

УДК: 577.3:577.355
©Коллектив авторов

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛИГАНДОВ НАТИВНОГО И ХИРАЛЬНО МОДИФИЦИРОВАННОГО NR1 ЦЕНТРА СВЯЗЫВАНИЯ NMDA-РЕЦЕПТОРА

А.С. Коротина¹, А.В. Дмитриев^{1}, В.А. Твердислов²*

¹Липецкий филиал Орловской региональной академии государственной службы, 398050, Липецк, Интернациональная, 3; тел.: (84742)273948; эл. почта: a_v_dmitriev@mail.ru

²Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва

Представлены результаты молекулярно-динамического моделирования лигандов нативного и хирально модифицированного (с неферментативной рацемизацией Asn) NR1 центра связывания NMDA-рецептора. В результате установлено, что Gly, D-Ser, D-Asn и D-Thr являются лигандами центра связывания NR1 нативного рецептора, а для хирально модифицированного центра связывания характерно появление алифатических неполярных аминокислот D-Ala, D-Leu, D-Ile и D-Pro в качестве лигандов. Последние аминокислоты можно рассматривать в качестве эффективных лигандов центра связывания NR1 рецептора при патологиях, связанных с заболеваниями пожилого возраста.

Ключевые слова: NMDA-рецептор, неферментативная рацемизация аминокислот, лиганды центра связывания NR1, молекулярная динамика

ВВЕДЕНИЕ. Одной из важнейших особенностей живой природы на Земле является “хиральная чистота” аминокислот, углеводов, нуклеотидов и многих эндогенных биологически активных веществ. На молекулярном уровне организации клетки данное свойство проявляется в том, что ее нуклеиновые кислоты включают исключительно D-энантиомеры (дезоксир)ибызы, а синтезируемые в рибосомах белки – L-энантиомеры аминокислот. Однако в 70-х годах прошлого века экспериментально было установлено, что в процессе старения наблюдается увеличение содержания D-аминокислот в различных тканях организма человека и животных, причиной появления которых является неферментативная рацемизация аминокислот (НРА) белков (см., например, обзор [1]). Причем из двадцати аминокислот только Asp и Asn в белках являются структурно нестабильными и наиболее подверженными неферментативной рацемизации [2-4]. НРА происходит только в ранее синтезированных белках. При этом все, что относится к рибосомальному синтезу полипептидов, характеризуется абсолютной хиральной чистотой. Например, неферментативная рацемизация Asp в ранее синтезированном белке происходит с участием интермедиата сукцинимиды и образованием D- α -Asp и D- β -Asp [2].

Вероятно, аккумуляция D-аминокислот в белках приводит к изменению пространственной структуры и нарушению их функциональных свойств. НРА оказывает существенное влияние как на структурно-функциональные свойства долгоживущих белков, так и, в определенном временном интервале, на функционирование некоторых ферментов и сигнальных белков [1]. Ранее нами было установлено, что не только рацемизация всех аминокислот [5, 6], но и

* - адресат для переписки

небольшого количества Asp [7] приводит к нарушению структурно-функциональных свойств некоторых мембранных белков.

Функционирование белков, подверженных НРА, остаётся малоисследованной областью биомедицинской химии. Прежде всего, это относится к биологически активным соединениям стереоспецифичного действия, которые могут оказывать как более, так и менее активное действие на белки пожилых индивидуумов [8]. Можно отметить лишь результаты исследования [9], согласно которым рацемизация Asp и Asp, локализованных в активном центре фермента, приводит к нарушению его ферментативной активности.

НРА играет существенную роль в патогенезе болезней, характерных для людей пожилого возраста. Так, в работе [10] отмечено появление D-Asp в белках больных болезнью Альцгеймера, Паркинсона, а также при склеротических изменениях в сердечно-сосудистой системе, при глазной катаракте и т.д. Вместе с тем, существуют данные о вовлечении NMDA-рецепторов в патофизиологические процессы при указанных заболеваниях мозга [11, 12], поэтому представляет интерес моделирование лигандов хирально модифицированного глицинового центра связывания NMDA-рецептора.

