



УДК 577.152.354'4'14

СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ.
РОЛЬ МЕТИЛЬНЫХ ГРУПП ПРИ 2', 3' И 5'-АТОМАХ
УГЛЕРОДА АДЕНОЗИНА

Калиниченко Е. Н., Бейгельман Л. Н. *, Михайлов С. Н. *,
Михайлопуло И. А.

Институт биоорганической химии Академии наук БССР, Минск;
* Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва

Исследована субстратная специфичность аденозиндезаминазы в отношении аналогов аденозина, содержащих метильные группы при С2', С3' или С5'-атомах фуранозного кольца. Субстратные свойства 2'-С- и 3'-С-метиладенозинов были сопоставлены с наиболее заселенными конформациями фуранозного кольца каждого из аналогов и на основании этих данных сформулирована модифицированная стереохимическая модель взаимодействия субстрата с ферментом: фермент акцептирует субстрат, фуранозное кольцо которого находится в диапазоне *N*-конформаций (${}^1E \leftrightarrow {}^1T^3 \leftrightarrow {}^3E$). Предложенная стереохимическая модель детально проанализирована на примере ряда аналогов аденозина, модифицированных при С3'-атоме, а также с субстратными свойствами *тало*- и *алло*-эпимеров 5'-С-метиладенозина.

Установление структурных и стереохимических факторов, определяющих субстратную активность аналогов аденозина в отношении аденозиндезаминазы (КФ 3.5.4.4), имеет большое значение для направленного поиска новых биологически активных соединений в указанном ряду. Известно, что аналоги аденозина, представляющие интерес в качестве химиотерапевтических препаратов, под действием аденозиндезаминазы превращаются в неактивные или существенно менее активные нуклеозиды гипоксантина и родственных гетероциклических оснований [1]. Таким образом, устойчивость аналогов к ферментативному дезаминированию является важным критерием, определяющим биологические свойства.

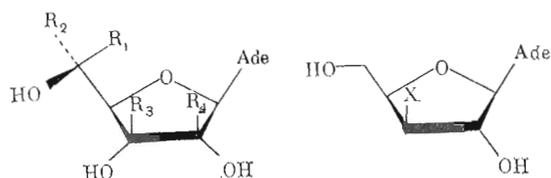
Разнообразные аналоги аденозина, в том числе модифицированные в углеводном фрагменте молекулы, были использованы в исследованиях по субстратной специфичности аденозиндезаминазы (см., например, работу [2] и литературу, цитированную в ней). При этом одной из сложных проблем является понимание роли объема заместителя на процесс ферментативного дезаминирования [2—8]. Объемный заместитель в углеводной части молекулы может препятствовать связыванию субстрата с активным центром фермента или вызывать такое изменение конформации фуранозного кольца, гетероциклического основания или экзоциклической 4'-СН₂ОН-группы, которое не соответствует требованиям фермента к пространственной структуре субстрата. Однако отсутствие в большинстве случаев данных конформационного анализа изучаемых аналогов аденозина в водных растворах, а также данных рентгеноструктурного анализа делает невозможным надежную интерпретацию результатов изучения кинетики ферментативного дезаминирования.

В настоящей работе нами изучены субстратные свойства 2'-С-метиладенозина (II) [9], 3'-С-метиладенозина (III) [10], 9-(6-дезоксид-β-D-аллофуранозил)аденина (IV) [11] и 9-(6-дезоксид-α-L-талофуранозил)аденина (V) [12] (таблица). Интерес к изучению этой группы соединений обусловлен рядом причин. В первую очередь следует отметить, что эти соединения являются функционально полными аналогами аденозина, т. е. содержат все группировки, присущие природному субстрату, и, кроме того, объемные метильные группы в определенной позиции фуранозного кольца. Далее, на примерах 2'-С-метилуридина [9] и 3'-С-метилцитидина [13] была изучена кристаллическая структура посредством рентгеноструктур-

