

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

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

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

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

Поступила в редакцию 28.01.2022 г.

После доработки 16.02.2022 г.

Принята к публикации 09.11.2022 г.

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

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

DOI: 10.31857/S0006302923030043, EDN: FQGCXE

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

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

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

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

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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

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

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

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

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

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

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

|                           | $T_m$ , °C | $\Delta G_D^\circ$ ,<br>ккал·моль <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|------------|---------------------------------------------------|
| ДКФ (мкМ)                 |            |                                                   |
| 0.00                      | 63.0       | 10.41                                             |
| 05.0                      | 61.5       | 9.84                                              |
| 10.0                      | 60.0       | 9.26                                              |
| Глицин (М)                |            |                                                   |
| 0.00                      | 63.0       | 10.41                                             |
| 0.50                      | 63.6       | 10.75                                             |
| 1.00                      | 64.4       | 10.81                                             |
| Саркозин (М)              |            |                                                   |
| 0.00                      | 63.0       | 10.41                                             |
| 0.50                      | 63.8       | 10.69                                             |
| 1.00                      | 65.1       | 11.24                                             |
| Бетаин (М)                |            |                                                   |
| 0.00                      | 63.0       | 10.41                                             |
| 0.50                      | 64.9       | 11.14                                             |
| 1.00                      | 66.4       | 11.59                                             |
| Глицин (М) + 10 мкМ ДКФ   |            |                                                   |
| 0.00                      | 60.0       | 9.26                                              |
| 0.50                      | 62.8       | 10.15                                             |
| 1.00                      | 63.9       | 10.96                                             |
| Саркозин (М) + 10 мкМ ДКФ |            |                                                   |
| 0.00                      | 60.0       | 9.26                                              |
| 0.50                      | 63.4       | 10.63                                             |
| 1.00                      | 64.1       | 11.03                                             |
| Бетаин (М) + 10 мкМ ДКФ   |            |                                                   |
| 0.00                      | 60.0       | 9.26                                              |
| 0.50                      | 64.1       | 10.81                                             |
| 1.00                      | 65.6       | 11.34                                             |

Примечание. По трехкратным измерениям значения максимальных погрешностей от средних значений составляют 0.1–0.6 для  $T_m$  и 5–9% для  $\Delta G_D^\circ$ .

