

ПРОТЕОМИКА

УДК 577.152.3.

©Коллектив авторов

КИНЕТИЧЕСКИЙ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ ДИМЕРИЗАЦИИ С МОНОМЕРАМИ ПРОТЕАЗЫ ВИЧ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

П.В. Ершов, О.В. Гнеденко, А.А. Мольнар, А.В. Лисица,
А.С. Иванов, А.И. Арчаков*

Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10; факс: +7 499 245-08-57; эл. почта: pavel79@inbox.ru

Проведён кинетический и термодинамический анализ взаимодействия пептидного и непептидного ингибиторов димеризации с иммобилизованными на оптическом чипе мономерами протеазы ВИЧ (пВИЧ) методом поверхностного плазмонного резонанса. Молекулярные взаимодействия исследовали при разных концентрациях ингибиторов (0-80 мкМ) и температурах (15-35°C). Определение кинетических (k_{on} , k_{off}) и равновесных (K_D) констант, а также термодинамических параметров взаимодействия (ΔG , ΔH , $-\Delta S$) показало, что оба ингибитора характеризуются близкими параметрами и основной движущей силой образования комплексов с мономерами пВИЧ является энтропийная компонента ($-\Delta S$), значение которой в среднем составляет порядка -20 ккал/моль, тогда как энтальпийная компонента (ΔH) положительна (14 ккал/моль) и противодействует образованию комплексов.

Ключевые слова: протеаза ВИЧ, оптический биосенсор, ингибитор димеризации, поверхностный плазмонный резонанс, термодинамика

ВВЕДЕНИЕ. Внедрение в клиническую практику 9 конкурентных ингибиторов протеазы ВИЧ (пВИЧ) явилось существенным прогрессом в лечении СПИДа [1, 2]. Оценка энтальпии и энтропии образования молекулярных комплексов с помощью методов поверхностного плазмонного резонанса и изотермического калориметрического титрования внесли заметный вклад в разработку более эффективных конкурентных ингибиторов и их прототипов [3-8]. Однако широкое применение в клинической практике конкурентных ингибиторов пВИЧ стало приводить к появлению устойчивых вирусных штаммов [9]. Некоторые мутации в структуре пВИЧ изменяли конформацию сайта связывания ингибиторов что приводило к снижению его аффинности.

Хорошо известно, что функциональная активность пВИЧ осуществляется только в форме гомодимера, а контактный интерфейс мономеров высоко консервативен. Были созданы ингибиторы димеризации пВИЧ, взаимодействующие с интерфейсом димеризации пВИЧ и блокирующие ассоциацию мономеров в димер и/или разрушающие активный димер пВИЧ [10, 11]. Недавно были найдены еще несколько пептидных [12-14] и непептидных [15, 16] ингибиторов димеризации пВИЧ, отличающиеся кинетическими профилями взаимодействия с пВИЧ. Однако разработка более эффективных

* - адресат для переписки

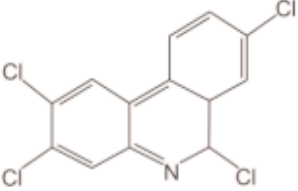
ИНГИБИТОРЫ ДИМЕРИЗАЦИИ С МОНОМЕРАМИ ПРОТЕАЗЫ ВИЧ

ингибиторов димеризации тормозится недостатком термодинамических данных о балансе сил взаимодействия таких ингибиторов с мономерами пВИЧ. Ранее с использованием биоинформационных методов нами был получен список низкомолекулярных органических соединений, которые могут связываться с интерфейсом димеризации пВИЧ, и с помощью оптико-биосенсорной тест-системы была осуществлена проверка взаимодействия этих соединений с мономерами пВИЧ [17, 18]. В результате был найден новый непептидный ингибитор димеризации (NPI) (соединение NCS 134382 из базы данных NCI), который селективно взаимодействует с мономерами пВИЧ и ингибирует активность фермента *in vitro* (IC_{50} около 10^{-6} М).

