



УДК 544.165 + 577.152.314

ИСКУССТВЕННЫЕ РИБОНУКЛЕАЗЫ. КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ СТРОЕНИЯ И АКТИВНОСТИ. НОВЫЙ ВЗГЛЯД НА СТРАТЕГИЮ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫХ РНКаз-МИМЕТИКОВ

© 2008 г. Л. С. Королева**, В. Е. Кузьмин**, Е. Н. Муратов**,
А. Г. Артеменко**, В. Н. Сильников*

*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
630090, Новосибирск, просп. Акад. Лаврентьева, 8, Россия;

**Отдел молекулярной структуры, Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАНУ, Украина

Поступила в редакцию 18.07.2007 г. Принята к печати 26.11.2007 г.

Проведен анализ зависимости гидролитической активности искусственных рибонуклеаз по отношению к фрагменту РНК ВИЧ I, 21-звенному олигонуклеотиду и тРНК^{Asp} от структуры РНКаз-миметика. Для определения количественных взаимосвязей структура – активность (QSAR-задачи) использовался метод симплексного представления молекулярной структуры – где дескрипторами служат количества четырехатомных фрагментов (симплексов) фиксированной структуры, симметрии и хиральности. Для атомов, входящих в симплексы, учитываются не только их типы, но и различные физико-химические свойства (например, парциальные заряды, липофильность и т.п.). Это позволяет оценить относительную роль различных факторов, влияющих на взаимодействие исследуемых молекул с соответствующей биологической мишенью. 2D-QSAR-модели, полученные методом проекций на латентные структуры, имеют вполне удовлетворительные статистические показатели ($R^2 = 0.82–0.96$; $Q^2 = 0.73–0.89$), позволяющие прогнозировать активность новых соединений. Показано, что в случае гидролиза 21-звенного олигонуклеотида и тРНК важную роль для проявления активности играют электростатические свойства атомов рибонуклеаз. Кроме того, выявлены структурные фрагменты, вносящие наибольший вклад в изменение гидролитической активности РНКаз. Полученные модели использованы для виртуального скрининга и молекулярного дизайна новых высокоэффективных РНКаз-миметиков.

Ключевые слова: искусственные рибонуклеазы; QSAR; симплексные дескрипторы.

ВВЕДЕНИЕ

Перспективными препаратами для лечения ряда вирусных и онкологических заболеваний, представляющими собой альтернативу общепринятой химиотерапии, являются рибонуклеазы различных организмов. На сегодняшний день клинически подтверждено противовирусное или противораковое действие ряда РНКаз, наиболее известными из которых являются РНКазы А, а также онконаза – РНКазы ооцитов лягушки *Rana pipiens*. Вопросы использования рибонуклеаз в качестве лекарственных препаратов активно разрабатываются, в частности, с позиции направленного мутагенеза и усиления вклада молекулярных детерминант,

ответственных за селективное поражение раковых клеток [1–3].

В то же время присущие природным РНКазам недостатки – большой молекулярный вес, наличие эффективных ингибиторов, низкая стабильность и биодоступность, сложность в получении гомогенных препаратов – стимулируют исследования, направленные на создание низкомолекулярных органических катализаторов гидролиза РНК, функционально имитирующих природные РНКазы [4]. На протяжении последних 10 лет в нашей лаборатории был создан широкий спектр соединений различного строения, в той или иной степени способных катализировать гидролиз фосфодиэфирных связей в РНК [5–8]. Гидролиз РНК в присутствии предложенных искусственных рибонуклеаз носит направленный характер: с наиболее высокой эффективностью расщепление происходит в Руг-Руг-сайтах. Было показано [5–8], что в различных РНК-субстратах присутствует, как правило, 2–5 сайтов, на которые приходится

Сокращения: QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationships) – количественные соотношения структура – активность; H_{1a} – гистамин; PLS (Projection to Latent structures) – метод проекций на латентные структуры; PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) – предсказание спектра активности для соединений.

* Автор для связи (тел.: (383) 333-37-62; факс: (383) 333-36-77; эл. почта: koroleva@niboch.nsc.ru).