Таким образом, цель работы – исследовать структурно-функциональные особенности нативного и хирально модифицированного посредством НРА NMDA-рецептора.

Для достижения указанной цели нами решались следующие задачи:

1) определение устойчивых конфигураций комплексов D-аминокислотных лигандов с нативным и хирально модифицированным посредством НРА глициновым центром связывания NMDA-рецептора;

2) определение наиболее эффективных лигандов нативного и хирально модифицированного глицинового центра связывания NMDA-рецептора.

МЕТОДИКА. NMDA-рецептор представляет собой лиганд-активируемый ионный канал, включающий семь различных центров связывания. Наиболее изученным является глициновый центр связывания NR1, лигандом которого является возбуждающая аминокислота Gly. Существуют экспериментальные данные по пространственной структуре центра связывания и D-аминокислот, выступающих в качестве лигандов [13].

Методом молекулярной динамики, используя силовое поле Amber96 [14], нами проведено исследование связывания D-аминокислотных лигандов с нативным и хирально модифицированным, в результате НРА, центром связывания NR1 рецептора. При проведении численного моделирования молекулярной динамики центра связывания мы использовали компьютерную программу HyperChem7. Координаты атомов центра связывания NR1 нативного рецептора брали из Банка белковых структур (Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, США). Код структуры центра связывания NR1 рецептора в комплексе с глицином – 1PB7. Для моделирования связывания центра NR1 с другими аминокислотными лигандами, перед проведением молекулярно-динамического моделирования, проводили замену Gly на другие D-аминокислоты. При этом единственным требованием такой замены являлось совпадение центра масс тестируемых аминокислотных лигандов. Выбор D-энантиомеров аминокислот обусловлен результатами кристаллографических исследований молекулярных основ стереоспецифичности связывания лигандов [13], согласно которым, прежде всего, D-аминокислоты являются наиболее эффективными лигандами центра связывания NR1.

Стерические напряжения в комплексе лиганд – центр связывания, обусловленные заменой структурно нестабильных L-аминокислот соответствующими D-аминокислотами центра связывания и заменой Gly другими D-аминокислотными лигандами, снимали с использованием молекулярной динамики. Были использованы следующие параметры моделирования: интервал – 10 пс, шаг – 0.001 пс. При численном интегрировании динамических уравнений производные по времени заменялись конечными центральными разностями с использованием

двухшагового алгоритма интегрирования, постоянной температуры интегрирования $T = 310^{\circ}\text{K}$ и времени температурной релаксации 0,1 пс. Для согласования с распределением скоростей Максвелла-Больцмана начальные значения импульсов атомов задавались нормально распределенными случайными числами. Потенциальная энергия включала следующие аддитивные составляющие [14]: энергия деформации валентных связей и валентных углов, энергия внутреннего вращения, энергия вандерваальсовых взаимодействий, энергия электростатических взаимодействий и энергия водородных связей. При этом устойчивое состояние (равновесная конфигурация) комплекса лиганд – центр связывания соответствует наиболее глубокому из локальных минимумов функции потенциальной энергии.

До проведения молекулярно-динамического моделирования осуществлялась хиральная модификация центра связывания путём замены всех его L-Asn и L-Asp, как структурно нестабильных аминокислот, на соответствующие D-Asn и D-Asp.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На диаграмме представлены равновесные энергии связывания D-аминокислотных лигандов с нативным и хирально модифицированным центром связывания. Для не представленных на диаграмме аминокислот характерно значительное стерическое напряжение в активном центре.

Значения равновесной энергии связывания Gly, D-Ser, D-Asn, D-Thr и центра связывания нативного рецептора лежат в интервале 80–100 ккал/моль, следовательно, данные лиганды наиболее прочно связываются с центром связывания. Данный результат согласуется с результатами кристаллографических исследований молекулярных основ стереоспецифичности связывания Gly и D-Ser [13], что даёт возможность использовать молекулярно-динамическое моделирование для исследования хирально модифицированного центра связывания. Другие аминокислоты менее прочно связываются с NR1, а для D-Leu характерно отталкивание (см. рисунок).

