

**Ингибитор фосфоинозитид-3-киназы LY294002 и его  
неактивный аналог LY303511 как антагонисты  
мускаринового M3-рецептора на основе  
экспериментальных данных и моделирования методом  
молекулярной динамики**

Лямин О.О. ([oleg.lyamin@gmail.com](mailto:oleg.lyamin@gmail.com))

Кочкина Е.Н

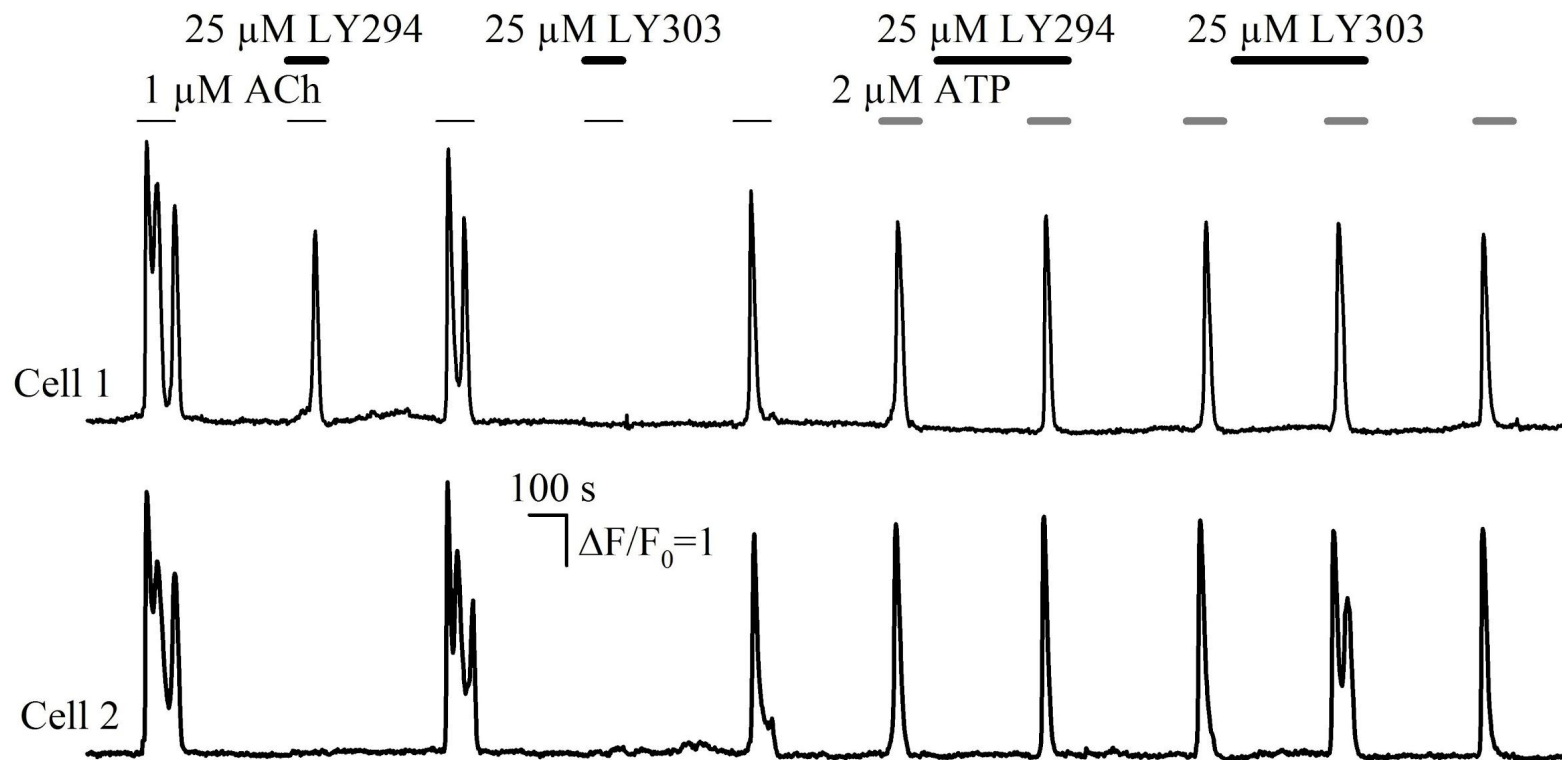
Ивашин Д.С.