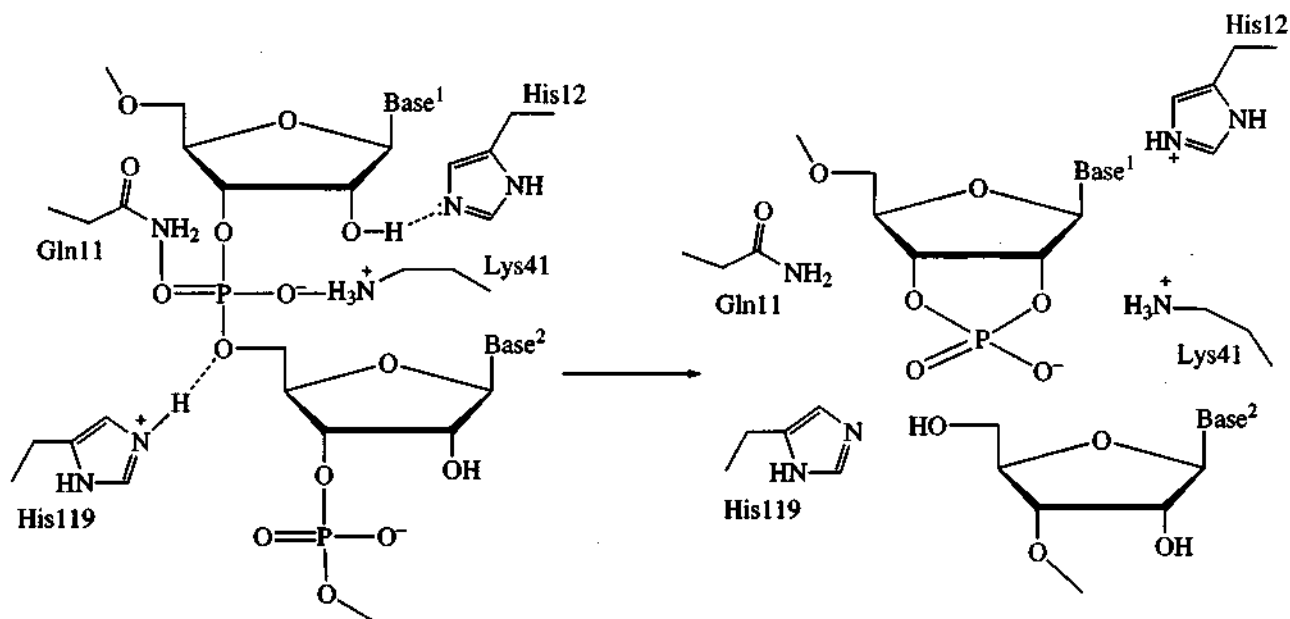


Рис. 1. Схема "классического" механизма гидролиза фосфодиэфирных связей в рибонуклеиновых кислотах РНКазой А [4]. На рисунке схематично показано расположение и функции аминокислотных остатков в активном центре РНКазы А.

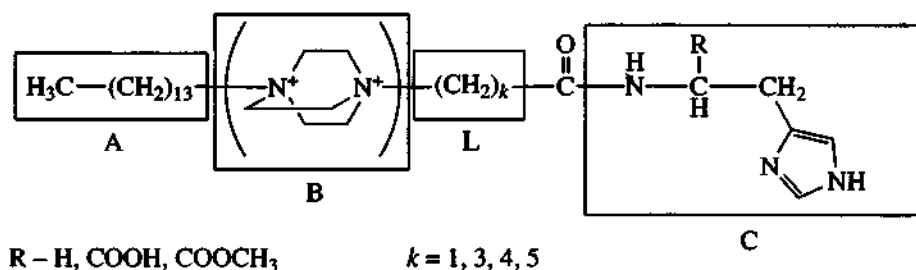


Рис. 2. Пример реализации стратегии конструирования искусственных рибонуклеаз из четырех функциональных доменов: липофильного фрагмента (А), РНК-связывающего фрагмента (В), линкера (L), каталитического домена (С).

до 90% общего количества расщепленных фосфодиэфирных связей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одной из стратегий конструирования искусственных рибонуклеаз является структурно-функциональное моделирование каталитических центров природных ферментов. Данная стратегия подразумевает введение в структуру РНКазамиметиков аминокислотных остатков (или их боковых функциональных групп), играющих ключевую роль в функционировании каталитических центров природных рибонуклеаз и расположенных в пространстве оптимальным для протекания каталитического процесса образом (рис. 1).

По аналогии с терминологией, принятой в белковой химии, структурные фрагменты молекул

искусственных рибонуклеаз, функционально аналогичные определенным доменам природных ферментов, называют доменами. Искусственные рибонуклеазы включают в себя каталитический домен (С), РНК-связывающий домен (В), соединяющую их линкерную группу (L) и гидрофильный фрагмент (А) (рис. 2). Ранее было показано, что наличие в структуре искусственных рибонуклеаз протяженного алкильного фрагмента А является важным условием достижения высокой гидролитической активности [9], а его отсутствие приводит к заметному снижению активности.

Предложенная стратегия была использована при синтезе нескольких серий искусственных рибонуклеаз:

- Структурно-функциональные аналоги каталитического центра рибонуклеазы А: дипептиды [5] и трипептиды (1)–(6) [10], содержащие в своем со-

ставе гистидин или гистамин (Hia), а также положительно заряженные аминокислоты (Lys и Arg):

His-Lys-Arg (1) Lys-Thr-Hia (4)
Lys-His-Arg (2) Arg-Lys-Hia (5)
Lys-Asn-Hia (3) Asp-Lys-Hia (6)

• Структурно-функциональные аналоги каталитического центра рибонуклеазы T1 [6]:

1. Короткие пептиды (7)–(12), содержащие в различных комбинациях аминокислотные остатки Arg, Glu, Ser, Thr, Lys, Phe:

Arg-Thr-Glu-Phe-OC₈H₁₇ (7)
Lys-Ser-Glu-Phe-OC₈H₁₇ (8)
Lys-Thr-Glu-Phe-OC₈H₁₇ (9)
Thr-Lys-Glu-Phe-OC₈H₁₇ (10)
Glu-Thr-Lys-Phe-OC₈H₁₇ (11)
Glu-Ser-Lys-Phe-OC₈H₁₇ (12)

2. Тетрапептиды (13)–(22), содержащие отрицательно заряженную (Glu) и положительно заряженные (Lys/Arg) аминокислоты, разделенные линкерами различной длины:

Glu-X-Arg-Gly-OC₁₀H₂₁ (13), (15), (17), (19), (21);

Glu-X-Lys-Gly-OC₁₀H₂₁ (14), (16), (18), (20), (22),

где X = Gly (13), (14); βAla (15), (16); 4-аминобутановая кислота (17), (18); 6-аминогексановая кислота (19), (20); *n*-аминобензойная кислота (21), (22).

• РНКаз-миметики, содержащие каталитически активную группу, соединенную с поликатионным фрагментом на основе 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана линкерными алкильными группами различной длины [6–7, 9] (рис. 2).

• Связанные различными линкерами два остатка кватернизованного 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана с алкильными заместителями различной длины [8] (рис. 3).

