

УДК 577.1:547.96

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ЛИГАНДОВ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

М.С. Беленикин, А. Маккиаруло*, Г. Костантино*, В.А. Палиюлин, Р. Пелличари*,
Н.С. Зефирюв

(кафедра органической химии)

С использованием программы *AutoDock 3.0* проведен докинг ряда агонистов и антагонистов в глутаматсвязывающие центры метаботропных и ионотропных глутаматных рецепторов. Показано, что при использовании методологии молекулярного докинга возможно получение лиганд-рецепторных комплексов, имеющих геометрию, согласующуюся с экспериментальными данными. Изучено влияние наличия молекул воды в лигандсвязывающем центре рецептора на ориентацию лигандов.

Метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR), открытые немногим более 10 лет назад, являются рецепторами, сопряженными с G-белком. В отличие от ионотропных рецепторов, осуществляющих быструю синаптическую передачу сигнала, метаботропные рецепторы вовлечены в ряд более длительных сигнал-передающих процессов. Этот класс рецепторов, сопряженных с G-белком, значительно отличается от других представителей как строением, так и локализацией в нервных тканях. В настоящее время лиганды метаботропных глутаматных рецепторов интенсивно изучаются с целью поиска как потенциальных нейропротекторов, так и регуляторов тонких внутриклеточных процессов.

Важным этапом исследования лиганд-белковых взаимодействий является докинг лигандов в белковые структуры. Докинг называется процесс "подстыковки" лиганда в лиганд-связывающий центр (ЛСЦ) рецептора с целью поиска как наиболее выгодных положений и ориентаций лигандов в ЛСЦ, так и выявления факторов, изменение которых может привести к улучшению лиганд-рецепторного взаимодействия. Поскольку определение пространственных структур комплексов лиганд-рецептор с помощью различных физико-химических методов для всех лигандов невозможно, задачей докинга является предсказание связывания химических соединений с рецепторами на основании только виртуального эксперимента.

Существует множество алгоритмов осуществления молекулярного докинга. Их главной задачей является нахождение глобального минимума энергии взаимодействия между лигандом и белком с помощью исследования всего доступного для лиганда пространства системы. Однако это требует проведения большого объема вычислительных работ и поэтому не

всегда возможно. В настоящее время наибольшее распространение получил ручной докинг, при котором внутренние и ориентационные степени свободы определяются оператором и результат которого зависит от начального положения лиганда. Ручной докинг можно использовать для исследования в тех случаях, когда известно (хотя бы ориентировочно) расположение лигандов определенного типа в ЛСЦ. Этот вид докинга требует экспертного подхода и является субъективным. В случае его применения производится поиск лишь ближайшего локального энергетического минимума.

В данной работе при проведении автоматического докинга использовали генетический алгоритм (ГА) [1, 2], позволяющий эффективно исследовать все доступное для лиганда пространство. ГА представляет собой оптимизационную схему, имитирующую процесс эволюции. Существуют разные подходы к реализации генетических алгоритмов, используемых для проведения молекулярного докинга [1–3]. Для нашего расчетного эксперимента был использован гибридный (применимый для глобального и локального поиска оптимального положения лиганда) ламарковский ГА. Результаты работы [1] показывают, что использование ламарковского ГА позволяет воспроизводить строение комплексов более точно, чем в случае использования методологии моделируемого отжига [4]. Высокая скорость расчета достигается благодаря использованию не пространственной структуры белка в явном виде, а предварительно вычисленных так называемых карт электростатических потенциалов [5].

Цель данной работы состояла в изучении возможности применения автоматического докинга для определения геометрии лиганд-рецепторных комплексов (ЛРК) глутаматных рецепторов на основе использования экспериментальных или расчетных данных о трехмерном строении ЛСЦ.

* Университет Перуджи, Италия.

Метаботропные глутаматные рецепторы согласно механизму передачи сигнала и гомологии аминокислотных последовательностей разделены на три группы [6]: mGluR1,5; mGluR2,3 и mGluR4,6–8. Ионотропные глутаматные рецепторы были разделены на три группы на основании чувствительности к лигандам [6]: NMDA-рецепторы (NR1;NR2A–NR2D; NR3A–NR3B), каинатные (КА) рецепторы (GluR5–GluR7; KA1–KA2) и AMPA-рецепторы (GluR1–GluR4). В соответствии со структурными различиями лиганды mGluR-рецепторов формально могут быть разделены на пять больших классов: ACPD (конформационно ограниченный аналог глутамата, все сокращения приведены в примечаниях к табл. 1), CCG, фенилглицина, L-AP4 и группа, включающая все остальные структуры. Среди исследуемых лигандов, принадлежащих к пяти перечисленным группам, были лиганды как проявляющие селективность по отношению к определенному подтипу, так и действующие на все подтипы. Необходимо отметить, что экспериментально определяемые величины EC_{50} и IC_{50} не позволяют рассчитать K_p , а зависимость этих величин от энергии докинга может быть достаточно сложной. Исследуемые лиганды [6, 8], значения EC_{50} , IC_{50} , а также рассчитанные значения энергии докинга для них в mGluR-рецепторы приведены в табл. 1 и на рис. 1.

Для исследования помимо агонистов были выбраны близкие к ним по размеру антагонисты, которые гипотетически могли бы располагаться в ЛСЦ закрытой формы. Ввиду большого количества разных по структуре лигандов в подтипы закрытых форм AMPA и каинатных рецепторов (GluR2, GluR5–GluR7, KA1) проводили докинг ряда лигандов, наиболее характерных для них (а не принадлежащих определенным структурным группам). Большое внимание было уделено каинатным рецепторам (GluR5–GluR7, KA1), поскольку они имеют достаточно схожие ЛСЦ [9] и в то же время для них известны селективные к определенным подтипам лиганды (АТРА, домоевая кислота). Для получения наиболее точных результатов были исследованы лиганды, состоящие только из атомов С, О, N, H, P, S. В лигандах допускалось вращение вокруг связей во всех случаях, где это было возможно.

