УДК 577.152.7

ЗАХИСНИЙ ВПЛИВ ТІАКАЛІКС[4]АРЕН-ТЕТРАСУЛЬФОНАТУ НА ІНГІБУВАННЯ АТР-ГІДРОЛАЗНОЇ АКТИВНОСТІ СУБФРАГМЕНТА-1 МІОЗИНУ МІОМЕТРІЯ КАТІОНАМИ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

Р. Д. ЛАБИНЦЕВА[1], О. В. БЕВЗА[1], А. А. БЕВЗА[1], А. О. ЛЮЛЬКО[1], С. Г. ХАРЧЕНКО[2], В. І. КАЛЬЧЕНКО[2], С. О. КОСТЕРІН[1]

[1]Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ;
e-mail: labyntseva@biochem.kiev.ua; kinet@biochem.kiev.ua;
[2]Інститут органічної хімії НАН України, Київ;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua

Важкі метали негативно впливають на скоротливі властивості гладенького м'яза матки, що часто стає причиною різноманітних патологій репродуктивної системи у жінок. У зв'язку з цим виникає потреба в розробленні ефективних методів корекції порушень скоротливої активності міометрія. Гідроліз АТР, каталізований міозиновою АТРазою, є одним із найважливіших елементів молекулярного механізму скорочення міометрія. Нами встановлена інгібувальна дія 0,03–0,3 мМ Ni^{2+}, Pb^{2+} та Cd^{2+} на ензиматичний гідроліз АТР, що здійснюється за участю субфрагмента-1 міозину, одержаного із гладенького м'яза матки свині. Тіакалікс[4]арен-тетрасульфонат (С-798) у концентрації 100 мкМ відновлює до контрольного рівня АТРазну активність субфрагмента-1 міозину у присутності катіонів важких металів. Найвірогідніше із припущень щодо механізму корегувальної дії С-798 ґрунтується на здатності цієї сполуки хелатувати важкі метали, а саме вилучати катіони Pb, Cd та Ni із середовища інкубації. Методом комп'ютерного моделювання було продемонстровано, що захисний вплив С-798 може бути також наслідком послаблення взаємодії катіонів важких металів з амінокислотними залишками молекули міозину поблизу активного центру АТР-гідролази. Таким чином, отримані результати можуть бути використані в подальших дослідженнях, спрямованих на оцінку перспективності тіакалікс[4]арен-тетрасульфонату як фармакологічної сполуки.

Ключові слова: міозин, субфрагмент-1, важкі метали, тіакалікс[4]арен, АТРазна активність, докінг, гладенькі м'язи, матка.

Велику кількість патологій в жінок, обумовлених порушенням скоротливої функції гладенького м'яза матки (міометрій), пов'язують з накопиченням важких металів у довкіллі [1, 2]. Скоротлива функція гладенького м'яза матки пов'язана з роботою основного структурного та скоротливого протеїну гладенького м'яза матки – міозину. Завдяки АТРазі міозин використовує хімічну енергію гідролізу АТР для виконання механічної роботи, яка приводить у рух голівки міозину вдовж актинових філаментів, внаслідок чого відбувається скорочення м'язів.

Відомо, що Pb^{2+} та Cd^{2+} є найпоширенішими в навколишньому середовищі серед катіонів важких металів та мають найбільшу здатність накопичуватись в тканинах живих організмів. Вони токсичні для багатьох фізіологічних систем у хребетних, у тому числі і для репродуктивної. Матка є органом, здатним накопичувати ці метали [3–5]. Ni^{2+} як біометал, у надлишковій кількості є токсичним для живих організмів і може спричинювати низку патологій. Хронічна інтоксикація Ni^{2+} підвищує ризик розвитку новоутворень легенів, нирок, шкіри, шлунка. Відомий його негативний вплив на репродуктивну систему людини та тварин [5, 6]. Встановлено інгібувальну дію Ni^{2+}, а також Pb^{2+} та Cd^{2+} на АТР-гідролазну активність актоміозинового комплексу міометрія свині [7, 8] .

Негативний вплив Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+} на скоротливі властивості міометрія потребує пошуку фармакологічних сполук, які можуть усунути дію цих металів. Перспективним

класом таких сполук є похідні каліксаренів [9] та тіакаліксаренів [10], які містять на макроциклічній молекулярній платформі рецепторні угруповання, здатні до селективного зв'язування катіонів металів певного типу [11]. Похідні каліксаренів, завдяки здатності зв'язувати в супрамолекулярні комплекси катіони (біо)металів, знайшли застосування в біомедичних дослідженнях як мембранотропні препарати [12], модулятори АТР-залежних кальцієвих насосів [13], інгібітори металоензимів [14], сорбенти радіонуклідів, [15] сенсори [16].

Об'єктом наших досліджень був тетрагідроксиітіакалікс[4]арен-тетрасульфонат (сполука С-798) (рис. 1, *а*) у формі тетранатрієвої солі [17]. У цій сполуці щільно розміщені на нижньому вінці макроциклу гідроксильні групи та атоми двовалентної сірки, що здатні хелатувати перехідні та важкі метали, в тому числі Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+} з утворенням міцних металокомплексів (рис. 1, *б*) [18]. Верхній вінець макроциклу містить чотири аніонні сульфонатні угруповання, котрі забезпечують гарну водорозчинність тіакаліксарену та адгезію до протеїнових молекул за рахунок електростатичних контактів із позитивно зарядженими атомами азоту амінокислотних фрагментів [19].

Детальне вивчення будови комплексу *трет*-бутилтіакалікс[4]арену з Ni^{2+} за допомогою методів ЯМР-спектрометрії та рентгеноструктурних досліджень (рис. 1в) чітко вказує на те, що атоми сірки беруть безпосередню участь у формуванні комплексу [20].

У цій роботі проведені дослідження сумісної дії катіонів важких металів (Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+}) та тіакаліксарену С-798 на біохімічний процес, який моделює молекулярний механізм скорочення міометрія – АТРазну активність міозину. Як відомо, субфрагмент-1 є основною функціональною одиницею міозину, оскільки навіть в ізольованому стані він має АТРазну активність, близьку до активності нативного міозину. Завдяки розчинності в розчинах із