Последняя серия предполагает механизм расщепления РНК, основанный на ускорении ее самопроизвольного гидролиза вследствие искажения структуры РНК под воздействием поликатионных молекул (рис. 4). Длина жесткой линкерной группы РНКаз этой серии сопоставима с расстоянием между соседними фосфатными группами РНК. Взаимодействие таких катионных молекул с РНК приводит к оптимизации геометрии комплекса (уменьшение расстояния *d* и увеличения угла α), способствующей гидролизу РНК по механизму "in line" [8, 11].

Каталитическая активность большинства РНКаз-миметиков исследовалась ранее на примере взаимодействия с различными тРНК (тРНК^{Asp} [9], тРНК^{Lys} [5, 9], тРНК^{Phe} [7, 12]). С целью установления влияния строения РНК-субстратов на эффективность гидролиза фосфодиэфирных связей в качестве мишеней также использовались рибонуклеотиды – синтетические (ди- [13, 14] и олигомеры различной длины [13–15]) и природ-

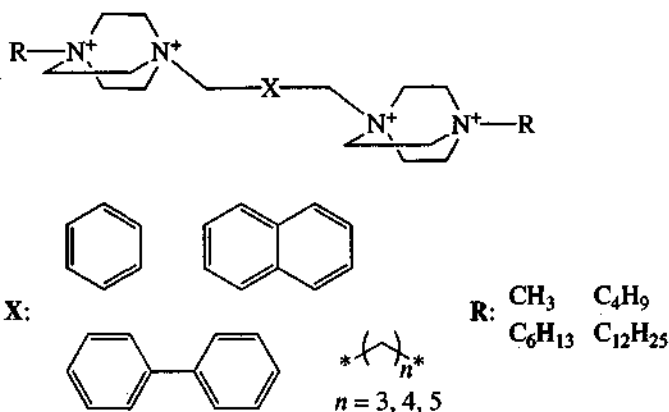


Рис. 3. Искусственные рибонуклеазы на основе остатков кватернизованного 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана с алкильными заместителями различной длины.

ные (96-звенный фрагмент РНК ВИЧ I [6], фрагмент мРНК белка M2 вируса гриппа [15], тРНК-подобный фрагмент РНК вируса желтой мозаики турнепса [5]).

Разнообразие РНК-субстратов и условий тестирования каталитической активности всех синтезированных искусственных рибонуклеаз делает невозможным прямое сопоставление получаемых для них экспериментальных данных, что, в сочетании с разнообразием структур исследованных соединений, затрудняет установление общих закономерностей структура–каталитическая активность.

В настоящей работе предприняты первые попытки определения молекулярных структурных характеристик, ответственных за гидролитическую активность изученных РНКаз-миметиков. В качестве основного инструмента для исследования количественной связи структура–активность был использован QSAR-подход на основе симплексного представления молекулярной структуры [16, 17].

Всего мы рассмотрели и включили в обучающие выборки 64 соединения (см. формулы выше и рис. 5), показавшие гидролитическую активность по отношению к фрагменту РНК ВИЧ I, 21-звенному олигонуклеотиду или тРНК^{Asp} (табл. 1).

МЕТОД QSAR НА ОСНОВЕ СИМПЛЕКСНОГО ПРЕДСТАВЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЫ

В использованном методе QSAR молекулярные структуры описываются с помощью симплексных дескрипторов, равных числу четырехатомных фрагментов (симплексов) фиксированной структуры, симметрии и хиральности [17]. Атомы в сим-

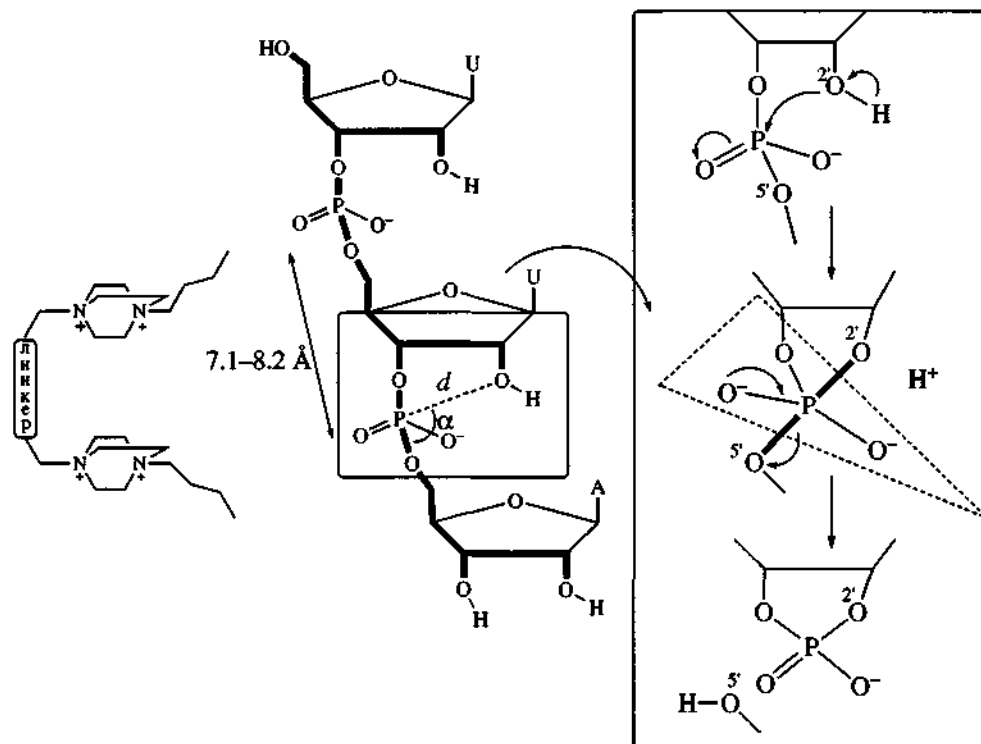


Рис. 4. Предполагаемый механизм гидролитического расщепления фосфодиэфирных связей синтетическими рибонуклеазами на основе бисчетвертичных солей 1,4-дизабисцикло[2.2.2]октана.

