

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.29, 615.277.3

### ТЕРМОДИНАМИКА СВЯЗЫВАНИЯ ВИНКА-АЛКАЛОИДА ВИНОРЕЛЬБИНА С КАЛЬМОДУЛИНОМ И ТУБУЛИНОМ

© 2011 г. Ф. О. Цветков<sup>1\*</sup>, А. А. Куликова<sup>1</sup>, F. Devred<sup>2</sup>, Е. Ю. Зерний<sup>3</sup>, D. Lafitte<sup>2</sup>, А. А. Макаров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Aix-Marseille Université, Faculté de Pharmacie, INSERM UMR 911, CRO2 Marseille, France

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

Поступила в редакцию 25.11.2010 г.

Принята к печати 03.02.2011 г.

Винка-алкалоиды, такие как винбластин, винкристин, а также их некоторые производные, в частности винорельбин, широко используют в терапии лейкоза и некоторых видов опухолей. Их действие ассоциировано с нарушением функций митотического веретена, которое ведет к блокированию митоза и остановке клеточного цикла. Главной мишенью винка-алкалоидов является тубулин, однако недавние исследования показали, что нельзя недооценивать влияние винка-алкалоидов на другие белки. Так, например, эти препараты могут ингибировать связывание кальмодулина со своими мишенями и таким образом влиять на передачу сигналов кальция в клетке. Связывание винка-алкалоидов с другими белками может быть ответственно за их противоопухолевую и нейропротекторную эффективность. В данной работе исследована термодинамика взаимодействия винорельбина с кальмодулином и тубулином. Установлено, что в отличие от других винка-алкалоидов оба сайта связывания винорельбина расположены в С-доме кальмодулина, их характеризуют константы ассоциации  $4.0 \times 10^5$  и  $5.4 \times 10^4$  М<sup>-1</sup>. В то же время термодинамика связывания винорельбина и других винка-алкалоидов с тубулином существенно не отличается.

**Ключевые слова:** тубулин, кальмодулин, винорельбин, микротрубочки.

**THERMODYNAMICS OF CALMODULIN AND TUBULIN BINDING TO THE VINCA-ALKALOID VINORELBINE**, by P. O. Tsvetkov<sup>1\*</sup>, A. A. Kulikova<sup>1</sup>, F. Devred<sup>2</sup>, E. Yu. Zernii<sup>3</sup>, D. Lafitte<sup>2</sup>, A. A. Makarov<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, \*e-mail: tsvetkov@eimb.ru; <sup>2</sup>Aix-Marseille Université, Faculté de Pharmacie, Marseille, INSERM UMR 911, CRO2, France; <sup>3</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, 119991 Moscow, Russia). Vinca-alkaloids, such as vinblastine, and some of their derivatives, as for example vinorelbine, are widely used in clinical therapy of leukemia and several types of tumors. Their effects are associated with the disfunctioning of the mitotic spindle, which leads to mitosis blockage and a shutdown of the cell cycle. Their primary target is tubulin, however recent research has shown that some of the vinca-alkaloids inhibit calmodulin binding to its targets. Vinca-alkaloids binding with other proteins could be responsible for their efficiency and neuroprotection. Here we investigated the thermodynamics of vinorelbine interactions with calmodulin and tubulin. It was determined that unlike the other vinca-alkaloids both vinorelbine binding sites are located in the C-domain of calmodulin, and characterized by association constants of  $4.0 \times 10^5$  and  $5.4 \times 10^4$  M<sup>-1</sup>. At the same time the thermodynamics of vinorelbine binding to tubulin are not much different from that of other vinca-alkaloids. These results will allow getting a better insight on the reaction mechanisms of vinca-alkaloids on a secondary protein target.