Молекулярный докинг лигандов проводили в закрытые формы представителей всех 3 типов mGluR-рецепторов – mGluR1 (код в белковой базе данных [10] – 1EWK, цепь А [11]), mGluR2, mGluR4 (модели аминоконцевых доменов были построены нами ранее [12]), в открытую форму mGluR1 (1EWK, цепь В [11]), а также в закрытые формы представителей AMPA и каинатных глутаматных рецепторов (GluR2 (1FTM [13]), GluR5–GluR7 [9], KA1 [9]). Для оценки влияния наличия молекул воды в ЛСЦ на результаты молекулярного докинга в структуре закрытой формы

mGluR1 (1EWK) в разных комбинациях учитывали только три наиболее близкие к ЛСЦ (номера в 1EWK: 11, 17, 46) молекулы воды. Для проведения автоматического докинга была использована программа AutoDock3.0 [1]. При расчетах рН системы принимали равным нейтральному. Для белка были использованы заряды из библиотеки *Charmm22* [14]. Необходимо отметить, что среди всех трех исследованных подтипов метаботропных рецепторов ЛСЦ в закрытой форме mGluR1 имеет наименьший размер. Докинг исследуемых в настоящей работе антагонистов метаботропных глутаматных рецепторов показал (табл. 1), что только антагонист AIDA (рис. 1, 6) обладает размером, не допускающим ее расположение в ЛСЦ закрытой формы mGluR1-рецептора, но допускающим ее расположение в ЛСЦ закрытых форм mGluR2- и mGluR4-подтипов. Возможно, это является причиной достаточно селективного действия антагониста AIDA по отношению к рецепторам I группы [15]. При докинге лигандов в ионотропные глутаматные рецепторы молекулы воды не учитывались из-за меньшего (чем для случая метаботропных рецепторов) размеров ЛСЦ, а также иного способа связывания с ними лигандов.

Важной проблемой является расчет атомных зарядов лигандов. В настоящей работе расчет зарядов проводили с помощью модуля MOPAC программного комплекса *InsightII* [16] по методу MNDO с учетом электростатических потенциалов. Как показано в работе [17], заряды, рассчитанные таким образом, коррелируют с зарядами, рассчитанными в базисе 6-31G*. Все расчеты проводили на рабочих станциях SGI O2 R12000 и SGI Octane R10000.

Анализ полученных результатов автоматического докинга показывает, что последний приводит к различной ориентации лигандов в ЛСЦ mGluR-рецепторов. Возможна как подобная глутамату ориентация (структура комплекса которого с mGluR1 была экспериментально определена [11]), так и другие варианты ориентации, при которых положения фармакофорных групп иногда значительно отличаются от их положения для глутамата. При проведении настоящего исследования на основе имеющихся экспериментальных данных было сделано предположение, что лиганды имеют глутаматоподобную ориентацию в ЛСЦ. В табл. 1, 2 приведены оптимальные значения энергии докинга для комплексов, в которых лиганд имеет сходное с глутаматом расположение фармакофорных групп. На рис. 2, 3 показано расположение глутамата в ЛСЦ закрытой формы в отсутствие и в присутствии молекул воды. С целью изучения влияния суммарного заряда лиганда на результаты докинга для лиганда (2R,4R)-APDC (ввиду возможного протонирования/депротонирования в зависимости от условий) принимали возможными разные заряды (рис. 1, соединение

