

На правах рукописи

УДК 541.6:547.96

ИВАНОВ АНДРЕЙ АНДРЕЕВИЧ

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СТРОЕНИЯ АДЕНОЗИНОВЫХ
РЕЦЕПТОРОВ И КОМПЬЮТЕРНЫЙ ДИЗАЙН ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
ЛИГАНДОВ



(02.00.03-Органическая химия
05.13.18-Математическое моделирование,
численные методы и комплексы программ)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Работа выполнена в лаборатории органического синтеза кафедры органической химии Химического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова и в группе Высокоэнергетических соединений Института физиологически активных веществ РАН

Научный руководитель: кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник **Палюлин Владимир Александрович**

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор **Синицын Аркадий Пантелеймонович**
кандидат химических наук, старший научный сотрудник **Махаева Галина Файвелевна**

Ведущая организация: ГУ НИИ Биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН

Защита состоится "22" октября 2004 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета К 002.102.01 в Институте физиологически активных веществ РАН по адресу: 142432 Московская обл., Ногинский р-н, г. Черноголовка, ИФАВ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологически активных веществ РАН.

Автореферат разослан "22" сентября 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета К 002.102.01
кандидат биологических наук



Е.Г. Кирсева

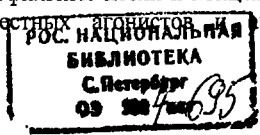
2005-4
16025

886971

Актуальность проблемы. Аденозиновые рецепторы широко представлены в большинстве типов тканей и клеток животных и человека и участвуют в огромном количестве различных физиологических процессов. Как агонисты, так и антагонисты аденозиновых рецепторов могут использоваться в медицине в качестве лекарственных препаратов для лечения ряда нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний. Данные о воздействии лигандов на аденозиновые рецепторы достаточно обширны, но до сих пор отсутствуют экспериментальные данные о пространственном строении этих рецепторов, что существенным образом затрудняет задачу изучения механизмов лиганд-рецепторных взаимодействий и разработку новых более эффективных препаратов. Также неясными остаются причины селективного связывания лигандов с тем или иным подтипом рецепторов. В связи с этим в настоящее время изучение структуры аденозиновых рецепторов и дизайн их новых селективных лигандов представляется весьма важной и актуальной проблемой. Аденозиновые рецепторы, как и другие рецепторы, сопряженные с G-белками, представляют собой мембранные белки, плохо поддающиеся кристаллизации и изучению методом рентгеноструктурного анализа. Поэтому на первый план выступает молекулярное моделирование пространственных структур этих белков. Однако к настоящему моменту не существует ни одной молекулярной модели аденозиновых рецепторов, в которой кроме трансмембранного домена были бы смоделированы все гидрофильные петли, влияющие на общую геометрию рецептора, участвующие в передаче сигнала от рецептора к G-белку и способные принимать участие в связывании агонистов и антагонистов. Кроме того, именно методы молекулярного моделирования дают возможность определить наиболее перспективные модификации существующих лигандов, что оказывается крайне важным при поиске новых биологически активных соединений с заданными свойствами.

Цель работы. 1) Изучение структуры каждого из четырех известных на сегодняшний день подтипов аденозиновых рецепторов человека (A1, A2a, A2b и A3) посредством построения их полных пространственных молекулярных моделей, включающих в себя не только трансмембранные α -спирали, но и гидрофильные петли, а также концевые участки; 2) детальное изучение механизмов лиганд-рецепторных взаимодействий для агонистов и антагонистов данных рецепторов на основе компьютерных молекулярных моделей, определение функциональных групп лигандов и аминокислотных остатков рецепторов, наиболее важных для эффективного связывания лигандов; 3) выявление особенностей строения лиганд-связывающих центров рецепторов и определение причин селективного связывания агонистов и антагонистов с каждым подтипом рецепторов; 4) компьютерное конструирование новых потенциальных лигандов аденозиновых рецепторов.

Научная новизна. В работе впервые построены полные молекулярные модели всех четырех подтипов аденозиновых рецепторов человека, содержащие как трансмембранные α -спирали, так и все гидрофильные петли и концевые участки. С помощью молекулярного докинга известных агонистов и антагонистов



аденозиновых рецепторов детально изучены лиганд-рецепторные взаимодействия и выявлены аминокислотные остатки, имеющие наибольшее значение для эффективного связывания лигандов с каждым подтипом рецепторов. Выявлен ряд важных особенностей строения лиганд-связывающих центров каждого рецептора. На основе полученных молекулярных моделей сделаны выводы о причинах селективности и эффективности различных лигандов, включая их оптические изомеры.

В работе показана возможность существования двух различных механизмов связывания антагонистов, что подтверждено результатами молекулярно-динамических расчетов лиганд-рецепторных комплексов A2B аденозинового рецептора в фосфолипидном бислое.

Все известные на сегодняшний день агонисты аденозиновых рецепторов представляют собой производные аденозина. В данной работе на основе полученных моделей и предложенных механизмов лиганд-рецепторных взаимодействий сконструирован ряд структур новых потенциальных агонистов аденозиновых рецепторов, не являющихся производными аденозина. Предложены пути поиска селективных агонистов A2B рецептора, что является одной из актуальнейших проблем в современной химии аденозиновых рецепторов.

Практическая значимость. Полученные полные молекулярные модели аденозиновых рецепторов человека позволяют не только представить их общее строение, но и выявить важные особенности, характерные для каждого подтипа. Данные модели вносят определенный вклад в понимание общей структуры G-белок сопряженных рецепторов семейства родопсина и могут использоваться при изучении структуры других рецепторов этого семейства. Построенные модели могут быть использованы при изучении механизмов функционирования аденозиновых рецепторов и передачи сигнала к G белку, что является отдельной крайне важной проблемой. Полученные данные о пространственной конфигурации лиганд-связывающих центров и установленные механизмы лиганд-рецепторных взаимодействий, а также предложенные пути поиска новых потенциальных эффективных лигандов аденозиновых рецепторов являются важными для разработки новых лекарственных препаратов для лечения сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваний.

Построенные пространственные модели рецепторов и лиганд-рецепторных комплексов могут использоваться в качестве иллюстративного материала и материала для практических работ при обучении студентов и аспирантов химических, биологических и медицинских ВУЗов.

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на IX Всероссийском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2002); III Российской конференции "Молекулярное моделирование" (Москва, 2003); X Всероссийском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2003); конференции "Medicinal Chemistry and Pharmacology of Purinergic Receptors", проводимой в рамках XIV международного симпозиума "Ongoing Progress in the Receptor Chemistry" (Камерино, Италия, 2003); конференции "Polish-Austrian-

German-Hungarian-Italian Joint Meeting on Medicinal Chemistry" (Краков, Польша, 2003);

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 научные статьи и 5 тезисов докладов на конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка литературы (198 работ). Общий объем диссертации составляет 163 страницы, включая 42 рисунка и 7 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ И РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Во введении формулируется цель и обосновывается актуальность темы диссертационной работы, указываются основные направления исследования.

Первая глава посвящена обзору литературных данных по теме диссертационной работы. В главе рассмотрена современная классификация и общая структура G-белок сопряженных рецепторов (GPCR), современная классификация аденозиновых рецепторов, особенности их строения и функционирования, проведен обзор как известных на сегодняшний день агонистов и антагонистов данных рецепторов, так и основных методов молекулярного моделирования G-белок сопряженных рецепторов. В главе изложены современные данные о лиганд-рецепторных взаимодействиях в аденозиновых рецепторах, полученные как с помощью экспериментальных работ по сайт-направленному мутагенезу, так и найденные с помощью молекулярного моделирования.

Вторая глава посвящена описанию построения пространственных молекулярных моделей четырех подтипов аденозиновых рецепторов человека (A1, A2a, A2b и A3), включающих трансмембранный домен, внеклеточные и внутриклеточные гидрофильные петли и концевые участки.