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

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

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

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ

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

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

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

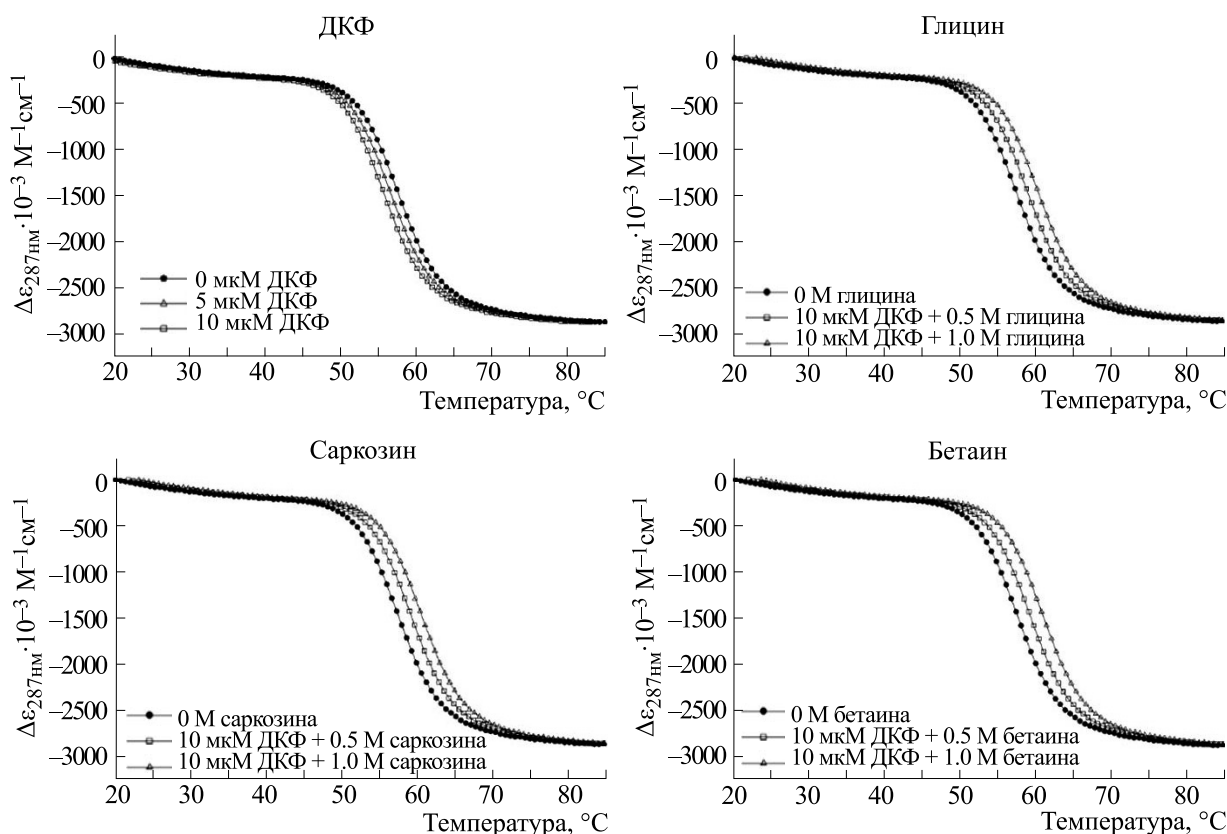


Рис. 1. Характерные профили тепловой денатурации РНКазы А в присутствии разных концентраций ДКФ и осмолитов при pH 7.0.

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

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

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

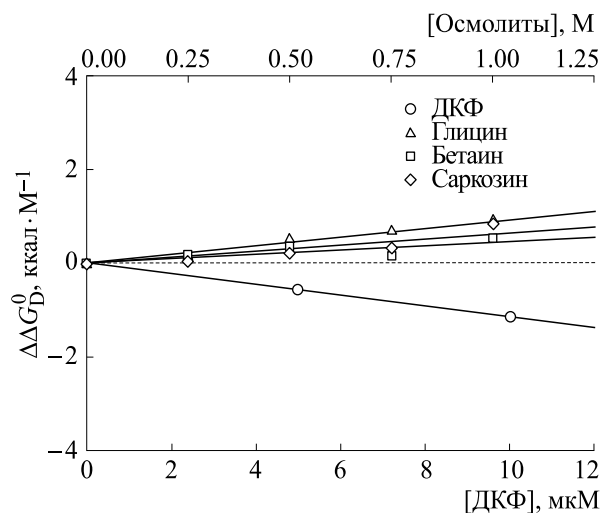
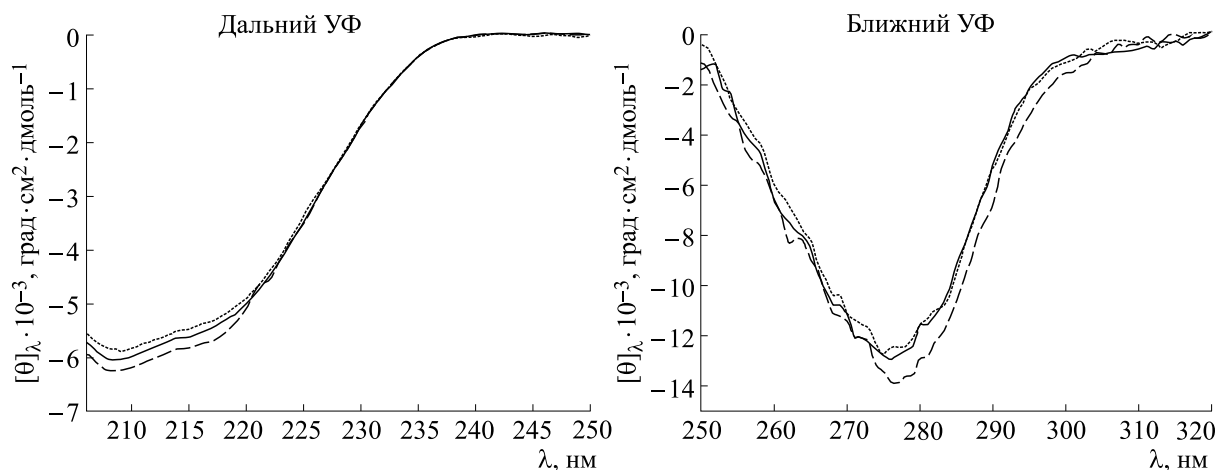


Рис. 2. Графики зависимости  $\Delta\Delta G_D^0$  от концентрации осмолита в присутствии глицина ( $\Delta$ ), бетаина ( $\square$ ), саркозина ( $\diamond$ ) и ДКФ ( $\circ$ ).



