



УДК 577.338:577.123.36

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ С АНАЛОГАМИ АДЕНОЗИНА. I. АЗА-, ДЕЗАЗА- И ИЗОМЕРНЫЕ АЗА-ДЕЗАЗААНАЛОГИ АДЕНОЗИНА

© 2005 г. И. А. Ильичева[#], Ю. П. Зарубин^{**}, П. А. Костин^{*}, Д. В. Миргородский^{**},
П. П. Пурыгин^{**}, В. Л. Флорентьев^{*}

^{*}Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991, Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, 32;

^{**}Самарский государственный университет, кафедра органической химии, Самара

Поступила в редакцию 06.12.2004 г. Принята к печати 31.03.2005 г.

Построены конформационные модели активного центра аденозиндезаминазы (ADA) и ее комплексов в основном состоянии с аденозином и 13 изостерными аналогами из ряда аза-, дезаза- и аза-дезазапроизводных. Оптимизацию конформационной энергии активного центра и связанного с ним в комплекс нуклеозида производили в поле всего фермента (была использована структура 1ADD) в молекулярно-механической модели с потенциалами AMBER 99. Определены устойчивые конформационные состояния каждого из комплексов, а также оптимальная конформация активного центра ADA в отсутствие лиганда. Оказалось, что конформационное состояние, близкое к известной из рентгеновских данных структуре комплекса ADA с 1-дезазааденозином (1ADD), отвечает одному из локальных минимумов потенциальной поверхности. Определен также другой, существенно более глубокий минимум, отличающийся от первого взаимной ориентацией боковых цепей аминокислотных остатков. Аналогичное ему конформационное состояние является оптимальным для активного центра ADA в отсутствие связанного лиганда. Выявляется качественная корреляция между величинами потенциальных энергий комплексов в этой конформации и ферментативной активностью ADA в отношении соответствующих нуклеозидов. Обсуждается динамика конформационных превращений активного центра после связывания субстрата или его аналогов, а также возможность оценки ингибиторных свойств нуклеозидов на основе расчетных данных.

Ключевые слова: аденозиндезаминаза, механизм субстратной специфичности, аденозин, аналоги аза-, дезаза-, аза-дезаза, теоретическое исследование.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых лекарственных средств, устойчивых к действию различных ферментов, в частности ферментов катаболизма пуринов и пиримидинов, является одной из актуальных проблем современной медицинской химии и фармакологии [1–3]. Особое место среди таких ферментов занимает аденозиндезаминаза (ADA, КФ 3.5.4.4), осуществляющая превращение (2'-дезокс)аденозина в (2'-дезокс)инозин путем гидролитического замещения 6-NH₂-группы на OH. В результате различные аналоги аденозина, в том числе и фармакологически активные, превращаются в неактивные или малоактивные аналоги инозина [4]. В регуляции иммунитета у млекопитающих ADA играет также исключительно важную роль [5, 6].

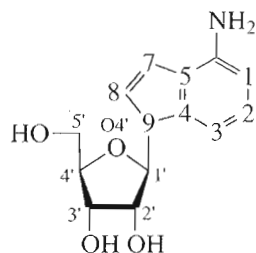
Установление структурных факторов, определяющих субстратные свойства аналогов аденозина в отношении ADA, имеет большое практичес-

кое значение для оценки лекарственного потенциала вновь синтезируемых аналогов, а также для поиска новых ингибиторов этого фермента.

Ранее нами были начаты исследования конформационных и электронных свойств серии изостерных аналогов аденозина [7–9]. Все производные этой серии содержат немодифицированный остаток β-D-рибофуранозы, связанный с гетероциклом пурина, в котором модифицированы те или иные позиции в цикле, при сохранении локализации его NH₂-группы в 6-м положении [10–38]. Обобщенная структурная формула молекулы аденозина и 28 его изостерных аналогов показана в табл. 1. Изменения геометрии гетероцикла в этих соединениях минимальны. Различия касаются электронного распределения, определяющего характер взаимодействий с функциональными группами остатков аминокислот в активном центре ADA. Они же, в основном, определяют и конформационные особенности каждого из аналогов.

Для большинства этих соединений в литературе описаны субстратные и ингибиторные свойства

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 135-65-91; эл. почта: imb_igina@rambler.ru).

Таблица 1. Расположение заместителей в остатке гетероцикла для аденозина (Ado) и его изостерных аналогов

№	Молекула	Заместители в соответствующих положениях остатка гетероцикла по пуриновой нумерации							
		1	2	3	4	5	7	8	9
	Ado	N:	CH	N:	C	C	N:	CH	N
1	z^2 Ado	N:	N:	N:	C	C	N:	CH	N
2	z^8 Ado	N:	CH	N:	C	C	N:	N:	N
3	c^1 Ado	CH	CH	N:	C	C	N:	CH	N
4	c^3 Ado	N:	CH	CH	C	C	N:	CH	N
5	c^7 Ado	N:	CH	N:	C	C	N:	CH	N
6	c^9 Ado	N:	CH	N:	C	C	NH	CH	C
7	z^2c^3 Ado	N:	N:	CH	C	C	N:	CH	N
8	z^5c^9 Ado ^{a)}	N:	CH	N:	C	N	N:	CH	C
9	z^8c^1 Ado	CH	CH	N:	C	C	N:	N:	N
10	z^8c^3 Ado ^{a)}	N:	CH	CH	C	C	N:	N:	N
11	z^8c^7 Ado	N:	CH	N:	C	C	CH	N:	N
12	$7H$ - z^8c^9 Ado	N:	CH	N:	C	C	NH	N:	C
13	$8H$ - z^8c^9 Ado	N:	CH	N:	C	C	N:	NH	C
14	$z^{2,8}$ Ado ^{a)}	N:	N:	N:	C	C	N:	N:	N
15	$c^{1,3}$ Ado	CH	CH	CH	C	C	N:	CH	N
16	$c^{1,7}$ Ado	CH	CH	N:	C	C	CH	CH	N
17	$c^{3,7}$ Ado ^{a)}	N:	CH	CH	C	C	CH	CH	N
18	$z^{2,8}c^3$ Ado	N:	N:	CH	C	C	N:	N:	N
19	$z^{2,8}c^7$ Ado	N:	N:	N:	C	C	CH	N:	N
20	$z^2c^{3,7}$ Ado ^{a)}	N:	N:	CH	C	C	CH	CH	N
21	$z^8c^{1,7}$ Ado	CH	CH	N:	C	C	CH	N:	N
22	$c^{1,3,7}$ Ado ^{a)}	CH	CH	CH	C	C	CH	CH	N
23	$z^4c^{3,9}$ Ado	N:	CH	CH	N	C	N:	CH	C
24	$z^4c^{7,9}$ Ado ^{a)}	N:	CH	N:	N	C	CH	CH	C
25	$z^{4,8}c^9$ Ado ^{a)}	N:	CH	N:	N	C	N:	N:	C
26	$z^{4,8}c^{1,9}$ Ado ^{a)}	CH	CH	N:	N	C	N:	N:	C
27	$z^{4,8}c^{3,9}$ Ado	N:	CH	CH	N	C	N:	N:	C
28	$z^{4,8}c^{1,3,9}$ Ado ^{a)}	CH	CH	CH	N	C	N:	N:	C

Обозначения: z^i – i -аза-, c^j – j -дезаза-, z^{ij} – i,j -диаза-, c^{ij} – i,j -дидезаза-, $c^{i,j,k}$ – i,j,k -тридезаза-; ^{a)} – для этих соединений субстратные свойства в отношении аденозиндезаминазы не исследовались.

ва в отношении АДА млекопитающих [10–26] (см. табл. 2). В группе имеются аналоги, подвергающиеся дезаминированию ферментом [10, 12, 14, 16–18, 25, 26], конкурентные ингибиторы фер-

мента [11, 13, 18–21, 26], нуклеозиды, не влияющие на кинетику дезаминирования аденозина [13, 15, 19, 20, 22–25] и нуклеозиды с неизученными субстратными свойствами [27–38]. Наличие экс-

Таблица 2. Кинетические параметры дезаминирования (K_m , V_{max}) и ингибирования (K_i) для Ado и его изоэстерных аналогов в отношении ADA

Соединение	K_m , мкМ	K_i , мкМ	V_{max} (отн.), %	Литература
Ado	67	–	–	[13]
	29	–	100	[10]
	25	–	100	[14]
	58	–	100	[15]
	33	–	100	[16]
	20	–	100	[17]
c ¹ Ado	–	2.0	–	[13]
	–	0.662	–	[19]
	–	0.66	–	[20]
c ³ Ado	–	0.18	–	[21]
	–	н/д	–	[13]
	–	359	–	[19]
	–	360	–	[20]
c ⁷ Ado	–	257	н/д	[21]
	–	–	–	[13, 15, 19, 20]
c ⁹ Ado	–	–	–	[22]
z ² Ado	670	н/и	102	[10]
z ⁸ Ado	130	н/и	310	[14]
	96	145	217	[18]
z ² c ³ Ado	н/д	н/д	н/д	[12]
z ⁸ c ¹ Ado	–	0.903	–	[11]
z ⁸ c ⁷ Ado	250	н/и	6.4	[16]
	125	н/и	6.4	[17]
z ⁸ c ⁹ Ado	1000	н/и	750–850	[14]

Примечания: “–” означает (в зависимости от позиции), что соединение либо не дезаминируется ферментом, либо не является его ингибитором; н/д – нет данных; н/и – не исследовалось.

периментальных данных позволяет подойти к анализу взаимосвязи между структурой и субстратными свойствами аналогов нуклеозидов в отношении ADA.