плексах могут быть дифференцированы на основе различных характеристик, в частности:

- символа, характеризующего химическую природу атома (знак химического элемента или более детализированный тип атома, учитывающий его химическое окружение);
- частичного заряда на атоме [18, 19] (см. рис. 6) (отражает электростатические свойства);
- липофильности атома [20] (отражает гидрофобные свойства);
- рефракции атома (в некоторой мере отражает дисперсионные свойства);
- донорно/акцепторных свойств атома водорода в потенциальной Н-связи*.

Использование различных вариантов дифференциации вершин симплексов (атомов) является принципиальной особенностью симплексного подхода**. Пример генерации симплексных дескрипторов для молекулы аланина с использова-

нием различных видов дифференциации атомов представлен на рис. 6.

Симплексные дескрипторы фактически являются фрагментарными параметрами, которые описывают не всю молекулу, а различные ее части. Для того чтобы отразить структурные особенности молекулы в целом (т.е. описать ее интегральные свойства), в данной работе также в качестве дескрипторов были задействованы вероятности проявления разных видов биологической активности, рассчитываемые программой PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances [21]), хорошо зарекомендовавшей себя при решении некоторых задач QSAR [22].

Для построения статистических зависимостей мы использовали метод проекций на латентные структуры PLS [23], который хорошо зарекомендовал себя при работе с большими массивами структурной информации, так как основан на преобразовании большого количества структурных параметров в небольшое число скрытых (латентных) переменных. Для поиска оптимального набора структурных параметров в PLS использовался ряд процедур, таких, как исключение взаимно коррелирующих и постоянных параметров, генетический алгоритм [24], метод отсева шумовых дескрипторов [17].

* Атомы делятся на три группы: А – акцептор, D – донор водорода в Н-связи, I – индифферентный атом.

** Мы полагаем, что реализованная во многих QSAR-методах детализация атомов по их природе (например, С, N, O) ограничивает возможности выделения фармакофорных фрагментов. Например, если NH-группа выбрана в качестве фрагмента, определяющего возможность образования Н-связи, то мы можем упустить такие доноры Н-связи, как, например, OH-группа.

Таблица 1. Наблюдаемая гидролитическая активность соединений в отношении РНК-субстратов

Номер соединения	Степень гидролиза Р-О-связей, %*			Номер соединения	Степень гидролиза Р-О-связей, %*		
	Фрагмент РНК ВИЧ I	21-Звенный олигонуклеотид	тРНК ^{Asp}		Фрагмент РНК ВИЧ I	21-Звенный олигонуклеотид	тРНК ^{Asp}
(1)	–	55	–	(33)	–	13	–
(2)	–	31	–	(34)	–	99	–
(3)	–	2	–	(35)	–	70	–
(4)	–	10	–	(36)	74	–	–
(5)	–	31	–	(37)	–	–	8
(6)	–	1	–	(38)	–	–	20
(7)	31	–	–	(39)	–	–	70
(8)	25	–	–	(40)	–	–	26
(9)	15	–	94	(41)	–	–	45
(10)	32	–	–	(42)	–	–	85
(11)	34	–	–	(43)	–	–	76
(12)	35	–	–	(44)	–	–	90
(13)	37	–	–	(45)	–	–	64
(14)	13	–	–	(46)	–	–	2
(15)	49	–	–	(47)	–	–	9
(16)	15	–	–	(48)	–	–	1
(17)	50	–	–	(49)	–	–	2
(18)	25	–	–	(50)	–	–	1
(19)	71	–	–	(51)	–	–	51
(20)	32	–	–	(52)	–	–	13
(21)	21	–	–	(53)	–	1	–
(22)	29	–	–	(54)	–	91	71
(23)	62	–	–	(55)	–	10	–
(24)	77	–	–	(56)	–	28	–
(25)	70	–	–	(57)	–	1	–
(26)	40	–	–	(58)	–	88	–
(27)	79	–	–	(59)	–	8	–
(28)	89	–	–	(60)	–	30	–
(29)	49	–	–	(61)	–	4	–
(30)	82	–	–	(62)	–	95	–
(31)	7	–	–	(63)	–	15	–
(32)	–	67	–	(64)	–	33	–

* В настоящей работе представлены количественные данные по суммарной деполимеризации РНК, полученные на основе электрофореграмм. Суммарная деполимеризация РНК определялась по формуле: $\left(1 - \frac{\text{РНК}_{\text{инт}}}{\text{РНК}_{\text{сумм}}}\right) \times 100\%$, где $\text{РНК}_{\text{инт}}$ – количество интактной РНК после инкубации, $\text{РНК}_{\text{сумм}}$ – исходное количество РНК. Прочерк означает отсутствие данных (эксперимент не проводился).