**Keywords:** tubulin, calmodulin, vinorelbine, microtubules.

Противоопухолевые препараты, мишенью которых служат микротрубочки, оказывают влияние на их сборку и динамику с помощью различных механизмов и с различной эффективностью [1]. Винка-алкалоиды действуют как деполимеризующие агенты как *in vivo*, так и *in vitro*. Многие винка-алкалоиды, такие как винбластин (рис. 1а) и винкристин, а

также их производные, в частности винорельбин (рис. 1б), широко используют в терапии лейкоза и некоторых видов опухолей. Их действие ассоциировано с ингибированием динамики микротрубочек в митотическом веретене, что ведет к блокированию митоза и смерти опухолевых клеток [1–3]. Винка-алкалоиды не только связываются с микро-

\* Эл. почта: tsvetkov@eimb.ru

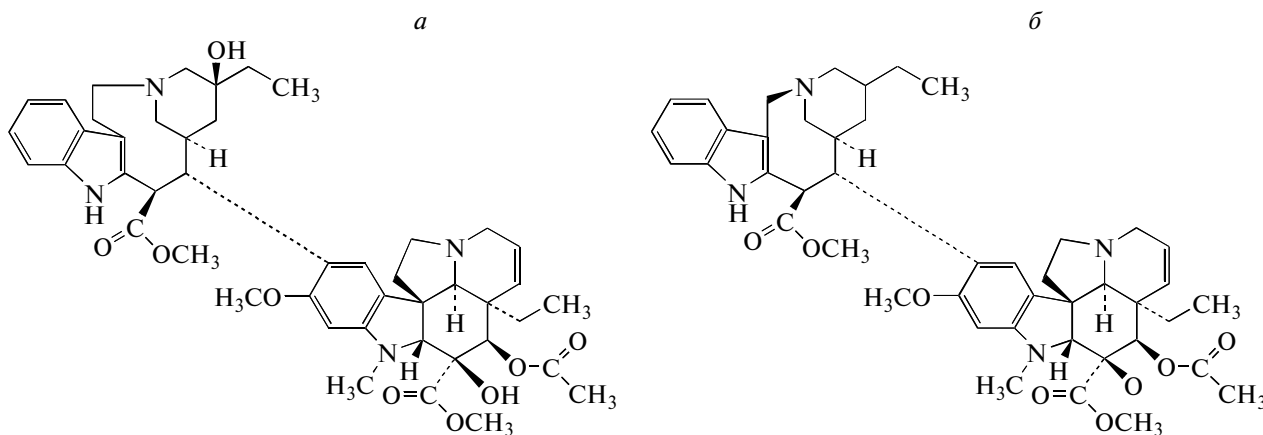


Рис. 1. Структуры винбластина (а) и винорельбина (б).

трубочками, но и блокируют взаимодействие кальмодулина со своими мишенями [4]. Более того, недавно мы показали, что различные винка-алкалоиды могут иметь различное число сайтов связывания на кальмодулине и по-разному влиять на взаимодействие кальмодулина с мишенями [5]. На основании этих данных предположили, что влияние винка-алкалоидов на динамику микротрубочек не ограничивается их прямым взаимодействием и может быть обусловлено взаимодействием с другими белками, вовлеченными в регуляцию микротрубочек, например с кальмодулином [5].

В данной работе впервые мы представили доказательства важности взаимодействия кальмодулина с винка-алкалоидом винорельбином. Показано, что, несмотря на отличия катарантиновых частей винбластина и винорельбина, связывание их с тубулином практически не отличается, в то время как термодинамика взаимодействия этих препаратов с кальмодулином принципиально разная.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Все используемые в работе реактивы аналитической степени чистоты получены от фирмы “Sigma-Aldrich” (США).

Гибридный кальмодулин экспрессирован и очищен как описано ранее [6]. Концентрацию кальмодулина определяли спектрофотометрически, полагая коэффициент экстинкции при 280 нм равным  $1560 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [7]. Удаление двухвалентных ионов осуществляли с помощью осаждения белка трихлоруксусной кислотой [8].

Тубулин выделен из мозга ягнят и очищен, как описано ранее [9]. Концентрацию тубулина определяли спектрофотометрически, полагая коэффициент экстинкции при 275 нм в 6 М гуанидингидрохлориде равным  $109000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  на гетеродимер [10].