Конформационное поведение 13 аналогов аденозина (№ 1–13 табл. 1) ранее было нами изучено в свободном состоянии в *N*- и *S*-областях круга псевдотворщения [7–9]. Кроме того, для каждого из них было получено распределение электростатического потенциала в конформации, которая была названа нами “активной”, то есть наиболее близкой к конформации 1-дезаадеинозина в комплексе с ADA. Результаты расчетов позволили тогда высказать ряд предположений, касающихся акцептирования нуклеозидов активным центром ADA.

В этой работе для более полной характеристики нуклеозидов в свободном состоянии их потенциальные поверхности рассчитаны на всем прост-

ранстве независимых параметров (использован алгоритм Монте-Карло).

Основной целью работы является исследование структурного аспекта первой стадии ферментативного процесса – акцептирования нуклеозидов активным центром аденозиндезаминазы. Для каждого из 13 нуклеозидов, которые были объектом предыдущих исследований, получены структуры комплексов с активным центром аденозиндезаминазы в основном состоянии, отвечающие наиболее низкой потенциальной энергии. Построение стартовых моделей комплексов, предшествующее оптимизации потенциальной энергии, мы производили, используя данные рентгеноструктурного анализа. В банке PDB имеются структуры комплексов ADA мыши с аналогом основного состояния субстрата (1-дезаадеинозином) – 1ADD [39], и с двумя аналогами переходного состояния ((6*S*)-гидрокси-1,6-дигидропуририбонуклеозидом) – 2ADA [40], полученные при pH 4.2 с разрешением 2.4 Å. Позднее комплексы с аналогами переходного состояния (6*S*)-гидрокси-1,6-дигидропуририбонуклеозидом и с 2'-дезоксикоформидином были закристаллизованы при pH 7.0 и их структуры получены при разрешении 2.6 и 1.95 Å соответственно [41]. Относительно недавно появилась также структура комплекса ADA теленка с аналогом переходного состояния 6-гидрокси-1,6-дигидропуририбонуклеозидом при pH 7.5 с разрешением 2.5 Å – 1KRM [42]. Активный центр ADA во всех этих комплексах независимо от того, является связанный нуклеозид аналогом основного или переходного состояния субстрата, и независимо от величины pH и от источника фермента имеет похожую конформацию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее рациональным методом для определения конформационных минимумов на потенциальной поверхности активного центра фермента в комплексе с лигандом является проведение серий минимизаций из различных начальных точек. Сканирование потенциального пространства затруднено из-за большого количества слабо связанных переменных. Мы производили минимизацию потенциальной энергии конформеров активного центра в комплексе с каждым из лигандов в трех сериях расчетов (см. “Методическую часть”): а) в модели зарядового распределения, которую мы назовем “AM1, AM1” (по названию методов расчета зарядов на протонированных остатках аминокислот Asp296 и Glu217 и на нуклеозиде) из стартовой точки, отвечающей конформации рентгеновской структуры 1ADD [39]; б) в модели зарядового распределения “*ab initio*, AM1” (неэмпирический метод использован для получения зарядов на остатках аминокислот и гидроксид-анионе, находящихся в комплексе с ионом цинка, а также на про-

Таблица 3. Потенциальная энергия (ккал/моль) комплексов аденозиндезаминазы с нуклеозидами, полученная в трех сериях расчетов (пояснения в тексте)

Нуклеозид	Локальный минимум (AM1, AM1)		Локальный минимум (<i>ab initio</i> , AM1)		“Глобальный” минимум (<i>ab initio</i> , AM1)	
	$E_{\text{компл}}$	$E_{\text{акт. ц}}$	$E_{\text{компл}}$	$E_{\text{акт. ц}}$	$E_{\text{компл}}$	$E_{\text{акт. ц}}$
Ado	+26.0	+36.9	+8.1 (–624.6)	+38.0 (–68.1)	0.0 (–652.2)	+0.7 (–106.0)
c ¹ Ado	+36.0	+39.9	+13.7 (–619.0)	+38.3 (–67.8)	+5.4 (–646.8)	+0.9 (–105.8)
c ³ Ado	+36.3	+40.1	+19.6 (–613.1)	+40.2 (–65.9)	+11.0 (–641.2)	+1.8 (–104.9)
c ⁷ Ado	+50.8	+38.1	+35.6 (–597.1)	+38.2 (–67.9)	+21.6 (–630.6)	+2.8 (–103.9)
c ⁹ Ado	+51.9	+40.0	+8.2 (–624.5)	+19.9 (–86.2)	+17.5 (–634.7)	+0.3 (–106.4)
z ² Ado	0.0	+4.1	+10.9 (–621.8)	+37.7 (–68.4)	+2.7 (–649.5)	+0.3 (–106.4)
z ⁸ Ado	+29.7	+36.4	+12.7 (–620.0)	+37.7 (–68.4)	+4.4 (–647.8)	+0.7 (–106.0)
z ² c ³ Ado	+38.6	+35.2	+22.2 (–610.5)	+39.6 (–66.5)	+13.3 (–638.9)	+1.1 (–105.6)
z ⁸ c ¹ Ado	+34.9	+37.0	+17.8 (–614.9)	+38.1 (–68.0)	+9.4 (–642.8)	+0.8 (–105.9)
z ⁸ c ³ Ado	+35.6	+39.8	+19.8 (–612.9)	+40.0 (–66.1)	+12.3 (–639.9)	+1.7 (–105.0)
z ⁸ c ⁷ Ado	+35.5	+19.4	+24.4 (–608.3)	+29.8 (–76.3)	+18.8 (–633.4)	+2.3 (–104.4)
7H-z ⁸ c ⁹ Ado	+11.4	0.0	+29.8 (–602.9)	+34.3 (–71.8)	+14.6 (–637.6)	0.0 (–106.7)
8H-z ⁸ c ⁹ Ado	+11.4	+7.4	+18.7 (–614.0)	+37.7 (–68.4)	+8.8 (–643.4)	+1.6 (–105.1)
z ⁵ c ⁹ Ado	+21.2	+9.8	0.0 (–632.7)	0.0 (–106.1)	+19.5 (–632.7)	+0.6 (–106.1)

Результаты расчетов серии (AM1, AM1) показаны только относительными величинами энергий. Результаты расчетов обеих серий (*ab initio*, AM1) показаны как относительными, так и абсолютными (в скобках) величинами энергий.

тонируемых остатках аминокислот Asp296 и Glu217, а минимизация потенциальной энергии проведена из той же стартовой точки); в) в модели зарядового распределения “*ab initio*, AM1” из стартовой точки, принципиально отличающейся от первой, и выбранной на базе предыдущих расчетов.

Значения потенциальных энергий комплексов в локальных минимумах, полученные в этих трех сериях, приведены в табл. 3. Для каждой серии расчетов приведены значения полной потенциальной энергии комплексов ($E_{\text{компл}}$), включающей в себя взаимодействия всех атомов фермента и нуклеозида. Это потенциальная энергия конформации активного центра в комплексе с нуклеозидом в поле рентгеновской структуры. Приведены также фрагменты этой энергии ($E_{\text{акт. ц}}$), составляющие внутреннее напряжение активного центра в каждом из комплексов. Энергия взаимодействия подвижных атомов активного центра с остальной структурой фермента и с нуклеозидом в этих величинах не учтена. Для всех серий расчетов показаны относительные величины потенциальных энергий, получающиеся для каждого из комплексов после вычитания энергии комплекса с наиболее низким значением в соответствующей серии (их можно сравнивать только в пределах своего столбца). Результаты вычислений в модели “*ab initio*, AM1” представлены не только относительными, но и абсолютными (указаны в скобках)

значениями энергий. Они позволяют сравнивать конформеры одноименных комплексов.

Анализ результатов первой серии расчетов (“AM1, AM1”), проведенных без учета заряда на катионе Zn²⁺, показал, что существует по крайней мере два устойчивых варианта конформаций активного центра, различающиеся взаимной ориентацией протонодонорных и протоноакцепторных боковых радикалов аминокислотных остатков. Первый из них близок к конформации активного центра рентгеновской структуры. В этом локальном минимуме оказываются структуры комплексов ADA с Ado, c¹Ado, c³Ado, c⁷Ado, c⁹Ado, z⁸Ado, z²c³Ado, z⁸c¹Ado и z⁸c³Ado после оптимизации из стартовой точки IADD. Напряжение активного центра в таких структурах довольно велико – на 35–40 ккал/моль превосходит напряжение комплекса с 7H-z⁸c⁹Ado, которое оказывается наименьшим в расчетах по схеме “AM1, AM1”. Конформация этого комплекса отличается от предыдущего типа картиной водородных связей и ориентацией боковых радикалов и ее можно отнести к другому, новому типу устойчивой конформации активного центра. В аналогичной конформации оказываются ферментативные комплексы с z²Ado, z⁸c⁷Ado, 8H-z⁸c⁹Ado и z⁵c⁹Ado после оптимизации из стартовой точки IADD. Таким образом, потенциальная поверхность активного центра в комплексе с лигандами (аденозином или его изостерными аналогами) в поле остальных атомов фермента характеризуется, по

крайней мере, двумя различными вариантами устойчивых конформационных состояний. Первый вариант близок к рентгеновской структуре комплекса ADA с 1-дезаадеинозином. Второй вариант можно отнести к новому типу конформации активного центра.

Следует помнить, что в этой серии расчетов атомные заряды на остатках Glu217, Asp295 и Asp296 получены с помощью полуэмпирического метода AM1, поэтому заряды на карбоксильных и пептидных группах этих аминокислот, отличаются от величин, принятых в базе данных HyperChem, а заряд на катионе Zn^{2+} не учтен. Простота выбранной на этом этапе методики расчета зарядов позволяет получать только ориентировочные данные о характере потенциальной поверхности. Поэтому важно определить степень зависимости нового типа конформации активного центра от расчетной модели зарядового распределения.

