

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ФЛАВОНОИДОВ С АДЕНОЗИНОВЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ

Г.Ф. Куракин

студент, лечебный факультет, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России
E-mail: phyzyk@mail.ru

Н.П. Лопина

к.х.н., доцент, кафедра химии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России

Г.Е. Бордина

к.б.н., доцент, кафедра химии, ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России

Разработана рецептор-обоснованная модель связывания флавоноидов с аденозиновыми рецепторами. Показано, что в полученной модели связывание флавоноидов с аденозиновыми рецепторами аналогично связыванию ксантиновых антагонистов. Селективность флавоноидов к определённым подтипам рецепторов предположительно объясняется формой гидрофобных карманов. Полученная модель может быть использована для дизайна новых антагонистов аденозиновых рецепторов и как отправная точка при моделировании связывания с данными рецепторами других веществ растительного происхождения.

Ключевые слова: флавоноиды, аденозиновые рецепторы, компьютерное моделирование, рецептор-обоснованная модель.

Для цитирования: Куракин Г.Ф., Лопина Н.П., Бордина Г.Е. Компьютерное моделирование взаимодействия флавоноидов с аденозиновыми рецепторами. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(1):42–47. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-01-06>

Флавоноиды – обширная группа полифенолов, повсеместно встречающихся в организме растений. Они привлекают внимание исследователей как антиоксиданты, потенциальные противовоспалительные средства [1, 2], средства для лечения нейродегенеративных заболеваний [1]. Помимо этого, флавоноиды – многообещающие противоопухолевые соединения [3]. Такое множество активностей делает флавоноиды привлекательными соединениями для разработки новых лекарственных средств.

Среди прочих мишеней действия флавоноидов пристальному изучению подвергаются аденозиновые рецепторы. В экспериментах флавоноиды оказывают на данные рецепторы антагонистическое действие [4–7]. В свою очередь, антагонисты аденозиновых рецепторов – вероятные кандидаты на создание новых лекарственных средств для лечения брадиаритмий, бронхиальной астмы, глаукомы, болезни Паркинсона [8], деменции и иных когнитивных дефицитов [9]. Антагонисты рецептора A₃ могут обладать церебропротективным [4] и противоопухолевым эффектом [10].

Для эффективной разработки на основе флавоноидов новых лекарственных средств, действующих на аденозиновые рецепторы, необходима

компьютерная модель взаимодействия флавоноидов с аденозиновыми рецепторами. Однако рецептор-обоснованные модели такого взаимодействия на сегодняшний день отсутствуют, существуют только лиганд-обоснованные модели CoMFA [4, 5]. Изучение взаимодействия флавоноидов с аденозиновыми рецепторами на рецептор-обоснованных моделях может предоставить дополнительную информацию, которую можно использовать при дизайне новых лекарственных препаратов, а кроме того, ценную информацию, касающуюся общих моментов взаимодействия нексантиновых соединений растительного происхождения с аденозиновыми рецепторами.

Цель исследования – разработать рецептор-обоснованные модели связывания флавоноидов с аденозиновыми рецепторами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследовании изучены флавоноиды, структурные формулы которых представлены на рис. 1. Использовались доступные в банке данных PDB (<https://www.rcsb.org/>) [11] структуры аденозиновых рецепторов A₁ (PDB ID: 6d9h [12]) и A_{2A} (PDB ID: 2ydo [13]). Пробелы в них, неприемлемые для гибкого докинга, заполнялись с помощью сервиса

GapRepairer (<https://gaprepairer.cent.uw.edu.pl/cgi-bin/repair>) [14]. Структуры соединений-лигандов были загружены из баз данных PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) [15] и ZINC (<http://zinc.docking.org/>) [16] (рис. 1). Лиганды для моделирования выбраны из числа упомянутых в [4, 6, 7, 17], а именно из числа соединений, подробно описанных в контексте аффинности и селективности и использованных для создания моделей CoMFA.

База данных GuideToPharmacology (<http://www.guidetopharmacology.org/>) [17] использовалась для

получения информации об экспериментально определённых аффинностях.

Аденозиновый рецептор A₃ был отмоделирован по гомологии с помощью сервиса SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>) [18, 19] с использованием структуры рецептора A_{2A} (PDB ID: 2ydo [13]) в качестве шаблона и полученной из базы UniProt (<https://www.uniprot.org/>) [20] последовательности AA3R_HUMAN [21] в качестве моделируемого белка. Выбор шаблона осуществлялся согласно [10], где рецептор A_{2A} идентифицирован как лучший шаблон для моделирования рецептора A₃.