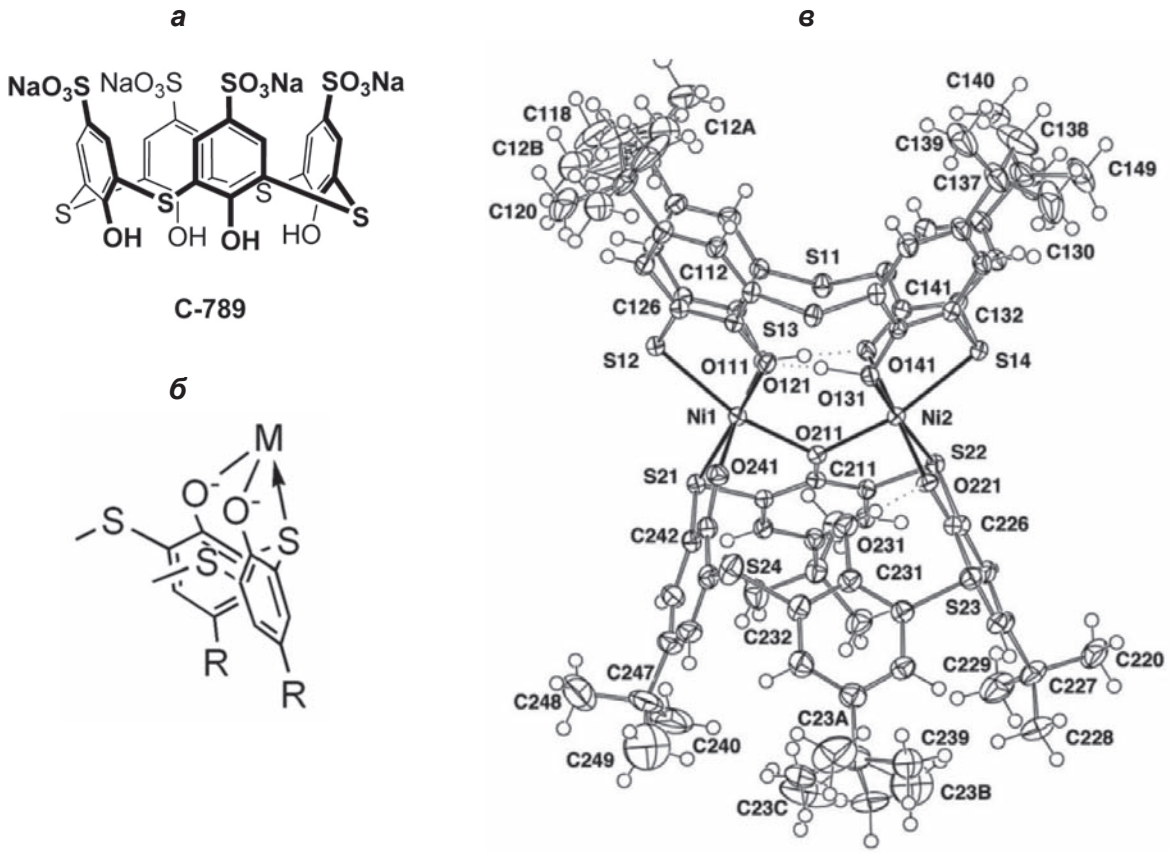


Рис. 1. Молекулярна формула сполуки С-798 (а) та структура хелатного комплексу з катіоном металу (б). Молекулярна структура комплексу [Ni_2(тіакаліксарен·Me_2CO)(тіакаліксарен·dmf)] (Me_2CO – ацетон; dmf – диметилформамід – не показано) [20] (в)

низькою іонною силою (на відміну від міозину) субфрагмент-1 є зручною моделлю для вивчення впливу будь-яких ефекторів на АТР-гідролазну активність скоротливих протеїнів.

Матеріали та методи

Препарат актоміозину отримували із гладенького м'яза матки свині методом, описаним у нашій попередній роботі [8]. Препарат субфрагмента-1 міозину одержували із актоміозину свині за методом Weeds A. G. і Taylor R. S. [21] із деякими модифікаціями [8]. Чистоту препарату контролювали методом електрофорезу в поліакриламідному гелі за денатуруючих умов.

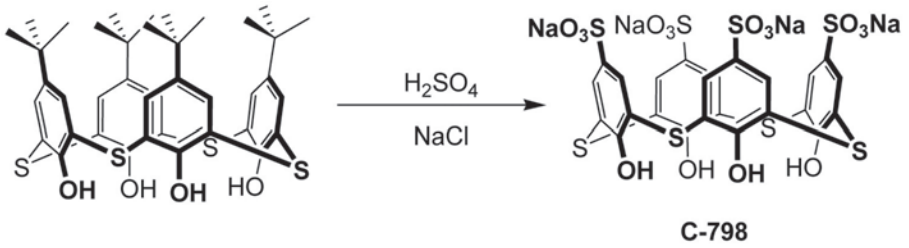
Активність АТРази субфрагмента-1 міозину визначали при 37 °С у середовищі інкубації (загальний об'єм 1 мл) такого складу (в мМ): трис-HCl буфер (pH 7,2) – 20, KCl – 100, $CaCl_2$ – 0,01, $MgCl_2$ – 5, АТР – 3 (стандартні умови). Концентрація протеїну – 20 мкг/мл. Тривалість інкубації – 1 хв. Контролем на неензиматичний гідроліз АТР слугували проби, в яких актоміозин був відсутній. Кількість відщепленого від нуклеозидтрифосфату P_i під час АТР-гідролазної реакції визначали методом Chen P. S. [22]. Суперпреципітацію актоміозину досліджували при кімнатній температурі в середовищі інкубації (загальний об'єм 2 мл) такого складу (в мМ): трис-HCl буфер (pH 7,2) – 5, KCl – 100, $CaCl_2$ – 0,01, $MgCl_2$ – 5 (стандартні умови). Концентрація протеїну – 500 мкг/мл. Запускали реакцію суперпреципітації додаванням до інкубаційного середовища, яке містило протеїн, аліквоту АТР до кінцевої концентрації 4 мМ. Кінетику суперпреципітації актоміозину реєстрували на спектрофотометрі СФ-26, λ 550 нм. Тривалість дослідження – 10 хв. Значення АТР-гідролазної активності субфрагмента-1 міозину становили 50–80 мкмоль P_i/хв на мг протеїну.

Вплив Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+} окремо, а також разом із калікс[4]ареном С-798 на питому ензиматичну активність АТРази субфрагмента-1 міозину та суперпреципітацію актоміозину досліджували у стандартному середовищі інкубації. Концентрація Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+} у пробі становила 0,03–0,3 мМ, каліксарену – 100 мкМ. Коефіцієнти інгібування $I_{0,5}$ визначали графічно як концентрацію катіонів важких металів, за яких інгібування АТРазної активності субфрагмента-1 становило 50% від контрольного значення (стандартні умови).

Для досліджень використовували такі реактиви: БСА, ЕГТА, АТР, аскорбінову кислоту (Sigma, США), дитіотреїтол (Serva, Німечинна), акриламід (Fluka, Швейцарія), трис, гліцин (Merck, Німеччина), N,N′-метиленбісакриламід (Acros organics, Бельгія), N,N,N′,N′-тетраметилендіамін (Reanal, Угорщина), також реактиви вітчизняного виробництва класу осч, хч. Для приготування розчинів використовували воду, очищену системою Crystal Bio (Adrona, Латвія). Електропровідність води становила менше 0,9 мкСм. Концентрацію катіонів двовалентних металів у розчинах визначали титруванням за методом Мора [23].

Тетрасульфонат С-798 був синтезований з виходом 70% *inco*-сульфонуванням *трет*-бутилтіакалікс[4[арену концентрованою сірчаною кислотою при 80 °С та наступною обробкою хлоридом натрію за методом [17] (*схема*).

Комп'ютерне моделювання (докінг) взаємодії досліджуваних лігандів (Pb^{2+}, Cd^{2+}, Ni^{2+} та тіакаліксарену С-798) із субфрагментом-1 міозину проводили у програмі Autodock 4.2 [24]. Під час розрахунку енергії зв'язування враховувалися ван-дер-ваальсові, електростатичні та гідрофобні взаємодії, водневі зв'язки, а також внесок енергії десольватації. Відбір оптимальних результатів проводили як за геометрични-



Схема

ми показниками положення ліганду в центрі зв'язування комплексу «протеїн–ліганд», так і за енергетичними показниками, використовуючи «вбудовані» в програмі докінгу функції розрахунку енергії зв'язування в комплексі «рецептор–ліганд».

Процедуру докінгу в активний центр субфрагмента-1 міозину було виконано для лігандів із повністю іонізованими фрагментами. Для іонів металів (Cd^{2+}, Pb^{2+}, Ni^{2+}) використовували стандартні параметри силового поля AMBER. За моделювання взаємодії лігандів із субфрагментом-1 міозину міометрія здійснювали так званий напівгнучкий докінг і відбирали низку комплексів з найменшою вільною енергією зв'язування лігандів. Далі розраховували оптимальну геометрію утворених комплексів та визначали енергетично найвигідніше розташування тіакаліксарену в просторі субфрагмента-1 міозину. У роботі використовували просторову структуру субфрагмента-1 міозину з ідентифікатором – 1B7T у базі даних протеїнів (RSCB Protein Data Bank) [25]. Для аналізу результатів та підготовки рисунків за результатами докінгу використовували програми Chimera [26] та Yasara [27].