Для этой цели мы провели новую серию расчетов "ab initio, AM1", в которой атомные заряды на протонированных остатках Glu217 и Asp296 и на фрагменте из остатков аминокислот и гидроксид-аниона, содержащихся в комплексе с ионом цинка, получены методом ab initio. В этом случае получающиеся заряды на карбоксильных и пептидных группах гораздо ближе к тем, которые используются в базе Amber99 Hyper Chem 7.1. Ближайший к стартовой точке локальный минимум всех комплексов, за исключением двух – с c^9Ado и z^5c^9Ado , сохраняет все особенности рентгеновской структуры. Мы расположили аналоги в ряд в порядке увеличения полных потенциальных энергий их комплексов с ADA в этом локальном минимуме: $Ado < z^2Ado < z^8Ado < c^1Ado < z^8c^1Ado < 8H-z^8c^9Ado < c^3Ado < z^8c^3Ado < z^2c^3Ado < z^8c^7Ado < 7H-z^8c^9Ado < c^7Ado$. Естественно, этот ряд не отражает относительных энергий связывания нуклеозидов, поскольку потенциальная энергия комплексов содержит в качестве одной из составляющих конформационную энергию нуклеозида в активном центре. Эта энергия отражает как структуру нуклеозидов, так и их электронную и конформационную комплементарность ферменту. Наиболее низкая потенциальная энергия в этом ряду отвечает комплексу с природным субстратом, а наиболее высокая (превышает комплекс с субстратом на 27.5 ккал/моль) у комплекса ADA с c^7Ado , который по экспериментальным данным (см. табл. 3) с ферментом не связывается. Потенциальная энергия комплексов с нуклеозидами, известными как ингибиторы (c^1Ado , z^8c^1Ado) или более слабые аналоги субстрата (z^2Ado , z^8Ado , $8H-z^8c^9Ado$ и c^3Ado), не превышает энергии комплекса с природным субстратом более чем на 11.5 ккал/моль. Потенциальная энергия комплекса нуклеозида z^8c^3Ado , субстратные свойства которого не исследованы, практически не отличается от энергии ферментативных комплексов слабого аналога и конкурентного ин-

гибитора c^3Ado . Правее в этом ряду находятся два нуклеозида – z^2c^3Ado и z^8c^7Ado , которые по экспериментальным данным (см. табл. 3) являются наиболее слабыми аналогами субстрата. Энергии их комплексов превышают энергию комплекса с субстратом на 14.1 и 16.3 ккал/моль соответственно. Предпоследним в этом ряду оказывается таутомер формицина $7H-z^8c^9Ado$. Скорее всего, формицин связывается ADA в форме таутомера $8H-z^8c^9Ado$. Такой вывод напрашивается из сопоставления результатов наших расчетов с результатами расчетов Боджак и соавт. [43]. По их данным, энергия связывания дезаминированного аналога этого соединения – ковалентного гидрата $7H$ -деаминоформицина с ADA весьма высока [43]. В свободном состоянии деаминоформицин находится именно в этой таутомерной форме. Однако образование деаминоформицином довольно прочных комплексов с ADA [44] можно объяснить связыванием его в форме ковалентного гидрата $8H$ -деаминоформицина, энергия связывания которого по данным расчетов в [43] значительно ниже.

Тем самым мы обнаруживаем, что величина полной потенциальной энергии в рассмотренной группе комплексов нуклеозидов с ADA изменяется симбатно активности фермента в отношении нуклеозидов. Симбатность величин потенциальных энергий комплексов ферментативной активности ADA в отношении соответствующих нуклеозидов носит чисто эмпирический характер и в определенной степени отражает их "структурную комплементарность" ферменту. Комплексы с двумя аналогами – c^9Ado и z^5c^9Ado – мы исключили из рассмотрения, поскольку конформации активного центра в них не сохраняют особенностей рентгеновской структуры. Первое из этих соединений не проявляет ни субстратных, ни ингибиторных свойств. Последнее экспериментально не изучено. Однако тот факт, что существует некая новая конформация активного центра ADA, потенциальная энергия комплексов нуклеозидов с которой значительно ниже, чем потенциальная энергия рентгеновской конформации, заслуживает дальнейшего исследования. Анализ этой новой конформации показал, что взаимная ориентация подвижных боковых радикалов (а с ней и картина водородных связей) похожа на конформеры второго типа из предыдущей серии расчетов. Это означает, что новая конформация не есть артефакт плохо согласованного расчета атомных зарядов в серии "AM1, AM1", но ее устойчивость на потенциальной поверхности отвечает балансу всех атомно-атомных взаимодействий в активном центре.

Мы использовали эту конформацию в качестве новой стартовой точки для оптимизации потенциальной энергии всех 13 комплексов в той же расчетной модели "ab initio, AM1". Результаты этой серии расчетов приведены в двух последних колонках табл. 3. Уже из величин фрагмента по-

тенциальных энергий ($E_{\text{акт.и}}$) видно, что процесс оптимизации не вызвал существенных конформационных перестроек в активном центре ни в одном из комплексов. Различия этой составляющей потенциальных энергий для всех комплексов составляют не более чем 2.5 ккал/моль (см. данные последней колонки табл. 3). Основным стабилизирующим фактором новой конформации являются более выгодные взаимодействия боковых радикалов аминокислот активного центра, которые понижают полную энергию всех комплексов в среднем на 30 ккал/моль по отношению к рентгеновской структуре. Интересно, что соотношения полных потенциальных энергий комплексов и в этом конформационном минимуме представлены рядом, в котором ферментативно активные нуклеозиды составляют левую, низкоэнергетическую часть, а неактивные нуклеозиды находятся в высокоэнергетической правой части: $\text{Ado} < z^2\text{Ado} < z^8\text{Ado} < c^1\text{Ado} < 8H\text{-}z^8c^9\text{Ado} < z^8c^1\text{Ado} < c^3\text{Ado} < z^8c^3\text{Ado} < z^2c^3\text{Ado} < 7H\text{-}z^8c^9\text{Ado} < c^9\text{Ado} < z^8c^7\text{Ado} < z^5c^9\text{Ado} < c^7\text{Ado}$. В низкоэнергетической части этот ряд отличается от рассмотренного выше только перестановкой положений одного из таутомеров слабого субстрата $8H\text{-}z^8c^9\text{Ado}$ и ингибитора $z^8c^1\text{Ado}$. Наименьшая потенциальная энергия отвечает комплексу аденозиндезаминазы с природным субстратом. Шесть аналогов, которые известны либо как ингибиторы ($c^1\text{Ado}$, $z^8c^1\text{Ado}$), либо как более слабые аналоги субстрата ($z^2\text{Ado}$, $z^8\text{Ado}$, $8H\text{-}z^8c^9\text{Ado}$ и $c^3\text{Ado}$) (см. табл. 2) составляют левую часть ряда. Относительная энергия их комплексов не превышает 11 ккал/моль. Инертные в отношении ADA нуклеозиды группируются в правой части ряда. Их относительная энергия не меньше 17.5 ккал/моль ($c^9\text{Ado}$). Наиболее высокое значение имеет относительная потенциальная энергия модельной структуры комплекса ADA с нуклеозидом $c^7\text{Ado}$, энергия которого превышает энергию комплекса с субстратом на 21.6 ккал/моль. Слабый аналог $z^8c^7\text{Ado}$ снова оказывается в высокоэнергетической части ряда, его относительная потенциальная энергия 18.8 ккал/моль. Причину этого мы усматриваем в том, что связывание этого аналога с большей вероятностью должно происходить с поворотом карбоксигруппы Asp296 на 180° . Этот поворот позволил бы образовать водородную связь с N8 и понизить потенциальную энергию комплекса. Однако такая ориентация карбоксигруппы не отвечает низкоэнергетическому состоянию свободного фермента (об этом можно судить на основании расчетов свободного фермента, которые будут описаны ниже). Поэтому связывание $z^8c^7\text{Ado}$ должно происходить крайне медленно, что и отражается на кинетических константах – максимальная относительная скорость дезаминирования этого аналога крайне низка (6.4%).

Ферментативная активность $z^5c^9\text{Ado}$ экспериментально не исследована. В нашей предыдущей

работе [8] мы предположили, что $z^5c^9\text{Ado}$ может оказаться слабым аналогом субстрата по той причине, что распределение электростатического потенциала в аденозине и в этом нуклеозиде, вычисленное в этой работе в вакууме неэмпирическим методом STO-3G оказываются похожими. Сходство сохраняется и в активном центре ADA, поскольку эффекты поляризации лишь незначительно меняют карту электростатического потенциала. Тем не менее, величина относительной потенциальной энергии комплекса $z^5c^9\text{Ado}$ с ADA оказывается весьма высокой (+19.5). Это обстоятельство является основанием для того, чтобы не рассчитывать на выраженную ферментативную активность ADA в отношении этого соединения. Однако окончательный вывод относительно возможности субстратных свойств у $z^5c^9\text{Ado}$ можно сделать только после оценки энергии его ковалентной гидратации.

Итак, определена альтернативная рентгеновской конформация активного центра аденозиндезаминазы, которая отвечает наиболее устойчивому низкоэнергетическому состоянию ее комплексов с изученными изостерными аналогами аденозина. От рентгеновской структуры комплекса ADA с 1-дезааденозином она отличается взаимной ориентацией аминокислотных радикалов активного центра и характером водородных связей. Для понимания возможной роли этой конформации в акцептировании нуклеозидов необходимо иметь представление о равновесной конформации активного центра свободной аденозиндезаминазы.