**Изотермическая калориметрия титрования.** Связывание винорельбина с кальмодулином при  $25^\circ\text{C}$  (буфер 50 мМ Hepes, pH 7.5, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ ) и с тубулином при  $10^\circ\text{C}$  (20-мМ Na-фосфатный буфер, pH 6.5, 0.1 мМ ГТФ и ТСЕР) исследовали на изотермическом калориметре титрования  $i\text{Tc}_{200}$  (MicroCal, США). Концентрации белка и винорельбина в калориметрической ячейке и титрующем шприце изменяли от 10 до 50 мкМ и от 0.3 до 1 мМ соответственно. Теплоту разбавления определяли титрованием буфера раствором винорельбина, после чего изотерму разбавления вычитали из изотермы связывания винорельбина с соответствующим белком, а полученную кривую обрабатывали и анализировали с помощью программного пакета MicroCal Origin 7.0 с использованием модели одинаковых сайтов связывания или модели двух типов сайтов связывания как описано ранее [11]. Таким образом определена стехиометрия N, константа  $K_a$  и энтальпия связывания  $\Delta H$ , а энтропию связывания  $\Delta S$  вычисляли с использованием стандартных термодинамических соотношений. Все эксперименты повторяли не менее трех раз.

**Дифференциальная сканирующая калориметрия.** Эксперименты проводили на микрокалориметре VP-DSC (MicroCal, США) при скорости нагрева 1 К/мин. Обратимость процесса тепловой денатурации определяли как отношение теплоты денатурации белка при повторном нагреве после охлаждения к ее значению при первом нагреве. Параметры тепловой денатурации белка  $T_m$  и  $\Delta H$  (температура денатурации и калориметрическая энтальпия денатурации) определяли как описано ранее [12]. Ошибка определения величины калориметрической энтальпии составляла 6–8%, экспериментальная ошибка измерения температуры денатурации не превышала  $0.1^\circ\text{C}$ . Кривые тепловой денатурации проанализированы с помощью пакета программ MicroCal Origin 7.0. Компьютерную деконволюцию кривых плавления проводили в предположении,

что каждая кривая плавления представляет собой алгебраическую сумму пиков, соответствующих независимым переходам. Ошибки в определении параметров отдельных переходов, полученных путем деконволюции кривых плавления, не превышали 10% для  $\Delta H$  и  $0.4^\circ\text{C}$  для  $T_m$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изотермическая калориметрия титрования использована для изучения связывания винорельбина с кальмодулином и тубулином. Установлено, что, как и другие винка-алкалоиды [5], винорельбин не связывается с кальмодулином в отсутствие ионов кальция (данные не приведены). На рис. 2а представлена типичная кривая титрования кальмодулина винорельбином в присутствии ионов кальция. Верхняя панель представляет собой экспериментальные данные, а нижняя – изотерму адсорбции, полученную интегрированием титрационных пиков. Анализ полученных данных с помощью модели двух типов сайтов связывания показал, что винорельбин, как и винбластин, имеет два сайта связывания на кальмодулине. При этом константы ассоциации составляют  $4.0 \times 10^5$  и  $5.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  и близки к найденным ранее константам связывания винбластина и кальмодулина (рис. 2б, табл. 1) [9]. Однако, в отличие от винбластина, термодинамические профили сайтов винорельбина разные. Действительно, в то время как связывание винорельбина с высокоафинным сайтом является энтальпийно выгодным ( $\Delta H_1 = -7.4 \text{ ккал/моль}$ ), взаимодействие с низкоафинным сайтом выгодно лишь энтропийно ( $\Delta H_2 = 7.0 \text{ ккал/моль}$ ;  $\Delta S_2 = 45 \text{ ккал/К моль}$ ) (табл. 1).

Таким образом, при связывании винорельбина с высокоафинным сайтом в системе образуются дополнительные водородные связи или ван-дер-ваальсовы взаимодействия между белком и лигандом. Наоборот, положительная энтальпия связывания винорельбина с низкоафинным сайтом компенсируется значительными энтропийными эффектами. Это указывает на то, что при взаимодействии происходит перестройка молекул растворителя и доминируют гидрофобные взаимодействия. Такое отличие сайтов связывания винорельбина от сайтов винбластина позволяет предположить разную локализацию этих сайтов на молекуле кальмодулина. Чтобы проверить это предположение, мы сравнили денатурацию кальмодулина в присутствии и в отсутствие винорельбина.