Результати та обговорення

Перш за все було досліджено вплив Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+} на АТР-гідролазну активність міозину гладенького м'яза матки, зокрема його субфрагмента-1, який є основною функціональною одиницею міозину. На рис. 2 представлена залежність АТРазної активності субфрагмента-1 міозину від концентрації Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+}. За 100% приймали величину АТРазної активності субфрагмента-1 міозину в контрольних умовах, а саме в середовищі інкубації без катіонів важких металів, але яке містило АТР, Mg^{2+} та Ca^{2+}. Величина активності АТРази за цих умов становила 50–80 мкмоль P_i/хв на мг протеїну. Катіони Pb та Cd виявляли яскраво виражений інгібувальний ефект на процес гідролізу АТР, каталізований субфрагментом-1 міозину: за 0,03 мМ концентрації Pb^{2+} та Cd^{2+} пригнічували АТРазну активність на 25 та 20% відповідно, за підвищення концентрації до 0,3 мМ пригнічувальний ефект збільшувався (відносно контролю) в середньому до 88% у присутності Pb^{2+} та до 56% у присутності Cd^{2+}. Величина коефіцієнтів $I_{0,5}$ для цих катіонів складає

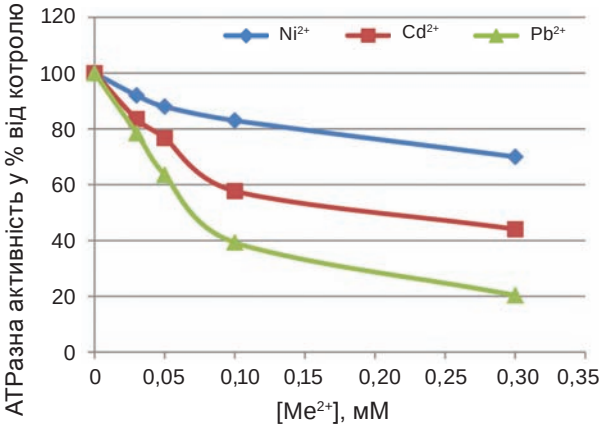


Рис. 2. Концентраційна залежність впливу катіонів Pb, Cd та Ni на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія. За 100% приймали значення АТРазної активності без додавання катіонів важких металів. Наведений типовий графік із вибірки (n = 3–4)

0,08 ± 0,01 мМ та 0,30 ± 0,03 мМ відповідно. Значно менший інгібувальний вплив встановлений у присутності катіонів Ni, а саме 0,3 мМ Ni^{2+} інгібував активність АТРази субфрагмента-1 міозину на 30%.

Щоб з'ясувати, чи зможе С-798 зняти негативний вплив Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+} на ензиматичну активність досліджуваного міозину, до інкубаційного середовища для визначення АТРазної активності, що містило один із цих катіонів, додавали розчин С-798 (50 мМ). Відомо, що сульфонільні групи цього тіакаліксарену здатні за певних умов (pH 9,8) зв'язувати катіони Mg^{2+} та Ca^{2+} [28], що може бути причиною невеликого інгібувального впливу сполуки С-798 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія (рис. 3). Скоріше всього, це зумовлене вилученням з інкубаційного середовища певної кількості катіонів Mg, необхідних для зв'язування АТР в активному центрі АТРази та здійснення гідролізу нуклеозидтрифосфату. Втім, дослідження сумісної дії 0,1 мМ Pb^{2+} та Cd^{2+} та С-798 на процес гідролізу АТР, каталізований субфрагментом-1 міозину, виявило здатність тіакаліксарену відновлювати до контрольного рівня АТРазну активність міозину міометрія у присутності катіонів важких металів (рис. 3). Тіакалікс[4]арен-тетрасульфонат виявляв подібну коригувальну дію відносно АТРазної активності субфрагмента-1 міозину за наявності 0,3 мМ Ni^{2+} (рис. 4).

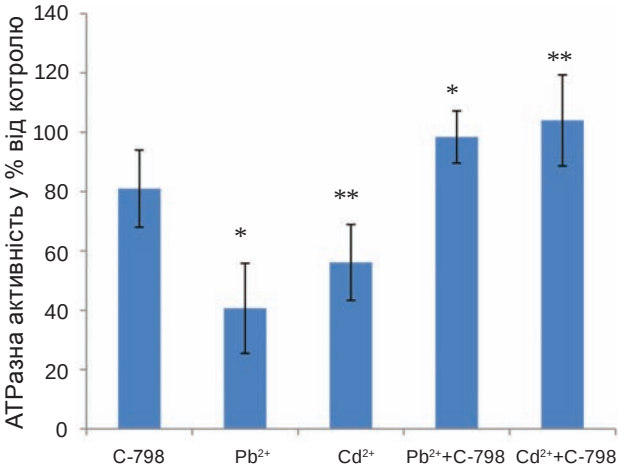


*Рис. 3. Вплив 100 мкМ С-798 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину у присутності 100 мкМ Pb^{2+} та Cd^{2+} (M ± m, n = 5–6). За 100% приймали значення АТРазної активності без додавання катіонів важких металів. *Різниці між значеннями «Pb^{2+}» та «Pb^{2+}+С-798» і ** різниці між значеннями «Cd^{2+}» та «Cd^{2+}+С-798» статистично вірогідні, P < 0,05*

Тіакалікс[4]арен-тетрасульфонат виявляв також відновлювальну дію на реакцію суперпреципітації актоміозину міометрія у присутності 300 мкМ Ni^{2+} (рис. 5). А як відомо, реакція суперпреципітації актоміозинового комплексу в певному наближенні характеризує його скоротливу здатність та пов'язана з процесом гідролізу АТР в активному центрі міозину [29].

Щодо механізму корегувальної дії С-798 на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину у присутності Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+}, то одним із найвирогідніших припущень може бути вилучення досліджуваним тіакаліксареном катіонів Pb, Cd та Ni із середовища інкубації, завдяки його здатності зв'язувати катіони важких металів. Водночас, цікаво, чи здатен цей тіакаліксарен «знешкоджувати» ті катіони важких металів, які вже зв'язалися в певних ділянках молекули міозину. Під час дослідження інших можливих механізмів корегувальної дії С-798 на АТРазу міозину міометрія у присутності важких металів необхідно було з'ясувати ділянки зв'язування цих катіонів із субфрагментом-1 міозину, а також можливість взаємодії Pb^{2+} та Cd^{2+} з каліксареном С-798 у структурі субфрагмента-1 міозину, для чого ми скористались методами комп'ютерного моделювання.

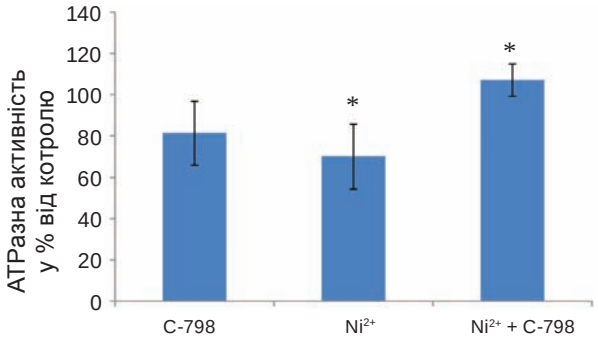


*Рис. 4. Вплив 100 мкМ С-798 на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину у присутності 300 мкМ Ni^{2+} (M ± m, n = 7–8). За 100% приймали значення АТРазної активності без додавання катіонів важких металів. *Різниці між значеннями «Ni^{2+}» та «Ni^{2+}+С-798» статистично вірогідна, P < 0,05*

АТРазна активність міозину залежить від природи катіонів металів, присутніх в інкубаційному середовищі, та добре корелює з їхнім іонним радіусом. Іонні радіуси Mg^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+} та Pb^{2+} у розчинах становлять 0,070; 0,067; 0,102 та 0,126 нм відповідно [30]. Очевидно, що взаємодія Cd^{2+} та Pb^{2+}+ із Mg^{2+}-зв'язувальними ділянками міозину істотно ускладнена через значно більший розмір катіонів Cd та Pb у порівнянні з Mg^{2+}. Але враховуючи експериментально доведену їхню інгібувальну дію на АТРазну активність субфрагмента-1 міозину, можна припустити, що досліджувані катіони

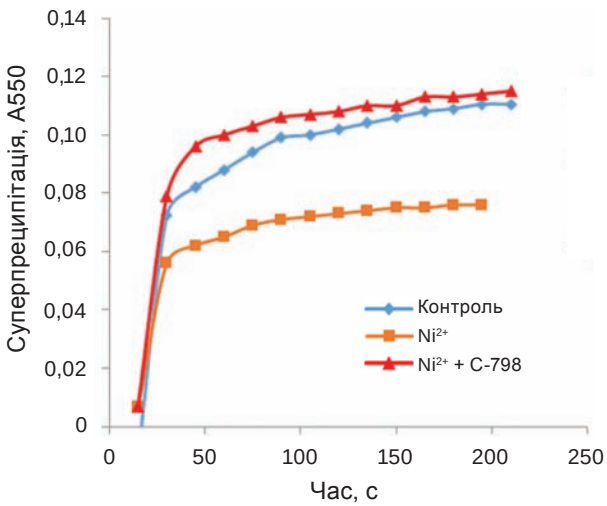


Рис. 5. Сумісна дія 0,3 мМ Ni^{2+} та 100 мкМ С-798 на суперпреципітацію актоміозину міометрія. Наведений типовий графік із вибірки n = 4

зв'язуються з іншими функціонально важливими ділянками субфрагмента-1, які відповідають за зв'язування та гідроліз АТР.

