

ПОВНЕ КОНФОРМАЦІЙНЕ СІМЕЙСТВО 2',3'-ДИДЕГІДРО-2',3'-ДИДЕЗОКСИГУАНОЗИНУ: КВАНТОВО-ХІМІЧНЕ ТА ЕЛЕКТРОННО-ТОПОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

© А. Г. ПОНОМАРЬОВА¹, Є. П. ЮРЕНКО^{1,2,3},
Р. О. ЖУРАКІВСЬКИЙ^{1,2}, Д. М. ГОВОРУН^{1,2,3}

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ;
e-mail: yevgen.yurenko@gmail.com;

²Науковий та освітній центр «Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології», Київ, Україна;

³Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
Інститут високих технологій, Україна;
e-mail: dhovorun@imbg.org.ua

Вперше на рівні теорії MP2/6-311++G(d,p)//DFT B3LYP/6-31G(d,p) проведено повний конформаційний аналіз 2',3'-дидегідро-2',3'-дидезоксигуанозину (d4G), біологічно активного нуклеозиду – інгібітора ВІЛ-зворотної транскриптази (ЗТ). Представлено основні геометричні, енергетичні та полярні характеристики знайдених 20 конформерів, а також основні конформаційні рівноваги за нормальних умов. Встановлено, що d4G стабілізується дев'ятьма типами внутрішньомолекулярних специфічних зв'язків: O5'H...N3, O5'H...C8, C8H...O5', C2'H...N3, C5'H1...N3, C5'H2...N3, C8H...H1'C5', C8H...H2'C5' та N2H1...O5'. Одержані результати підтверджують, що біологічна активність d4G пов'язана з термінацією синтезу полінуклеотидного ланцюга у напрямку 5'-3' шляхом конкуренції з канонічним 2'-дезоксигуанозиним за зв'язування із активним центром ензиму.

Ключові слова: 2',3'-дидегідро-2',3'-дидезоксигуанозин, конформаційний аналіз, квантово-хімічні розрахунки, водневі зв'язки, біологічна активність.

В основі внутрішньоклітинної активності вірусу імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1), що спричинює захворювання на СНІД, лежить функціонування ензиму зворотної транскриптази (ЗТ), що транскрибує одноланцюгову вірусну РНК у двоспіральну ДНК, яка в подальшому вбудовується в геном клітини-господаря. Нуклеозиди – інгібітори ЗТ (нині існує декілька десятків таких сполук [1, 2]), належать до найбільш широко використовуваних в клінічній практиці препаратів [1]. На разі вичерпно досліджено кількісну залежність між структурою та активністю (QSAR) нуклеозидів (див., напр., [3]), а також розглянуто можливість використання їх не лише як анти-ВІЛ-агентів [4], але й інгібіторів реплікації вірусу гепатиту В [5], протипухлинних препаратів [6], інгібіторів аденилат циклази [7] тощо. Проте актуальним залишається питання токсичності цих препаратів (так, зокрема, інгібітори ЗТ можуть вступати у взаємодії з мітохондріальною полімеразою γ [8]) та резистентності вірусів, спричиненої мутаціями [9, 10]. У зв'язку з цим постає проблема пошуку нових нуклеозидних агентів, які відрізняються від

існуючих своїм метаболізмом, а також показниками токсичності та відсутності до них резистентності вірусів.

Важливу роль у терапії СНІДу відіграють 2',3'-дидегідро-2',3'-дидезоксинуклеозиди, в яких нема гідроксильної групи у положенні 3' [11]. Після активації клітинними кіназами та входження в активний трифосфат – зв'язувальний сайт ЗТ, вони слугують термінаторами вірусної реплікації [11]. Серед представників цього класу лише 2',3'-дидегідро-2',3'-дидезокситимідин (d4Т, ставудин) зареєстрований та застосовується як лікарський препарат. Дослідження показали, що d4Т є менш токсичним, аніж AZТ [12], добре абсорбується і виводиться з організму в немодифікованому вигляді [13]. Крім того, резистентність ВІЛ-1 до d4Т є досить низькою, оскільки ЗТ не здатна розрізнити трифосфати тимідину (dTTP) та d4Т (d4TTP), що зумовлює високу ефективність інкорпорації останнього в ДНК [14].

Інші 2',3'-дидегідро-2',3'-дидезоксинуклеозиди, які містять канонічні основи ДНК (d4G, d4C та d4A), також розглядають як потенційні інгібітори ЗТ [15], проте механізми

їхньої активності залишаються недостатньо дослідженими. Так, зокрема, досліді *in vitro* показали, що d4G, на відміну від d4T, d4C та d4A [16] характеризується досить низькими показниками активності по відношенню до ВІЛ-1 [17], проте навіть незначна його модифікація, як, наприклад, заміна аміногрупи на циклопропіламіногрупу в положенні 2, істотно підвищує розчинність, стабільність та ліпофільність і зменшує токсичність, перетворюючи його на вельми ефективний антивірусний агент [18].

Відомо, що для активації нуклеозидний препарат має пройти декілька стадій біомолекулярного впізнавання, взаємодіючи з протеїнами-рецепторами, транспортерами, фосфорилуючись кіназами та/або 5'-нуклеотидазами і у формі нуклеозидтрифосфату розпізнатися мішенню – активним центром ензиму [19, 20]. Загалом нуклеозидні аналоги конкурують із канонічними нуклеозидами за зв'язувальні сайти ензимів [21]. На кожній із вищезгаданих стадій вони набувають унікальної тривимірної молекулярної структури (конформації), яка *a priori* невідома [22]. Знання конформаційної «ємності», тобто повного набору усіх можливих конформерів, є неодмінною запорукою ефективного дизайну біологічно активних препаратів. Рентгеноструктурні дослідження d4G [23] засвідчують, що конформації d4G та d4A [24] в

кристалічному стані мають high-anti орієнтацію основи відносно цукрового залишку, істотно відрізняючись орієнтацією гідроксильної групи в положенні 5'. Наші нещодавні квантово-хімічні дослідження [25] показали, що повне конформаційне сімейство d4A містить 21 конформер (серед яких один є ДНК-подібним), які стабілізуються вісьмома типами специфічних внутрішньомолекулярних зв'язків: O5'H...N3, O5'H...C8, C8H...O5', C2'H...N3, C5'H1...N3, C5'H2...N3, C8H...N1C5' та C8H...N2'C5'.

Мета роботи – визначити повне конформаційне сімейство d4G та дослідити природу специфічних внутрішньомолекулярних взаємодій, які стабілізують його можливі конформери. Ця інформація дозволить знайти відмінності між конформаційними властивостями d4G та d4A [25], а також виокремити потенційно активні структури, що у подальшому будуть використані для молекулярно-динамічного моделювання докінгу в системі «ензим-субстрат».

Матеріали і методи

Просторова будова молекули d4G, нумерація її атомів та позначення торсійних кутів [26] зображено на рис. 1.

