

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

Химический факультет

На правах рукописи

Карлов Дмитрий Сергеевич

**Моделирование структуры ионотропных
глутаматных рецепторов и дизайн их лигандов**

02.00.16 — Медицинская химия

02.00.03 — Органическая химия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва

2016

Работа выполнена в лаборатории медицинской химии кафедры медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: к.х.н., с.н.с. **Палюлин Владимир Александрович**

Официальные оппоненты: **Грин Михаил Александрович** д.х.н., профессор, ФГБОУВО «Московский технологический университет» (МИТХТ), зам. зав. кафедрой химии и технологии биологически активных соединений тонкого органического синтеза

Уткин Юрий Николаевич, д.х.н., профессор, ФГБУН «Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова», зав. лабораторией молекулярной токсикологии

Ведущая организация: ФГБНУ "Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В.Закусова"

Защита состоится 25 мая 2016 г. в 13:00 на заседании диссертационного совета Д 501.001.69 при МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.3, Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, ауд. 446.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27 и на сайте Химического факультета МГУ <http://www.chem.msu.ru> .

Автореферат разослан «__» _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.69
доктор химических наук, профессор

Т.В. Магдесиева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Дизайн новых лекарственных веществ — основная задача современной медицинской химии. Вычислительные методы прочно вошли в арсенал исследователей, их использование позволяет существенно сэкономить время и материальные ресурсы на всех стадиях разработки лекарственных препаратов - как на стадии поиска ведущего соединения, так и при оптимизации его активности и фармакокинетических параметров.

Глутаматергическая система имеет огромное значение для человеческого организма, в частности, доказано ее участие в процессах обучения и формирования памяти. Генетические или приобретенные нарушения в регуляции этой системы могут стать причиной психических, нейродегенеративных заболеваний, раннего развития деменции. В то же время разумное регулирование данной системы может значительно улучшить нарушенные когнитивные функции и память при таких заболеваниях, активизировать восстановительные процессы в поврежденном мозге. К настоящему моменту накоплено значительное количество данных о фармакологии и механизме действия глутаматных рецепторов.

Прочно вошел в клиническую практику блокатор глутаматных рецепторов мемантин, используемый для облегчения состояния при болезни Альцгеймера, известный анестетик кетамин используется для наркоза в ветеринарии. В то же время широкий круг задач, касающихся некоторых аспектов механизма активации и деактивации ионотропных глутаматных рецепторов, создания их селективных модуляторов, еще ожидает решения.

Цели и задачи исследования. Цель данной работы — моделирование структуры NMDA-рецептора и компьютерный дизайн новых модуляторов ионотропных глутаматных рецепторов на основе данных молекулярной динамики, результатов докинга и исследований QSAR.

Для достижения цели необходимо было решить следующие задачи:

Построить структурные модели аминоконцевых доменов NMDA-рецепторов подтипов GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D на основе структуры GluN1/GluN2B для изучения взаимодействий в лиганд-рецепторных комплексах. Построить полные структурные модели тетрамерного комплекса внеклеточных и трансмембранных субъединиц, обеспечивающих функционирование ионного канала NMDA-рецептора.

На основе анализа молекулярно-динамических траекторий объяснить различия в селективности отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора.

Определить способы связывания лигандов различных классов, действующих на аминоконцевые домены NMDA-рецептора, на основе результатов докинга и моделей 3D QSAR.

Разработать протокол виртуального скрининга, ориентированный на отбор потенциальных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора.

Разработать протокол поиска сайтов связывания малых органических молекул для белковых комплексов большого размера и протестировать его на лигандах NMDA-рецептора с известными сайтами связывания с использованием построенной по гомологии и оптимизированной полной структуре NMDA-рецептора.

На основе моделей 3D QSAR и молекулярно-динамических расчетов разработать систему для предсказания pEC_{50} для положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецептора.

Научная новизна. В ходе исследования впервые были построены модели аминоконцевых доменов NMDA-рецепторов подтипов GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D и полная модель NMDA-рецептора, включающая внеклеточные и трансмембранные домены. На основании молекулярно-динамического моделирования определен механизм взаимодействия лиганда с

аминоконцевыми доменами NMDA-рецептора. С помощью 3D QSAR и молекулярного докинга определены способы связывания лигандов и найдены причины высокой аффинности ряда лигандов к комплексу аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B. Проведенный виртуальный скрининг позволил идентифицировать ранее неизвестные отрицательные аллостерические модуляторы с умеренной активностью, имеющие не встречающиеся в литературе структурные скаффолды. Разработан протокол поиска сайтов связывания лигандов для белковых комплексов большого размера, для которых отсутствуют данные о способах связывания. Для положительных модуляторов АМРА-рецептора разработана система для предсказания pEC_{50} , сочетающая проведение молекулярно-динамических расчетов значений энтальпий связывания лигандов и модели 3D QSAR.

Практическая значимость результатов работы. Найденные в результате виртуального скрининга отрицательные модуляторы с новыми скаффолдами могут представлять интерес после оптимизации их структуры для дальнейших доклинических исследований. Предложенный протокол поиска сайтов связывания может быть применена для других лигандов с известной мишенью, но неизвестным способом связывания. Методика предсказания pEC_{50} для положительных аллостерических модуляторов, совмещающая 3D QSAR и молекулярно-динамические расчеты, может найти применение для оптимизации структур соединений-лидеров, действующих на сайт связывания положительных аллостерических модуляторов АМРА-рецептора.

Апробация работы. Результаты исследования были доложены на российских и международных научных конференциях и симпозиумах: XIX Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 2012), 19-ом международном симпозиуме EuroQSAR-2012 (Вена, Австрия, 2012), Втором международном симпозиуме по компьютерному моделированию в

материаловедении и биологических науках (СМБС-2015) (Нагоя, Япония, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация общим объемом в 153 страницы состоит из введения, литературного обзора, 5 глав, выводов и двух приложений. Материал проиллюстрирован 47 рисунками и 15 таблицами. Библиографический указатель содержит 250 цитированных работ.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обсуждаются актуальность темы диссертационной работы, ее практическое значение, а также цели исследования.

Первая глава посвящена обзору литературы по основным направлениям диссертационной работы. Приведено описание известных к настоящему моменту структурных особенностей глутамат-активируемых ионных каналов. Кратко изложена информация об основных сайтах связывания лигандов: ортостерическом сайте связывания глутаминовой кислоты и аллостерических сайтах, их фармакологии и перспективах клинического применения лигандов. Проведен анализ представленных в литературе данных по моделям QSAR для лигандов глутаматных рецепторов, виртуальному скринингу баз органических соединений и применению молекулярной динамики для изучения структуры и функций глутаматных рецепторов. Продемонстрирован факт недостаточной изученности сайта связывания аллостерических модуляторов, действующих на аминоконцевой домен. В литературе отсутствуют механистические объяснения селективности таких аллостерических модуляторов к рецепторам состава



GluN1/GluN2B. Также отсутствуют данные о расположении сайтов связывания лигандов, селективных к GluN2C- и GluN2D-содержащим рецепторам.