Аденозиновые рецепторы являются мембранными белками, плохо поддающимися кристаллизации и изучению с помощью рентгеноструктурного анализа. По этой причине, наиболее эффективным оказывается изучение их пространственной структуры с помощью молекулярного моделирования по гомологии со структурно-схожим шаблонным белком. На первом этапе работы было осуществлено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей трансмембранных ос-спиралей четырех известных подтипов аденозиновых рецепторов человека (A1, A2a, A2b и A3) и шаблонного белка - родопсина. Далее с помощью программного комплекса Sybyl 6.9 все аминокислотные остатки трансмембранного домена родопсина, нетождественные остаткам аденозиновых рецепторов, были последовательно заменены на соответствующие аминокислотные остатки каждого подтипа рецепторов. Таким образом были получены четыре трехмерные структуры, отвечающие трансмембранному домену четырех подтипов аденозиновых рецепторов. К данным структурам были добавлены все водородные атомы, после чего была проведена оптимизация геометрии полученных моделей. Минимизация энергии

проводилась методом Пауэлла в силовом поле Tripos с использованием атомных зарядов Кольмана ("KOLLMAN-ALL"). После завершения построения моделей трансмембранных доменов аденозиновых рецепторов с помощью программы LOOP SEARCH блока BIOPOLYMER, входящего в состав комплекса Sybyl 6.9 было осуществлено моделирование внеклеточных и внутриклеточных гидрофильных петель. После вставки всех гидрофильных петель была проведена повторная оптимизация геометрии полученных моделей. Таким образом, были построены четыре пространственные молекулярные модели каждого подтипа аденозиновых рецепторов человека, включающие в себя как трансмембранные α -спирали, так и гидрофильные петли, соединяющие эти спирали. Формальная геометрия полученных моделей была проверена с помощью процедуры ProTable, входящей в состав комплекса Sybyl, и программы Procheck. Проведенный анализ полученных молекулярных моделей показал, что в целом модели обладают достаточным качеством и могут использоваться для изучения лиганд-рецепторных взаимодействий. Однако полученное пространственное расположение гидрофильных петель в данных моделях заметно отличается от их расположения в родопсине, структура которого рассматривается как эталонная для рецепторов первой подгруппы GPCRs. В большей степени это касается второй внеклеточной и третьей внутриклеточной гидрофильных петель, имеющих наибольшую длину.

Для уточнения пространственного расположения гидрофильных петель аденозиновых рецепторов было осуществлено повторное построение молекулярных моделей. При этом в качестве шаблона для моделирования были использованы как трансмембранные α -спирали родопсина, так и его гидрофильные петли и концевые участки. Для этого с помощью программы автоматического выравнивания ClustalX и с учетом выравнивания, проведенного для трансмембранных α -спиралей, было проведено множественное выравнивание полных аминокислотных последовательностей аденозиновых рецепторов и родопсина. После этого с помощью программы Modeller было осуществлено построение пространственных моделей аденозиновых рецепторов. Для тех случаев, когда во множественном выравнивании аминокислотных последовательностей исследуемых рецепторов и родопсина имелись пропуски или вставки, была использована процедура DOLOOP, входящая в Modeller. С помощью данного подхода были получены молекулярные модели четырех подтипов аденозиновых рецепторов, содержащие все атомы основных и боковых цепей рецептора, кроме атомов водорода. Далее с помощью программного комплекса Sybyl 6.9 для каждой из полученных моделей были добавлены водородные атомы и атомные заряды из библиотеки "KOLLMAN-ALL". После этого была выполнена окончательная минимизация энергии в силовом поле Tripos. Верификация моделей была осуществлена с помощью процедуры ProTable и программы Procheck. Проведенный анализ полученных пространственных моделей аденозиновых рецепторов показал их высокое качество и возможность их дальнейшего использования в работе. Полученные модели представлены на рис. 1.

Сравнения молекулярные модели аденозиновых рецепторов, полученные двумя различными способами, следует отметить, что основные отличия при построении моделей были связаны со способом моделирования гидрофильных петель, а не трансмембранных α -спиралей, при построении которых было

использовано одно и то же выравнивание аминокислотных последовательностей и шаблонные α -спирали родопсина. Поэтому расположение аминокислотных остатков внутри трансмембранного домена, в частности лиганд-связывающего центра рецепторов, практически идентично в моделях, построенных разными способами. Из этого следует, что результаты изучения лиганд-рецепторных взаимодействий, полученные для двух различных моделей одного и того же рецептора, вполне сопоставимы. С другой стороны, расположение гидрофильных петель в моделях, построенных с помощью подбора гомологичных петель глобулярных белков, находится в меньшем соответствии со структурой родопсина, чем в моделях, построенных с помощью моделирования по гомологии с полной структурой шаблонного белка. Кроме того, в моделях, построенных последним способом, присутствуют внеклеточный и внутриклеточный концевые участки, что также является их важным преимуществом.

Третья глава посвящена изучению лиганд-рецепторных взаимодействий антагонистов аденозиновых рецепторов с помощью молекулярного докинга.

Процедура докинга лигандов осуществлялась вручную и заключалась в следующем. Первоначально, геометрия каждого лиганда была оптимизирована в силовом поле Tripos с использованием атомных зарядов, рассчитанных по Гастайгеру - Хюккелю. Далее каждый лиганд был помещен в лиганд-связывающий центр рецептора таким образом, чтобы функциональные группы лиганда, предположительно участвующие в связывании, находились на расстоянии от соответствующих групп рецептора, оптимальном для образования водородных связей. После этого с помощью программы dock, входящей в комплекс Sybyl 6.9, проводился поиск наиболее благоприятного расположения лигандов в лиганд-связывающем центре с фиксированным положением атомов основных и боковых цепей рецептора до достижения наиболее энергетически выгодной конформации лиганда внутри рецептора. Далее ограничения на подвижность основных и боковых цепей лиганд-связывающего центра снимались, и проводилась повторная процедура молекулярного докинга с небольшим числом итераций минимизации энергии. Это позволяло учесть не только гибкость лиганда, но и подвижность боковых цепей рецептора. После этого осуществлялась окончательная оптимизация геометрии полученных лиганд-рецепторных комплексов. Использование такого подхода, во-первых, позволяет найти наиболее выгодную конформацию лигандов внутри сайта связывания, и, во-вторых, избежать значительных изменений в структуре рецептора, возникающих на первых шагах молекулярного докинга при подвижных боковых цепях.

В главе изложены результаты изучения лиганд рецепторных взаимодействий для 38 антагонистов аденозиновых рецепторов, включая 8-незамещенные 1,3-диалкилксантины, 1,3-диалкил-8-циклопентил- и 8-фенилксантиновые производные, антагонисты с сукцинимидными, малимидными и пара-замещенными фениламидными заместителями (рис. 2). Всего для данных лигандов было построено и изучено 152 лиганд-рецепторных комплекса. На основе полученных результатов был предложен общий механизм лиганд-рецепторных взаимодействий (рис. 3-6), найдены наиболее важные для связывания аминокислотные остатки рецепторов и фармакофорные группы лигандов, а также

выявлены важные особенности взаимодействий антагонистов с каждым подтипом рецепторов, что позволило объяснить причины различий в селективности и эффективности связывания антагонистов.

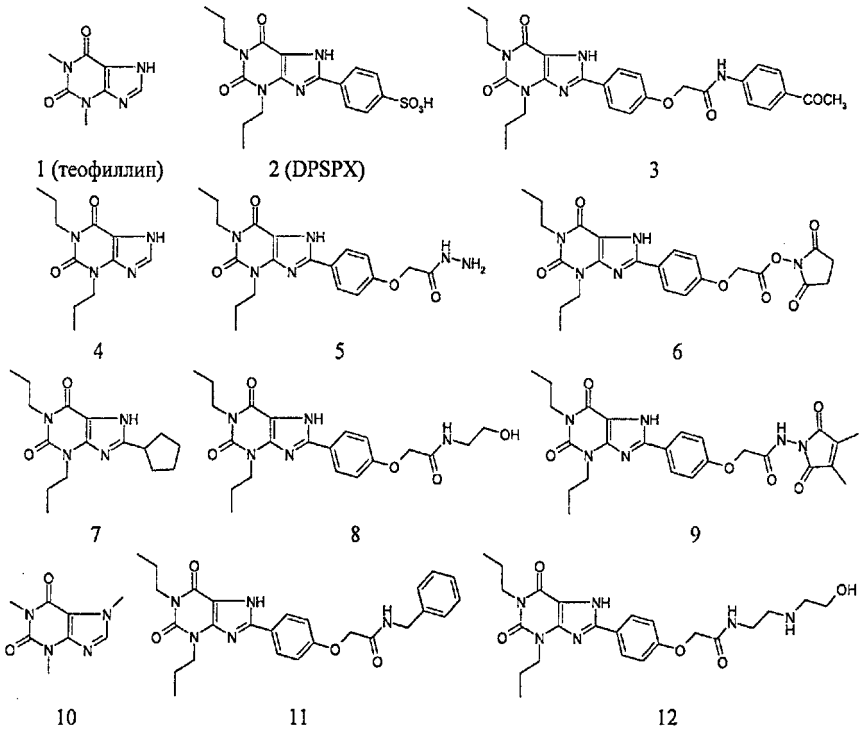


Рис. 2. Структуры некоторых антагонистов, использованных в работе.