Для вивчення конформаційної ємності d4G використано теорію функціоналу густини (DFT) із застосуванням гібридного обмінно-кореляційного функціонала в уза-

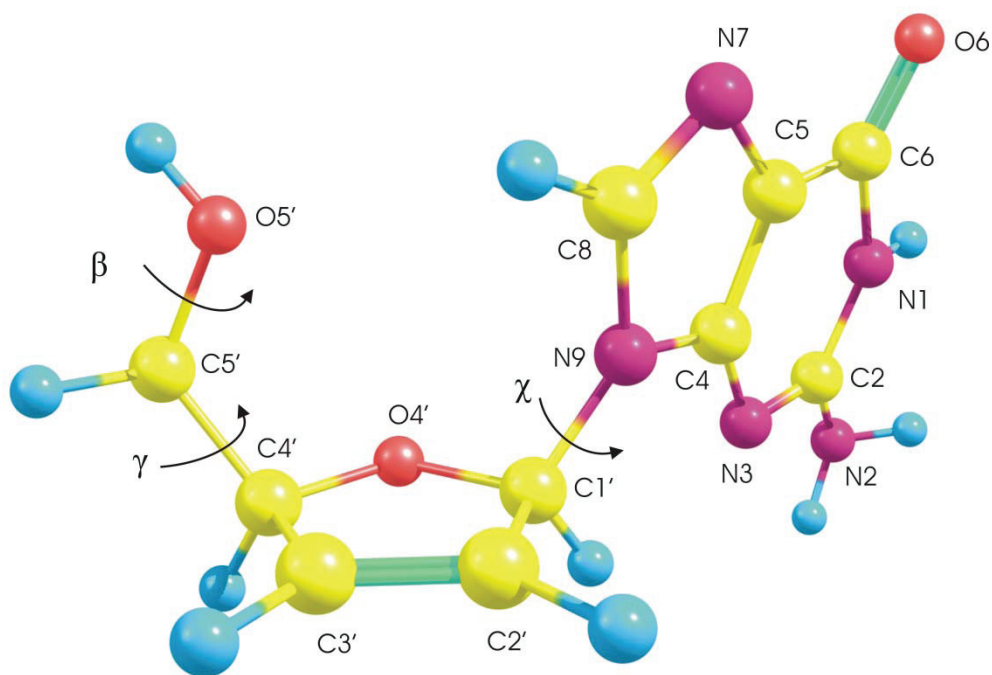


Рис. 1. Просторова будова, нумерація атомів та номенклатура торсійних кутів d4G

гальненому градієнтному наближенні V3LYP. Оптимізацію геометрії здійснювали із використанням набору базисних функцій 6-31G(d,p). Усі зоптимізовані конформери перевірено на стійкість за відсутністю уявних частот в їхніх коливальних спектрах, які одержані на згаданому рівні теорії у гармонійному наближенні. Розрахунок електронних енергій в одній точці проводили у наближенні теорії збурень Меллера-Плесета другого порядку MP2, яке краще, ніж DFT враховує ефекти електронної кореляції, з базисом 6-311++G(d,p). Значення відносної вільної енергії Гіббса ΔG для конформерів визначали як суму електронної енергії на рівні MP2 та поправки на рівні V3LYP, яка включає енергію нульових коливань, а також термічний та ентропійний внески. Для одержання повного конформаційного сімейства d4G ми оптимізували 36 стартових структур, які згенерували шляхом перебору трьох діапазонів значень для конформаційних змінних γ та β , що дозволяють побудувати незатулені структури, а також чотирьох діапазонів (syn, anti, high-syn та high-anti) для змінної χ .

Внутрішньомолекулярні водневі (H) зв'язки ідентифікували методом квантово-механічного аналізу топології електронної густини за Бейдером [27], використовуючи програмний пакет AIMAll [28]. Хвильові функції розраховано на рівні теорії DFT V3LYP/6-31G(d,p), що відповідає рівноважним геометріям конформерів. Наявність критичної точки (3,-1) між воднем та атомом-акцептором та позитивний знак лапласіана електронної густини вважали необхідними умовами наявності H-зв'язку. Крім того, усі контакти-кандидати на H-зв'язок перевіряли за геометричними та додатковими електронно-топологічними критеріями.

Енергію класичних (O5'H...N3 та N2H1...O5') H-зв'язків оцінювали за емпіричною формулою Йогансена [29]:

$$-\Delta H_{\text{freq}} = 0,33(\Delta\nu - 40)^{1/2}, \quad (1)$$

де $-\Delta H$ – енергія H-зв'язку (ккал/моль), $\Delta\nu$ – зсув частоти (cm^{-1}) валентного коливання $\nu(\text{OH})$ у червону область за наявності H-зв'язку. При цьому використано процедуру вибіркового дейтерування, що дозволило чітко виокремити бажані коливальні моди в ІЧ-спектрі. Для порівняння брали структурно найближчі конформери без відповідного H-зв'язку.

Інший метод (Еспінози–Молінса–Леконта, надалі – ЕМЛ [30]) дозволив нам оцінити енергію всіх H-зв'язків на основі розподілу

електронної густини в його критичній точці (3,-1) за формулою:

$$\text{ENB} = 0,5V(r), \quad (2)$$

де $V(r)$ – значення локальної потенціальної енергії в критичній точці (3,-1).

Усі квантово-механічні розрахунки проведено з використанням програмного пакету «GAUSSIAN03» для платформи Win32.

Результати та обговорення

Конформаційно-енергетичні характеристики d4G. Конформаційний аналіз засвідчив, що ізольований d4G має 20 конформерів (табл. 1), що займають діапазон відносних енергій Гіббса 0–5,16 ккал/моль за кімнатної температури ($T = 298,15$ K). Це невелике сімейство порівняно з канонічними 2'-дезоксидеокси- (канонічний 2'-дезоксигуанозин (dG) має 96 стійких конформерів [31, 32]) і рибонуклеозидами [33] та їхніми аналогами, модифікованими за нуклеотидною основою [34]. Пояснити цей факт можна тим, що саме залишок 2'-дезоксирибози є основним джерелом їхньої структурної лабільності. В d4G доволі жорсткий залишок 2,5-дигідрофурану набуває практично пласкої конфігурації, що узгоджується також із попередніми даними рентгеноструктурного аналізу [35]. Відзначимо, що величина максимальної амплітуди вигину цукрового кільця ν_{max} для конформерів d4G лежить в інтервалі $0,1^{\circ}$ – $9,0^{\circ}$, тобто є суттєво меншою порівняно з dG ($27,9^{\circ}$ – $38,7^{\circ}$ на рівні теорії V3LYP/6-31G(d,p) [32]).