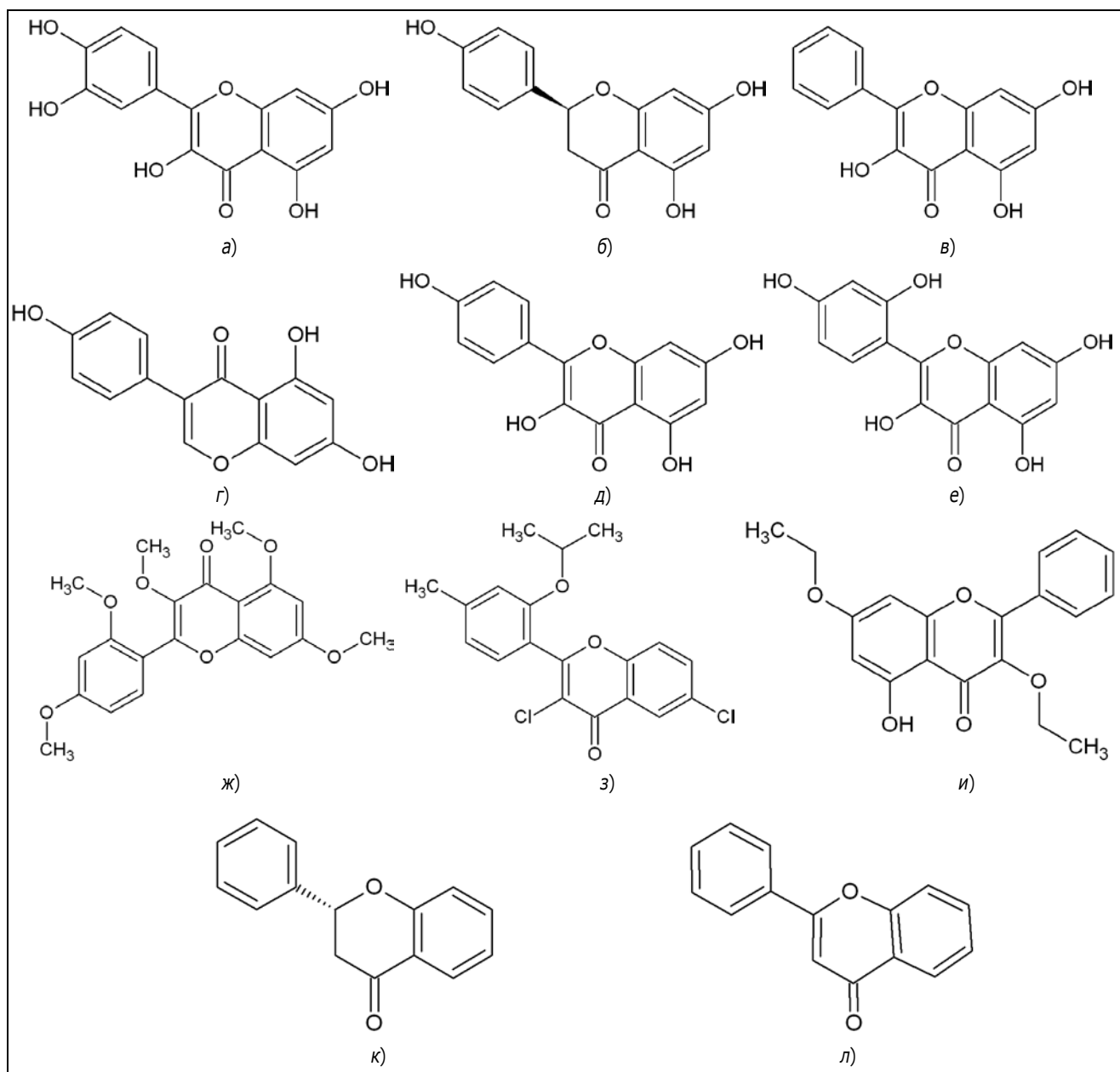


Рис. 1. Структурные формулы флавоноидов: а – кверцетин; б – нарингенин; в – галангин; г – генистеин; д – кемпферол; е – морин; ж – пентаметилморин; з – MRS1067; и – MRS1093; к – флаванон; л – флаванон

Гибкий докинг проводился с использованием сервера Galaxy7TM (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=7TM>), предназначенного для гибкого докинга лигандов в рецепторы семейства GPCR [22]. Выполнялся прицельный докинг в ортостерический связывающий участок, который задавался по номерам аминокислотных остатков.

