

МИРГОРОДСКИЙ Денис Викторович

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУР ФЕРМЕНТ-ЛИГАНДНЫХ КОМПЛЕКСОВ
АДЕНОЗИНА И ЕГО 2'-, 3'- И 5'-ЗАМЕЩЁННЫХ АНАЛОГОВ
С АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗОЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ
МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОЙ ХИМИИ**

02.00.03 - органическая химия

02.00.04 - физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата химических наук



Работа выполнена в ГОУ ВПО «Самарский государственный университет»

Научный руководитель: Заслуженный деятель науки и техники РФ,
доктор химических наук, профессор
Пурыгин Пётр Петрович

Научный консультант: кандидат физико-математических наук,
старший научный сотрудник
Ильичёва Ирина Алексеевна

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Панкратов Алексей Николаевич,
кандидат химических наук,
Рамазанов Арман Кенжеевич

Ведущая организация Институт органической химии
им. Н. Д. Зелинского РАН (г. Москва)

Защита диссертации состоится "30" декабря 2004 г. в .14 часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.07 в Саратовском государственном университете им. Н. Г. Чернышевского по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83, корпус 1, химический факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского

Автореферат разослан "30" ноября 2004 г.

Учёный секретарь диссертационного совета

доктор химических наук, профессор



Федотова О. В.

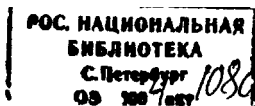
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Аденозиндезаминаза (АДА, КФ 3.5.4.4) – фермент, играющий исключительно важную роль в метаболизме пуриновых нуклеозидов и регуляции клеточного иммунитета у человека и животных. АДА необратимо дезаминирует аденозин и его различные аналоги, включая фармакологически активные, в инозин и его соответствующие малоактивные аналоги путём гидролитического замещения NH_2 -группы на OH -группу в положении 6 остатка пурина или другого гетероцикла.

Недостаток этого фермента в лимфоидных тканях приводит к тяжёлому комбинированному иммунодефициту (ТКИД), связанному с угнетающим действием избытка 2'-дезоксаденозина на биосинтез ДНК в Т- и В-лимфоцитах (образующийся 2'-дезоксаденозин-5'-трифосфат аллостерически ингибирует рибонуклеотидредуктазу) и, как следствие, на их размножение.

Исследование взаимодействий в системах фермент-лиганд на примере системы «АДА-аналог аденозина» методами квантовой химии и молекулярной механики позволяет на атомном уровне получить данные о взаимосвязи структур фермент-лигандных комплексов с субстратными свойствами этих лигандов, которые невозможно получить экспериментальными методами.

Существуют лишь единичные работы, в которых методами компьютерной химии исследовались отдельные аналоги аденозина в комплексе с АДА. Несмотря на наличие ряда рентгеноструктурных данных для комплексов АДА-ингибитор, многие аспекты взаимодействия аналогов субстрата и взаимосвязь их с субстратными свойствами в отношении АДА млекопитающих остаются неизученными. Поэтому теоретическое исследование особенностей акцептирования 2'-, 3'- и 5'-замещённых аналогов аденозина (производных β -D-рибофуранозы, β -D-арабинофуранозы, β - ϵ -ксилофуранозы, β -D-ликсофуранозы и др.) в активном центре АДА методами компьютерной химии представляется **актуальным**. Установление влияния структурных и стереохимических факторов на субстратную активность у этих аналогов аденозина в отношении АДА



млекопитающих необходимо для направленного поиска в этих группах новых нуклеозидов с возможной химиотерапевтической активностью (противовирусной, противоопухолевой, иммуносупрессорной).

Работа выполнялась при финансовой поддержке РФФИ (проект 01-04-49938).

Целью работы явилось исследование оптимизированных структур фермент-лигандных комплексов «АДА-аналог аденозина» и установление взаимосвязи их параметров с субстратными свойствами соответствующих аналогов аденозина.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) получение распределения зарядов методом *ab initio* в базе 6-31G* (6-311G- для бромпроизводных) в молекулах исследуемых нуклеозидов и поиск их конформаций - наиболее устойчивых и оптимальных для акцептирования активным центром АДА - с использованием метода молекулярной механики с силовым полем Amber99;
- 2) получение распределения зарядов методом *ab initio* (базисный набор 6-31G*) в остатках аминокислот с нестандартным состоянием протонирования или находящихся в комплексе с ионом цинка и создание стартовой модели полного комплекса АДА-1-дезааденозин на базе исходной структуры 1ADD из Protein Data Bank для последующего замещения 1-дезааденозина на аденозин или его аналог;
- 3) ступенчатая оптимизация полученных структур фермент-лигандных комплексов в силовом поле Amber99;
- 4) анализ геометрических и энергетических параметров оптимизированных структур комплексов «АДА-аналог аденозина»;
- 5) установление структурных, стереохимических и конформационных факторов, приводящих к различиям в субстратных свойствах для 2'-, 3'- и 5'-замещённых аналогов аденозина в отношении АДА млекопитающих.