Syn-орієнтація нуклеотидної основи відносно цукру зафіксована у 7 конформерах ($30,1^{\circ} \leq \chi_{\text{syn}} \leq 71,7^{\circ}$), 6 конформерів мають *anti*-орієнтацію ($-177,8^{\circ}; -177,8^{\circ} \leq \chi_{\text{anti}} \leq -115,8^{\circ}$), а 9 – характеризуються *high-anti*-орієнтацією ($-115,8^{\circ} \leq \chi_{\text{anti}} \leq -98,9^{\circ}$) (рис. 2). Тобто у d4G, на відміну від dG, виявляється чітка тенденція до *high-anti*-орієнтації основи відносно цукру. Крім того, у цукровому залишку реалізуються усі 9 можливих комбінацій торсійних кутів γ та β .

Торсійний кут γ (рис. 2), який визначає орієнтацію метиленової групи CH_2OH цукрового залишку, лежить у трьох доволі вузьких секторах: g^+ ($39,1^{\circ} \leq \gamma_{g^+} \leq 59,6^{\circ}$) (5 конформерів), t ($156,6^{\circ} \leq \gamma_t \leq 178,3^{\circ}$; $-179,3^{\circ} \leq \gamma_t \leq -170,1^{\circ}$) (8 конформерів) і g^- ($-68,3^{\circ} \leq \gamma_{g^-} \leq -65,4^{\circ}$) (7 конформерів).

Тримодальний розподіл також має місце і для кута β (рис. 2), який займає ті ж самі сектори g^+ , t і g^- : g^+ ($44,9^{\circ} \leq \beta_{g^+} \leq 83,6^{\circ}$) (9 конформерів), t ($-178,8^{\circ} \leq \beta_t \leq 155,8^{\circ}$) (5 конформерів) і g^- ($-75,2^{\circ} \leq \beta_{g^-} \leq -55,7^{\circ}$) (6 конформерів).

Таблиця 1. Енергетичні, структурні та полярні характеристики усіх можливих конформерів d4G, одержані на рівні теорії MP2/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31G(d,p)

Конформер	$\Delta G_{298,15}$, ккал/моль	d, D	P, град.	v_{max} , град.	χ , град.	γ , град.	β , град.	τ_{max} , град.
1	0,00	5,65	100,3	8,5	53,5	39,1	44,9	1,0
2	2,00	7,72	57,4	3,0	-103,2	59,6	64,4	1,8
3	2,55	7,11	281,9	1,1	-100,5	174,9	-55,7	1,7
4	3,00	6,72	51,9	1,0	-115,8	45,0	155,8	1,9
5	3,11	5,45	332,3	1,0	-98,9	-66,2	-178,8	1,8
6	3,19	6,57	135,9	2,7	69,4	174,5	-56,3	1,7
7	3,72	7,82	69,9	0,1	173,1	47,6	60,7	1,2
8	4,03	7,57	66,4	1,5	-100,4	-65,8	-75,2	1,7
9	4,31	7,20	116,2	2,7	71,7	-67,5	-176,1	2,0
10	4,42	5,53	301,6	1,6	-100,1	-170,1	-163,3	1,9
11	4,54	7,10	154,7	1,2	69,5	-65,4	-72,5	1,7
12	4,55	6,42	2,2	0,6	-100,0	-67,6	83,0	1,8
13	4,78	8,75	124,4	2,3	-132,3	50,5	-61,6	2,1
14	5,00	5,62	218,8	4,9	30,1	156,6	-62,0	2,7
15	5,43	7,75	264,1	9,0	-177,8	178,3	-173,6	1,8
16	5,53	7,94	229,8	0,3	-172,3	-68,3	83,6	2,0
17	5,61	6,71	134,9	2,4	69,0	-67,8	78,4	1,6
18	5,66	8,18	71,1	1,2	-103,4	-179,0	61,8	1,9
19	6,01	9,10	261,8	8,4	-174,6	168,9	56,8	1,9
20	6,23	8,29	140,9	2,2	67,8	-179,3	60,4	1,6

Позначення кутів P, v_{max} , χ , γ і β – стандартні [26], величини наведено в градусах; ΔG – відносна вільна енергія Гіббса за температури T = 298,15 K, ккал/моль; D – дипольний момент, дебаї; τ_{max} – максимальне значення серед усіх торсійних кутів всередині пуринового кільця, відмінних від нуля, градуси. Структурні характеристики одержано методом DFT B3LYP/6-31G(d,p), а енергетичні – методом MP2/6-311++G(d,p)//DFT B3LYP/6-31G(d,p). Конформації пронумеровано в порядку зростання їхньої відносної енергії Гіббса, ΔG .

Окрім розподілу конформаційних змінних, ми дослідили також тонкі структурні закономірності у конформерах d4G – мінливість довжин хімічних зв'язків, величин валентних кутів, торсійних кутів, що описують неплоскість гетероциклу основи та вихід глікозидного зв'язку із середньої площини гетероциклу основи.

Гетероцикл нуклеотидної основи у складі нуклеозиду, строго кажучи, є непласким: внутрішньоциклові торсійні кути лежать у межах $1,0^\circ \div 2,7^\circ$. Раніше за допомогою неемпіричної молекулярної динаміки Кара-Парініелло було встановлено, що канонічні ізольовані основи ДНК мають непланарну ефективну конформацію, при цьому заселеність пласкої конфігурації піримідинового кільця не перевищує 30% [36].

Іншою структурною особливістю конформерів d4G є відносно невеликий вихід

глікозидного зв'язку C1'N9 із середньої площини імідазольного кільця основи. Середньою площиною кільця вважається площина, проведена через його атоми за методом найменших квадратів. Згідно з отриманими результатами кут виходу зв'язку C1'N9 із площини імідазольного кільця основи змінюється від $0,2^\circ$ до $4,0^\circ$.

Також нами встановлено, що модуль кута між екзоциклічним зв'язком C2N2 амінного фрагмента та площиною шестичленного кільця основи змінюється в межах $1,0^\circ \div 2,8^\circ$. При цьому значення кутів між зв'язком C2N2 та площиною аміногрупи лежать у межах $34,1^\circ \div 39,9^\circ$ залежно від конформації. Отже, екзоциклічний фрагмент основи CNH2 є істотно пірамідалізованим.

Пошук кореляцій між конформаційними змінними засвідчив, що торсійні кути γ , β та χ практично не корелюють між собою (значення

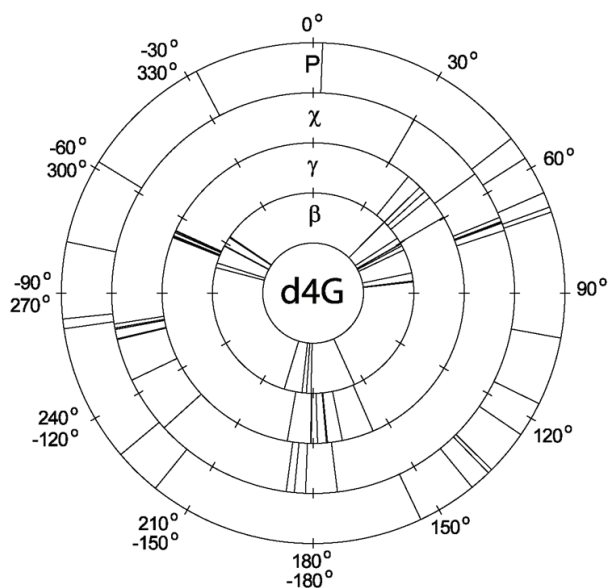


Рис. 2. Конформаційне «колесо» для трьох основних торсійних кутів d4G: χ , γ та β , а також кута псевдообертання ρ

відповідних коефіцієнтів лінійної кореляції не перевищує по модулю 0,26).