Рентгенографических данных о структуре свободной ADA на сегодняшний день нет. Попытки кристаллизовать ADA теленка в отсутствие лиганда не увенчались успехом [42]. Не исключено, что это следствие высокой конформационной подвижности свободной ADA. О ней, в частности, свидетельствует тот факт, что ADA теленка может связывать лиганды ненуклеозидной природы. Они инактивируют фермент, давая эффект ингибирования, причем за связывание некоторых лигандов ненуклеозидной природы отвечает не активный центр, а иные участки фермента [45]. Активный центр также способен связывать некоторые лиганды ненуклеозидной природы. В результате происходят существенные конформационные перестройки всего фермента, сопровождающиеся образованием в нем новых гидрофобных “карманов” [45].

Мы провели расчеты энергетически оптимальной конформации **активного центра в отсутствие лиганда**, в поле неподвижной оболочки, отвечающей структуре 1ADD [39]. При оптимизации потенциальной энергии происходили конформационные движения 21 а.о. и 17 молекул воды (см. “Методическую часть”). В результате оптимизации потенциальной энергии получена структура, имеющая

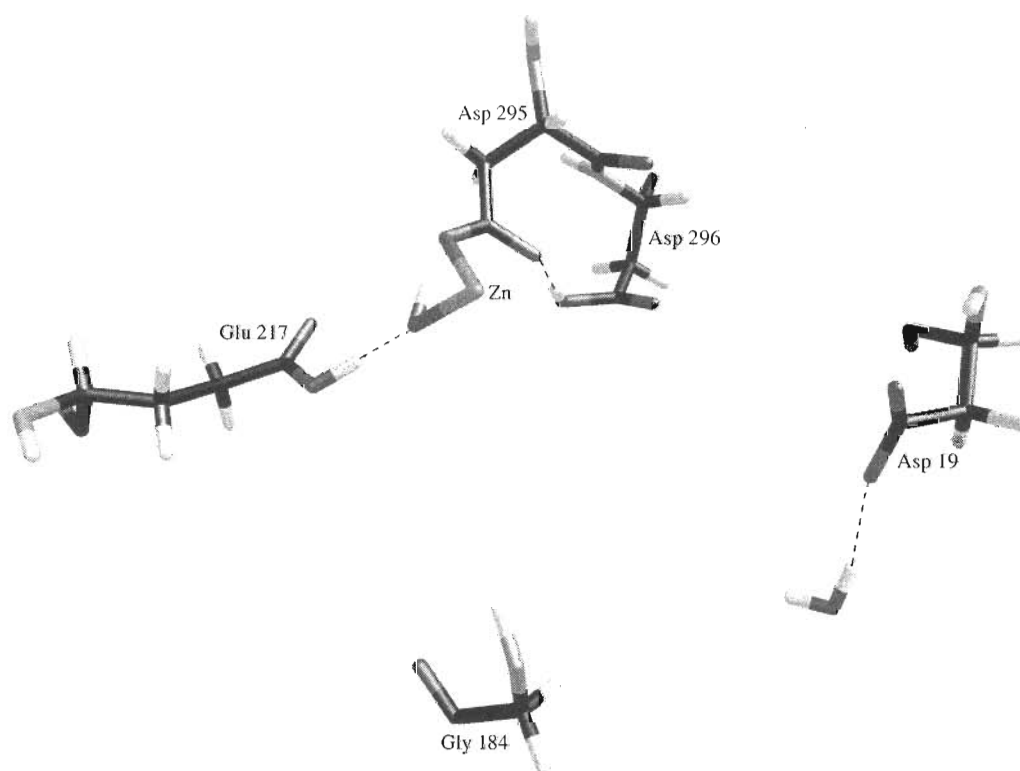


Рис. 1. Фрагмент пространственной структуры активного центра аденозиндеаминазы в отсутствие связанного лиганда. Конформация отвечает наиболее низкому значению минимума потенциальной энергии, рассчитанной в модели “*ab initio*, AM1” (см. текст).

характерную сетку водородных связей. На рис. 1 показан фрагмент этой структуры, состоящий из аминокислотных остатков, которые в комплексах непосредственно контактируют с нуклеозидом. В отсутствие лиганда расположение этих остатков формирует полость, размеры которой соответствуют пространству, занимаемому нуклеозидом. Характерной особенностью свободной от нуклеозида структуры активного центра является наличие двух сильных донорно-акцепторных связей, одна из которых образована карбоксильными группами остатков Asp295 и Asp296, а другая карбоксильной группой Glu217 и гидроксид-анионом, координированным с катионом цинка (или, возможно, с соответствующей молекулой воды, если ее активация до гидроксид-аниона еще не произошла). В то же время амидогруппа остатка Gly184 не участвует в водородных связях, а карбоксильная группа Asp19 образует только одну водородную связь с молекулой воды, которая, в свою очередь, дает начало сети водородосвязанных молекул воды. Таким образом, структура свободного от лиганда активного центра оказывается достаточно жестко сформированной и имеет две свободные донорно-акцепторные группы – амидогруппу остатка Gly184 и один из кислородов карбоксильной группы Asp19.

На рис. 2 показан фрагмент комплекса активного центра с ингибитором – аналогом основного состояния ($c^1\text{Ado}$), в той конформации, которая отвечает наиболее глубокому минимуму потенциальной энергии в модели “*ab initio*, AM1”. Она имеет многие черты свободного активного центра. Сохраняются сильные донорно-акцепторные взаимодействия между карбоксильными группами остатков Asp295 и Asp296 и карбоксильной группой Glu217 с гидроксид-анионом. Нуклеозид дает новые водородные связи: атом N3 пурина фиксируется амидогруппой Gly184, а один из протонов 6-NH₂-группы фиксируется кислородом той же карбоксильной группы Asp296, которая одновременно образует водородную связь с Asp295. Углеводный фрагмент нуклеозида является донором протонов в сильных донорно-акцепторных взаимодействиях с карбоксильной группой Asp19. Расстояние между атомами O5' и O3', которое совместимо с образованием одновременно обеих таких связей, определяется торсионными углами δ (C5'-C4'-C3'-O3') и γ (O5'-C5'-C4'-C3'). Оно должно составлять около 3.7 Å. Именно C3'-*эндо*-конформация углеводного цикла позволяет получить эти водородные связи без напряжения. Амплитуда псевдотворения фуранозного цикла в этом случае должна быть не слишком мала – угол τ (C1'-C2'-C3'-C4') не менее 34°. Обратим внимание на то, что по

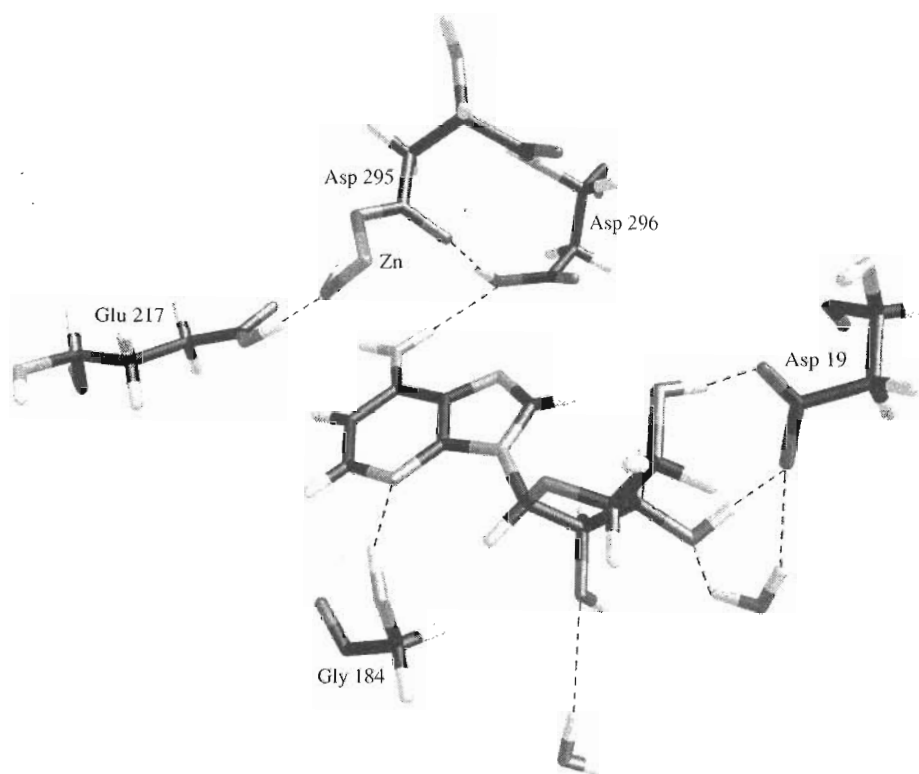


Рис. 2. Фрагмент пространственной структуры активного центра аденозиндеаминазы в комплексе с ингибитором – аналогом основного состояния субстрата (c^1 Ado). Конформация отвечает наиболее низкому значению минимума потенциальной энергии, рассчитанной в модели “*ab initio*, AM1” (см. текст).

данным РСА конформация c^1 Ado отвечает гораздо меньшей складчатости кольца ($\tau = 23^\circ$) и соответствующие водородные связи возможны, но структура при этом напряжена. Из экспериментальных данных известно, что активность аденозиндеаминазы выше в отношении нуклеозидов, имеющих сдвиг конформационного равновесия в *N*-область круга псевдотвращения (см., в частности, [46]). Мы предполагаем, что одной из причин этого является конформационное напряжение, которое затрудняет удержание нуклеозида в *S*-области в активном центре за счет этих важных водородных связей. Кислород $O5'$ является также акцептором протона от His17, однако на рисунках, в целях наглядности представления основных закономерностей изменения структуры, мы не приводим этот и другие аминокислотные остатки активного центра.