ного анализа. С высокой степенью вероятности можно полагать, что подобная структура должна быть присуща в кристалле соответствующим адениновым нуклеозидам. Последнее подтверждается данными конформационного анализа в растворе [9, 13]: имеется близкое стереохимическое подобие пиримидиновых и адениновых нуклеозидов как в ряду 2'-С-метилпроизводных, так и в ряду 3'-С-метилпроизводных. Эти данные по стереохимии рассматриваемых аналогов аденозина вызвали наш интерес к изучению субстратных свойств для аденозиндезаминазы, так как они могли дать более глубокое понимание стереохимических требований фермента к субстрату, предположенных ранее [2]. Наконец, включение в эту группу 5'-С-метилпроизводных аденозина (IV) и (V), субстратные свойства которых в отношении аденозиндезаминазы были изучены ранее [4], представлялось необходимым в свете более поздних данных [14, 15] по стереохимии 4'-СН₂ОН-группы в фермент-субстратном комплексе, а также в связи с некоторыми противоречиями данных работы [4] и таковыми поздних публикаций [14, 15].

Важной особенностью 2'-С- и 3'-С-метиладенозинов является конформационная «жесткость» фуранозного кольца в отличие от природных нуклеозидов и большинства их аналогов, для которых характерно динамическое равновесие $S(C2'-\text{эндо}; {}^2E \leftrightarrow {}^2T_3 \leftrightarrow {}^3E) \rightleftharpoons N(C3'-\text{эндо}; {}^3E \leftrightarrow {}^3T_2 \leftrightarrow {}^2E)$ (обозначения см. обзор Дэвиса [16]). Существенный элемент $S-N$ -равновесия — постоянство усредненного во времени расстояния между 5'-ОН-группой и гетероциклическим основанием (точнее, С6-атомом аденинового кольца), что является одним из важнейших требований фермента к субстрату (ср., например, с данными работ [17, 18]). Именно этот критерий был положен ранее в основу стереохимической модели взаимодействия субстрата — аденозина и его аналогов с аденозиндезаминазой [2]. Вместе с тем, принимая во внимание, что 2'-С-метиладенозин (II) — хороший субстрат аденозиндезаминазы и для фуранозного кольца аналога (II) наиболее вероятна ${}^1T^3$ -конформация [9], представляется целесообразным скорректировать предложенную стереохимическую модель [2] следующим образом: фермент акцептирует субстрат, фуранозное кольцо которого находится в N -конформации (${}^1E \leftrightarrow {}^1T^3 \leftrightarrow {}^3E$). Насколько нам известно, единственным исключением является 9-(5-дезоксид-β-D-ксилофуранозил)аденин, дезаминирование которого под действием аденозиндезаминазы [19] можно допустить только в S -конформации фуранозного кольца (детальную дискуссию см. в работе [2]). Эта новая стереохимическая модель хорошо соотносится с рядом фактов, а именно с отсутствием субстратных свойств у R и S -изомеров 8,5'-циклоаденозина [14, 15] (вопреки более ранним данным, согласно которым один из изомеров является субстратом аденозиндезаминазы [4]), со сделанным ранее предположением о механизме связывания субстрата с ферментом [2], а также с полным отсутствием субстратных свойств у 3'-С-метиладенозина (III), фуранозное кольцо которого полностью находится в S -конформации [13]. В последнем случае, по-видимому, следует с определенной осторожностью трактовать факт отсутствия субстратных свойств у аналога (III) по следующим причинам. Ранее уже отмечалось, что объем заместителя при С3' в ксилоконфигурации оказывает значительное влияние на процесс образования фермент-субстратного комплекса [2, 7]. Устойчивость 3'-С-метиладенозина (III) к дезаминированию не является неожиданной, если рассмотреть зависимость между субстратными свойствами аналогов и ван-дер-ваальсовыми радиусами «инертных» С3'-ксило-заместителей, т. е. заместителей, неспособных образовывать водородные связи и тем самым взаимодействовать с определенными участками активного центра фермента. Действительно, субстратные свойства в ряду соединений (VI) — (IX) и (III) изменяются в соответствии с ван-дер-ваальсовыми радиусами С3'-ксило-заместителей: Н 1,20, F 1,35, Cl 1,81, Br 1,95 и СН₃ 2,00 Å. Как и следовало ожидать, 3'-дезоксаденозин (VI) и фторид (VII) обладают очень близкой субстратной активностью. Далее, при переходе от соединений (VI) и (VII) к аналогам (X) — (XII) сродство субстрата к ферменту (K_m) претерпевает значительные изменения. Для этой группы соединений харак-

