

УДК: 577.322

Молекулярные механизмы биологического действия кофеина. Компьютерное моделирование конкуренции с аденозином за места связывания с рецепторами

Дерябина А.С.*¹, Родригес Э.¹, Гонсалес Э.¹, Дерябин М.С.²,
Эррера Х.Н.¹, Санчес К.¹, Полтев В.И.^{1,3}

¹Автономный университет Пуэблы, 72570, Пуэбла, Мексика

²Научно-исследовательский радиофизический институт, Нижний Новгород, 603950, Россия

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики, Российская академия наук, Пуццо, Московская область, 142290, Россия

Аннотация. Кофеин – это известное с древних времен и применяемое большинством населения биологически активное вещество с широким спектром действия. Кофеин (К) влияет на функционирование белков, нуклеиновых кислот и мембран. Основной фармакологический эффект К – стимуляция центральной нервной системы – определяется его антагонистической конкуренцией с аденозином (Ado) на аденозиновых рецепторах A1 и A2a. Наша работа направлена на выяснение атомно-молекулярных механизмов этого эффекта. Основной вопрос, который мы при этом ставим и на который стараемся ответить с помощью компьютерного моделирования, – как сравнительно небольшая, практически жесткая молекула К с ограниченными возможностями участия в сильных невалентных взаимодействиях может конкурировать за рецепторные сайты связывания с молекулой Ado, имеющей большее количество центров образования водородных связей и обладающей заметной конформационной подвижностью. С этой целью методом молекулярной механики были найдены минимумы энергии взаимодействия молекул К и Ado с участками трансмембранных фрагментов рецептора A1, ответственными за связывание Ado. Оказалось, что значения энергии в наиболее глубоких из этих минимумов близки для К и Ado. Рассмотрение геометрических характеристик молекулярных моделей отдельной молекулы Ado и комплексов, соответствующих этим минимумам, показывает, что Ado, как и К, образует не более трех водородных связей с соответствующими участками рецепторов. Качественное объяснение этим результатам дает образование в наиболее выгодных конформациях молекулы Ado двух внутримолекулярных водородных связей, которое ограничивает взаимодействие с рецепторами участвующих в них атомов. Поэтому две разные по количеству гидрофильных центров и конформационным возможностям молекулы оказываются близкими с точки зрения энергии комплексообразования с участками аденозинового рецептора A1.

Ключевые слова: кофеин, аденозин, аденозиновые рецепторы, компьютерное моделирование, молекулярная механика, расчеты *ab initio*.

* aderv@yahoo.com

ВВЕДЕНИЕ

Кофеин (К) – это одно из наиболее широко и регулярно употребляемых природных биологически активных соединений [1, 2], известное с древних времен. Свое название К получил от одного из главных источников происхождения – бобов кофе. Другие до сих пор применяемые названия К (теин, матеин, гуаранин) происходят от других его растительных источников (листья чая, трава мате, плоды гуараны). К влияет на процессы функционирования белков, включая рецепторы и ферменты, нуклеиновых кислот и мембран, он обладает множественным действием на живые системы, включая человеческий организм. Изучению разных аспектов этого действия посвящены тысячи исследований, выполненных на биологическом, биохимическом, физико-химическом, генетическом и медицинском уровнях. Однако до сих пор молекулярный механизм действия этого довольно простого соединения мало изучен. Основной эффект К – это стимуляция центральной и периферической нервных систем [3]; он входит во многие популярные напитки, такие как кофе, чай, какао, многие газированные напитки, а также содержится в некоторых лекарственных препаратах. Есть разные точки зрения на полезность потребления К, каждая из которых подтверждается медицинскими наблюдениями, от утверждений о «бесконечном разнообразии полезных эффектов для ума, тела и духа» [4] до предупреждений об опасности потребления К, который действует подобно классическим наркотикам [5].

Главной мишенью действия К в физиологически значимых концентрациях являются аденозиновые рецепторы (АР). Общепринято, что К является конкурентным антагонистом аденозина (Ado), взаимодействуя с рецепторами A1 и A2a (см., например, [6–8]). Ado – это важная биологическая молекула, компонент нуклеиновых кислот и коферментов. Межклеточный Ado играет важную физиологическую роль в активации рецепторов. Для понимания функционирования АР был синтезирован и изучен ряд антагонистов и агонистов Ado (см., например, [9, 10]). Все они, как и сам Ado, много более сложные, чем К, молекулы, обладающие большим числом центров сильного невалентного взаимодействия с белками и значительной конформационной подвижностью, что позволяет предположить для них больше возможностей образования комплексов с АР, чем для К. Поэтому первый вопрос о молекулярных механизмах действия К, на который мы пытаемся дать ответ, может быть сформулирован так: “Как довольно простая и практически жесткая молекула К, имеющая небольшой набор центров сильных невалентных взаимодействий с белками, может конкурировать с более сложной молекулой Ado, способной образовывать большее число Н-связей, и потенциально, казалось бы, более стабильные комплексы с АР?”