Научная новизна. В работе впервые получены следующие результаты:

- 1) методами компьютерной химии созданы и оптимизированы фермент-лигандные комплексы «АДА-аналог аденозина», содержащие аналоги аденозина с заместителями в положениях 2', 3' и 5' фуранозного цикла;
- 2) проведён сравнительный анализ геометрических и энергетических параметров для оптимизированных структур комплексов «АДА-аналог аденозина»;
- 3) установлено, что нахождение фуранозного цикла в TV-области псевдovращения является необходимым условием для эффективного акцептирования аналога аденозина активным центром АДА;
- 4) установлены структурные, стереохимические и конформационные корреляции в комплексах «АДА-аналог аденозина» с экспериментальными данными по субстратным свойствам в отношении АДА для изученных аналогов аденозина.

Практическая значимость работы. Исследование и сравнительный анализ геометрических и энергетических параметров оптимизированных структур фермент-лигандных комплексов для 2'-, 3'- и 5'-замещённых аналогов аденозина с АДА млекопитающих совместно с анализом взаимосвязи их субстратной активности в отношении этого фермента позволит проводить направленный поиск новых аналогов аденозина с ожидаемыми субстратными и ингибиторными свойствами, которые могут проявлять различные виды химиотерапевтической активности.

Предложенные подходы к исследованию фермент-лигандных комплексов методами компьютерной химии могут быть распространены на другие ферменты, для которых известны рентгеноструктурные данные по их фермент-ингибиторным комплексам.

На защиту выносятся:

- результаты исследования оптимизированных структур фермент-лигандных комплексов «АДА-аналог аденозина», включая установление того факта, что нахождение фуранозного цикла в N-области псевдovращения является необходимым условием для эффективного акцептирования аналога аденозина активным центром АДА;

- результаты исследования влияния структурных и стереохимических факторов, приводящих к различиям в субстратных свойствах для АДА у исследуемых групп аналогов аденозина;
- установление основных критериев для акцептирования 2'-, 3'- и 5'-замещённых аналогов аденозина активным центром АДА млекопитающих.

Личный вклад автора заключается в постановке научно-исследовательской работы, планировании подходов к её решению, определении характера проводимых расчётов, обсуждении взаимосвязи структуры фермент-лигандных комплексов с субстратными свойствами 2'-, 3'- и 5'-замещённых аналогов аденозина в отношении АДА млекопитающих, установления влияния ориентации и природы заместителей в положениях 2', 3' и 5' фуранозного цикла на субстратные свойства соответствующих аналогов аденозина.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 3 статьи и 4 тезиса докладов.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, трёх глав, выводов, списка использованных источников и приложения. Текст диссертации изложен на 103 страницах машинописного текста, содержит 16 таблиц, 24 рисунка, 133 литературных ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов. В первой главе проанализированы литературные данные по структурно-функциональным исследованиям субстратных свойств аналогов аденозина в отношении АДА млекопитающих, в частности 2'-, 3'- и 5'-замещённых аналогов аденозина, и их теоретическим исследованиям с использованием различных методов квантовой химии и молекулярной механики. Вторая глава посвящена обсуждению полученных результатов. Третья глава содержит экспериментальные материалы автора. Приложение (60 с.) содержит подробные данные по результатам расчётов фермент-лигандных комплексов и листинги расчётов их конформационных параметров.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

Структурные формулы всех исследованных соединений приведены ниже на рис. 1 с пояснениями в табл. 1.

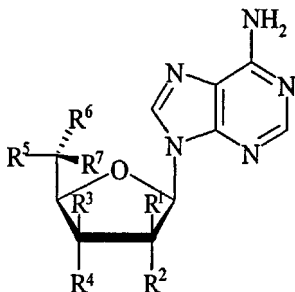


Рис. 1. Обобщённая структурная формула молекул аденозина

и его 2', 3'- и 5'- замещённых аналогов

Таблица 1

Расположение заместителей в остатке фуранозы для аденозина
и его 2', 3'- и 5'-замещённых аналогов

№	Молекула	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
Рибоаденозин и его замещённые аналоги								
1	Ado	H	H	H	H	H	H	H
2	2',3',5'tri-d-Ado	H	H	H	H	H	H	H
3	2',3'di-d-2'-α-F-Ado	H	F	H	H	OH	H	H
4	2',3'di-d-2'-β-F-Ado	F	H	H	H	OH	H	H
5	2',3'di-d-Ado	H	H	H	H	OH	H	H
6	2',5'di-d-Ado	H	H	H	OH	H	H	H
7	2'C-CH ₃ -Ado	CH ₃	OH	H	OH	OH	H	H
8	2'Cl-2d'-Ado	H	Cl	H	OH	OH	H	H
9	2'd-3'-β-ethynyl-Ado	H	H	CCH	OH	OH	H	H
10	2'd-Ado	H	H	H	OH	OH	H	H
11	2'N ₃ -2'd-Ado	H	N ₃	H	OH	OH	H	H
12	2'NH ₂ -2'd-Ado	H	NH ₂	H	OH	OH	H	H
13	2'O-CH ₃ -Ado	H	OCH ₃	H	OH	OH	H	H
14	3'-β-ethyl-Ado	H	OH	CH ₂ CH ₃	OH	OH	H	H
15	3'-β-ethenyl-Ado	H	OH	CHCH ₂	OH	OH	H	H
16	3'-β-ethynyl-Ado	H	OH	CCH	OH	OH	H	H
17	3'C-CH ₃ -Ado	H	OH	CH ₃	OH	OH	H	H
18	3'Cl-3'd-Ado	H	OH	H	Cl	OH	H	H
19	3'd-Ado	H	OH	H	H	OH	H	H