Кількість конформерів у повному сімействі d4G (20 структур) виявилась дещо меншою, ніж теоретично очікувана, отримана перебором усіх можливих комбінацій торсійних кутів (36 структур). На нашу думку, цей факт можна пояснити існуванням доволі сильних Н-зв'язків типу C8H...O5' та O5'H...N3, які завдяки своєму стабілізуючому впливу «виморожують» потенційні конформери без відповідних Н-зв'язків. Крім того, велику роль можуть відігравати й інші види взаємодій, зокрема, електростатичні.

Спираючись на енергетичні характеристики всіх без винятку конформерів d4G, ми чисельно охарактеризували конформаційні рівноваги. Виявилось, що рівновага syn:anti значно зсунута за кімнатної температури в бік syn конформерів (syn:anti = 94,0%:6,0%). Що ж стосується підсімейств цукрового залишку, то розподіл має інший характер, ніж для канонічного dG [32]: O4'-endo (93,4%), C4'-exo (4,1%), O4'-exo (1,3%), C2'-exo (0,6%), C1'-exo (0,5%), C1'-endo (0,1%). Загалом же співвідношення E : N : S : W є таким – 97,6% : 0,5% : 0,5% : 1,4%. Це можна пояснити відсутністю енергетичних бар'єрів у разі зміни конформації цукрового кільця молекули d4G, внаслідок чого кут псевдообертання може набувати практично довільних значень.

Конформери з $\gamma \in g^+$ (97,5%) сильно домінують над конформерами з $\gamma \in t$ (1,8%) та конформерами з $\gamma \in g^-$ (0,7%). Ситуація з кутом β аналогічна: структури з $\beta \in g^+$ (96,9%) вносять найсуттєвіший внесок у заселеність порівняно з $\beta \in g^-$ (1,9%) та $\beta \in t$ (1,2%).

Чотири енергетично найвигідніші конформери d4G зображено на рис. 3. Глобальному мінімуму на енергетичному ландшафті d4G відповідає конформер **1** syn/O4'-endo (табл. 1, рис. 3), який стабілізується двома доволі міцними Н-зв'язками: N2H...O5' та O5'H...N3.

Порівняння результатів розрахунків із даними рентгеноструктурного аналізу [23] засвідчує (табл. 2), що в кристалі реалізується конформер **13** ($\Delta G = 4,78$ ккал/моль), який не є ні енергетично найвигіднішим, ні ДНК-подібним. Слід зазначити, що в кристалічній комірниці він сильно деформується порівняно з вільним станом завдяки міжмолекулярним взаємодіям (особливо відчутно змінюються значення кутів ρ та χ).

Важливо відзначити, що повне конформаційне сімейство d4G містить лише один конформер **4** ($\Delta G = 3,00$ ккал/моль), який можна умовно вважати ДНК-подібним – $\chi \in anti$, $\gamma \in g^+$, $\beta \in t$ (при цьому, на відміну від канонічного dG, у ньому відсутні номенклатурні кути δ та ϵ). Він стабілізується Н-зв'язком C8H...O5' з енергією 2,93 ккал/моль.

Щоб краще зрозуміти конформаційний вплив на можливі механізми біологічної активності d4G, ми розрахували дві структури з фіксованим кутом χ для $\chi = -158,5^\circ$ та $\chi = -102,4^\circ$, що відповідають так званім «ідеальним» (усередненим на основі даних ЯМР та рентгеноструктурних досліджень) значенням цього кута в А- та В-формах ДНК [37]. Виявилось, що В-ДНК-подібна структура має меншу відносну вільну енергію ΔG , ніж конформер **4** 2,02 ккал/моль порівняно з 3,00 ккал/моль (табл. 3). Що ж стосується А-ДНК-подібної структури, то її відносна енергія становить 4,51 ккал/моль (тобто на 1,51 ккал/моль більше, ніж у конформера **4**). Обидві структури з фіксованим кутом χ теж мають Н-зв'язок C8H...O5', який є відповідальним за збереження взаємної орієнтації основи і цукру, тому, ймовірно, розпізнається полімеразами в процесі біосинтезу ДНК [38]. Отже, з конформаційної та енергетичної точок зору немає жодних перешкод для інкорпорації нуклеотиду d4G у структуру подвійної спіралі ДНК. Це підтверджує точку зору, яка існує [11], про те, що біологічна активність d4G зумовле-