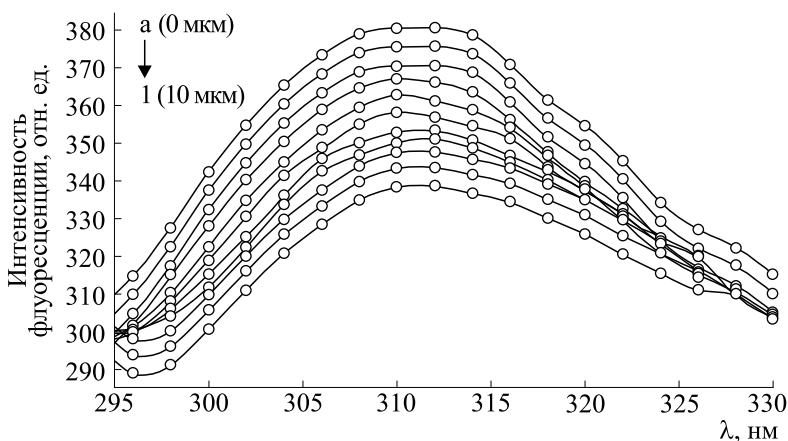
**Рис. 3.** Изменения вторичной и третичной структуры РНКазы А в присутствии осмолитов (бетаина) и ДКФ при pH 7.0. Символы обозначают РНКазу А (точки), РНКазу А + 10 мкМ ДКФ (пунктир), РНКазу А с 10 мкМ ДКФ и 1М бетаином (сплошная линия) для графиков в ближнем и дальнем УФ. Из осмолитов представлены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

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

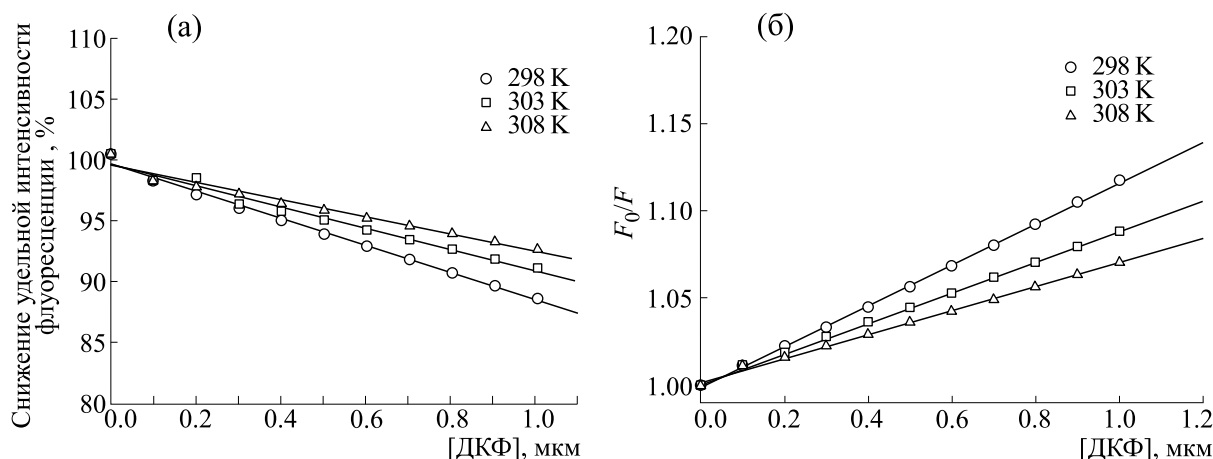
Поскольку структура определяет стабильность, стабильность также должна быть отражена в структуре белка. Измерения активности проводили для оценки  $k_{\text{cat}}$  и  $K_m$  РНКазы А при pH 7.0 при 25°C. Сначала эксперименты проводили при разных концентрациях ДКФ. Было обнаружено, что ДКФ увеличивает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

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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



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



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

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

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

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

где  $F_0$  и  $F$  — интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии ДКФ (тушителя),  $K_{SV}$  — константа Штерна–Фольмера,  $[Q]$  — молярная концентрация ДКФ,  $k_q$  и  $\tau_0$  — константа скорости бимолекулярной реакции тушения и время жизни флуоресценции белка в отсутствие тушителя соответственно (табл. 2).

