

УДК 577.1: 547.96

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ

А.А. Иванов, И.И. Баскин, В.А. Палюлин, Н.С. Зефирова

(кафедра органической химии)

В работе проведено обобщение данных по компьютерному моделированию аденозиновых рецепторов и молекулярному докингу их лигандов. Показано, что на сегодняшний день наиболее изученными являются А1-, А2а- и А3-подтипы аденозиновых рецепторов, в то время как структура и механизмы связывания лигандов А2b-подтипа практически не исследованы. Рассмотрены разные подходы к построению моделей данных рецепторов, а также основные закономерности и отличия в механизмах связывания лигандов.

Как известно, все пуриновые рецепторы подразделяются на две большие группы – P1 (или аденозиновые) и P2 [1]. Общим природным агонистом аденозиновых рецепторов является аденозин, в то время как общим лигандом P2-рецепторов служит АТФ [2]. Кроме того, P2-рецепторы не чувствительны к антагонистическому действию метилксантинов, являющихся эффективными антагонистами P1-рецепторов [3, 4]. Основываясь на разной селективности к аналогам аденозина, а также на биохимических и фармакологических свойствах, аденозиновые рецепторы разделяют на четыре подтипа (А1, А2а, А2b и А3), которые клонированы для разных видов млекопитающих и человека. Все они являются сопряженными с G-белками. Аденозиновые рецепторы широко представлены в разных типах тканей и участвуют в регуляции целого ряда биологических процессов. Активация А1- и А3-рецепторов вызывает снижение уровня цАМФ [5, 6], а активация А2а- и А2b-рецепторов приводит к его увеличению [7, 8]. Кроме того, стимулирование А1-рецепторов вызывает активацию калиевых и дезактивацию кальциевых каналов [9, 10], а стимулирование А2а-рецепторов приводит к ингибированию функциональной активности D2-дофаминовых рецепторов, что имеет важное значение в развитии неврологических и психических заболеваний [11, 12]. Лиганды аденозиновых рецепторов находят широкое применение в фармакологии и медицине, что в свою очередь делает крайне важной и актуальной задачу изучения структуры данных рецепторов и поиска их новых, более эффективных и селективных лигандов. На сегодняшний день существует достаточно большое число публикаций, посвященных молекулярному моделированию аденозиновых рецепторов с использованием различных подходов к построению моделей. В лаборатории органического синтеза кафедры органической химии активно ведутся работы по моделированию аденозиновых рецепторов и компьютерному дизайну их селективных лигандов. Целью данного обзора является обобщение накопленных данных по моделированию аденозиновых рецепторов.

Аденозиновые рецепторы, как и другие рецепторы, сопряженные с G-белками, представляют собой мембранные белки, плохо поддающиеся кристаллизации, а следовательно, точному структурному изучению методом рентгеноструктурного анализа. На рис. 1 представлено общее строение сопряженных с G-белками рецепторов, состоящих из семи трансмембранных α -спиралей, попарно соединенных тремя внешними и тремя внутриклеточными гидрофильными петлями.

К настоящему времени существуют надежные данные рентгеноструктурного анализа двух схожих мембранных белков – бактериородопсина и родопсина. Как правило, именно эти белки используют в качестве шаблонов для построения молекулярных моделей рецепторов, сопряженных с G-белками.