Методом комп'ютерного моделювання встановлено, що Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+} можуть взаємодіяти з амінокислотними залишками субфрагмента-1 міозину в декількох зонах, що мають відношення до функціонування ензиму. Причому місця зв'язування досліджуваних катіонів на поверхні субфрагмента-1 міозину відрізняються від місць зв'язування Mg^{2+} (рис. 6).

Як відомо, у формуванні АТРазного центру беруть участь петля Р (Gly176-Lys187), перемикач 1 (Gly230-Phe243) і перемикач 2 ((Ile461-Ser471), 50 кДа – «верхній» та 50 кДа – «нижній» субдомени, а також «реле» (Leu475-Glu506) [31, 32]. Тому найбільшу увагу ми звернули на дві найвірогідніші області зв'язування для кожного з катіонів (Cd^{2+}, Pb^{2+} та Ni^{2+}), які наближені до АТР-зв'язувальної ділянки субфрагмента-1 міозину.

Встановлено, що Cd^{2+} координується з атомами кисню Glu177 (довжина зв'язку 0,27 та 0,36 нм) і з атомом кисню Ser178 (довжина зв'язку 0,35 нм). Також Cd^{2+} взаємодіє з Arg236 (довжина зв'язку 0,3 нм) в області зв'язування 1 (рис. 7, *А*), яка знаходиться в нижній частині щілини між нуклеозидзв'язувальним центром та «нижнім» субдоменом розміром 50 кДа (Ser652-Leu666), безпосередньо біля петлі Р.

В області зв'язування 2 (рис. 7, *Б*), що знаходиться в нижній частині «верхнього» субдомену розміром 50 кДа (Leu218-Asp463, Glu605-Phe621) та наближена до перемикача 1 (Gly233-Phe246), Cd^{2+} координується із атомом кисню Glu327 (довжина зв'язку 0,24 нм), з атомом кисню Glu326 (довжина зв'язку 0,32 нм) та атомом кисню Asp323 (довжина зв'язку 0,35 нм). Ця ділянка зв'язування, як і 1, також має відношення до зв'язування та гідролізу АТР.

Для Pb^{2+} виявлені дві можливі ділянки зв'язування з субфрагментом-1 міозину. Перша

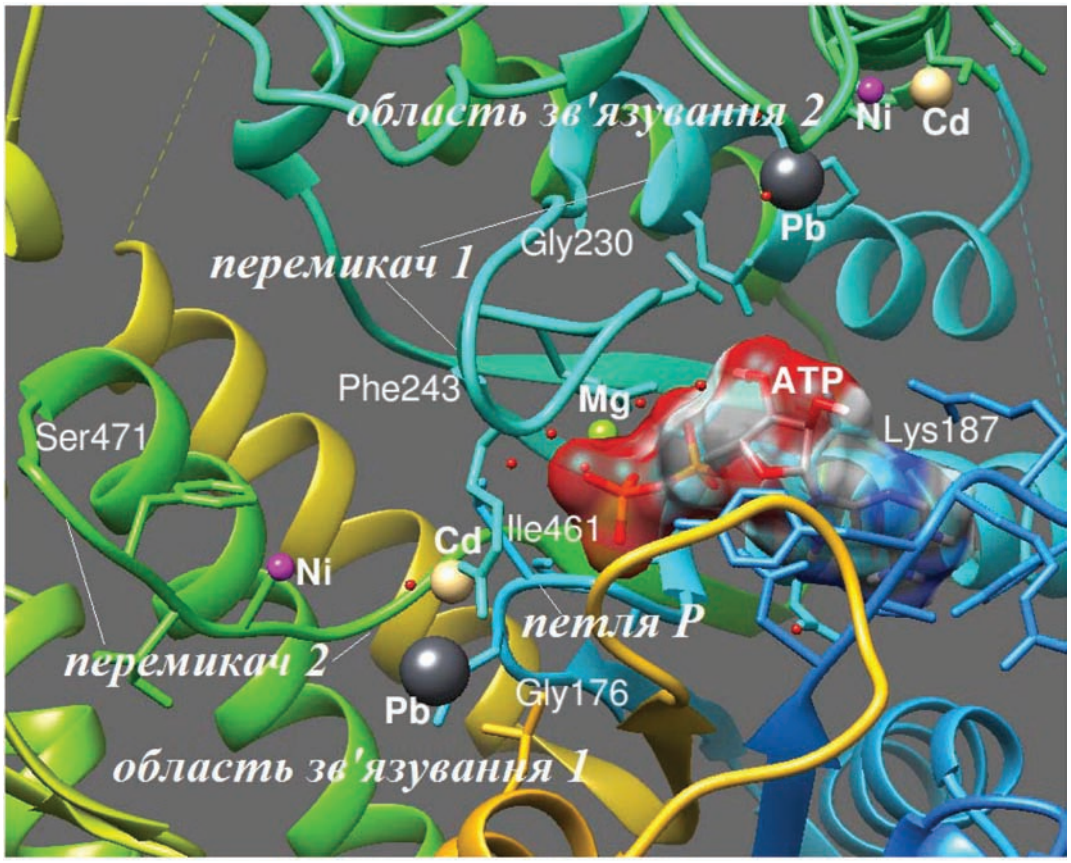


Рис. 6. Докінг Cd^{2+} (світло-жовтий), Pb^{2+} (чорний) та Ni^{2+} (рожевий) в зони зв'язування в області, наближеній до нуклеозидзв'язувальної ділянки субфрагмента-1 молекули міозину. На рисунку показано петлю Р (Gly176-Lys187), перемикач 1 (Gly230-Phe243) і перемикач 2 (Ile461-Ser471)