В главе 2 описано построение моделей аминоконцевых доменов GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D по гомологии со структурой GluN1/GluN2B, анализ способа связывания лигандов методом докинга и молекулярной динамики. Предложено объяснение селективности известных лигандов к рецепторам состава GluN1/GluN2B, приведено описание процедуры виртуального скрининга и результаты биологических испытаний предложенных лигандов.

Описана общая методика построения структурных моделей белков по гомологии, нахождение выравниваний аминокислотных последовательностей аминоконцевых доменов GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D и построение моделей на основании структуры комплекса GluN1/GluN2B.

Проведена оценка качества построенных моделей в целом, выделены локальные области, для которых требуется дополнительная оптимизация. Проведен анализ аминокислотного окружения и способа связывания лигандов, являющихся аналогами ифенпродила. Показано, что селективность отрицательных модуляторов-аналогов ифенпродила не может быть объяснена лишь различиями в локальном аминокислотном окружении лиганда.

Описано моделирование молекулярной динамики для NMDA-рецепторов подтипов GluN1/GluN2X (где X = A, B, C, D) как в отсутствие связанного лиганда, так и в комплексе с лигандами (программа Amber11, силовое поле AmberFF10, модель воды TIP3P, время моделирования 30 нс). Описано поведение лиганда в сайте связывания: изменение конформации, разрушение или образование водородных связей в зависимости от типа комплекса. На Рис. 1 представлены равновесные структуры комплексов GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D с ифенпродилом. Для комплекса GluN1/GluN2A с

лигандом показано изменение конформации лиганда в сайте связывания. Структура комплекса GluN1/GluN2B с лигандом оказывается наиболее стабильной. Для комплекса GluN1/GluN2C наблюдается обрыв водородной связи E232 (GluN2C) с гидроксилом фенольного фрагмента лиганда в конце траектории. В случае GluN1/GluN2D разрыв водородной связи E254 (GluN2D) с лигандом происходит практически сразу после начала моделирования совместно с образованием солевого мостика между E234 и R115. Следует отметить существенные различия в равновесной конформации петель подтипов GluN2A, GluN2C, GluN2D, гомологичных петле GluN2B, начинающейся с D206 и

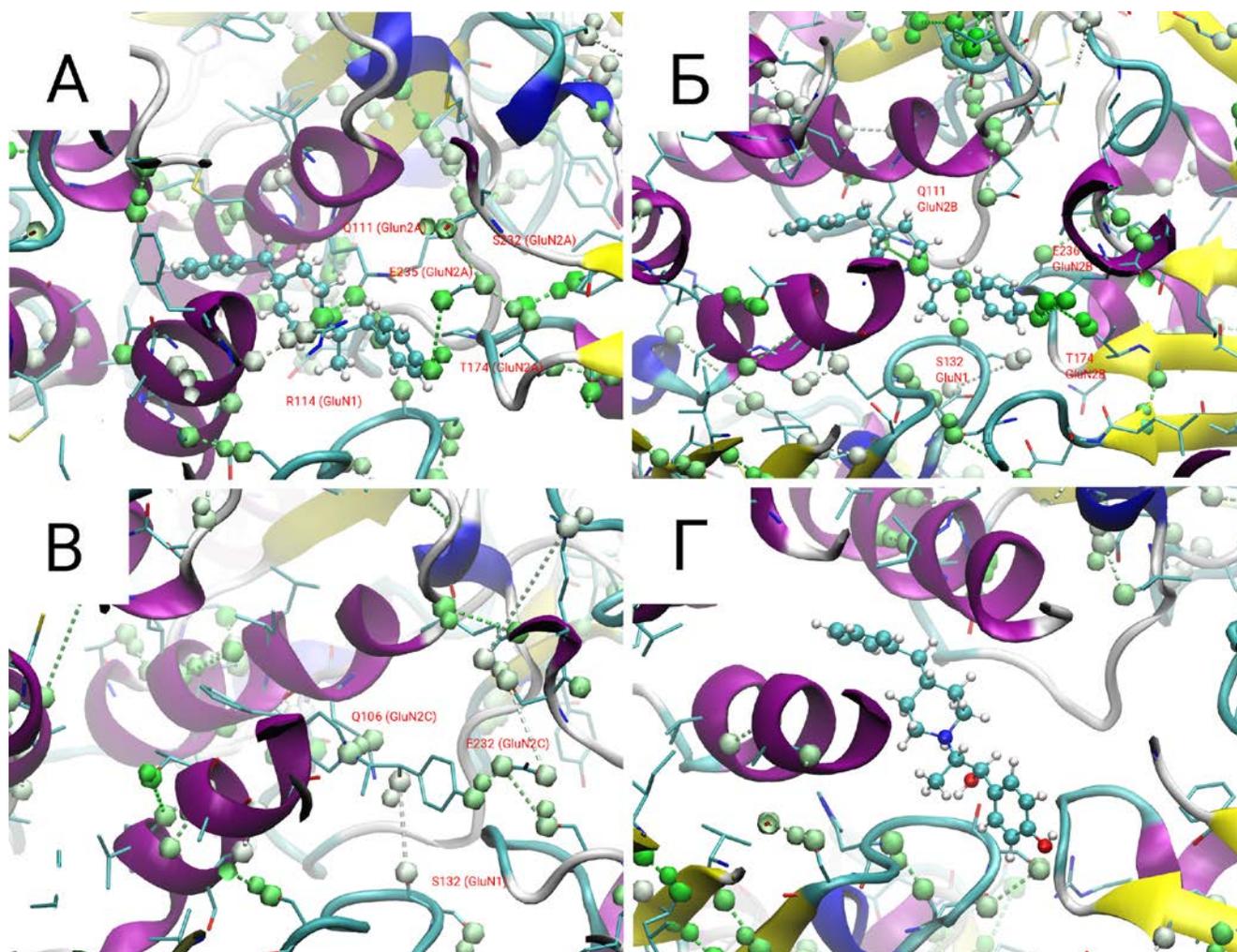


Рисунок 1. Равновесные конформации комплексов GluN1/GluN2X с одним из изомеров ифенпродила. (А — GluN1/GluN2A, Б - GluN1/GluN2B, В -

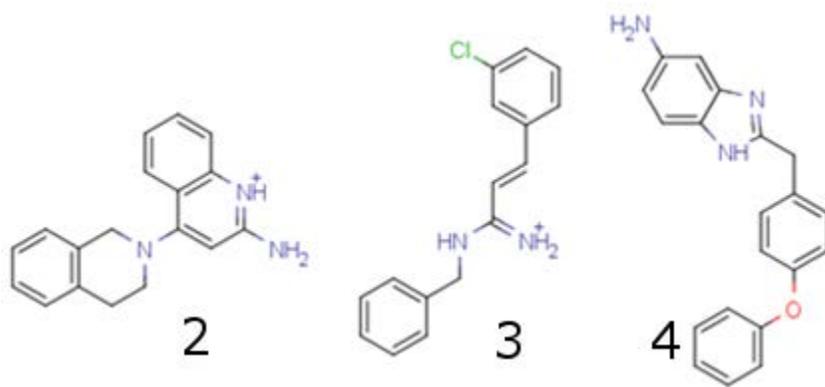
GluN1/GluN2C, Г - GluN1/GluN2D). Зеленым цветом отмечены водородные связи. Чем насыщеннее цвет, тем дольше существует водородная связь.