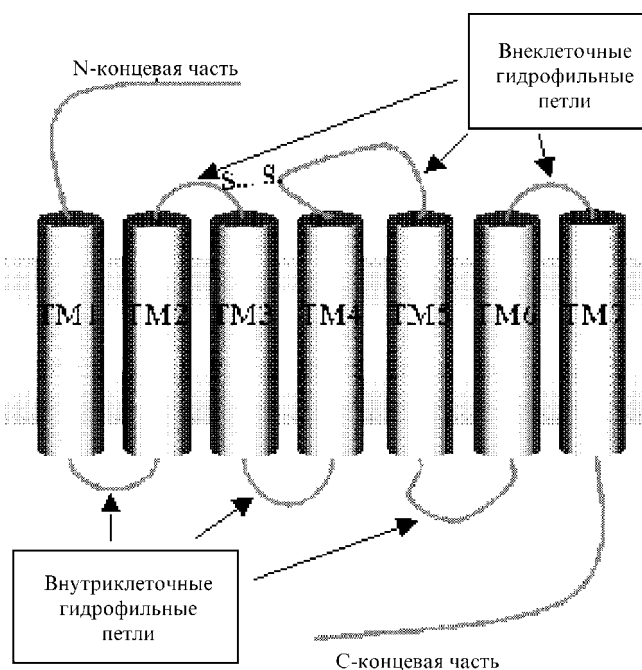


Рис. 1. Общее строение рецепторов, сопряженных с G-белками

Первые модели рецепторов, сопряженных с G-белками, базировались на структуре бактериородопсина, полученной методом электронной микроскопии [13, 14]. Предполагалось, что рецепторы, сопряженные с G-белками, имеют такое же расположение трансмембранных α -спиралей, что и бактериородопсин. Однако было высказано предположение, что бактериородопсин не является подходящим шаблоном для построения моделей, так как не является сопряженным с G-белком. Данные электронной микроскопии родопсина коровы, лягушки и кальмара показали, что действительно расположение α -спиралей в родопсине и бактериородопсине существенно отличается [15–17]. В 1993 г., анализируя аминокислотные последовательности более двухсот рецепторов, сопряженных с G-белками, и данные электронной микроскопии, Болдуин предложил два правила расположения семи трансмембранных спиралей [18]: 1) каждая α -спираль должна располагаться после предыдущей в аминокислотной последовательности; 2) первая, четвертая и пятая спирали должны находиться в наибольшей, а третья спираль – в наименьшей близости к липидному окружению рецептора. На основании этих правил была построена молекулярная модель β 2-адренорецептора [19]. Были построены также модели с использованием автоматизированного подхода, основанного на детальном анализе аминокислотных последовательностей, множественном выравнивании этих последовательностей и использовании интерактивных графических пакетов [20, 21]. Была предложена методика “упаковки” семи α -спиралей рецептора в трансмембранный домен, учитывающая правила Болдуина и базирующаяся на экспериментальных и теоретических данных [22, 23]. В 1997 и 1999 гг. были построены модели, основанные на расчетах по методу дистанционной геометрии и учитывающие максимальное число водородных связей внутри α -спиралей для рецепторов, сопряженных с G-белками [24, 25].

Первой моделью аденозиновых рецепторов стала модель A1-подтипа, построенная в 1992 г. [26] по гомологии со структурой бактериородопсина низкого разрешения. К этому моменту уже были опубликованы данные по клонированию и мутагенезу A1-рецептора коровы [27], было известно, что при замене His278 на Leu278 в седьмой α -спирали способность как агонистов ($[^{125}\text{I}]\text{APNECA}$), так и антагонистов ($[^3\text{H}]\text{XAC}$) связываться с рецептором падает более, чем на 90%, в то время как замена His251 на Leu251 в шестой α -спирали приводила к падению афинности для антагонистов в гораздо большей степени, чем для агонистов. На основании полученных данных авторами [27] был сделан вывод, что оба гистидиновых остатка важны для связывания как агонистов, так и антагонистов, но His251 особенно важен для связывания антагонистов аденозиновых рецепторов. В работе [26] с помощью компьютер-

