

КОМПЬЮТЕРНЫЕ МЕТОДЫ В СОЗДАНИИ НОВЫХ ЛЕКАРСТВ

УДК 577.152.3.

©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА КАТАЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ И СТРУКТУРЫ АКТИВНОГО ЦЕНТРА ГЛУТАМИН(АСПАРАГИН)АЗЫ МЕТОДОМ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ. I. МОДЕЛИ ФАРМАКОФОРОВ СУБСТРАТОВ ГЛУТАМИН(АСПАРАГИН)АЗЫ.

А. В. ВЕСЕЛОВСКИЙ, З. И. ЛЕБЕДЕВА, А. С. ИВАНОВ, Т. Т. БЕРЕЗОВ

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН, Москва,
119832, Погодинская ул. 10, факс: (7)(095) 245 08 57

Глутамин(аспарагин)азы (КФ 3.5.1.38) – фермент, катализирующий гидролиз амидной группы L-глутамина и L-аспарагина, а также их D-изомеров, с образованием соответствующих аминокислот и аммиака. В работе построены две модели фармакофоров основных субстратов фермента и их гидролизуемых аналогов. Они отражают две стадии взаимодействия субстратов с активным центром фермента. Эти модели позволяют объяснить широкую субстратную специфичность глутамин(аспарагин)азы.

Ключевые слова: амидогидролаза, глутамин(аспарагин)аза, субстраты, компьютерное моделирование, модель фармакофора

ВВЕДЕНИЕ. Изучение структуры и функции ферментов, метаболизма аминокислот в живых организмах является одним из важных направлений в биохимии. Специфической группой ферментов, участвующих в катаболизме аминокислот, являются амидогидролазы - ферменты, катализирующие гидролиз амидной группы глутамина и аспарагина. Наиболее изученными ферментами этой группы являются L-аспарагиназа (КФ 3.5.1.1) и L-глутаминаза (КФ 3.5.1.2). Однако у некоторых видов микроорганизмов открыты ферменты, способные осуществлять гидролиз как L-аспарагина, так и L-глутамина с сопоставимыми скоростями. Ферменты с такой субстратной специфичностью были выделены в специальную группу и получили систематическое название L-глутамин-(L-аспарагин) амидогидролазы (ГА, КФ 3.5.1.38), рабочее название - глутамин(аспарагин)азы.

В настоящее время выделено в гомогенном состоянии и охарактеризовано около десяти глутамин(аспарагин)аз [1, 2]. Показано, что специфичность действия этих ферментов заметно отличается от специфичности действия как L-аспарагиназ, так и L-глутаминаз. К существенным отличиям следует, прежде всего, отнести довольно близкие значения скоростей гидролиза L-аспарагина и L-глутамина. Для ферментов из различных микроорганизмов скорость гидролиза L-аспарагина варьирует от 41 % до 106 % от скорости гидролиза L-глутамина [1]. Некоторые аспарагиназы обладают способностью катализировать гидролиз L-глутамина.

Однако эта активность у них низка и составляет всего 1-5 % от скорости гидролиза L-аспарагина [3]. Кроме того, глутамин(аспарагин)азы обладает значительно менее выраженной стереоспецифичностью, т.к. наряду с L-изомерами они с достаточно высокой скоростью катализируют гидролиз D-изомеров глутамина и аспарагина [1]. Аспарагиназа, как правило, катализирует гидролиз D-изомеров со скоростью, составляющей 5-10 % от скорости гидролиза L-аспарагина [3]. Еще более высокую избирательность в отношении стереоизомеров субстрата проявляют глутаминазы [4]. Субстратная специфичность глутамин(аспарагин)аз была исследована не только в отношении физиологических субстратов, но и большого количества структурных аналогов, содержащих различные заместители в α -аминогруппе, а также в β - или γ -амидных группах [1].

Интерес к глутамин(аспарагин)азам определяется их субстратной специфичностью и тем обстоятельством, что эти ферменты наделены противоопухолевой активностью в отношении некоторых видов опухолей [5-7].