Температурная денатурация кальмодулина и его комплекса с винорельбином изучена с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии. Зависимости избыточной парциальной молярной теплоемкости кальмодулина и комплекса кальмодулин–винорельбин существенно отличаются (рис. 3). Кривые плавления кальмодулина и его комплексов могут быть разделены на два кооперативных перехода “все-или-ничего”, при этом первый переход соответствует денатурации С-концевого домена, а второй – N-концевого домена [13, 14]. В отличие от винбластина и винфлюина, которые при связывании с кальмодулином влияют на термостабильность обоих доменов белка [5], винорельбин вызывает смещение лишь первого денатурационного перехода (рис. 3, табл. 2). Этот факт свидетельствует о том, что оба сайта связывания винорельбина расположены в С-концевом домене кальмодулина. О разной локализации сайтов связывания винорель-

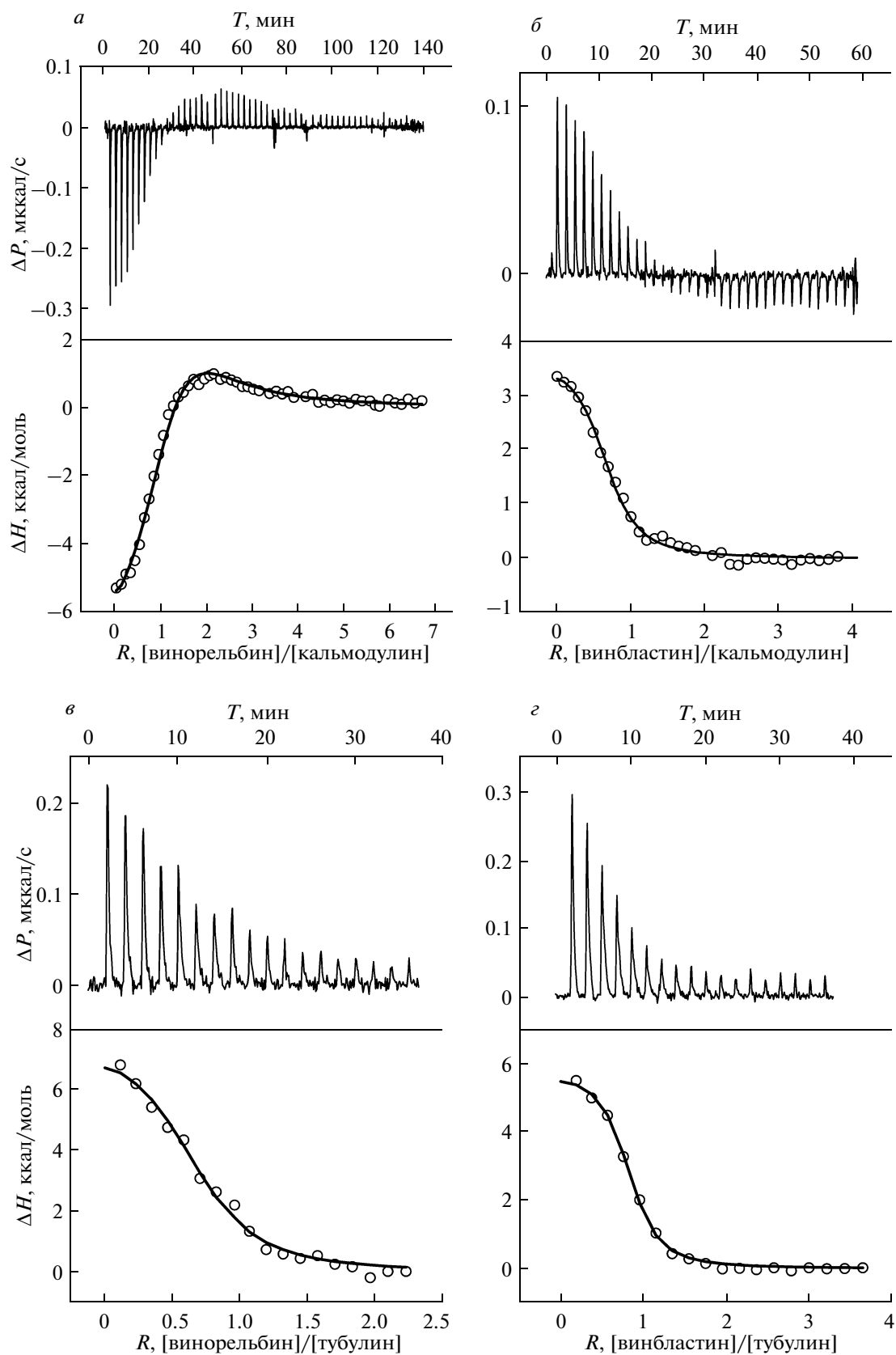
**Таблица 1.** Термодинамические параметры связывания кальмодулина и тубулина с винорельбином и винбластином