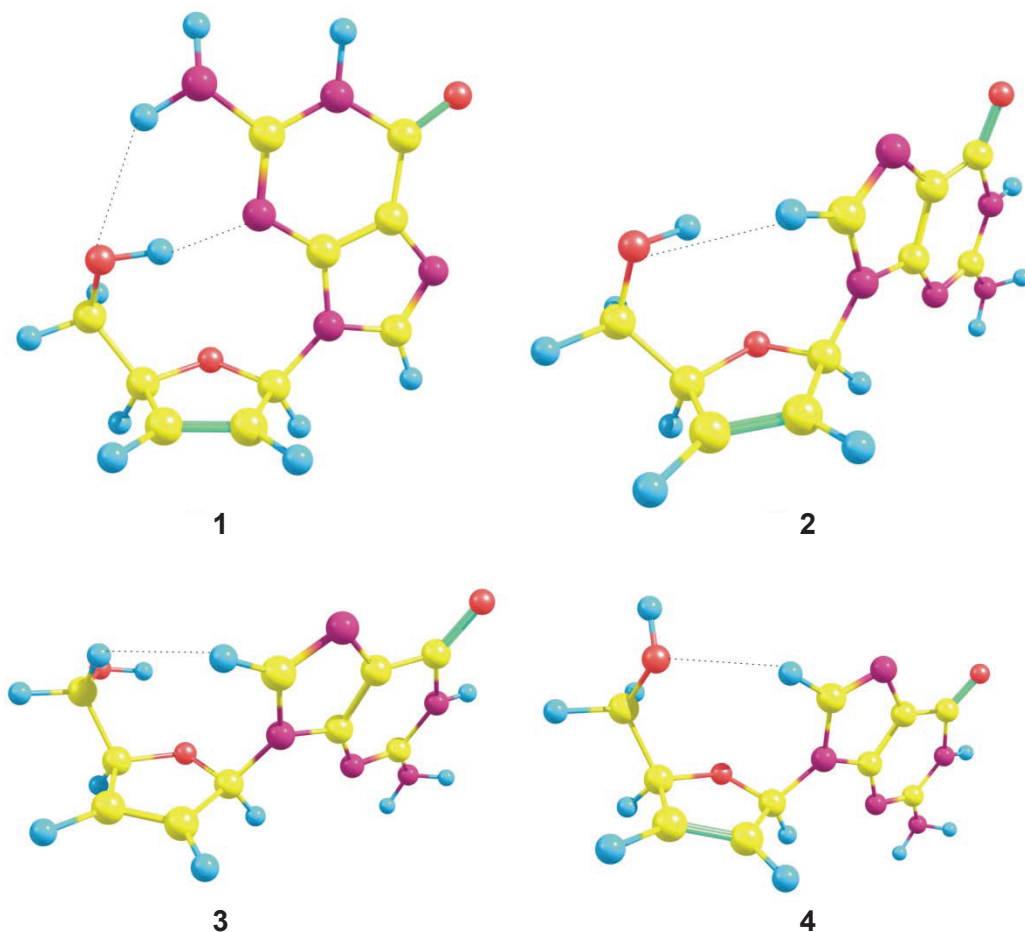


Рис. 3. Просторова структура чотирьох енергетично найвигідніших конформерів (1, 2, 3 та 4) d4G. Пунктиром позначено внутрішньомолекулярні Н-зв'язки

на, в першу чергу, відсутністю гідроксильної групи в С3'-положенні. Таким чином, d4G, як і d4A, є конкурентним інгібітором оберненої транскриптази, принцип дії якого полягає у термінації процесу біосинтезу дочірнього полінуклеотидного ланцюга в напрямку 5'-3'. Відмінність між d4A та d4G полягає в тому, що перший, згідно з тестуванням *in vitro* [17], є ефективнішим інгібітором ЗТ. Оскільки конформаційні та енергетичні властивості d4G та d4A є дуже подібними, цей факт неможливо пояснити, спираючись виключно на результати квантово-хімічних розрахунків. Тому для глибшого з'ясування механізмів біологічної активності необхідно дослідити взаємодію нуклеозидтрифосфатів d4G та d4A зі ЗТ гібридним методом QM/MM [39]. Цьому буде присвячено нашу наступну роботу.

Специфічні внутрішньомолекулярні зв'язки. У 20 конформерах d4G зафіксовано 9 типів (табл. 4) специфічних внутрішньомолекулярних взаємодій (їх за-

Таблиця 2. Порівняння даних рентгеноструктурного аналізу d4G з результатами квантово-хімічних розрахунків

Конформер	<i>P</i>	χ	γ	β
13 ^a	124,4	-132,3	50,5	-61,6
d4A ^b	244,0	-94,2	47,5	-72,1

Позначення кутів ті самі що й у табл. 1 та на рис. 1. ^aРозрахований конформер 13. ^bКонформер, що спостерігається у кристалічному стані [23]. Розрахунок на рівні теорії B3LYP/6-31G(d,p)

гальна кількість – 24): O5'Н...N3 (2 конформери), O5'Н...C8 (1), C8Н...O5' (4), C2'Н...N3 (2), C5'Н1...N3 (2), C5'Н2...N3 (3), C8Н...Н1'С5' (5), C8Н...Н2'С5' (3) і N2Н1...O5' (2). Усі вони, крім контактів СН...НС, задовольняють геометричним та електронно-топологічним критеріям Н-зв'язування [40]. Перші вісім типів взаємодій ідентифіковано також у конформерах d4A [25]. Крім того, в d4G присутній класичний

Таблиця 3. Енергетичні та конформаційні характеристики ДНК-подібного конформера d4G 4 та частково оптимізованих структур з фіксованим кутом χ , що відповідає BI (-158,5°) та AI (-102,4°) формам ДНК [37]

Структура	D	P	v_{\max}	χ	γ	β	τ_{\max}	l (C1'-N9)	$\Delta G_{298,15}$
Конформер 4	6,72	51,9	1,0	-115,8	45,0	155,8	1,9	1,459	3,01
A-ДНК	7,47	75,5	4,3	-158,9	49,6	170,7	2,0	1,468	4,51
B-ДНК	6,54	285,5	1,6	-101,9	45,0	150,8	1,93	1,458	2,02

Позначення D, P, v_{\max} , χ , γ , β , τ_{\max} , τ_1 і $\Delta G_{298,5}$ ті самі, що й в табл. 1; l (C1'-N9) – довжина глікозидного зв'язку (Å).

H-зв'язок N2H1...O5' за участю аміногрупи в положенні 2 (конформери **1** та **14**). Зазначимо, що більшість конформерів (14 із 20) містить один специфічний внутрішньомолекулярний зв'язок, п'ять конформерів – по два зв'язки. Лише в одному конформері **16** специфічні внутрішньомолекулярні зв'язки відсутні. Відзначимо, що у конформаційно лабільнішому нуклеозиді dG [41] зафіксовано 15 типів H-зв'язків. Загалом взаємодії у d4G можна віднести до трьох категорій: класичні (OH...N, NH...O), слабкі (CH...O, OH...C, CH...N) водневі зв'язки та, так звані, двоводневі контакти CH...HC. Характерною ознакою останніх є те, що в них взаємодія відбувається між атомами водню різних груп СН. Вони, в принципі, можуть належати як до слабких H-зв'язків, так і до ван-дерваальсових взаємодій. Слабкі зв'язки CH...HC раніше досліджувались в амінокислотах та асоціатах органічних молекул [42, 43], і нині їхня природа інтенсивно вивчається переважно квантово-хімічними методами [44]. Також зазначимо, що всі без винятку H-зв'язки утворюються між основою та цукровим залишком, тобто, на відміну від канонічного dG [41], у d4G немає жодного внутрішньоцукрового H-зв'язку.

Дослідження геометричних та енергетичних (методом ЕМЛ) характеристик усіх типів H-зв'язків дозволяє класифікувати зв'язки O5'H'...N3 у конформерах **1** та **14** як середні за міцністю згідно з критеріями Джеффри [45] ($E = 10,11$ та $6,31$ ккал/моль за методом ЕМЛ і $6,48$ та $4,75$ ккал/моль за формулою Йогансена), інші ж типи H-зв'язків ($0,28 \leq E \leq 2,93$ ккал/моль) можна віднести до слабких. Привертає увагу той факт, що лише два типи H-зв'язків (N2H1...O5' і O5'H'...N3 у конформерах **1** та **14**) проявляються в коливальному спектрі d4G (табл. 5). Цікаво, що конформер **14**, незважаючи на стабілізацію двома доволі міцними H-зв'язками, є високоенергетичним

($\Delta G=5,00$ ккал/моль). Це може свідчити про наявність сильних дестабілізуючих взаємодій, зокрема електростатичного відштовхування, яке у конформері **1** компенсується більш міцним H-зв'язком O5'H'...N3.