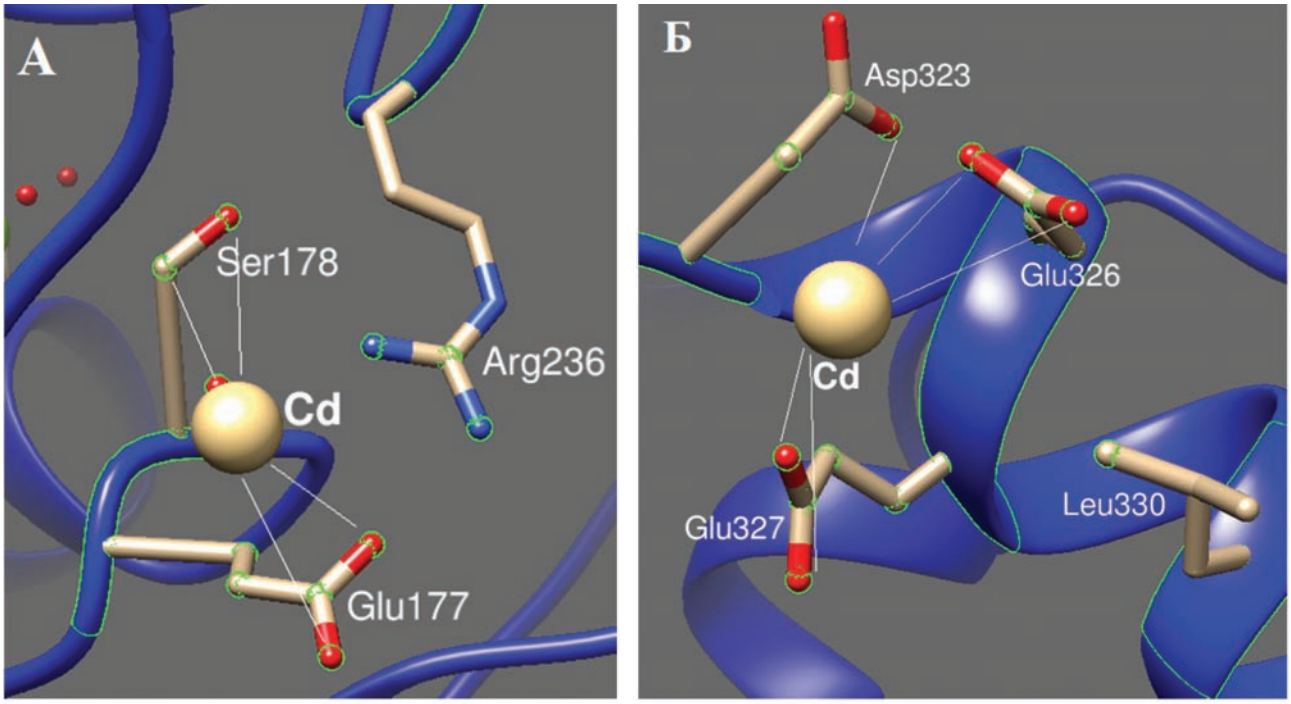


Рис. 7. Взаємодія катіона Cd із лігандзв'язувальною ділянкою субфрагмента-1 міозину у водному оточенні. Лініями показані водневі та іонні взаємодії. А та Б – 1 та 2 ділянки зв'язування

з них (рис. 8, *А*) контактує з перемикачем 1 та петлею P, неподалік від спіралі «реле» (Leu475-Glu506). Катіон Pb координується з атомом кисню Glu177 (довжина зв'язку 0,32 нм), з атомами кисню Glu675 (довжина зв'язку 0,27 та 0,35 нм) і також взаємодіє з Arg236 (довжина зв'язку 0,25 нм) та Leu686 (довжина зв'язку 0,26 та 0,30 нм).

В іншій ділянці зв'язування (рис. 8, *Б*), Pb^{2+} координується з атомами кисню Glu327 (довжина зв'язку 0,25 та 0,34 нм) і з атомом кисню Glu227 (довжина зв'язку 0,35), а також взаємодіє з Pro224 (довжина зв'язку 0,4 нм) та Gln287 (довжина зв'язку 0,45 нм). Ця ділянка зв'язування контактує з перемикачем 1, і також має відношення до зв'язування та гідролізу АТР.

Катіон Ni може взаємодіяти із субфрагментом-1 міозину в області зв'язування, яка контактує з перемикачем 2, що бере участь у зв'язуванні АТР та його гідролізі, а саме взаємодіє з Glu465 (довжина зв'язку 0,22 нм), Asp468 (довжина зв'язку 0,35 нм) та Leu653 (довжина зв'язку 0,37 нм). Ця область зв'язування знаходиться поблизу актинзв'язувальної ділянки та щілини між «верхнім» та «нижнім» 50 кДа субдоменами, на дні якої знаходиться АТР-зв'язувальна кишеня, де через Mg^{2+} зв'язується молекула субстрату. Вона зазнає складних конформаційних перетворень у процесі передачі енергії від АТР-гідролазного центру до актинзв'язувальної поверхні. Також катіон Ni, подібно до Cd^{2+} та Pb^{2+}, може взаємодіяти із протеїном в області зв'язування 2 (дані не наведено).

Можна зазначити, що взаємодія іонів із поверхнею протеїну відбувається, як правило, за участю їх гідратних оболонок. Якщо енергія зв'язку іона з дипольною молекулою води, яка залежить від іонного радіуса, менше теплової енергії, то на поверхні іонів вода не буде утримуватися. Під час взаємодії з поверхнею протеїну, іон металу з великим іонним радіусом міцніше зв'язується з негативно зарядженою групою амінокислотного залишку протеїну і може утворювати кулонівський комплекс із загальною гідратною оболонкою. У цьому разі іони металу повністю компенсують локальний поверхневий заряд протеїнової молекули, і зв'язування катіонів металу із протеїном стає міцнішим.

Дійсно, аналізуючи одержані результати щодо докінгу Cd^{2+}, Pb^{2+} та Ni^{2+}, можна заначити те, що у зв'язуванні досліджуваних катіонів із молекулою міозину основне значення відіграють

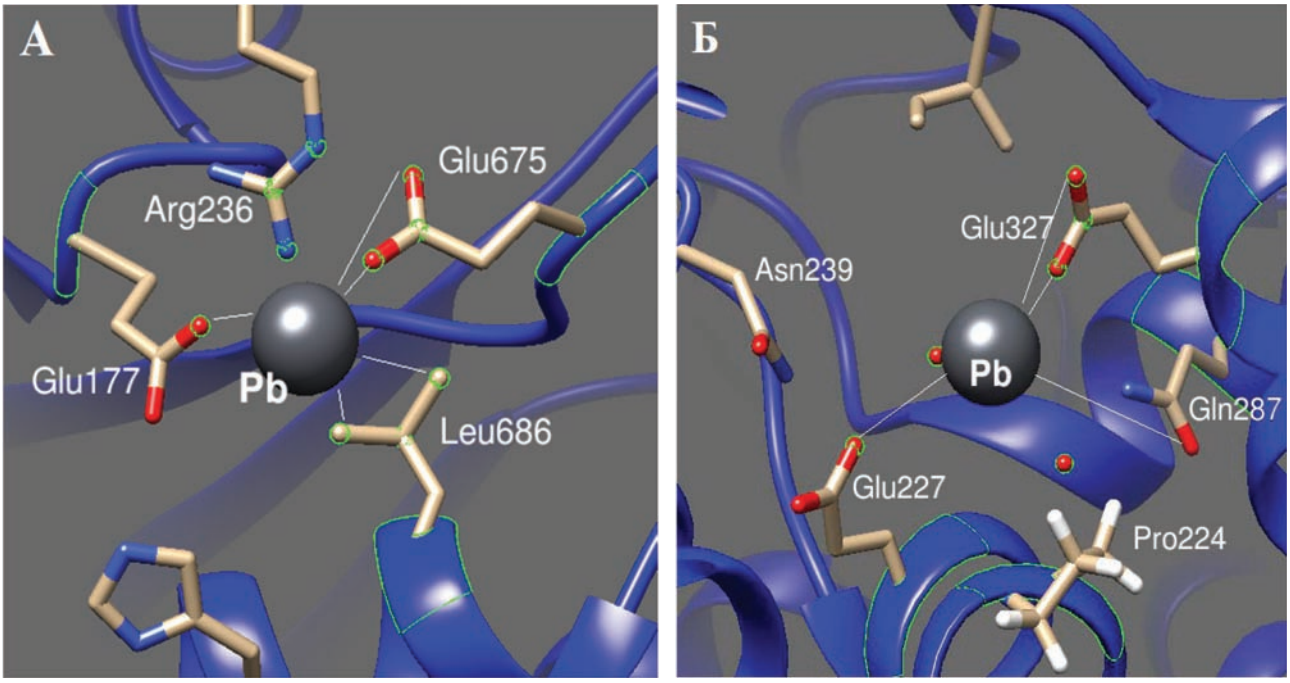


Рис. 8. Взаємодія катіона Pb із лігандзв'язувальною ділянкою субфрагмента-1 міозину у водному оточенні. Лініями показані водневі та іонні взаємодії. А та Б – 1 та 2 ділянки зв'язування

їх взаємодії з негативно зарядженими групами амінокислотних залишків ензиму, зокрема Glu та Asp.

Також ми провели дослідження взаємодії С-798 із катіонами Cd та Pb за умови їх попереднього докінгу в лігандзв'язувальну ділянку субфрагмента-1 міозину. Цей тіакаліксарен знаходиться в конформації «конус», яка стабілізується внутрішньомолекулярними водневими зв'язками між фенольними групами. Спочатку ми отримали енергетично мінімізовану структуру С-798: загальна енергія після мінімізації становила 62,45 ккал/моль. Наявність іонізованих сульфонільних груп на верхньому вінці та гідроксильних груп на нижньому вінці тіакаліксарену істотно збільшує внесок електростатичних взаємодій в загальну енергію взаємодії «гість-хазяїн» [33].