Дополнительно к данным Galaxy7TM, взаимодействия «лиганд-рецептор» выборочно анализировались онлайн-сервисом PoseView [23, 24] в составе портала ProteinsPlus (<https://proteins.plus/>). Также для некоторых флавоноидов рассчитывалась энергия связывания с помощью сервера K_{DEEP} (<http://playmolecule.org/Kdeep/>), построенного на основе нейронной сети [25].

Данные консервативности аминокислотных остатков аденозиновых рецепторов получены с помощью сервера ConSurf (<http://consurf.tau.ac.il/2016/>) [26] с использованием последовательностей UniProt [20].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Практически каждый исследованный флавоноид в результате докинга имел конформацию, аналогичную представленной на рис. 2.

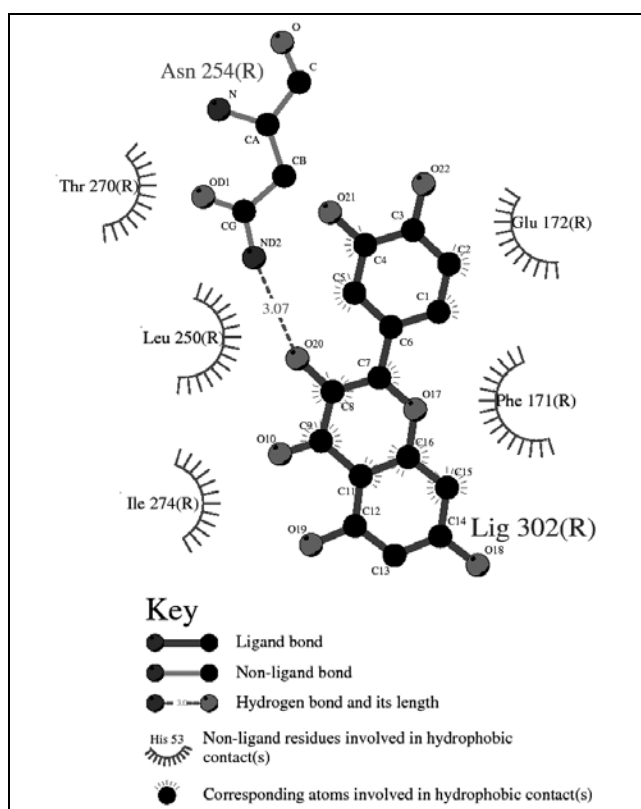


Рис. 2. Результат докинга кверцетина в рецептор A₁ (изображение получено с помощью Galaxy7TM [22])

В такой конформации молекула флавоноида (через одну из гидроксильных групп) образует водородную связь с остатком аспарагина (Asn254 в A₁, Asn253 в A_{2A}, Asn250 в A₃) и гидрофобный контакт с остатком фенилаланина (Phe171 в A₁, Phe168 в A_{2A}, Phe168 в A₃). Повторный анализ взаимодействий с помощью сервиса PoseView [23, 24] показал, что в данных конформациях всегда присутствует также π-π-взаимодействие лиганда с остатком фенилаланина (Phe171 в A₁, Phe168 в A_{2A}, Phe168 в A₃) (рис. 3).

В указанных конформациях присутствовали также гидрофобные контакты с консервативными для аденозиновых рецепторов (данные ConSurf [26]) аминокислотными остатками: изолейцином (Ile274 в A₁ и A_{2A}, Ile268 в A₃) и лейцином (Leu250 в A₁, Leu249 в A_{2A}, Leu246 в A₃) (рис. 2).

Аналогичные взаимодействия опосредуют связывание хорошо изученных на сегодняшний день антагонистов ксантиновой структуры (PDB ID: 3REY [27], 3RFM [27], 3EML [28]). Поэтому описанный способ связывания мог бы объяснить антагонистическую активность флавоноидов. В дальнейшем с целью сокращения он будет называться *рабочей конформацией*.