Четыре типа АР клеток млекопитающих были клонированы и охарактеризованы: А1, А2а, А2в и А3 [7, 11]. Рецептор А1 является наиболее распространенным в организмах человека и лабораторных животных, взаимодействие с ним наиболее существенно для физиологических эффектов К (см., например, [12, 13]). Поэтому взаимодействия с этим рецептором мы здесь в основном и обсуждаем. Все АР – белки с похожей первичной структурой, содержащие более 300 аминокислотных остатков. Это мембранные белки, относящиеся к семейству G-белоксопряженных рецепторов (GPCR). До недавнего времени о пространственной структуре этих рецепторов можно было судить лишь по молекулярным моделям, основанным на гомологии со структурой бычьего зрительного родопсина. АР содержат внеклеточные (ЕС), внутриклеточные (ІС) и трансмембранные (ТМ) домены. Семь ТМ доменов содержат около 20 аминокислотных остатков каждый и имеют α -спиральную конфигурацию. Именно эти домены играют важную роль во взаимодействии с Ado, его антагонистами и агонистами [10]. В 2008 году была опубликована пространственная структура комплекса рецептора человека А2а с антагонистом Ado [14] с разрешением 2.6 Å, в

целом подтверждающая предложенные ранее модели рецепторов. В этой структуре специфический для A2a типа AP антагонист ZM241385 довольно сложного строения, содержащий ароматические кольца, протон-донорные группы OH, NH и NH₂, а также 6 атомов-акцепторов Н-связи, встраивается в «карман», образованный несколькими ТМ доменами и третьим ЕС доменом [14]. Авторы отмечают, что карман данной структуры отличается от карманов других GPCR, которые могут принимать различные конформации и обладают заметной конформационной подвижностью.

Еще не зная этой работы, в качестве частичного ответа на поставленный выше вопрос мы попытались представить себе, как и какие вообще достаточно стабильные комплексы может образовывать К с ТМ доменами AP [15, 16]. Ввиду слишком сложной для квантово-механических расчетов структуры даже небольших участков AP, единственным расчетно-теоретическим методом исследования их комплексов с К остается метод молекулярной механики (ММ). Мы показали, используя два разных силовых поля ММ и две разные компьютерные программы, что стабильные комплексы К с фрагментами рецептора A1 человека возможны, и, взаимодействуя с AP, молекула К экранирует от взаимодействий с Ado не только те аминокислотные остатки, с которыми она образует Н-связи, но и ряд соседних [15, 16].

В 2011 году первая экспериментально полученная пространственная структура комплекса AP [14] была использована в работе [17] для поиска ответа на поставленный выше вопрос в отношении рецептора A2a. Проведя оценки свободной энергии методом молекулярной динамики с использованием нескольких начальных взаимных положений К и ZM241385 в кармане рецептора, авторы сделали заключение о том, что связывание специфического антагониста (ZM241385) с рецептором A2a только на 2.4 ккал/моль более выгодно, чем К, неспецифического антагониста. Эта величина, по мнению авторов работы [17], сравнительно близкая к экспериментальной (3.6 ккал/моль), соответствующей в 397 раз более частому связыванию ZM241385, чем К, дает для рецептора A2a ответ на поставленный выше вопрос. При этом существенный (0.9 ккал/моль) вклад в эту разность свободных энергий связывания вносит энтропийный член, то есть большее число возможных положений в кармане рецептора К, небольшой молекулы, чем более объемной молекулы ZM241385. Учитывая погрешности силового поля (AMBER) и большое количество слагаемых, вносящих вклад в конечную величину разности энергий, лучшего согласия трудно было бы ожидать, но важным является то заключение работы [17], что одним из источников «конкурентоспособности» К является энтропийный фактор.

В 2011 году были опубликованы новые работы, посвященные структуре комплексов рецептора A2a с лигандами, в том числе с Ado [18], с агонистом UK-432097 [19], имеющим еще более сложное молекулярное строение, чем ZM241385, и с К [20]. Пространственная структура кармана рецептора A2a зависит от того, с каким лигандом он закристаллизован. При этом молекула К образует только одну водородную связь с аминокислотным остатком кармана рецептора, а все другие лиганды – несколько водородных связей (ZM241385 – 3, Ado – 6, UK-432097 – 10). Учитывая эти данные и отмечаемую во многих работах конформационную подвижность рецептора A2a, как и других GPCR, мы предполагаем, что для конкуренции К с Ado важны не только (а, может быть, и не столько) относительные энергии взаимодействия в структурах закристаллизованных комплексов рецептора A2a, но и взаимодействия с другими конформациями, возможно, и с отдельными сегментами до образования подобных комплексов.

Структурных данных для рецептора A1 до сих пор нет. Предположить, что конфигурация кармана для него такая же (или почти такая же), как для рецептора A2a, нет оснований, и такое предположение не согласуется со специфичностью антагониста ZM241385 к рецептору A2a, но не A1. В этой работе мы рассматриваем возможности образования комплексов К и Ado с участками ТМ доменов рецептора A1, более

протяженными, чем в наших работах, опубликованных в 2010 году [15, 16]. Результаты расчетов показывают, что К может образовывать такие комплексы, не уступающие по энергии взаимодействия комплексам с Aдо.

Прежде чем излагать результаты наших расчетов, хотелось бы упомянуть еще одну работу, выполненную методом молекулярной динамики и использующую определенные в 2011 году пространственные структуры комплексов рецептора A2а. Ли и Лиман [21] сравнивают динамику Aдо и UK-432097. Большую эффективность UK-432097 по сравнению с Aдо авторы объясняют тем, что UK-432097 стабилизирует активную конформацию рецептора за счет образования стабильной сетки водородных связей, тогда как Aдо очень динамичен, то есть может занимать несколько положений. Этот вывод, который авторы делают на основании молекулярно-динамических траекторий, может быть качественно понят из рассмотрения структуры молекул лигандов и их комплексов с рецептором A2а. Агонист UK-432097, более объемная, чем Aдо, и способная образовать большее число водородных связей молекула, более плотно упаковывается в кармане рецептора A2а [19], тогда как Aдо образует меньшее число водородных связей с аминокислотными остатками кармана, но связан с ними также и через лабильные «водные мостики» и может занимать разные положения относительно рецептора [18]. Конкуренцию К с Aдо таким образом объяснить невозможно.