Основная цель данной работы состояла в выполнении сравнительного кинетического и термодинамического анализа взаимодействия известного пептидного ингибитора димеризации пВИЧ (PI) [19] и найденного нами ранее нового NPI [17, 18] с мономерами пВИЧ. Для этого был использован оптический биосенсор Viacore-3000, работающий на эффекте поверхностного плазмонного резонанса. Кинетику ассоциации и диссоциации комплексов ингибиторов димеризации с иммобилизованными на поверхности оптического чипа мономерами пВИЧ измеряли при разных концентрациях ингибиторов (0–80 мкМ) и температурах (15–35°C). В результате анализа полученных сенсограмм были определены кинетические константы скоростей ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}), равновесные константы диссоциации комплексов (K_D) и термодинамические параметры. Было обнаружено, что оба ингибитора имели почти одинаковые параметры взаимодействия и основной движущей силой при образовании комплексов является энтропийная компонента ($-T\Delta S$), равная примерно -20 ккал/моль. В тоже время, энтальпийная компонента (ΔH) имеет положительное значение порядка 14 ккал/моль и противодействует образованию комплексов между ингибиторами димеризации и мономерами пВИЧ.

МЕТОДИКА. В работе была использована рекомбинантная пВИЧ (кат. № H-9040) и PI (пептидный ингибитор димеризации) (кат. № 4044791) были получены от фирмы “Bachem AG” (Швейцария). PI представляет собой 6-членный пептид, модифицированный на N-конце остатком пальмитиновой кислоты [19] (табл. 1). NPI (табл. 1) был получен из Национального института рака США (NCI) (кат. № NCS 134382).

Таблица 1. Пептидный (PI) и непептидный (NPI) ингибиторы димеризации пВИЧ.

Ингибитор	PI	NPI
Название	-	2,3,6,8-тетрахлорфенантридин
Источник	«Bachem AG», кат. № 4044791	NCI (США), кат. № NCS 134382
Молекулярный вес	949	314
IC_{50} , мкМ	~ 1 [18]	~ 1 [18]
Структура	(Palmitoyl)-Thr-Val-Ser-Tyr-Glu-Leu	

Буферные растворы и специальные реагенты для оптического биосенсора Biacore-3000 были приобретены у фирмы “GE Healthcare” (Россия): буфер HBS-EP (150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% сурфактант P20, 10 mM HEPES, pH 7,4); 10 mM ацетат натрия (pH 4,5); 50 mM NaOH; 10 mM глицин-HCl (pH 2,5); EDC (1-этил-3-(3-диметил-аминопропил)карбо-диимид гидрохлорид), NHS (N-гидроксисукцинимид); 1 M этаноламин-HCl, pH 8,5.

Остальные вещества были получены от отечественных производителей.

Все измерения выполнены на биосенсоре Biacore 3000 (“GE Healthcare”, США), работающего под управлением программы “Biacore Control v. 3.1” software (“GE Healthcare”). Эксперименты проводили на стандартном оптическом чипе Biacore CM5 с использованием в качестве рабочего буфера HBS-EP. Молекулярные взаимодействия в каждом канале биосенсора регистрировались в виде сенсограмм, представляющих собой графики зависимости сигнала биосенсора в резонансных единицах (RU, 1 RU = 1 пг белка) от времени.

Молекулы пВИЧ в димерной форме были ковалентно иммобилизованы на карбоксиметилдекстрановой поверхности оптического чипа за аминогруппы остатков лизина или N-конца белка [20]. Иммобилизованную пВИЧ мономеризовали путем продолжительного пропускания рабочего буфера, что сопровождалось постепенным распадом димеров пВИЧ [18]. После полной диссоциации пВИЧ, сигнал биосенсора стабилизировался на уровне 2700 RU с дрейфом базовой линии менее 1 RU/мин.