Белок	Лиганд	$K_a$ , $^\circ\text{C}$	$\Delta H$ , ккал/моль	$\Delta S$ , кал/град моль
Кальмодулин	NAV <sup>1</sup>	$4.0 \times 10^5$	-7.4	0.8
	NAV <sup>2</sup>	$5.4 \times 10^4$	7.0	45.0
Кальмодулин	VLB <sup>1</sup>	$3.2 \times 10^5$	8.8	-40.2
	VLB <sup>2</sup>	$2.0 \times 10^4$	4.2	-28.8
Тубулин	NAV	$4.5 \times 10^5$	7.7	53.0
Тубулин	VLB	$8.5 \times 10^5$	6.1	48.8

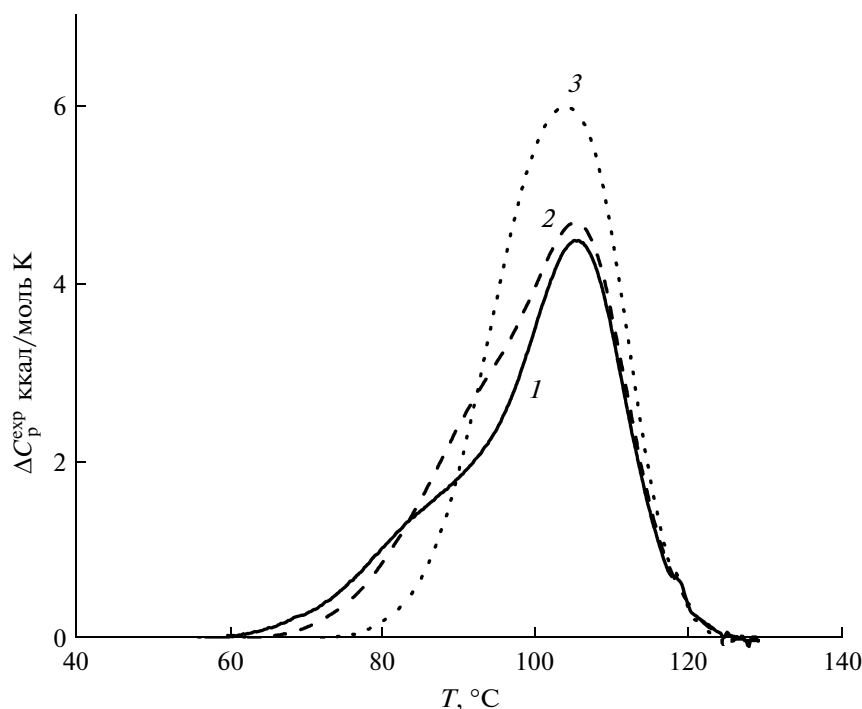
<sup>1, 2</sup> Термодинамические параметры связывания лиганда с первым и вторым сайтом соответственно.