Значення електронної густини ρ для H-зв'язків лежать у межах $0,002 \div 0,045$ а.о., а лапласіану електронної густини $\nabla^2\rho$ – $0,008 \div 0,109$ а.о., що дещо розширює межі, постульовані раніше Кохом і Попельє [40]. Слід відзначити, що більшим значенням ρ і $\nabla^2\rho$ відповідають дещо сильніші H-зв'язки. Цей висновок узгоджується з існуючими літературними даними (див., наприклад, [46] і наведену там бібліографію).

Оскільки водень є найлегшим атомом, то такі ефекти як нульові коливання, ангармонізм та квантове тунелювання можуть відігравати важливу роль у формуванні H-зв'язків [47]. Розрахунки методом молекулярної динаміки, який ґрунтується на обчисленні інтегралів за траєкторіями, дозволили встановити для значної кількості H-зв'язків таку закономірність [47]: внаслідок врахування квантових ефектів слабкі зв'язки стають ще слабшими, а міцні зв'язки посилюються. Тому, строго кажучи, наведені нами значення енергій H-зв'язків у d4G можуть в майбутньому бути уточнені.

Вісім взаємодій $C_{sp}^2-H \cdots H-C_{sp}^3$ у d4G, які спостерігаються виключно в суп-конформерах, не задовольняють повною мірою геометричні критерії H-зв'язування, тому їхня природа потребує подальших досліджень. Раніше було показано [48], що контакти CH...HC в тимідині задовольняють квантово-механічному критерію взаємної проникності, який є аналогом вищезгаданої класичної вимоги $\Sigma \gamma^{vdw} > d_{H \cdots B}$. Відзначимо, що для двоводневих зв'язків CH...HC відстані між критичними точками VCP (3,-1) та RCP (так звана кільцева критична точка, (3,+1)) є доволі ма-

Таблиця 4. Геометричні, енергетичні та електронно-топологічні характеристики внутрішньомолекулярних взаємодій в усіх можливих конформерах d4G

Конформер / $\chi/\beta/\gamma$	H-зв'язок	d(A...B), Å	d(H...B), Å	\angle АНВ, degrees	ρ , a.u.	$\nabla^2 \rho$, a.u.	100-ε, a.u.	-E, kcal/mol	d(BCSP-RCP), Å
1	syn/g ⁺ /g ⁺	3,234	2,398	139,1	0,010	0,036	57	2,21	0,490
		2,738	1,766	167,5	0,045	0,109	5	10,11	1,064
2	anti/g ⁺ /g ⁺	3,319	2,634	120,7	0,008	0,030	132	1,42	0,964
		3,327	2,672	118,6	0,003	0,010	7	0,36	0,530
3	anti/g ⁻ /t	3,295	2,345	145,7	0,013	0,038	7	2,93	1,045
		3,335	2,713	116,2	0,003	0,009	5	0,34	0,494
4	anti/t/g ⁺	3,614	2,673	143,3	0,008	0,024	1	1,41	0,947
		3,657	2,727	161,4	0,006	0,019	26	0,81	0,536
5	anti/t/g ⁻	3,161	2,660	107,6	0,009	0,031	43	1,56	0,548
		3,448	2,786	119,4	0,002	0,008	24	0,28	0,360
6	syn/g ⁺ /g ⁺	3,684	2,751	142,5	0,007	0,020	3	1,16	0,898
		3,286	2,696	113,9	0,003	0,010	10	0,36	0,499
7	syn/t/g ⁻	3,548	2,606	144,0	0,009	0,026	1	1,62	0,956
		3,369	2,747	116,4	0,003	0,008	5	0,32	0,481
8	anti/g ⁺ /g ⁺	3,318	2,312	154,0	0,014	0,039	5	3,19	0,951
		2,826	2,000	140,8	0,028	0,074	8	6,31	0,872
9	syn/g ⁻ /t	3,284	2,414	143,2	0,010	0,034	30	2,31	0,574
		3,055	2,611	103,8	0,004	0,016	41	0,58	0,223
10	anti/t/t	3,281	2,854	103,5	0,006	0,024	464	1,14	0,100
		Специфічні внутрішньомолекулярні зв'язки відсутні							
11	anti/g ⁺ /g ⁻	3,608	2,658	144,5	0,008	0,024	2	1,45	0,967
		3,605	2,747	144,5	0,002	0,008	17	0,29	0,423
12	anti/g ⁺ /t	3,130	2,635	107,3	0,004	0,015	441	0,55	0,045
		3,856	2,911	146,3	0,004	0,016	183	0,66	0,109
13	anti/g ⁺ /t, біфуркуючий зв'язок	3,580	2,628	145,2	0,009	0,025	2	1,52	0,958

Таблиця 5. Спектрально-коливальні характеристики внутрішньомолекулярних водневих зв'язків ОН...О та ОН...N у двох конформерах d4G

Конформер	Н-зв'язок	Δd^a , Å	$\Delta \nu^b$, cm ⁻¹	I/I ₀ ^c	$\Delta \gamma^d$, cm ⁻¹	$-\Delta H^e$, kcal/mol
1	O5'H'...N3	0,021	425	52,7	148	6,48
	N2H1...O5'	0,004	142	4,8	79	3,33
14	O5'H'...N3	0,017	245	14,5	98	4,72
	N2H1...O5'	0,004	127	3,2	68	3,08

^a Подовження зв'язку ОН; ^b зсув частоти валентного коливання ν (ОН) в червону область (cm⁻¹); ^c відношення інтенсивності валентного коливання за Н-зв'язування та відповідного коливання у структурно близькому конформері без відповідного Н-зв'язку; ^d зсув частоти неплосинного коливання в синю область; ^e енергія Н-зв'язку, розрахована за формулою Йогансена, ккал/моль [29]

лими (0,045–0,530 Å), що, очевидно, свідчить про їхню динамічну нестійкість.

Якщо припустити, що взаємодії СН...НС – це Н-зв'язки, то в цьому разі неможливо визначити *a priori*, яка із двох груп СН є доном, а яка акцептором Н-зв'язування. Щоб це дослідити, ми в кожному разі інтегрували басейни атомів водню обох груп у натуральних координатах для одержання характеристик цих атомів (табл. 6). Виявилось, що атом водню нуклеотидної основи несе більший позитивний заряд (0,054±0,102) та більшу енергію (-0,608±-0,590 Хартрі), ніж водень цукрового залишку (-0,018±0,023 та -0,641±-0,627 Хартрі відповідно). Це свідчить про те, що у всіх випадках група-донор належить основі, а група-акцептор – цукровому залишку. Усі специфічні досліджені контакти Н...Н мають енергію (табл. 4), яка вписується в сучасні уявлення про слабкі Н-зв'язки: $E_{\text{НВ}} \geq 1$ кДж/моль $\approx 0,25$ ккал/моль [49, 50].

Отже, одержані нами результати свідчать про доволі складну систему стабілізації конформерів d4G як класичними, так і нестандартними внутрішньомолекулярними Н-зв'язками, які співіснують із диполь-дипольними взаємодіями між нуклеотидною основою і цукровим залишком.