На рис. 9 наведені результати вбудовування С-798 у структуру субфрагмента-1 міозину за попереднього зв'язування протеїном катіонів Cd (рис. 9, *А*) та Pb (рис. 9, *Б*) в області зв'язування 1 для кожного катіона. Cd^{2+} взаємодіє з атомами кисню нижнього обода та місткової сірки С-798 (О3 – 0,21 нм; S1 – 0,30 нм, О2 – 0,33 нм). При цьому спостерігається зміна положення катіона в цій області зв'язування. Показано, що Cd^{2+} дещо відходить від амінокислотних залишків петлі P, і його взаємодія з атомом кисню Glu177 послаблюється (довжина зв'язку 0,39 нм) (рис. 9, *А*).

У разі взаємодії з катіоном Cd, С-798 фіксується у «западині» моторного домену субфрагмента-1 міозину за участю декількох амінокислотних залишків. Зокрема, гідрофобна корзина тіакаліксарену фіксується залишками ароматичних амінокислот Phe467 та Phe469 субфрагмента-1 міозину, негативно заряджені атоми кисню тіакаліксарену взаємодіють із позитивно зарядженими залишками амінокислот – Arg570, Asn572 та His689.

Катіон Pb, подібно до Cd^{2+}, взаємодіє з атомами кисню нижнього обода та місткової сірки каліксарену (S2 – 0,23 нм; О1 – 0,25 нм; О3 – 0,28 нм). (рис. 9, Б) і також дещо віддаляється від попереднього місця зв'язування в області 1 (рис. 10, *Б*). Катіон Pb^{2+} припиняє взаємодіяти з атомом кисню Glu177, а координування з Glu675 стає слабкішим (довжина зв'язку 0,39 нм). Водночас, гідрофобна корзина С-798 фіксується залишками ароматичних амінокислот Phe464 та Phe467 субфрагмента-1 міозину, негативно заряджені

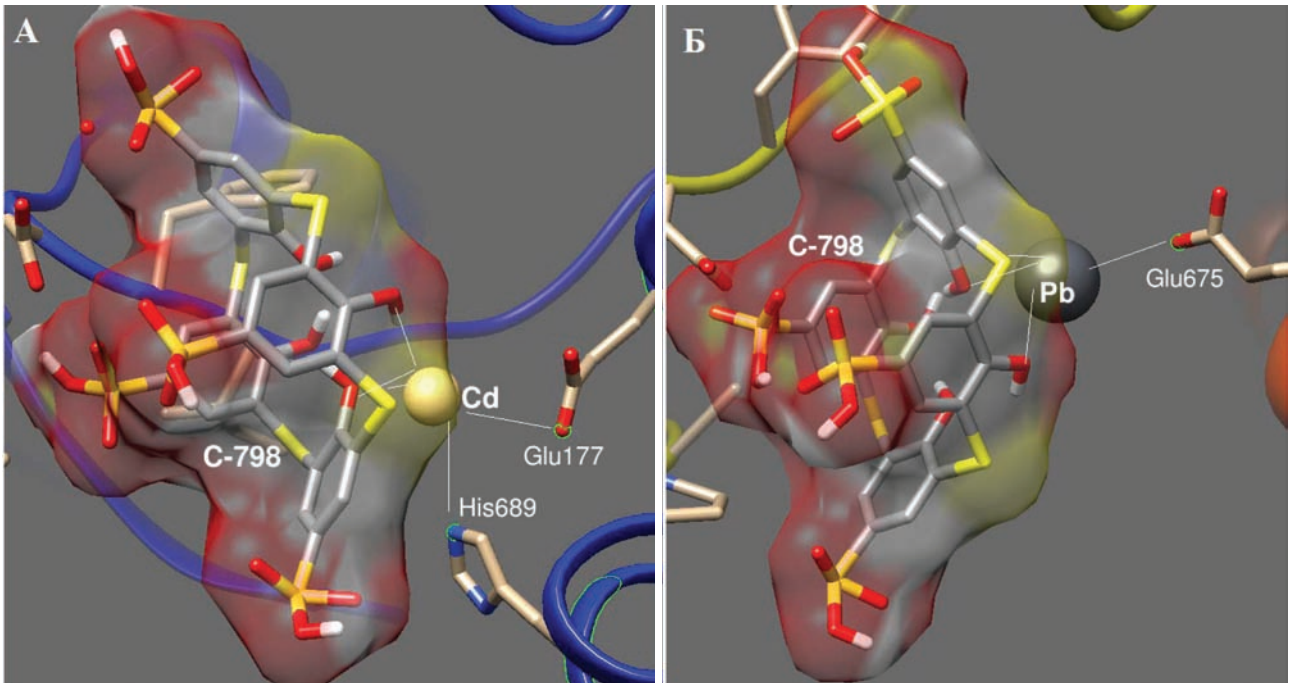


Рис. 9. Вплив С-798 на взаємодію катіонів Cd (А) та Pb (Б) із амінокислотними залишками субфрагмента-1 в області зв'язування 1 кожного з катіонів

атоми кисню калікс[4]арену взаємодіють із позитивно зарядженими залишками амінокислот – Pro571, Asn572 та Gln573.

Також ми дослідили вплив С-798 на зміну геометрії положення Cd^{2+} та Pb^{2+} під час докінгу в область зв'язування 2 субфрагмента-1 міозину (рис. 10). У присутності тіакаліксарену Cd^{2+} взаємодіє з атомами кисню третьої сульфонільної групи (О16 – 0,25 нм; О15 – 0,26 нм) (рис. 10, *А*), майже не взаємодіє з атомами кисню Asp323 та Glu326, а координування з Glu327 значно слабшає (довжина зв'язку 0,41 нм).

У разі вбудовування С-798 як і у разі з Cd^{2+} катіон Pb також взаємодіє з атомами кисню третьої сульфонільної групи (О16 – 0,2 нм; О14 – 0,26 нм; О15 – 3,8 нм). При цьому цей катіон дещо віддаляється від попереднього місця зв'язування в області 2 субфрагмента-1 міозину, і нівелюється його взаємодія з атомом кисню Glu227, а з Glu327 координується лише з одним атомом кисню, причому їх взаємодія значно послаблюється (довжина зв'язку 0,41 нм) (рис. 10, *Б*). В обох випадках тіакаліксарен фіксується у «западині» протеїну за участі декількох амінокислотних залишків (рис. 10). Зокрема, негативно заряджені атоми кисню сульфонільних груп тіакаліксарену взаємодіють із позитивно зарядженими залишками амінокислот – Lys188, Lys195 та Gln221 субфрагмента-1 міозину.

На рис. 9, 10 С-798 «оточений» напівпрозорою поверхнею, яка відображає карту розповсюдження електростатичних взаємодій, зумовлених наявністю атомів кисню (червоний колір) та атомів сірки (жовтий колір). Згідно з рисунками, катіони Cd та Pb контактують і навіть дещо перекриваються з цією поверхнею. Це свідчить про те, що досліджувані катіони знаходяться у досить тісній взаємодії з негативно зарядженими атомами верхнього та нижнього вінців С-798. Ймовірно, що тіакаліксарен «відтягує» на себе Pb^{2+} та Cd^{2+}, внаслідок чого взаємодія катіонів з амінокислотними залишками ензиму послаблюється.

Отже, результати докінгу С-798 у ділянку субфрагмента-1 міозину, яка наближена до АТР-гідролазного центру, під час зв'язування з протеїном Cd^{2+}, Pb^{2+}, вказують на ймовірність взаємодії функціональних груп С-798 із катіонами важких металів. При цьому зв'язки Cd^{2+} та Pb^{2+} із залишками амінокислот субфрагмента-1 міозину істотно послаблюються, і відстань між ними збільшується. Можливо, внаслідок цього знімається їх негативний вплив на АТРазну активність міозину.