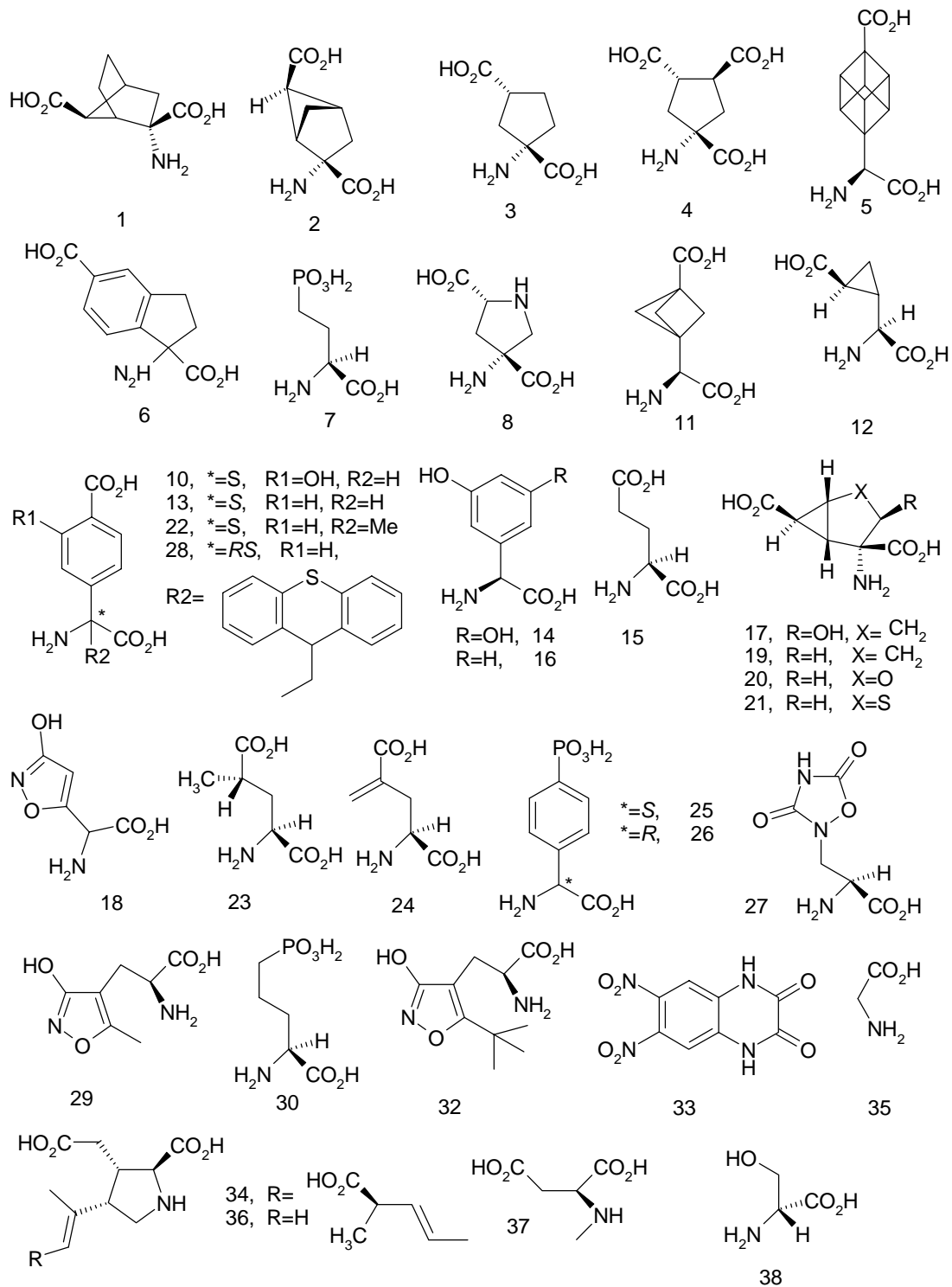


Рис. 1. Структуры лигандов, использованных для молекулярного докинга

8; табл. 1). Интересно отметить, что в случае закрытых форм нейтральная форма лучше связывается с mGluR1 (табл. 1). Нейтральная форма лучше связывается с ЛСЦ также при наличии в нем молекул воды (табл. 2). Однако в случае открытой формы mGluR1 предпочтительной оказывается уже заряженная форма (табл. 2). При докинге оптических изомеров *S*-PPG и *R*-PPG (рис. 1, соединения 25, 26; табл. 1, 2), в случае mGluR1 подтипа лучшее связывание наблюдается

для *R*-изомера, а в случае mGluR2 подтипа преимущественно связывается уже *S*-изомер. Оптимальные значения энергии взаимодействия обоих изомеров наблюдаются в случае mGluR4-рецептора, что согласуется с экспериментально определенным достаточно селективным действием PPG на рецепторы III группы [6].

Во многих работах при объяснении селективности лигандов к рецепторам часто упускается тот факт, что экспериментально установленные структуры имеют

Значения энергии докинга в закрытые формы АКД mGluR1,2,4-рецепторов

Номер лиганда	Название лиганда	Заряд лиганда	Подтип рецептора					
			mGluR1		mGluR2		mGluR4	
			EC ₅₀ (для антагониста IC ₅₀), мкмоль	E, ккал/моль	EC ₅₀ (для антагониста IC ₅₀), мкмоль	E, ккал/моль	EC ₅₀ (для антагониста IC ₅₀), мкмоль	E, ккал/моль
1	ABHD-II	-1	Слаб. ч.а.	-11,56	Слаб. аг.	-10,44	-	-13,05
2	ABHD-I	-1	1,6	-11,19	0,33	-10,64	23	-12,30
3	(1S,3R)-ACPD	-1	42	-11,63	5	-10,72	98	-11,29
4	(3S,4S)-ACPT-III	-2	>1000	-10,93	>1000	-11,44	8,8	-12,29
5	(S)-ACUDA	-1	Ант., 323	-12,21	55, ч.а.	-12,89	>1000	-15,32
6	(S)-AIDA	-1	Ант., 214	-	>1000	-14,00	>1000	-13,73
7	(S)-AP4	-2	>1000	-11,37	>1000	-10,32	0,32-0,91	-12,80
8	(2R,4R)-APDC	-1	>100	-11,00	0,30-0,45	-9,99	>300	-10,72
9	(2R,4R)-APDC	0	>100	-11,42	0,30-0,45	-9,35	>300	-10,40
10	(S)-4C3HPG	-1	Ант., 30	-11,60	20	-12,84	Ант., >1000	-14,42
11	(S)-CBPG	-1	Ант., 25	-13,70	Ант., >300	-11,25	Ант., >300	-13,11
12	(2S,3S,4S)-CCG-I	-1	1,9-50	-11,22	0,30-0,49	-9,89	3,7-50	-11,64
13	(S)-4CPG	-1	Ант., 18-84	-11,83	500-577	-12,55	Ант., >1000	-14,14
14	(S)-3,5-DHPG	0	6,6	-12,13	>1000	-10,38	>1000	-11,10
15	(S)-Glu	-1	1,1-10	-10,90	0,29-10	-9,55	9,8-17	-11,16
16	(S)-HPG	0	68-1000	-11,52	>1000	-10,21	>1000	-10,74
17	HYDIA	-1	Ант. >100	-11,54	Ант., 0,11	-11,18	Ант., 22	-12,20
18	Ibo	0	43	-10,02	110	-9,06	>1000	-9,49
19	LY354740	-1	>100	-12,26	0,011	-11,00	>100	-12,04
20	LY379268	-1	>100	-12,11	0,0027	-10,61	21	-12,44
21	LY389795	-1	>100	-12,42	0,0039	-10,76	>100	-11,61
22	(S)-M4CPG	-1	Ант., 70-540	-11,00	Ант., 51	-11,91	Ант., >1000	-11,89
23	(2S,4S)-4MG	-1	10	-11,59	2,0	-10,29	470	-11,38
24	(S)-4MeGlu	-1	0,15	-11,31	0,23	-10,01	>1000	-11,60
25	(S)-PPG	-2	>500	-11,87	>300	-13,61	5,2	-16,33
26	(R)-PPG	-2	>500	-12,39	>300	-12,80	5,2	-14,23
27	(S)-Quis	-1	1,1	-11,38	>1000	-11,00	>1000	-12,66
28	LY367366*	-1	5,7	-	-	-	-	-