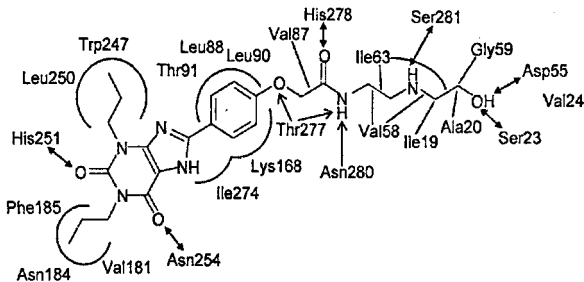


Рис. 3. Общая схема лиганд-рецепторных взаимодействий фенил-ксантиновых антагонистов аденозиновых рецепторов на примере комплекса A1 рецептора с лигандом 12. (\leftrightarrow водородные связи; \rightarrow возможные, но неочевидные, водородные связи; — гидрофобные взаимодействия).

В главе также представлены результаты компьютерного исследования механизмов связывания 8-пиразол-, 8-изоксазол- и 8-аминофенилзамещенных ксантиновых производных с A2B аденозиновым рецептором человека (рис. 7). Всего построено и изучено 53 лиганд-рецепторных комплекса для таких лигандов. Первоначально, была предпринята попытка расположить данные антагонисты в лиганд-связывающем центре A2B рецептора по аналогии с 1,3-диалкил-8-фенилксантиновыми производными, то есть таким образом, чтобы оба кислородных атома ксантинового фрагмента участвовали в образовании водородных связей с гистидиновым и аспарагиновым остатками. Однако полученные результаты позволяют предположить, что такой механизм связывания лигандов маловероятен. Было найдено, что металльная группа антагонистов, находящаяся в первом положении пиразольного цикла, должна располагаться между гидроксильными группами Thr89 и Ser279. Кроме того, His280, Val85, Ile61 и Glu14 создают стерические затруднения для фенильного кольца лигандов. Аналогичные результаты были получены и для 8-(3-пиразольных)-производных, замещенных в положении 5.

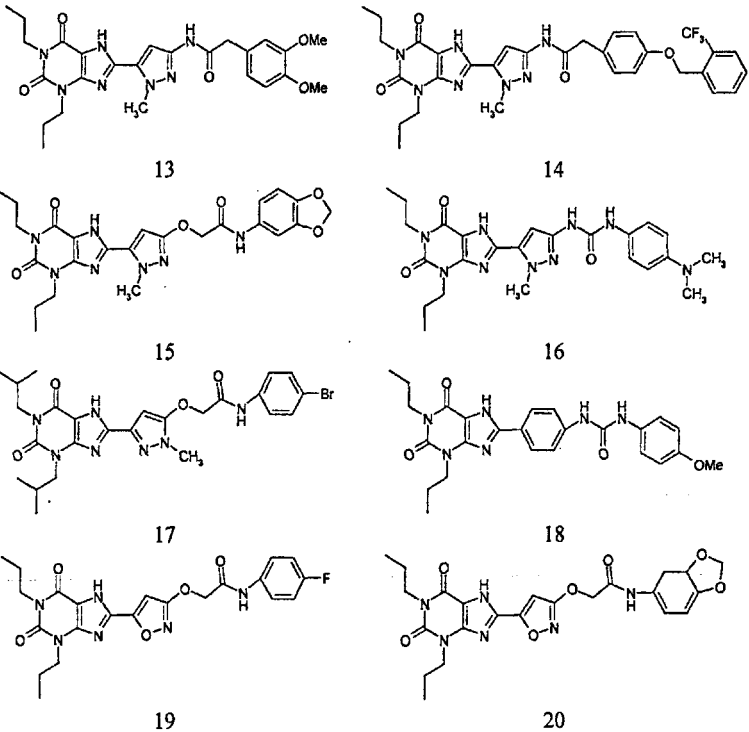


Рис. 7. Структуры некоторых антагонистов A2B рецептора, для которых предложен альтернативный механизм связывания.

Рассматриваемый механизм лиганд-рецепторных взаимодействий оказался невыгодным и для изоксазолильных производных. Несмотря на отсутствие в изоксазолильном цикле металлической группы, при взаимодействии данных структур с A2B аденозиновым рецептором сохраняются стерические препятствия, создаваемые, прежде всего, His280 и Glu14, расположенными слишком близко к фенильному циклу лигандов. Тем не менее, экспериментальные значения констант связывания рассматриваемых лигандов, показывают, что данные антагонисты обладают определенной, достаточно высокой аффинностью по отношению к A2B подтипу аденозиновых рецепторов. На основании полученных результатов было сделано предположение о возможности существования альтернативного механизма связывания данных антагонистов с A2B рецептором.

Для поиска такого механизма связывания был проведен анализ Внутренней конфигурации полученной молекулярной модели A2B рецептора и молекулярный докинг рассматриваемых антагонистов в различные части данного рецептора. Было найдено, что наиболее вероятное расположение ксантинового фрагмента лиганда такое, что атом кислорода в положении 6 находится на расстоянии 2.4А от гидроксильной группы Ser92 и 3А от аминогруппы Asn282, что обуславливает возможность образования водородной связи данного кислородного атома с обоими аминокислотными остатками. При этом алкильный заместитель в первом положении ксантинового цикла располагается внутри гидрофобной полости, образованной Leu49, Ala52, Asp53 и Asn286, а алкильная группа в третьем положении находится в окружении Ile93, Leu195 и Met198. Кроме того, фенильное кольцо Phe243 оказалось расположенным параллельно плоскости ксантинового фрагмента лигандов и находится от него в непосредственной близости. Это позволяет предположить, что с большой вероятностью между данным фенилаланиновым остатком и ксантиновой частью лигандов могут возникать выгодные π - π взаимодействия (рис. 8).

Анализ полученных результатов молекулярного докинга 1-метилпиразолозамещенных производных показал, что металлическая группа в положении 1 пиразольного цикла лиганда находится в окружении гидрофобных заместителей Leu195, His251 и Trp247. При этом индольный цикл Trp247 остатка ориентирован параллельно плоскости пиразольного цикла, что может приводить к дополнительным выгодным лиганд-рецепторным взаимодействиям. Кроме того, атом кислорода амидной группы лигандов образует водородную связь с His251, а NH-группа амидной части антагонистов участвует в образовании водородной связи с Thr89.

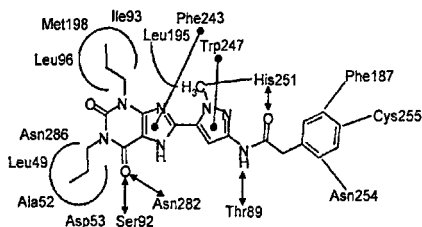


Рис. 8. Общий механизм лиганд-рецепторных взаимодействий пиразольных производных с A2B аденозиновым рецептором (•—• π - π взаимодействия)

Согласно механизмам связывания, полученным для изоксазолзамещенных производных, NH-группа имидазольного цикла His251 находится на расстоянии 4А от атомов кислорода и азота изоксазолильного фрагмента лигандов. Это позволяет предположить участие гистидинового остатка в образовании водородной связи с лигандами данного типа, возникающей за счет возможности вращения имидазольного цикла вокруг С-С связи. Также было найдено, что в моделях, полученных для данных антагонистов, расстояние между атомом кислорода в положении 6 ксантинового цикла и аминогруппой Asn282 составляет 2.4А, и участие Asn282 в образовании водородной связи представляется достаточно вероятным. Рассмотрение механизмов связывания 8-амидофенилзамещенных ксантиновых производных позволяет сделать вывод, что фенильная группа в восьмом положении ксантинового фрагмента участвует в я-я взаимодействиях с Thr247, находящимся достаточно близко от данного заместителя и расположенным параллельно плоскости фенильного цикла лигандов. Также в связывании лигандов принимает участие гидроксильная группа Thr89 и NH-группа имидазольного цикла His251, образующие водородные связи с амидной группировкой антагонистов. Бензильная группа лигандов или соответствующий ей анилиновый фрагмент располагаются между Phe187, Val91, Leu258 и метиленовой группой Asn254. На расстоянии 3А от атомов кислорода метоксигрупп лигандов (в частности, лиганда 13) оказалась расположена аминогруппа Asn186, которая с равной вероятностью может участвовать в образовании водородной связи как с группой в пара-положении, так и в мета-положении. Кроме того, метиленовая группа данного аспарагинового остатка находится около метильного заместителя метоксигруппы в мета-положении лиганда. В гидрофобных взаимодействиях с мета-метоксигруппой принимает участие Leu258, а метильный заместитель метоксигруппы, находящейся в пара-положении фенильного цикла, участвует в гидрофобных взаимодействиях с Val183, Cys255 и Phe187, образующих гидрофобный карман. На рис. 9 представлены молекулярные комплексы лигандов 13 и 14 с А2Б рецептором.

Было показано, что альтернативный механизм связывания может реализоваться и для 8-незамещенных 1,3-диалкилксантинов, а также 8-фенилксантинов с небольшими функциональными группами в пара-положении фенильного цикла. Все результаты молекулярного докинга антагонистов аденозиновых рецепторов находятся в хорошем соответствии с имеющимися экспериментальными данными по сайт-направленному мутагенезу аденозиновых рецепторов.