заканчивающейся на I216. Структура данной петли играет определяющую роль в формировании контактов с аминоконцевым доменом GluN1 и данные различия объясняют селективность аналогов ифенпродила по отношению к GluN2B-содержащим подтипам рецепторов.

Методом MM-GBSA были рассчитаны энтальпии связывания лигандов, а также энтальпии связывания мономеров GluN1 и GluN2X (X=A, B, C, D) в димере (Таблица 1). Следует отметить, что рассчитанные значения энтальпий хорошо согласуются со значениями активности. Значение энтальпии связывания аминоконцевых доменов для комплексов GluN1/GluN2B оказывается более высоким по сравнению с GluN1/GluN2A и GluN1/GluN2D в отсутствие лиганда (при учете сольватации методом GBSA), что также объясняет повышенную аффинность лигандов такого типа к GluN1/GluN2B, так как лиганд в этом случае дополнительно стабилизирует структуру.

Таблица 1. Рассчитанные энтальпии связывания лиганда и энтальпии связывания мономеров в димере GluN1/GluN2.

Тип комплекса	Энтальпия связывания лиганда, MM-GBSA, ккал/моль	Энтальпия связывания димеров в отсутствии лиганда MM-GBSA, ккал/моль	RMSD лиганда в сайте связывания, Å	Ифенпродил в IC ₅₀ , μM по лит. данным
GluN1/GluN2A	-50.3	-82.2	1.06	> 100
GluN1/GluN2B	-53.4	-64.3	0.55	0.8
GluN1/GluN2C	-49.3	-32.6	0.59	> 100
GluN1/GluN2D	-35.4	-69.5	1.48	неактивен



Конформационные изменения в рецепторе при отсутствии лиганда можно интерпретировать как разворот субъединиц аминоконцевого домена друг относительно друга

на угол 15° , как это показано на Рис. 2. При этом происходят изменения в форме и объеме сайта связывания лиганда. Во-первых, карман связывания фенильной группы лиганда оказывается полностью скрыт окружающими остатками. Во-вторых, происходит увеличение объема пространства между субъединицами домена GluN2B, что можно интерпретировать как повышение степени “открытия” аминоконцевого домена. Показано, что удаление лиганда из сайта связывания ифенпродила влечет за собой изменение геометрии сайта связывания Zn^{2+} .

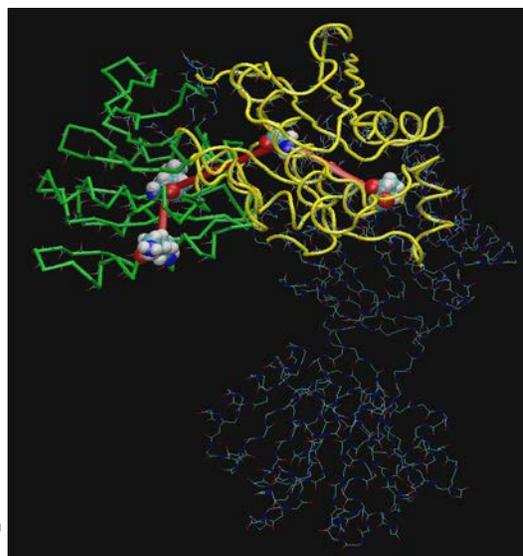
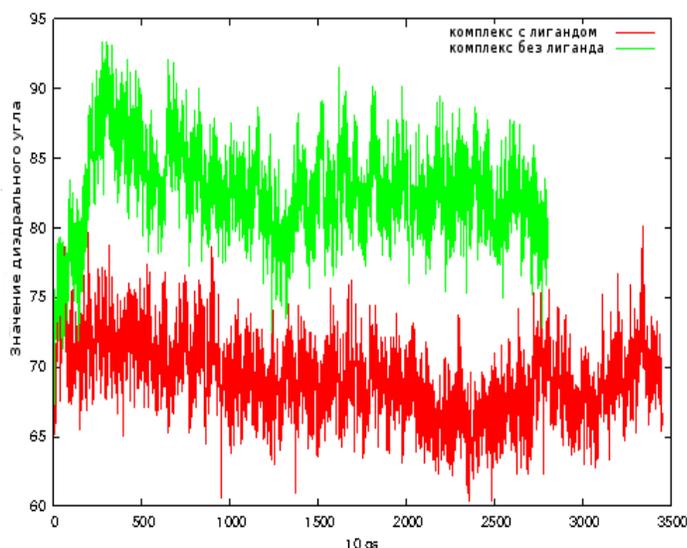


Рисунок 2. (Справа) Выбранный диэдральный угол для измерения конформационных изменений. (Слева) Изменение диэдрального угла по траектории молекулярной динамики аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B.

Описан докинг различных отрицательных модуляторов в сайт связывания ифенпродила, которые структурно можно разделить на три группы, наиболее

характерные представители из которых показаны на рис. 3. Для каждой группы найдены способы связывания, при этом лишь структуры, принадлежащие к группе 3 (например, соединение **4**) имеют способ связывания, аналогичный ифенпродилу (водородная связь с E236, гидрофобные контакты с F114 и L111 (GluN2B) и P78 (GluN1)).