Примечания. * Докинг проводили только в открытую форму рецептора; ч.а. – частичный агонист; слаб. ч.а. – слабый частичный агонист; слаб. аг. – слабый агонист; Ант. – антагонист; ABHD-II, (1S,2S,4S,5S) – 2-аминобицикло[2.1.2]гептан-2,5-дикарбоновая кислота; ABHD-I, (1S,2S,4S,5S) – 2-аминобицикло[2.1.1]гексан-2,5-дикарбоновая кислота; (1S,3R)-ACPD, (1S,3R) – 1-аминоциклопентан-1,3-дикарбоновая кислота; (3S,4S)-ACPT-III, (3S,4S) – 1-аминоциклопентан-1,3,4-трикарбоновая кислота; (S)-ACUDA, (S) – 2-(4'-карбоксивибил)глицин; (S)-AIDA, 1-аминоиндан-1,5-дикарбоновая кислота; (S)-AP4, (S) – 2-амино-4-фосфобутановая кислота; (2R,4R)-APDC, (2R,4R) – 4-аминопирролидин-2,4-дикарбоновая кислота; (S)-4C3HPG, (S) – 4-карбоксив-3-гидроксифенилглицин; (S)-CBPG, (S) – 2-(3'-карбоксив[1.1.1]бициклопентил)глицин; (2S,3S,4S)-CCG-I, (2S,3S,4S) – 2-(карбоксивциклопропил)глицин; (S)-4CPG, (S) – 4-карбоксивфенилглицин; (S)-3,5-DHPG, (S) – 3,5-дигидроксифенилглицин; (S)-Glu, (S) – глутаминовая кислота; (S)-HPG, (S) – 3-гидроксифенилглицин; HYDIA, (1S,2R,3R,5R,6S) – 3-гидрокси-2-аминобицикло[3.1.0]гексан-2,6-дикарбоновая кислота; Ibo, иботеновая кислота; LY354740, (1S,2S,5R,6S) – 2-аминобицикло[3.1.0]гексан-2,6-дикарбоновая кислота; LY379268, (-) – 2-окса-4-аминобицикло[3.1.0]гексан-4,6-дикарбоновая кислота; LY389795, (-) – 2-тиа-4-аминобицикло[3.1.0]гексан-4,6-дикарбоновая кислота; (S)-M4CPG, (S) – метил-4-карбоксивфенилглицин; (2S,4S)-4MG, (2S,4S) – 4-метилглутаминовая кислота; (S)-4MeGlu, (S) – 4-метилглутаминовая кислота; (S)-PPG, (S) – 4-фосфобифенилглицин; (R)-PPG, (R) – 4-фосфобифенилглицин; (S)-Quis, квискаловая кислота; LY367366, (S) – тиоксантилметил-4-карбоксивфенилглицин.

определенное пространственное разрешение. В данном случае: 2,2 [11] и 3,3 Å [6] (mGluR1), 1,7 и 1,8 Å [13] (mGluR2) для агониста и антагониста соответственно. Это означает полную необоснованность использования при объяснении селективности лигандов структурных различий, составляющих доли ангстрема. Нужно отметить гораздо лучшее качество экспериментальных данных в случае ионотропных рецепторов по сравнению с метаботропными. По этой причине мы считаем недостаточно обоснованным объяснение антагонистической активности, приведенное в работе [18], авторы которой считают ответственным за антагонистическую активность взаимодействие ароматических систем лиганда MCPG и аминокислоты Trp110 (mGluR1). Интересно отметить, что для метаботропных глутаматных рецепторов экспериментально были установлены практически идентичные расположения агониста глутамата (15) (mGluR1 [11]) и антагониста (*S*)-метил-4-карбоксифенилглицина (22) (mGluR1 [18]) в ЛСЦ рецептора. Аналогичная ситуация наблюдается и для ионотропных рецепторов – положение агониста глутамата (GluR2 [13]) достаточно сходно с положением антагониста 6,7-динитрохиноксалин-2,3-диона (33) (GluR2 [13]). При таком характере расположения лигандов не совсем понятными остаются причины, обуславливающие активность антагонистов, сходных по размеру с агонистами. В метаботропных глутаматных рецепторах лиганды располагаются вдоль границы между комплементарными глобулами и не полностью ясно, каким образом антагонисты стабилизируют открытую форму рецептора. В ионотропных рецепторах причины антагонистической активности лигандов более очевидны, поскольку антагонисты (так же как и агонисты), располагаются в качестве распорки между комплементарными глобулами. И в случае метаботропных, и в случае ионотропных рецепторов имеется гипотетическая возможность расположения антагонистов в ЛСЦ закрытых форм (см. ниже). Необходимо также отметить, что ввиду отсутствия достаточного объема экспериментальных данных мы не можем сделать достаточно однозначных выводов об идентичности геометрии ЛСЦ (а также степени схлопывания комплементарных глобул) в случае разных агонистов и сохранении одинаковых степеней открытия комплементарных глобул в случае антагонистов.

Другой важной проблемой при проведении молекулярного докинга является необходимость учета влияния молекул растворителя. Программа AutoDock3.0 позволяет учесть влияние растворителя, даже если он не задан в явном виде. Целью проведения докинга в структуры с разным количеством и расположением молекул воды в ЛСЦ было выявление ее влияния на положение лиганда (и на энергию докинга) в ЛСЦ

mGluR1-рецептора. В качестве примера упомянем о важной роли молекулы воды в связывании глутамата с ЛСЦ mGluR1 [11]. Присутствие молекулы воды между дистальной карбоксильной группой глутамата и Arg78 обусловлено как большим расстоянием между ними (~6 Å), так и невозможностью расположения дистальной карбоксильной группы около Arg78 без изменения положения боковых цепей аминокислотных остатков, образующих своеобразный карман (Tyr74, Ser186, Lys409). Другой проблемой является ориентация атомов водорода в молекулах воды. Чтобы атомы водорода в молекулах воды приняли корректную ориентацию, проводили оптимизацию геометрии рецептора с молекулами воды в явном виде при фиксированных положениях атомов кислорода. Варьирование числа молекул воды в ЛСЦ приводит к незначительному изменению энергии докинга, в то же время сильно влияя на ориентацию и положение лигандов (рис. 2, 3). Полученные результаты молекулярного докинга представлены в табл. 2. Таким образом, для произвольного лиганда, докируемого в ЛСЦ, дос-

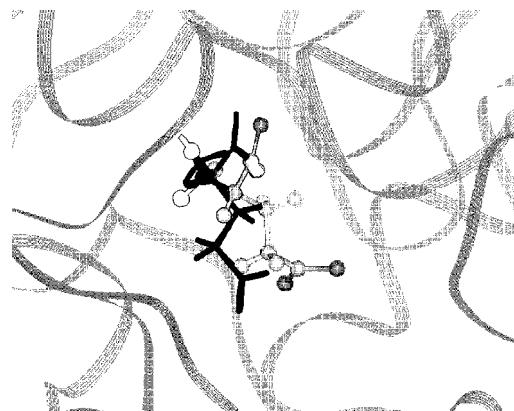


Рис. 2. Результаты докинга агониста (глутамата) в ЛСЦ закрытой формы mGluR1-рецептора в отсутствие молекул воды (шаро-стержневое изображение). Экспериментально определенное положение глутамата показано в виде стержневого изображения

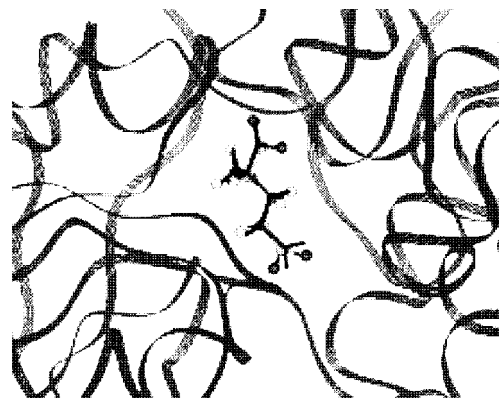


Рис. 3. Результаты докинга агониста (глутамата) в ЛСЦ закрытой формы mGluR1-рецептора в присутствии трех молекул воды (шаро-стержневое изображение). Экспериментально определенное положение глутамата показано в виде стержневого изображения

таточно сложно предсказать расположение молекул воды, важных для связывания.