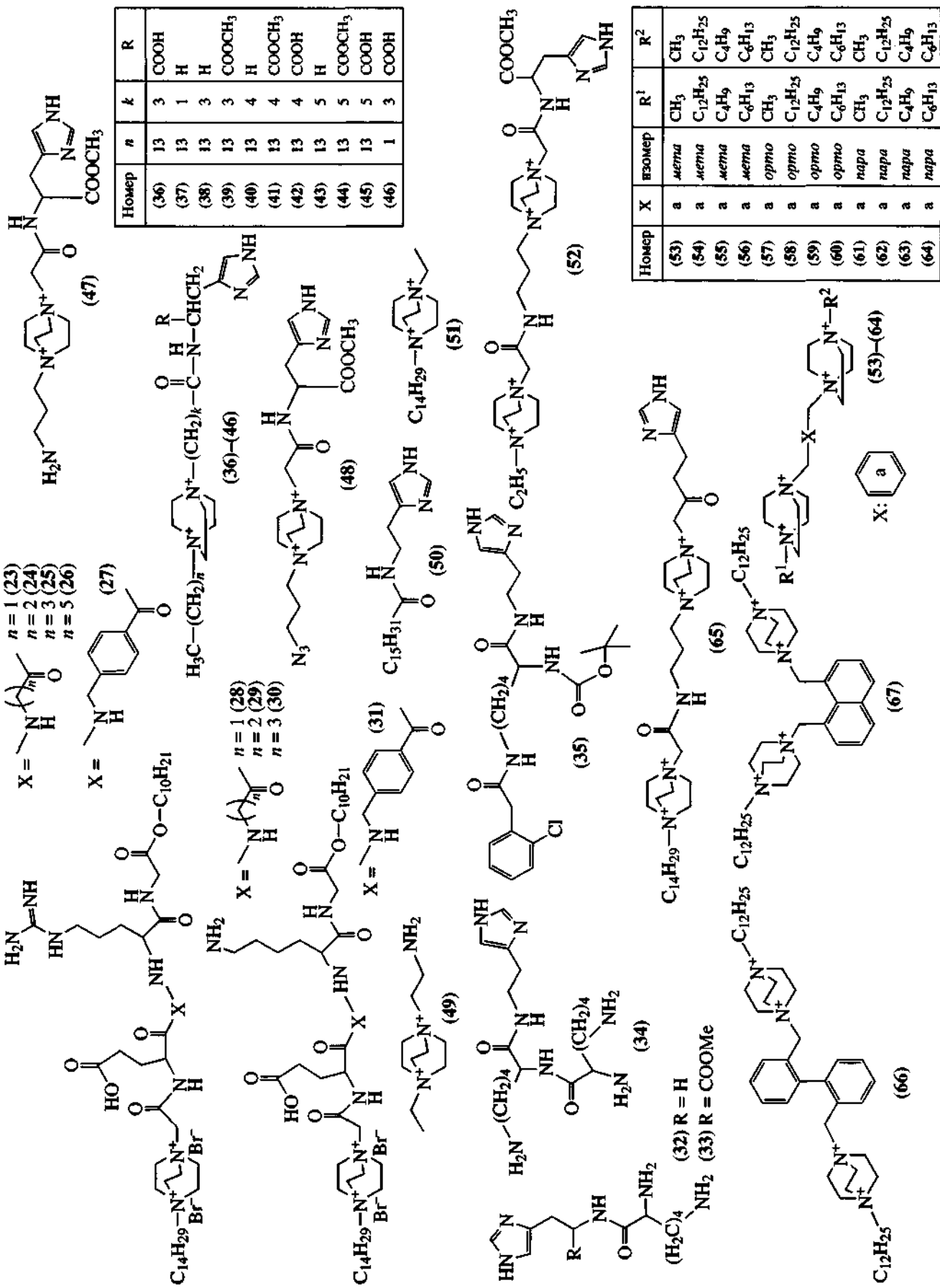
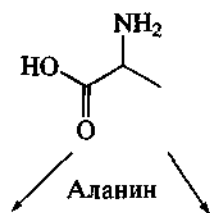


Рис. 5. Структуры искусственных рибонуклеаз, изученных в работе (23)–(64) и предложенных на основании построенных QSAR-моделей (65)–(67).



Дифференциация по типам атомов	Дифференциация по зарядам	Описание этапа
	<p style="text-align: center;"> $A \leq -0.1$ $-0.1 < B \leq -0.05$ $-0.05 < C \leq -0.01$ $-0.01 < D \leq 0.01$ $0.01 < E \leq 0.05$ $0.05 < F \leq 0.1$ $0.1 < G$ </p>	<p>Расчет атомных характеристик</p> <p>Дифференциация атомов на группы</p> <p>Установка новых меток атомов</p> <p>Генерация симплексных дескрипторов</p>

Рис. 6. Генерация симплексных дескрипторов в рамках симплексного представления молекулярной структуры на примере молекулы аланина.

PLS-уравнение может быть представлено как [16]:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^N b_i x_i, \quad (1)$$

где Y – изучаемая активность, b_i – регрессионные коэффициенты PLS, x_i – значение i -го дескриптора, N – общее число дескрипторов.

Используя это уравнение в рамках симплексного представления молекулярной структуры, достаточно легко решить обратную задачу (интерпретация QSAR-модели). Вклад каждого атома в молекулу может быть определен как отношение суммы регрессионных коэффициентов (b_i) всех симплексов, содержащих данный атом, к количеству атомов в симплексе. На основе этой информации могут быть выделены фрагменты структуры (комбинации атомов), способствующие

Таблица 2. Статистические характеристики отобранных QSAR-моделей*

Номер модели	Тип субстрата	R^2	Q^2	M	N
I	Фрагмент РНК ВИЧ	0.836	0.788	26	24 (4 + 0 + 0 + 0 + 0 + 20)
II	21-Звенный олигонуклеотид	0.959	0.892	22	21 (3 + 8 + 10 + 0 + 0 + 0)
III	тРНК ^{Asp}	0.823	0.732	17	58 (19 + 24 + 14 + 1 + 0 + 0)

* R^2 – коэффициент детерминации, Q^2 – коэффициент детерминации, вычисленный в условиях скользящего контроля, M – количество молекул в обучающей выборке, N – количество дескрипторов, в скобках приведено количество дескрипторов по каждому из используемых типов дифференциации симплексов (тип атома, заряд, липофильность, рефракция, способность к образованию водородной связи) и количество интегральных дескрипторов (программа PASS).

щие или препятствующие проявлению изучаемой активности.