Выделенный ранее ферментный препарат ГА из *P. aurantiaca* был испытан на способность гидролизировать амидные группы ряда производных глутамина и аспарагина [1, 2, 8]. Установлено, что он с близкими скоростями может гидролизировать L-глутамин и L-аспарагин. Были определены аминокислотный состав, четвертичная структура, молекулярная масса ГА и ее субъединиц, найдены обратимые и необратимые ингибиторы этого фермента. [2, 8]. Однако остаются неясными структурные и некоторые физико-химические свойства ГА, лежащие в основе особенностей ее каталитического действия.

Учитывая эти обстоятельства, в данной работе были построены модели фармакофоров субстратов для выявления структурных особенностей, определяющих их связывание в активном центре фермента.

МЕТОДИКА. В работе использованы данные об эффективности окисления 12 аналогов глутамина и аспарагина, полученные ранее [8]. Структурные формулы субстратов и величины активности фермента представлены в таблице 1.

Моделирование проводилось с использованием молекулярно-графического пакета "SYBYL 6.4" (фирма TRIPOS GmbH, Германия) [9] на графической рабочей станции Indigo 2 (фирма Silicon Graphics).

Построенные модели молекул субстратов были оптимизированы при использовании стандартного поля сил Tripos. Парциальные заряды на атомах были рассчитаны полуэмпирическим квантовомеханическим методом AM1. Расчет конформаций молекул проводился программой MULTISEARCH.

Модели фармакофоров для субстратов ГА были построены с использованием программы DISCO. Построение модели фармакофора в данной программе осуществляется в два этапа. На первом этапе для каждой молекулы проводится расчет конформеров и поиск структурных элементов с определенными физико-химическими свойствами, наиболее часто участвующих в связывании лигандов в активном центре (характерный признак). Такими характерными признаками являются положительно и отрицательно заряженные атомы, циклические группировки в молекулах, донорные и акцепторные атомы, способные образовывать водородные связи. Наличие донорных и акцепторных атомов в лиганде предполагает присутствие соответствующих группировок на молекуле белка на определенном расстоянии и в определенной ориентации по отношению к структуре лиганда. Они также рассматриваются как характерные признаки. На втором этапе происходит непосредственное построение модели фармакофора. Оно осуществляется путем сопоставления характерных признаков каждого лиганда или его конформеров друг относительно друга и поиск такого положения молекул в пространстве, чтобы как можно большее число характерных признаков одного класса совпало бы друг с другом в пределах допустимого интервала расстояний, задаваемого исследователем. Совпадение характерного признака одного класса у

всех тестируемых молекул в одной точке пространства рассматривается как фармакофорная точка. Совокупность всех фармакофорных точек и расстояния

Таблица 1. Субстратная специфичность ГА в реакциях гидролиза [8].

№	СУБСТРАТ	СТРУКТУРА	АКТИВНОСТЬ, %
1	L-глутамин		100
2	L-аспарагин		91
3	D-глутамин		50
4	D-аспарагин		19
5	L-глутамил-γ-моногидроксамат		76
6	L-аспартил-β-гидроксамат		31
7	L-γ-глутамил-п-нитроанилид		0,002
8	6-диазо-5-оксо-L-норлейцин		0,017
9	N _α -ацетил-L-глутамин		0
10	N _α -карбобензокси-L-глутамин		0
11	N _α -карбобензокси-L-аспарагин		0
12	N _α -трет-бутоксикарбонил-L-аспарагин		0

между ними представляют собой модель фармакофора. Анализ полученных моделей проводится по количеству фармакофорных точек модели (обычно их должно быть не меньше трех), величине допуска – максимальное отклонение в расстояниях между фармакофорными точками, которое определяет, насколько характерные признаки в фармакофорной точке совпадают между собой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Одной из особенностей глутамин(аспарагин)азы является то, что этот фермент примерно, с одинаковой скоростью гидролизует два своих основных субстрата, отличающиеся по длине молекулы. Это предполагает, что фермент должен связывать субстраты таким образом, чтобы обеспечить их дезамидирование в достаточно широком интервале размеров молекул. То есть при связывании и гидролизе субстраты и/или активный центр фермента должны претерпевать конформационные переходы, обеспечивающие метаболизм соединений с различной длиной аминокислотного остатка.