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

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

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

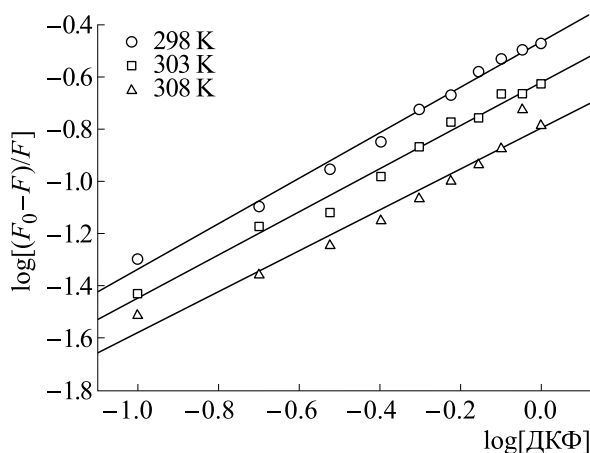
показывает присутствие только одного типа эквивалентного сайта связывания ДКФ. Отношение  $K_{SV}$  и  $\tau_0$  определяло значения  $k_q$  при различных температурах (табл. 2), значение  $\tau_0$  для РНКазы А было принято за  $3.5 \cdot 10^{-9}$  с [29]. Результирующие значения  $k_q$  ( $10^{13} M^{-1}c^{-1}$ ) были существенно выше, чем максимальная динамическая константа тушения ( $10^{10} M^{-1}c^{-1}$ ). Это свидетельствует, что ДКФ-зависимое тушение происходило в результате образования комплекса. Процесс тушения хорошо описан вычислительно, он сильно зависит от температуры [28]. При высоких температурах динамическое тушение увеличивается вследствие более быстрой диффузии, а статическое тушение уменьшается вследствие диссоциации слабо ассоциированных комплексов. Таким образом, снижение  $K_{SV}$  и  $k_q$  позволяет предположить, что тушение флуоресценции РНКазы А в присутствии ДКФ происходит скорее за счет образования комплекса, а не за счет динамического тушения. Далее, значения константы связывания ( $K_a$ ) и количества сайтов связывания ( $n$ ) рассчитывали с применением уравнения Штерна–Фольмера, модифицированного следующим образом [30]:

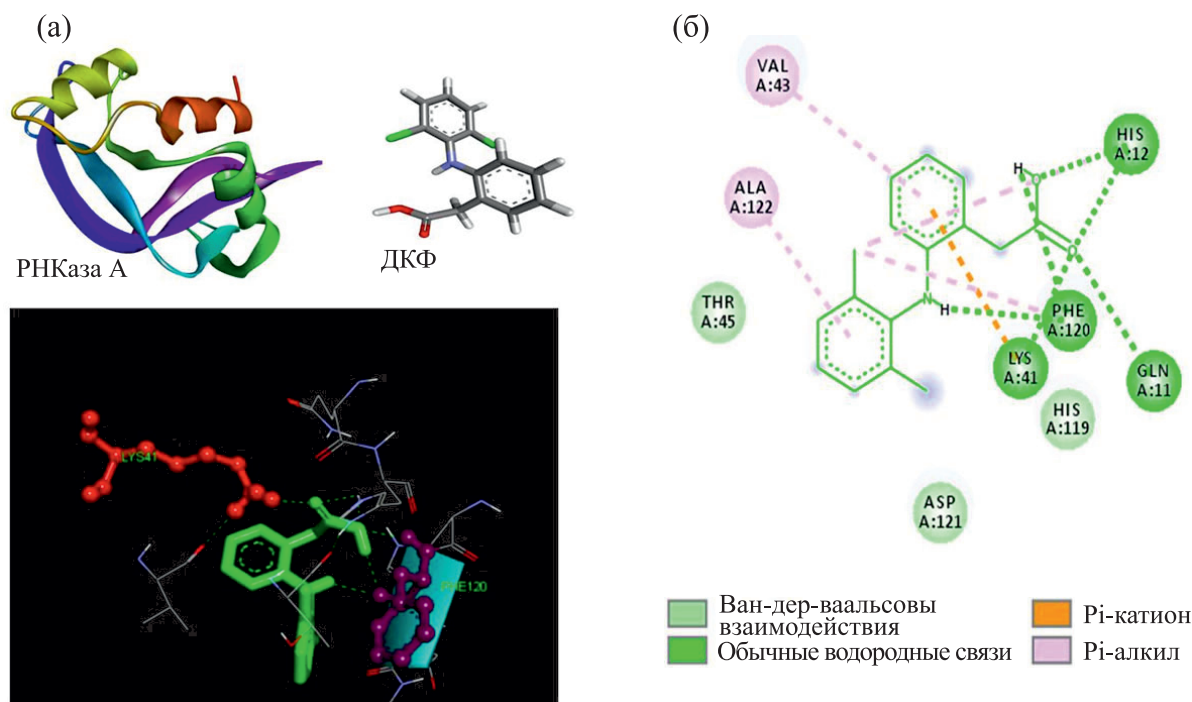
$$\log[(F_0 - F)/F] = \log K_a + n \log [Q]. \quad (3)$$