Интересно отметить положение в ЛСЦ лигандов с фосфоновыми группами (соединения 7, 25, 26 на рис. 1). При докинге в метаботропные глутаматные рецепторы размер и заряд фосфоновой группы, больший, чем карбоксильной, приводят к тому, что она располагается не в небольшом кармане около Arg78 (здесь и далее нумерация дана для mGluR1) и Lys409, а в значительной степени экспонирована в сторону комплементарной глобулы и взаимодействует с Arg71 и Arg323. Максимальное агонистическое действие фосфоновых производных по отношению к рецепторам III группы можно объяснить наличием в области связывания дистальной кислотной функции лиганда трех положительно заряженных аминокислотных остатков и отсутствием аминокислоты Tyr (гомологичной Ser164 в mGluR1), находящейся в рецепторах II группы [12]. Интересно отметить, что по результатам расчета почти все лиганды, проявляющие селективность по отношению к подтипу mGluR2 (ABHxD-I (2), (1*S*,3*R*)-ACPD (3), (2*R*,4*R*)-APDC (8), LY354740 (19), LY379268 (20), LY389795 (21), (2*S*,4*S*)-4MG (23)), имеют по отношению к mGluR2 наихудшее связывание. А лиганды, проявляющие селективность к mGluR1 ((*S*)-CBPG (11), (*S*)-DHPG (14), (*S*)-HPG (16), Ibo (18), (*S*)-Quis (27)) и mGluR4 ((*S*)-AP4 (7), (*R**S*)-PPG (25, 26)) подтипам, имеют наилучшее связывание с тем подтипом рецептора, к которому проявляют селективность.

Полученные результаты показывают (табл. 1), что некоторые антагонисты метаботропных глутаматных рецепторов, сопоставимые по размеру с агонистами (например CBPG), гипотетически могут взаимодействовать с ЛСЦ закрытой формы рецептора в лучшей степени, чем агонисты, что заслуживает отдельного исследования. Антагонисты же, подобные LY367366 (28), препятствуют схлопыванию комплементарных глобул благодаря наличию объемного заместителя [19]. Несмотря на достаточно малые различия значений энергий докинга для разных лигандов (табл. 1–3), мы все же можем проводить качественную оценку предпочтительности связывания того или иного лиганда с ЛСЦ, поскольку такое сравнение проводится именно в рамках одного типа рецепторов.

Докинг лигандов в открытую форму mGluR1-рецептора был проведен с целью изучения геометрии ЛРК, получаемых с использованием автоматического докинга при большом размере межглобулярного пространства (исследуемой области). Полученные результаты приведены в табл. 2 (последний столбец). На рис. 4, *a*, *б* показан результат докинга глутамата в ЛСЦ открытой формы mGluR1 (на рис. 4, *a* – общий вид АКД, на рис. 4, *б* – более подробный вид ЛСЦ),

а на рис. 5 – положение антагониста MCPG (22) в ЛСЦ mGluR1-рецептора (расчетные и экспериментальные данные). Довольно большое различие между расчетным и экспериментальными положениями антагониста в некоторой степени можно объяснить недостаточно хорошим пространственным разрешением структуры его комплекса (3,3 Å). Результаты докинга показали, что области связывания дистальных карбоксильных групп антагониста (MCPG) и агониста (Glu) практически идентичны, однако благодаря большей длине антагониста, расположение его карбоксильной группы несколько ближе к Tyr74, Arg78, Lys409 (поэтому взаимодействие MCPG с этими аминокислотами более сильное, чем в случае Glu). Во многих случаях (при большом размере исследуемого конформационного пространства) комплексы с глутаматподобным расположением фармакофоров не всегда соответствуют расчетному минимуму энергии взаимодействия с ЛСЦ. Это наблюдается и в данном случае при докинге глутамата и MCPG в открытую форму mGluR1-рецептора (наиболее энергетически выгодным для них является расположение около шарнирной области, соединяющей комплементарные глобулы). Результаты расчетов показали, что агонисты и антагони-



Рис. 4. Результаты докинга агониста (глутамата) в ЛСЦ открытой формы mGluR1-рецептора (шаро-стержневое изображение): *a* – общий вид АКД mGluR1 и положение глутамата в нем; *б* – более подробный вид связывания глутамата в области ЛСЦ. Экспериментально определенное положение глутамата показано в виде стержневого изображения

Т а б л и ц а 2

Значения энергии докинга в закрытую (в присутствии разного количества молекул воды) и открытую формы АКД mGluR1-рецептора*