Рабочие растворы NPI и PI готовили из 3 mM стоковых растворов ингибиторов в 100% ДМСО путем разбавления рабочим буфером до концентраций 2, 4, 15, 36 и 72 мкМ. При этом конечная концентрация ДМСО не превышала 2,5%. Для минимизации эффектов декстранового матрикса в рабочий буфер был также добавлен ДМСО в конечной концентрации 2,5%.

Каждый измерительный цикл состоял из трёх этапов:

1) регистрация ассоциации комплексов при инъекции образца в течение 180 с при скорости потока 5 мкл/мин и диссоциации комплекса в течение 300 с при скорости потока рабочего буфера 5 мкл/мин;

2) регенерация поверхности оптического чипа путем пропускания 10 mM NaOH или 10 mM глицин-HCl (pH 2,5) в течение 2 мин при скорости 10 мкл/мин;

3) стабилизация базовой линии сигнала биосенсора.

Биосенсорный анализ взаимодействия всех образцов ингибиторов с иммобилизованными мономерами пВИЧ был выполнен при температуре 15, 20, 25, 30 и 35°C. При переходе от одной температурной точки к другой осуществляли термостабилизацию биосенсора в течение 1 ч. Выбор температурного диапазона был ограничен плохой растворимостью ингибиторов ниже 15°C и низкой эффективностью регенерации каналов биосенсора выше 35°C. Анализ каждого образца повторялся 3 раза, а порядок инъекции образцов был рандомизирован для исключения систематических ошибок.

Для определения кинетических параметров взаимодействия при разной температуре сенсограммы анализировали с помощью программы Biacore Evaluation v. 4.1 software с использованием кинетической модели связывания Ленгмюра. Рассчитанные значения K_D были использованы для определения изменений свободной энергии Гиббса (ΔG) по уравнению (1):

$$\Delta G = RT \cdot \ln K_D \quad (1),$$

где T - абсолютная температура, R - универсальная газовая константа, K_D - константа диссоциации комплекса.

Затем строили график зависимости значений $\ln K_D$ от $1000/T$ (рисунок, а). Изменение энтальпии Ван-Гоффа (ΔH) определяли по углу наклона линейной регрессии ($\Delta H/R$). Изменение энтропии (ΔS) рассчитывали по классическому уравнению Ван-Гоффа (2):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2).$$

Для подготовки и статистической обработки данных были использованы программы Biacore Evaluation v. 4.1 software и Sigmaplot v.10.

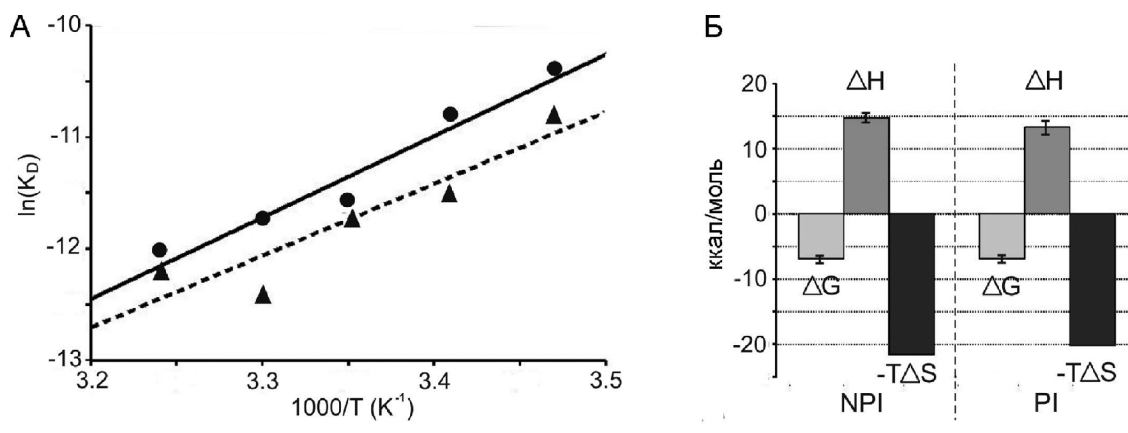


Рисунок.