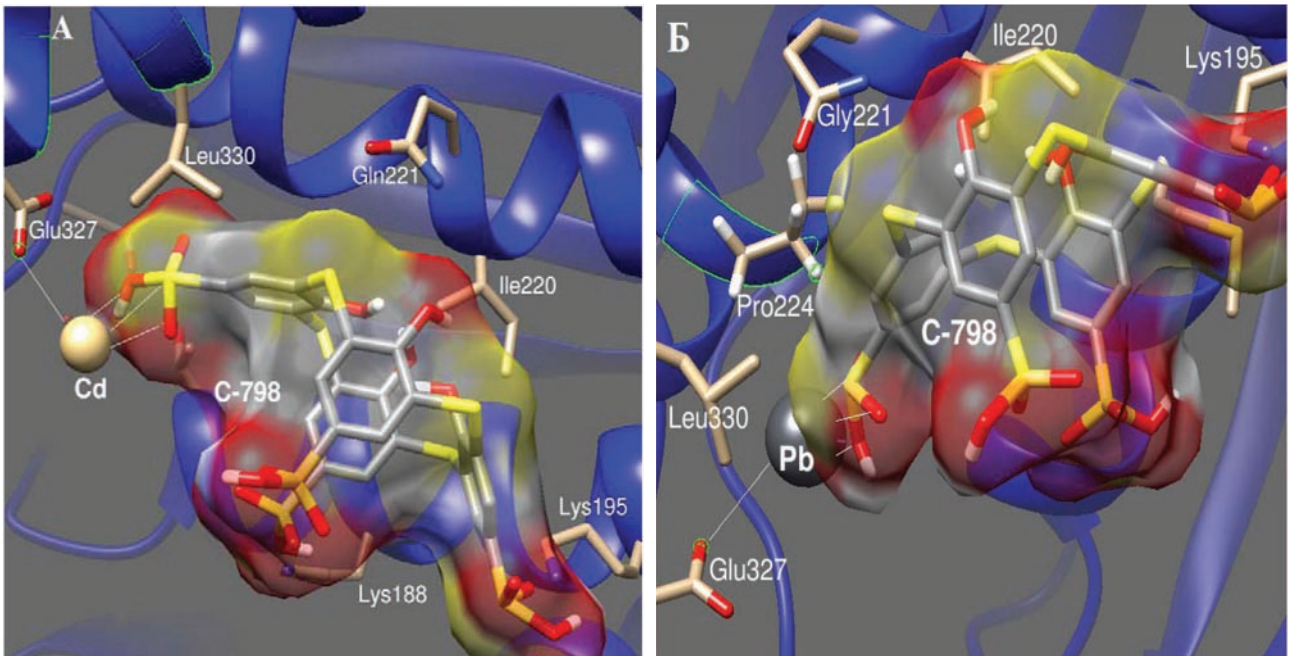


Рис. 10. Вплив С-798 на взаємодію катіонів Cd (А) та Pb (Б) із амінокислотними залишками S-1, в області зв'язування 2 кожного з катіонів. Лініями показані водневі та іонні взаємодії

Таким чином, встановлено інгібувальну дію Ni^{2+}, Pb^{2+} та Cd^{2+} (0,03–0,3 мМ) на АТР-гідролазну активність субфрагмента-1 міозину міометрія свині. Тіакалікс[4]арен-тетрасульфонат відновлює до контрольного рівня АТРазну активність субфрагмента-1 міозину у присутності катіонів важких металів. Одним із найбільш вірогідних припущень щодо механізму коригувальної дії С-798 може бути вилучення катіонів Pb^{2+}, Cd^{2+} та Ni^{2+} із середовища інкубації завдяки їх зв'язуванню з катіонами важких металів. Методом комп'ютерного моделювання було визначено можливі місця зв'язування Ni^{2+}, Pb^{2+} та Cd^{2+} із субфрагментом-1 міозину, встановлено тип зв'язків між цими катіонами та амінокислотними залишками, їх довжина та геометричні характеристики. Показано зміну положення катіонів важких металів під час докінгу С-798 у ділянки зв'язування Pb^{2+} та Cd^{2+} в межах субфрагмента-1, що може свідчити про здатність С-798 взаємодіяти з катіонами важких металів, які зв'язалися з молекулою міозину. Корегувальна дія С-798 може бути наслідком послаблення взаємодії катіонів важких металів із амінокислотними залишками молекули міозину поблизу активного центру. Одержані результати можуть бути використані в подальших дослідженнях, спрямованих на оцінку перспективності тіакалікс[4]арен-тетрасульфонату як фармакологічної сполуки.

Автори вдячні к.б.н. Ребрієву А. В. за допомогу в очищенні субфрагмента-1 міозину на хроматографічній системі BioRad.

Роботу було виконано за фінансової підтримки державної цільової науково-технічної програми «Нанотехнології та наноматеріали», № 0110U005970.

ЗАЩИТНОЕ ВЛИЯНИЕ ТИАКАЛИКС[4]АРЕН-ТЕТРАСУЛЬФОНАТА НА ИНГИБИРОВАНИЕ АТР-ГИДРОЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СУБФРАГМЕНТА-1 МИОЗИНА МИОМЕТРИЯ КАТИОНАМИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Р. Д. Лабынцева[1], А. В. Бевза[1], А. А. Бевза[1], А. А. Люлько[1], С. Г. Харченко[2], В. И. Кальченко[2], С. А. Костерин[1]

[1]Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины, Киев;
e-mail: labyntseva@biochem.kiev.ua;
kinet@biochem.kiev.ua;
[2]Институт органической химии НАН Украины, Киев;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua

Тяжелые металлы негативно влияют на сократительные свойства гладких мышц матки, что часто становится причиной различных патологий репродуктивной системы у женщин. В связи с этим возникает потребность в разработке эффективных методов коррекции нарушений сократительной активности миометрия. Гидролиз АТР, катализируемый миозиновой АТРазой, является одним из главнейших элементов молекулярного механизма сокращения миометрия. Нами установлено ингибирующее действие 0,03–0,3 мМ Ni^{2+}, Pb^{2+} и Cd^{2+} на энзиматический гидролиз АТР, осуществляемый с участием субфрагмента-1 миозина, полученного из гладких мышц матки свиньи. Тиакаликс[4]-арен-тетрасульфонат (С-798) в концентрации 100 мкМ восстанавливает до контрольного уровня АТРазную активность субфрагмента-1 миозина в присутствии катионов тяжелых металлов. Одной из наиболее вероятных версий относительно механизма корректирующего действия С-798, основанной на его способности хелатировать тяжелые металлы, может быть изъятие Pb^{2+}, Cd^{2+} и Ni^{2+} из среды инкубации. Методом компьютерного моделирования было продемонстрировано, что защитное влияние С-798 может быть также следствием ослабления взаимодействия катионов тяжелых металлов с аминокислотными остатками молекулы миозина вблизи активного центра АТР-гидролазы. Таким образом, полученные результаты могут быть использованы для дальнейших исследований, направленных на оценку перспективности тиакаликс[4]арен-тетрасульфоната как фармакологического соединения.

Ключевые слова: миозин, субфрагмент-1, тяжелые металлы, тиакаликс[4]арен, АТРазная активность, докинг, гладкие мышцы, матка.

PROTECTIVE EFFECT OF TIACALIX[4] ARENE-TETRASULPHONATE ON HEAVY METAL INHIBITION OF MYOMETRIUM MYOSIN SUBFRAGMENT-1 ATP-HYDROLASE ACTIVITY

R. D. Labyntseva[1], O. V. Bevza[1], A. A. Bevza[1], A. M. Lulko[1], S. Kharchenko[2], V. I. Kalchenko[2], S. O. Kosterin[1]

[1]Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: labyntseva@biochem.kiev.ua;
kinet@biochem.kiev.ua;
[2]Institute of Organic Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
e-mail: vik@ioch.kiev.ua

Heavy metals have a negative effect on the contractility of uterine smooth muscles (myometrium), these effects can lead to various pathologies of a women reproductive system. To overcome these effects the methods for correcting the myometrium contractile activity are to be developed. Catalyzed by myosin ATPase ATP hydrolysis is the most important reaction in the molecular mechanism of myometrium contraction. We have found an inhibitory effect of 0.03-0.3 mM Ni^{2+}, Pb^{2+} and Cd^{2+} on enzymatic hydrolysis of ATP by myosin subfragment-1 obtained from swine uterine smooth muscles. We have demonstrated that 100 μM thiacalix[4]arene-tetrasulphonate (C-798) recovered to the control level of ATPase activity of myosin subfragment-1 in the presence of heavy metal cations. One of the most probable mechanisms of C-798 corrective activity is based on its ability to chelate heavy metals, thus cations Pb, Cd and Ni can be removed from the incubation medium. Computer simulation has demonstrated that the protective effect of C-798 may also be the result of weakening the interaction of heavy metal ions with amino acid residues of the myosin molecule near the active site of ATP hydrolase. The obtained results can be used for further research

aimed at assessing the prospects of thiacalix[4] arene-tetrasulfonate as pharmacological compounds.