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

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

В термодинамическом равновесии, если смещение происходит вследствие дестабилизации РНКазы А диклофенаком что показано значениями  $\Delta G_D^\circ$  [нативное состояние  $\leftrightarrow$  денатурирован-

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



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

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

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

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

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

### БЛАГОДАРНОСТИ

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

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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



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

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

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

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

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. H. Lin, D. M. Cocchetto, and D. E. Duggan, Clin. Pharmacokinet., **12** (6), 402 (1987). DOI: 10.2165/00003088-198712060-00002
2. K. K. H. Chan, K. H. Vyas, and K. D. Brandt, J. Pharm. Sci., **76** (2), 105 (1987). DOI: 10.1002/jps.2600760204
3. J. Santoro, C. González, M. Bruix, et al., J. Mol. Biol., **229** (3), 722 (1993). DOI: 10.1006/jmbi.1993.1075
4. R. T. Raines, Chem. Rev., **98** (3), 1045 (1998). DOI: 10.1021/cr960427h
5. S. H. Khan, N. Ahmad, F. Ahmad, and R. Kumar, IUBMB Life., **62** (12), 891 (2010). DOI: 10.1002/iub.406
6. J. Giri, Plant Signal. Behav., **6** (11), 1746 (2011). DOI: 10.4161/psb.6.11.17801
7. P. Yancey, M. Clark, S. Hand, et al., Science, **217** (4566), 1214 (1982). DOI: 10.1126/science.7112124
8. M. Auton and D. W. Bolen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102** (42), 15065 (2005). DOI: 10.1073/pnas.0507053102
9. S. N. Timasheff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **99** (15), 9721 (2002). DOI: 10.1073/pnas.122225399
10. A. J. Saunders, P. R. Davis-Searles, D. L. Allen, et al., Biopolymers, **53** (4), 293 (2000). DOI: 10.1002/(SI-CI)1097-0282(20000405)53:4<293::AID-BIP2>3.0.CO;2-T
11. I. Haque, R. Singh, F. Ahmad, and A. A. Moosavi-Movahedi, FEBS Lett., **579** (18), 3891 (2005). DOI: 10.1016/j.febslet.2005.06.005
12. A. Sinha, S. Yadav, R. Ahmad, and F. Ahmad, Biochem. J., **345** (Pt 3), 711 (2000). DOI: 10.1042/bj3450711
13. R. Singh, I. Haque, and F. Ahmad, J. Biol. Chem., **280** (12), 11035 (2005). DOI: 10.1074/jbc.M410716200
14. Y. H. Chen, J. T. Yang, and H. M. Martinez, Biochemistry, **11** (22), 4120 (1972). DOI: 10.1021/bi00772a015
15. N. K. Poddar, Z. A. Ansari, R. K. B. Singh, et al., Biophys. Chem., **138** (3), 120 (2008). DOI: 10.1016/j.bpc.2008.09.013
16. S. Jamal, N. K. Poddar, L. R. Singh, et al., FEBS J., **276** (20), 6024 (2009). DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07317.x
17. S. K. Dutta, S. K. Basu, and K. K. Sen, Indian J. Exp. Biol., **44** (2), 123 (2006).
18. K. Gekko and S. N. Timasheff, Biochemistry, **20** (16), 4667 (1981). DOI: 10.1021/bi00519a023
19. Y. Liu and D. W. Bolen, Biochemistry, **34** (39), 12884 (1995). DOI: 10.1021/bi00039a051
20. T. Arakawa, Y. Kita, and J. F. Carpenter, Pharm. Res., **8** (3), 285 (1991). DOI: 10.1023/a:1015825027737
21. T. O. Street, D. W. Bolen, and G. D. Rose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **103** (38), 13997 (2006). DOI: 10.1073/pnas.0606236103
22. L. R. Singh, T. A. Dar, S. Rahman, et al., Biochim. Biophys. Acta – Proteins Proteomics, **1794** (6), 929 (2009). DOI: 10.1016/j.bbapap.2009.02.005
23. S. Knapp, R. Ladenstein, and E. A. Galinski, Extremophiles, **3** (3), 191 (1999). DOI: 10.1007/s007920050116

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

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

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

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

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

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