МЕТОДЫ

Рассматриваемые системы содержали участки полипептидной цепи трансмембранных фрагментов аденозинового рецептора человека A1 в α -спиральной конформации и один из лигандов (молекулу К или Aдо). Эти участки выбирались так, чтобы в них содержались аминокислотные остатки, с которыми могут образовываться Н-связи, в том числе остатки, важные для связывания рецепторов с аденозином и его антагонистами и агонистами, определенные направленным мутагенезом [10]. Аминокислотная последовательность этих участков и полных доменов, их содержащих, приведена в разделе, посвященном результатам. Оба конца выбранных пептидных участков блокировались метильными группами, чтобы исключить возникновение на этих концах зарядов или не участвующих в формировании α -спирали дополнительных гидрофильных центров. Начальные взаимные положения взаимодействующих молекул выбирались с помощью молекулярной графики так, чтобы положение и ориентация лиганда и конформации аминокислотных остатков допускали образование межмолекулярных Н-связей. Начальная геометрия молекулы К была такой же, как в наших предыдущих работах [15, 16], и почти не изменялась при взаимодействии с фрагментами AP. Начальная геометрия молекулы Aдо соответствовала одному из её наиболее глубоких минимумов энергии внутримолекулярных взаимодействий.

Расчеты и поиск минимумов энергии проводились методом молекулярной механики (ММ) с помощью программы AMBER9 с параметрами parm-94 и зарядами BCC [22]. При этом остов полипептидной цепи удерживался в α -спиральной конформации. Минимумы для отдельной молекулы аденозина и некоторые минимумы энергии взаимодействия с фрагментами рецепторов были воспроизведены с использованием зарядов RESP (численные результаты расчетов с зарядами RESP здесь не приводятся). Абсолютные величины энергии, рассчитанные с двумя наборами зарядов силового поля AMBER, могли существенно различаться между собой, но геометрические параметры систем и относительные значения энергии в разных минимумах отличались при этом, как правило, незначительно. Приводимые в работе численные значения энергии и геометрических параметров получены при диэлектрической постоянной (ϵ), равной 1; использование при расчетах $\epsilon = 2$ или 3 сдвигает значения энергии, сохраняя их относительные значения, и практически не влияет на геометрические характеристики. Существенные качественные изменения начинаются только при значениях $\epsilon = 4$ и

более, которые не соответствуют условиям мембраны. Для подтверждения существования найденных методом ММ наиболее глубоких минимумов, для молекулы Адо были проведены квантовомеханические (КМ) расчеты *ab initio* в приближении MP2/6-32G(d,p) и MP2/aug-cc-pVDZ по программе GAUSSIAN 09 [23]. Эти два приближения отличаются используемым набором базисных волновых функций и, следовательно, временем счета и требуемыми компьютерными ресурсами. Первое из них в настоящее время широко используется для расчетов внутри- и межмолекулярных взаимодействий компонентов биополимеров, и правильно воспроизводит их характеристики. Во втором методе используется более широкий набор базисных функций, требуются большие компьютерные ресурсы, удастся получить более точные характеристики. Для подтверждения того, что найденные структуры соответствуют истинным минимумам, были рассчитаны матрицы вторых производных энергии, все элементы которых оказались положительными.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярное строение и возможные типы невалентных взаимодействий кофеина и аденозина

Молекула кофеина (рис. 1,а) имеет сравнительно простое химическое строение. Это 1,3,7-триметилксантин, то есть 1,3,7-триметил-2,6-диоксопурин, – практически жесткая молекула, имеющая три протон-акцепторных центра (O2, O6 и N9) и не имеющая протон-донорных центров. Все атомы молекулы К, кроме водородов метильных групп, лежат в одной плоскости. Возможности комплексообразования К с белками ограничены образованием водородных связей с аминокислотными остатками, содержащими протон-донорные центры (Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, His и Trp) и стекинг-взаимодействиями с ароматическими кольцами. Возможности взаимодействия с фрагментом N–H пептидной группы мы не упоминаем, поскольку трансмембранные фрагменты аденозиновых рецепторов имеют конформацию α -спирали, в которой пептидные группы образуют между собой N–H...O водородные связи.

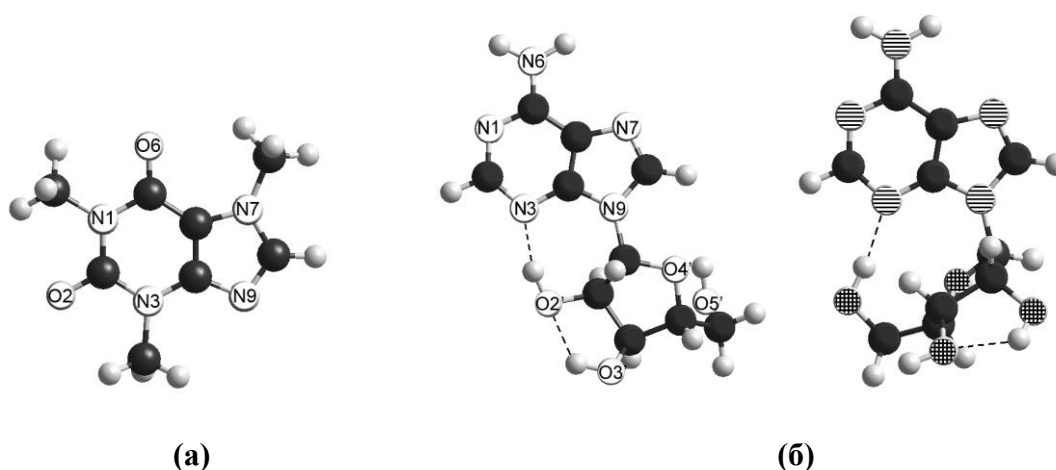


Рис. 1. Молекулярная структура и нумерация атомов азота и кислорода кофеина (а) и аденозина (б). Черными сферами обозначены атомы углерода, серыми – водорода. На правом рисунке аденозина сферы с горизонтальной штриховкой обозначают атомы азота, с шашечной штриховкой – кислорода. Пунктирные линии обозначают водородные связи. Приведены конформации аденозина, соответствующие наиболее глубоким минимумам энергии с анти- (слева) и син- (справа) ориентацией рибозы относительно основания.