В четвертой главе для дальнейшего изучения лиганд-рецепторных взаимодействий антагонистов с А2Б аденозиновым рецептором и дополнительной проверки гипотезы о существовании альтернативного механизма связывания лигандов были осуществлены молекулярно-динамические расчеты комплексов А2Б рецептора с теофилином, 1,3-дипропил-8-сульфопенилксантином (DPSPX) и лигандом 15.

Наиболее оптимальным для проведения молекулярно-динамических расчетов трансмембранных рецепторов представляется использование фосфолипидного бислоя, который является естественной природной средой таких

рецепторов. В данной работе была использована модель фосфолипидного бислоя 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (рис. 10), содержащая 200 фосфолипидных молекул, сольватированных молекулами воды, что представляется достаточным для помещения внутрь бислоя структуры A2B аденозинового рецептора. Для проведения молекулярно-динамических расчетов A2B рецептора, была осуществлена вставка трех лиганд-рецепторных комплексов рецептора с указанными выше лигандами внутрь фосфолипидного бислоя. Данная процедура осуществлялась вручную с помощью программного комплекса Sybyl 6.9 и заключалась в следующем. Первоначально, молекулярная модель A2B рецептора с лигандом помещалась внутрь фосфолипидного бислоя, содержащего исходное количество молекул фосфолипидов и воды. При этом пространственная ориентация рецептора внутри бислоя была такой, что, во-первых, трансмембранный домен рецептора был окружен примерно одинаковым количеством фосфолипидов с каждой стороны. Во-вторых, трансмембранные α -спирали рецептора были ориентированы максимально параллельно углеводородным цепям фосфолипидных молекул (то есть, перпендикулярно плоскости водного слоя). Кроме того, внеклеточные и внутриклеточные гидрофильные петли рецептора находились в окружении молекул воды внеклеточного и внутриклеточного водных слоев. После этого все фосфолипидные молекулы и молекулы воды, перекрывающиеся со структурой рецептора и находящиеся от нее на расстоянии 2.3Å, были удалены, что позволило получить необходимое пространство для структуры рецептора внутри фосфолипидного бислоя.

Таким образом были построены три молекулярных комплекса A2B аденозинового рецептора с теофиллином, DPSPX и лигандом 15 в окружении фосфолипидного бислоя. В среднем, каждый комплекс содержит 130 фосфолипидных молекул и 4220 молекул воды, что с учетом атомов рецептора и лиганда составляет около 22350 атомов (рис. 10). Далее для снятия возможных неблагоприятных взаимодействий между боковыми цепями рецептора и молекулами фосфолипидного бислоя была осуществлена оптимизация геометрии полученных молекулярных комплексов. Оптимизация геометрии проводилась методом "скорейшего спуска" с помощью программного комплекса GROMACS 3.14. После этого, также с помощью программы GROMACS, для каждого лиганд-рецепторного комплекса были осуществлены молекулярно-динамические расчеты. Для молекул фосфолипидов, воды, лиганда и рецептора была использована температура 300K с константой сопряжения $\tau_t = 0.1$ пс и постоянное давление 1 атм с константой сопряжения $\tau_p = 1$ пс. Молекулярно-динамические расчеты проводились в течение 1 нс с временным шагом 0.002 нс в силовом поле GROMACS, являющимся модифицированной версией силового поля GROMOS, с периодическими граничными условиями по каждой из трех координат. Как известно, для изучения глобальных изменений в структуре рецептора в течение молекулярной динамики требуются достаточно большие времена (10-20 нс). Однако в данной работе основной целью проведения молекулярно-динамических расчетов являлось уточнение пространственного расположения лигандов внутри лиганд-связывающего центра рецептора, поэтому выбор времени молекулярной динамики $t = 1$ нс представляется оправданным.

И

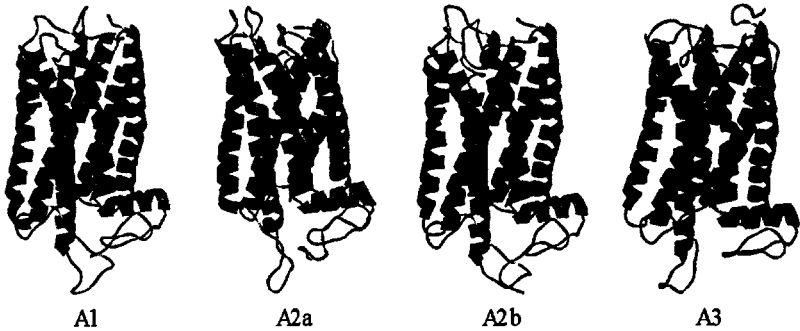


Рис. 1. Молекулярные модели аденозиновых рецепторов, построенные по гомологии с полной структурой родокеина.

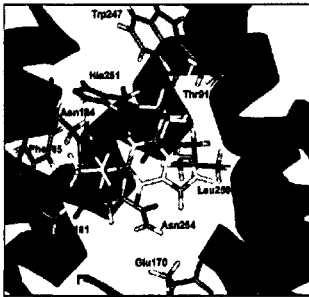


Рис. 4. Пространственное расположение дипропилксантина внутри лиганд-связывающего центра A1 рецептора

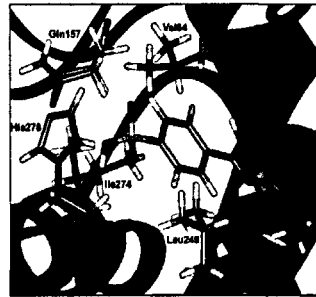
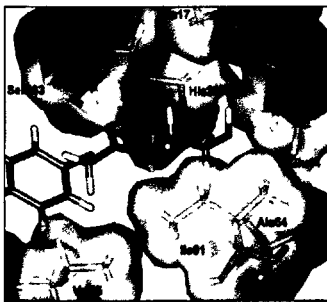


Рис. 5. Механизм связывания сульфогруппы DPSPX с A2a рецептором



A2b



A2a

Рис. 6. Расположение гидроксиметиламидного фрагмента 8-фенилксантиновых производных в лиганд-связывающих центрах A2b и A2a рецепторов.

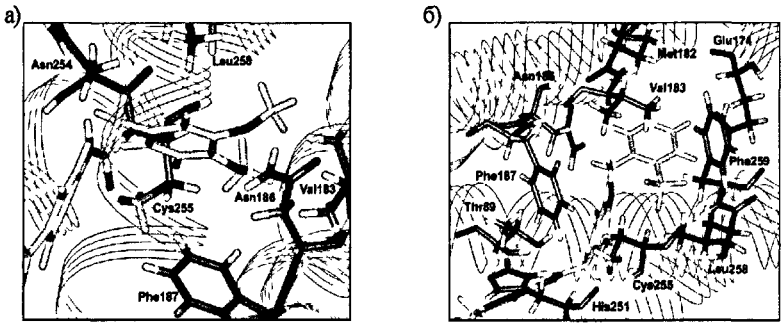


Рис. 9. Расположение 3,4-диметоксифенильного заместителя 13 (а) и трифторфенильного заместителя 14 (б) внутри лиганд-связывающего центра A2b рецептора. Желтым цветом выделены углеродные атомы лиганда.

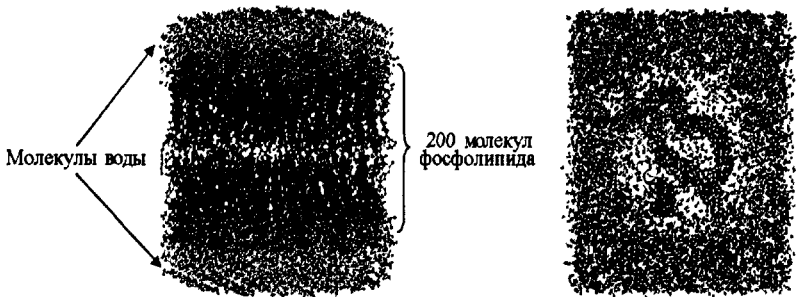


Рис. 10. Модель фосфолипидного бислоя, использованная для молекулярно-динамических расчетов A2b аденозинового рецептора, и пространственная структура A2b рецептора внутри фосфолипидного бислоя (вид "сверху").