20	3'N ₃ -3'd-Ado	H	OH	H	N ₃	OH	H	H
21	3'NH ₂ -3'd-Ado	H	OH	H	NH ₂	OH	H	H
22	3'O-CH ₃ -Ado	H	OH	H	OCH ₃	OH	H	H
23	5'd-Ado	H	OH	H	OH	H	H	H
24	5'NH ₂ -2',5'di-d-Ado	H	H	H	OH	NH ₂	H	H
25	5'NH ₂ -5d'-Ado	H	OH	H	OH	NH ₂	H	H
26	5'O-CH ₃ -Ado	H	OH	H	OH	OCH ₃	H	H
27	5'C(R)-CH ₃ -Ado	H	OH	H	OH	OH	CH ₃	H
28	5'C(S)-CH ₃ -Ado	H	OH	H	OH	OH	H	CH ₃
29	5'SCH ₃ -5'd-Ado	H	OH	H	OH	SCH ₃	H	H
Кирилоаденозин и его замещенные аналоги								
1	xyloAde	H	OH	OH	H	OH	H	H
2	2'Br-2'd-xyloAde	H	Br	OH	H	OH	H	H
3	2'd-xyloAde	H	H	OH	H	OH	H	H
4	3'-α-ethynyl-xyloAde	H	OH	OH	CCH	OH	H	H
5	3'NH ₂ -3'd-xyloAde	H	OH	NH ₂	H	OH	H	H
6	3'-α-ethenyl-xyloAde	H	OH	OH	CHCH ₂	OH	H	H
7	3'-α-ethyl-xyloAde	H	OH	OH	CH ₂ CH ₃	OH	H	H
8	3'F-3'd-xyloAde	H	OH	F	H	OH	H	H
9	5'd-xyloAde	H	OH	OH	H	H	H	H
10	3'Cl-3'd-xyloAde	H	OH	Cl	H	OH	H	H
11	2',3',5'-tri-NO ₂ -xyloAde	H	ONO ₂	ONO ₂	H	ONO ₂	H	H
12	2'NO ₂ -xyloAde	H	ONO ₂	OH	H	OH	H	H
13	3'N ₃ -3'd-xyloAde	H	OH	N ₃	H	OH	H	H
14	3'NO ₂ -xyloAde	H	OH	ONO ₂	H	OH	H	H
15	2'N ₃ -2'd-xyloAde	H	N ₃	OH	H	OH	H	H
16	3'Br-3'd-xyloAde	H	OH	Br	H	OH	H	H
17	5'NO ₂ -xyloAde	H	OH	OH	H	ONO ₂	H	H
18	3',5'O-di-NO ₂ -xyloAde	H	OH	ONO ₂	H	ONO ₂	H	H
Арабиноаденозин и его замещенные аналоги, ликсоаденозин								
1	araAde	OH	H	H	OH	OH	H	H
2	2'Cl-2'd-araAde	Cl	H	H	OH	OH	H	H
3	2'F-2'd-araAde	F	H	H	OH	OH	H	H
4	3'Br-3'd-araAde	OH	H	H	Br	OH	H	H
5	3'Cl-3'd-araAde	OH	H	H	Cl	OH	H	H
6	3'd-araAde	OH	H	H	H	OH	H	H
7	5'd-araAde	OH	H	H	OH	H	H	H
8	2',3'O-di-CH ₃ -araAde	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	H	H
9	2'O-CH ₃ -araAde	OCH ₃	H	H	OH	OH	H	H
10	3'N ₃ -3'd-araAde	OH	H	H	N ₃	OH	H	H
11	3'O-CH ₃ -araAde	OH	H	H	OCH ₃	OH	H	H
12	5'O-CH ₃ -araAde	OH	H	H	OH	OCH ₃	H	H
13	lyxoAde	OH	H	OH	H	OH	H	H

Для создания исходных структур молекул аденозина и его 2'-, 3'- и 5'-замещённых аналогов (60 структур) была использована структура остатка аденозин-5'-монофосфата из программы HyperChem 7.1 со стартовыми конформациями рибофуранозного цикла C2' -эндо (S-область) и C3'-эндо (N-область).