терно то, что СЗ'-ксило-заместители могут оказывать влияние на субстратные свойства посредством стерических взаимодействий и в результате образования водородных связей. На основании данной работы [2] можно предполагать, что и в этом случае изменения субстратных свойств в значительной мере связаны с пространственным фактором. Следует отметить, что аналогичные изменения характера заместителя при С2' в арабиноконфигурации оказывают значительно меньшее влияние на сродство субстрата к ферменту [2, 8, 20, 21]. Изложенное выше приводит к заключению, что аденозиндезаминаза предъявляет весьма жесткие требования к объему заместителя при СЗ'-атоме субстрата в ксилоконфигурации.



- | | |
|---------------------------------|---------------|
| (I) $R_1=R_2=R_3=R_4=H$ | (VI) $X=H$ |
| (II) $R_1=R_2=R_3=H; R_4=CH_3$ | (VII) $X=F$ |
| (III) $R_1=R_2=R_4=H; R_3=CH_3$ | (VIII) $X=Cl$ |
| (IV) $R_1=R_3=R_4=H; R_2=CH_3$ | (IX) $X=Br$ |
| (V) $R_2=R_3=R_4=H; R_1=CH_3$ | (X) $X=OH$ |
| | (XI) $X=NH_2$ |
| | (XII) $X=N_3$ |

Ade — аденин-9-ил

Кинетические параметры, K_m и V , найденные нами для 5'-С-метилпроизводных аденозина (IV) и (V), удовлетворительно согласуются с приведенными в работе [4]. Имеется ряд экспериментальных данных, свидетельствующих, что аденозиндезаминаза акцептирует аденозин в конформации ψ^- ($\sim 300^\circ$) [16] 4'-СН₂ОН-группы, которая схематически представлена в изображении формулы соединений (I)–(V). Во-первых, 5'-ОН-группа играет критически важную роль в процессе связывания субстрата с ферментом и ее отсутствие приводит к полному исчезновению субстратных свойств (см., например, [2]). Однако в случае 9-(5-дезоксид-β-D-ксилофуранозил)аденина функцию 5'-ОН-группы берет на себя 3'-ОН-ксилогруппа, что делает это соединение хорошим субстратом аденозиндезаминазы [19]. Со стереохимической точки зрения такая функциональная взаимозаменяемость возможна только для ψ^- -конформации 4'-СН₂ОН-группы и S-конформации фуранозного кольца 9-(5-дезоксид-β-D-ксилофуранозил)аденина [2]. Во-вторых, S-эпимер 8,5'-циклоаденозина, но не R-эпимер является слабым ингибитором аденозиндезаминазы [14, 15]. Наконец, ψ^+ -конформация 4'-СН₂ОН-группы, присущая практически всем нуклеозидам в кристалле, не реализуется в ферментативных реакциях [22]. Все эти данные, вместе взятые, говорят о том, что ψ^- -конформация 4'-СН₂ОН-группы наиболее вероятна в продуктивном фермент-субстратном комплексе. В этом случае, на первый взгляд, необъяснимым представляется наличие субстратной активности у тало-эпимера (V) и практически полное отсутствие таковой у алло-эпимера (IV). Действительно, в случае первого соединения необходимо было бы рассмотреть стерическое взаимодействие 5'-тало-метильной группы и аденинового основания. Однако в полном согласии со сформулированной выше стереохимической моделью образования фермент-субстратного комплекса указанная N-конформация фуранозного кольца полностью исключает стерические контакты 5'-тало-метильной группы и аденинового основания. Отсутствие субстратной активности у алло-эпимера (IV) связано, по всей вероятности, со стерическими препятствиями, которые создает 5'-алло-метильная группа в ψ^- -конфигурации 4'-СН₂ОН-группы образованию фермент-субстратного комплекса, тогда как конформация ψ_0 вокруг С4'–С5'-связи исключает возможность образования водородной связи между 5'-ОН-группой и соответствующим местом активного центра фермента (дискуссию см. в работе [2]). В этой связи