Аденозин – это нуклеозид, имеющий три протон-акцепторных (N1, N3 и N7) и протон-донорную (NH₂) группы основания, акцепторную группу O4' сахарного кольца и три группы O–H рибозы, каждая из которых может быть донором и акцептором Н-связи (рис. 1,б). Молекула Ado имеет широкие конформационные возможности, связанные с вращением вокруг гликозидной связи (для пуриновых нуклеозидов возможны как *анти*-, так и *син*-конформации), гибкостью кольца рибозы (в кристаллах мономеров обнаружены как C3'-*эндо*, так и C2'-*эндо* упаковки кольца), и вращением вокруг связей C2'–O2', C3'–O3', C4'–C5' и C5'–O5'. В кристалле аденозина, как показали нейтронографические исследования [24], все гидрофильные центры каждой молекулы Ado, кроме O4', связаны Н-связями с гидрофильными центрами одной из окружающих молекул. При этом упаковка рибозного кольца соответствует C3'-*эндо* области, а взаимная ориентация основания и рибозы – *анти*-конформации. В литературе имеются также кристаллографические данные о двух разных структурах моногидрата аденозин-5'-монофосфата. Обе структуры соответствуют *анти*-конформации нуклеозида, но в одной из них рибозное кольцо имеет C3'-*эндо* упаковку [25], а в другой – C2'-*эндо* [26]. Структура нуклеозидной части 5'-АМР в этом кристалле и полученная нейтронографически структура аденозина были использованы нами для построения начальных конфигураций молекулы Ado при поиске ее минимумов энергии. При этом использовалось несколько стартовых точек, отвечающих разным углам вращения вокруг гликозидной связи и разным наборам торсионных углов, ответственных за вращение вокруг связей C2'–O2', C3'–O3', C4'–C5' и C5'–O5'. Эти наборы включали конфигурации как с Н-связями, так и без них. Не ставя задачи нахождения всех локальных минимумов энергии внутримолекулярных взаимодействий Ado, мы нашли несколько минимумов, отвечающих образованию двух Н-связей, которые имели энергию на 8–10 ккал/мол более низкую, чем в минимумах с одной Н-связью. Конформация молекулы в кристалле Ado и конформации нуклеозидных частей 5'-АМР не имеют внутримолекулярных Н-связей и довольно далеки от конфигураций, отвечающих локальным минимумам энергии внутримолекулярных взаимодействий. Они формируются под действием межмолекулярных взаимодействий, в том числе (и в первую очередь) благодаря образованию сетки Н-связей. Три наиболее глубоких из локальных минимумов энергии были использованы нами в качестве начальных структур для квантовомеханических расчетов *ab initio* в приближении MP2/6-32G(d,p), а найденные в этом приближении структуры затем оптимизировались на уровне MP2/aug-cc-pVDZ.

В табл. 1 приведены геометрические характеристики этих локальных минимумов, найденные методом ММ (эти конформации использовались затем в качестве исходных структур для поиска возможных комплексов Ado с участками пептидной цепи AP) и КМ методами, соответствующими двум уровням теории *ab initio*, упомянутым выше. Значения энергии внутримолекулярных взаимодействий этих трех структур, рассчитанные методом ММ, довольно близки между собой и составляют –150.5, –150.0 и –150.3 ккал/мол (на рис. 1,б представлены первые две из этих структур). Мы провели несколько пробных счетов комплексов, используя в качестве стартовой другие конформации Ado, отвечающие менее глубоким локальным минимумам с одной Н-связью, для проверки предположения, что межмолекулярные взаимодействия в таких минимумах могут быть намного сильнее, чем в минимумах с Ado с двумя Н-связями. Но таких структур получить не удалось; не удалось построить начальных конфигураций с большим количеством межмолекулярных Н-связей, чем в структурах, найденных с начальными конформациями Ado, приведенными в табл. 1. Поэтому другие локальные минимумы отдельной молекулы Ado и полученные с их использованием комплексы мы здесь не рассматриваем.

Таблица 1. Геометрические характеристики трех наиболее глубоких минимумов энергии внутримолекулярных взаимодействий аденозина, рассчитанные методом ММ с использованием силового поля AMBER с зарядами ВСС (строки ВСС) и КМ методом *ab initio* в приближении MP2/6-32G(d,p) (строки КМ1) и MP2/aug-cc-pVDZ (строки КМ2). Конформация рибозного кольца описана в терминах концепции псевдовращения P (угол) и v_{\max} (амплитуда псевдовращения). Эти величины и гликозидный торсионный угол выражены в градусах, длины Н-связей в рибозе (R–R) и между основанием и рибозой (B–R) приведены в Å