ного моделирования было показано, что химическая модификация двух гистидиновых остатков, расположенных в шестой и седьмой α -спиралях, сильно влияет на связывание лигандов. Эти данные, заложившие основу для дальнейшего изучения сайта связывания лигандов с аденозиновыми рецепторами, позволили авторам провести докинг эффективного и A1-селективного агониста N⁶-циклопентиладенозина. В 1994 г. в работе [28] была описана подобная модель, базирующаяся на структуре бактериородопсина и учитывающая важность двух гистидиновых остатков для связывания лигандов, для A2a-рецептора крысы. Докинг селективного агониста SHA174 показал, что непротонированный атом азота His245 образует водородную связь с N⁶-протоном лиганда. Кроме того, возможно образование водородных связей между His245 и 2'- и 3'-ОН-группами рибозного фрагмента (рис. 2). В работе отмечено, что некоторые другие аминокислотные остатки рецептора расположены на достаточно близком расстоянии от функциональных групп лиганда. Было показано, что аминогруппа карбоксиамида Asn248 может взаимодействовать с N¹-положением пуринового кольца, гидроксильная группа Ser129 – с непротонированным атомом азота гидразиновой части SHA174, а Ser276 образует водородную связь с 5'-ОН-группой рибозной части лиганда. В этой же работе описаны взаимодействия функциональных групп селективных антагонистов с аминокислотными остатками A2a-рецептора. Стоит отметить, что докинг антагонистов несколько отличает данную работу от большинства других, в которых рассматриваются лишь взаимодействия агонист – рецептор. Докинг наиболее

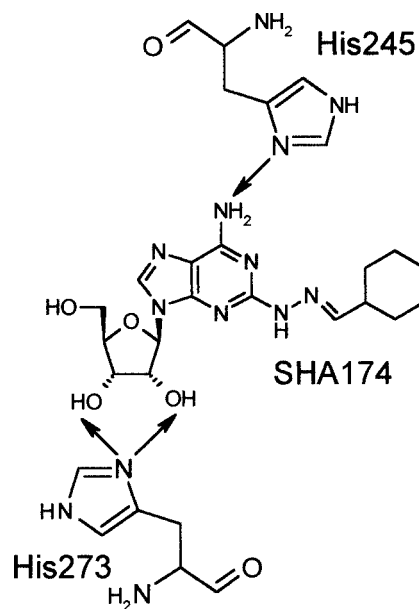


Рис. 2. Фрагмент первой модели A2a аденозинового рецептора [28]

селективного антагониста CSC показал, что Trp241 может взаимодействовать с карбонильной группой (C6=O) лиганда, образуя водородную связь. 3-Хлорстирил (гидрофобный заместитель лиганда) оказался “утопленным” в гидрофобный карман, образованный Ile132, Tyr174, Phe177, Cys249 и Phe252. Кроме того, His245, Asn248 и His273 также находятся в непосредственной близости от лиганда и могут участвовать в его связывании. Позднее с помощью работ по мутагенезу было установлено, что как гистидиновые, так и другие аминокислотные остатки важны для связывания агонистов и антагонистов аденозиновых рецепторов. Важность изолейцина-274 и треонина-277 для связывания лигандов A1-рецептора человека была более детально изучена в [29], где показано, что изолейцин взаимодействует с заместителями в N⁶-положении аденозина, а Thr277 важен для взаимодействия с рибозной частью, особенно при отсутствии заместителей в N⁶-положении. К тем же выводам относительно Thr277 пришли авторы [30]. Одной из наиболее интересных и важных работ последнего времени, посвященных построению модели A1-подтипа и определению сайта связывания, является работа [31], где анализируется докинг шести лигандов данного подтипа, среди которых присутствует природный агонист аденозин. На его примере, подтверждаются данные о взаимодействии рибозной группы лиганда с Thr277 и His278, хотя ничего не сообщается о взаимодействиях с Ile274. В работе также показано, что при наличии фенильного заместителя во втором положении аденозинового кольца антагонистов может образовываться водородная связь между этим заместителем и двумя аминокислотами рецептора (Phe86 и Phe275), хотя Thr277 и His278 также участвуют в связывании.

Между тем существуют данные [32], позволяющие предположить, что His278 может и не принимать участия в связывании антагонистов. В работе [33] описана модель A2a-рецептора человека, основанная на структуре родопсина. Авторами было проведено мутирование двенадцати аминокислотных остатков в пятой, шестой и седьмой α -спиралях, а именно Phe182, Asn253, Cys254, Ile274, His278 и Ser281, присутствующих во всех аденозиновых рецепторах, Phe181 и His250, присутствующих в A1- и A2-рецепторах, Ser277, характерного для A2- и A3-подтипов, Phe257 и Tyr271, характерных для A2-рецепторов и Phe180 (Tyr180), присутствующего в аденозиновых рецепторах либо как Phe, либо как Tyr. Каждая аминокислота подвергалась индивидуальному мутированию на аланин. Было установлено, что при замене Phe180 и Cys254 на Ala, рецептор обладает такой же афинностью к NECA, DPMA, CGS15943 и XAC (рис. 3), что и большинство других аденозиновых рецепторов.