**Таблица 2.** Термодинамические параметры денатурации кальмодулина и его комплекса с винорельбином в буфере 50 мМ HEPES в присутствии 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и 150 мМ KCl, pH 7.5

[NAV]/[CaM], избыток	Первый денатурационный переход		Второй денатурационный переход	
	$T_1$ , $^\circ\text{C}$	$\Delta H_1$ , кДж/моль	$T_2$ , $^\circ\text{C}$	$\Delta H_2$ , кДж/моль
0	89.3	167	105.9	287
2	92.3	201	106.1	288
10	98.0	246	106.6	299



**Рис. 2.** Кривые титрования (верхние панели) и полученные интегрированием пиков титрования изотермы адсорбции (нижние панели) для связывания винорельбина с кальмодулином (а) и тубулином (в), винбластина с кальмодулином (б) и с тубулином (г).



**Рис. 3.** Зависимость избыточной парциальной молярной теплоемкости кальмодулина (1) и его комплекса с винорельбином при двукратном (2) и десятикратном (3) избытке винорельбина от температуры в буфере 50 мМ HEPES в присутствии 2 мМ CaCl<sub>2</sub> и 150 мМ KCl, pH 7.5.

бина и винбластина говорят и эксперименты по конкурентному связыванию. Так, в присутствии десятикратного избытка винбластина изотерма адсорбции винорельбина кальмодулином практически не отличалась от изотермы, полученной в отсутствие винбластина (данные не приведены).

Чтобы сравнить связывание винорельбина и винфлюнина с тубулином, мы получили термодинамические параметры связывания этих винка-алкалоидов с помощью ИКТ (рис. 2*в, г*, табл. 1). Однако следует отметить, что связывание тубулина с винка-алкалоидами вызывает формирование протофиламентов, скрученных в спирали или кольца [15], т.е. при связывании винка-алкалоидов происходит полимеризация тубулина. Поскольку ИКТ позволяет регистрировать только интегральную теплоту реакции, то все определенные термодинамические параметры также носят интегральный характер и являются кажущимися. Как видно из табл. 1, энтальпии связывания винорельбина с тубулином и винбластина отличаются всего на 20%, что немногим больше экспериментальной ошибки. При этом константы связывания этих винка-алкалоидов с тубулином отличаются менее чем вдвое. Таким незначительным различием сложно объяснить тот факт, что винорельбин применяется в основном в химиотерапии рака легкого и молочной железы, в то время как винбластин эффективен при терапии очень широкого ряда онкологических заболеваний, таких как, ретикулосаркома, хронический лейкоз, саркома Капоши, нейробластома, рак

почки, рак мочевого пузыря и рак легкого. Ранее мы предполагали, что различия в эффективности и токсичности винбластина и нового винка-алкалоида винфлюнина связаны с их взаимодействием с кальмодулином [5]. В данной работе установлено, что связывание винорельбина и винбластина с кальмодулином существенно различается, в то время как термодинамика их связывания с тубулином практически одинакова. Таким образом, эти данные свидетельствуют в пользу выдвинутой ранее гипотезы о том, что действие винка-алкалоидов не ограничивается непосредственным связыванием с тубулином и что они влияют на другие клеточные механизмы. В свою очередь, это говорит о том, что белки-мишени винка-алкалоидов, в частности кальмодулин, могут быть модуляторами токсичности и направленности действия этих лекарств, а уровень экспрессии таких белков служить биомаркером эффективности данного препарата. Действительно, установлено, что уровень экспрессии статмина может существенно влиять на эффективность терапии винбластином [16]. Поэтому понимание этих “непрямых” механизмов действия винка-алкалоидов чрезвычайно важно не только для создания новых противоопухолевых лекарств, но и для возможной корректировки существующих терапий с учетом уровня экспрессии белков-мишеней.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на