ИБК РАН, г. Пущино

- При оценке роли фосфоинозитид-3-киназы (PI3-киназы) в механизме генерации кальциевых ответов на АТФ в мезенхимных стромальных клетках (МСК) жировой ткани были использованы ингибитор PI3-киназы LY294002 (LY294) и его структурный аналог LY303511 (LY303), не оказывающий ингибирующего эффекта.
- Для этой пары LY-соединений был подобран рабочий протокол: концентрация веществ (25 мкМ) и время инкубации клеток в их присутствии перед стимуляцией агонистом (200 с) - при таком протоколе LY294 подавлял кальциевые ответы на АТФ, а LY303 не влиял на них.
- Клеточные ответы анализировались методом кальциевого имиджинга.

- При использовании того же протокола для МСК пупочного канатика эти вещества не влияли на способность клеток генерировать полноценные кальциевые ответы на АТФ.
- Однако мы столкнулись с неожиданным действием: ответы клеток на ацетилхолин блокировал как ингибитор PI3-киназы LY294, так и его неактивный аналог LY303, причем этот эффект проявлялся при одновременном добавлении с агонистом, что свидетельствовало о возможном неспецифическом внеклеточном воздействии этих соединений.
- При этом LY303 был более эффективен: только 4.8% из 293 чувствительных к ацетилхолину МСК пупочного канатика отвечали на 1 мкМ ацетилхолина в присутствии 25 мкМ LY303, 23% - в присутствии 25 мкМ LY294.

# Ответы МСК пупочного канатика на LY294 и LY303 в присутствии агонистов ацетилхолина и АТФ



# Компьютерное моделирование взаимодействий соединений LY с мускариновым M3-рецептором крысы

Подтверждение гипотезы о внеклеточном механизме действия требовало проведения анализа связывания LY-соединений с рецептором, которое по техническим причинам мы выполнить не могли. Мы обратились к компьютерному моделированию такого взаимодействия методом молекулярной динамики (МД).

Моделирование проводилось на мускариновом рецепторе типа M3 крысы по следующим причинам:

- экспрессионный анализ популяции МСК пупочного канатика показал, что клетки используют M3-рецептор для генерации кальциевых ответов на ацетилхолин;
- аминокислотная последовательность M3-рецептора человека на 90% гомологична последовательности рецептора крысы ([www.uniprot.org/uniprot/P08483#similar\\_proteins](http://www.uniprot.org/uniprot/P08483#similar_proteins));
- кристаллографическая структура M3-рецептора крысы разрешена и опубликована.

## Моделирование рецептора

- При моделировании была использована структура М3-рецептора в комплексе с антагонистом тиотропиумом (Protein Data Bank (PDB) ID: 4U15).
- Тиотропиум, а также вставка лизоцима на месте третьей внутриклеточной петли рецептора, используемая для облегчения кристаллизации, предварительно удалялись.
- В результате удаления вставки между 5 и 6 трансмембранными цепями образовывался разрыв, который при помощи инструментов swissmodel ([swissmodel.expasy.org/interactive](http://swissmodel.expasy.org/interactive)) заполнялся небольшим линкером (в некоторых симуляциях использовался одиночный глицин, в некоторых - последовательность из 8 аминокислот GSGSGSGS).
- N- и C-концы закрывались нейтральными группами ацетила и метиламида, соответственно.
- Аминокислотный остаток Asp113 протонировался: он соответствует Asp83 родопсина, который остаётся в протонированном состоянии на протяжении всего фотоцикла ([doi.org/10.1073/pnas.90.21.10206](https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10206)).

# Моделирование соединений LY, мембраны и раствора

К полученной структуре добавлялось одно из соединений LY на расстоянии не менее 12 Å от поверхности рецептора.

Структура рецептора:

- ориентировалась относительно мембраны при помощи инструментов OPM ([opm.phar.umich.edu](http://opm.phar.umich.edu));
- помещалась в модель мембраны (POPC би-слой) в charmm-gui ([charmm-gui.org](http://charmm-gui.org));
- и модель раствора NaCl в концентрации 150 mM.

Построенные таким образом модели насчитывали 60 - 70 тысяч атомов.

# Параметризация

При параметризации построенной модели использовались следующие силовые поля AMBER:

- ff14SB - белки;
- lipid17 - липиды;
- tip3p - раствор;
- gaff2 - соединения LY.



