



УДК 539.193:577.153

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТИВНЫХ КОНФОРМАЦИЙ СУБСТРАТОВ
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С ПОМОЩЬЮ ТЕОРЕТИЧЕСКОГО
КОНФОРМАЦИОННОГО АНАЛИЗА

Шестакова Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е.,
Жоров В. С.* , Говырин В. А.*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова
Академии наук СССР, Ленинград;




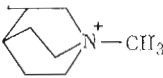
* Институт физиологии им. И. П. Павлова Академии наук СССР,
Ленинград

Методом молекулярной механики рассчитаны все устойчивые конформации 23 эффектов ацетилхолинэстеразы. В ряду конформационно гибких производных ацетилхолина выявлена корреляция между скоростью гидролиза ацетилхолинэстеразы и заселенностью полностью вытянутой *tt*-конформации. Циклические субстраты гидролизуются с высокой скоростью только в том случае, если по взаиморасположению аммониевой группировки, карбонильного углерода и карбонильного кислорода они могут быть совмещены с *tt*-конформацией ацетилхолина. У аналогов ацетилхолина с удлинённой цепочкой между аммониевой группировкой и ацильной частью скорость гидролиза пропорциональна заселенности конформаций, совместимых с *tt*-конформацией ацетилхолина. Сделан вывод о продуктивности по отношению к ацетилхолинэстеразе полностью вытянутой *tt*-конформации ацетилхолина.

Ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7) — фермент, относящийся к классу сериновых гидролаз, — играет важную роль в процессе передачи нервного импульса, осуществляя инактивацию (гидролиз) медиатора ацетилхолина. Исследование большого числа субстратов и ингибиторов ацетилхолинэстеразы позволило установить, что активный центр фермента имеет анионный и эстеразный участки, с которыми связываются соответственно катионная и ацильная части ацетилхолина (соединение (I) в табл. 1). Разрыв сложноэфирной связи субстрата осуществляется в результате атаки карбонильного углерода сериновым гидроксилем фермента [1]. Недавно установлена аминокислотная последовательность ацетилхолинэстеразы [2]. Высказаны предположения о локализации в этой последовательности аминокислотных остатков, формирующих активный центр. Однако пространственное строение активного центра остается неизвестным, что затрудняет трактовку структурно-функциональных отношений имеющих эффекторов и направленный синтез новых субстратов и ингибиторов ацетилхолинэстеразы. Определенным этапом на пути решения этой проблемы может стать выявление биологически активных (продуктивных) конформаций ацетилхолина и других субстратов.

Ранее предпринимались попытки определения продуктивной конформации субстратов ацетилхолинэстеразы [3—11]. Так, на основании исследования молекулы ацетилхолина методами ИК-спектроскопии было высказано предположение о существовании устойчивых циклических структур, образованных за счет кулоновских взаимодействий [3] или водородных связей [4] между атомами катионной группировки и эфирным кислородом. Такие циклические структуры возможны, если фрагмент $O-C-C-N^+$ находится в *gosh*-конформации. Методами ЯМР-спектроскопии была подтверждена предпочтительность *gosh*-конформации этого фрагмента [5]. На основании расчетов молекулы ацетилхолина методом PCIO было показано, что для нее существуют четыре устойчивые конформации, причем свернутые формы на 1 ккал/моль энергетически вы-

Аналоги ацетилхолина $\text{CH}_3\text{-C(O)-O-A-N}^+(\text{CH}_3)_3$ и скорости их гидролиза ацетилхолинэстеразой

| Соединение | Конфигурация атомов | | —A— | $v_{\text{отн.}} \%$ | Ссылка |
|------------|---------------------|------------------|---|----------------------|----------|
| | C^α | C^β | | | |
| (I) | | | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | 100 | [16] |
| (II) | R | | $-\text{CH}_2-\text{CH}-$ | 84 | » |
| (III) | S | | $\begin{array}{c} \\ \text{CH}_3 \end{array}$ | 110 | » |
| (IV) | | R | $-\text{CH}-\text{CH}_2-$ | 0 | » |
| (V) | | S | $\begin{array}{c} \\ \text{CH}_3 \end{array}$ | 32 | » |
| (VI) | R | R | $-\text{CH}-\text{CH}-$ | 7 | » |
| (VII) | S | S | $\begin{array}{c} \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array}$ | 6 | » |
| (VIII) | R | S | | 1,3 | » |
| (IX) | S | R | | 1,4 | » |
| (X) | S | S |  | 96 | [12] |
| (XI) | R | R | | 56 | » |
| (XII) | S | R | | 0 | » |
| (XIII) | R | S | | 0 | » |
| (XIV) | S | S |  | } 46 | [17] |
| (XV) | R | R | | | |
| (XVI) * | R | R |  | 0 | [10, 11] |
| (XVII) * | S | S | | 36 | » |
| (XVIII) * | R | R | | 0 | » |
| (XIX) * | S | S | | 0 | » |
| (XX) | | S |  | 103 | [18] |
| (XXI) | | R | | 0,8 | » |
| (XXII) | | | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | 70 | [16] |
| (XXIII) | | | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ | 10 | » |

* Соединения (XVI) и (XVII) — диаксиальные, а соединения (XVIII) и (XIX) — аксиально-экваториальные изомеры декалинового производного ацетилхолина.