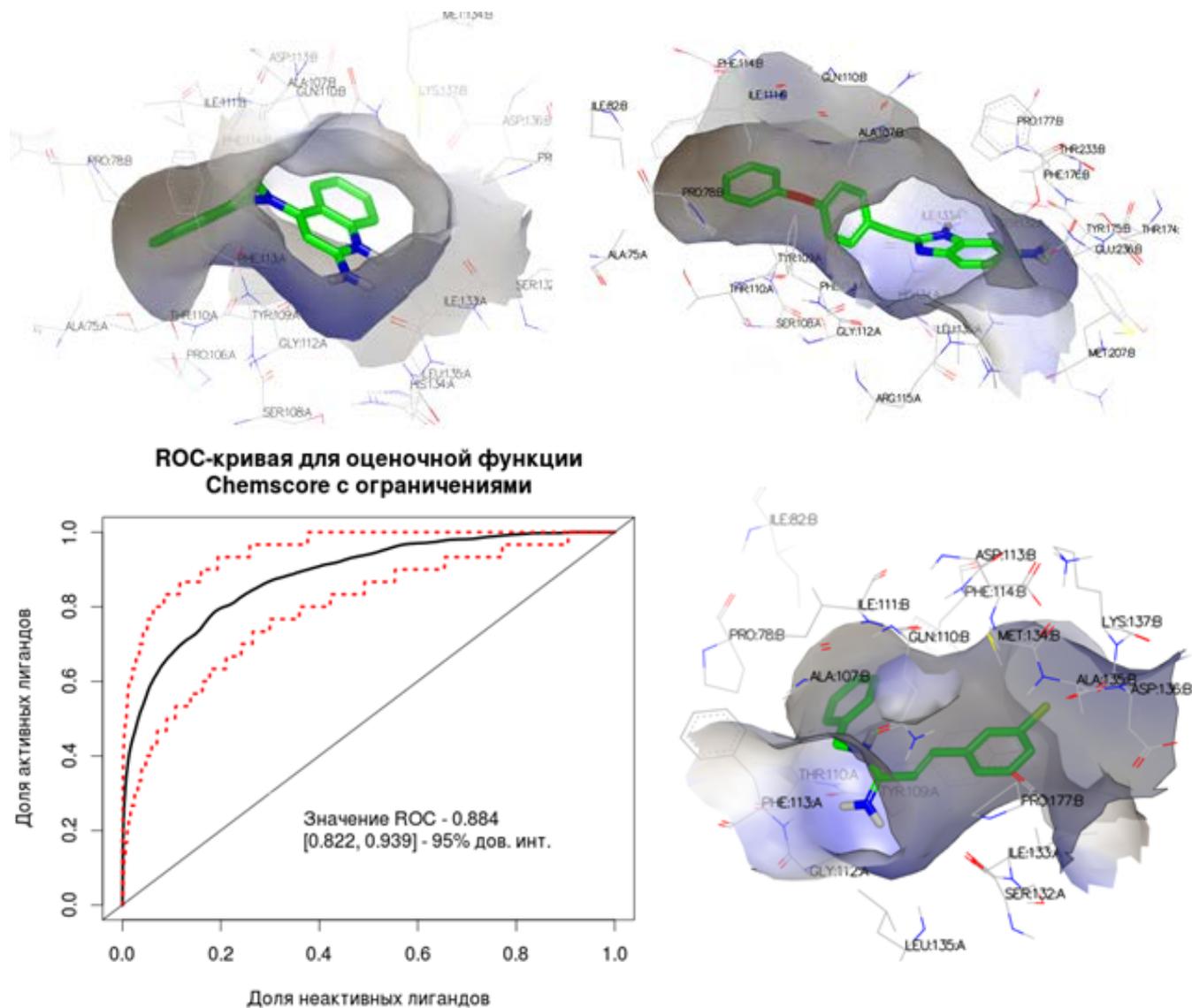


Рисунок 3. Результаты докинга структур **2**, **3**, **4** в сайт связывания ифенпродила и ROC-кривая для оценочной функции ChemScore.

Производные тетрагидроизохинолина (**2**) также занимают карман, образованный остатками F114, L111 (GluN2B) и P78 (GluN1). Однако при этом

аминохинолиновый фрагмент оказывается вовлечен в стекинг-взаимодействия с остатком Y109. Лиганды, относящиеся ко второй группе, обладают сходным с первой группой способом связывания, однако большинство из них оказываются способны образовать водородную связь с Q110, как и ифенпродил.

Рассмотрены особенности гидратации сайта связывания модуляторов. Показано, что присутствие молекул воды в карманах, образованных остатками Y109 (GluN1), Q111 (GluN2B) и P78 (GluN2B), I111 (GluN2B), A107 (GluN2B), T110 (GluN1) невыгодно.

Описано построение моделей 3D QSAR (CoMFA) для всех трех групп лигандов. Для наложения структур использовали конформации, полученные в результате докинга. Для лигандов первой и второй группы удалось добиться построения достаточно качественных моделей ($n = 66$, $Q^2 = 0.50$, $R^2 = 0.93$, $N_F = 5$ — для первой группы с использованием зарядов Гастайгера и $n = 53$, $Q^2 = 0.54$, $R^2 = 0.97$, $N_F = 6$ для второй группы лигандов с использованием зарядов MMFF94). Следует отметить, что для первой группы без добавления рассчитанного значения константы кислотности в качестве дескриптора не удастся построить модель, обладающую высокой предсказательной силой, в то время как для выборки стери-

Таблица 2. Результаты валидации фармакофорной гипотезы для отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора (оценочная функция - TanimotoCombo).

Номер	Структуры, составляющие фармакофор	Площадь под кривой (AUC) ROC	Фактор обогащения (EF) 0.5%
1	6,7,8,9	0.87 ± 0.05	55 ± 10
2	2,5,6,8	0.87 ± 0.05	57 ± 10
3	5,7,8,9	0.91 ± 0.05	61 ± 10
4	5,6,7,9	0.91 ± 0.06	57 ± 10
5	2,6,8,9	0.90 ± 0.06	68 ± 10