Вперше проведено вичерпний квантово-хімічний конформаційний аналіз нуклео-

зиду d4G, який розглядається як можливий претендент на використання в клінічній практиці. На рівні теорії MP2/6-311++G(d,p)//B3LYP/6-31G(d,p) встановлено, що він має 20 конформерів, які лежать у діапазоні вільних енергій 0±6,23 ккал/моль і стабілізуються дев'ятьма типами специфічних внутрішньомолекулярних зв'язків.

Повне конформаційне сімейство d4G містить один ДНК-подібний конформер ($\chi \in \text{anti}$, $\gamma \in \text{g}^+$, $\beta \in \text{t}$). Одержані результати не суперечать існуючій точці зору про те, що біологічна активність d4G полягає в тому, що він є термінатором синтезу полінуклеотидного ланцюга в напрямку 5'-3', конкуруючи з канонічним dG за зв'язування із активним центром ензиму. Відносна вільна енергія ДНК-подібного конформера (3,00 ккал/моль) d4G є вищою, ніж для аналогічного конформера d4A (2,49 ккал/моль) [25]

Оскільки конформаційні властивості d4G та d4A є доволі близькими, квантово-хімічні розрахунки не дають однозначної відповіді на питання, чому d4A є ефективнішим інгібітором ЗТ. У зв'язку з цим ми плануємо провести моделювання взаємодії трифосфатів d4A та d4G з модельним активним центром ЗТ гібридним методом QM/MM.

Таблиця 6. Атомні характеристики (заряд q , дипольна поляризація M , об'єм v , енергія E , радіус r) атомів водню, залучених у взаємодії $C8H^*...N^{**}C5'$, одержані методом DFT B3LYP/6-31G(d,p). MIN і MAX – мінімальне та максимальне значення параметрів відповідно. Всі величини наведено в атомних одиницях

Конформер d4A ($\chi/\beta/\gamma$)	$q(H^*)$	$q(H^{**})$	$M(H^*)$	$M(H^{**})$	$v(H^*)$	$v(H^{**})$	$-E(H^*)$	$-E(H^{**})$	$r(H^*)$	$r(H^{**})$
3 (anti/g-/t)	0,057	-0,018	0,126	0,147	47,1	51,4	-0,607	-0,641	2,561	2,528
5 (anti/t/g-)	0,056	-0,011	0,126	0,149	47,0	51,1	-0,607	-0,638	2,618	2,553
8 (anti/g-/g-)	0,060	0,017	0,127	0,141	46,9	49,1	-0,605	-0,629	2,688	2,631
10 (anti/t/t)	0,054	-0,003	0,127	0,147	47,1	50,3	-0,608	-0,635	2,622	2,522
12 (anti/g+/g-)	0,054	-0,010	0,127	0,146	47,2	50,8	-0,608	-0,638	2,650	2,583
15 (anti/t/t)	0,086	-0,007	0,113	0,142	42,6	49,3	-0,598	-0,638	2,576	2,440
18 (anti/g+/t)	0,054	0,023	0,126	0,140	47,3	48,8	-0,608	-0,627	2,649	2,589
19 (anti/g+/t)	0,102	0,015	0,113	0,132	41,5	47,6	-0,590	-0,632	2,521	2,544
MIN	0,054	-0,018	0,113	0,132	41,5	47,6	-0,608	-0,641	2,521	2,440
MAX	0,102	0,023	0,127	0,149	47,3	51,4	-0,59	-0,627	2,688	2,631

ПОЛНОЕ КОНФОРМАЦИОННОЕ СЕМЕЙСТВО 2',3'-ДИДЕГИДРО-2',3'-ДИДЕЗОКСИГУАНОЗИНА: КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ И ЭЛЕКТРОННО-ТОПОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

А. Г. Пономарева¹, Е. П. Юренко^{1,2,3}, Р. А. Жураковский^{1,2}, Д. Н. Говорун^{1,2,3}

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев; e-mail: yevgen.yurenko@gmail.com;

²Научный и образовательный центр «Государственная ключевая лаборатория молекулярной и клеточной биологии», Киев, Украина;

³Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Институт высоких технологий, Украина; e-mail: dhovorun@imbg.org.ua

Впервые на уровне теории MP2/6-311++G(d,p) // DFT B3LYP/6-31++G(d,p) проведен полный конформационный анализ 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксигуанозина (d4G) – ингибитора ВИЧ-обратной транскриптазы. Представлены основные геометрические, энергетические и полярные характеристики найденных 20 конформеров, а также основные конформационные равновесия при нормальных условиях. Установлено, что d4G стабилизируется девятью типами внутримолекулярных специфических связей: O5'H...N3, O5'H...C8, C8H...O5', C2'H...N3, C5'H1...N3, C5'H2...N3, C8H...N1C5', C8H...N2'C5' и N2H1...O5'. Полученные результаты подтверждают, что биологическая активность d4G связана с терминацией синтеза полинуклеотидной цепи в направлении 5'-3' путем конкуренции с каноническим 2'-дезоксигуанозином за связывание с активным центром энзима.

Ключевые слова: 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксигуанозин, конформационный анализ, квантово-химические расчеты, водородные связи, биологическая активность.

COMPLETE CONFORMATIONAL FAMILY OF 2',3'-DIDEHYDRO-2',3'-DIDEOXYGUANOSINE: QUANTUM CHEMICAL AND ELECTRON DENSITY TOPOLOGICAL STUDY

A. G. Ponomareva¹, Ye. P. Yurenko^{1,2,3}, R. O. Zhurakivsky^{1,2}, D. M. Hovorun^{1,2,3}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: yevgen.yurenko@gmail.com;

²Research and educational center "State key laboratory of molecular and cell biology", Kyiv, Ukraine;

³Taras Shevchenko Kyiv National University, Institute of High Technologies, Ukraine; e-mail: dhovorun@imbg.org.ua

S u m m a r y

Comprehensive conformational analysis of the biologically active nucleoside 2',3'-dideohydro-2',3'-dideoxyguanosine (d4G) has been performed at the MP2/6-311++G(d,p)//DFT B3LYP/6-31G(d,p) level of theory. The energetic, geometrical and polar characteristics of twenty d4G conformers as well as their conformational equilibrium were investigated. The electron density topological analysis allowed us to establish that the d4G molecule is stabilized by nine types of intramolecular interactions: O5'H...N3, O5'H...C8, C8H...O5', C2'H...N3, C5'H1...N3, C5'H2...N3, C8H...H1C5', C8H...H2'C5' and N2H1...O5'. The obtained results of conformational analysis permit us to think that d4G may be a terminator of the DNA chain synthesis in the 5'-3' direction. Thus it can be inferred that d4G competes with canonical 2'-deoxyguanosine in binding an active site of the corresponding enzyme.

Key words: 2',3'-dideohydro-2',3'-dideoxyguanosine, conformational analysis, quantum chemical calculations, hydrogen bonds, biological activity.