Эти данные позволяют сделать вывод о том, что ароматическая группа в Phe180 и SH-группа в Cys254

не участвуют в связывании лигандов. Мутации Ser277 показали, что гидроксильная группа в боковой цепи серина необходима для эффективного связывания не антагонистов, а агонистов, особенно не замещенных в N⁶-положении. При мутациях Asn181 теряется афинность для агонистов, замещенных в N⁶- и C-2-положениях, не в C-5'. Мутации Phe182, His250, Asn253, Ile274, His278 и Ser281 показали, что данные аминокислоты важны для связывания как агонистов, так и антагонистов A2a-рецептора. Описанная выше работа получила продолжение, и год спустя те же авторы опубликовали новые данные о взаимодействиях между лигандом и аминокислотами в третьей и седьмой α -спиралях [34]. Было показано, что при мутациях Ser90Ala, Ser91Ala и Ser277Cys афинность лигандов меняется незначительно. В то же время более детальное изучение роли Ser281 при связывании с лигандами позволило предположить, что серин в 281 положении в большей степени важен для связывания антагонистов и в меньшей агонистов. Существенным вкладом в изучение аденозиновых рецепторов явилась экспериментальная работа по мутагенезу сайта связывания A1-рецептора человека, а именно аминокислотных остатков, входящих в первые четыре α -спирали [35]. Было установлено, что замена Glu16 и Asp55 на аланин вызывает серьезные изменения в афинности агонистов, что свидетельствует о важности данных аминокислот при связывании агонистов с рецептором. При замене Ser94 на Ala94 не удалось зафиксировать каких-либо изменений в уровне цАМФ даже при высокой концентрации лиганда, эти данные показывают, что Ser94 оказывается важным для связывания как агонистов, так и антагонистов. При этом в работе отмечено, что Ser94 взаимодействует с C2- или C6-положениями аденозинового кольца антагониста, и с N⁷- или N⁹-положениями агониста. На основании модели, приведенной в [33], была построена модель A1-рецептора человека [36]. В работе [36] основное внимание уделено изучению роли аминокислотных остатков в 1–4 α -спиралях; показано, что группировки, расположенные в N⁶-положении лигандов, взаимодействуют с Leu88, Thr91 и Gln92 (рис. 4).

Было отмечено, что замена Gln14 на Thr14 повышает афинность агонистов, в то время как мутации Glu16 в A1-рецепторе и Glu11 в A2a-рецепторе приводят к ее падению. На основании этих данных, было сделано предположение, что мутации в первой α -спирали косвенным образом влияют на взаимодействие рибозной группы лиганда с седьмой α -спиралью, находящейся в непосредственной близости от первой. Важность первой α -спирали для связывания лигандов и возможность ее взаимодействия с гистидином в седьмой α -спирали были также рассмотрены в работе [37]. Для изучения взаимодействий между лигандами и A2a-рецептором, был проведен мутагенез остатка глутаминовой кислоты