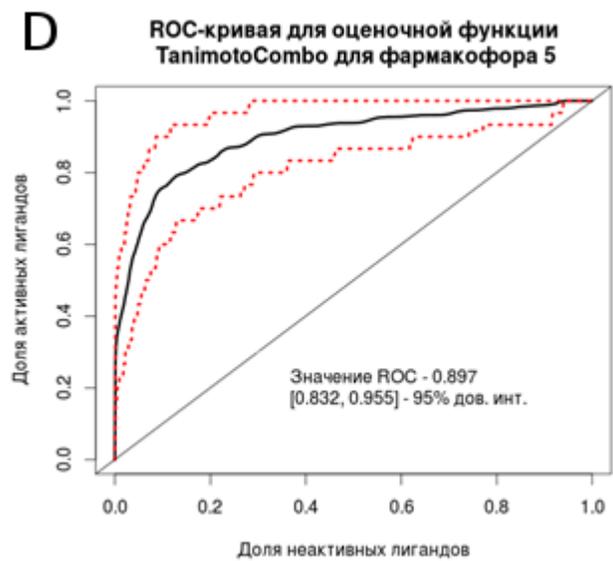
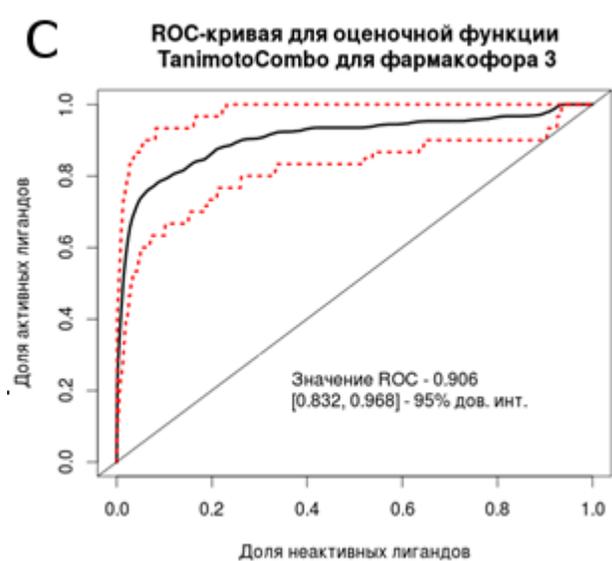
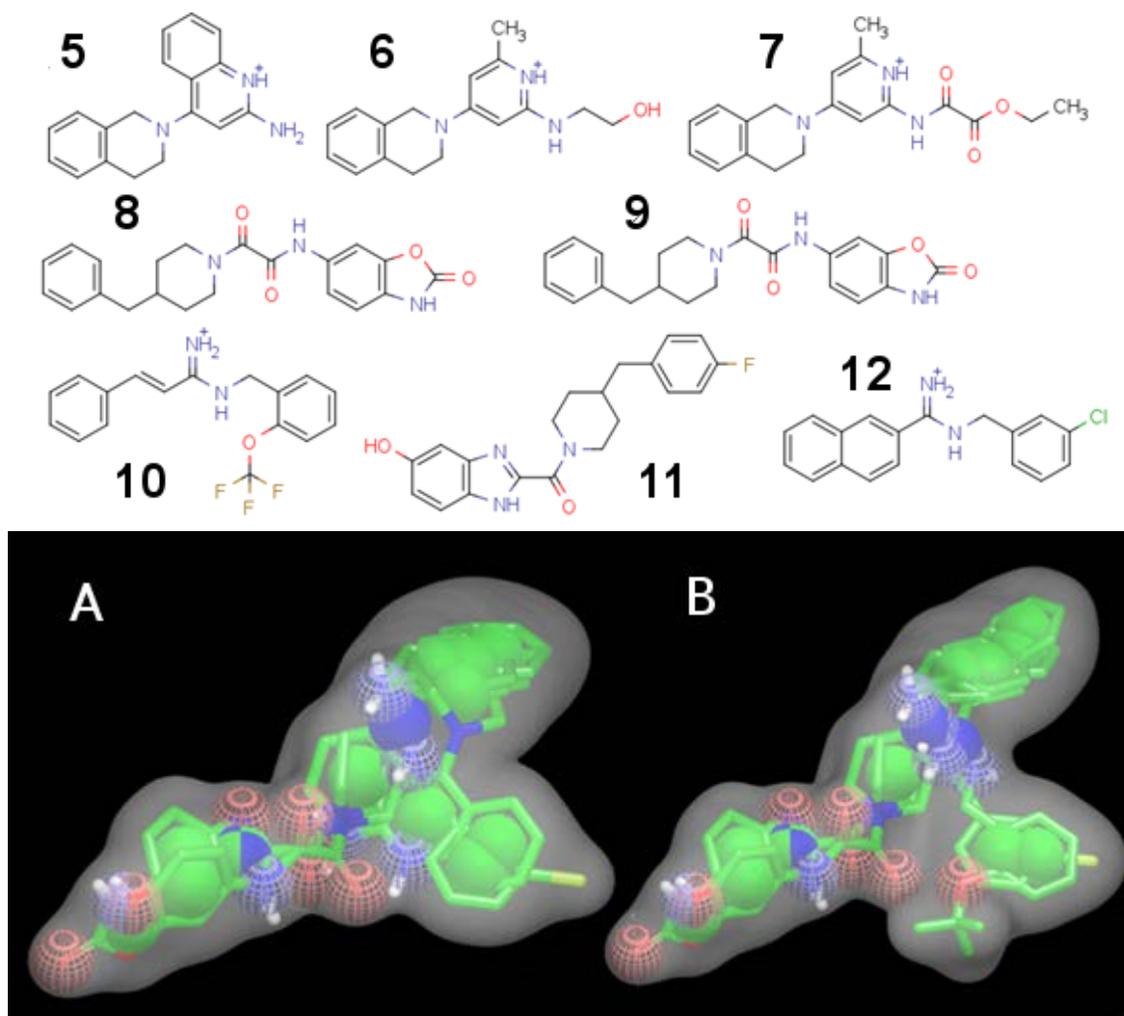


Рисунок 4. Выборка структур для построения фармакофора (5 – 12), фармакофоры 3 (A) и 5 (B) и результаты валидации фармакофоров 3 (C) и 5 (D) (см. Таблицу 2).

ламидинов (3) (вторая группа) достаточно лишь значений стерического и электростатического потенциала. Этот факт согласуется с тем, что по результатам докинга важную роль в образовании стабильного комплекса играют стекинг- и π -катионные взаимодействия с остатком Y109 (GluN1). Как известно, стекинг-взаимодействия усиливаются в случаях, когда одно из колец содержит акцепторные заместители или несет положительный заряд, а другое содержит донорные заместители. Вследствие высокой основности амидины протонированы практически полностью, а константы основности тетрагидроизохинолинов существенно зависят от природы заместителей в хинолиновом фрагменте. Для лигандов третьей группы не удалось построить высококачественные модели, видимо, вследствие низкой вариации в исходных данных.

Приведено описание протокола виртуального скрининга баз данных органических соединений методами докинга и фармакофорного поиска. Полученные результаты позволили определить структурные ограничения, которые следует накладывать при виртуальном скрининге для нахождения перспективных аллостерических модуляторов. Для статистической валидации предложенных методик использовали метрики ROC, также были рассчитаны факторы обогащения. Для валидации были использованы две базы: активные соединения и условно неактивные соединения, похожие по физико-химическим свойствам на активные, но отличающиеся от них топологически. Виртуальный скрининг методом докинга проводили в программе FRED. Подбор оптимальной оценочной функции для докинга определялся по результатам расчета площади под кривой ROC (AUC) и факторов обогащения. Проверялись оценочные функции Chemgauss3, Chemgauss4, OEChemscore, PLP, Shapegauss из библиотеки, разработанной фирмой OpenEye, а также Chemscore, G_score, D_score, PMF_score из программы Sybyl X 1.3. Наилучшие значения факторов обогащения (EF) и площади под кривой (AUC) достигаются при использовании оценочной функции Chemscore (AUC = 0.88 ± 0.06 , EF = 27 ± 9 , доверительный интервал дан для 95%

вероятности (бутстреп)). Практически так же работает оценочная функция Chemgauss4 ($AUC = 0.87 \pm 0.07$, $EF = 19 \pm 9$), которая по причине удобства использования применялась для проведения скрининга.

Добавление ограничений на наличие ароматического фрагмента в кармане, образованном остатками F114, L111 (GluN2B) и P78 (GluN1), незначительно ухудшает статистические характеристики классификатора. Однако, судя по результатам докинга, данный карман оказывается заполнен для всех полученных комплексов активных лигандов, поэтому рассмотренное ограничение также было применено при проведении скрининга.