В рабочих конформациях спорадически встречались водородные связи с иными аминокислотными остатками, кроме остатка аспарагина (Asn254 в A₁, Asn253 в A_{2A}, Asn250 в A₃) (рис. 3), присутствие которых в значительной степени зависело от используемого для анализа сервиса (GalaxyWEB или PoseView). Исключить их наличие при реальном связывании невозможно, однако

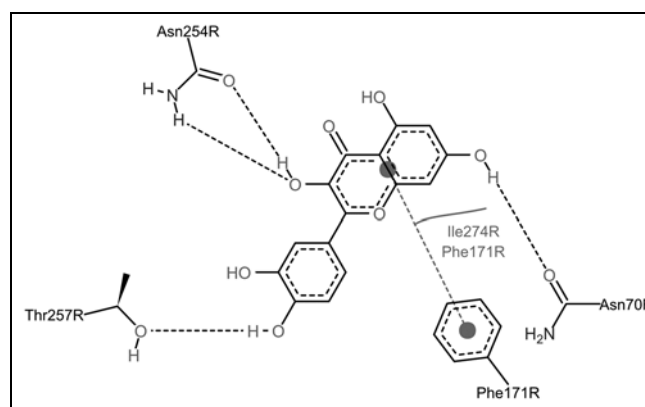


Рис. 3. Та же структура, что на рис. 2. Взаимодействия пересчитаны сервисом PoseView. Здесь и далее: пунктир – водородные связи; пунктир с жирными точками на концах – π-электронное взаимодействие; сплошная кривая – гидрофобное взаимодействие (изображение получено с помощью PoseView [23, 24])

они не представляются критически значимыми. Рабочие конформации не всегда занимали энергетически наиболее выгодное положение. Но их ранг в списке результатов докинга соотносился с известными из литературы экспериментальными данными по селективности флавоноидов к аденозиновым рецепторам: чем меньше ранг (ближе к первому месту), тем выше селективность к данному рецептору. С теми же данными согласовывались результаты пересчёта энергии связывания с помощью онлайн-приложения K_{DEEP} . Прежде всего, это имело место для высокоселективных синтетических флавоноидов. Для высокоселективного по отношению к рецептору A_3 [4] лиганда MRS1067 ранг рабочей конформации в результатах докинга и рассчитанные в K_{DEEP} энергии связывания позволили правильно распределить подтипы рецептора по аффинности к данному лиганду: $A_3 > A_1$. Для селективного по отношению к A_{2A} [7, 17] соединения MRS1093 правильное ранжирование достигнуто при комбинации данных Galaxu7TM и K_{DEEP} : $A_{2A} > A_3 > A_1$. Таким образом, построенные модели адекватны экспериментальным данным [4, 7, 17] в плане оценки «аффинность больше/аффинность меньше».

В случае пентаметилморина по расчётным данным K_{DEEP} для рабочей конформации предсказана селективность по отношению к подтипу A_3 ($pK_d A_3$ 7,38, $pK_d A_1$ 6,96), что согласуется с экспериментальными данными [4], но ещё большая селективность по отношению к подтипу A_3 предсказана для морина ($pK_d A_3$ 6,73, $pK_d A_1$ 6,18). Добавление пяти метильных групп, таким образом, не селективно увеличивало аффинность. Однако такой результат получен в модели. Возможно, в реальных условиях тот же механизм объясняет увеличение селективности к рецептору A_3 вследствие метилирования или этилирования.

Тем не менее согласуемость с экспериментальными данными в части правильного ранжирования рабочих конформаций по селективности позволяет предположить, что флавоноиды связываются с аденозиновыми рецепторами способом, названным рабочей конформацией. Дополнительным аргументом в пользу данного утверждения являются результаты оценки с помощью K_{DEEP} аффинности к аденозиновому рецептору A_1 рабочих конформаций флавоноидов, изученных экспериментально в работе [6], где флавоноиды ранжи-

рованы по аффинности так: кверцетин > флаванон > кемпферол > генистеин > нарингенин > флаванон. Причем pK_i флаванона составила менее четырех, то есть связывание его с рецептором было пренебрежимо мало [6].

При докинге в аденозиновый рецептор A_1 рабочие конформации флавонона и флаванона (неразличимых в формате PDB без неполярных атомов водорода) вообще не были получены, что согласуется с указанными выше экспериментальными данными. Остальные флавоноиды, проанализированные в [6], были ранжированы следующим образом (указаны расчётные pK_d): генистеин \approx кверцетин > кемпферол > нарингенин. Такое ранжирование большей частью соответствует экспериментальным данным.