Заряды на атомах в молекулах нуклеозидов рассчитаны методом *ab initio* в режиме single point (базисный набор 6-31G*). В молекулах нуклеозидов, содержащих атом брома, расчёт зарядов проводился в базисном наборе 6-311G. Их выбор связан с тем, что: 1) распределение зарядов в структурных фрагментах молекул белков и нуклеиновых кислот, используемое в программе HyperChem 7.1, получено также в базисном наборе 6-31G*; 2) для бромпроизводных нуклеозидов использование базисного набора 6-311G связано с отсутствием параметров для атомов брома в базисном наборе 6-31G*.

Далее структуры с рассчитанными зарядами повторно оптимизировались методом молекулярной механики (силовое поле Amber99) и использовались для дальнейших расчётов. Использование силового поля Amber99 связано с двумя причинами: 1) полуэмпирические методы расчёта дают некорректные результаты по конформациям фуранозного цикла в нуклеозидах; 2) силовое поле Amber99 предназначено для молекулярно-механических расчётов белков и нуклеиновых кислот с соответствующим зарядовым распределением и, в отличие от силовых полей Amber94 и Amber96, позволяет корректно рассчитывать молекулы нуклеозидов, содержащих азидные и этильные группы.

Для поиска конформаций молекул нуклеозидов в N- и S-областях псевдотворения фуранозного цикла в силовом поле Amber99 использовался модуль Conformational Search из программного пакета HyperChem 7.1. Использовалось варьирование по трём основным торсионным углам: гликозидному χ (C4N9C1'O4'), экзоциклическому ψ (C3'C4'C5'O5'), эндоциклическому ν_2 (C1'C2'C3'C4').

Для расчёта зарядов в базисном наборе 6-31G* на протонированных остатках аминокислот Glu217 (по кислороду OE1), Asp296 (по кислороду OD2) были созданы структуры трипептидов (Gly216—Glu217—Val218 и Asp295-

Asp296-Pro297), в которых N-концевая аминокислота преобразована в CH_3CO -группу, а C-концевая - в NHCH_3 -группу ($\text{N}(\text{CH}_3)\text{g}$ - в случае остатка Pro297).

Непосредственный расчёт зарядов на остатках аминокислот в комплексе с ионом цинка и гидроксид-ионом в программе HyperChem 7.1 невозможен из-за большого количества атомов в нём, поэтому расчёт зарядов на ионах Zn^{2+} и OH^- проводился в модельном комплексе, в котором C -углеродные атомы остатков соответствующих аминокислот были преобразованы в CH_3 -группы.

Заряды на остатках аминокислот, содержащихся в комплексе с ионом цинка (His 15, His 17, His214, Asp295), были получены в структурах, в каждой из которых соответствующий остаток аминокислоты закрывался фрагментами соседних остатков как описано выше, а остальные три остатка в комплексе с ионом Zn^{2+} и OH^- -ионом были с закрывающими p- CH_3 -группами.

Рассчитанные заряды на атомах в этих структурах переносились в полную структуру комплекса АДА-1-дезааденозин. Далее проводилось замещение 1-дезааденозина в активном центре структуры АДА на соответствующий аналог аденозина.

Ввиду крайней сложности оптимизируемых структур (порядка 6000 атомов) и кооперативного характера конформационных изменений в молекуле белка оптимизация созданных комплексов проводилась ступенчато в несколько этапов до достижения критерия сходимости 0.1 ккал/(А-моль).

Конформационные параметры всех полученных структур молекул нуклеозидов рассчитывались в программе NuclConf, разработанной на языке программирования Borland Pascal 7.0 for DOS.

Расчёт парциальных зарядов в молекулах аденозина и его аналогов показывает, что распределение зарядов в остатке аденина очень мало зависит от углеводного заместителя или его производного в положении 9 гетероцикла. Распределение зарядов в остатке углевода или его производного зависит от природы заместителей и их взаимной ориентации при атомах C2', C3' и C5'. Наибольший отрицательный заряд в остатке гетероцикла - на атоме N1, что объяс-

няет наблюдаемое его протонирование в активном центре АДА, необходимое для протекания ферментативной реакции дезаминирования.

Только имеющимися структурными и конформационными особенностями молекул 2'-, 3'- и 5'-замещённых аналогов аденозина нельзя объяснить значительные различия в их субстратных свойствах в отношении АДА, известные из литературных экспериментальных данных (табл. 2).

Таблица 2

Экспериментальные кинетические константы параметров дезаминирования (K_m , V_{max}) и вычисленные значения относительной субстратной эффективности (V_{max}/K_m) для молекул аденозина и его аналогов в отношении АДА

Соединение	K_m , мкМ	V_{max} (отн.), %	V_{max}/K_m
Ado	33	188	1.00
	25	17	1.00
	42	100	1.00
	31	100	1.00
	58	100	1.00
	52	100	1.00
2',3'-di-d-2'- α -F-Ado	36	283	1.38
2',3'-di-d-2'- β -F-Ado	50	206	0.7
2',3'-di-d-Ado	9.6	18	0.28
	85	205	0.4
2'C-CH ₃ -Ado	65	5	0.02
2'Cl-2'd-Ado	35	146	1.3
2'd-Ado	9.4	19	0.3
	66	75	0.66
	68	113	0.87
	34	185	1.7
	23	245	1.87
2'N ₃ -2'd-Ado	19	27	0.44
2'NH ₂ -2'd-Ado	208	40	0.06
2'O-CH ₃ -Ado	***	***	—
	164	97	0.3
2'd-3'- β -ethynyl-Ado	****	****	0.38
3'- β -ethynyl-Ado	110	2	>0.01
3'- β -ethenyl-Ado	**	**	—
3'- β -ethyl-Ado	**	**	—
3'C-CH ₃ -Ado	**	**	—
3'Cl-3'd-Ado	118	45	0.12