годнее вытянутых [6]. Сопоставление величин торсионного угла фрагмента X-C-C-N^+ ($\text{X}=\text{O}, \text{S}, \text{Se}$) для различных производных ацетилхолина с относительной скоростью их гидролиза под действием ацетилхолинэстеразы позволило сделать вывод о способности к ферментативному гидролизу субстратов, имеющих как *гош*-, так и *транс*-конформацию фрагмента X-C-C-N^+ [7]. На этом основании было выдвинуто предположение, что при взаимодействии с ферментом молекула ацетилхолина может претерпевать переход в биологически активную конформацию. Смишман и соавт. [8–11] провели анализ конформационно-функциональных отношений 3-триметиламмоний-2-ацетокси-*транс*-декалинов. Субстратом оказался только *транс*-диаксиальный изомер, у которого двугранный угол фрагмента O-C-C-N^+ равен 147° . В работе [10] на основании собственных и литературных данных авторы сделали вывод, что в переходном состоянии субстрата в активном центре ацетилхолинэстеразы дву-

гранный угол фрагмента $O-C-C-N^+$ близок к 150° . Однако авторы работы [10], цитируя данные работы [12] о высокой скорости гидролиза (+)-*транс*-изомера ацетоксициклопропилтриметиламмония (96%), обходят молчанием приведенный в этой же работе факт, что (-)-*транс*-изомер этого соединения, у которого угол $O-C-C-N^+$ равен -137° , также гидролизует ацетилхолинэстеразой с высокой скоростью (56%). На основании исследования ряда изомеров 3-триметиламмоний-2-ацетоксибицикло(2,2,2)октанов выдвинуто предположение, что продуктивными могут быть изомеры, у которых двугранный угол $O-C-C-N^+$ изменяется от 95 до 145° [13].

Таким образом, по вопросу о геометрии продуктивной конформации субстратов ацетилхолинэстеразы нет единого мнения. Следует отметить, что авторы всех перечисленных работ, за исключением Пюльмана и Кори [6], представление о продуктивной конформации связывают только с геометрией фрагмента $O-C-C-N^+$.

Конформационные расчеты молекулы ацетилхолина [14, 15] показали наличие семи относительно устойчивых конформаций, различающихся по энергии менее чем на 1 ккал/моль. При этом энергетический барьер перехода между любой парой конформаций превышает 3 ккал/моль. Поскольку эти конформации равновероятны, нельзя выделить какую-либо из них в качестве продуктивной.

Для определения продуктивной конформации в настоящей работе нами исследованы 23 эффектора ацетилхолинэстеразы. Структурные формулы эффекторов и литературные данные о скоростях их гидролиза [10–12, 16–18] приведены в табл. 1.

Метод расчета

Теоретический конформационный анализ осуществляли методом молекулярной механики с помощью универсальной конформационной программы [19]. Устойчивые конформации отыскивали путем минимизации энергии при варьировании торсионных и валентных углов при постоянных длинах связей. Конформационную энергию представляли как сумму невалентных и торсионных взаимодействий, энергии деформации валентных углов и энергии замыкания циклов. Электростатические взаимодействия не учитывали, поскольку они весьма слабо влияют на конформационные возможности ацетилхолина [20]. Длины связей и параметры потенциальных функций взяты из работы [21].

Молекула ацетилхолина содержит три связи ($C(O)-O$, $O-C^\beta$, $C^\beta-C^\alpha$), при вращении вокруг которых существенно изменяется взаиморасположение функциональных групп. При поиске устойчивых конформаций в качестве начального приближения использовалась *транс*-конформация фрагмента $CH_3-C(O)-O-C$, поскольку она энергетически выгоднее *цис*-формы [6, 14, 15]. Для обозначения конформаций молекул использовали два символа, первый из которых отражает геометрию фрагмента $C(O)-O-C-C$, а второй — фрагмента $O-C-C-N^+$. Символы *t*, *g*, *g*⁻ обозначают соответственно *транс*-, *гош*⁺- и *гош*⁻-конформации этих фрагментов.

Результаты и обсуждение

В табл. 2 приведены значения энергии относительно устойчивых конформеров ацетилхолина и его α - и β -метилзамещенных аналогов. У аналогов ацетилхолина имеет место дифференциация энергии устойчивых конформаций. Однако минимумы энергии имеют почти такие же координаты, как у ацетилхолина.

Для поиска возможных корреляций между конформационными свойствами и скоростью гидролиза субстратов были рассчитаны заселенности

Энергия устойчивых конформаций метилзамещенных аналогов ацетилхолина

| Соединение | Энергия, ккал/моль | | | | | | |
|------------|--------------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|--------------|
| | Конформация * | | | | | | |
| | <i>tt</i> | <i>tg</i> | <i>tg-</i> | <i>gt</i> | <i>g-t</i> | <i>gg</i> | <i>-g-g-</i> |
| (I) | 0,2 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,0 |
| (II) | 0,2 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 1,2 | 0,8 | 0,3 |
| (III) | 0,2 | 0,4 | 0,0 | 1,2 | 0,0 | 0,3 | 0,8 |
| (IV) | 2,1 | 2,0 | 0,0 | 0,6 | 2,9 | 1,3 | 1,0 |
| (V) | 1,5 | 0,0 | 2,1 | 2,3 | 0,6 | 1,0 | 1,6 |
| (VI) | 0,7 | 0,9 | 0,1 | 0,0 | 4,1 | 0,9 | 0,9 |
| (VII) | 0,7 | 0,1 | 0,9 | 4,1 | 0,0 | 1,0 | 0,9 |
| (VIII) | 3,6 | 3,3 | 0,0 | 1,7 | 4,0 | 2,4 | 3,4 |
| (IX) | 3,5 | 0,0 | 3,3 | 4,1 | 1,7 | 3,4 | 2,4 |

* Конформация соединения определена двумя двугранными углами C(O)—O—C—C и O—C—C—N. Символы *t*, *g* и *g-* обозначают *транс*-, *гош+*- и *гош-*-конформации соответственно.