Конформация того же фрагмента комплекса аденозиндеаминазы с c^1 Ado в локальном минимуме с более высокой потенциальной энергией (минимум, ближайший к структуре IADD) показана на рис. 3. Как мы уже говорили выше, потенциальная энергия этой конформации выше предыдущей почти на 30 ккал/моль (ср. величины полных энергий комплекса с c^1 Ado, приведенные в табл. 3). В этой структуре нет донорно-акцепторных взаимодействий между карбоксильными

группами остатков Asp295 и Asp296. Вместо этого имеется водородная связь остатка Asp296 с атомом N7 имидазольного цикла и одновременно карбоксильный кислород является акцептором одного из протонов 6-NH₂-группы. Таким образом, взаимная ориентация остатков Asp295 и Asp296 изменяется, вследствие чего увеличивается количество водородных связей с нуклеозидом. Второй протон 6-NH₂-группы участвует в водородной связи с карбоксильной группой Glu217.

На рис. 4 показан фрагмент комплекса активного центра аденозиндеаминазы с субстратом (аденозином) в конформации, отвечающей низкоэнергетическому локальному минимуму. Отличие этой структуры от аналогичного локального минимума комплекса с c^1 Ado только в том, что N1-группа аденозина является более сильным акцептором протона, чем гидроксид-анион, и образует водородную связь с карбоксильной группой остатка Glu217. Такая конформация является предшественницей протонированному по N1 состоянию аденозина.

Существование описанных выше вариантов конформаций активного центра и соотношения потенциальных энергий двух конформеров одноименных комплексов позволяет предположить, что после связывания нуклеозида происходит серия конформационных перестроек. На первой стадии

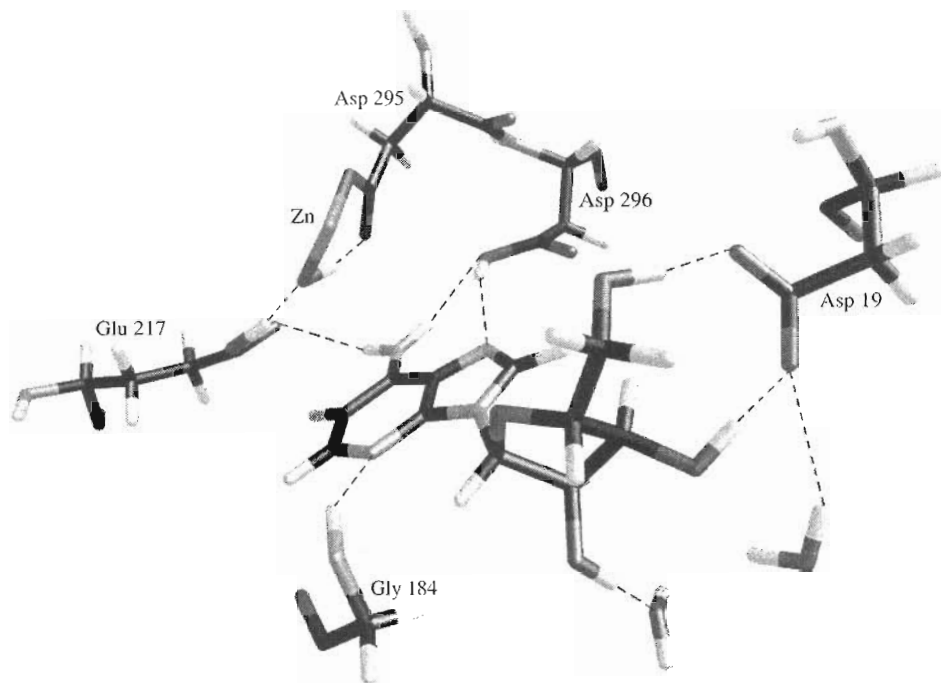


Рис. 3. Фрагмент пространственной структуры активного центра аденозиндезаминазы в комплексе с ингибитором – аналогом основного состояния субстрата ($c^1\text{Ado}$). Конформация отвечает локальному минимуму потенциальной энергии, ближайшему к рентгеноструктурным данным (потенциальная энергия превышает оптимальную почти на 30 ккал/моль).

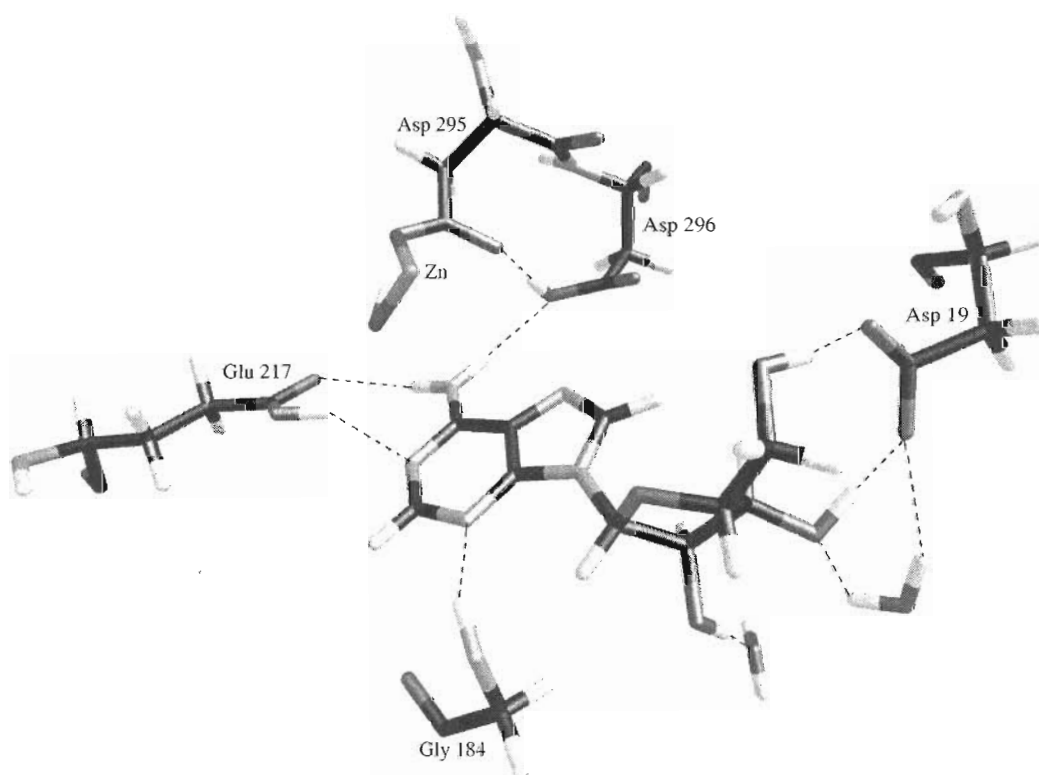


Рис. 4. Фрагмент пространственной структуры активного центра аденозиндезаминазы в комплексе с субстратом (аденозином). Конформация отвечает наиболее низкому значению минимума потенциальной энергии, рассчитанной в модели “*ab initio*, AM1” (см. текст).

Таблица 4. Параметры оптимальных конформаций свободных нуклеозидов и конформаций в активном центре аденозиндезаминазы

Соединение	$E_{\text{нукл}}$ в акт. ц.	$E_{\text{нукл}}$ в своб. сост.	ΔE
Ado	17.2 $\chi = -112.1; \tau = 35.2; \gamma = -64.3/56.4$	7.4 $\chi = -39.0/37.3; \tau = 28.9/33.4; \gamma = 63.6/-64.7$	9.8
c ¹ Ado	20.0 $\chi = -112.0; \tau = 35.9; \gamma = -65.3/55.8$	10.3 $\chi = -37.4; \tau = 30.9; \gamma = 65.7$	9.7
c ³ Ado	21.3 $\chi = -114.2; \tau = 36.0; \gamma = -65.3/55.6$	10.3 $\chi = -43.6; \tau = 29.0; \gamma = 67.0$	11.0
c ⁷ Ado	34.9 $\chi = -116.1; \tau = 34.9; \gamma = -63.7/57.2$	25.3 $\chi = -161.1; \tau = -35.4; \gamma = 69.6$	9.6
c ⁹ Ado	38.1 $\chi = -108.5; \tau = 34.3; \gamma = -62.2/57.5$	28.9 $\chi = -172.5; \tau = -31.6; \gamma = -64.0$	9.2
z ² Ado	20.5 $\chi = -110.8; \tau = 35.4; \gamma = -64.3/56.5$	11.8/12.1 $\chi = 31.2/34.3; \tau = 36.2/33.8; \gamma = 69.5/-69.2$	8.7
z ⁸ Ado	22.4 $\chi = -111.3; \tau = 36.4; \gamma = -61.3/58.4$	11.4/11.9 $\chi = 54.5/-123.3; \tau = -33.2/35.1; \gamma = -66.1/-61.0$	11.0
z ² c ³ Ado	24.4 $\chi = -114.6; \tau = 36.4; \gamma = -65.5/55.5$	13.0/13.4 $\chi = -46.3/-25.3; \tau = 36.5/-24.9; \gamma = -67.6/68.1$	11.4
z ⁸ c ¹ Ado	24.9 $\chi = -111.6; \tau = 36.4; \gamma = -61.1/58.6$	14.2/14.7 $\chi = 54.4/-123.2; \tau = -33.2/35.0; \gamma = -66.0/-61.0$	10.7
z ⁸ c ³ Ado	23.4 $\chi = -113.1; \tau = 37.1; \gamma = -62.5/57.3$	12.0/12.2 $\chi = 52.5/-174.4; \tau = -33.7/37.1; \gamma = -72.3/-64.7$	11.4
z ⁸ c ⁷ Ado	32.9 $\chi = -114.3; \tau = 36.6; \gamma = -63.1/57.0$	24.1/24.7 $\chi = 54.7/-122.8; \tau = -33.4/35.2; \gamma = -66.0/-61.2$	12.7
7H-z ⁸ c ⁹ Ado	36.6 $\chi = -106.2; \tau = 35.8; \gamma = -63.3/56.8$	27.8/28.0/28.2 $\chi = 53.9/50.2/-156.6; \tau = -32.6/31.3/-32.0; \gamma = -64.2/-4.0/-62.5$	7.9
8H-z ⁸ c ⁹ Ado	27.4 $\chi = -122.2; \tau = 34.9; \gamma = -61.4/58.2$	15.8 $\chi = -169.2; \tau = 37.6; \gamma = -63.5$	12.2
z ⁵ c ⁹ Ado	37.1 $\chi = -111.5; \tau = 35.0; \gamma = -62.5/57.2$	28.7/28.9 $\chi = -170.3/54.0; \tau = 38.2/-32.9; \gamma = 69.3/-65.1$	8.4