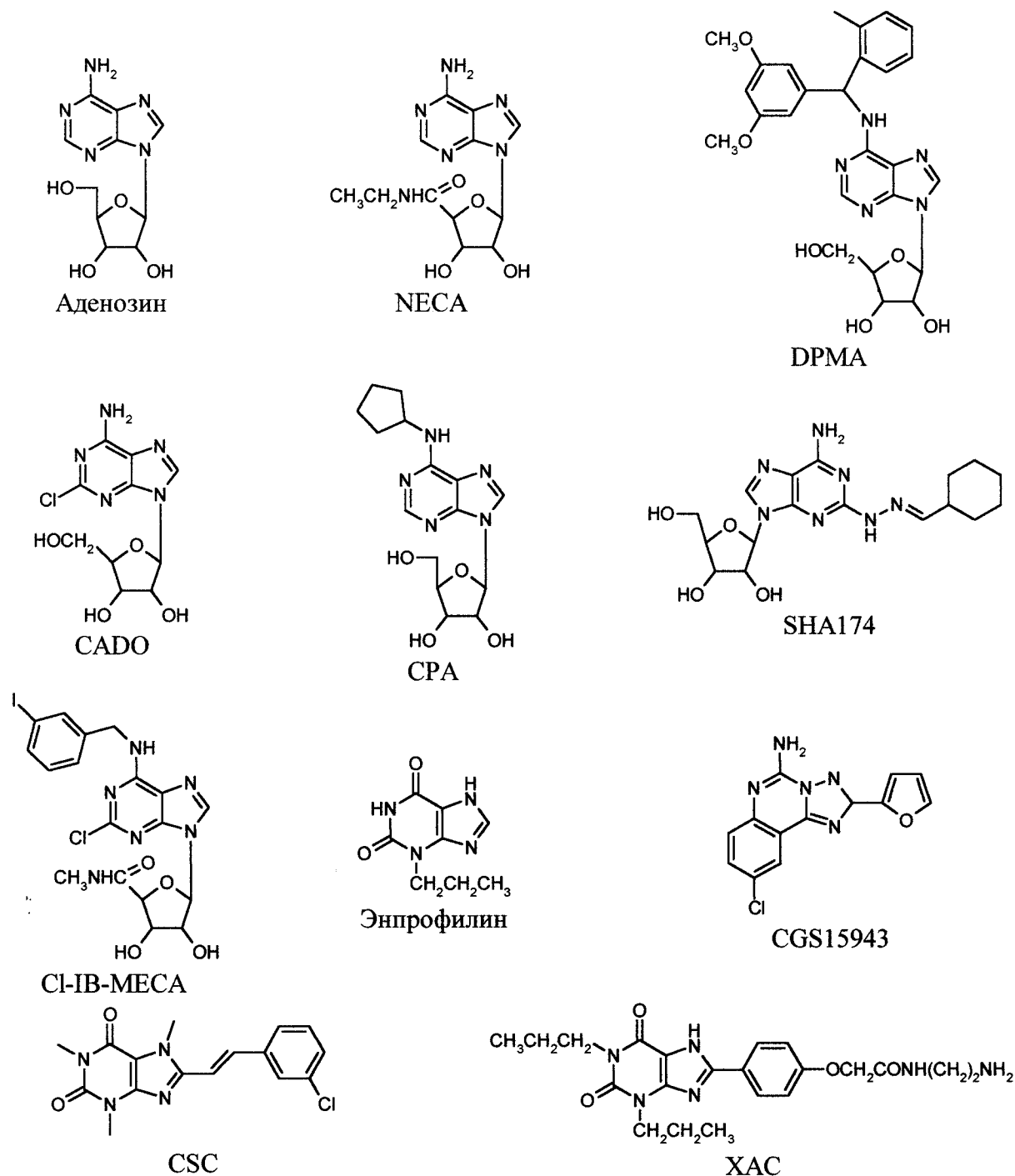


Рис. 3. Лиганды аденозиновых рецепторов

(Glu13), входящей в первую α -спираль, на глутамин и гистидин (His278), входящего в седьмую трансмембранную спираль, на тирозин. Все тестируемые в этой работе лиганды проявляли более низкую аффинность к мутированным рецепторам по сравнению с неизменным A2a-рецептором, что говорит о непосредственном или косвенном влиянии данных аминокислот на связывание агонистов. Аффинность агонистов практически не изменялась при мутациях Glu13, но значительно падала

при мутациях гистидина, что говорит о большей значимости His278 для связывания антагонистов.