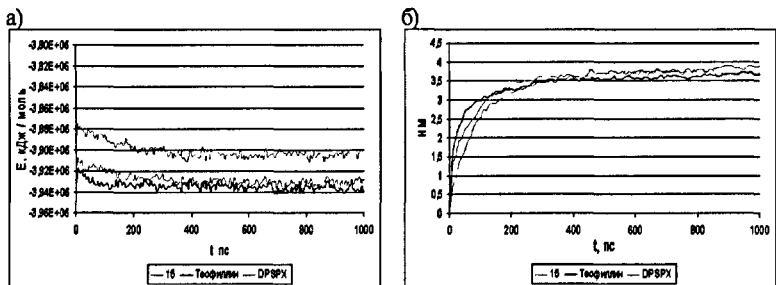
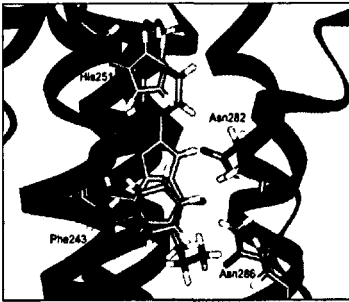
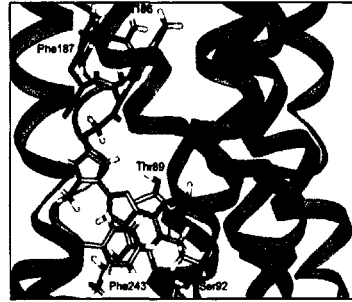


Рис. 11. а) Зависимость полной энергии молекулярных комплексов от времени, б) зависимость среднеквадратичного отклонения атомных координат молекулярных комплексов от времени



A2b-DPSPX



A2b-15

Рис. 12. Пространственное расположение DPSPX и 15 в лиганд-связывающем центре A2b аденозинового рецептора, полученное после молекулярно-динамических расчетов.

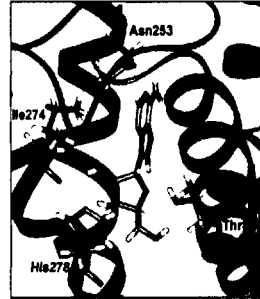
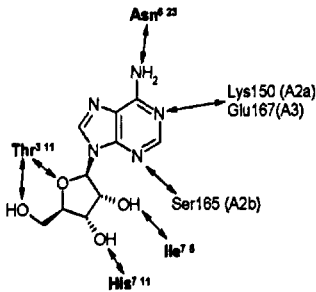


Рис. 14. Общий механизм связывания аденозина и его расположение в лиганд-связывающем центре A2a рецептора.



Рис. 15. Расположение этильного заместителя NECA внутри сайта связывания A3 рецептора.

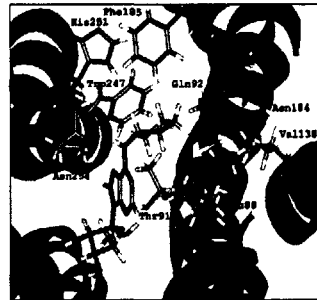


Рис. 16. Расположение циклогексильного заместителя CPA внутри лиганд-связывающего центра A1 аденозинового рецептора.

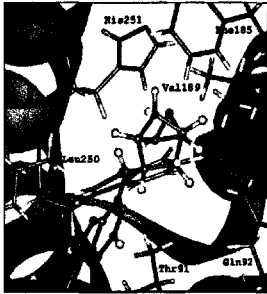


Рис. 17. Расположение эпоксиноборнорильной группы в лиганд-связывающ ем центре А1 аденозинового рецептора.

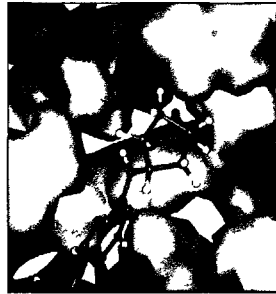
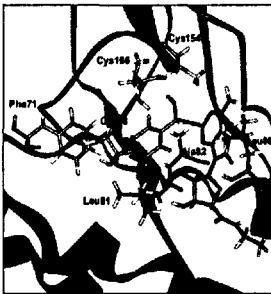
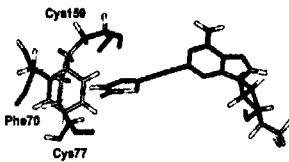
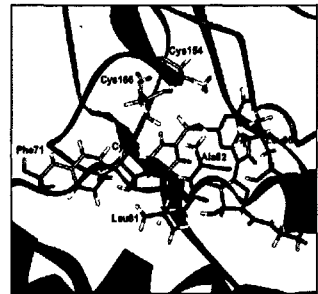


Рис. 18. Расположение тиазольного фрагмента лиганда 29 в А2а рецепторе.



(S)-RHPNECA



(R)-RHPNECA

Рис. 19. Механизмы связывания (S)- и (R)-RHPNECA с А2b рецептором

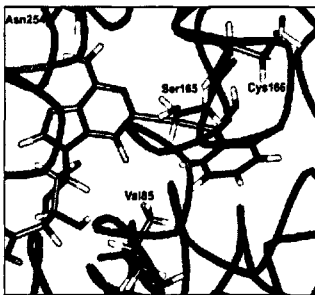


Рис. 20. Механизм связывания потенциальных агонистов с заменой атома азота в положении 3 аденинового цикла

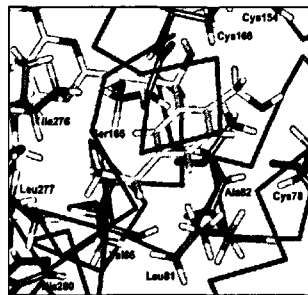


Рис. 22. Механизм связывания предложенных аналогов (S)-RHPNECA с А2b рецептором

Для оценки стабильности систем, полученных после проведения молекулярно-динамических расчетов, для каждой системы был осуществлен расчет общей энергии. Расчет энергии проводился по всей молекулярно-динамической траектории. Результаты показали, что каждая система перешла в стабильное состояние примерно после 400 пс молекулярной динамики. Также была осуществлена оценка изменений в общей структуре исследуемых систем, произошедших за 1 нс молекулярно-динамических расчетов (рис. 11). Для этого было рассчитано среднеквадратичное отклонение (RMSD) атомных координат систем относительно их исходных значений. Было найдено, что в каждом случае значения RMSD составляют около 4 нм. Анализ зависимостей RMSD от времени (рис. И) показал, что каждая система перешла в стабильное состояние после 400 пс, что находится в хорошем соответствии с результатами анализа полной энергии систем и указывает на возможность дальнейшего использования комплексов, полученных после 1 нс молекулярно-динамических расчетов.

Для определения аминокислотных остатков A2B рецептора, в пространственном расположении которых произошли наибольшие изменения, для каждого комплекса были рассчитаны среднеквадратичные флуктуации (RMSF) α -углеродных атомов рецептора. Было найдено, что наибольшие значения RMSF соответствуют аминокислотным остаткам, расположенным в гидрофильных петлях рецептора, тогда как значения RMSF, соответствующие трансмембранным α -спиралям, находятся в пределах 0.15 нм. Наибольшие значения RMSF были получены для остатков, находящихся во второй внеклеточной петле, имеющей наибольшую длину. В частности, максимальное значение RMSF = 0.4 нм соответствует Thr155 комплекса A2B рецептора с лигандом 15.

Проведенный анализ полученного после молекулярно-динамического расчета комплекса A2B рецептора с теофилином показал, что лиганд образует водородные связи Asn286 и Trp247. Кроме того, расстояние между гидроксильной группой Ser92 и карбонильным атомом кислорода лиганда составляет 2.96Å, что обуславливает возможность участия данного серинового остатка в образовании водородной связи. Также, согласно полученным результатам, фенильное кольцо Phe243 принимает участие в π - π взаимодействиях с теофилином.

Анализ найденного после молекулярной динамики механизма связывания DPSPX с A2B рецептором показал, что существенных изменений в лиганд-рецепторных взаимодействиях данного лиганда по сравнению с результатами, полученными с помощью молекулярного докинга, не произошло (рис. 12). Было показано, что His251 участвует в образовании водородной связи с сульфогруппой лиганда, а Asn282 образует водородную связь с карбонильным атомом кислорода в положении 2 ксантинового фрагмента. Кроме того, данный кислородный атом лиганда может участвовать в образовании водородной связи с Asn286. Фенильное кольцо Phe243 также располагается достаточно близко от лиганда и с большой вероятностью может быть вовлечено в π - π взаимодействия. Пропильные заместители в первом и третьем положении ксантинового цикла DPSPX оказались расположенными в окружении Leu49, Ala52, Asp53, Ile93, Leu195, Met198 и Asn286, а согласно результатам молекулярного докинга именно эти аминокислотные остатки участвуют в гидрофобных взаимодействиях с пропильными группами лиганда.

Результаты молекулярно-динамических расчетов, полученные для комплекса A2B рецептора с лигандом 15 (рис. 12) показали, что карбонильный атом кислорода во втором положении ксантинового цикла находится достаточно близко от гидроксильной группы Ser92 и образует с ней водородную связь. Аналогичный результат был получен и с помощью молекулярного докинга. Гидроксильная группа Thr89 с большой вероятностью вовлечена в образование водородной связи с протонированным атомом азота ксантинового фрагмента. Кроме того, анализ полученной модели показывает, что карбонильная группа Asn186 взаимодействует с NH-группой амидной части лиганда, а аминокислота данного аспарагинового остатка образует водородную связь с атомом кислорода бензодиазольного фрагмента. Также около данного фрагмента лиганда оказались расположены Lys170 и Phe187. Атом кислорода метоксигруппы в положении 3 пиразольного фрагмента лиганда 15 находится достаточно близко от His251 и может принимать участие в образовании водородной связи с NH-группой имидазольного цикла данного аминокислотного остатка.