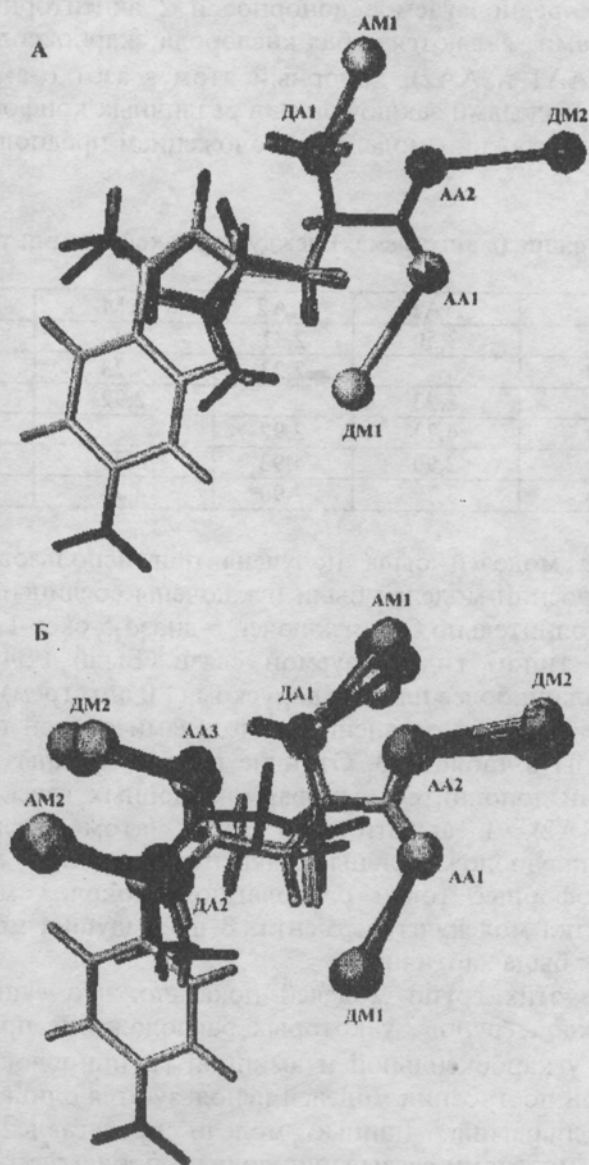


Рисунок.

Фармакофорные модели субстратов глутамин(аспарагин)азы. А - для первой фазы связывания с активным центром фермента; Б - для второй фазы. Обозначения: АА - акцепторный атом, ДА - донорный атом, АМ - акцепторное место на белке, ДМ - донорное место на белке.

Поэтому были построены трехмерные модели фармакофора, описывающие участки молекул лиганда, ответственные за его связывание в активном центре. Для анализа использованные 12 аналогов субстратов глутамина и аспарагина, проверенных на их способность гидролизываться ферментом (см. таблица 1). Полученные модели фармакофоров, можно разбить на две группы. Первая группа (54 модели) построена при включении в анализ 8 субстратов (соединения № 1-8). Соединения с модифицированной α -аминогруппой и не гидролизываемые ферментом не вошли в анализ (соединения № 9-12). Типичная модель из первой группы представлена на рисунке А. Модели состояли из 6 фармакофорных точек с хорошим совпадением между собой (допуск 0,05 ангстрем и среднее расстояние между фармакофорными точками колебалось в моделях от 3,75 до 4,56 ангстрем). Расстояния между фармакофорными точками представлены в таблице 2. Фармакофорными точками в этих моделях являются: 1 донорный и 2 акцепторных атома на лиганде, 1 предполагаемое донорное и 2 акцепторных мест на белке. Акцепторными атомами являются оба кислорода карбоксильной группы (на рисунке обозначены АА1 и АА2), донорный атом - азот α -аминогруппы (ДА1). Разница между этими моделями заключалась в различных конформерах субстратов, использованных при построении моделей и положением предполагаемых донорных и акцепторных мест.

Таблица 2. Расстояния (в ангстремах) между фармакофорными точками в модели А.

