A., Pearlman D. A., Caldwell J. W. et al.* / AMBER 7. University of California, San Francisco. – 2002. – 318 p.
20. *Berman H. M., Westbrook J., Feng Z. et al.* // Nucl. Acids Res. – 2000. – **28**, N 1. – P. 235–242.
21. *Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B. et al.* // J. Comput. Chem. – 2005. – **26**. – P. 1701–1719.
22. *Allen M. P., Tildesley D. J.* / Computer Simulation of Liquids. Oxford: Clarendon Press. – 2002. – 385 p.
23. *Li L., Jose J., Xiang Y. et al.* // Nature. – 2010. – **468**, N 7324. – P. 645–646.
24. *Коростылев П. П.* / Приготовление растворов для химико-аналитических работ. – Изд-во АН СССР, 1964. – 310 с.
25. *Xu R.* / Particle Characterization. Light Scattering Methods. – Kluwer. – 2002. – 410 p.
26. *Proteins and Cell Regulation. Myosins. A Superfamily of Molecular Motors* / Ed. L. M. Coluccio. – Watertown, MA, USA: Springer. – 2008. – **7**. – 467 p.
27. *Baby G. J., Warsaw D. M., Periasamy M.* // Microsc. Res. Tech. – 2000. – **50**, N 6. – P. 532–540.
28. *Burgess S. A., Yu S., Walker M. L. et al.* // J. Mol. Biol. – 2007. – **372**, N 5. – P. 1165–1178.
29. *Векліч Т. О., Костерін С. О., Родік Р. В. та ін.* // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 1. – С. 70–78.

Отримано 21.11.2011