3'd-Ado	74	68	0.6
	64	84	0.68
	43	120	0.87
3'NH ₂ -3'd-Ado	218	148	0.21
3'O-CH ₃ -Ado	***	***	—
	258	81	0.16
5'd-Ado	**	**	—
5'NH ₂ -5'd-Ado	—	—	0.04
5'NH ₂ -2,5-di-dAdo	—	—	0.08
5'O-CH ₃ -Ado	—	<0.01	—
	—	<0.01	—
5'C(R)-CH ₃ -Ado	***	***	—
5'C(S)-CH ₃ -Ado	28	16	0.18
5'SCH ₃ -5'd-Ado	**	**	—
3'N ₃ -3'd-Ado	52	81	0.48
2',5'di-d-Ado	**	**	—
	4	13	0.48
2',3',5'tri-d-Ado	**	**	**
xyloAde	73	55	0.25
	30	34	1.13
2'Br-2'd-xyloAde	118	80	0.68
2'd-xyloAde	208	63	0.3
3'-α-ethynyl-xyloAde	160	19	0.05
3'NH ₂ -3'd-xyloAde	250	19	0.01
3'-α-ethenyl-xyloAde	140	26	0.08
3'-α-ethyl-xyloAde	140	33	0.24
3'F-3'd-xyloAde	38	160	1.31
5'd-xyloAde	—	—	0.04
3'Cl-3'd-xyloAde	333	55	0.05
2',3',5'-tri-NO ₂ -xyloAde	—	—	—
2'NO ₂ -xyloAde	24	53	0.68
3'N ₃ -3'd-xyloAde	416	16	0.01
3'NO ₂ -xyloAde	220	14	0.02
2'N ₃ -2'd-xyloAde	32	126	1.22
3'Br-3'd-xyloAde	*	*	—
3',5'O-di-NO ₂ -xyloAde	—	—	—
5'NO ₂ -xyloAde	—	—	—

araAde	157	52	0.20
	227	49	0.11
	142	53	0.12
	94	24	0.08
	89	23	0.08
2'Cl-2'd-araAde	149	20	0.04
2'F-2'd-araAde	50	110	0.73
3'Br-3'd-araAde	*	*	–
3'Cl-3'd-araAde	**	**	–
3'd-araAde	330	3	>0.01
	**	**	–
5'd-araAde	**	**	–
2',3'O-di-CH ₃ -araAde	–	–	
2'O-CH ₃ -araAde	–	–	0.02
	–	–	0.04
3'N ₃ -3'd-araAde	91	9	0.03
3'O-CH ₃ -araAde	–	–	0.04
	–	–	0.07
5'O-CH ₃ -araAde	–	–	>0.01
	–	–	>0.01
lyxoAde	164	2	>0.01

Примечания:

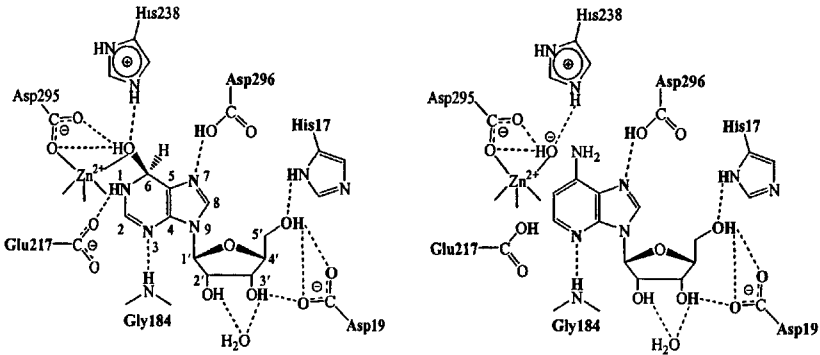
- * – значение K_m настолько велико, что точная оценка затруднительна;
- ** – соединение не является субстратом;
- *** – K_m имеет очень большую величину, соединение дезаминируется очень медленно;
- **** – при соблюдении первого порядка кинетики.

В связи с этим нами было выдвинуто предположение о том, что заместители в положениях 2', 3' и 5' углеводного остатка в нуклеозидах могут влиять на образование соответствующих водородных связей с активным центром АДА.