## Молекулярная динамика (общая схема)

Предварительные этапы:

- минимизация
- нагревание до 310 К
- короткая экилибрация в каноническом ансамбле  $NVT$  (при постоянных количестве частиц  $N$ , объеме  $V$  и температуре  $T$ )
- дополнительная короткая экилибрация в изотерм-изобарическом ансамбле  $NPT$  при давлении в 1 атм (при постоянных количестве частиц  $N$ , давлении  $P$  и температуре  $T$ )

После этого инициировалась генерация и запись длинных МД-траекторий в ансамбле  $NPT$ .

## Молекулярная динамика (параметры)

- ковалентные связи атомов водорода ограничивались алгоритмом SHAKE
- радиус обрезания короткодействующих взаимодействий = 9 Å
- далекодействующие электростатические взаимодействия вычисляли методом Particle Mesh Ewald (PME)
- в некоторых симуляциях использовался метод hydrogen mass repartitioning (HMR), позволяющий увеличить шаг интегрирования до 4 фс, в остальных - 2 фс
- чтобы избежать перехода соединения LY через границу периодической ячейки, в некоторых симуляциях отдаление LY от поверхности рецептора ограничивалось сверху расстоянием в 40 Å при помощи штрафной функции

# Молекулярная динамика

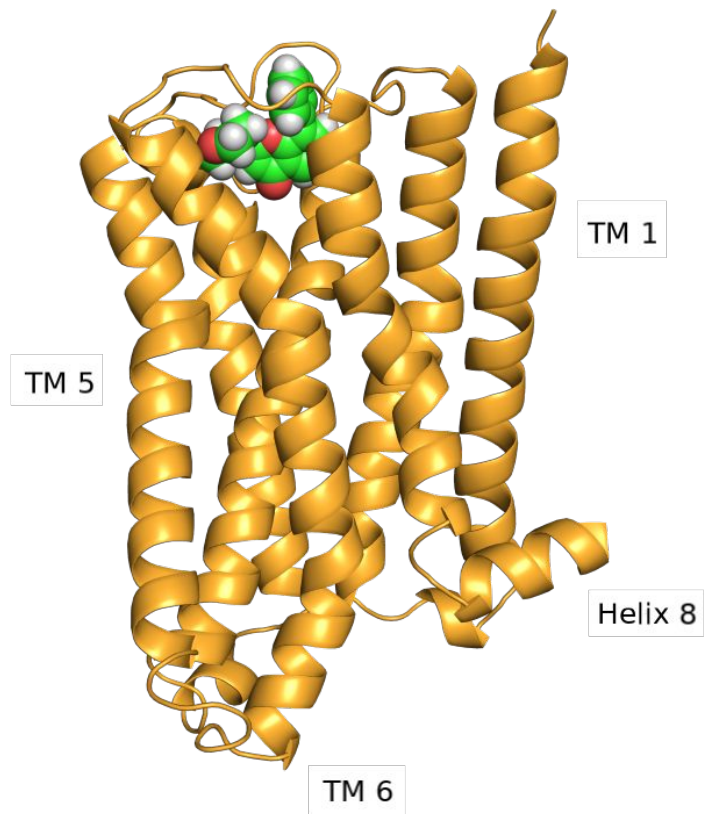
МД-моделирование велось:

- в программном обеспечении AMBER с функцией счета на графических процессорах
- на собственной вычислительной установке, построенной на 7 видеокартах Gigabyte с графическими процессорами Nvidia 2080