Таким образом, проведенный анализ результатов молекулярно-динамических расчетов комплексов A2B аденозинового рецептора с тремя структурно различными антагонистами внутри фосфолипидного бислоя подтвердил возможность существования альтернативного механизма связывания лигандов. При этом было показано, что Ser92, Asn282, His251, Phe243 и Trp247, расположенные в трансмембранной части рецептора, имеют наибольшее значение при связывании лигандов. Кроме того, при реализации данного механизма связывания большое значение имеют аминокислотные остатки, находящиеся во второй, пятой, шестой и седьмой трансмембранных α -спиралях, участвующие в выгодных гидрофобных взаимодействиях с 1,3-алкильными заместителями ксантинового фрагмента.

Пятая глава посвящена изучению лиганд-рецепторных взаимодействий структурно различных агонистов аденозиновых рецепторов (рис. 13). Всего в работе проведен анализ 188 молекулярных лиганд-рецепторных комплексов, полученных для 47 агонистов.

Первоначально для изучения механизмов связывания агонистов, общих для всех исследуемых подтипов аденозиновых рецепторов, и определения наиболее важных для связывания лигандов аминокислотных остатков рецепторов, был осуществлен молекулярный докинг неселективного природного агониста - аденозина. Полученные результаты показали, что механизмы взаимодействия аденозина с каждым из четырех аденозиновых рецепторов практически идентичны. Было найдено, что аминокислота лиганда образует водородную связь с Asn^{6,23}. 3'-Гидроксильная группа аденозина взаимодействует с протонированным атомом азота His^{7,11}, а 2'-гидроксильная группа - с He^{7,6}. Атом кислорода рибозной части лиганда располагается на расстоянии, оптимальном для образования водородной связи с гидроксильной группой Thr^{3,11}, которая также может взаимодействовать с 5'-гидроксильной группой аденозина (рис. 14). Выявленные лиганд-рецепторные взаимодействия находятся в хорошем соответствии как с известными экспериментальными данными по сайт-

направленному мутагенезу, так и с данными работ, посвященных молекулярному моделированию аденозиновых рецепторов.

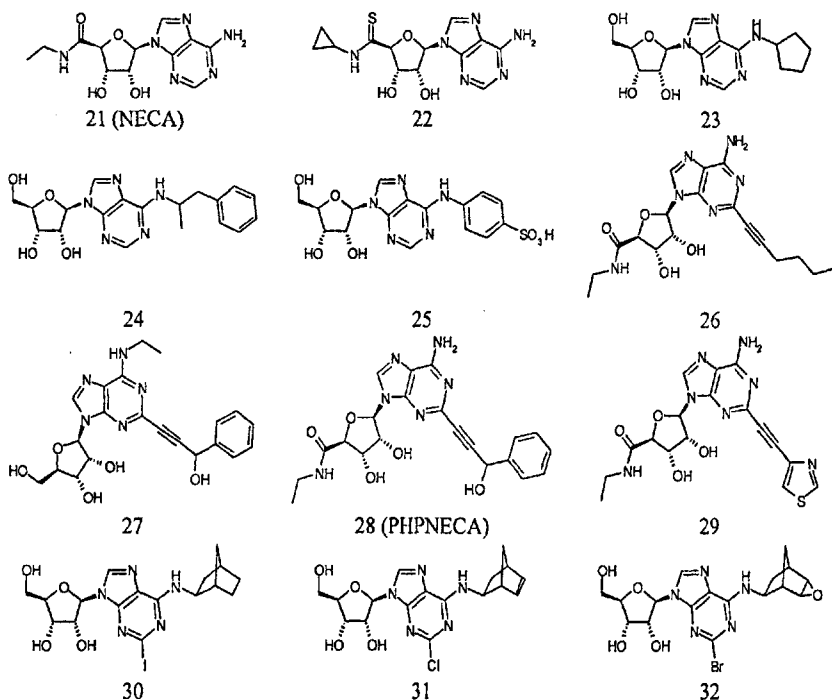


Рис. 13. Структуры некоторых агонистов, исследованных в работе.

Проведенное исследование лиганд-рецепторных взаимодействий 5'-N-алкилкарбоксамидоаденозинов и 5'-N-алкилтиокарбоксамидоаденозинов (рис. 15) показало, что при связывании данных лигандов все взаимодействия, характерные для аденозина, сохраняются. Кроме того, гидроксильная группа Thr³¹¹ образует водородную связь с NH-группой амидной части лигандов, а атом кислорода данной амидной группы взаимодействует либо с Thr277 в случае A1 рецептора, либо с соответствующим сериновым остатком A2a, A2b и A3 рецепторов. При этом для тиопроизводных взаимодействие с Thr(Ser)⁷¹⁰ не наблюдается, что, видимо, является причиной некоторого уменьшения аффинности данных агонистов. Алкильный заместитель лигандов оказался расположенным в полости, образованной Ser³¹⁴, Asn⁷¹³ и Trp⁶¹⁶, присутствующими в каждом подтипе рецепторов. В случае A2b рецептора в образовании данной полости также принимает участие Cys246, присутствующий только в A2 рецепторах. Кроме того, в моделях, полученных для A1, A2b и A3 рецепторов, в непосредственной близости от данного заместителя находится Phe⁶¹², тогда как для A2a рецептора указанный фенилаланиновый остаток оказался расположен несколько дальше от лиганда. Также для A1 и A2 подтипов во взаимодействиях с алкильной группой лиганда принимает участие Leu³¹⁰, а для A3

рецептора на месте данного лейцина находится фенилаланин. Эта особенность A3 рецептора позволяет объяснить наибольшую аффинность 5'-N-метилкарбоксамидоаденозина (МЕСА) к данному подтипу по сравнению с A1 и A2 рецепторами. В случае A3 рецептора переход от этильного заместителя (НЕСА) к метальному (МЕСА) приводит к уменьшению неблагоприятных взаимодействий между ароматическим кольцом Phe93 и алкильной группой ($K_{(НЕСА)} = 10.6$ нМ, $K_{(МЕСА)} = 6.4$ нМ). Для остальных рецепторов, напротив, уменьшаются выгодные гидрофобные взаимодействия (для A2b $K_{(НЕСА)} = 2.4$ нМ, $K_{(МЕСА)} = 45.0$ нМ). Найденные пространственные ориентации лигандов внутри лиганд-связывающих центров рецепторов также показали, что в случае A2a и A2b подтипов объем полости, в которой находится алкильный заместитель лиганда, оказывается несколько меньше, чем в A1 и A3 рецепторах, что является возможной причиной падения аффинности циклобутилзамещенного производного по отношению к A2 рецепторам.

На следующем этапе работы был осуществлен молекулярный докинг и анализ механизмов связывания N⁶-алкил-, N⁶-циклоалкил- и N⁶-фенилзамещенных производных аденозина и НЕСА. Полученные результаты докинга N⁶-алкил- и N⁶-циклоалкилзамещенных производных показали, что заместитель в \wedge -положении лиганда расположен внутри полости, образованной Thr^{3,11}, Phe^{5,7}, Trp^{6,16} и Asn^{6,23}, присутствующими в каждом из четырех подтипов рецепторов (рис. 16). Найденные механизмы взаимодействий аденозиновых рецепторов с агонистами, содержащими N⁶-фенильный заместитель, показали, что фенильное кольцо лигандов окружено теми же аминокислотными остатками, что и алкильные группы N⁶-алкильных производных. Однако механизмы лиганд-рецепторных взаимодействий лигандов, содержащих функциональные группы, способные к образованию водородных связей, оказались различными для разных подтипов рецепторов. Полученные результаты позволили выявить причины различий в селективности и эффективности связывания ряда N⁶-замещенных агонистов аденозиновых рецепторов с каждым из четырех подтипов. В частности, полученные результаты позволяют объяснить более чем четырехсоткратное различие в константах связывания R-PIA - одного из селективных лигандов A1 рецептора - с A1 и A2a рецепторами.

Изучение механизмов лиганд-рецепторных взаимодействий N⁶-норборнен-, N⁶-норборнил- и N⁶-эпоксинорборнилзамещенных производных аденозина, предложенных в качестве эффективных агонистов A1 рецептора, (рис. 17) показало, что каркасный заместитель лигандов расположен между Thr91, Gln92, Phe185, Val189, Trp247, Leu250 и His251 A1 рецептора. При этом конфигурация полости, образованной этими аминокислотными остатками, такова, что никаких неблагоприятных контактов между рецептором и каркасной группой лигандов не наблюдается. Кроме того, атом кислорода эпоксинорборнильной группы располагается около His251 и образует с ним водородную связь.