2007–2012 годы” (ГК 02.512.11.2293), Российского фонда фундаментальных исследований (07-04-92165 НЦНИ\_а) и программы “Молекулярная и клеточная биология” Российской академии наук, а также “Ассоциацией по изучению рака” (“Association pour la Recherche contre le Cancer”, no. 1035).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jean-Decoster C., Brichese L., Barret J.M., Tollon Y., Kruczynski A., Hill B.T., Wright M. 1999. Vinflunine, a new vinca alkaloid: cytotoxicity, cellular accumulation and action on the interphasic and mitotic microtubule cytoskeleton of PtK2 cells. *Anticancer Drugs*. **10**, 537–543.
- Kruczynski A., Colpaert F., Tarayre J.P., Mouillard P., Fahy J., Hill B.T. 1998. Preclinical *in vivo* antitumor activity of vinflunine, a novel fluorinated Vinca alkaloid. *Cancer Chemother Pharmacol* **41**, 437–447.
- Ngan V.K., Bellman K., Hill B.T., Wilson L., Jordan M.A. 2001. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by the semisynthetic Vinca alkaloids vinorelbine and its newer derivative vinflunine. *Mol. Pharmacol.* **60**, 225–232.
- Vertessy B.G., Harmat V., Boeskei Z., Naray-Szabo G., Orosz F., Ovadi J. 1998. Simultaneous binding of drugs with different chemical structures to Ca<sup>2+</sup>-calmodulin: crystallographic and spectroscopic studies. *Biochemistry*. **37**, 15300–15310.
- Makarov A.A., Tsvetkov P.O., Villard C., Esquieu D., Pourroy B., Fahy J., Braguer D., Peyrot V., Lafitte D. 2007. Vinflunine, a novel microtubule inhibitor, suppresses calmodulin interaction with the microtubule-associated protein STOP. *Biochemistry*. **46**, 14899–14906.
- Craig T.A., Watterson D.M., Prendergast F.G., Haiech J., Roberts D.M. 1987. Site-specific mutagenesis of the alpha-helices of calmodulin. Effects of altering a charge cluster in the helix that links the two halves of calmodulin. *J. Biol. Chem.* **262**, 3278–3284.
- Kilhoffer M.C., Roberts D.M., Adibi A., Watterson D.M., Haiech J. 1989. Fluorescence characterization of VU-9 calmodulin, an engineered calmodulin with one tryptophan in calcium binding domain III. *Biochemistry*. **28**, 6086–6092.
- Haiech J., Klee C.B., Demaille J.G. 1981. Effects of cations on affinity of calmodulin for calcium: ordered binding of calcium ions allows the specific activation of calmodulin-stimulated enzymes. *Biochemistry*. **20**, 3890–3897.
- Devred F., Tsvetkov P.O., Barbier P., Allegro D., Horwitz S.B., Makarov A.A., Peyrot V. 2008. Stathmin/Op18 is a novel mediator of vinblastine activity. *FEBS Lett.* **582**, 2484–2488.
- Devred F., Barbier P., Douillard S., Monasterio O., Andreu J.M., Peyrot V. 2004. Tau induces ring and microtubule formation from alphabeta-tubulin dimers under nonassembly conditions. *Biochemistry*. **43**, 10520–10531.
- Цветков Ф.О., Devred F., Макаров А.А. 2010. Термодинамика связывания цинка белком S100A2. *Молекуляр. биология*. **44**, 938–942.
- Makarov A.A., Protasevich I., Frank E.G., Grishina I.B., Bolotina I.A., Esipova N.G. 1991. The number of cooperative regions (energetic domains) in a pepsin molecule depends on the pH of the medium. *Biochim. Biophys. Acta*. **1078**, 283–288.
- Protasevich I., Ranjbar B., Lobachov V., Makarov A., Gilli R., Briand C., Lafitte D., Haiech J., 1997. Conformation and thermal denaturation of apocalmodulin: role of electrostatic mutations. *Biochemistry*. **36**, 2017–2024.
- Tsalkova T.N., Privalov P.L. 1985. Thermodynamic study of domain organization in troponin C and calmodulin. *J. Mol. Biol.* **181**, 533–544.
- Gigant B., Wang C., Ravelli R.B., Roussi F., Steinmetz M.O., Curmi P.A., Sobel A., Knossow M. 2005. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*. **435**, 519–522.
- Alli E., Yang J.M., Ford J.M., Hait W.N. 2007. Reversal of stathmin-mediated resistance to paclitaxel and vinblastine in human breast carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* **71**, 1233–1240.