График обратных значений температур ($1000/T$) и значений $\ln(K_D)$ равновесного связывания непептидного NPI (●) и пептидного PI (▲) ингибиторов димеризации с мономерами пВИЧ (А) и график термодинамических профилей взаимодействия NPI и PI с мономерами пВИЧ при 25°C (Б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На основе выполненного биосенсорного анализа связывания NPI и PI с иммобилизованными на оптическом чипе мономерами пВИЧ были определены кинетические параметры взаимодействия. Теоретические кривые были рассчитаны на основе модели простого связывания со стехиометрией 1:1 (1 молекула ингибитора димеризации с одним мономером пВИЧ), что соответствует изотерме поверхностной абсорбции Ленгмюра и хорошо совпадает с экспериментальными сенсограммами о чём свидетельствуют значения критерия хи-квадрат ($\chi^2 \leq 2$). Из таблицы 2 видно, что при возрастании температуры в диапазоне от 15 до 30°C значения констант скоростей ассоциации (k_{on}) для NPI и PI значительно увеличивались, тогда как величины констант скоростей диссоциации (k_{off}) практически не изменялись. Контрольные эксперименты по взаимодействию обоих ингибиторов димеризации с мономерами пВИЧ в концентрации 36 мкМ при увеличении скорости потока от 5 до 80 мкл/мин показали практически идентичные сенсограммы, что указывает на отсутствие эффекта ограничения диффузионного переноса вещества и его влияния на получаемые результаты (данные не приводятся). Из таблицы 2 также видно, что при возрастании температуры от 15 до 35°C значения констант диссоциации комплексов (K_D) снижаются с 30 до 6 мкМ для NPI и с 20 до 5 мкМ для PI. Это означает увеличение аффинности взаимодействия ингибиторов димеризации с мономерами пВИЧ при росте температуры. Наблюдаемые изменения K_D обусловлены в основном ростом значений k_{on} . В таблице 3 суммированы полученные значения термодинамических параметров взаимодействия ингибиторов димеризации с мономерами пВИЧ. Для лучшего понимания соотношения движущих сил при образовании молекулярных комплексов, на рисунке (б) представлены термодинамические профили изучаемых ингибиторов димеризации при 25°C. Из рисунка видно, что образование комплексов NPI и PI с мономерами пВИЧ характеризуются позитивными изменениями энтальпии ΔH (14,7 и 13,3 ккал/моль, соответственно) и негативными изменениями энтропии $-T\Delta S$ (-21,6 и -20,2 ккал/моль, соответственно).

Таблица 2. Кинетические параметры для взаимодействий ингибиторов димеризации с мономерами пВИЧ.

	NPI			PI		
t °C	$k_{on} \pm S.E. (M^{-1}c^{-1})$	$k_{off} \pm S.E. (c^{-1})$	$K_D, \text{ мкМ}$	$k_{on} \pm S.E. (M^{-1}c^{-1})$	$k_{off} \pm S.E. (c^{-1})$	$K_D, \text{ мкМ}$
15	$(9 \pm 2,0) \times 10^1$	$(2 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$30 \pm 1,0$	$(2 \pm 0,1) \times 10^2$	$(5 \pm 0,04) \times 10^{-3}$	$20 \pm 1,8$
20	$(1 \pm 0,1) \times 10^1$	$(2 \pm 0,03) \times 10^{-3}$	$20 \pm 0,9$	$(6 \pm 1,0) \times 10^2$	$(6 \pm 0,8) \times 10^{-3}$	$10 \pm 0,7$
25	$(1 \pm 0,2) \times 10^3$	$(1 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	$9,0 \pm 0,4$	$(9 \pm 2,0) \times 10^2$	$(8 \pm 2,0) \times 10^{-3}$	$9,0 \pm 1,0$
30	$(7 \pm 0,2) \times 10^2$	$(5 \pm 0,09) \times 10^{-3}$	$8,0 \pm 0,4$	$(2 \pm 0,1) \times 10^3$	$(6 \pm 0,4) \times 10^{-3}$	$4,0 \pm 0,1$
35	$(7 \pm 0,2) \times 10^2$	$(4 \pm 0,06) \times 10^{-3}$	$6,0 \pm 0,4$	$(1 \pm 0,1) \times 10^3$	$(7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$5,0 \pm 2,0$

Примечание: S.E. - стандартная ошибка.