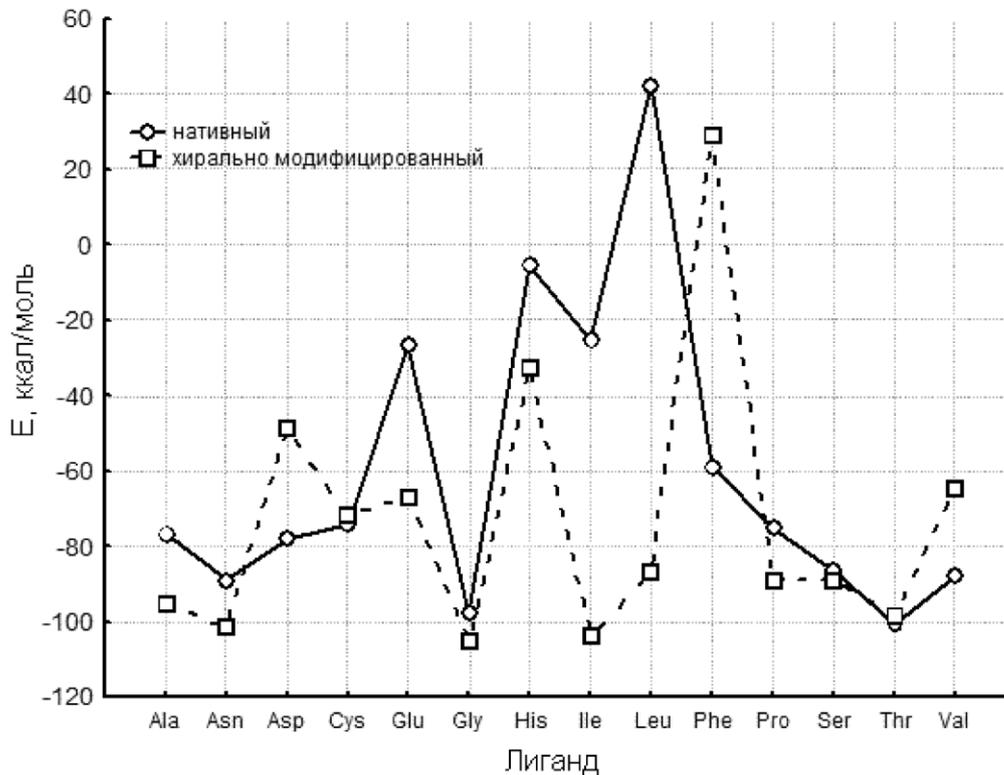


Рисунок.

Равновесные энергии связывания D-аминокислотных лигандов с нативным и хирально модифицированным NR1 центром связывания.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛИГАНДОВ NR1 ЦЕНТРА NMDA РЕЦЕПТОРА

НРА центра связывания NR1 приводит к увеличению количества D-аминокислот, равновесная энергия связывания которых лежит в интервале 80–100 ккал/моль – Gly, D-Ala, D-Asn, D-Ile, D-Leu, D-Pro, D-Ser, D-Thr. Отличительной особенностью данной совокупности аминокислот, является появление алифатических неполярных аминокислот D-Ala, D-Leu, D-Ile и D-Pro в качестве лигандов.

К настоящему времени экспериментально установлено, что патогенез болезней характерных для людей пожилого возраста связан с НРА ряда белков [15-18]. Вследствие этого, данные аминокислоты можно рассматривать в качестве эффективных лигандов центра связывания NR1 рецептора при патологиях пожилого возраста.