В отличие от этого модели, полученные для A2a рецептора, позволяют сделать вывод, что пространственное расположение каркасного фрагмента в данном рецепторе значительно отличается от установленного для A1. Если в случае A1 рецептора, двойная связь норборненового фрагмента ориентирована в сторону Leu250 и His251, то для A2a рецептора такое расположение невозможно

из-за стерических затруднений. То есть в этом случае, двойная связь лиганда перекрывалась бы с указанными аминокислотными остатками. Поэтому каркасные группы лигандов в A2a рецепторе оказываются ориентированы в противоположную сторону, а именно в сторону Glu63 и Asn181. При этом, согласно полученным моделям, около атома кислорода эпоксинорборнильной группы находится аминогруппа Asn181, но расстояние между ними составляет 3.7Å и образование водородной связи между лигандом и Asn181 неочевидно. Эти результаты хорошо согласуются с экспериментальными данными и позволяют понять причины проявления большей аффинности лигандов по отношению к A1 рецептору, чем к A2a.

Проведенный анализ механизмов связывания 2-замещенных аналогов аденозина и NECA с каждым из четырех подтипов аденозиновых рецепторов показал, что заместитель в положении 2 лигандов расположен в полости, образованной рядом аминокислотных остатков рецепторов, находящихся не только в трансмембранных спиральных, но также и в первой и второй внеклеточных гидрофильных петлях. Согласно моделям, полученным для каждого подтипа рецепторов, в непосредственной близости от алкинильного заместителя лигандов оказались расположены оба цистеиновых остатка, образующих дисульфидную связь в рецепторах. При этом цистеин, находящийся во второй внеклеточной петле, может участвовать в образовании водородной связи с гидроксильной группой гидроксипропинильных производных. Анализ результатов, полученных для тиазолильного производного 29, показал, что водородных связей между рецепторами и тиазолильной группой лиганда не образуется. Наиболее выгодное расположение данной группы лиганда внутри лиганд-связывающего центра было установлено для A2b и A3 подтипов. В случае A1 рецептора около двойной связи тиазолильной группы находится Asn148, что приводит к определенным неблагоприятным взаимодействиям. Согласно модели, полученной для A2a рецептора, расположение тиазолильной группы внутри лиганд-связывающего центра данного рецептора оказывается наименее выгодным, по сравнению с другими подтипами рецепторов (рис. 18). Эти результаты находятся в хорошем соответствии с экспериментальными данными.

При изучении лиганд-рецепторных взаимодействий агонистов, содержащих гидроксипропинильный заместитель, было уделено особое внимание различиям в механизмах связывания оптических изомеров данных лигандов. Результаты молекулярного докинга RHPNECA в A1 рецептор показали, что дополнительных водородных связей между рецептором и гидроксильной группой фенилгидроксипропинильного заместителя не образуется ни с (R)-, ни с (S)-изомером лиганда. Однако и неблагоприятных лиганд-рецепторных взаимодействий также не наблюдается. Данный механизм связывания RHPNECA с A1 рецептором позволяет объяснить практически идентичную активность двух изомеров. Механизмы связывания RHPNECA, полученные для A2 и A3 рецепторов, показали, что гидроксильная группа (S)-фенилгидроксипропинильного заместителя образует водородную связь с цистеиновым остатком, находящимся во второй внеклеточной петле рецепторов и образующим дисульфидную связь. В отличие от этого, при взаимодействии (R)-RHPNECA с A2a, A2b и A3 рецепторами данная гидроксильная¹ группа

оказывается окруженной гидрофобными аминокислотными остатками (рис. 19), что приводит к нежелательным лиганд-рецепторным взаимодействиям и ухудшению константы связывания. Полученные результаты докинга (R)- и (S)-изомеров 2-(4-гидрокси-1-пентинил)-замещенных производных позволяют сделать вывод, что для данных лигандов более активными являются (S)-изомеры (экспериментально определены константы связывания только для смеси изомеров).

Шестая глава посвящена компьютерному дизайну новых потенциальных агонистов аденозиновых рецепторов с модифицированным адениновым фрагментом. К предлагаемым в работе лигандам предъявлялся ряд необходимых требований. А именно, механизм связывания потенциального лиганда должен соответствовать общему механизму связывания известных агонистов, прежде всего, лиганд должен образовывать необходимые водородные связи с рецептором. Во-вторых, модифицируемый адениновый фрагмент должен сохранять плоскую структуру, что необходимо для нахождения аминогруппы и рибозной части агонистов в строго определенном положении. На сегодняшний день высокоэффективных и селективных агонистов A2b подтипа не найдено и поиск таких лигандов является актуальнейшей проблемой химии аденозиновых рецепторов. По этой причине в качестве "структуры-лидера" был выбран (S)-RHPNECA, являющийся одним из наиболее эффективных и селективных агонистов A2b рецептора, а в качестве "начального лиганд-рецепторного комплекса" был использован молекулярный комплекс A2b - (S)-RHPNECA. Такой выбор является оправданным с точки зрения установленного общего механизма лиганд-рецепторных взаимодействий известных агонистов аденозиновых рецепторов с каждым из четырех подтипов, поскольку в каждом подтипе аденозиновый фрагмент лигандов располагается в лиганд-связывающем центре практически идентично. Также очевидно, что при замене 5'-N-этилкарбоксамидного заместителя на гидроксиметильную группу или другой известный заместитель в данном положении, а также при отсутствии 2-фенилгидроксипропилильного заместителя агонистическое действие лиганда сохранится. С другой стороны, наличие указанных заместителей увеличивает вероятность получения наиболее эффективного агониста A2b рецептора.

Первоначально был проведен анализ возможных модификаций аденинового цикла агонистов и выявлена возможность замены атома азота в положении 3 на СН-группу. Такая замена с одной стороны позволяет сохранить ароматичность модифицируемого фрагмента, а с другой стороны может привести к увеличению селективности связывания агонистов с A1, A2a и A3 рецепторами по сравнению с A2b подтипом. Было показано, что в данном положении аденинового цикла может находиться как незамещенная СН-группа, так и замещенная на атом галогена (рис. 20). Также был проведен анализ механизмов связывания лигандов, содержащих дополнительное бензольное кольцо, сопряженное с атомами в седьмом и восьмом положениях аденинового цикла (рис. 21). При этом атом азота в положении 7 был заменен на углеродный атом. Таким образом были найдены новые лиганды с потенциальной агонистической активностью, содержащие вместо пуринового цикла трициклический у-карболиновый фрагмент. Согласно полученным

молекулярным комплексам данных соединений с аденозиновыми рецепторами, карболиновый цикл является оптимальным для расположения внутри гидрофобного кармана и не вызывает неблагоприятных взаимодействий с гидрофильными группами аминокислотных остатков.

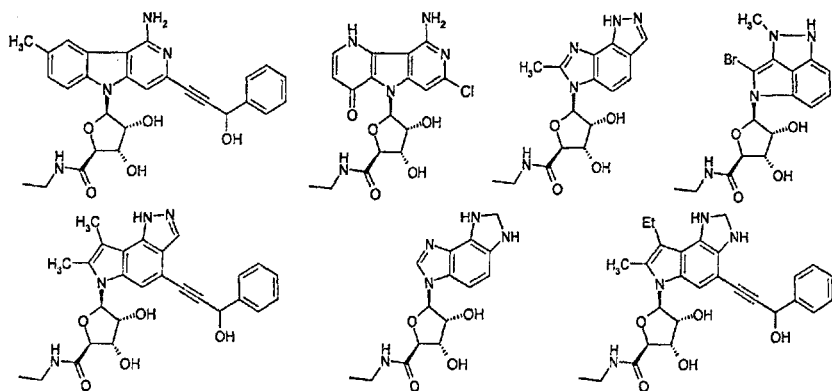


Рис. 21. Примеры структур предложенных потенциальных агонистов аденозиновых рецепторов.

Наличие небольших гидрофильных групп в восьмом положении карболинового фрагмента также представляется выгодным. Было показано, что гидроксильная группа или аминогруппа в положении 8 могут участвовать в образовании водородных связей с сериновым и треониновым аминокислотными остатками рецепторов. Также введение карбонильной группы в восьмое положение является перспективной модификацией лиганда, и карбонильный атом кислорода оказывается расположенным около гидрофильных групп рецептора. При этом для сохранения плоской структуры карболинового фрагмента СН-группа в положении 5 должна быть заменена на NH-группу (рис. 21).