На схеме 2 приведены взаимодействия молекул 6(S)-гидрокси-1,6-дигидропуририбозиды (слева) и 1-дезааденозина (справа) с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре АДА по данным рентгеноструктурного анализа. Анализ этих данных показывает, что для оптимального акцептирования молекулы аденозина или его аналога в активном центре фермента необходимо образование водородных связей атомами азота N1, N3 и N7

гетероцикла, атомами кислорода 03' и 05' и атомом водорода 5'-ОН-группы (Н05') с соответствующими остатками аминокислот в активном центре фермента.

Схема 1



1. Аденозин и его замещённые рибоаналоги. Известно, что ключевую роль в акцептировании молекулы субстрата (аденозина) играет образование водородной связи между атомами азота N7 гетероцикла в субстрате и водорода COOH-группы остатка Asp296 в активном центре АДА.

Замещение 5'-ОН-группы на CH₃O-группу или атом водорода приводит к полному исчезновению субстратных свойств для рибоаналогов (а также арабиноаналогов) аденозина. Это видно из оптимизированных структур для 5'-метокси- и 5'-дезоксипроизводных аденозина, оптимизированных в активном центре фермента в стартовой N-области псевдообращения. При этом для 5'-метоксипроизводных наблюдаются отклонения от оптимальной геометрии по сравнению с аденозином. В случае 5'-дезоксипроизводных оптимальность геометрических параметров фермент-лигандного комплекса при экспериментально наблюдаемом отсутствии субстратных свойств свидетельствует в пользу согласованного последовательного механизма акцептирования субстрата или его аналога активным центром АДА.

Для большинства рибоаналогов аденозина для стартовой S-области после оптимизации в активном центре фермента наблюдается либо S→N-переход, ли-

бо расположение в активном центре с неоптимальными геометрическими параметрами. Особый интерес представляет 3'-С-замещённые аденозина. Объём заместителя при атоме С3' в β -ориентации фуранозного цикла в зависимости от его ван-дер-ваальсового радиуса непосредственно у атома углерода сильно влияет на субстратные свойства соответствующих производных аденозина. При достижении определённого критического размера ван-дер-ваальсового радиуса субстратные свойства полностью исчезают. Это связано со стерическим влиянием заместителя на образование водородной связи между атомом кислорода OD1 (Asp 19) и водородом 5'-ОН-группы нуклеозида (подобное наблюдается и для ксилоаналогов аденозина в положении С3'). Увеличение объёма заместителя при атоме С2' в α -ориентации меньше влияет на снижение скорости ферментативного дезаминирования.

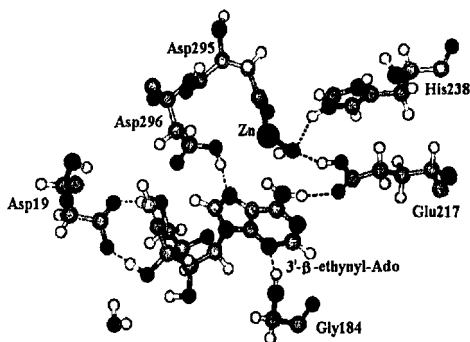


Рис. 1. Расположение молекулы 3'-С-этиниладенозина (N-область псевдовращения) в активном центре АДА по данным молекулярно-механических расчётов

2. Ксилоаденозин и его замещённые аналоги. В случае ксилоаналогов аденозина важным фактором является изменение ориентации гидроксильной группы в положении С3', так как при этом нарушается водородная связь 3'-ОН-группы с кислородом OD2 (Asp 19). В связи с этим сильно ухудшаются субстратные свойства для тех ксилоаналогов аденозина, которые имеют в положении С3' либо полярный заместитель, способный образовывать водородные связи, либо неполярный заместитель большого объёма.

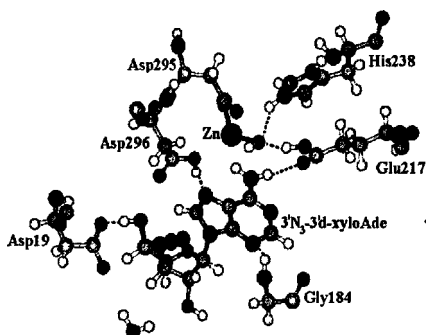


Рис. 2. Расположение молекулы 3'-азидо-3'-дезоксисилоаденозина (N-область псевдповращения) в активном центре АДА по данным молекулярно-механических расчётов

3. Арабиноаденозин и его замещённые аналоги, ликсоаденозин. В

случае арабиноаналогов заместитель при атоме С2' в Р-ориентации играет немаловажную роль, поскольку он ограничивает возможность поворота гетероцикла вокруг гликозидной связи. Увеличение его ван-дер-ваальсового радиуса приводит к резкому уменьшению скорости дезаминирования. Для заместителя при атоме С3' в а-ориентации увеличение его ван-дер-ваальсового радиуса приводит к резкому снижению скорости дезаминирования и его исчезновению. Ликсоаденозин также является очень плохим субстратом (см. выше).