Кроме того, в рамках симплексного подхода возможно определить относительное влияние различных физических и химических факторов на характер взаимодействия молекул с биологической мишенью. Для этой цели необходимо сравнить доли модулей нормированных вкладов (b_i), вошедших в модель симплексов для каждого из свойств, по которым проводилась дифференциация атомов в симплексах (заряд, липофильность, рефракция и т.п.) (см. рис. 6).

В результате с использованием метода QSAR на основе симплексного представления молекуляр-

ной структуры были получены три независимые статистические модели (I, II, III), описывающие связь между структурой РНКаз и их гидролитической активностью по отношению к: I – фрагменту РНК ВИЧ, II – 21-звенному олигонуклеотиду, III – тРНК^{Asp}. Качество этих моделей вполне удовлетворительное (табл. 2).

Анализ вкладов b_i (уравнение 1) симплексов, вошедших в модели, показал, что в случае 21-звенного олигонуклеотида основное влияние оказывают электростатические (49%) и гидрофильно/гидрофобные (38%) взаимодействия, а влияние природы атомов составляет всего 13%. Для тРНК^{Asp} основное влияние (40%) вносят электростатические взаимодействия. При этом природа атома и гид-

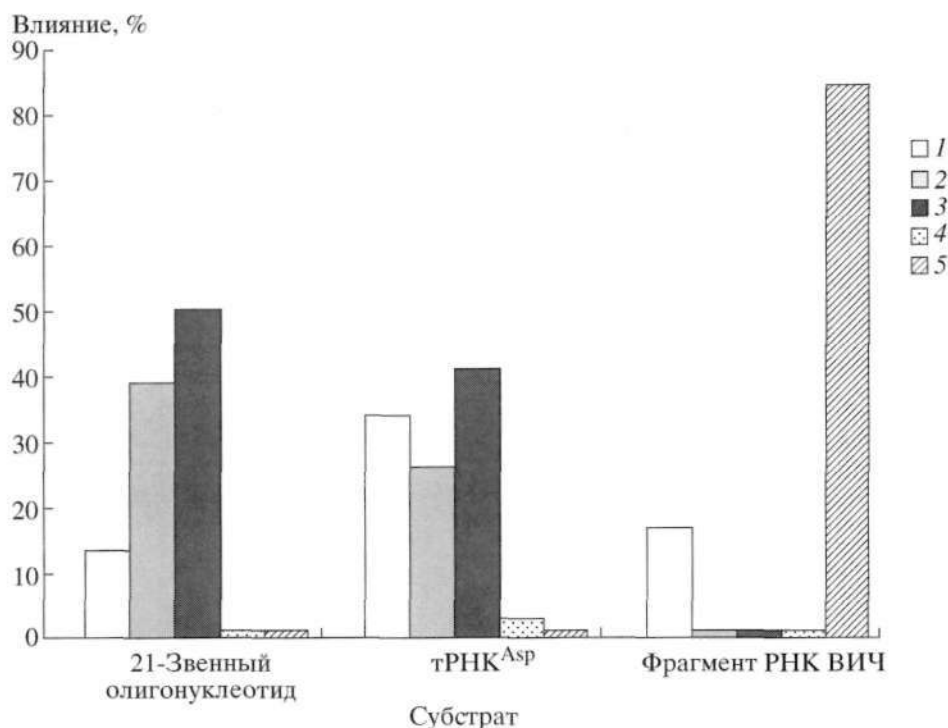
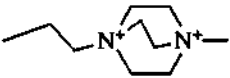
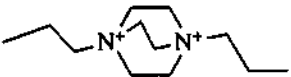
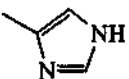
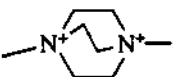


Рис. 7. Относительное влияние некоторых физико-химических факторов на изменение каталитической активности РНКаз: 1 – характеристики индивидуальности атомов (тип атомов); 2 – гидрофильно/гидрофобные взаимодействия; 3 – электростатические взаимодействия; 4 – дисперсионные взаимодействия; 5 – интегральные параметры.

Таблица 3. Относительные вклады фрагментов РНКаз в изменение их гидролитической активности (Δ , %)*

Номер фрагмента	Фрагмент	Фрагмент РНК ВИЧ	21-Звенный олигонуклеотид	τ РНК ^{Asp}
1	$-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})\text{NH}_2$	+2	-11	
2		+3	U	+4
3		+4		+6
4		+1	U	U
5	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	-2	-6	+1
6	$>\text{CH}-\text{CH}_2-\text{OH}$	-4	-6	+1
7	$>\text{CH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{OH}$	-5	-	-
8	$-\text{O}-\text{Cl}-\text{C}_6\text{H}_5$	-	+3	-
9	$-\text{NH}-\text{CO}-\text{O}-t\text{-Bu}$	-	+28	-
10	$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-$	-	+16	-
11	$-\text{NH}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}(\text{NH})-$	-	+22	-
12	$-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}(\text{NH}_2)-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-$	-	+24	-
13		+2	+3	+2
14	$\geq\text{N}-\text{C}_{12}\text{H}_{25}$	-	+38	+6
15	$\geq\text{N}-\text{C}_4\text{H}_9$	-	+7	+5
16	$\geq\text{N}-\text{C}_6\text{H}_{13}$	-	+15	+6
17	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$	0	U	+2
18	$(m)-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$	-	-13	-
19	$(o)-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$	-	-15	-
20	$(p)-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-$	-	-17	-
21	$>\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}<$	0	-8	-
22	$>\text{CH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_3$	-	-7	+1
23	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NH}_2$	+2	-8	-
24	$-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}_2$	-	-5	+2
25	$-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_3$	-	-28	-
26	$\geq\text{N}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$	+1	-	+7
27	$\geq\text{N}-\text{C}_2\text{H}_5$	-	U	+1
28	$-\text{CH}_2-\underset{ }{\text{CH}}-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_3-$	0	U	+8
29	$-\text{CH}_2-\underset{ }{\text{CH}}-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_4-$	0	+12	+8
30	$-\text{CH}_2-\underset{ }{\text{CH}}-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-$	0	+13	+11
31	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_3-$	-	U	+6
32	$-\text{COOH}$	0	U	+1
33	$-\text{CO}-\text{C}_{15}\text{H}_{31}$	-	-	+4
34	$-\text{N}_3$	-	-	-1

* "+" – усиление каталитических свойств; "-" – ослабление каталитических свойств; прочерк – нет данных (структуры с таким фрагментом не входят в обучающую выборку для данного свойства); U – неоднозначное влияние на каталитическую активность (направление влияния существенно зависит от окружения данного фрагмента).