Поиск потенциальных агонистов с сопряженным гетероциклическим фрагментом при 1-6 и 6-5 положениях пуринового цикла показал, что одной из перспективных модификаций известных агонистов может являться введение пиразольного фрагмента в пуриновый цикл. При этом атом азота в первом положении пуринового цикла был заменен на углеродный атом; полученная таким образом связь С6=C1 находится в сопряжении со связью С4=C5 пиразольного фрагмента. Несколько менее выгодным, но потенциально возможным, представляется введение неароматического пятичленного цикла, содержащего NH-группы в первом и третьем положениях. Также для данных лигандов была проанализирована возможность замены атома азота, соответствующего атому азота в положении 7 пуринового фрагмента, на СН-группу, и введение в данное положение небольших алкильных групп и атомов галогенов (рис. 21). Полученные результаты показали, что такие модификации возможны, хотя и не приводят к заметному улучшению связывания лигандов.

Анализ конфигурации лиганд-связывающих центров аденозиновых рецепторов также позволяет предположить, что потенциальной агонистической

активностью могут обладать структуры, содержащие дополнительный циклический фрагмент, образованный атомами углерода в пятом и шестом положениях пуринового цикла, углеродным атомом, находящимся на месте N7, атомом азота аминогруппы агонистов и дополнительной аминогруппой в седьмом положении. При этом атомы водорода обеих аминогрупп данного циклического фрагмента оказываются расположенными вблизи карбонильной группы Asp⁶²³ и могут участвовать в образовании водородных связей. Однако более выгодным представляется замещение атома водорода введенной аминогруппы на метильную группу, что приводит к возникновению дополнительных гидрофобных взаимодействий с Trp⁶¹⁶ и Leu / Val⁶¹⁹.

С целью получения потенциальных агонистов, селективных по отношению к A2B рецептору, были проанализированы возможности модификаций фенильного цикла (S)-RHPNECA. Было найдено что введение заместителей любой природы в положения 3, 4 и 6 является нежелательным. Напротив, введение в положение 2 фенильного цикла гидроксиметильной группы или метиламинного заместителя является эффективной модификацией, приводящей к увеличению гидрофобных взаимодействий, а также, что более существенно, к образованию дополнительной водородной связи с карбонильной группой Cys78 A2b рецептора. Молекулярный докинг таким образом модифицированных структур в A1, A2a и A3 рецепторы показал, что проведенные модификации не являются выгодными ни для одного из этих подтипов рецепторов, а наоборот заметно затрудняют связывание лиганда из-за недостаточного свободного пространства внутри лиганд-связывающего центра. Введение заместителей в положение 5 также представляется достаточно перспективным направлением для поиска агонистов A2B подтипа рецепторов. Анализ конфигурации аминокислотного окружения фенильного цикла лиганда в модели A2B рецептора показал, что около пятого положения данного цикла расположен достаточно объемный гидрофобный карман, образованный Leu81, Val85, Ser165, Ile276, Leu277 и His280. С помощью молекулярного докинга было найдено, что свободное пространство внутри гидрофобного кармана позволяет ввести в положение 5 фенильного цикла лиганда метильную, этильную, пропильную, изопропильную и циклопентильную группы (рис. 22).

Таким образом, в результате проведенных расчетов был предложен ряд новых потенциальных агонистов аденозиновых рецепторов, не содержащих адениновый фрагмент, присутствующий во всех известных на сегодняшний день агонистах. Кроме того, проведенный анализ механизма связывания и ближайшего аминокислотного окружения (S)-RHPNECA позволил предложить пути поиска новых агонистов, селективных по отношению к A2B аденозиновому рецептору.

Для количественной оценки активностей предложенных потенциальных агонистов для каждого полученного лиганд-рецепторного комплекса были рассчитаны значения оценочных функций CSCORE комплекса Sybyl 6.9 и проведено их сопоставление со значениями, полученными для известных агонистов A2B аденозинового рецептора. С использованием данных оценочных функций была построена множественная линейно-регрессионная модель для значений pKi известных агонистов A2B рецептора. Полученная зависимость описывается уравнением: $pKi = -1,12635 - 0,02210 * G_Score - 0,04973 * PMF_Score + 0,00414 * D_Score + 0,02853 * ChemScore$ (R = 0.6345, s = 0.4355).

Данная регрессионная модель представляется полезной с точки зрения оценки порядка значений K_j , что в свою очередь позволяет уменьшить число заведомо неактивных соединений. Значения оценочных функций, рассчитанные для потенциальных агонистов, хорошо согласуются со значениями, полученными для известных лигандов, а значения K_i предложенных структур, рассчитанные с помощью регрессионной модели, лежат в диапазоне от 0.21 до 23.59 нМ, что вместе с установленными механизмами лиганд-рецепторных взаимодействий позволяет ожидать проявление определенной активности сконструированных агонистов аденозиновых рецепторов.

Выводы.

1. С помощью метода моделирования по гомологии впервые построены полные пространственные модели каждого из четырех известных на сегодняшний день подтипов аденозиновых рецепторов человека, содержащие как трансмембранные α -спирали, так и все внеклеточные и внутриклеточные гидрофильные петли, а также концевые участки рецепторов.
2. С использованием компьютерного молекулярного докинга исследованы лиганд-рецепторные взаимодействия для серии известных антагонистов аденозиновых рецепторов, определены аминокислотные остатки рецепторов, участвующие в связывании антагонистов и выявлены особенности взаимодействий антагонистов с каждым из четырех подтипов рецепторов.
3. Для некоторых антагонистов аденозиновых рецепторов установлена возможность существования альтернативного механизма связывания, что подтверждено результатами молекулярно-динамических расчетов лиганд-рецепторных комплексов A2b рецептора в фосфолипидном бислое.
4. С помощью молекулярного докинга серии структурно различных производных аденозина детально изучены механизмы и особенности связывания агонистов с каждым подтипом аденозиновых рецепторов, найдены причины различий в селективности и эффективности связывания различных агонистов, в том числе оптических изомеров.
5. На основе результатов молекулярного моделирования аденозиновых рецепторов и докинга известных агонистов предложены пути поиска новых потенциальных агонистов аденозиновых рецепторов, не являющихся аналогами аденозина. Сконструирован ряд структур потенциальных селективных агонистов A2b аденозинового рецептора.

Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Иванов А.А., Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. Молекулярное моделирование A1 аденозинового рецептора человека и изучение механизмов связывания его селективных лигандов. // ДАН. 2002. Т. 386. № 4. С. 548-551.
2. Ivanov A.A., Baskin I.I., Palyulin V.A., Baraldi P.G., Zefirov N.S. Molecular modelling of the human A2b adenosine receptor and an analysis of the binding modes of its selective ligands. // Mendeleev Commun. 2002. V. 6. P. 211-212.
3. Иванов А.А., Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефирова Н.С. Молекулярное моделирование аденозиновых рецепторов. // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. Т. 43. № 4. С. 231-236.

4. Иванов А.А., Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефилов Н.С. Построение молекулярной модели A2a-аденозинового рецептора человека. // ДАН. 2003. Т. 389. № 3. С. 404-407.
5. Ivanov A.A., Baskin I.I., Palyulin V.A., Baraldi P.G., Zefirov N.S. Molecular modeling and molecular dynamics simulation of the human A2b adenosine receptor in the phospholipid bilayer. // Book of abstracts of Meeting "Medicinal Chemistry and Pharmacology of Purinergic Receptors". Camerino. Italy. September 11-13 2003. P. 62.
6. Ivanov A.A., Baskin I.I., Palyulin V.A., Baraldi P.G., Zefirov N.S. Molecular modeling of the human A2b adenosine receptor. The investigation of the ligand-receptor interactions. // Book of abstracts of Polish-Austrian-German-Hungarian-Italian Joint Meeting on Medicinal Chemistry. Krakow. Poland. October 15-18. 2003. P. 78.
7. Иванов А.А., Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефилов Н.С. Молекулярное моделирование аденозиновых рецепторов и докинг лигандов. // Сборник тезисов докладов IX Всероссийского национального конгресса "Человек и лекарство". 8-12 апреля 2002. Москва. С. 619.
8. Иванов А.А., Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефилов Н.С. Изучение комплексов аденозиновых рецепторов с их лигандами методом молекулярной динамики. // Сборник тезисов докладов X Всероссийского национального конгресса "Человек и лекарство". 7-11 апреля 2003. Москва. С. 717.
9. Иванов А.А., Баскин И.И., Палюлин В.А., Зефилов Н.С. Сравнительный анализ структуры аденозиновых рецепторов и механизмов связывания их лигандов. // Сборник тезисов докладов III Российской конференции "Молекулярное моделирование". 15-17 апреля 2003. Москва. С. 70.

Подписано в печать 15.09.2004
Формат 60×88 1/16. Объем 1.75 п.л.
Тираж 110 экз. Заказ № 134
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к.102

№ 17366

РНБ Русский фонд

2005-4

16025