Виртуальный скрининг методом фармакофорного поиска выполнен в программе ROCS. Для построения фармакофора из набора докированных лигандов была взята представительная выборка из 8 высокоаффинных лигандов (2-9) разных классов, для которых результаты докинга однозначны. Перебирались наборы из 4-х лигандов так, чтобы для получившегося фармакофора значения оценочной функции TanimotoCombo для оставшихся лигандов были максимальны, для 5 лучших комбинаций была проведена статистическая валидация, результаты представлены в таблице 2. Лучшие фармакофоры, а также результаты валидации представлены на рисунке 4.

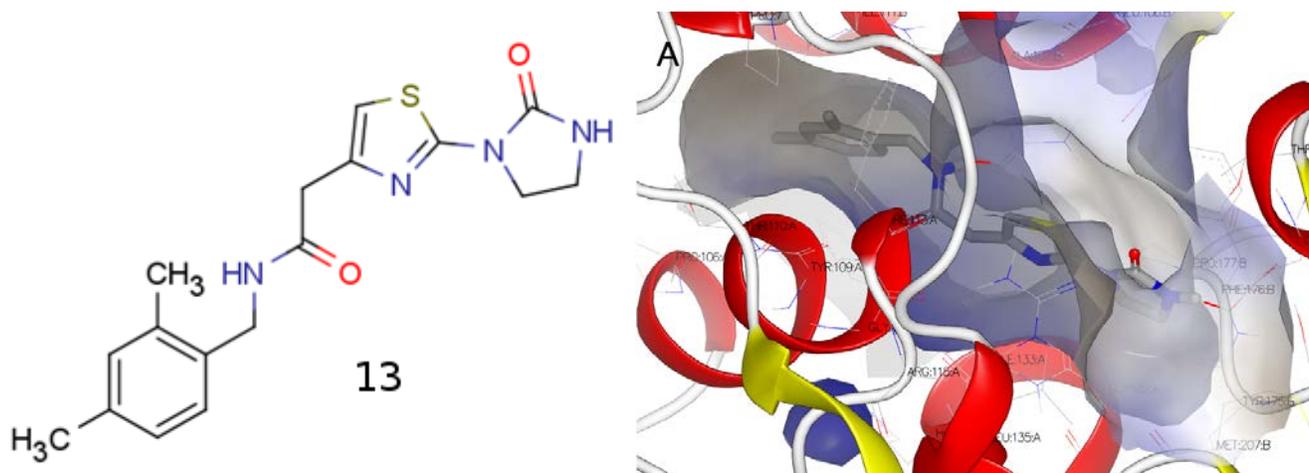


Рисунок 5. Структура одного из найденных в результате виртуального скрининга аллостерических модуляторов.

Выборки активных и неактивных соединений для валидации методики строили следующим образом: активные - все найденные в литературе лиганды, выборка неактивных лигандов строилась из случайных структур, взятых из базы ZINC, имеющих сходные физико-химические свойства, но сильно отличающихся от известных лигандов по топологии. Граничное значение оценочной функции при проведении докинга подбиралось таким образом, чтобы минимизировать вероятность ошибок классификации первого и второго рода.

Описаны результаты биологических испытаний некоторых отобранных лигандов на замещение меченого $[H^3]$ ифенпродила. Из 14 испытанных веществ два проявляют активность в концентрациях 40-50 μM , структура и способ связывания одного из них (**13**) представлены на рисунке 5. Следует отметить, что, несмотря на умеренную активность, рассмотренный лиганд не принадлежит ни к одному из известных классов отрицательных модуляторов NMDA рецептора, что позволяет проводить дальнейшие модификации структуры для улучшения активности и устранения возможных побочных эффектов.

Глава 3 посвящена поиску сайтов связывания отрицательных модуляторов NMDA-рецептора, селективных к рецепторам, содержащим GluN2C и GluN2D субъединицы.

Приведено описание построения модели полной структуры NMDA-рецептора подтипа GluN1/GluN2D по гомологии со структурой GluN1/GluN2B (код PDB 4PE5), включающей внеклеточные и трансмембранные домены. Общий вид полученной модели рецептора приведен на рис. 6. Выравнивание аминокислотных последовательностей представлены в приложении к диссертационной работе. Степень схожести аминокислотных последовательностей GluN2D и GluN2B достаточно высока. В структуре 4PE5 отсутствуют петли, входящие в трансмембранный домен и находящиеся во внутриклеточном пространстве, а также структура фильтра селективности. Так как сайт связывания известных блокаторов канала (фенциклидин, мемантин) образован в том числе остатками,

образующими фильтр селективности, при построении модели был добавлен дополнительный шаблон, представляющий собой структуру калиевого канала KirBac1.1 (код PDB 2WLL). Данный канал обладает сходной с NMDA-рецептором топологией и длина фильтра селективности у названных белков примерно равна.