Анализ рабочих конформаций в приложении отображения взаимодействий PoseView также даёт возможность изучить механизм селективности ряда флавоноидов к аденозиновым рецепторам. У натуральных флавоноидов гидрофобные взаимодействия с аденозиновыми рецепторами представлены двумя-тремя аминокислотными остатками и образуют небольшую зону контакта, как показано на рис. 3. При взаимодействии с метилированными флавоноидами рецептор уже образует неглубокие гидрофобные «кармашки», с которыми взаимодействуют эти боковые цепи (рис. 4).

В случае высокоселективных лигандов, таких как MRS1067, имеющих объёмные алкоксильные заместители, гидрофобные карманы становятся глубокими и плотно охватывают лиганд (рис. 5).

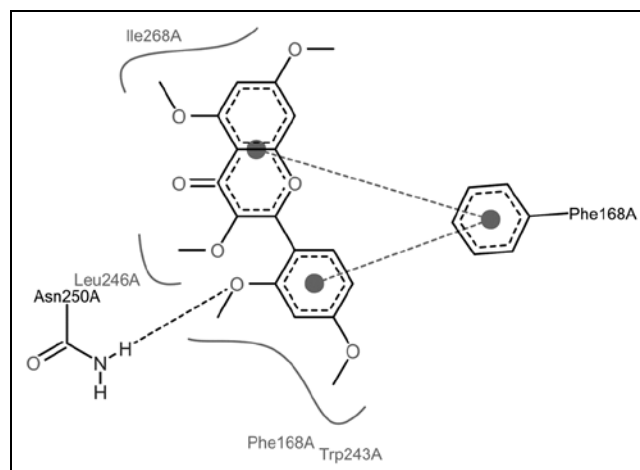


Рис. 4. Пентаметилморин в связывающем участке рецептора A_3 . Видны все характерные для антагонистов взаимодействия и гидрофобные «кармашки»

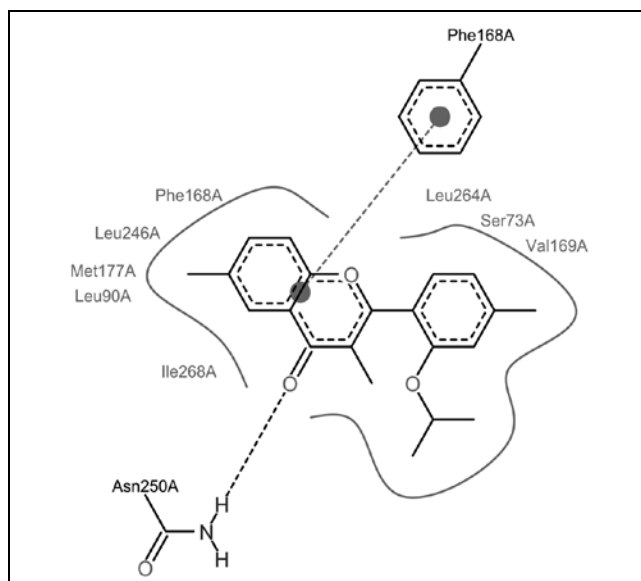


Рис. 5. MRS1067 в связывающем участке рецептора A₃

В комплексах с рецепторами A₁ и A₃ данные карманы имели практически одинаковую конфигурацию. В случае лиганда MRS1067 различалось только число гидрофобных взаимодействий. Таких различий не было найдено для MRS1093. Таким образом, полученные модели лишь в общих чертах указывают на возможные механизмы селективности.

Несмотря на наличие нерешённых вопросов, полученные результаты вносят дополнительные уточнения в модели связывания «флавоноид-рецептор», полученные методом CoMFA [4].

Выводы

1. Для большинства испытанных соединений характерно образование только одной водородной связи с остатком аспарагина (Asn254 в A₁, Asn253 в A_{2A}, Asn250 в A₃), несмотря на большое количество гидроксильных групп в структуре флавоноидов.
2. Гидрофобные контакты имеют вид выраженных «карманов» только у лигандов с алкильными группами в составе боковых заместителей, у натуральных флавоноидов они единичные и представлены высококонсервативными гидрофобными остатками. Также для всех испытанных соединений характерно π-π взаимодействие с остатком фенилаланина (Phe171 в A₁, Phe168 в A_{2A}, Phe168 в A₃).
3. Связывание флавоноидов почти повторяет связывание хорошо известных лигандов ксантинового ряда. Аффинность, рассчитанная по таким структурам, согласуется с эксперимен-

тальными данными, что можно рассматривать как валидацию.