**Кинетические параметры (K_m и V) дезаминирования адениновых нуклеозидов
под действием аденозиндезаминазы**

Соединение	K_m , мкМ	V (отн.)
Адспозин * (I)	31	100
2'-С-Метиладенозин (II)	65	5
3'-С-Метиладенозин (III)	**	
5'-С-Метиладенозин (<i>алло</i>) (IV)	***	
5'-С-Метиладенозин (<i>тало</i>) (V)	28	16
3'-Дезоксиаденозин * (VI)	43	120
9-(3-Фтор-3-дезоксид- β -D-ксилофуранозил)аденин (VII)	38	160
9-(3-Хлор-3-дезоксид- β -D-ксилофуранозил)аденин * (VIII)	333	55
9-(3-Бром-3-дезоксид- β -D-ксилофуранозил)аденин * (IX)	***	
9-(β -D-ксилофуранозил)аденин * (X)	73	55
9-(3-Амино-3-дезоксид- β -D-ксилофуранозил)аденин (XI)	250	19
9-(3-Азидо-3-дезоксид- β -D-ксилофуранозил)аденин * (XII)	416	16

* Данные взяты из работы [2].

** Соединение не является субстратом.

*** K_m имеет очень большую величину; соединение дезаминируется очень медленно.

следует отметить, что *алло*-эпимер (IV), так же как и 3'-С-метиладенозин (III), не ингибирует ферментативное дезаминирование аденозина в диапазоне концентраций 15–60 мкМ.

Экспериментальная часть

Кинетические параметры (K_m и V) дезаминирования изученных адениновых нуклеозидов под действием аденозиндезаминазы из стенок кишок теленка (Boehringer Mannheim) были получены аналогично описанному ранее [2] с учетом данных работы [23] и представлены в таблице. В работе использован 9-(3-амино-3-дезоксид- β -D-ксилофуранозил)аденин (XI), синтез которого был описан ранее [24]; 9-(3-фтор-3-дезоксид- β -D-ксилофуранозил)аденин (VII) получен согласно методу, описанному в работе [24] для синтеза 9-(3-азидо-3-дезоксид- β -D-ксилофуранозил)аденина (XII), и подробно будет описан позднее.