Номер лиганда	Название лиганда	Закрытая форма mGluR1								Открытая форма mGluR1
		Общее количество молекул воды								
		0	1		2		3			
		Номера молекул воды (из комплекса 1EWK)								
		–	46	17	11	17, 46	11, 46	11, 17	11, 17, 46	
1	ABHD-II	-11,56	-11,47	-11,75	-11,91	-11,76	-11,92	-12,03	-11,95	-7,99
2	ABHxD	-11,19	-11,51	-11,53	-11,43	-11,47	-11,01	-11,72	-11,72	-7,83
3	(1S,3R)-ACPD	-11,63	-11,61	-11,59	-11,61	-11,74	-11,84	-11,78	-11,23	-7,07
4	(3S,4S)-ACPT-III	-10,93	-10,92	-11,58	-10,69	-11,10	-10,81	-10,99	-11,11	-8,37
5	(S)-ACUDA, ант	-12,21	-12,42	-12,30	-12,52	-12,49	-12,12	-11,51	-11,42	-9,21
6	(S)-AIDA, ант	–	–	–	–	–	–	–	–	-8,95
7	(S)-AP4	-11,37	-11,73	-11,48	-12,03	-11,64	-12,44	-12,05	-12,45	-7,35
8	(2R,4R)-APDC (-1)*	-11,00	-11,26	-10,98	-11,28	-11,26	-11,50	-11,27	-11,67	-6,83
9	(2R,4R)-APDC (0)*	-11,42	-11,54	-11,47	-11,41	-11,52	-11,65	-11,38	-11,74	-6,39
10	(S)-4C3HPG, ант	-11,60	-11,41	-11,78	-12,30	-11,85	-11,50	-10,37	-10,12	-8,02
11	(S)-CBPG, ант	-13,70	-11,75	-13,28	-13,81	-11,87	-12,51	-13,74	-11,75	-8,29
12	(2S,3S,4S)-CCG-I	-11,22	-11,46	-11,07	-11,59	-11,31	-12,25	-11,74	-12,28	-7,17
13	(S)-4CPG, ант	-11,83	-11,28	-11,92	-12,27	-11,24	-11,37	-12,64	-10,94	-8,29
14	(S)-3,5-DHPG	-12,13	-11,82	-11,95	-11,57	-12,04	-11,29	-11,39	-9,69	-7,72
15	(S)-Glu	-10,90	-10,95	-10,77	-11,27	-10,96	-11,47	-11,25	-11,43	-7,48
16	(S)-HPG	-11,52	-11,38	-11,64	-11,42	-11,31	-10,74	-11,46	-10,21	-8,31
17	HYDIA, ант	-11,54	-11,54	-11,55	-11,89	-11,41	-11,85	-11,41	-9,73	-8,06
18	Ibo	-10,02	-9,94	-9,98	-10,09	-10,18	-10,09	-10,13	-9,87	-7,42
19	LY354740	-12,26	-10,95	-12,34	-12,46	-10,53	-11,23	-12,55	-9,83	-8,08
20	LY379268	-12,11	-10,48	-11,96	-12,55	-10,30	-10,99	-12,52	-10,37	-7,66
21	LY389795	-12,42	-10,49	-12,29	-11,93	-10,50	-10,41	-11,66	-9,44	-8,07
22	(S)-M4CPG, ант	-11,00	-11,01	-10,67	-11,10	-10,94	-11,32	-10,95	-10,84	-7,66
23	(2S,4S)-4MG	-11,59	-11,69	-11,27	-11,55	-11,43	-11,99	-11,43	-11,64	-7,68
24	(S)-4MeGlu	-11,31	-11,35	-10,94	-11,76	-11,28	-11,61	-11,41	-11,28	-7,34
25	(S)-PPG	-11,87	-11,86	-11,03	-11,75	-11,00	-11,49	-9,82	-9,95	-8,25
26	(R)-PPG	-12,39	-12,22	-12,07	-10,78	-13,07	-10,43	-9,98	-9,95	-8,69
27	(S)-Quis	-11,38	-11,27	-11,13	-11,48	-11,20	-10,77	-10,50	-10,49	-7,92
28	LY367366	–	–	–	–	–	–	–	–	-14,00

* Все обозначения приведены в пояснениях к табл. 1. (-1)*,(0)* – суммарные заряды лиганда.

Таблица 3

Значения энергии докинга в закрытые формы GluR рецепторов

Номер лиганда	Название лиганда	Заряд лиганда	AMPA (GluR2)	КА (GluR5)	КА (GluR6)	КА (GluR7)	КА (КА1)
29	(S)-AMPA	0	-13,82	-13,57	-11,27	-11,93	-12,52
30	(S)-AP5(e) ^c	-2	-13,45	-11,76 ^c	-8,84	-10,99	-9,92 ^c
31	(S)-AP5(f) ^c	-2	-13,97	-12,30 ^c	-10,05	-11,48	-10,81 ^c
32	(S)-ATPA	0	-15,58	-15,14	-9,14 ^c	-14,11	-14,23
33	DNQX	0	-12,52	-11,62 ^c	-8,70	-11,71	-10,98 ^c
34	Домоевая кислота	-2	-6,57 ^b	-8,92 ^b	- ^a	- ^a	-6,78 ^b
15	(S)-Glu	-1	-12,35	-11,10	-9,73	-10,81	-9,96 ^d
35	Gly	0	-8,45	-8,25	-5,95	-7,02	-7,62
36	КА	-1	-15,45	-12,76	-10,11	-12,88	-10,64 ^c
37	NMDA	-1	-12,17	-10,89	-8,58 ^c	-10,52	-8,71 ^c
38	(D)-Ser	0	-9,59	-9,50	-7,24	-8,02	-8,85

Примечания. ^a агонист не помещается в ЛСЦ рецептора; ^b положение фармакофорных групп отлично от их расположения в каинатном ЛРК; ^c значение энергии докинга для комплекса с глутаматоподобным расположением фармакофоров; ^d глутамат имеет вытянутую конформацию; ^e (e) – вытянутая конформация, (f) – скрученная конформация. Сокращения: (S)-AMPA, α-амино-3-гидрокси-5-метилизоксазолпропионовая кислота; (S)-AP5, 2-амино-5-фосфоновалериановая кислота; (S)-ATPA, (S)-2-амино-3-(3-гидрокси-5-третбутилизоксазол-4-ил)пропановая кислота; DNQX, 6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион; (S)-Glu, (S)-глутаминовая кислота; Gly, глицин; КА – каиновая кислота; NMDA, N-метил-D-аспаратат; (D)-Ser, (D)-серин

сты имеют сходные наиболее энергетически выгодные варианты расположения в ЛСЦ, что хотя согласуется с экспериментальными данными [11, 18] и позволяет корректно предсказать геометрию ЛРК, но не позволяет сделать заключение относительно причин селективности лигандов и их разного действия. Необходимо отметить, что при автоматическом докинге для лиганда существует достаточно малая вероятность расположения в межглобулярном пространстве в виде распорки между комплементарными глобулами, поскольку при проведении автоматического докинга структура белка фиксирована, отсутствуют молекулы воды и энергетически выгодными для лиганда

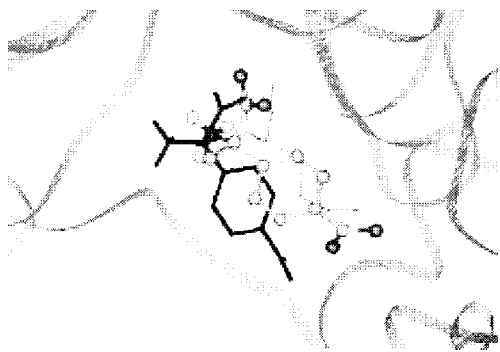


Рис. 5. Результаты докинга антагониста (MCPG) в ЛСЦ открытой формы mGluR1-рецептора (шаро-стержневое изображение). Экспериментально определенное положение MCPG показано в виде стержневого изображения, а глутамата – тонкими линиями

будут положения параллельно поверхности белка.