Key words: myosin subfragment-1, heavy metals, thiacalix[4]arene, ATPase activity, docking, smooth muscle, uterus.

References

1. Paranko N. M., Rublevskaya N. I., Belytskaya E. N., Golovkova T. A., Zemlyakova T. D., Chub L. E., Shmatkov G. G. The role of heavy metals in occurrence of reproductive disorders. *Gigiena i sanitariia*. 2002;(1):28-30. (In Russian).
2. Serduk A. M., Belitskaya E. N., Paranko N., Shmatko G. G. Heavy metals external environment and their impact on the reproductive function of women. Dnepropetrovsk: ART Press, 2004. 148 p. (In Russian).
3. Dorea J. G., Donangelo C. M. Early (in uterus and infant) exposure to mercury and lead. *Clin. Nutr.* 2006;25(3):369-376.
4. Bellinger D. C., Burger J., Cade T. J., Finkelstein M., Hu H., Kosnett M., Landrigan P. J., Lanphear B., Pokras M. A., Redig P. T., Rideout B. A., Silbergeld E., Wright R., Smith D. R. Health risks from lead-based ammunition in the environment. *Environ. Health Perspect.* 2013;121(6):a178-a179.
5. Bires J., Maracek I., Bartko P., Biresova M., Weissova T. Accumulation of trace elements in sheep and the effects upon qualitative and quantitative ovarian changes. *Vet. Hum. Toxicol.* 1995;37(4)349-356.
6. Vaktskjold A., Talykova L. V., Chashchin V. P., Odland J. O., Nieboer E. Spontaneous abortions among nickel-exposed female refinery workers. *Int. J. Environ. Health Res.* 2008;18(2):99-115.
7. Labyntseva R. D., Ulyanenko T. V., Kosterin S. A. Effect of heavy metals ions on superprecipitation and ATPase activity of actomyosin of uterine smooth muscle. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 1998;70(1):71-77. (In Ukrainian).
8. Labyntseva R. D., Bobrowska O. M., Chunikhin O. Yu., Kosterin S. O. Effect of heavy metal cations on ATPase activity of actomyosin complex and myosin subfragment-1 of smooth muscle of the uterus. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2011;83(4):79-88. (In Ukrainian).
9. Gutsche C. D. Calixarenes: an introduction, monographs in supramolecular chemistry. Royal Society of Chemistry. Cambridge, 2008. 276 p.
10. Morohashi N., Narumi F., Iki N., Hattori T., Miyano S. Thiacalixarenes. *Chem. Rev.* 2006;106:5291-5316.
11. Calixarenes for Separations / Lumetta G. J., Rogers R. D., Gopalan A. S. (eds). American Chemical Society. – Washington, 2000. 366 p.
12. Kalchenko V. I., Rodik R. V., Boyko V. I. Calixarenes. Prospects for biomedical applications. *J. Org. Farm. Chem.* 2005;3(4):13-29. (In Ukrainian).
13. Veklich T. O., Kosterin S. O., Rodik R. V., Cherenok S. O., Boyko V. I., Kalchenko V. I. Effect of calixarene-phosphonic acid on Na^+, K^+-ATPase activity in plasma membranes of the smooth-muscle cells. *Ukr. Biokhim. Zhurn.* 2006;78(1):70-78. (In Ukrainian).
14. Cherenok S., Vovk A., Muravyova I., Shivanyuk A., Kukhar V., Lipkowski J., Kalchenko V. Calix[4]arene α-aminophosphonic acids: asymmetric synthesis and enantioselective inhibition of alkaline phosphatases. *Org. Letters.* 2006;8(4):549-552.
15. Phan G., Semili N., Bouvier-Capely C., Landon G., Mekhloufi G., Huang N., Rebière F., Agarande M., Fattal E. Calixarene cleansing formulation for uranium skin contamination. *Health Phys.* 2013;105(4):382-389. doi: 10.1097/HP.0b013e318298e8d3.
16. Nimse S.B., Kim T. Biological applications of functionalized calixarenes. *Chem. Soc. Rev.* 2013;42:366-386
17. Iki N., Fujimoto T., Miyano S. A. New Water-Soluble Host Molecule Derived from Thiacalixarene. *Chem. Lett.* 1998;27(7):625-626.
18. Iki N., Morohashi N., Narumi F., Miyano S. High Complexation Ability of Thiacalixarene with Transition Metal Ions. The Effect of Replacing Methylene Bridges of Tetra(p-t-butyl)calyx[4] arenetetrol by Epithio Groups. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1998;71(7):1597-1603.
19. Coleman A. W., Perret F., Moussa M., Dupin M., Guo Y., Perron H. Calix[n]arenes as protein sensors. *Top. Curr. Chem.* 2007;277:31-88.
20. Bilyk A., Dunlop J. W., Fuller R. O., Hall A. K., Harrowfield J. M., Hosseini M. W., Koutsantonis G. A., Murray I. W., Skelton B. W., Stamps R. L., White A. H. Systematic structural coordination chemistry of p-t-butyltetrathiacalix[4]arene: further complexes of transition-metal ions. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2010:2106-2126.

21. Weeds A. G., Taylor R. S. Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. *Nature*. 1975;257(1):54-56.
22. Chen P. S., Toribara Jr., T. Y., Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem*. 1956;28(11):1756-1758.
23. Korostylev P. P. Preparation of solutions for chemical analytical work. Moscow: Nauka, 1964. 202 p. (In Russian).
24. Cassidy C. E., Setzer W. N. Cancer-relevant biochemical targets of cytotoxic Lonchocarpus flavonoids: a molecular docking analysis. *J. Mol. Model.* 2010;16:311-326.
25. Houdusse A., Kalabokis V. N., Himmel D., Szent-Gyorgyi A. G., Cohen C. Atomic structure of scallop myosin subfragment S1 complexed with MgADP: a novel conformation of the myosin head. *Cell*. 1999;97(4):459-470.
26. Li L., Jose J., Xiang Y., Kuhn R. J., Rossmann M. G. Structural changes of envelope proteins during alphavirus fusion. *Nature*. 2010;468(7324):705-708.
27. Krieger E., Koraimann G., Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA a self-parameterizing force field. *Proteins*. 2002;47(3):393-402.
28. Morohashi N., Iki N., Sugawara A., Miyano S. Selective oxidation of thiacalix[4]arenes to the sulfinyl or sulfonyl counterparts and their complexation abilities towards metal ions as studied by solvent extraction. *Tetrahedron*. 2001;57:5557-5563.
29. Kofman E., Nankina V. P. Some features of actomyosin superprecipitation and its possible mechanisms. By the book.: Biophysical and biochemical methods for investigating of muscle proteins. Leningrad: Leningrad State University, 1978. P. 82-86. (In Russian).
30. Bugaenko L. T., Ryabykh S. M., Bugaenko A. L. Almost complete system of average crystallographic ionic radii and its use for determining the ionization potentials. *Vestn. Mosk. Univ. Series 2. Chemistry*. 2008;4(6):363-383. (In Russian).
31. Burghardt T. P., Neff K. L., Wieben E. D., Ajtai K. Myosin individualized: single nucleotide polymorphisms in energy transduction. *BMC Genomics*. 2010;11:172. http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/172.
32. Risal D., Gourinath S., Himmel D. M. Myosin subfragment 1 structures reveal a partially bound nucleotide and a complex salt bridge that helps couple nucleotide and actin binding. *PNAS*. 2004;10(24):8930-8935.
33. Mustafina A. R., Skripacheva V. V., Konovalov A. I. Outer-sphere association of calixarenes and other macrocyclic ligands with metal complexes as a basis for designing of molecular devices. *Usp. Chim*. 2007;76(10):979-993. (In Russian).

Отримано 04.04.2014