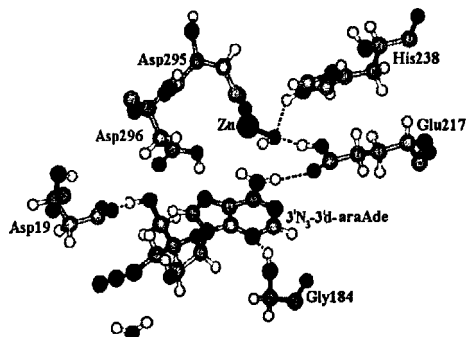


Рис. 3. Расположение молекулы 3'-азидо-3'-деоксиарабиноаденозина (N-область псевдповращения) в активном центре АДА по данным молекулярно-механических расчётов

4. Возможный механизм акцептирования аденозина и его аналогов в активном центре АДА млекопитающих и его уточнение для 2'-, 3'- и 5'-замещённых аналогов аденозина. На основании литературных данных по изучению субстратных и ингибиторных свойств для АДА различных замещённых аналогов аденозина и результатов квантово-химических и молекулярно-механических расчётов, можно предположить, что процесс акцептирования молекулы аденозина или его замещённого аналога активным центром АДА включает следующие стадии.

1. Переход молекулы субстрата или его аналога в «активное» конформационное состояние со следующими параметрами:

- $\chi = -120 \dots -100^\circ$ (*анти-конформация*);
- $\gamma = 40 \dots 65^\circ$ (*+сиклиальная конформация*);
- $\beta = -90 \dots -90^\circ$ (*-синклиальная конформация*);
- равновесная конформация рибофуранозного цикла - в TV-области псевдовращения (группа C3'-эндо).

Впервые установлено, что величина торсионного угла β должна находиться в указанных выше пределах. Уменьшение его значения ниже -100° приводит к резкому ухудшению и исчезновению субстратных свойств у соответствующих аналогов аденозина. Однако 3'-азидо-3'-дезоксаденозин является хорошим субстратом, так как N₃-группа благодаря своему вытянутому линейному строению в определённой ориентации относительно фуранозного кольца меньше затрудняет акцептирование этого аналога активным центром АДА.

2. Кооперативное образование трёх водородных связей:

- между атомами кислорода O5' субстрата и водорода при атоме N1 имидазольной группы остатка His 17;
- между атомом водорода HO5' субстрата и атомом кислорода OD1 COO'-группы остатка Asp 19;
- между атомами азота N7 субстрата и водорода γ -COOH-группы остатка Asp296.

Для рибо- и ксилоаналогов аденозина наличие заместителя при атоме С3' в *p*-ориентации приводит к стерическим затруднениям в образовании водородной связи между атомом водорода НО5' субстрата и атомами кислорода СОО'-группы остатка Asp 19. При достижении ван-дер-ваальсового радиуса этого заместителя величины 1.8 Å субстратные свойства у аналога полностью исчезают вследствие невозможности его акцептирования активным центром АДА.

Для арабиноаналогов аденозина увеличение размера заместителя при атоме С2' в *P*-ориентации приводит к стерическим затруднениям при вращении вокруг гликозидной связи нуклеозида и ухудшению субстратных свойств вплоть до полного их исчезновения. К аналогичному явлению также приводит наличие заместителя при атоме С3' в «-ориентации, но оно уже связано со взаимным отталкиванием заместителей при атоме С2' в *p*-ориентации и атоме С3' в *a*-ориентации в фуранозном цикле, что приводит к неоптимальной его конформации для процесса дезаминирования.

Для 5'-метокси- и 5'-дезоксиданалогов аденозина независимо от типа и ориентации заместителей при атомах С2' и С3' наблюдается полное отсутствие субстратных свойств вследствие невозможности образования водородных связей между атомами кислорода О5' субстрата и водорода при атоме N1 имидазольной группы остатка His 17 и между атомом водорода НО5' субстрата и атомами кислорода СОО'-группы остатка Asp 19;

3. Образование водородной связи между атомами азота N1 субстрата и водорода СООН-группы остатка Glu217.

4. Образование водородной связи между атомами азота N3 субстрата и водорода СОНН-группы остатка Gly184.

5. Протонирование атома азота N1 гетероцикла в молекуле путём переноса протона от СООН-группы остатка Glu217.

Такая система образующихся водородных связей субстрата в активном центре аденозиндезаминазы максимально способствует нуклеофильной атаке цинк-активированной молекулы воды (в виде гидроксид-иона) на атом С6 гете-

роцикла и, следовательно, протеканию ферментативной реакции дезаминирования по механизму S_NAr .