Перейдем теперь к рассмотрению результатов автоматического докинга ряда лигандов в некоторые подтипы AMPA и каинатных рецепторов. Среди исследованных лигандов были AMPA (29), каинат (36) и NMDA (37) – лиганды, действующие на три основных типа ионотропных рецепторов. Число возможных расположений лигандов в ЛСЦ, а также их геометрия зависят от подтипа рецептора. Но в общем случае для GluR рецепторов при докинге лигандов в ЛСЦ были получены несколько лучшие результаты, чем в случае mGluR-рецепторов. Отчасти это связано с более плотным расположением лигандов в ЛСЦ закрытых форм. Большинство ЛРК имеют такое расположение фармакофорных групп в ЛСЦ, которое согласуется с экспериментальными данными [13] и при котором достигается минимум энергии докинга для ЛРК. Докинг агонистов проводили только в ЛСЦ закрытых форм, поскольку в этом случае возможно более точное (чем для открытой формы) определение расположения лигандов в ЛСЦ. Полученные данные приведены в табл. 3. Каинат связывается лучше, чем глутамат со всеми подтипами рецепторов. Интересно сравнить эти расчетные данные с экспериментальными для некоторых подтипов (табл. 4). На рис. 6, 7 показаны рассчитанные варианты положений агонистов AMPA и глутамата в закрытой форме и сравнение их с экспериментально определенным положением AMPA. В последнем случае положение фармакофорных групп глутамата и AMPA идентичны (рис. 7).

Лиганд АТРА (рис. 1, соединение 32), являющийся селективным агонистом GluR5-подтипа [21], по расчетным данным должен демонстрировать по отношению к этому подтипу наилучшее связывание по сравнению с другими каинатными рецепторами (табл. 3). Отличием АТРА (32) от АМРА (29) является наличие *трет*-бутильной группы вместо метильной, что приводит к гораздо более плотному расположению лиганда в ЛСЦ, что, по-видимому, и объясняет селективность АТРА к GluR5. Таким образом, расчетные данные позволяют выявить следующую закономерность: полнота заполнения лигандом пространства ЛСЦ оказывает значительное влияние на конечное значение энергии докинга (приводит к увеличению взаимодействия лиганда с белком), что объясняется более благоприятным ван-дер-ваальсовым взаимодействием. Согласно экспериментальным данным, эффективность агонистов по отношению к GluR5-подтипу уменьшается в ряду [21]: АМРА ($EC_{50} = 3,7$ мкМ) > NMDA ($EC_{50} = 11$ мкМ) = каинат ($EC_{50} = 13$ мкМ) > АТРА ($EC_{50} = 33$ мкМ) (при этом АТРА проявляет к GluR5-подтипу наибольшую селективность среди четырех данных агонистов). В качестве другого примера можно привести результаты докинга домоевой кислоты (рис. 1, соединение 34; табл. 3), являющейся высокоэффективным агонистом каинатных рецепторов (сильным нейротоксином), значительно более эффективным, чем каинат [6]. Этот пример ярко демонстрирует, что ни сравнительный анализ строения ЛСЦ каинатных рецепторов [9], ни результаты докинга (табл. 3) не позволяют предсказать высокоэффективного агонистического действия домоевой кислоты на GluR5- и GluR6-подтипы, и антагонистического действия на GluR7-подтип. К тому же домоевая кислота, имея в основе своей каинатные фармакофоры, не может расположиться в ЛСЦ подобным каинату обра-



Рис. 6. Результаты докинга агониста (АМРА) в ЛСЦ закрытой формы GluR2-рецептора (шаро-стержневое изображение). Экспериментально определенное положение АМРА показано в виде стержневого изображения

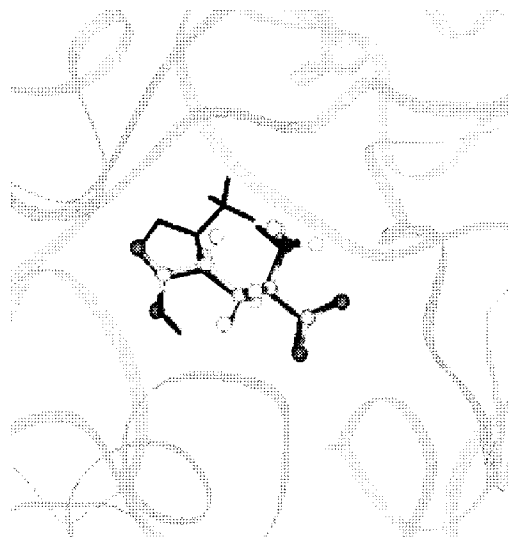


Рис. 7. Результаты докинга агониста (глутамата) в ЛСЦ закрытой формы GluR2-рецептора (шаро-стержневое изображение). Экспериментально определенное положение АМРА показано в виде стержневого изображения