устойчивых конформаций:

$$P_i = \frac{\exp\left(-\frac{\Delta E_i}{RT}\right)}{\sum_j^N \exp\left(-\frac{\Delta E_j}{RT}\right)} \cdot 100,$$

где N — число устойчивых конформаций соединения, ΔE_i — энергия i -го конформера, ΔE_j — энергия j -го конформера, R — универсальная газовая постоянная, T — температура, принятая равной 310 К.

Обращает на себя внимание наличие четкой корреляции между заселенностью *tt*-конформации у соединений (I) — (IX) и скоростью их гидролиза (коэффициент корреляции равен 0,79) (табл. 3). Для *gg*-конформации соответствующий коэффициент равен 0,75. Для остальных конформаций четкая корреляция между их заселенностью и скоростью гидролиза отсутствует (коэффициенты корреляции находятся в диапазоне от -0,32 до 0,57). Это позволяет выделить *tt*- и *gg*-конформации как кандидаты в продуктивные.

Конформации *tt* и *gg* существенно отличаются друг от друга (рис. 1). У ацетилхолина расстояние между карбонильным кислородом и азотом ($r_{O,N}$) в *tt*-конформации равно 5,1 Å, а в *gg*-конформации — 4,2 Å. Расстояния между карбонильным углеродом и азотом ($r_{C,N}$) в *tt*- и *gg*-конформациях равны соответственно 4,9 и 3,9 Å. Трудно предположить, что обе эти конформации комплементарны каталитической поверхности фермента.

Чтобы выяснить, какая из конформаций продуктивна, был проведен анализ конформационно-функциональных отношений 12 аналогов ацетилхолина с жесткими циклическими фрагментами, препятствующими вращению вокруг связи C^β—C^α (соединения (X) — (XXI)). Результаты расчета устойчивых конформаций этих соединений приведены в табл. 4.

Прежде всего следует отметить, что у рассмотренных циклических аналогов ацетилхолина, за исключением соединений (XVIII) и (XIX), фрагмент O—C—C—N⁺ не может принимать заторможенные *t*-, *g*- или *g-*-конформации. У циклопропильного, циклобутильного и хинуклидинового аналога ацетилхолина этот фрагмент оказывается в заслоненной конформации. У диаксимальных производных декалина (соединения (XVI) и (XVII)) вследствие существенного внутримолекулярного напряжения торсионный угол O—C—C—N⁺ принимает значения, промежуточные между заслоненной и заторможенной конформациями. Примечательно, что рассчитанные значения угла O—C—C—N⁺ хорошо согласуются с данными

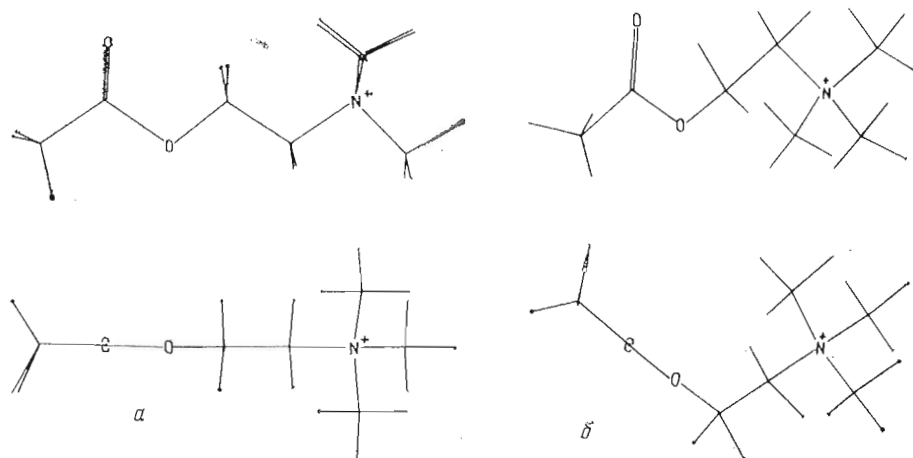


Рис. 1. Проекция ацетилхолина на взаимно перпендикулярные плоскости: *a* — полностью вытянутая *tt*-конформация, *b* — свернутая *gg*-конформация

рентгеноструктурного анализа [11, 12]. Так, по данным работы [12], угол $\tau_2(\text{O}-\text{C}-\text{C}-\overset{+}{\text{N}})$ у соединения (X) равен 137° . Согласно нашим расчетам, при *t*-, *g*⁻- и *g*-конформациях фрагмента $\text{C}(\text{O})-\text{O}-\text{C}-\text{C}$ угол τ_2 равен 135 , 141 и 126° соответственно. Для соединения (XVIII) по данным, приведенным в работе [11], $\tau_2=147^\circ$. Наши расчеты показали, что τ_2 может принимать значения 138 , 147 и 114° . Таким образом, устойчивые конформации «гибких» соединений (I)–(IX) и «жесткие» соединения (X)–(XXI) нельзя сравнивать друг с другом по значениям торсионных углов. По этой причине для сравнения мы использовали уже упоминавшиеся расстояния между функционально значимыми атомами $r_{\text{C}, \text{N}}$ и $r_{\text{O}, \text{N}}$ (табл. 4).