К настоящему времени также достаточно хорошо изученным является A3-подтип. К сожалению, для данного подтипа не проводились эксперименты по мутагенезу сайта связывания, что существенным образом затрудняет задачу построения модели и докинга лигандов. Тем не менее существует ряд работ, посвященных именно моделированию данного подтипа и изуче-

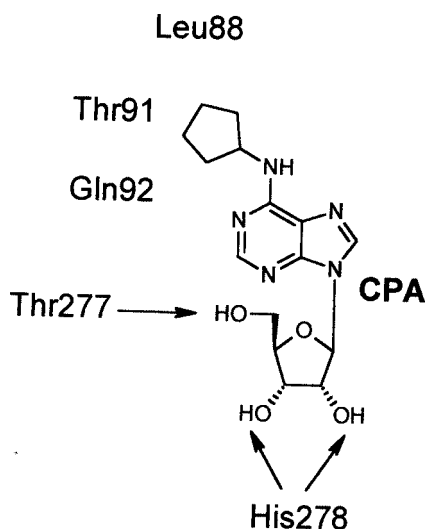


Рис. 4. Связывание агонистов A1-рецептора [36]

нию роли разных аминокислотных остатков при связывании как агонистов, так и антагонистов A3-рецептора. Первые данные о сайте связывания A3-подтипа [38] показали, что взаимодействие лигандов с рецептором осуществляется за счет образования водородных связей с аминокислотами, принимающими участие в связывании лигандов других подтипов аденозиновых рецепторов, а именно с His274 и Ser277. Как и в случае остальных подтипов, лиганды A3-рецептора взаимодействуют с His274 посредством 2'- и 3'-ОН-групп, а с Ser277 за счет 5'-ОН-группы рибозного фрагмента. Стоит отметить, что описанная в данной работе модель строилась по аналогии с построенной ранее моделью A1-рецептора [26] и докинг лигандов проводился по аналогии с A1-подтипом. Так как в A3-рецепторе на

месте гистидинового остатка, взаимодействующего с лигандами в других подтипах, находится серин (Ser249), был проведен анализ возможного участия данной аминокислоты в связывании лигандов рецепторов A3-подтипа и было показано, что Ser249 находится на слишком большом (~7 Å) расстоянии от N⁶-H для возникновения водородной связи и не может участвовать в связывании лигандов A3-подтипа. В 2001 г. появилась работа Якобсона [39], также посвященная A3-подтипу аденозиновых рецепторов, в которой основное внимание было уделено идентификации аминокислот в седьмой α-спирали, принимающих участие в связывании лигандов. Для построения модели A3-рецептора в качестве шаблона использовали структуру родопсина. Построенная модель содержит семь трансмембранных α-спиралей и вторую внутриклеточную гидрофильную петлю. His272 в модели оказался расположенным на расстоянии 2,40 Å от Glu19, вполне достаточном для взаимодействия этих двух аминокислот. Кроме того, в работе говорится, что Glu19 может взаимодействовать с Tyr265 и Ser73. Докинг CADO и CI-IB-MECA (агонистов A3-аденозиновых рецепторов) показал, что NH₂-группа CADO расположена на достаточном для образования водородной связи расстоянии от атомов кислорода Trp243 и Ser247 (2,76 и 2,51 Å соответственно), в то время как в CI-IB-MECA такое взаимодействие наблюдается только с Ser247 (рис. 5).

N⁶-Бензил-замещенное CI-IB-MECA в основном взаимодействует с Phe182, Ile186 и Phe187, благодаря чему весь лиганд оказывается сдвинутым к пятой и шестой α-спиралям и, соответственно, удален от седьмой. Очевидно по этой причине 3'-ОН-группа CI-IB-MECA