4. По результатам моделирования можно предположить, что повышение селективности к рецептору A₃ вследствие алкилирования гидроксигрупп происходит из-за укрепления гидрофобных контактов.
5. Полученные результаты могут использоваться при разработке новых лекарственных препаратов на основе флавоноидов и при моделировании взаимодействия других веществ растительного происхождения с аденозиновыми рецепторами.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Panche A.N., Diwan A.D., Chandra S.R. Flavonoids: an overview // *Journal of Nutritional Science*. 2016; 5.
2. Kim H.P., Son K.H., Chang H.W., Kang, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms // *Journal of Pharmacological Sciences*. 2004; 96 (3): 229–245.
3. Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. Flavonoids: promising anticancer agents // *Medicinal Research Reviews*. 2003; 23 (4): 519–534.
4. Jacobson K.A., Moro S., Manthey J.A., West P.L., Ji X.D. Interactions of flavones and other phytochemicals with adenosine receptors // *Flavonoids in Cell Function* / Ed. B.S. Buslig, J.A. Manthey Boston: Springer, 2002; P. 163–171.
5. Moro S., van Rhee A.M., Sanders L.H., Jacobson K.A. Flavonoid derivatives as adenosine receptor antagonists: a comparison of the hypothetical receptor binding site based on a comparative molecular field analysis model // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1998; 41 (1): 46–52.
6. Alexander S.P. H. Flavonoids as antagonists at A₁ adenosine receptors // *Phytotherapy Research: An international journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives*. 2006; 20 (11): 1009–1012.
7. Karton Y., Jiang J.L., Ji X.D., Melman N., Olah M.E., Stiles G.L., Jacobson K.A. Synthesis and biological activities of flavonoid derivatives as A₃ adenosine receptor antagonists // *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996; 39 (12): 2293–2301.
8. Sachdeva S., Gupta M. Adenosine and its receptors as therapeutic targets: an overview // *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2013; 21 (3): 245–253.
9. Schingnitz G., Küfner-Mühl U., Ensinger H., Lehr E., Kuhn F. J. Selective A₁-antagonists for treatment of cognitive deficits // *Nucleosides & Nucleotides*. 1991; 10 (5): 1067–1076.
10. Almerico A.M., Tutone M., Pantano L., Lauria A. A₃ adenosine receptor: Homology modeling and 3D-QSAR studies // *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2013; 42: 60–72.
11. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne, P.E. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Research*. 2000; 28 (1): 235–242.
12. Draper-Joyce C.J., Khoshouei M., Thal D. M. et al. Structure of the adenosine-bound human adenosine A₁ receptor-Gi complex // *Nature*. 2018; 558 (7711): 559–563.
13. Lebon G., Warne T., Edwards P.C., Bennett K., Langmead C.J., Leslie A.G., Tate C.G. Agonist-bound adenosine A_{2a} receptor structures reveal common features of GPCR activation // *Nature*. 2011; 474 (7352): 521–525.
14. Jarmolinska A.I., Kadlof M., Dabrowski-Tumanski P., Sulkowska J.I. GapRepairer – a server to model a structural gap and validate it using topological analysis // *Bioinformatics*. 2018; 1: 8.