Из табл. 4 видно, что у всех субстратов ацетилхолинэстеразы (соединения (X), (XI), (XIV), (XV), (XVII), (XX) и (XXI)) имеются низкоэнергетические конформеры, которые по расстоянию $r_{\text{O}, \text{N}}$ отличаются от *tt*-конформера ацетилхолина не более чем на $0,1 \text{ \AA}$, а по расстоянию $r_{\text{C}, \text{N}}$ — не более чем на $0,2 \text{ \AA}$. При этом у большинства перечисленных соединений с *tt*-конформацией ацетилхолина совместимы наиболее энергетически выгодные конформации. У части субстратов имеются также кон-

Таблица 3

Заселенность устойчивых конформаций метилзамещенных аналогов ацетилхолина и коэффициенты корреляции между заселенностью каждой устойчивой конформации и скоростью гидролиза субстрата

| Соединение | $v_{\text{отн}}$, % | Заселенность, % | | | | | | |
|------------------------|----------------------|-----------------|-----------|------------------------|-----------|---------------------|-----------|----------------------------------|
| | | Конформация * | | | | | | |
| | | <i>tt</i> | <i>tg</i> | <i>tg</i> ⁻ | <i>gt</i> | <i>g</i> - <i>t</i> | <i>gg</i> | <i>g</i> - <i>g</i> ⁻ |
| (I) | 100 | 13,0 | 14,0 | 14,0 | 13,0 | 13,0 | 17,0 | 17,0 |
| (II) | 84 | 16,0 | 22,0 | 12,0 | 23,0 | 3,0 | 6,0 | 15,0 |
| (III) | 110 | 16,0 | 12,0 | 23,0 | 3,0 | 24,0 | 14,0 | 6,0 |
| (IV) | 0 | 1,0 | 2,0 | 55,0 | 20,0 | 0,5 | 6,0 | 11,0 |
| (V) | 32 | 5,0 | 52,0 | 2,0 | 1,0 | 20,0 | 10,0 | 4,0 |
| (VI) | 7 | 11,0 | 8,0 | 30,0 | 34,0 | 0,0 | 8,0 | 8,0 |
| (VII) | 6 | 10,0 | 30,0 | 8,0 | 0,0 | 35,0 | 8,0 | 8,0 |
| (VIII) | 1,3 | 0,3 | 0,4 | 90,0 | 5,0 | 0,0 | 2,0 | 0,4 |
| (IX) | 1,4 | 0,3 | 90,0 | 0,5 | 0,0 | 6,0 | 0,4 | 2,0 |
| Коэффициент корреляции | | 0,79 | -0,19 | -0,32 | 0,02 | 0,26 | 0,76 | 0,57 |

* Обозначения см. табл. 2.

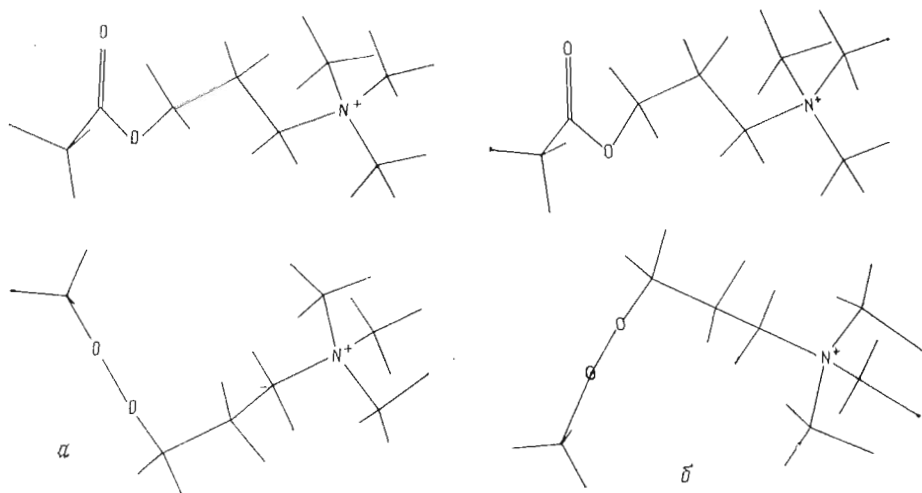


Рис. 2. Проекция на взаимно перпендикулярные плоскости конформаций соединения (XXII), совместимых с *tt*-конформацией ацетилхолина: а — *ggt*-конформация, б — *g⁻g⁻t*-конформация

формации, которые по взаимному расположению функциональных групп подобны *gg*-конформации ацетилхолина. Однако степень сходства в этих случаях невысока: по расстоянию $r_{O, N}$ конформации соединений (XIV) и (XXI) различаются на 0,6 Å, а по расстоянию $r_{C, N}$ конформации соединений (XI) и (X) также различаются на 0,6 Å. Наиболее примечателен тот факт, что у соединений (XII) и (XIII), (XVIII) и (XIX), не являющихся субстратами ацетилхолинэстеразы, нет конформеров, совместимых с *tt*-конформацией ацетилхолина, хотя имеются конформеры, подобные *gg*-конформации ацетилхолина. Наконец, у соединения (XVII), относительная скорость гидролиза которого составляет 36%, имеется конформация, совместимая с *tt*-, но не с *gg*-конформацией ацетилхолина. Эти факты позволяют сделать вывод, что продуктивной по отношению к ацетилхолинэстеразе является *tt*-конформация ацетилхолина и его гибких аналогов.