	ДА	АА1	АА2	АМ	ДМ1	ДМ2
ДА		3,50	2,31	2,90	3,50	5,16
АА1	3,50		2,23	4,73	2,90	3,79
АА2	2,31	2,23		2,92	4,93	2,90
АМ	2,90	4,73	2,92		6,91	4,73
ДМ1	3,50	2,90	4,93	6,91		6,62
ДМ2	5,16	3,79	2,90	4,73	6,62	

Вторая группа моделей была получена при использовании в анализе 7 субстратов (при построении моделей были исключены соединения № 8-12). В этом случае из анализа дополнительно был исключен 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин (ДОН), обладающий другим типом гидролизываемой связи. Были получены 10 моделей (рисунок Б). Они обладали более плохим допуском (1,0 ангстрем) и большим числом фармакофорных точек (10), по сравнению с моделями первой группы. Расстояния между ними приведены в таблице 3. Отличие второй группы моделей от первой заключается в наличии дополнительных фармакофорных точек: 1 донорный атом (амидный азот - ДА2), 1 акцепторный атом (атом кислорода - АА3) и соответствующие им предположительные 1 акцепторное (АМ2) и 1 донорное место (ДМ3). Эти фармакофорные точки располагаются около амидного азота, т.е. каталитического участка молекулы фермента. В предыдущих моделях локализация этих участков молекул была хаотичной.

Сопоставление этих групп моделей показало, что существует только по одной модели из каждой группы, у которых расположение предполагаемых мест связывания на белке у карбоксильной и аминной группировок при α -углеродном атоме совпадают и при построении моделей используются одинаковые конформеры для глутамина и аспарагина. Данные модели представлены на рисунке. В соответствии с этими моделями связывание должно происходить по группировкам, участвующим в образовании пептидной связи в белках.

Построенные две группы моделей различаются по количеству фармакофорных точек и по величинам допуска. По-видимому, они отражают разные этапы взаимодействия субстратов с активным центром фермента. Первая модель (рис. А) имеет фармакофорные точки, расположенные только у группировок

при α -углеродном атоме субстратов. Это указывает, что связывание происходит только с одного конца субстрата, противоположного месту гидролиза. При этом расположение остальных частей молекул не имеет значения. Эта модель, по-видимому, отражает этап образования фермент-субстратного комплекса, т.е. связывания субстрата с активным центром посредством NH_4^+ и COO^- группами α -углеродного атома субстратов. Ранее были определены величины констант обратимого связывания ДОН и азосерина [10, 11], соединений имеющих одинаковые группировки у α -углеродного атома и отличающиеся химической природой бокового радикала. Эти значения оказались близкими по величине ($1,0 \times 10^{-4}$ и $1,2 \times 10^{-4}$ М, соответственно), подтверждая наше предположение, что первичное связывание этих соединений в активном центре происходит при взаимодействии группировок у α -углеродного атома молекул. Полученная модель предполагает, что в активном центре могут связываться любые соединения, имеющие карбоксильную и аминную группировку у углеродного атома, в частности аминокислоты. Проведенные исследования по термоинактивации ГА в присутствии некоторых аминокислот показывают, что они связываются с ферментом и защищают его от тепловой инактивации [12], что согласуется с предложенной моделью фармакофора.

Таблица 3. Расстояния (в ангстремах) между фармакофорными точками в модели Б.

	ДА1	ДА2	АА1	АА2	АА3	АМ1	АМ2	ДМ1	ДМ2	ДМ3
ДА1		4,30	3,50	2,31	2,51	2,90	5,99	5,12	5,16	4,75
ДА2	4,30		5,71	6,08	2,25	6,50	2,90	4,85	8,89	3,65
АА1	3,50	5,71		2,25	5,17	4,40	7,85	2,90	3,89	7,38
АА2	2,31	6,08	2,25		4,69	3,19	7,77	2,25	2,90	6,64
АА3	2,51	2,25	5,17	4,69		4,85	3,78	5,51	7,58	2,90
АМ1	2,90	6,50	4,40	3,19	4,85		8,61	6,51	4,91	7,32
АМ2	5,99	2,90	7,85	7,77	3,78	8,61		7,14	10,52	2,28
ДМ1	5,12	4,85	2,90	2,25	5,51	6,51	7,14		6,62	7,53
ДМ2	5,16	8,89	3,89	2,90	7,58	4,91	10,52	6,62		9,35
ДМ3	4,75	3,65	7,38	6,64	2,90	7,32	2,28	7,53	9,35	