Таблица 3. Термодинамические параметры для взаимодействия ингибиторов димеризации с мономерами пВИЧ.

	NPI				PI			
t °C	ΔG	ΔH	ΔS	$-T\Delta S$	ΔG	ΔH	ΔS	$-T\Delta S$
	ккал/моль	ккал/моль	$\text{кал/моль} \cdot \text{K}^{-1}$	ккал/моль	ккал/моль	ккал/моль	$\text{кал/моль} \cdot \text{K}^{-1}$	ккал/моль
15	$-6,0 \pm 0,2$	$14,7 \pm 1,1$	$0,0718$	$-20,7$	$-6,1 \pm 0,6$	$13,3 \pm 1,4$	$0,0673$	$-19,4$
20	$-6,3 \pm 0,3$		$0,0716$	$-21,0$	$-6,7 \pm 0,4$		$0,0682$	$-20,0$
25	$-6,9 \pm 0,3$		$0,0724$	$-21,6$	$-6,9 \pm 0,6$		$0,0677$	$-20,2$
30	$-7,1 \pm 0,4$		$0,0719$	$-21,8$	$-7,5 \pm 0,2$		$0,0686$	$-20,8$
35	$-7,4 \pm 0,6$		$0,0717$	$-22,1$	$-7,4 \pm 2,1$		$0,0672$	$-20,7$

Примечание. Для расчёта значений ΔG согласно уравнению $\Delta G = RT \cdot \ln K_D$ были использованы средние значения K_D .

Таким образом полученные результаты свидетельствуют о том, что:

- 1) пептидный и непептидный ингибиторы димеризации имеют фактически одинаковую аффинность к мономерам пВИЧ и близкие значения изменения свободной энергии Гиббса при образовании комплексов;
- 2) энтропийная компонента является основной движущей силой в образовании комплексов мономеров пВИЧ как с пептидным, так и с непептидным ингибиторами димеризации, существенно отличающимися по природе и по структуре. По-видимому, схожее сродство разных ингибиторов к мономерам пВИЧ можно отчасти объяснить тем, что они взаимодействуют с одним и тем же сайтом связывания в пределах интерфейса димеризации пВИЧ. Наблюдаемые отрицательные значения изменения энтропийной компоненты ($-T\Delta S$), выявленные в ходе выполнения биосенсорного анализа, благоприятствуют образованию комплексов, что может быть обусловлено вытеснением молекул воды от гидрофобных участков на поверхности интерфейса димеризации пВИЧ.

ИНГИБИТОРЫ ДИМЕРИЗАЦИИ С МОНОМЕРАМИ ПРОТЕАЗЫ ВИЧ

В то же время изменения энтальпийной компоненты (ΔH) имеют положительные значения и противодействуют образованию комплексов ингибитор-пВИЧ. Данные изменения ΔH , по-видимому, могут быть обусловлены конформационными переходами в мономере пВИЧ и/или десольватацией полярных групп при связывании ингибитора.

В заключение необходимо отметить, что такое исследование взаимодействия разных типов ингибиторов димеризации с иммобилизованными мономерами пВИЧ с использованием эффекта поверхностного плазмонного резонанса было выполнено впервые.

Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант 07-04-00575) и Министерством образования и науки РФ (гос. контракт № 16.552.11.7001).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson J., Schiffer C., Lee S.K., Swanstrom R.* (2009) *Handbook Exp. Pharmacol.*, **189**, 85-110.
2. *Mastrolorenzo A., Rusconi S., Scozzafava A., Barbaro G., Supuran C.T.* (2007) *Curr. Med. Chem.*, **14**, 2734-2748.
3. *Velazquez-Campoy A., Todd M.J., Freire E.* (2000) *Biochemistry*, **39**, 2201-2207.
4. *Velazquez-Campoy A., Kiso Y., Freire E.* (2001) *Arch. Biochim. Biophys.*, **390**, 169-175.
5. *Ohtaka H., Freire E.* (2005) *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, **88**, 193-208.
6. *Muzammil S., Armstrong A.A., Kang L.W., Jakalian A., Bonneau P.R., Schmelmer V., Amzel L. M., Freire E.* (2007) *J. Vir.*, **81**, 5144-5154.
7. *Markgren P.-O., Lindgren M.T., Gertow K., Karlsson R., Hamalainen M., Danielson U.H.* (2001) *Anal. Biochem.*, **291**, 207-218.
8. *Fanghänel J., Fischer G.* (2003) *Biophys. Chem.*, **100**, 351-366.
9. *Roberts N.A.* (1995) *AIDS*, **9(Suppl. 2)**, S27-S32.
10. *Camarasa M.-J., Velazquez S., San-Felix A., Perez-Perez M.-J., Gago F.* (2006) *Antiviral Research*, **71**, 260-267.
11. *Boggetto N., Reboud-Ravaux M.* (2002) *Biol. Chem.*, **383**, 1321-1324.
12. *Zutshi R., Franciskovich J., Shultz M., Schweitzer B., Bishop P., Wilson M., Chmielewski J.* (1997) *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 4841-4845.
13. *Zutshi R., Brickner M., Chmielewski J.* (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 62-66.
14. *Song M.C., Rajesh S., Hayashi Y., Kiso Y.* (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**, 2465-2468.
15. *Quere L., Wenger T., Schramm H.J.* (1996) *Biophys. Res. Commun.*, **227**, 484-488.
16. *Ma C., Nakamura N., Miyashiro H., Hattori M., Shimotohno K.* (1999) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **47**, 141-145.
17. *Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Mezentssev Y.V., Lisitsa A.V., Archakov A.I.* (2007) *J. Bioinform. Comput. Biol.*, **5**, 579-592.
18. *Ершов П.В., Гнеденко О.В., Мольнар А.А., Лисица А.В., Иванов А.С., Арчаков А.И.* (2009) *Биомед. химия*, **55**, 462-478.
19. *Schramm H.J., Boetzel J., Buttner J., Fritsche E., Gohring W., Jaeger E., Konig S., Thumfart O., Wenger T., Nagel N.E., Schramm W.* (1996) *Antiviral Res.*, **30**, 155-170.
20. *Markgren P.O., Hamalainen M., Danielson U.H.* (1998) *Anal. Biochem.*, **265**, 340-350.

Поступила: 31. 08. 2011.

**THERMODYNAMIC ANALYSIS OF DIMERIZATION INHIBITORS BINDING
TO HIV PROTEASE MONOMERS**

P.V. Ershov, O.V. Gnedenko, A.A. Molnar, A.V. Lisitsa, A.S. Ivanov, A.I. Archakov

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Moscow, Pogodinskaya ul., 10, 119121 Russia;
fax: +7 499 245-08-57; e-mail: pavel79@inbox.ru

Here, we describe the analysis of kinetic and thermodynamic parameters for binding of peptide and nonpeptide dimerization inhibitors to immobilized HIV protease (HIVp) monomers by using surface plasmon resonance. Molecular interactions were investigated at different inhibitors concentrations (0-80 μ M) and temperatures (15-35°C). The kinetic, equilibrium and thermodynamic parameters have been determined. It was found that both inhibitors were characterized by similar interaction parameters. The complex formation is entropically driven process for both inhibitors. The entropic term ($-T\Delta S$) had the value about -20 kcal/mol while the enthalpic term (ΔH) had the positive value about 14 kcal/mol and counteracted the complex formation.

Key words: HIV-1 protease, optical biosensor, dimerization inhibitor, SPR, thermodynamics.