Таблица 4. Наблюдаемые (А) и предсказанные (Б) значения гидролитической активности (степень гидролиза Р-О-связей в РНК, %) для наиболее перспективных соединений*

Структура	Фрагмент РНК ВИЧ		21-Звенный олигонуклеотид		тРНК ^{Asp}	
	А	Б	А	Б	А	Б
(19)	71	52	-	>95	-	81
(24)	77	68	-	>95	-	>95
(25)	70	68	-	>95	-	>95
(27)	79	62	-	>95	-	>95
(28)	89	82	-	>95	-	>95
(30)	82	82	-	>95	-	>95
(42)	-	84	-	75	85	74
(44)	-	73	-	82	90	80
(54)	-	>95	91	91	-	>95
(58)	-	>95	88	89	-	>95
(62)	-	>95	95	87	-	>95
(65)	-	>95	-	94	-	72
(66)	-	>95	-	>95	-	>95
(67)	-	>95	-	>95	-	>95

* Прочерк означает отсутствие данных.

рофилно/гидрофобные взаимодействия также играют заметную роль (рис. 7). В случае фрагмента РНК ВИЧ большее влияние на расщепление оказывают интегральные дескрипторы, описывающие молекулу целиком (84%), влияние же природы атомов составляет всего 16%.

В результате решения обратной задачи (интерпретации QSAR-моделей) определены молекулярные фрагменты структур РНКаз, способствующие и препятствующие проявлению изучаемых активностей (табл. 3). Для 21-звенного олигонуклеотида и тРНК^{Asp} определенные участки молекулы вносят заметный вклад в проявление рибонуклеазной активности. В случае 96-звенного фрагмента РНК ВИЧ для проявления активности важно не столько наличие или отсутствие определенных структурных фрагментов, сколько структура молекулы в целом. Это показывает превалирование интегральных характеристик (параметров PASS) над локальными (симплексными) (рис. 7).

Эти расчетные данные согласуются с результатами, полученными экспериментально. Было показано [13], что при переходе от протяженных РНК к коротким моделям наблюдается снижение гидролитической активности всех искусственных рибонуклеаз. При этом в случае 21-звенного олигонуклеотида разница в эффективности расщепления между соединениями одной серии значительно меньше, нежели в случае расщепления этими же соединениями 96-звенного фрагмента РНК ВИЧ.

На примере 21-звенного олигонуклеотида видно, что влияние функциональных групп, формирующих каталитические центры природных ферментов (гуанидиниевая (1), гидроксильная (6) и (25) группы, а также амидного фрагмента (21)), оказалось отрицательным (табл. 3). Кроме того, неоднозначное влияние на каталитическую активность оказывает и имидазольный фрагмент (4). Ароматические фрагменты 18–20 также понижают активность исследуемых соединений по отношению к 21-звенному олигонуклеотиду.

Проявлению каталитической активности (по отношению ко всем субстратам, кроме РНК ВИЧ) способствуют гидрофобные фрагменты 14–16, а также алкильные фрагменты, содержащие амидные связи (10–12, 29, 30). Фрагменты 2, 3, 13, содержащие четвертичные соли 1,4-диазабицикло[2.2.2]октана, в незначительной степени способствуют гидролизу 96-звенного фрагмента РНК ВИЧ и тРНК^{Asp}.

Влияние ароматических фрагментов может быть разнонаправленным в зависимости от их окружения. Гидрофобный ароматический фрагмент 8, расположенный на конце структуры, вносит положительный вклад в активность, тогда как ароматические остатки 18–20, расположенные внутри структуры, препятствуют увеличению гидролитической активности.

Полученные модели использованы для виртуального скрининга и молекулярного дизайна новых эффективных РНКаз-миметиков (табл. 4). В результате скрининга каталитической активности отобрано 11 соединений ((19), (24), (25), (27), (28), (30), (42), (44), (54), (58), (62)) и проведен дизайн трех новых соединений ((65), (66), (67)) с высокой потенциальной гидролитической активностью. Для всех этих соединений в дальнейшем планируется провести испытания. Полученные результаты будут отражены в дальнейших публикациях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 07-04-00990-а); PharmaMed RUXO-008-N0-06, программы фундаментальных исследований РАН "Происхождение и эволюция биосферы", грантом администрации Новосибирской области для молодых ученых, а также при частичной поддержке Украинского научно-технического центра (грант STCU № 3147).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Makarov A.A., Hlinskaya O.N. // FEBS Lett. 2003. V. 540. P. 15–20.
2. Matousek J. // Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 2001. V. 129. P. 175–191.