Обозначения: $E_{\text{нукл}}$ в активном центре и $E_{\text{нукл}}$ в свободном состоянии – потенциальная энергия конформации нуклеозида в активном центре и в вакууме; ΔE – напряжение нуклеозида в активном центре; торсионный угол χ – гликозидный (N4–N(C)9–C1'–O4'); торсионный угол γ – (O5'–C5'–C4'–O4'); торсионный угол τ – (C1'–C2'–C3'–C4') используется нами вместо амплитуды псевдотворения $\theta_{\text{ин}}$.

взаимодействия нуклеозида с ферментом эффективнее должны связываться те аналоги, структура которых максимально комплементарна активному центру свободного фермента. Как показывают наши расчеты, изменения в энергии напряжения активного центра при начальном связывании изомерных аналогов варьирует в очень небольших пределах (2.5 ккал/моль – см. табл. 3, последнюю колонку). Существеннее варьирует конформационное напряжение нуклеозидов в активном центре. В зависимости от структуры оно составляет от 7.9 до 12.7 ккал/моль (см. табл. 4). Поскольку конформационное напряжение нуклеозидов является одной из составляющих полной потенциальной энергии комплексов, то **форма потенциальной кривой свободного нуклеозида играет важную роль в его взаимодействии с аденозиндезаминазой.** Чем более пологой является потенциальная кривая

свободного нуклеозида в области *N*-минимума, тем легче напряжение нуклеозида компенсируется взаимодействиями с ферментом. Так, например, у таутомера 8H-z⁸c⁹Ado это напряжение очень велико, в то же время потенциальная энергия комплекса достаточно низкая. Это возможно благодаря пологой форме потенциальной кривой этого аналога в области *N*-минимума, которая позволяет получить компенсацию конформационного напряжения нуклеозида за счет выгодных взаимодействий с ферментом. Только в таком смысле можно обсуждать влияние конформационных особенностей свободных нуклеозидов на связывание с аденозиндезаминазой (ср. с [46]). Если же глобальным минимумом аналога является *S*-конформер, то важную роль играют величина конформационного барьера *N* \longleftrightarrow *S*-перехода и ширина низкоэнергетического конформационно-

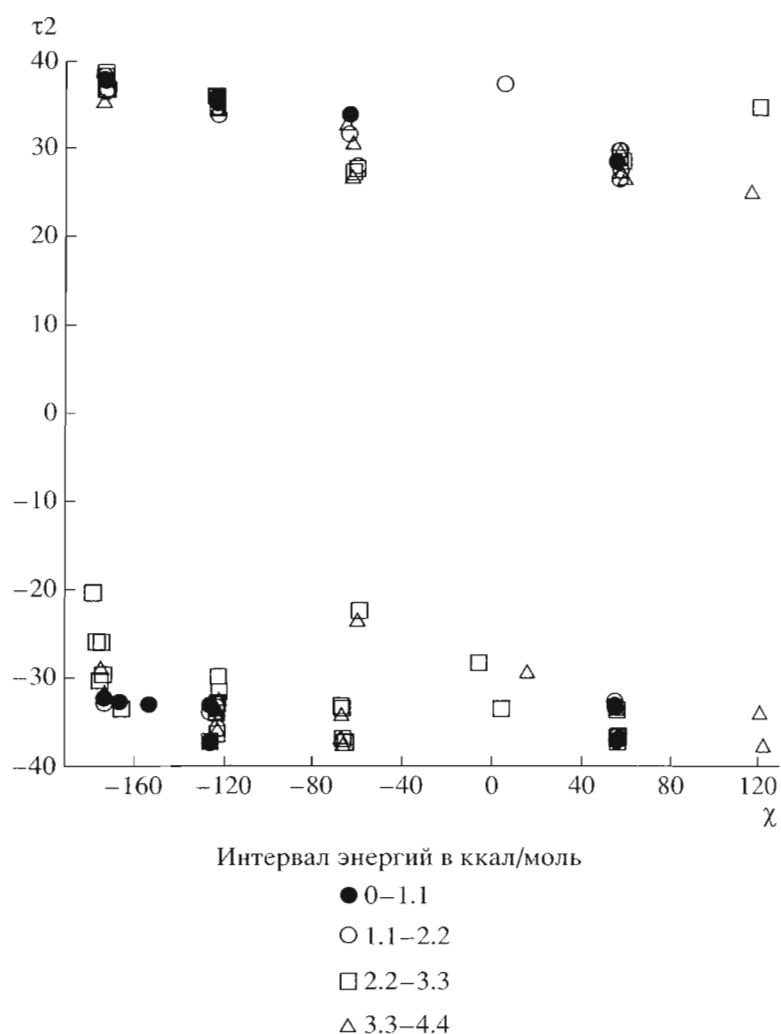


Рис. 5. Зависимость потенциальной энергии $z^8\text{Ado}$ от ориентации основания по отношению к рибофуранозному циклу в N - и S -областях конформационного пространства.

го пространства в каждой из областей. Так, $z^8\text{Ado}$ и $z^8c^1\text{Ado}$ образуют довольно прочные комплексы с ADA в силу того, что конформационная вариабельность в низкоэнергетической части N -области достаточно широка, хотя глобальному минимуму этих нуклеозидов отвечает все же $C2'$ -эндо-конформер. Это хорошо видно из распределения угла τ в аналоге $z^8\text{Ado}$ (см. рис. 5). Для другого аналога $z^8c^1\text{Ado}$ картина аналогична.

Потенциальные энергии комплексов ADA с аналогами аденозина, рассчитываемые нами, дают информацию об энтальпийной составляющей начальной стадии взаимодействия. Акцепция лиганда вызывает электронные и конформационные перестройки в активном центре комплекса, которые, в свою очередь, вызывают конформационные изменения всего фермента. Рентгеновская структура IADD [39], скорее всего, являет собой первый этап таких перестроек. Степень выраженности конформационных изменений ADA можно

оценить из совокупности кинетических и термодинамических исследований, проведенных Кастро и Бриттом [47, 48]. Полученная ими теплота образования комплекса ADA теленка с аналогом переходного состояния (коформицином) почти вчетверо больше, чем теплота образования комплекса с аналогом основного состояния (1-дезааденозином), что авторы связывают с уменьшением экспонированности неполярных радикалов на поверхности глобулы ADA в переходном комплексе. Основной вывод цитируемых работ – белковая глобула **свободной ADA находится в относительно высокоэнергетическом состоянии, а ее активный центр комплементарен основному состоянию субстрата**. Расчеты комплексов ADA с нуклеозидами, проведенные в нашей работе, позволили получить конформационное состояние активного центра, комплементарное основному состоянию субстрата.

МЕТОДИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Все модельные построения и расчеты проводили с помощью коммерческого программного пакета HyperChem 7.1. Потенциальную энергию оценивали в молекулярно-механической модели с помощью потенциалов Amber99.

Для построения моделей комплексов использовали координаты 1ADD из банка данных PDB (комплекс ADA с 1-дезаадеинозином) [7]. Структура состоит из 349 а.о., иона Zn^{2+} , 110 молекул H_2O и молекулы 1-дезаадеозина. Координаты атомов получены с разрешением 2.4 Å.

Для создания модели, на базе которой можно было бы производить оценку и оптимизацию потенциальной энергии комплекса ADA с 1-дезаадеинозином, а также получать стартовые структуры для оптимизации потенциальной энергии остальных комплексов, необходимо было дополнить рентгеновскую структуру протонами, а также оценить парциальные заряды на атомах. При протонировании структуры необходимо учесть, что два а.о. в активном центре – Glu217 и Asp296, находятся в кислой форме, и для них в базе данных HyperChem нет атомных зарядов. Кроме того, необходимо оценить заряд на катионе Zn^{2+} , координирующем 4 остатка аминокислот и гидроксид-анион.

Использование парциальных атомных зарядов в молекулярно-механических расчетах несет в себе погрешность, величину которой сложно (или невозможно) оценить: плотность электростатического распределения, получаемого любым квантово-химическим методом, зависит как от конформации рассчитываемой структуры, так и от внешнего поля, а аппроксимация плотности парциальными атомными зарядами может быть проведена разными способами. Мы провели независимые серии расчетов, отличающиеся квантово-химическими методами получения зарядов на атомах аминокислот активного центра и на нуклеозидах. Тем самым мы смогли оценить степень влияния погрешности, *a priori* заложенной в любых расчетах такого рода, на качественные выводы, которые позволяют сделать расчеты.