Конформация		1 (син)	2 (анти)	3 (син)
P	ВСС	29.5	133.1	156.4
	КМ1	30.2	161.7	162.0
	КМ2	29.1	173.0	163.0
v_{\max}	ВСС	35.0	38.8	34.6
	КМ1	38.6	37.6	39.1
	КМ2	37.4	34.7	38.2
χ	ВСС	41.5	172.3	53.0
	КМ1	47.3	162.5	55.8
	КМ2	50.3	162.1	58.1
Н-связи R–R	ВСС	1.98	1.93	2.01
	КМ1	2.08	2.05	2.11
	КМ2	2.14	2.11	2.19
Н-связи B–R	ВСС	1.88	1.76	1.83
	КМ1	1.97	1.90	1.90
	КМ2	1.92	1.91	1.86

Одна из наиболее низкоэнергетических конформаций (2 в табл. 1) соответствует *анти*-ориентации рибозы относительно основания и C2'-эндо упаковке рибозного кольца, а две других – *син*-ориентации. Рибозное кольцо первой из них (1 в табл. 1) имеет C3'-эндо, а другой (3 в табл. 1) — C2'-эндо упаковку. Эти две структуры имеют также разные Н-связи в рибозе: O2'–Н...O3' в конформации 1 и O3'–Н...O2' в конформации 3, но очень близкие энергии внутримолекулярных взаимодействий. Результаты табл. 1 показывают, что геометрические характеристики, найденные двумя КМ методами, несколько отличаются между собой и от найденных методом ММ, но остаются в пределах тех же областей торсионных углов и упаковки кольца рибозы. Отличаются и относительные энергии разных конформаций и длины Н-связей, но в целом каждой конформации, найденной ММ методом, соответствует довольно близкая конформация, полученная КМ методом. Проведение достаточно строгих КМ-расчетов рассматриваемых в этой работе комплексов не представляется сейчас возможным, поэтому мы не обсуждаем здесь эти небольшие различия конформаций отдельной молекулы Ado. Отметим только, что КМ-расчеты позволили показать близость геометрических характеристик наиболее выгодных конформаций Ado, полученных ММ- и КМ-методами. Эти конформации имеют две внутримолекулярные Н-связи: одна из них образуется в рибозе между группами O2'–Н и O3'–Н, а другая — между N3 аденина и O2'–Н рибозы (в *анти*-конформации нуклеозида) или O5'–Н (для *син*-конформации).

Выбор участков аденозиновых рецепторов для поиска возможных комплексов с кофеином и аденозином

Наиболее важными для связывания с Ado (и его агонистами и антагонистами) участками AP являются их трансмембранные фрагменты (ТМ), имеющие α -спиральную конформацию. Наши прежние расчеты [15, 16] показали, что, как и

следовало ожидать, наиболее глубокие минимумы энергии комплексов К с участками ТМ соответствуют образованию не менее двух Н-связей с соседними или расположенными не более через два других аминокислотными остатками. Например, для седьмого ТМ фрагмента – с Thr²⁷⁷, His²⁷⁸ и Asn²⁸⁰ или с His²⁷⁸ и Ser²⁸¹. Некоторый вклад в формирование таких минимумов могут вносить и стекинг-взаимодействия с ароматическими аминокислотами, но межмолекулярные взаимодействия в минимумах с одной Н-связью существенно менее энергетически выгодны, чем в минимумах с двумя или тремя Н-связями [15, 16]. Имея в виду возможность образования ТМ бóльшего числа Н-связей с Aдо, чем с К, для сравнения стабильности комплексов необходимо было выбрать участки, содержащие не менее четырех гидрофильных аминокислот. Каждая пара этих аминокислот может быть разделена не более чем двумя неполярными остатками. Анализ первичной структуры ТМ фрагментов AP A1 [15] показал, что большая часть аминокислотных остатков этих фрагментов – алифатические гидрофобные, не способные к образованию Н-связей. Только два ТМ фрагмента, третий и седьмой, содержат участки, удовлетворяющие такому требованию. (Шестой ТМ фрагмент, с аспарагином которого рецептор A2a образует водородную связь в кристалле комплекса, условию не удовлетворяет.)

Третий ТМ фрагмент имеет аминокислотную последовательность

Cys-Pro-Val-Leu-Ile-Leu-Thr-Gln-Ser-Ser-Ile-Leu-Ala-Leu-Leu-Ala-Ile-Ala

и седьмой ТМ – последовательность

Tyr-Ile-Ala-Ile-Phe-Leu-Thr-His-Gly-Asn-Ser-Ala-Met-Asn-Pro-Ile-Val-Tyr.

В этих последовательностях подчеркнуты участки, для которых проводились расчеты и минимизация энергии с К и Aдо, и в этих участках выделены аминокислотные остатки, способные образовывать Н-связи. Оба участка содержат остаток с амидной группой (глутамин в третьем фрагменте и аспарагин в седьмом), которая может образовать две Н-связи с аденином, так что можно было бы предположить наличие глубоких минимумов с Aдо.

Комплексообразование кофеина и аденозина с участком третьего трансмембранного фрагмента

Поиск минимумов энергии систем, содержащих К или Aдо с пептидным участком, выявил по несколько локальных минимумов с двумя Н-связями для К и двумя или тремя Н-связями для Aдо как в *син-*, так и в *анти-*конфигурации. Положение гидрофильных центров аминокислотных остатков этого фрагмента (как и седьмого фрагмента) не позволяет образоваться большему числу Н-связей с Aдо в наиболее выгодных конфигурациях. Поскольку конфигурации Aдо без Н-связи между рибозой и основанием энергетически менее выгодны на 10 и более ккал/мол, образование комплексов Aдо в таких конфигурациях оказывается менее выгодным, чем с наиболее выгодными конфигурациями Aдо. Эти наиболее выгодные конфигурации Aдо почти не изменяются при комплексообразовании с участком третьего фрагмента. В частности, незначительно изменяется упаковка кольца рибозы (угол Р и амплитуда v_{\max} псевдовращения Р изменяются менее, чем на градус, а гликозидный торсионный угол – до 2 градусов).