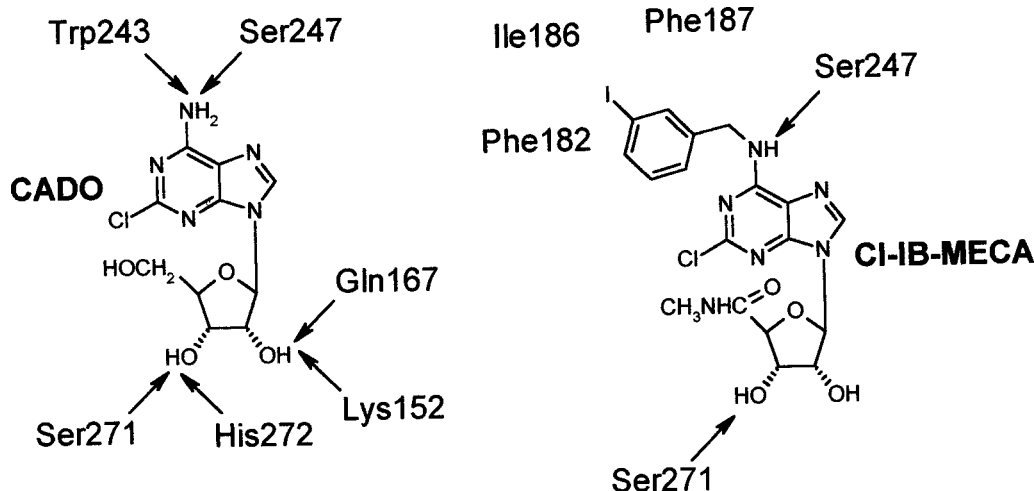


Рис. 5. Связывание лигандов A3-подтипа [39]

взаимодействует лишь с Ser271, тогда как эта же группа в CADO образует водородные связи как с Ser271, так и с His272. Кроме того, отмечено, что гидроксильная группа в 2'-положении рибозного кольца CADO находится на достаточном для образования водородной связи расстоянии от кислорода Gln167 и азота Lys152. Помимо этого, было показано [40], что Ser242, Ser271, His274 и Ser275 могут играть особенно важную роль при связывании антагонистов. В этой работе в качестве антагонистов предложены и синтезированы биологически активные производные пиразоло[4,3-с]-1,2,4-триазоло[1,5-с]пиримидинов. Докинг данных соединений показал, что Ser275 оказывается крайне важным при связывании лигандов.

Анализ литературных данных показывает, что к настоящему времени относительно хорошо изучено строение A1-, A2a- и A3-аденозиновых рецепторов, суще-