В расчетах первой серии (“AM1, AM1”) заряды на пептидных фрагментах, содержащих протонированные формы остатков Glu217 и Asp296, а также на нуклеозидах, находящихся в активном центре, получены методом AM1 в поле остальных атомных зарядов фермента, взятых из базы данных HyperChem. Метод AM1 не позволяет включать в расчеты системы с *d*-электронами, поэтому зарядом на катионе Zn^{2+} в этой серии расчетов мы вынуждены были пренебречь.

В расчетах второй и третьей серий (“*ab initio*, AM1”) заряды на пептидных фрагментах, содержащих протонированные формы остатков Glu217 и Asp296, а также на фрагменте активного центра, состоящем из остатков четырех аминокислот и гидро-

ксид-аниона, координированных с катионом Zn^{2+} , проведены методом *ab initio* в базисе 6-31G*. Высокая ресурсоемкость этого метода не позволила нам получать заряды на нуклеозидах непосредственно в активном центре фермента. Поскольку внешнее поле существенно влияет на парциальные заряды малых полярных молекул, для расчета зарядов на нуклеозидах мы предпочли использовать метод AM1. Благодаря этому мы смогли производить повторный пересчет зарядов на нуклеозидах после первой стадии оптимизации комплекса нуклеозида с ферментом и, тем самым, эффективно учесть влияние изменившейся конформации на парциальные заряды нуклеозидов.

Методика выделения аминокислотных фрагментов для получения зарядов в поле фермента в методе AM1

Аминокислота Glu217 была протонирована по кислороду OE1. Для этого трипептид Gly216-Glu217-Val218 был “отрезан” от соседних аминокислот и на основе атомов *N*-концевой аминокислоты был сформирован закрывающий фрагмент $O=C-CH_3$, а на основе его *C*-концевой аминокислоты – закрывающий фрагмент $HN-CH_3$. В результате расчета методом AM1 получившегося фрагмента в присутствии всех остальных атомов фермента были получены заряды на атомах Glu217. Суммарный заряд на протонированном остатке Glu217 оказался равен -0.145 . Аналогичным образом были пересчитаны заряды на дипептиде Asp295-Asp296, в котором был протонирован атом OD2 Asp296. Суммарный заряд этого дипептида оказался равен -1.052 . Перебрав несколько вариантов закрывающих фрагментов на *N*- и *C*-концах, мы убедились в том, что именно такой вариант закрытия концов наилучшим образом моделирует краевые эффекты в полипептидной цепочке.

*Расчет зарядов ab initio в базисном наборе 6-31G**

Для расчета 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 ($N(CH_3)_2$ – в случае остатка Pro297). Полученные заряды на этих остатках составили -0.065 и -0.047 соответственно.

Непосредственный расчет зарядов на остатках аминокислот в комплексе с ионом Zn^{2+} и гидроксид-ионом в HyperChem 7.1 невозможен из-за большого количества атомов в нем, поэтому расчет зарядов на ионах Zn^{2+} и OH^- проводился в модельном комплексе, в котором C^β -углеродные

атомы остатков соответствующих аминокислот преобразованы в CH_3 -группы. Полученные заряды на ионе Zn^{2+} и координированном на нем OH^- -ионе составили +1.260 и -0.613 соответственно.

Заряды на остатках аминокислот, содержащихся в комплексе с ионом цинка (His15, His17, 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 $\beta\text{-CH}_3$ -группами. Полученные заряды на этих остатках составили +0.032, +0.044, -0.033 и -0.860 соответственно. Суммарный заряд на всем комплексе составил -0.170.

Все рассчитанные заряды на атомах в этих структурах переносились в структуру 1ADD, тем самым были созданы две расчетные модели комплекса ADA-c¹Ado, различающиеся зарядовым распределением на атомах аминокислотных остатков активного центра. Получение стартовых моделей комплексов для каждого из аналогов начиналось с модификации 1-дезаадеозина прямо в активном центре до соответствующего нуклеозида. Поэтому стартовая конформация любого аналога в активном центре совпадала с конформацией 1-дезаадеозина, а стартовые координаты активного центра совпадали с координатами 1ADD, за исключением атомов Glu217 и Asp296, соседствующих с карбоксильными группами, которые в результате протонирования слегка сдвигаются.

В процессе оптимизации потенциальной энергии конформационные движения затрагивали нуклеозид и 19 а.о., находящихся в непосредственном контакте с нуклеозидом или ионом цинка, и 17 молекул воды, которые по рентгеноструктурным данным находятся не далее 3.5 Å от атомов этих аминокислот. Аминокислоты активного центра указаны в файле pdbname <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/pdbname/1add/main.html> структуры 1ADD (это His15, His17, Asp19, Leu58, Phe61, Leu62, Phe65, Arg101, Tyr102, Ser103, Leu106, Met155, Ala183, Glu184, His214, Glu217, His238, Asp295, Asp296). Молекулы воды, участвующие в конформационных перестройках, имеют следующие номера в PDB-файле: 4, 9, 10, 12, 15, 17, 18, 19, 20, 35, 36, 42, 76, 77, 78, 82 и 83. Таким образом, процесс оптимизации комплекса в общей сложности затрагивал координаты 363 атомов фермента и все атомы связанных в активном центре нуклеозидов.

При оптимизации потенциальной энергии фермента в отсутствие лиганда мы дополнительно учитывали возможность движения остатков Asp185 и Glu186, амидные группы которых находятся в контакте с остатками Leu58 и Leu62 и могут играть важную роль при акцептировании нуклеозидов [42].

Оптимизацию структуры комплекса для каждого из аналогов проводили в две стадии, каждую из которых прерывали после достижения градиентом величины 0.01. После первой стадии оптимизации атомные заряды на нуклеозидах пересчитывали повторно.

Для оценки напряжения нуклеозида в активном центре необходимо знание потенциальной поверхности свободных нуклеозидов. Сканирование конформационного пространства свободных нуклеозидов мы осуществляли с помощью алгоритма Монте-Карло в специальном программном модуле, встроенном в пакет HyperChem 7.1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, предложено конформационное состояние активного центра аденозиндезаминазы, комплементарное субстрату. Оно отличается от конформации, которая была определена на основании рентгеноструктурных исследований для комплекса аденозиндезаминазы с аналогом основного состояния субстрата [39]. В частности, в этом состоянии сохраняются водородные связи, дающие наиболее устойчивую структуру активного центра фермента в отсутствие лиганда. Сопоставляя полученные расчетные результаты с выводами, сделанными на основании совокупности кинетических и термодинамических исследований Кастро и Бриттом [47, 48], мы склонны думать, что на первой стадии образования ферментом комплекса с нуклеозидом участвует именно это конформационное состояние. Потенциальные энергии комплексов аденозиндезаминазы с аденозином и 13 его изостерными аза-, деаза- и аза-дезааналогами составляют ряд, качественно адекватно отражающий известные из эксперимента данные по ферментативной активности этих нуклеозидов. Наиболее низкая потенциальная энергия отвечает комплексу с природным субстратом. Энергии комплексов с шестью аналогами данной группы, известными как ингибиторы или слабые субстраты, не превышают этой энергии более чем на 11 ккал/моль. Для всех аналогов, которые по экспериментальным данным не проявляют ни субстратных, ни ингибиторных свойств, потенциальная энергия комплексов с аденозиндезаминазой оказывается выше этого значения. Исключение составляет слабый аналог субстрата $z^8c^7\text{Ado}$, энергия комплекса ADA с которым выше указанного порога. Наличие протона в 7-м положении пуринового цикла обуславливает необходимость поворота карбоксильной группы остатка Asp296 для фиксации этого аналога. Такой поворот энергетически невыгоден в свободном ферменте. Поэтому образование комплекса с этим соединением происходит очень медленно.

Потенциальная энергия комплексов основного состояния аденозиндезаминазы с аналогами аденозина является одной из составляющих, влияющих

на константу связывания с ферментом. По этой причине ее относительная величина может быть использована в качестве начального критерия для оценки вероятности связывания этих аналогов. В случае ингибиторов, которые в силу своего химического строения не могут образовать переходный комплекс ($c^1\text{Ado}$, $z^8c^1\text{Ado}$), потенциальная энергия комплекса коррелирует с величиной константы ингибирования. Однако ингибиторную или субстратную активность аналогов, которые способны образовывать ковалентные гидраты, имитирующие переходное состояние субстрата, можно оценивать только на основании последующих расчетов. Такие расчеты должны включать в себя оценку свободной энергии образования ковалентного гидрата и энергию комплекса нуклеозида с ADA в переходном состоянии. Для предсказания силы ингибиторов в ряду дезаминопроизводных С-нуклеозидов этот подход был успешно использован в работе Боджак и соавт. [43]. Как мы уже упоминали выше, соотношение энергий связывания в комплекс переходного состояния с ADA двух таутомеров деаминоформицина, которое получено в цитируемой работе, качественно аналогично полученному нами соотношению потенциальных энергий комплексов основного состояния ADA с двумя таутомерами формицина.

Более строгой и одновременно ресурсоемкой является оценка потенциальной энергии всего переходного комплекса с помощью квантово-химических (*ab initio*) расчетов. Такие расчеты были проведены в работе Глессон и соавт. [49] для соединений той же серии, что и в работе [43]. Несмотря на значительное усложнение схемы их расчетов, предложенная ими структура наиболее эффективного ингибитора совпала со структурой, предсказанной в [43].