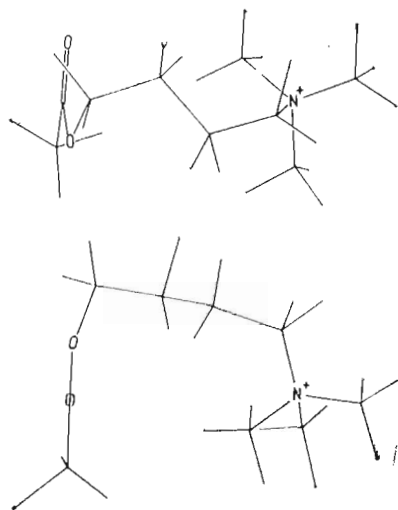


Рис. 3. Проекция на взаимно перпендикулярные плоскости *g⁻g⁻tg⁻*-конформации соединения (XXIII), совместимой с *tt*-конформацией ацетилхолина

У циклических аналогов ацетилхолина продуктивны совместимые с *tt*-конформацией ацетилхолина конформации, у которых значение торсионного угла $O-C-C-N^+$ варьирует в пределах $120-240^\circ$, а торсионного угла $C(O)-O-C-C$ — в пределах $156-202^\circ$ (табл. 4).

Субстратами ацетилхолинэстеразы являются соединения (XXII) и (XXIII) с тремя и четырьмя метиленовыми группами между эфирным кислородом и катионной группировкой. Относительные скорости ферментативного гидролиза этих соединений равны соответственно 70 и 10% (табл. 1). Расчет всех устойчивых конформаций соединения (XXII) (табл. 5) показал, что по взаиморасположению функционально значимых атомов *tt*-конформации ацетилхолина подобны конформациям *ggt*, *tgg*, *tgg⁻*, *tg⁻g*, *g⁻g⁻t*, суммарная заселенность которых равна 35,3%. Расстояние $r_{C, N}$

у этих конформеров варьирует в пределах 4,6–4,8 Å, а расстояние $r_{O, N}$ — в пределах 5,0–5,3 Å. На рис. 2 приведены изображения *ggt*- и *g⁻g⁻t*-кон-

Конформационная энергия и геометрические характеристики устойчивых конформаций * ацетилхолина и его циклических аналогов

| Соединение | $r_{\text{отп}}, \%$ | Конформация фрагмента C—O—C—C—N ⁺ | $E_p,$ ккал/моль | τ_1 | τ_2 | $r_{\text{C, N}}$ | $r_{\text{O, N}}$ |
|------------|----------------------|---|---------------------|----------|----------|-------------------|-------------------|
| | | | | град | | Å | |
| (I) | 100 | <i>tt</i> | 0,2 | 180 | 180 | 4,9 | 5,1 |
| | | <i>gg</i> | 0,0 | 60 | 60 | 3,9 | 4,2 |
| (X) | 96 | <i>g⁻a</i> | 0,0 | -76 | 141 | 4,1 | 3,7 |
| | | <i>ta</i> | 0,8 | 156 | 135 | 4,9 | 5,2 |
| (XI) | 56 | <i>ga</i> | 4,7 | 58 | 126 | 4,5 | 3,7 |
| | | <i>ga⁻</i> | 0,0 | 77 | -140 | 4,1 | 3,7 |
| | | <i>ta⁻</i> | 0,7 | -157 | -135 | 4,9 | 5,2 |
| (XII) | 0 | <i>g⁻a⁻</i> | 4,6 | -58 | -125 | 4,4 | 4,3 |
| | | <i>gc</i> | 0,0 | 85 | 1,6 | 3,7 | 3,8 |
| | | <i>tc</i> | 0,4 | -152 | -1,5 | 4,4 | 5,0 |
| (XIII) | 0 | <i>g⁻c</i> | 0,0 | -84 | -1,6 | 3,7 | 3,8 |
| (XIV) | | <i>tc</i> | 0,4 | 152 | 1,5 | 4,4 | 5,0 |
| | | <i>ta</i> | 0,0 | 176 | 117 | 4,7 | 5,1 |
| (XV) | 46 | <i>g⁻a</i> | 0,9 | -74 | 136 | 4,0 | 3,6 |
| | | <i>ga</i> | 2,1 | 58 | 109 | 4,3 | 4,3 |
| | | <i>ta⁻</i> | 0,0 | 183 | -116 | 4,7 | 5,1 |
| | | <i>ga⁻</i> | 1,0 | 73 | -136 | 4,0 | 3,7 |
| (XVI) | 0 | <i>g⁻a⁻</i> | 2,0 | -58 | -109 | 4,3 | 4,3 |
| | | <i>ga⁻</i> | 0,0 | 78 | -148 | 4,1 | 3,7 |
| | | <i>ta⁻</i> | 1,5 | 163 | -147 | 4,8 | 5,0 |
| (XVII) | 36 | <i>g⁻a⁻</i> | 6,5 | -62 | -113 | 4,4 | 4,5 |
| | | <i>g⁻a</i> | 0,0 | -78 | 148 | 4,1 | 3,7 |
| | | <i>ta</i> | 1,5 | -163 | 147 | 4,8 | 5,0 |
| (XVIII) | 0 | <i>ga</i> | 6,5 | 62 | 114 | 4,4 | 4,5 |
| | | <i>tg⁻</i> | 0,0 | 152 | -55 | 4,1 | 4,7 |
| (XIX) | 0 | <i>g⁻g⁻</i> | 1,2 | -68 | -48 | 3,7 | 3,7 |
| | | <i>tg</i> | 0,0 | -152 | 55 | 4,1 | 4,7 |
| (XX) | 0,8 | <i>gg</i> | 1,2 | 68 | 48 | 3,7 | 3,7 |
| | | <i>ta</i> | 0,0 | 168 | 121 | 4,7 | 5,1 |
| (XXI) | 105 | <i>ga</i> | 0,0 | 69 | 122 | 4,4 | 4,4 |
| | | <i>g⁻a</i> | 4,1 | -53 | 139 | 4,0 | 3,5 |
| | | <i>ta⁻</i> | 0,0 | -168 | -121 | 4,7 | 5,1 |
| | | <i>g⁻a⁻</i> | 0,0 | -69 | -122 | 4,4 | 4,4 |
| | | <i>ga⁻</i> | 4,1 | 53 | -139 | 4,0 | 3,5 |