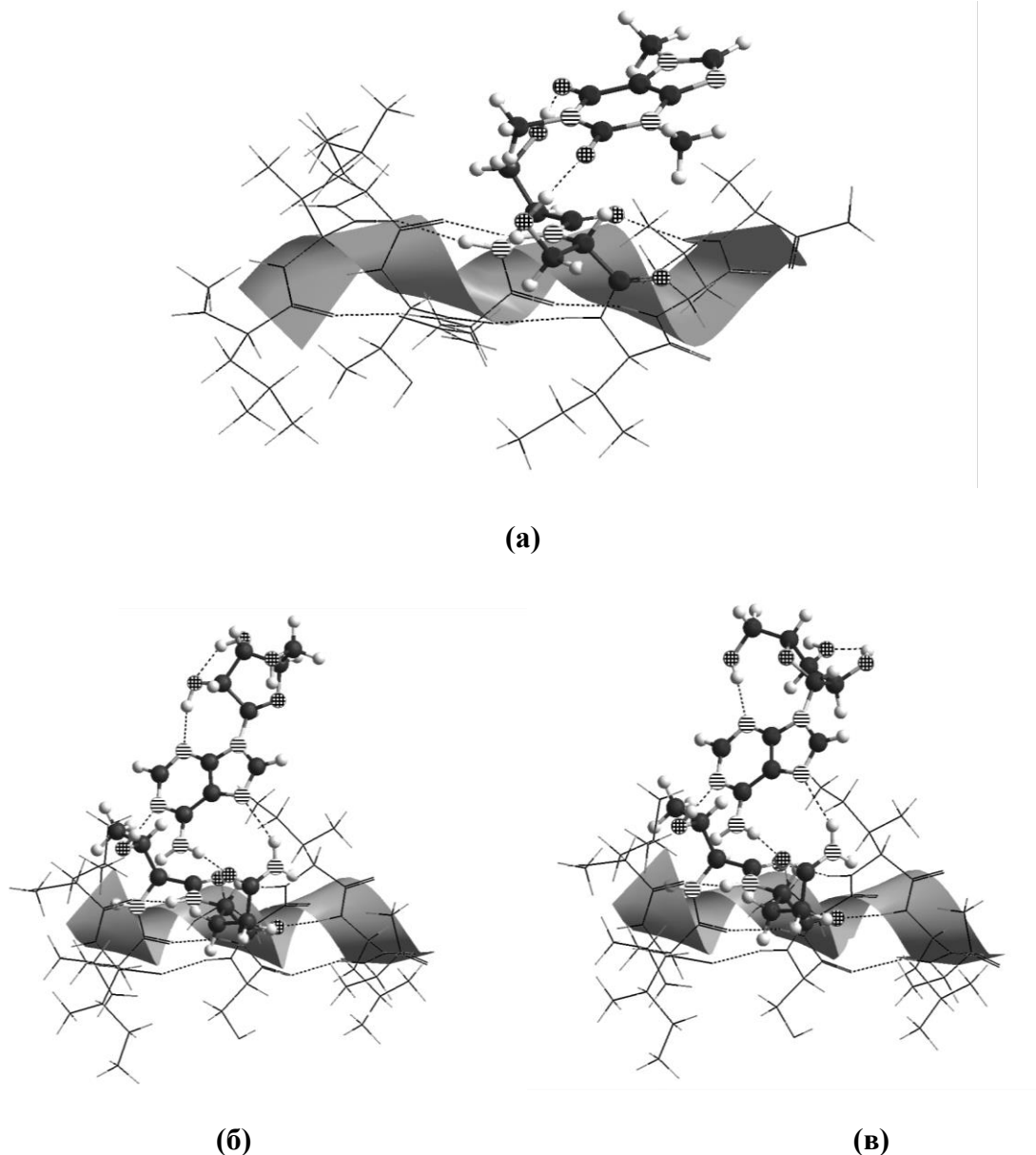


Рис. 2. Конформации возможных комплексов участка третьего трансмембранного фрагмента рецептора A1 с кофеином (а) и аденозином в *анти*- (б) и *син*- (в) ориентации. Рисунки выполнены с использованием программы HyperChem. Молекулы лигандов и взаимодействующие с ними аминокислотные радикалы представлены в виде шаро-стержневых моделей. Обозначены Н-связи лигандов с аминокислотными остатками и внутри нуклеозида, перечисленные в табл. 2. В остальных частях пептидного фрагмента обозначены только химические связи и Н-связи между пептидными группами в α -спирали.

Молекулярные модели энергетически наиболее выгодных комплексов К и Ado с участком третьего трансмембранного фрагмента приведены на рис. 2, а их количественные характеристики – в табл. 2. В обоих этих комплексах Ado образует все три Н-связи гидрофильными группами основания, то есть две Н-связи с амидной группой глутамина (N6–N62...О и N7...Н–N) и третью Н-связь, через N1 Ado, с группой О–Н треонина. К образует Н-связи с группами О–Н двух сериновых остатков. Другие минимумы для комплексов с Ado и К энергетически менее выгодны. Расчеты показали, что значения энергии межмолекулярных взаимодействий К и Ado с этим участком довольно близки. Различие, равное 1.6 ккал/мол (табл. 2), можно считать небольшим, учитывая точность ММ расчетов и приблизительность модели.