ствует обширный набор селективных и эффективных лигандов данных подтипов. В то же время практически неизученным остается A2b-подтип, для которого не существует надежных молекулярных моделей. Кроме того, для данного подтипа ненайденными остаются селективные и эффективные лиганды (как агонисты, так и антагонисты). В заключение необходимо отметить, что на данный момент не построено ни одной молекулярной модели аденозиновых рецепторов, содержащей гидрофильные петли, что в значительной мере затрудняет понимание механизмов селективного связывания лигандов с рецепторами. Тем не менее накопленные к сегодняшнему дню данные, позволяют объяснить основные закономерности и отличия в структуре аденозиновых рецепторов в лиганд-рецепторных взаимодействиях и дают общее представление о перспективных путях поиска новых более эффективных и селективных лигандов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freedholm B.B., Ijzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J. // *Pharmacol. Rev.* 2001. **53**. P. 527.
2. Ralevic V., Burnstock G. // *Pharmacol. Rev.* 1998. **50**. P. 413.
3. De Gubareff T., Sleator W.J. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1965. **148**. P. 202.
4. Sattin A., Rall T.W. // *Mol. Pharmacol.* 1970. **6**. P. 13.
5. Jockers R., Linder M.E., Hoehnegger M. // *J. Biol. Chem.* 1994. **269**. P. 32077.
6. Palmer T.M., Gettys T.W., Stiles G.L. // *J. Biol. Chem.* 1995. **270**. P. 16895.
7. Kull B., Svenningsson P., Fredholm B.B. // *Mol. Pharmacol.* 2000. **58**. P. 771.
8. Bruns R.F., Lu G.H., Pugsley T.A. // *Mol. Pharmacol.* 1986. **29**. P. 331.
9. Iredale P.A., Alexander S.P.H., Hill S.J. // *Br. J. Pharmacol.* 1994. **111**. P. 1252.
10. Bunemann M., Pott L. // *J. Physiol.* 1995. **482**. P. 81.
11. Fuxe K., Ferre S., Zoli M., Agnati L.F. // *Brain Res. Rev.* 1998. **26**. P. 258.
12. Franco R., Ferre S., Agnati L., Torvinen M., Gines S., Hillion J. // *Neuropsychopharmacol.* 2000. **23**. P. S50.
13. Hibert M.F., Trumppkallmeyer S., Bruinvels A., Hoflack J. // *Mol. Pharmacol.* 1991. **40**. P. 8.
14. Findlay J., Eliopoulos E. // *Trends Pharmacol. Sci.* 1990. **12**. P. 492.
15. Schertler G.F.X., Hargrave P.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995. **92**. P. 11578.
16. Schertler G.F.X., Villa C., Henderson R. // *Nature.* 1993. **362**. P. 770.
17. Davies A., Schertler G.F.X., Gowen B.E., Saibil H.R. // *J. Struct. Biol.* 1996. **117**. P. 36.
18. Baldwin J.M. // *EMBO J.* 1993. **12**. P. 1693.
19. Donnelly D., Overington J.P., Ruffle S.V. // *Protein Sci.* 1993. **2**. P. 55.
20. Alkorta I., Du P. // *Protein Eng.* 1994. **7**. P. 1231.
21. Taylor W.R., Jones D.T., Green N. M. // *Proteins.* 1994. **3**. P. 281.
22. Herzyk P., Hubbard R.E. // *Biophys. J.* 1995. **69**. P. 2419.
23. Herzyk P., Hubbard R.E. // *J. Mol. Biol.* 1998. **281**. P. 741.
24. Pogozheva I.D., Lomize A.L., Mosberg H.I. // *Biophys. J.* 1997. **72**. P. 1963.
25. Lomize A.L., Pogozheva I.D., Mosberg H.I. // *JCAMD.* 1999. **13**. P. 325.
26. Ijzerman A.P., van Galen P.J.M., Jacobson K.A. // *Drug Des. Discov.* 1992. **9**. P. 49.
27. Olah M.E., Ren H., Ostrowski J., Jacobson K.A., Stiles G.L. // *J. Biol. Chem.* 1992. **267**. P. 10764.
28. Ijzerman A.P., van der Wenden E.M., van Galen P.J.M. // *Eur. J. Pharmacol.* 1994. **268**. P. 95.
29. Tucker A.L., Robeva A.S., Taylor H.E., Holeton D., Bockner M. // *J. Biol. Chem.* 1994. **269**. P. 27900.
30. Townsend-Nicholson A., Schofield P.R. // *J. Biol. Chem.* 1994. **269**. P. 2373.
31. Bianucci A.M., Bigi M.U., Biagi G., Giorgi I., Livi O., Scartoni V. // *Drug Des. Discov.* 1998. **15**. P. 149.
32. Dawson E.S., Wells J.N. // *Mol. Pharmacol.* 2001. **59**. P. 1187.
33. Kim J., Wess J., van Rhee A.M., Schoneberg T., Jacobson K.A. // *J. Biol. Chem.* 1995. **270**. P. 13987.
34. Jiang Q., van Rhee A.M., Kim J., Yehle S., Wess J., Jacobson K.A. // *Mol. Pharmacol.* 1996. **50**. P. 512.
35. Barbhaiya H., McClain R., Ijzerman A., Rivkees S.A. // *Mol. Pharmacol.* 1996. **50**. P. 1635.
36. Rivkees S.A., Barbhaiya H., Ijzerman A.P. // *J. Biol. Chem.* 1999. **274**. P. 3617.
37. Gao Z.G., Jiang Q., Jacobson K.A., Ijzerman A.P. // *Biochem. Pharmacol.* 2000. **60**. P. 661.
38. Galen van P.J.M., Bergen van A.H., Gallo-Rodriguez C. // *Mol. Pharmacol.* 1994. **45**. P. 1101.
39. Jacobson K.A., Gao Z.G., Chen A., Barak D. // *J. Med. Chem.* 2001. **44**. P. 4125.
40. Baldi P.G., Cacciari B., Moro S., Spalluto G., Pastorin G. // *J. Med. Chem.* 2002. **45**. P. 770.