3. Benito A., Ribo M., Vilanova M. // *Mol. BioSyst.* 2005. V. 1. P. 294–302.
4. Artificial Nucleases / Ed. Zenkova M.A. *Nucleic Acids and Molecular Biology.* V. 13. Berlin: Springer Verlag, 2004.
5. Ждан Н.С., Кузнецова И.Л., Власов А.В., Сильников В.Н., Зенкова М.А., Власов В.В. // *Биоорганическая химия.* 1999. Т. 25. С. 723–732.
6. Королева Л.С., Доница А.А., Тамкович Н.В., Ковалев Н.А., Зенкова М.А., Сильников В.Н. // *Изв. АН. Сер. хим.* 2005. № 11. С. 2596–2605.
7. Konevets D.A., Beck I.E., Beloglazova N.G., Sulimencov I.V., Sil'nikov V.N., Zenkova M.A., Shishkin G.V., Vlassov V.V. // *Tetrahedron.* 1999. V. 55. P. 503–512.
8. Burakova E.A., Silnikov V.N. // *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids.* 2004. V. 23. P. 915–920.
9. Konevets D.A., Mironova N.L., Beck I.E., Zenkova M.A., Shishkin G.V., Vlassov V.V., Sil'nikov V.N. // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2002. V. 28. P. 331–341 (Коневец Д.А., Миронова Н.Л., Бек И.Э., Зенкова М.А., Шиликин Г.В., Власов В.В., Сильников В.Н. // *Биоорганическая химия.* 2002. Т. 28. С. 367–378).
10. Кузнецова И.Л., Ждан Н.С., Зенкова М.А., Власов В.В., Сильников В.Н. // *Изв. АН. Сер. хим.* 2004. № 2. С. 435–442.
11. Soukur G.A., Breaker R.R. // *RNA.* 1999. V. 5. P. 1308–1325.
12. Beloglazova N.G., Sil'nikov V.N., Zenkova M.A., Vlassov V.V. // *FEBS Lett.* 2000. V. 481. P. 277–280.
13. Белоглазова Н.Г., Миронова Н.Л., Коневец Д.А., Петюк В.А., Сильников В.Н., Власов В.В., Зенкова М.А. // *Мол. биология.* 2002. Т. 36. С. 1068–1073.
14. Зенкова М.А., Чумакова Н.Л., Власов А.В., Комарова Н.И., Венъяминова А.Г., Власов В.В., Сильников В.Н. // *Мол. биология.* 2000. Т. 34. С. 456–460.
15. Beloglazova N., Vlassov A., Konevets D., Sil'nikov V., Zenkova M., Giege R., Vlassov V. // *Nucleosides Nucleotides.* 1999. V. 18. P. 1463–1465.
16. Kuz'min V.E., Artemenko A.G., Lozitsky V.P., Muratov E.N., Fedtchouk A.S., Dyachenko N.S., Nosach L.N., Gridina T.L., Shitikova L.I., Mudrik L.M., Mescheriakov A.K., Chelombitko V.A., Zheltvay A.I., Vanden Eynde J. // *Acta Biochim. Polon.* 2002. V. 49. P. 157–168.
17. Kuz'min V.E., Artemenko A.G., Lozitska R.N., Fedtchouk A.S., Lozitsky V.P., Muratov E.N., Mescheriakov A.K. // *SAR and QSAR in Env. Res.* 2005. V. 16. P. 219–230.
18. Jolly W.L., Perry W.B. // *J. Am. Chem. Soc.* 1973. V. 95. P. 5442–5450.
19. Кузьмин В.Е., Берестецкая Е.Л. // *Журн. структ. химии.* 1983. Т. 24. С. 131–132.
20. Wang R., Fu Y., Lai L. // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1997. V. 37. P. 615–621.
21. Поройков В.В., Филимонов Д.А., Караичева Е.И. и др. // *Эксп. и клиническая фармакология.* 1995. № 2. С. 56–62.
22. Филимонов Д.А., Акимов Д.В., Поройков В.В. // *Хим.-фарм. журн.* 2004. № 1. С. 21–24.
23. Rannar S., Lindgren F., Geladi P., Wold S. // *J. Chemometrics.* 1994. V. 8. P. 111–125.
24. Hasegawa K., Miyashita Y., Funatsu K. // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1997. V. 37. P. 306–310.

Artificial Ribonucleases: Quantitative Analysis of the Structure–Activity Relationship and New Insight into the Strategy of Design of Highly Efficient RNase Mimetics

L. S. Koroleva^{a,*}, V. E. Kuz'min^b, E. N. Muratov^b, A. G. Artemenko^b, and V. N. Sil'nikov^a

^{*} Phone: +7 (383) 333-3762; fax: +7 (383) 333-3677; e-mail: koroleva@niboch.nsc.ru

^a Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^b Department of Molecular Structure, Bogatskii Physicochemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine

The dependence of hydrolytic activity of artificial ribonucleases toward an HIV-1 RNA fragment, a 21-mer oligonucleotide, and tRNA_{Asp} on the structure of the RNase mimetic was analyzed. The quantitative structure–activity relationship (QSAR task) was determined by the method of simplex representation of the molecular structure, where the amounts of four-atom fragments (simplexes) of fixed structure, symmetry, and chirality served as descriptors. Not only the types of atoms participating in simplexes but also their physicochemical properties (e.g., partial charges, lipophilicities, etc.) were taken into account. This allowed the estimation of the relative role of various factors affecting the interaction of molecules under study with the corresponding biological target. The 2D QSAR models obtained by the method of projection to latent structures have quite satisfactory statistical indices ($R^2 = 0.82–0.96$; $Q^2 = 0.73–0.89$), which help predict the activities of new compounds. The electrostatic properties of ribonuclease atoms were shown to contribute significantly to the manifestation of the hydrolytic activity of ribonucleases in the case of the 21-mer oligonucleotide and tRNA. In addition, the structural fragments that most greatly contribute to the alteration of the hydrolytic activity of RNases were identified. The models obtained were used for the virtual screening and molecular design of new highly efficient RNase mimetics.

Key words: artificial ribonucleases, QSAR, simplex descriptors