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методики создания, расчёта и анализа структур фермент-лигандных комплексов «АДА-аналог аденозина», содержащие аналоги аденозина с заместителями в положениях 2', 3' и 5' фуранозного цикла.
2. Установлено, что нахождение фуранозного цикла в N-области псевдовращения (группа C3'-эндо) является необходимым условием для эффективного связывания аналога аденозина активным центром АДА. В случае стартовой S-области молекулы нуклеозида наблюдаются либо конформационный $S \rightarrow N$ -переход, либо неоптимальность геометрических параметров оптимизированных фермент-лигандных комплексов.
3. Установлено, что величина торсионного угла β должна находиться в пределах $-80 \dots -90^\circ$ (*-синклиальная* конформация). Уменьшение его значения ниже -100° (*-антиклиальная* конформация) приводит к резкому ухудшению и исчезновению субстратных свойств у соответствующих аналогов аденозина, так как нарушается соответствующая водородная связь между 5'-ОН-группой нуклеозида и COO⁻-группой остатка Asp 19 в активном центре АДА.
4. Для рибоаналогов аденозина наличие заместителя при атоме C3' в β -ориентации приводит к стерическим затруднениям в образовании водородной связи между атомом водорода НО5' субстрата и атомом кислорода COO⁻-группы остатка Asp 19. Ван-дер-ваальсовый радиус этого заместителя не должен превышать 1.8 \AA , чтобы соединение проявляло субстратные свойства (этинильная группа). Увеличение размеров заместителя при атоме C3' в α -ориентации влияет на ухудшение субстратных свойств аналога гораздо сильнее, чем при атоме C2' в той же ориентации вследствие его влияния на образование той же водородной связи.

5. Для ксилоаналогов аденозина наличие заместителя при атоме С3' в β -ориентации приводит к сходному его влиянию, как и в случае рибоаналогов. Поэтому наилучшими субстратными свойствами обладают соединения, у которых в β -ориентации при атоме С3' находятся атомы водорода или фтора. При достижении ван-дер-ваальсового радиуса этого заместителя величины 1.8 Å субстратные свойства у аналога полностью исчезают вследствие невозможности его акцептирования активным центром АДА.
6. Для арабиноаналогов аденозина увеличение объёма заместителя при атоме С2' в β -ориентации приводит к стерическим затруднениям при вращении вокруг гликозидной связи нуклеозида и ухудшению субстратных свойств вплоть до полного их исчезновения. К аналогичному явлению также приводит наличие заместителя при атоме С3' в α -ориентации, что связано с влиянием этого заместителя на образование водородной связи между атомом водорода НО5' субстрата и атомом кислорода СОО'-группы остатка Asp 19. Наилучшими субстратами для АДА являются те арабиноаналоги аденозина, которые имеют в соответствующих положениях остатков фуранозы атомы водорода или фтора.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Миргородский Д.В., Пурыгин П.П., Зарубин Ю.П. Теоретическое использование структур фермент-лигандных комплексов для аденозиндезаминазы млекопитающих. I. Замещённые рибоаналоги аденозина // Вестник СамГУ. 2004. Спецвыпуск. Естественнонаучная серия. С. 201-210.
2. Миргородский Д.В., Пурыгин П.П., Зарубин Ю.П. Теоретическое исследование структур фермент-лигандных комплексов для аденозиндезаминазы млекопитающих. II. Замещённые ксилоаналоги аденозина // Вестник СамГУ. 2004. Спецвыпуск. Естественнонаучная серия. С. 211-217.
3. Миргородский Д.В., Пурыгин П.П., Зарубин Ю.П. Теоретическое исследование структур фермент-лигандных комплексов для аденозиндезаминазы мле-

- копитающих. III. Замещённые арабино- и ликсоаналоги аденозина // Вестник СамГУ. 2004. Спецвыпуск. Естественнонаучная серия. С. 218-221.
4. Миргородский Д.В., П.П. Пурыгин, Ю.П. Зарубин, И.А. Ильичёва, В.Л. Флорентьев Теоретическое исследование аденозина и его изостерных аналогов. Возможный механизм их акцептирования в активном центре аденозиндезаминазы млекопитающих // Вестник СамГУ. 2003. Спецвыпуск. С. 152—172.
 5. Миргородский Д.В., Зарубин Ю.П., Пурыгин П.П. Исследование структур фермент-субстратных комплексов аденозина и его 2'-, 3'- и 5'-замещённых рибоаналогов с аденозиндезаминазой млекопитающих методами компьютерной химии // Тез. докл. Международной научной конференции. Томск, 2004. С. 61-62.
 6. Миргородский Д.В., Зарубин Ю.П., Пурыгин П.П. Исследование структур фермент-лигандных комплексов аденозина и его 2'-, 3'- и 5'-замещённых ксилоаналогов с аденозиндезаминазой млекопитающих методами компьютерной химии // Тез. докл. научной конференции «Человек и Вселенная». Санкт-Петербург, 2004. С. 40-42.
 7. Миргородский Д.В., Зарубин Ю.П., Пурыгин П.П. Взаимосвязь структур комплексов «АДА-аналог аденозина» с субстратными свойствами аналогов аденозина. // Тез. докл. научной конференции «Человек и Вселенная». Санкт-Петербург, 2004. С. 43-46.

Ответственный за выпуск - д.х.н., доцент Сорокин В.В.

Подписано в печать 30 ноября 2004.

Формат 60x84/16. Бумага офсетная. Печать оперативная.

Объём 1,4 п.л. Тираж 100 экз. Заказ № 1124

443011 г.Самара, ул. Академика Павлова, 1

УОП СамГУ ПЛД №67-43 от 19.02.98.

26995