* τ_1 и τ_2 — торсионные углы C(O)—O—C—C и O—C—C—N⁺. Символы *t, g, g⁻, c, a, a⁻* обозначают *транс-, гош⁺-, гош⁻-, цис-, анти*клинальные (+120°) и (-120°) соответственно.

Таблица 5

Энергия (E , ккал/моль), заселенность (P , %) и межатомные расстояния (r , Å) устойчивых конформаций соединения (XXII)

| Двугранный угол | Конформация | Параметр | τ (O—C γ —C β —C α) и τ (C γ —C β —C α —N ⁺) | | | | | | | | |
|--|----------------------|------------------|---|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------------------|------------|------------|------------------------|
| | | | <i>gg</i> | <i>gt</i> | <i>gg⁻</i> | <i>tg</i> | <i>tt</i> | <i>tg⁻</i> | <i>g-g</i> | <i>g-t</i> | <i>g-g⁻</i> |
| τ (C(O)—O—C γ —C β) | <i>g</i> | E | 1,1 | 0,0 | 2,0 | 2,0 | 0,5 | 1,7 | 1,8 | 0,6 | нк |
| | | P | 2,3 | 13,8 | 0,6 | 0,6 | 6,3 | 0,9 | 0,8 | 5,3 | 0 |
| | | $r_{\text{C,N}}$ | 4,5 | 4,8 | 4,4 | 5,1 | 5,5 | 5,6 | 4,0 | 4,6 | — |
| | <i>t</i> | $r_{\text{O,N}}$ | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 4,7 | 5,1 | 5,5 | 4,3 | 4,4 | — |
| | | E | 0,9 | 0,1 | 1,8 | 1,9 | 0,4 | 2,0 | 1,8 | 0,1 | 1,0 |
| | | P | 3,2 | 11,7 | 0,7 | 0,6 | 7,5 | 0,6 | 0,8 | 11,7 | 3,0 |
| | <i>g⁻</i> | $r_{\text{C,N}}$ | 4,6 | 5,7 | 4,6 | 5,6 | 6,2 | 5,7 | 4,6 | 5,7 | 4,6 |
| | | $r_{\text{O,N}}$ | 5,2 | 6,4 | 5,3 | 5,5 | 6,5 | 5,5 | 5,3 | 6,4 | 5,2 |
| | | E | нк | 0,6 | 1,8 | 2,1 | 0,5 | 1,1 | 1,9 | 0,0 | 1,1 |
| | | P | 0 | 5,3 | 0,8 | 0,5 | 6,3 | 2,4 | 0,6 | 13,8 | 2,3 |
| | | $r_{\text{C,N}}$ | — | 4,6 | 4,0 | 5,4 | 5,5 | 4,9 | 4,4 | 4,8 | 4,4 |
| | | $r_{\text{O,N}}$ | — | 4,4 | 4,3 | 5,2 | 5,1 | 4,3 | 5,0 | 5,0 | 5,0 |

Примечание: нк — неустойчивая конформация.

Энергия (ккал/моль) устойчивых конформаций соединения (XXIII)

| Двугран- ный угол | Конфор- мация | $\tau(C^{\delta}-C^{\gamma}-C^{\beta}-C^{\alpha})$ и $\tau(C^{\gamma}-C^{\beta}-C^{\alpha}-N^{\dagger})$ | | | | | | | | |
|---|-----------------------------------|--|-----------|-----------------------|-----------|-----------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| | | <i>gg</i> | <i>gt</i> | <i>gg⁻</i> | <i>tg</i> | <i>tt</i> | <i>tg⁻</i> | <i>g⁻g</i> | <i>g⁻t</i> | <i>g⁻g⁻</i> |
| $\tau(C(O)-O-C^{\delta}-C^{\gamma})$ $\tau(O-C^{\delta}-C^{\gamma}-C^{\beta})$ | <i>gg</i> | 1,8 | 0,3 | нк | 2,1 | 0,6 | 1,8 | нк | 0,1 | 0,6 |
| | <i>gt</i> | 1,6 | 0,9 | нк | 2,7 | 1,1 | 1,9 | нк | 1,1 | 2,4 |
| | <i>gg⁻</i> | нк | 0,3 | нк | 3,2 | 1,0 | 2,1 | нк | 0,0 | 2,7 |
| | <i>tg</i> | 1,6 | 0,3 | нк | 2,3 | 0,6 | 1,8 | нк | 0,4 | 1,4 |
| | <i>tt</i> | 2,0 | 0,8 | нк | 2,6 | 0,9 | 2,0 | нк | 0,8 | 2,1 |
| | <i>tg⁻</i> | 1,4 | 0,4 | нк | 2,4 | 0,6 | 1,6 | нк | 0,3 | 1,6 |
| | <i>g⁻g</i> | 2,6 | 0,0 | нк | 2,8 | 1,0 | 2,3 | нк | 0,3 | 2,1 |
| | <i>g⁻t</i> | 2,3 | 1,1 | нк | 2,6 | 1,1 | 2,2 | нк | 0,9 | 1,6 |
| | <i>g⁻g⁻</i> | 0,6 | 0,1 | нк | 2,4 | 0,6 | 0,9 | нк | 0,3 | 1,7 |

Примечание: нк — неустойчивая конформация.