зом. Отдельно рассмотрим результаты докинга лигандов в GluR2-подтип (код в белковой базе данных – 1FTM [13]). Интересно отметить, что значения энергии докинга в экспериментально определенную структуру GluR2 для всех агонистов (за исключением домоевой кислоты, располагающейся в ЛСЦ отличным от каината образом) являются минимальными для ЛРК всех исследованных подтипов (табл. 3). Причина этого не совсем понятна, так как в случае mGluR-рецепторов подобной зависимости не наблюдается (табл. 1). Докинг антагонистов (DNQX (33) и AP5 (30)) проводили для того, чтобы продемонстрировать возможность их расположения в закрытой форме ЛСЦ. Оба этих антагониста в соответствии с результатами докинга имеют возможность располагаться в ЛСЦ закрытых форм GluR-рецепторов, причем AP5 располагается достаточно свободно даже в вытянутой конформации (в то же время такой агонист, как домоевая кислота (рис. 1, соединение 34), не способен располагаться в ЛСЦ закрытой формы каинатных рецепторов ввиду наличия объемного заместителя). Для изучения влияния начальной конформации антагониста AP5 на результаты докинга были использованы вытянутая и скрученная конформации (табл. 3). Так, для скрученной начальной конформации антагониста рассчитанные значения энергий ЛРК для исследованных подтипов оказались меньшими, чем при начальной вытянутой конформации. Необходимо отметить, что несмотря на то, что размер антагониста мог бы позволить им расположиться внутри закрытой формы ЛСЦ рецептора, их ориентация несколько отличается от таковой в ЛСЦ открытых форм. В последнем случае лиганды в большей степени развернуты перпендикулярно границе между комплементарными глобулами,

Т а б л и ц а 4

Действие глутамата и каината на рецепторы разных подгрупп [20]

Лиганд	K _i , нмоль			
	GluR2	GluR5	GluR6	GluR7
Глутаминовая кислота	12221±2744	701±46	1106±159	789±83
Каиновая кислота	940±93	177±22	32±13	10±2

чем в случае закрытой формы. Так, в экспериментально определенной структуре комплекса GluR2 с DNQX последний располагается практически как распорка между комплементарными глобулами, тогда как в смоделированном комплексе – более развернутым образом. Вероятно, действие антагонистов обусловлено тем, что лиганду в этом случае энергетически более выгодно взаимодействовать с открытой (или частично закрытой) формой рецептора, стабилизируя ее.

Одной из главных нерешенных проблем для ЛРК остается проблема вычисления так называемых скоринг-функций (наборов параметров для вычисления энергии докинга). Поскольку универсальные скоринг-функции достаточно грубы, наиболее точным подходом является их построение для каждой конкретной системы. Однако такой подход может дать лишь некоторое увеличение точности вычисления энергии до-

кинга для конкретной системы (но, разумеется, не может привести к значительному изменению общей картины) и также не позволяет объяснить ни селективность, ни другие особенности действия лигандов. К тому же при использовании частных скоринг-функций увеличение точности вычислений, проводимых с их помощью, компенсируется снижением их масштабируемости на более общие случаи. Необходимо четко выделять задачи, решение которых возможно с помощью молекулярного докинга. Он эффективен в случаях проведения высокопроизводительного виртуального скрининга, задача которого заключается только лишь в определении возможности расположения лигандов (из базы данных) в ЛСЦ биомиметической и оценке комплементарности расположения их функциональных групп (время вычислений до нескольких минут), а также при определении геометрии ЛРК (время вычислений, как правило, до нескольких часов). Полученные результаты показали применимость методологии молекулярного докинга для качественного изучения и определения геометрии ЛРК глутаматных рецепторов, в то же время количественные данные, полученные с использованием программы AutoDock3.0, могут рассматриваться лишь как оценочные и не могут использоваться для построения корреляций с экспериментальными данными. Однако иногда в случае наиболее селективных лигандов наблюдается минимум энергии для ЛРК определенных подтипов рецепторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Миннауки РФ (проект “Компьютерное конструирование лекарств”) и правительства Италии (Accordo di cooperazione scientifica).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J. // J. Comp. Chem. 1998. **19**. P. 1639.
- Jones G., Willett P., Glen R.C. // J. Comput.-Aided Mol. Des. 1995. **9**. P. 532.
- Oshiro C.M., Kuntz I.D., Dixon J.S. // J. Comput.-Aided Mol. Des. 1995. **9**. P. 113.
- Goodsell D.S., Olson A.J. // Proteins: Str. Func. Genet. 1990. **8**. P. 195.
- Goodford P.J. // J. Med. Chem. 1985. **28**. P. 849.
- Brauner-Osborne H., Egebjerg J., Nielsen E.O., Madsen U., Krosgaard-Larsen P. // J. Med. Chem. 2000. **43**. P. 2609.
- Ma D. // Bioorg. Chem. 1999. **27**. P. 20.
- Зефирова О.Н., Зефиров Н.С. // ЖОрХ. 2000. **36**. С. 1273.
- Беленикин М.С., Баскин И.И., Костантино Г., Палюлин В.А., Пелличари Р., Зефиров Н.С. // ДАН. 2002. **386**. С. 118.
- Westbrook J., Feng Z., Jain S., Bhat T.N., Thanki N., Ravichandran V., Gilliland G.L., Bluhm W., Weissig H., Greer D.S., Bourne P.E., Berman H.M. // Nucl. Acids. Res. 2002. **30**. P. 245.
- Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka S., Nakanishi S., Jingami H., Morikawa K. // Nature. 2000. **407**. P. 971.
- Беленикин М.С., Баскин И.И., Костантино Г., Палюлин В.А., Пелличари Р., Зефиров Н.С. // ДАН. 2002. **386**. С. 261.
- Armstrong, N., Gouaux E. // Neuron. 2000. **28**. P. 165.
- MacKerell J., Bashford A. D., Bellott M. // J. Phys. Chem. B. 1998. **102**. P. 3586.
- Moroni F., Lombardi G., Thomsen C., Leonardi P., Attucci S., Peruginelli F., Torregrossa S.A., Pellegrini-Giampietro D.E., Luneia R., Pellicciari R. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997. **281**. P. 721.
- InsightII Modeling Environment. San Diego: Molecular Simulations, Inc.
- Besler B.H., Merz K.M., Kollman P.A. // J. Comp. Chem. 1990. **11**. P. 431.
- Tsuchiya D., Kunishima N., Kamiya N., Jingami H., Morikawa K. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002. **99**. P. 2660.
- Беленикин М.С., Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефиров Н.С. // ДАН. 2002. **384**. С. 113.
- Pedregal C., Collado I., Escribano A., Ezquerra J., Dominguez C., Mateo A.I., Rubio A., Baker S.R., Goldworthy J., Kamboj R.K., Ballyk B.A., Hoo K., Bleakman D. // J. Med. Chem. 2000. **43**. P. 1958.
- Kristensen B.W., Norberg J., Zimmer J. // Brain Res. 2001. **917**. P. 21.