Полученные результаты позволяют сделать следующие выводы:

1) из всех возможных комбинаций аминокислот, наиболее стабильными являются молекулярные комплексы NR1 центра связывания нативного рецептора с лигандами Gly, D-Ser, D-Asn и D-Thr;

2) из всех возможных комбинаций аминокислот, наиболее стабильными являются молекулярные комплексы хирально модифицированного NR1 центра связывания рецептора с лигандами Gly, D-Ala, D-Asn, D-Ile, D-Leu, D-Pro, D-Ser и D-Thr;

3) для NMDA-рецептора в патологии обусловленной НРА характерно наличие дополнительных алифатических аминокислотных лигандов D-Ala, D-Leu, D-Ile и D-Pro.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (грант 05-05-64974-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ritz-Timme S., Collins M.J.* (2002) *Ageing Research Reviews*, **1**, 43–59.
2. *Nakamura T., Sadakane Y., Fujii N.* (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1764**, 800–806.
3. *Geiger T., Clarke S.* (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 785–794.
4. *Stephenson R.C., Clarke S.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 6164–6170.
5. *Дмитриев А.В., Исаев П.П., Твердислов В.А.* (2006) *Журн. структурной химии*, **47**(3), 578–580.
6. *Дмитриев А.В., Марков И.В., Твердислов В.А.* (2006) *Технологии живых систем*, **3**(1), 5–8.
7. *Дмитриев А.В., Марков И.В., Твердислов В.А.* (2007) *Известия вузов. Сер. Химия и хим. технология*, **50**(5), 128–129.
8. *Твердислов В.А., Яковенко Л.В., Жаворонков А.А.* (2007) *Российский химический журнал*, **LI**(1), 13-23.
9. *Lowenson J., Clarke S.* (1988) *Blood Cells*, **14**, 103–117.
10. *Fujii N.* (2005) *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1585–1589.
11. *Giuffra M.E., Sethy V.H., Davis T.L. et al.* (1993) *Mov. Disord.*, **8**, 147-150.
12. *Ulas J., Wiehmuller F.B., Brunner I.C. et al.* (1994) *J. Neurosci.*, **14**, 6317-6324.
13. *Furukawa H., Gouaux E.* (2003) *EMBO J.*, **22**, 2873–2885.
14. *Cornell W.* (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5179–5197.
15. *Masters P.M., Bada J.L., Zigler J.S.* (1977) *Nature*, **268**, 71–73.
16. *Man E.H., Sandhouse M.E., Burg J., Fisher G.H.* (1983) *Science*, **220**, 1407–1408.
17. *Shapiro S.D., Endicott S.K., Province M.A., Pierce J.A., Campbell E.J.* (1991) *J. Clin. Invest.*, **87**, 1828–1834.
18. *Orpiszewski J., Schormann N., Kluge-Beckerman B., Liepnieks J.J., Benson M.D.* (2000) *FASEB J.*, **14**, 1255–1263.

Поступила: 22. 10. 2007.

**NATIVE AND CHIRAL MODIFIED NMDA-RECEPTOR NR1-BINDING CORE
LIGANDS MODELING**

A.S. Korotina¹, A.V. Dmitriev¹, V.A. Tverdislov²

¹Lipetsk Branch of Orel Regional Academy of State Service, Lipetsk, Internationalnaya ul., 3, 398050
Russia; tel.: (8-4742)273948; e-mail: a_v_dmitriev@mail.ru

²School of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Native and chiral modified (with non-enzymatic Asn racemization) NR1-binding core of NMDA-receptor was modelled by means of molecular dynamic ligand modelling. It was concluded that Gly, D-Ser, D-Asn and D-Thr are ligands of NR1-binding core native NMDA-receptor, whereas the chiral modified NR1-binding core is characterized by the aliphatic non-polar amino acids D-Ala, D-Leu, D-Ile and D-Pro as ligands. The latter amino acids can be considered as effective ligands of NMDA-receptor NR1-binding core in age-related pathology.

Key words: NMDA-receptor, non-enzymatic racemization, ligands of NR1-binding core, molecular dynamics.