формаций субстрата (XXII). С *gg*-конформацией ацетилхолина совместимы лишь *gg⁻g⁻* и *g⁻gg⁻*-конформации соединения (XXII), суммарная заселенность которых равна 1,6%. У соединения (XXIII) *tt*-конформации ацетилхолина подобны *ggtg*, *ggg⁻t*, *gg⁻tt*, *gg⁻tg⁻*, *g⁻ggt*, *g⁻gg⁻g⁻*, *g⁻g⁻gt*, *g⁻g⁻tg⁻*-конформации, у которых расстояния $r_{c, N}$ варьируют в пределах 4,6–5,4 Å, а расстояния $r_{o, N}$ — в пределах 4,9–5,5 Å. Суммарная заселенность этих популяций равна 15,6% (табл. 6). На рис. 3 показаны проекции на взаимно перпендикулярные плоскости *g⁻g⁻tg⁻*-конформации соединения (XXIII). Что же касается *gg*-конформации ацетилхолина, то с ней совместимы лишь *ggg⁻g⁻*- и *g⁻g⁻gg*-конформации соединения (XXIII) ($r_{c, N}=4,2$ Å, $r_{o, N}=4,6$ Å), суммарная заселенность которых составляет 5,6%. Таким образом, результаты расчета соединений (XXII) и (XXIII) подтверждают вывод о продуктивности *tt*-конформации ацетилхолина.

Расстояния между функционально значимыми атомами являются существенными, но не единственными характеристиками молекулы субстрата, влияющими на скорость его гидролиза. Как видно из табл. 4, у энантиомеров расстояния между функционально важными атомами одинаковы (рис. 4), однако скорости ферментативного гидролиза существенно различаются. Примечательно, что при увеличении объема заместителей у атомов C^{β} и C^{α} разница в скоростях ферментативного гидролиза энантиомеров возрастает. Так, (*S,S*)-изомер ацетоксициклопропилтриметиламмония (соединение (X)) гидролизуеться в 2 раза быстрее, чем (*R,R*)-изомер (соединение (XI)). (*S*)-Изомер хинуклидинового производного ацетилхолина (соединение (XX)) гидролизуеться в 140 раз быстрее (*R*)-изомера (соединение (XXI)). У производных декалина с диаксиальным расположением заместителя ацетилхолинэстеразой гидролизуеться только (*S,S*)-изомер (соединение (XVII)). Во всех приведенных примерах наиболее активными субстратами являются изомеры, у которых хиральные атомы C^{β} и C^{α} имеют (*S*)-конфигурацию. Это свидетельствует о том, что в активном центре ацетилхолинэстеразы имеется область существенного объема. Локализована эта область со стороны (*R*)-энантиотопных атомов водорода α - и β -метиленовых групп продуктивно связанного *tt*-конформера ацетилхолина. Именно эта область препятствует связыванию (*R*)-изомеров производных ацетилхолина с объемными заместителями в α - и β -положениях.

Что касается (*S*)-изомеров, то для них не наблюдается корреляции между объемом заместителей и скоростью гидролиза. Так, скорости гидролиза субстратов (III), (X) и (XX) практически равны скорости гидролиза ацетилхолина. С высокой скоростью (36%) гидролизуеться (*S,S*)-изомер декалинового производного ацетилхолина (соединение (XVII)). Это говорит о том, что со стороны (*S*)-энантиотопных атомов водорода