Работа поддержана грантом РФФИ № 03-04-48938.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glazer R.I. // *Cancer Chemother. and Pharmacol.* 1980. V. 4. P. 227–235.
2. Agarwal R.P. // *Pharmacol. and Ther.* 1982. V. 17. P. 399–429.
3. Cristalli G., Costanzi S., Lambertucci C., Lupidi G., Vittori S., Volpini R., Camaioni E. // *Med. Res. Rev.* 2001. V. 21. P. 105–128.
4. Montgomery J.A. // *Med. Res. Rev.* 1982. V. 2. P. 271–308.
5. Resta R., Thompson L.F. // *Immunol. Today.* 1997. V. 18. P. 371–374.
6. Franco R., Valenzuela A., Lluís C., Blanco J. // *Immunol. Rev.* 1998. V. 161. P. 27–42.
7. Зарубин Ю.П., Ильичёва И.А., Пурыгин П.П., Флорентьев В.Л. // *Биоорганич. химия.* 2002. Т. 28. С. 315–323.
8. Зарубин Ю.П., Ильичёва И.А., Пурыгин П.П., Флорентьев В.Л. // *Биоорганич. химия.* 2002. Т. 28. С. 447–454.
9. Зарубин Ю.П., Миргородский Д.В., Пурыгин П.П., Ильичёва И.А., Флорентьев В.Л. // *Вестник СамГУ – Естественнонаучная серия.* 2003. Вып. 2. С. 152–173.
10. Bennett L.L., Jr., Allan P.W., Carpenter J.W., Hill D.L. // *Biochem. Pharmacol.* 1976. V. 25. P. 517–521.
11. Franchetti P., Cappellacci L., Grifantini M., Lupidi G., Nocentini G., Barzi A. // *Nucleosides Nucleotides.* 1992. V. 11. P. 1059–1076.
12. Bussolari J.C., Ramesh K., Stoeckler J.D., Chen S.-F., Panzica R.P. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 4113–4120.
13. Ikehara M., Fukui T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. V. 338. P. 512–519.
14. Agarwal R.P., Sagar S.M., Parks R.E., Jr. // *Biochem. Pharmacol.* 1975. V. 24. P. 693–701.
15. Krajewska E., De Clercq E., Shugar D. // *Biochem. Pharmacol.* 1978. V. 27. P. 1421–1426.
16. Bennett L.L., Jr., Allan P.W., Smithers D., Vail M.H. // *Biochem. Pharmacol.* 1969. V. 18. P. 725–740.
17. Hecht S.M., Frye R.B., Werner D., Fukui T., Hawrelak S.D. // *Biochemistry.* 1976. V. 15. P. 1005–1015.
18. Simon L.N., Bauer R.J., Tolman R.L., Robins R.K. // *Biochemistry.* 1970. V. 9. P. 573–577.
19. Lupidi G., Riva F., Cristalli G., Grifantini M. // *Ital. J. Biochem.* 1982. V. 31. P. 396–403.
20. Lupidi G., Cristalli G., Marmocchi F., Riva F., Grifantini M. // *J. Enzyme. Inhib.* 1985. V. 1. P. 67–75.
21. Kurz L.C., Moix L., Riley M.C., Frieden C. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 39–48.
22. Zimmerman T.P., Deepröse R.D., Wolberg G., Stopford C.R., Duncan G.S., Miller W.H., Miller R.L., Lim M.I., Ren W.Y., Klein R.S. // *Biochem. Pharmacol.* 1983. V. 32. P. 1211–1217.
23. Cristalli G., Vittori S., Eleuteri A., Volpini R., Cola D., Camaioni E., Gariboldi P.V., Lupidi G. // *Nucleosides Nucleotides.* 1993. V. 12. P. 39–53.
24. Sanghvi Y.S., Larson S.B., Willis R.C., Robins R.K., Revankar G.R. // *J. Med. Chem.* 1989. V. 32. P. 945–951.
25. MacCoss M., Meurer L.C., Hoogsteen K., Springer J.P., Koo G., Peterson L.B., Tolman L., Emini E. // *J. Heterocycl. Chem.* 1993. V. 30. P. 1213–1220.
26. Schneller S.W., Thompson R.D., Cory J.G., Olsson R.A., De Clercq E., Kim I.K., Chiang P.K. // *J. Med. Chem.* 1984. V. 27. P. 924–928.
27. May J.A., Jr., Townsend L.B. // *J. Org. Chem.* 1976. V. 41. P. 1449–1456.
28. Franchetti P., Messini L., Cappellacci L., Grifantini M., Nocentini G., Guarracino P., Marongiu M.E., La Colla P. // *Antiviral Chem. Chemother.* 1993. V. 4. P. 341–352.
29. Tam S.Y.-K., Hwang J.-S., De Las Heras F.G., Klein R.S., Fox J.J. // *J. Heterocycl. Chem.* 1976. V. 13. P. 1305–1308.
30. Cristalli G., Franchetti P., Grifantini M., Nocentini G., Vittori S. // *J. Med. Chem.* 1989. V. 32. P. 1463–1466.
31. Meade E.A., Wotring L.L., Drach J.C., Townsend L.B. // *J. Med. Chem.* 1992. V. 35. P. 526–533.

32. *Montgomery J.A., Thomas H.J.* // *J. Med. Chem.* 1972. V. 15. P. 182–187.
33. *Walton E., Holly F.W., Jenkins S.R.* // *J. Org. Chem.* 1968. V. 33. P. 192–197.
34. *Pathil S.A., Otter B.A., Klein R.S.* // *Tetrahedron Lett.* 1994. V. 35. P. 5339–5342.
35. *Nishimura N., Kato A., Maeba I.* // *Carbohydr. Res.* 2001. V. 331. P. 77–82.
36. *Ramasamy K., Ugarkar B.G., McKernan P.A., Robins R.K., Revankar G.R.* // *J. Med. Chem.* 1986. V. 29. P. 2231–2235.
37. *Kang Y., Larson S.B., Robins R.K., Revankar G.R.* // *J. Med. Chem.* 1989. V. 32. P. 1547–1551.
38. *Kobe J., Brdar B., Soric J.* // *Nucleosides Nucleotides.* 1986. V. 5. P. 135–151.
39. *Wilson D.K., Quioco F.A.* // *Biochemistry.* 1993. V. 32. P. 1689–1694.
40. *Wilson D.K., Rudolph F.B., Quioco F.A.* // *Science.* 1991. V. 252. P. 1278–1284.
41. *Wang Z., Quioco F.A.* // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 8314–8324.
42. *Kinoshita T., Nishio N., Nakanishi I., Sato A., Fujii T.* // *Acta Cryst.* 2005. D59. P. 299–303.
43. *Bojack G., Earnshaw C.G., Klein R., Lindell S.D., Lowinski C., Preuss R.* // *Org. Lett.* 2001. V. 3. P. 839–842.
44. *Lindell S.D., Moloney B.A., Hewitt B.D., Earnshaw C.G., Dudfield P.J., Dancer J.E.* // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1999. V. 9. P. 1985.
45. *Terasaka T., Kinoshita T., Kuno M., Nakanishi I.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 34–35.
46. *Ford H., Jr., Dai f., Mu L., Siddiqui A., Nicklaus M.C., Anderson L., Marquez V.E., Barchi J.J., Jr.* // *Biochemistry.* 2000. V. 39. P. 2581–2592.
47. *Castro C., Britt B.M.* // *Biophysical Chemistry.* 1998. V. 70. P. 87–92.
48. *Castro C., Britt B.M.* // *J. Enzyme Inhibition.* 2001. V. 16. P. 217–232.
49. *Glesson M.P., Burton N.A., Hiller I.H.* // *Chem. Commun.* 2003. № 17. P. 2180–2181.

Theoretical Study of the Structure of Adenosine Deaminase Complexes with Adenosine Analogues: I. Aza-, Deaza- and Isomeric Azadeazaanalogues of Adenosine

I. A. Il'icheva[#], Yu. P. Zarubin^{**}, P. A. Kostin^{*},
D. V. Mirgorodskii^{**}, P. P. Purygin^{**}, and V. L. Florent'ev^{*}

[#]Phone: +7 (095) 135-6591; e-mail: imb_irina@rambler.ru

^{*}Engelhardt Institute of Molecular Biology,

Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

^{**}Department of Organic Chemistry, Samara State University,

ul. Akademika Pavlova 1, Samara, 443011 Russia

The conformational models of the active site of adenosine deaminase (ADA) and its complexes in the basic state with adenosine and 13 isosteric analogues of the aza, deaza, and azadeaza series were constructed. The optimization of the conformational energy of the active site and the nucleoside bound with it in the complex was achieved in the force field of the whole enzyme (the 1ADD structure was used) within the molecular mechanics model using the AMBER 99 potentials. The stable conformational states of each of the complexes, as well as the optimal conformation of the ADA in the absence of ligand, were determined. It was proved that the conformational state that is close to the structure of the ADA complex with 1-deazaadenosine (1ADD) known from the X-ray study corresponds to one of the local minima of the potential surface. Another, a significantly deeper minimum was determined; it differs from the first minimum by the mutual orientation of side chains of amino acid residues. A similar conformational state is optimal for the ADA active site in the absence of the bound ligand. A qualitative correlation exists between the values of potential energies of the complexes in this conformation and the enzymatic activity of ADA toward the corresponding nucleosides. The dynamics of conformational conversions of the active site after the binding of substrate or its analogues, as well as the possibility of the estimation of the inhibitory properties of nucleosides on the basis of calculations, are discussed. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: adenosine; adenosine deaminase, mechanism of substrate specificity; aza, deaza, and azadeaza analogues of adenosine; theoretical study