ЛИТЕРАТУРА

1. Montgomery J. A. // Med. Res. Rev. 1982. V. 2. № 3. P. 271–308.
2. Mikhailopulo I. A., Wiedner H., Cramer F. // Biochem. Pharmacol. 1981. V. 30. № 9. P. 1001–1004.
3. Tronchet J. M. J., Tronchet J. // Helv. chim. acta. 1971. V. 54. № 5. P. 1466–1479.
4. Hampton A., Harper P. J., Sasaki T. // Biochemistry. 1972. V. 11. № 25. P. 4736–4739.
5. Jenkins S. R., Walton E. // Carbohydr. Res. 1973. V. 26. № 1. P. 71–81.
6. Tronchet J. M. J., Tronchet J., Graf R. // J. Med. Chem. 1974. V. 17. № 10. P. 1055–1056.
7. Tronchet J. M. J., Tronchet J. F. // Helv. chim. acta. 1979. V. 62. № 3. P. 689–695.
8. Baker D. C., Haskell Th. H., Pull S. R., Sloan B. J. // J. Med. Chem. 1979. V. 22. № 3. P. 273–279.
9. Beigelman L. N., Ermolinsky B. S., Gurskaya G. V., Tsapkina E. N., Karpeisky M. Ya., Mikhailov S. N. // Carbohydr. Res. 1987. V. 166. № 2. P. 219–232.
10. Beigelman L. N., Gurskaya G. V., Tsapkina E. N., Mikhailov S. N. // Carbohydr. Res. 1988. V. 180.
11. Карпейский М. Я., Михайлов С. Н. // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 6. С. 895–905.
12. Михайлов С. Н., Падюкова Н. Ш., Стручкова М. И., Яроцкий С. В. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. № 7. С. 926–931.
13. Mikhailov S. N., Beigelman L. N., Gurskaya G. V., Podlyukova N. Sh., Yakovlev G. I., Karpeisky M. Ya. // Carbohydr. Res. 1983. V. 124. № 1. P. 75–96.
14. Stolarski R., Dudycz L., Shugar D. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 108. № 1. P. 111–121.
15. Dudycz L., Shugar D. // FEBS Lett. 1979. V. 107. № 2. P. 363–365.
16. Davies D. B. // Progr. Nucl. Magn. Res. Spectroscopy. 1978. V. 12. № 3. P. 135–226.
17. Phadtare Sh., Zemlicka Y. // Nucl. Acids Res. Sympos. Ser. 1987. № 18. P. 25–28.
18. Schaeffer H. J., Gurwara S., Vince R., Bittner S. // J. Med. Chem. 1971. V. 14. № 4. P. 367–369.
19. York J. L., Page Le G. A. // Can. J. Biochem. 1966. V. 44. № 3. P. 331–337.
20. Bobek M., Cheng Y.-C., Mihich E., Bloch A. // Cancer chemo- and immunopharmacology. 1. Immunopharmacology/Eds Mathe G., Muggia F. M. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1980. P. 78–83.
21. Stoechler J. D., Bell C. A., Parks R. E., Chu Ch. K., Fox J. J., Ikehara M. // Biochem. Pharmacol. 1982. V. 31. № 9. P. 1723–1728.

22. Haromy T. P., Raleigh J., Sundaralingam M. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 8. P. 1718–1722.
23. Murphy J., Baker D. C., Behling C., Turner R. A. // Anal. Biochem. 1982. V. 122. № 2. P. 328–337.
24. Азреш А. А., Зайцева Г. В., Калининченко Е. Н., Михайлопуло И. А. // Биорганическая химия. 1976. Т. 2. № 10. С. 1325–1337.

Поступила в редакцию
3.III.1988

**SUBSTRATE SPECIFICITY OF ADENOSINE DEAMINASE: ROLE
OF METHYL GROUPS AT 2',3'- AND 5'-POSITIONS
OF ADENOSINE**

KALINITCHENKO E. N., BEIGELMAN L. N. *, MIKHAILOV S. N. *, MIKHAILOPULO I. A.

*Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences
of the Byelorussian SSR, Minsk;*

** Institute of Molecular Biology, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow*

The substrate specificity of adenosine deaminase has been studied using C'-methyl derivatives of adenosine. On the basis of the correlation revealed between conformations of 2'- and 3'-C-methyladenosine and their substrate properties, a modified stereochemical model is suggested: the enzyme accepts the substrate within a N-type conformational range (${}^1E \leftrightarrow {}^4T^3 \leftrightarrow {}^3E$) of the furanose ring. The model was analysed in details using a number of C3'-modified adenosines and 5'-C-methyladenosine analogues with *D-allo*- and *L-talo*-configuration.