Таблица 2. Наиболее глубокие минимумы энергии взаимодействия участка третьего трансмембранного фрагмента AP A1 с кофеином, К, и аденозином в *син*- (Ado *син*) и *анти*- (Ado *анти*) конфигурациях. Приведены значения энергии E (ккал/мол) и длины Н-связей (Å) аминокислотных остатков с гидрофильными центрами лигандов

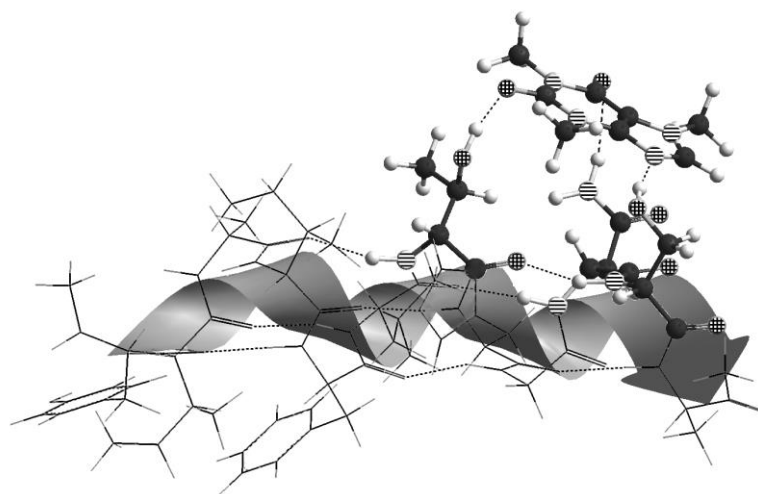
	Ado <i>син</i>	Ado <i>анти</i>	К
Е	-32.6	-31.3	-31.0
1 Н-связь	NH2 – Gln 1.81	NH2 – Gln 1.79	O6 - Ser1 1.63
2 Н-связь	N7 – Gln 2.24	N7 – Gln 2.25	O2 - Ser2 1.72
3 Н-связь	N1 – Thr 1.77	N1 – Thr 1.77	

Комплексообразование кофеина и аденозина с участком седьмого трансмембранного фрагмента

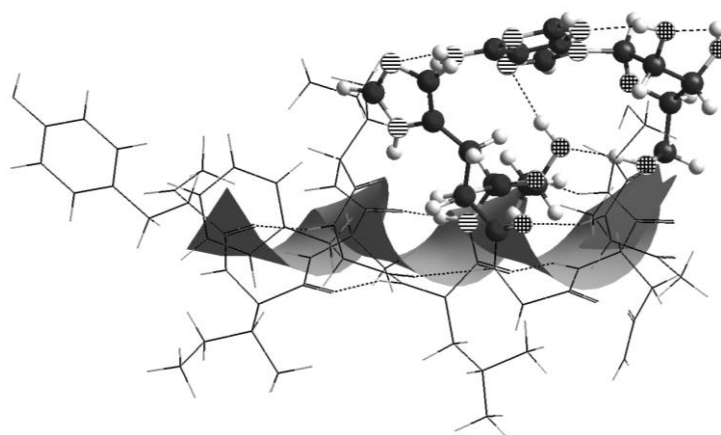
Для этого участка наиболее глубокие минимумы энергии взаимодействия с Ado в *син*-конфигурации энергетически заметно выгоднее, чем наиболее глубокий минимум, соответствующий *анти*-конфигурации. В табл. 3 и на рис. 3 мы приводим по одному самому глубокому минимуму для каждой из конфигураций Ado. В этих комплексах два гидрофильных центра Ado (N7 и амино-группа) образуют две Н-связи с пептидом, а третья Н-связь образуется группами О–Н рибозы. Более низкоэнергетического минимума с Ado в *анти*-конфигурации нам найти не удалось. Приведенный здесь минимум отличается от многих других тем, что конфигурация Ado при комплексообразовании изменяется по сравнению с наиболее низкоэнергетической *анти*-конфигурацией отдельной молекулы Ado, как упаковкой рибозы, так и гликозидным торсионным углом (более 20 для ρ и χ). В образовании наиболее низкоэнергетического комплекса К с этим пептидом участвуют все три протон-акцепторных центра К. Как и для третьего трансмембранного фрагмента, различия в энергии наиболее низкоэнергетических конформаций комплексов с Ado и К небольшие, менее 1 ккал/мол (табл. 3), что позволяет качественно объяснить возможность конкуренции К с Ado за места связывания с рецептором.

Таблица 3. Наиболее глубокие минимумы энергии взаимодействия участка седьмого трансмембранного фрагмента AP A1 с кофеином и аденозином. Обозначения те же, как в табл. 2

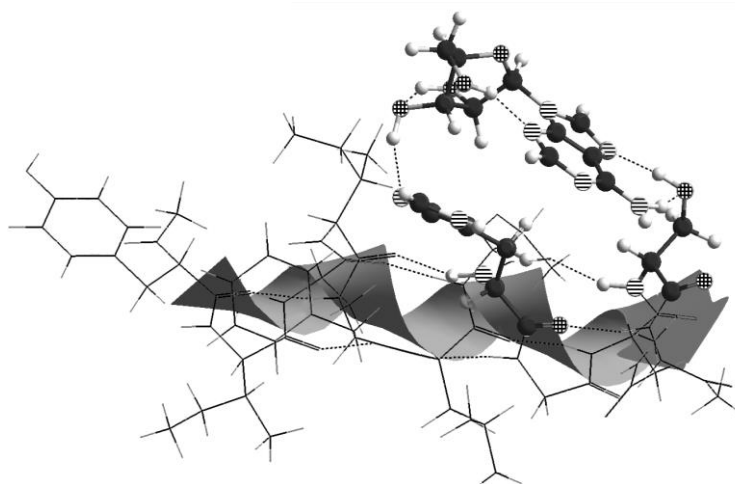
	Ado <i>син</i>	Ado <i>анти</i>	К
Е	-35.6	-28.0	-34.8
1 Н-связь	N7 – Ser 1.75	N7 – Thr 2.17	O2 – Thr 1.69
2 Н-связь	NH2 – Ser 1.97	NH2 – His 2.27	O6 – Asn 2.35
3 Н-связь	O3'Н – His 1.89	O5'Н – Thr 1.76	N9 – Ser 1.80