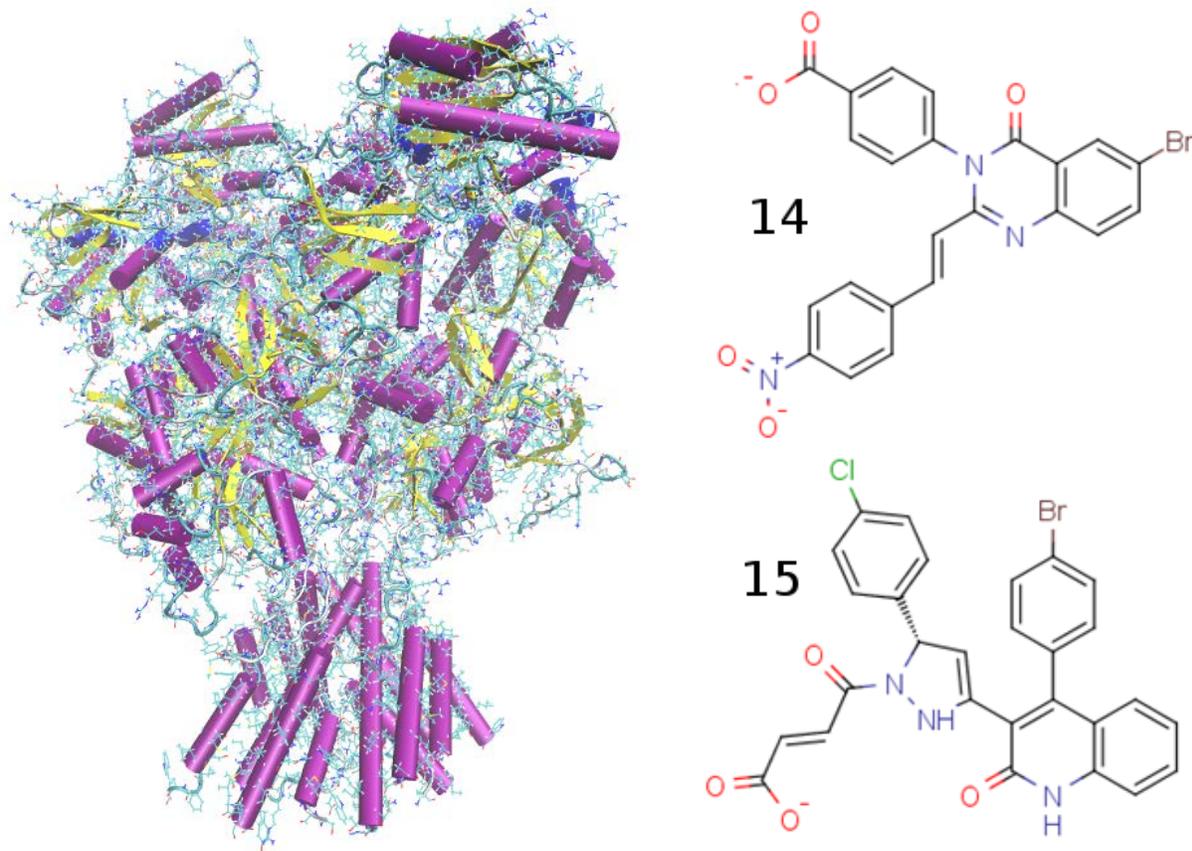


Рисунок 6. Модель полной структуры GluN1/GluN2D рецептора и структуры лигандов, использованные для нахождения местоположения сайтов связывания отрицательных аллостерических модуляторов, селективных к GluN2C- и GluN2D-содержащим подтипам.

Описан протокол, включающий поиск карманов на поверхности рецептора (в полной структуре NMDA-рецептора найдено 152 кармана) и гибкий докинг лигандов в программе Rosetta-3.5, с последующим ранжированием карманов по значению оценочной функции Talaris2013. Для валидации протокол был опробован на лигандах с известными сайтами связывания: глутамате, глицине, D-2-амино-5-фосфопентановой кислоте (D-AP5), ифенпродиле и 5,7-дихлоркинуреновой кислоте (ДСКА). Для глутамата, глицина и ифенпродила наиболее высоко

оцениваются истинные карманы связывания. Несмотря на неполное конформационное соответствие структуры рецептора истинной конформации связывания D-AP5, для данного лиганда истинный карман связывания оценивается наиболее высоко, хотя полученная конформация несколько отличается от нативной.

Рассмотрены результаты применения данной методики к селективным лигандам GluN1/GluN2C и GluN1/GluN2D **14** и **15**. Докинг проводился в карманы, найденные в структурах GluN2B и GluN2D.

Некоторые высокооцененные карманы, находящие в районе петель, соединяющих трансмембранный и лигандсвязывающий домены GluN2 субъединицы, согласуются с литературными данными по мутагенезу.

Описано построение QSAR-моделей с использованием метода анализа топологии молекулярного поля (MFTA) для анализа структурных факторов в модуляторах данного типа, влияющих на активность и селективность лигандов. Модель, имеющая наибольшую предсказательную силу, строится для активности по отношению к рецептору GluN1/GluN2C ($n = 94$, $N_F = 6$, $R^2 = 0.78$, $Q^2 = 0.47$, $RMSE_{cv} = 0.56$), несколько хуже получаются модели для GluN2A-, GluN2B-содержащих рецепторов, вследствие меньшей вариации в данных.

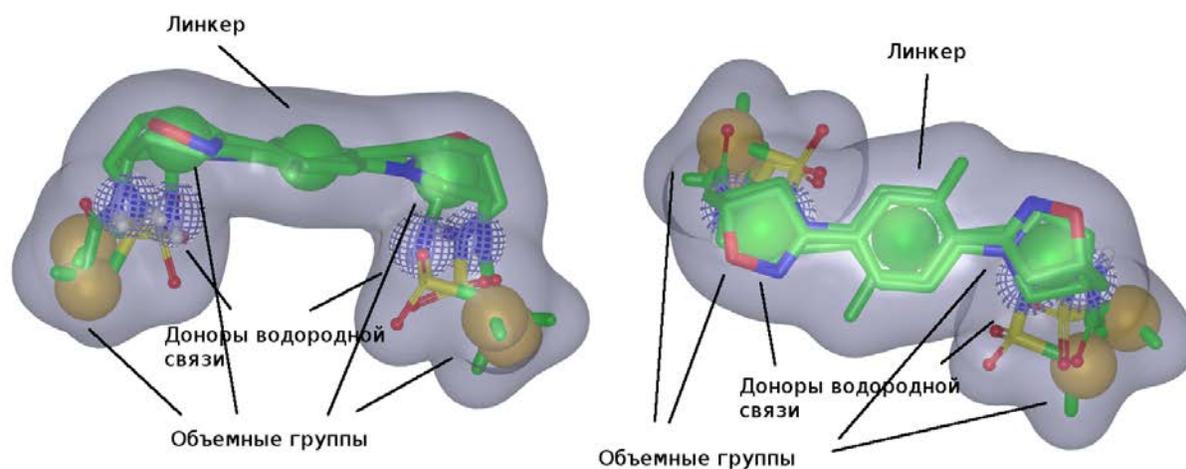


Рисунок 7. Фармакофорное наложение положительных модуляторов AMPA-рецептора.

В Главе 4 описана методика прогнозирования pEC_{50} для ПАМ AMPA-рецептора (подтип GluA2) и построена фармакофорная гипотеза (рис 7). Стимуляция AMPA-рецепторов не вызывает нейротоксических эффектов и способствует улучшению когнитивных функций.

Обсуждены результаты построения модели CoMFA для ПАМ на основе 25 известных кристаллических структур лиганд-рецепторных комплексов с варьированием способа расчета зарядов. Наилучшая модель получена при применении зарядовой модели MMFF94 ($n = 25$, $R^2 = 0.85$, $Q^2 = 0.57$, $RMSE_{cv} = 0.37$).

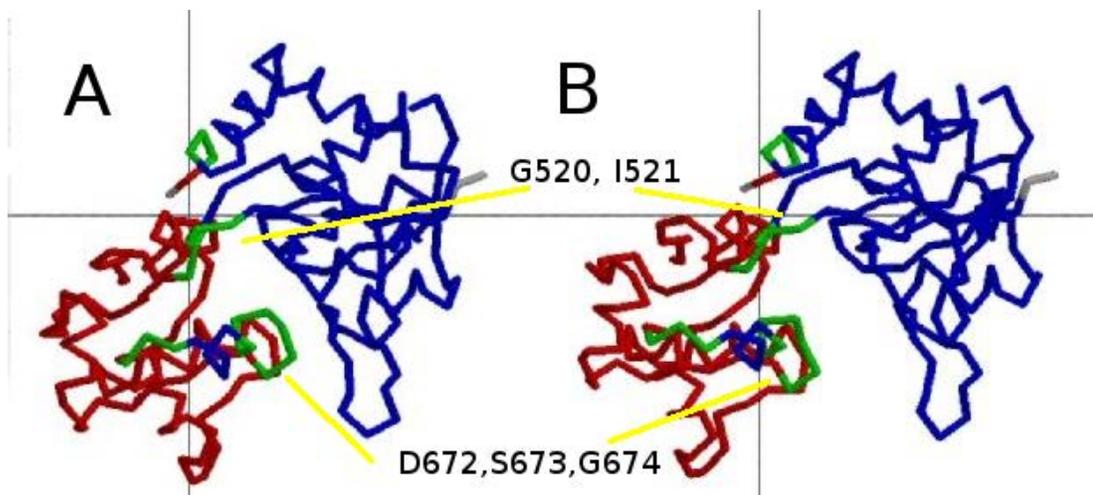


Рисунок 8. Иллюстрация конформационных переходов в лиганд-связывающих доменах GluA2 рецептора, происходящих при открытии домена.