1. *Herdewijn P.* Modified nucleosides in biochemistry, biotechnology and medicine. – Wiley. – 2008. – 622 p.
2. *Chu C. K.* Recent advances in nucleosides: chemistry and chemotherapy. – Elsevier. – 2002. – 533 p.
3. *Sarmah P., Deka R. C.* // *J. Mol. Mod.* – 2009. – **16**. – P. 411–418.
4. *Macchi B., Mastino A.* // *Pharmacol. Res.* – 2002. – **46**. – P. 473–482.
5. *Bryant M. L., Bridges E. G., Placidi L. et al.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – **45**. – P. 229–235.
6. *Matsuda A., Sasaki T.* // *Cancer Sci.* – 2004. – **95**. – P. 105–111.
7. *Fain J. N., Pointer R. H., Ward W. F.* // *J. Biol. Chem.* – 1972. – **247**. – P. 6866–6872.
8. *Johnson A. A., Ray A. S., Hanes J. W. et al.* // *Ibid.* – 2001. – **28**. – P. 40847–40857.
9. *Coffin J. M.* // *Science.* – 1995. – **267**. – P. 483–489.
10. *Larder B. A.* // *J. Gen. Virol.* – 1994. – **75**. – P. 951–957.
11. *Everaert D. H., Peeters O. M., De Ranter C. J. et al.* // *Antiviral Chem. Chemother.* – 1993. – **4**. – P. 289–299.
12. *Hitchcock M. J. M.* // *Ibid.* – 1991. – **2**. – P. 125–132.
13. *Russell J. W., Whiterock V. J., Marrero D., Klunk L. J.* // *Nucleosides Nucleotides.* – 1989. – **8**. – P. 845–848.
14. *Vaccaro J. A., Parnell K. M., Terezakis S. A., Anderson K. S.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1999. – **44**. – P. 217–221.
15. *Hamamoto Y., Nakashima H., Matsui T. et al.* // *Ibid.* – 1987. – **31**. – P. 907–910.
16. *De Clercq E.* // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* – 1992. – **8**. – P. 119–134.
17. *Chu C. K., Schinazi R. F., Arnold B. H. et al.* // *Biochem. Pharmacol.* – 1988. – **37**. – P. 3543–3548.
18. *Ray A. S., Yang Z., Chu C. K., Anderson K. S.* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2002. – **46**. – P. 887–891.
19. *King A. E., Ackley M. A., Cass C. E. et al.* // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2006. – **27**. – P. 416–425.
20. *Van Rompay A., Johansson M., Karlsson A.* // *Pharmacol. Ther.* – 2003. – **100**. – P. 119–139.
21. *Kukhanova M., Krayevsky A., Prusoff W., Cheng Y.-C.* // *Curr. Pharmac. Des.* – 2000. – **6**. – P. 585–598.
22. *Saran A.* // *Int. J. Quant. Chem.* – 1981. – **20**. – P. 439–447.
23. *Van Roey P., Chu C. K.* // *Nucleosides Nucleotides.* – 1992. – **11**. – P. 1229–1239.
24. *Hutcheon W. L. B., James M. N. G.* // *Acta Cryst.* – 1974. – **30**. – P. 1777–1782.
25. *Пономарьова А. Г., Юренко Є. П., Жураківський Р. О., Говорун Д. М.* // *Укр. біохім. журн.* – 2011. – **83**, № 2. – С. 74–84.
26. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – Москва: Мир, 1987. – 584 с.
27. *Бейдер Р.* Атомы в молекулах. Квантовая теория. – Москва: Мир, – 2001. – 532 с.
28. *AIMAll (Version 10.12.08), Todd A. Keith, 2010 (aim.tkgristmill.com).*

29. Иогансен А. В. Инфракрасная спектроскопия и спектральное определение энергии водородной связи / Водородная связь / Ред. Н. Д. Соколова. – Москва: Наука, 1981. – 286 с.
30. *Espinosa E., Molins E., Lecomte C.* // Chem. Phys. Lett. – 1998. – **285**. – P. 170–173.
31. *Yurenko Ye. P., Zhurakivsky R. O., Ghomi M. et al.* // J. Phys. Chem. B. – 2007. – **111**. – P. 9655–9663.
32. Жураківський Р. О., Говорун Д. М. // Доп. НАН України. – 2007. – № 33. – С. 187–195.
33. Жураківський Р. О., Говорун Д. М. // Ukrainica Bioorganica Acta – 2007. – С. 44–51.
34. *Yurenko Y. P., Zhurakivsky R. O., Ghomi M. et al.* // J. Phys. Chem. B. – 2007. – **111**. – P. 6263–6271.
35. *Van Roey P., Taylor E. W., Chu C. K., Schinazi R. F.* // J. Am. Chem. Soc. – 1993. – **115**. – P. 5365–5371.
36. *Isayev O., Furmanchuk A., Shishkin O. V. et al.* // J. Phys. Chem. B. – 2007. – **111**. – P. 3476–3480.
37. *Foloppe N., MacKerell Jr. A. D.* // Biophys. J. – 1999. – **76**. – P. 3206–3218.
38. *Summerer D., Marx A.* // Angew. Chem. Int. Ed. – 2001. – **40**. – 3693–3695.
39. *Lin L., Truhlar D. G.* // Theor. Chem. Acc. – 2007. – **117**. – P. 185–199.
40. *Koch U., Popelier P. L. A.* // J. Phys. Chem. – 1995. – **99**. – P. 9747–9754.
41. Жураківський Р. О., Говорун Д. М. // Доп. НАН України. – 2007. – № 5. – С. 180–184.
42. *Matta C., Bader R. F. W.* // Proteins: Struct. Funct. Genet. – 2000. – **40**. – P. 310–329.
43. *Hernandez-Trujillo J., Matta C. F.* // Struct. Chem. – 2007. – **18**. – P. 849–857.
44. *Matta C.* Hydrogen-hydrogen bonding. The non-electrostatic limit of closed-shell interaction between two hydrogen atoms. A critical review. In: Grabowski S. (Ed.): Hydrogen bonding- New insights. – 2006. – P. 337–375.
45. *Jeffrey G., Saenger W.* Hydrogen bonding in biological structures / Springer-Verlag. – 1991.
46. *Grabowski S. J.* // J. Phys. Chem. A. – 2001. – **105**. – P. 10739–10746.
47. *Li X.-Z., Walker B., Michaelides A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2011 (www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1016653108).
48. *Yurenko Y. P., Zhurakivsky R. O., Samijlenko S. P. et al.* // Chem. Phys. Lett. – 2007. – **447**. – P. 140–146.
49. *Kaplan I.* Intermolecular interactions: physical picture, computational methods and model potentials. – Wiley. – 2006. – 380 p.
50. *Bakmutov V. I.* Dihydrogen bonds: principles, experiments and applications. – Wiley Interscience. – 2008. – 241 p.

Отримано 13.05.2011