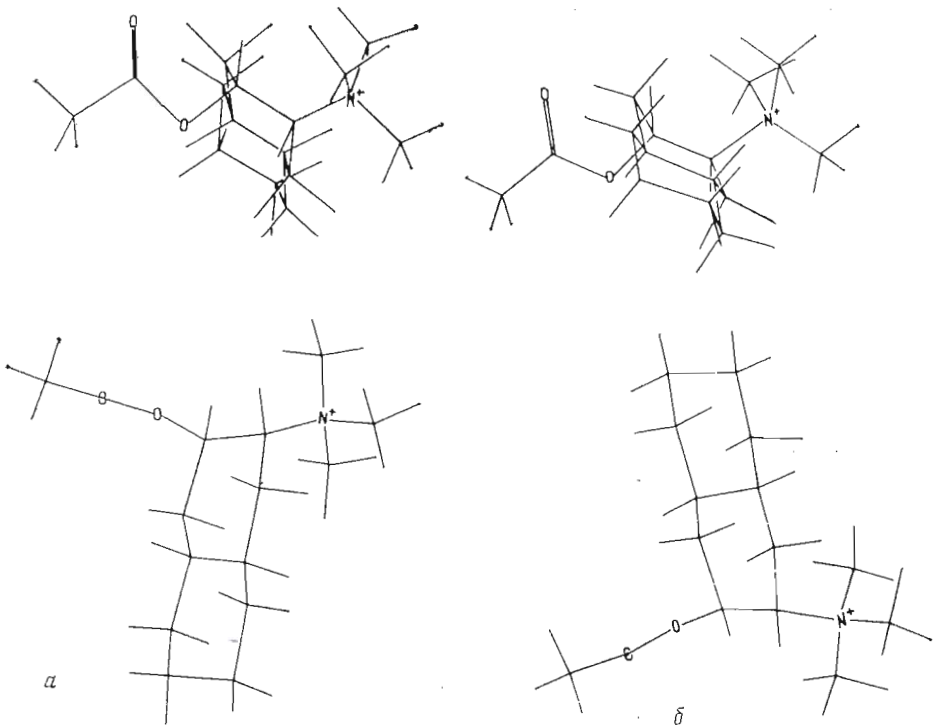


Рис. 4. Проекция на взаимно перпендикулярные плоскости конформаций соединений (XVI) и (XVII), совместимых по расположению аммониевой группировки, карбонильного углерода и карбонильного кислорода с *tt*-конформацией ацетилхолина: а - *ta*-конформация соединения (XVI) ($\tau_1=163$, $\tau_2=-147^\circ$), б - *ta*-конформация соединения (XVII) ($\tau_1=-163$, $\tau_2=147^\circ$)

α - и β -метиленовых групп продуктивно связанного *tt*-конформера ацетилхолина имеется область исключенного объема фермента. Именно со стороны этой области возможен подход молекулы субстрата к активному центру фермента.

Таким образом, конформационно-функциональный анализ аналогов ацетилхолина позволил установить, что продуктивна *tt*-конформация ацетилхолина. В свете этих данных можно объяснить особенности структурно-функциональных отношений субстратов ацетилхолинэстеразы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Brestkin A. P., Rozengart E. V. // Nature. 1965. V. 205. P. 388-389.
2. Schumacher M., Camp S., Maulet Y., Newton M., MacPhee-Quigley K., Taylor S. S., Friedmann T., Taylor P. // Nature. 1986. V. 319. P. 407-409.
3. Canepa F. G., Pauling P., Sörum H. // Nature. 1966. V. 210. P. 907-909.
4. Herdklotz J. K., Sass R. L. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1970. V. 40. P. 583-588.
5. Partington P., Feeney J., Burgen A. S. V. // Mol. Pharmacol. 1972. V. 8. P. 269-277.
6. Pullman B., Courriere P. // Mol. Pharmacol. 1972. V. 8. P. 612-622.
7. Shefter E., Mauther H. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1969. V. 63. P. 1253-1260.
8. Shefter E., Smissman E. E. // J. Pharm. Sci. 1971. V. 60. P. 1364-1366.
9. Smissman E. E. // J. Med. Chem. 1966. V. 9. P. 458-465.
10. Stephen J., Smissman E. E. // J. Med. Chem. 1972. V. 15. P. 241-243.
11. Showen K., Smissman E. E., Stephen W. F. // J. Med. Chem. 1975. V. 18. P. 292-300.
12. Choïou C. J., Long J. P., Cannon J. G., Armstrong P. D. // Pharm. Exptl Ther. 1969. V. 166. P. 243-246.
13. Nelson W. L., Wilson R. S. // J. Med. Chem. 1971. № 14. P. 169-173.
14. Gelin B. R., Karplus M. // J. Amer. Chem. Soc. 1975. V. 96. № 24. P. 6996-7006.
15. Бровцына Н. Б., Кудряшова Н. И., Хромов-Борисов Н. В., Жоров В. С., Говырин В. А. // Фармакология нейротропных средств/Ред. Бендер К. И. Саратов, 1982. В. 2. Т. 55(122). С. 86-94.
16. Бресткин А. П., Розенгарт Е. В., Абдувахабов А. А., Садыков А. А. // Успехи химии. 1983. Т. LII. № 10. С. 1624-1647.
17. Robinson J. B. // Can. J. Pharm. Sci. 1976. V. 11. № 4. P. 112-113.

18. Weinstein H., Maayani S., Srebrenik S., Cohen S., Sokolovsky M. // Mol. Pharm. 1975. V. 11. № 6. P. 671-689.
19. Жоров Б. С. // Автометрия. 1975. № 1. С. 23-29.
20. Foimowitz M., Gans P. J. // J. Amer. Chem. Soc. 1972. V. 9. № 23. P. 8020-8025.
21. Жоров Б. С., Розенгарт Е. В., Говырин В. А. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 231. № 1. С. 215-218.

Поступила в редакцию
26.VII.1988

**DETERMINATION OF PRODUCTIVE CONFORMATIONS
OF ACETYLCHOLINESTERASE SUBSTRATE WITH THE USE
OF MOLECULAR MECHANICS METHOD**

SHESTAKOVA N. N., ROZENGART E. V., KHOVANSKIKH A. E., ZHOROV B. S.*,
GOVYRIN V. A.*

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry;
** I. P. Pavlov Institute of Physiology,*

Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

All equilibrium conformations of twenty-three acetylcholinesterase effectors were calculated by the molecular mechanics method, nonbonded interactions, torsion energy and energy of bond angles deformation being taken into account. In a series of conformationally flexible derivatives of acetylcholine the correlation was found between hydrolysis rate and population of the completely extended *tt*-conformation. In a series of cyclic analogues of acetylcholine the high hydrolysis rate occurs only for substrates sterically corresponding to *tt*-conformation of acetylcholine with regard to disposition of ammonium group, carbonyl oxygen and carbonyl carbon. The hydrolysis rate of acetylcholine derivatives with elongated chain between acetyl and cationic groups is directly proportional to the population of the conformations similar to *tt*-conformation of acetylcholine. It is concluded that *tt*-conformation of acetylcholine is productive for acetylcholinesterase hydrolysis.