В Главе 5 приведено описание протокола расчета значений энтальпии и свободной энергии связывания ПАМ AMPA-рецептора AMPA-рецептора методом MM-GBSA (20 нс, AmberFF12SB, из последних 10 нс траектории отобрано 50 кадров для расчета энтальпии). Энтальпия данным методом рассчитывается как разность между энергией комплекса, рассчитанной методом молекулярной механики, и суммарной энергией белка и лиганда, с учетом сольватации. Лучшая корреляция с pEC_{50} лигандов ($n = 25$, $R^2 = 0.55$, $RMSE_{cv}(LOO) = 0.74$), получается при использовании метода MM-GBSA для учета эффектов сольватации. Добавление энтальпии связывания белка в димере к рассчитанному значению

энтальпии связывания лиганда приводит к снижению коэффициента корреляции. Учет величины энтропии комплексообразования не улучшает модели.

В большинстве траекторий происходило раскрытие лиганд-связывающих доменов (рис. 8). На основе анализа большого числа траекторий удалось определить последовательность конформационных изменений, приводящих к открытию домена.

На первой стадии происходит конформационное изменение в районе остатков D672, S673, G674 (GluA2). Изначально в полностью закрытом домене имеется водородная связь между амидной группой основной цепи S673 и карбонильным атомом кислорода основной цепи G472. Для всех рассмотренных структур после обрыва этой водородной связи за счет теплового движения (G674 облегчает этот обрыв за счет повышения конформационной подвижности основной цепи) начинается отрыв S1 субъединицы от субъединицы S2.

На второй стадии наблюдаются небольшие конформационные изменения в основной цепи остатков G520, I521, входящих в так называемую шарнирную область.

ВЫВОДЫ

1. Построены структурные модели димерных комплексов аминоконцевых доменов состава GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D по гомологии со структурой димера аминоконцевых доменов GluN1/GluN2B. Построена полная структурная модель рецептора GluN1/GluN2D на основании структуры комплекса GluN1/GluN2B и калиевого канала KirBac1.1.

2. Выполнено моделирование молекулярной динамики для комплексов аминоконцевых доменов GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2C, GluN1/GluN2D. Выявленные структурные изменения в сайте связывания, происходящие при удалении лиганда, являются следствием внутреннего вращения долей аминоконцевого домена GluN2. Показано, что сайты связывания ифенпродила и Zn^{2+} аллостерически связаны.

3. Разработан протокол виртуального скрининга для отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора, основанный на методе докинга и фармакофорном подоби. Качество распознавания активных молекул подтверждено статистическими методами. Идентифицированы активные соединения, не относящиеся ни к одному из известных классов отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора.

4. Построены модели 3D QSAR (CoMFA) для различных классов отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора, определены оптимальные зарядовые схемы и наиболее значимые физико-химические дескрипторы.

5. Для положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецептора построены модели 3D-QSAR (CoMFA), обладающие высокой предсказательной способностью.

6. Разработана методика предсказания EC_{50} для положительных аллостерических модуляторов GluA2-подтипа AMPA-рецептора на основе расчета энтальпии связывания в комплексах димера лиганд-связывающих доменов подтипов GluA2 AMPA-рецептора с лигандами методом ММ-GBSA. Для известных комплексов обнаружена высокая корреляция рассчитанных величин с литературными данными.

7. Разработан протокол поиска сайтов связывания лигандов для белковых комплексов большого размера, включающих в себя тысячи аминокислотных остатков и сотни возможных карманов связывания, сочетающий в себе анализ поверхности белка с выявлением карманов с последующим «гибким» докингом лиганда в идентифицированные карманы. Для данной методики на примере NMDA-рецептора показана эффективность поиска сайтов связывания глутамата, глицина, ифенпродила и некоторых антагонистов с известным способом связывания. Идентифицированы сайты связывания новых отрицательных модуляторов NMDA-рецептора, согласующиеся с литературными данными.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Радченко Е.В., Карлов Д.С., Палюлин В.А., Зефирова Н.С., Пентковский В.М. Компьютерное моделирование активности и селективности неконкурентных антагонистов NMDA-рецептора в ряду хиназолинонов. // Доклады Академии Наук. 2012. Т. 443, № 5, С. 637-641.

2. Karlov D.S., Radchenko E.V., Zefirov A.N., Palyulin V.A., Pentkovski V.M., Zefirov N.S. On mechanism of allosteric modulation of NMDA receptor via amino-terminal domains. // Biochemical and Biophysical Research Communications. 2012. V. 424. P. 687-690.

3. Радченко Е.В., Карлов Д.С., Зефирова А.Н., Палюлин В.А., Зефирова Н.С., Пентковский В.М. Компьютерный дизайн отрицательных аллостерических модуляторов NMDA-рецептора. // Доклады Академии Наук. 2013. Т. 448, № 3, С. 358-362.

4. Д. С. Карлов, М. И. Лавров, В. А. Палюлин, Н. С. Зефирова. Фармакофорный анализ положительных аллостерических модуляторов AMPA рецепторов. // Известия Академии Наук. Серия химическая, 2016, № 2, с. 581-587.

5. Карлов Д.С., Палюлин В.А., Зефирова Н.С., Пентковский В.М. Исследование механизма аллостерического ингибирования NMDA-рецептора ифенпродиллом и его аналогами. // Сборник материалов XIX Российского национального конгресса, ЗАО РИЦ "Человек и лекарство" Москва, 2012, с. 384-384.

6. Karlov D.S., Palyulin V.A., Pentkovski V.M., Zefirov N.S. On mechanism of NMDA receptor allosteric inhibition. // 19-th EuroQSAR; Knowledge Enabled Ligand Design. Vienna. Austria. 2012.

7. Palyulin V.A., Karlov D.S., Lavrov M.I., Radchenko E.V., Zefirov N.S. Molecular Dynamics Simulation and QSAR Studies of Ligand-Receptor Interactions in Ionotropic Glutamate Receptors. // 2nd International Symposium on Computational Materials and Biological Sciences. Nagoya. Japan. 2015, I-5.