15. Kim S., Thiessen P.A., Bolton E.E. et al. PubChem Substance and Compound databases // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. Database issue. P. D1202–D1213.
16. Irwin J.J., Sterling T., Mysinger M.M., Bolstad E.S., Coleman R.G. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology // *Journal of Chemical Information and modeling.* 2012; 52 (7): 1757–1768.
17. Harding S.D., Sharman J.L., Faccenda E. et al. The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY // *Nucleic Acids Research.* 2018; 46 (D1): D1091–D1106.
18. Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F.T., de Beer T.A.P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes // *Nucleic Acids Research.* 2018; 46 (W1): W296–W303.
19. Guex N., Peitsch M. C., Schwede T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective // *Electrophoresis.* 2009; 30 (S1): S162–S173.
20. The UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase // *Nucleic Acids Research.* 2017; 45 (D1): D158–D169.
21. Salvatore C.A., Jacobson M.A., Taylor H.E., Linden J., Johnson R.G. Molecular cloning and characterization of the human A₃ adenosine receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90 (21): 10365–10369.
22. Lee G.R., Seok C. Galaxy7TM: flexible GPCR–ligand docking by structure refinement // *Nucleic Acids Research.* 2016; 44 (W1): W502–W506.
23. Stierand K., Maaß P.C., Rarey M. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams // *Bioinformatics.* 2006; 22 (14): 1710–1716.
24. Stierand K., Rarey M. Drawing the PDB: protein–ligand complexes in two dimensions // *ACS Medicinal Chemistry Letters.* 2010; 1 (9): 540–545.
25. Jiménez Luna J., Skalic M., Martínez-Rosell G. et al. K_{DEEP}: Protein-ligand absolute binding affinity prediction via 3D-convolutional neural networks // *Journal of Chemical Information and Modeling.* 2018; 58 (2): 287–296.
26. Ashkenazy H., Abadi S., Martz E., Chay O., Mayrose I., Pupko T., Ben-Tal N. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules // *Nucleic Acids Research.* 2016; 44 (W1): W344–W350.
27. Doré A.S., Robertson N., Errey J. C. et al. Structure of the adenosine A_{2A} receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine // *Structure.* 2011; 19 (9): 1283–1293.
28. Jaakola V.P., Griffith M.T., Hanson M.A. et al. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist // *Science.* 2008; 322 (5905): 1211–1217.

Поступила после доработки 20 ноября 2018 г.

COMPUTATIONAL MODELLING OF INTERACTION BETWEEN FLAVONOIDS AND ADENOSINE RECEPTORS

© Authors, 2019

G.F. Kurakin

Student, Faculty of General Medicine, Tver State Medical University

E-mail: phyzyk@mail.ru

N.P. Lopina

Ph.D. (Chem.), Department of Chemistry, Tver State Medical University

G.E. Bordina

Ph.D. (Biol.), Department of Chemistry, Tver State Medical University

Presently, the possibility of invention of flavonoid-based medicines for treatment of therapeutical, neurological, oncological diseases is actively studied. Herewith, antagonistic activity of flavonoids on adenosine receptors is described. A model of interaction between flavonoids and adenosine receptors is necessary for the prediction of possible adenosine receptor-mediated effects of flavonoids and for development of new adenosine receptor antagonists on their basis. Conversely, up to date, receptor-based models of flavonoid binding to adenosine receptors are absent.

Research objective: obtaining of a receptor-based computational model of flavonoid binding to adenosine receptors.

Materials and methods. Ligand structures from databases PubChem and ZINC were used. Structures of A₁ and A_{2A} adenosine receptors were obtained from Protein Data Bank (PDB). A₃ adenosine receptor was homology modelled using Swiss-Model server. The interactions between flavonoids and adenosine receptors were analysed using flexible docking on Galaxy7TM server. The binding energies were indirectly evaluated by pose ranges in Galaxy7TM docking results and were also calculated using K_{DEEP} server based on neural network. For several flavonoids, the ligand-receptor interactions were additionally analysed using PoseView online service. Amino acid conservation was studied using ConSurf server and UniProt sequences.

Results. The most flavonoids form a hydrogen bond with asparagine residue (Asn254 in A₁, Asn253 in A_{2A}, Asn250 in A₃) of adenosine receptors. Other hydrogen bonds were present occasionally in a case of some flavonoids.

All flavonoids form π -electronic and hydrophobic interactions with phenylalanine residue (Phe171 in A₁, Phe168 in A_{2A}, Phe168 in A₃). Hydrophobic contacts with conserved isoleucine (Ile274 in A₁ and A_{2A}, Ile268 in A₃) and leucine (Leu250 in A₁, Leu249 in A_{2A}, Leu246 in A₃) residues were also present. These interactions resemble those in the case of xanthine-based antagonists. Obtained models accord with experimental data and allows to range flavonoids by affinity to certain types of adenosine receptors with feasible accuracy. In our models, selectivity of flavonoids toward certain types of adenosine receptors and reinforcement of binding under flavonoid alkylation were determined by the form of hydrophobic pockets of adenosine receptors.

Conclusion. The receptor-based model of flavonoid binding to adenosine receptors was obtained. It can be used for the design of adenosine receptor-targeted drugs and as starting point for modelling of interactions between other phytochemicals and adenosine receptors.

Key words: flavonoids, adenosine receptors, computational modelling, receptor-based model.

For citation: Kurakin G.F., Lopina N.P., Bordina G.E. Computational modelling of interaction between flavonoids and adenosine receptors. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2019; 22(1): 42–47. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-01-06>