Вторая модель представляет собой, по-видимому, отражение второго этапа взаимодействия субстрата с активным центром – образование переходного состояния. На это указывает наличие общих точек для всех гидролизующихся соединений в области места гидролиза. Худшее совпадение фармакофорных точек (допуск 1,0 ангстрем вместо 0,05) в этой модели указывает на то, что в процессе образования активного комплекса происходит изменение конформации не только субстратов, но и активного центра ГА. Это позволяет объяснить более широкую субстратную специфичность ГА, по сравнению с аспарагиназой. По-видимому, на первом этапе субстрат связывается в активном центре посредством α -амино- и α -карбоксильных групп у α -углеродного атома молекул. Это взаимодействие приводит к изменению структуры активного центра фермента и конформации лиганда таким образом, что амидная группа субстрата оказывается в непосредственной близости от каталитического участка активного центра (второй этап). Последним этапом является гидролитическое дезамидирование субстрата.

Ранее с использованием реагента Вудварда было определено, что в связывании субстратов принимает участие карбоксильная группа фермента [13]. На основании фармакофорной модели субстратов можно предположить, что эта карбоксильная группа взаимодействует с α -аминогруппой субстрата, и локализовать положение этой группы относительно расположения субстратов в активном центре.

Таким образом, в результате проведенного исследования на основании данных по субстратам и их аналогам получены модели фармакофоров активного центра ГА, описывающие различные стадии взаимодействия субстратов с активным

центром фермента. Полученные модели могут быть использованы для поиска новых субстратов и ингибиторов этого фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-50497).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лебедева З.И., Березов Т.Т. (1995) Усп. биол. химии, **35**, 161-187.
2. Лебедева З.И., Березов Т.Т. (1995) Вестник РАМН, N 2, 57-61.
3. Wriston J.C. (1985) *Methods Enzymol.*, **113**, 608-618.
4. Козлов Е.А., Коваленко Е.А. (1972) Усп. биол. химии, **13**, 49-79.
5. Schmid F.A., Roberts J. (1974) *Cancer Chemother. Rep.*, **251**, 829-840.
6. Rosenfeld H., Roberts J. (1981) *Cancer Res.*, **41**, 1324-1328.
7. Roberts J., Gregor W.G. J. (1991) *Gen. Virol.*, **72**, 299-305.
8. Лебедева З.И., Кабанова Е.А., Березов Т.Т. (1986) *Биохимия*, **51**, 293-301.
9. SYBYL 6.4. Tripos Inc. 1699 South Hanley Road. St. Louis. Missouri. 63144. USA.
10. Кабанова Е.А., Лебедева З.И., Березов Т.Т. (1986) *Биохимия*, **51**, 432-441.
11. Lebedeva Z.I., Kabanova E.A., Berezov T.T. (1986) *Biochem. Int.* **12**, 413-420.
12. Кабанова Е.А., Лебедева З.И., Березов Т.Т. (1985) *Вопр. мед. химии*, **31**, 31-36.
13. Лебедева З.И., Кабанова Е.А., Березов Т.Т. (1988) *Бюлл. экспер. биол. и мед.* **4**, 426-429.

Поступила 21. 01. 99.

INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF CATALITICAL ACTION AND ACTIVE SITE STRUCTURE OF GLUTAMINE(ASPARAGIN)ASE BY METHODS OF COMPUTER ANALYSIS. I. PHARMACOPHORE MODELS OF GLUTAMINE(ASPARAGINE) ASE SUBSTRATES.

A.V. VESELOVSKY, Z. I. LEBEDEVA, A.S. IVANOV, T.T. BEREZOV.

Institute of Biomedical Chemistry, PAMS, Moscow, 119832, Pogodinskaya str,10,
FAX (7)(095)2450857.

Glutamine(asparagine)ase catalyses desamidation of both L-glutamine and L-asparagine, and their D-isomers. In this study the two-pharmacophore models of main enzyme substrates and their hydrolysed analogues were design. The received models reflect two stage of substrate interaction with the enzyme active site. These models allow to explain the wide substrate specificity of glutamine(asparagine)ase.

Key words: amidohydrolase, glutamine(asparagine)ase, substrates, computer modelling, pharmacophore model