(a)



(б)



(в)

Рис. 3. Конформации возможных комплексов участка седьмого трансмембранного фрагмента рецептора A1 с кофеином (а) и аденозином в анти- (б) и син- (в) ориентации. Обозначения те же, что на рис. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование взаимодействия кофеина и аденозина с участками трансмембранных фрагментов рецептора A1 методом молекулярной механики показало, что в комплексах, соответствующих минимумам энергии, образуется не более трех водородных связей с каждой из молекул. При этом разница в значениях энергии в наиболее глубоких минимумах энергии взаимодействия К с A1 и Ado с A1 не превышает 5%. То, что эта разница так мала, объясняется тем, что в наиболее выгодных конформациях молекулы Ado формируются две внутренние водородные связи, которые, во-первых, ограничивают внутреннюю подвижность молекулы, а во-вторых, блокируют активные центры, задействованные в этих связях, от взаимодействия с рецептором. Похожие энергии комплексов К:A1 и Ado:A1 качественно объясняют возможность конкуренции К с Ado за места связывания с рецептором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brice C.F., Smith A.P. *Int J. Food Sci. Nutr.* 2002. V. 53. P. 55–64.
2. Frary C.D., Johnson R.K., Wang M.Q. *J. Am. Diet. Assoc.* 2005. V. 105. P. 110–113.
3. Brauer L.H., Buican B., De Wit H. *Behav. Pharmacol.* 2002. V. 5. P. 111–118.
4. Weinberg B.A., Bealer B.K. *The Caffeine Advantage: How to Sharpen Your Mind, Improve Your Physical Performance, and Achieve Your Goals - the Healthy Way.* New York: The Free Press, 2002. P. 256.
5. Ogawa N., Ueki H. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 2007. V. 61. P. 263–268.
6. Nurminen M.L., Niittynen L., Korpela R., Vapaatalo H. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1999. V. 53. P. 831–839.
7. Fredholm B., Battig K., Holmen J., Nehlig A., Zvartau E. *Pharmacol. Rev.* 1999. V. 51. P. 83–133.
8. Fisone G.G., Borgkvist A., Usiello A. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. P. 857–872.
9. Linden J. *FASEB J.* 1991. V. 5. P. 2668–2676.
10. Rivkees S.A., Barbhuiya H., IJzerman A.P. *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 3617–3621.
11. Fredholm B.B., IJzerman A.P., Jacobson K.A., Klotz K.N., Linden J. *Pharmacol. Rev.* 2001. V. 53. P. 527–552.
12. Elmenhorst D., Meyer P.T., Matusch A., Winz O.H., Bauer A. *J. Nucl. Med.* 2012. V. 53. P. 1723–1729.
13. Buscariollo D.L., Breuer G.A., Wendler C.C., Rivkees S.A. *PLOS ONE* 2012. V. 6. doi: 10.1371/journal.pone.0028296
14. Jaakola V.-P., Griffith M.T., Hanson M.A., Cherezov V., Chien E.Y.T., Lane J.R., IJzerman A.P., Stevens R.C. *Science.* 2008. V. 322. P. 1211–1217.
15. Poltev V., Rodríguez E., Grokhлина T., Deriabina A., Gonzalez E. *Int. J. Quant. Chem.* 2010. V. 110. P. 681–688.
16. Poltev V.I., Rodríguez E., Grokhлина T., Teplukhin A., Deriabina A., Gonzalez E. *Proceedings of the International Conference on Applied Computer Science.* Malta, 2010. P. 51–55.
17. Liu Y., Burger S.K., Ayers P.W., Esteban Vöhringer-Martinez E. *J. Phys. Chem. B* 2011. V. 115. P. 13880–13890.
18. Lebon G., Warne T., Patricia C. Edwards P.C., Kirstie Bennett K., Langmead C.J., Leslie A.G.W., Tate C.G. *Nature.* 2011. V. 474. P. 521–525.
19. Xu F., Wu H., Katritch V., Han G.W., Jacobson K.A., Gao Z-G., Cherezov V., Stevens R.C. *Science.* 2011. V. 332. P. 322–327.
20. Doré A.S., Robertson N., Errey J.C., Ng I., Hollenstein K., Tehan B., Hurrell E., Bennett K., Congreve M., Magnani F., Tate C.G., Weir M., Marshall F.H. *Structure* 2011. V. 19. P. 1283–1293.
21. Lee J.Y., Lyman E. *Bioph. J.* 2012. V. 102. P. 2114–2120.

22. Cornell W.D., Cieplak P., Gould C.I., Merz K.M. Jr., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 5179–5197.
23. *Gaussian 09, Revision D.01*. 2013. http://www.gaussian.com/g_tech/rel_notes.pdf (дата обращения: 25.09.2014).
24. Klooster W.T, Ruble J.R., Craven B.M., McMullan R.K. *Acta Cryst.* 1991. V. B47. P. 376–383.
25. Kraut J., Jensen L.H. *Acta Cryst.* 1963. V. 16. P. 79–88.
26. Neidle S., Kuhlbrandt W., Achari A. *Acta Cryst.* 1976. V. B32. P. 1850–1855.

Материал поступил в редакцию 06.08.2014, опубликован 11.11.2014.