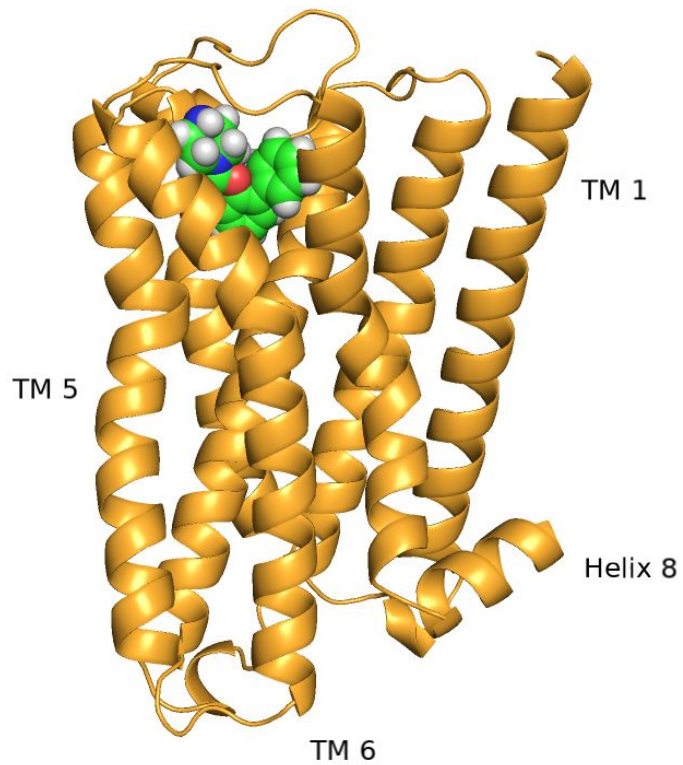
## Результаты моделирования

- МД-моделирование показало, что оба соединения LY при диффузии в области внеклеточных петель рецептора способны занимать и сохранять положение в т.н. внеклеточном вестибюле - аллостерическом сайте мускариновых рецепторов между 2 и 3 внеклеточными петлями, что может указывать на ингибирование мускариновых рецепторов этими веществами по принципу аллостерической модуляции.
- Однако ранее МД-моделированием было показано ([doi.org/10.1038/nature10867](https://doi.org/10.1038/nature10867)), что антагонист мускариновых рецепторов тиотропиум приостанавливается в вестибюле при связывании и диссоциации с ортостерическим сайтом рецептора.
- Возможно, и соединения LY связываются с вестибюлем лишь временно перед проникновением в ортостерический сайт, однако наши МД-траектории не были достаточно продолжительными для этого.

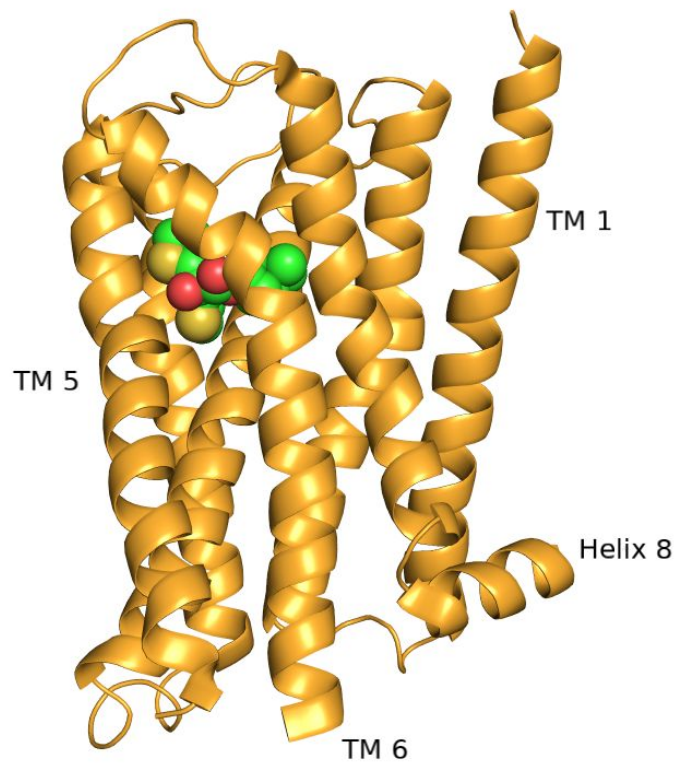
## LY294 в вестибуле рецептора



# LY303 в вестибуле рецептора



## Тиотропиум в ортостерическом сайте



## Результаты моделирования

Всего нами было получено 47 траектории.

Соединение	Кол-во траекторий	Кол-во траекторий, в которых произошло связывание с вестибюлем	Средняя длина траектории, в которых произошло связывание с вестибюлем
LY294	21	9	272 нс
LY303	26	8	363 нс

- Оба соединения LY в разных траекториях принимают, вообще говоря, несколько различные положения во внеклеточном вестибюле. Это согласуется с МД-результатами на ангаонисте тиотропиуме ([doi.org/10.1038/nature10867](https://doi.org/10.1038/nature10867)).
- Продление некоторых траекторий на дополнительные 100 нс показало, что оба LY-соединения, связавшись с вестибюлем, не покидают его.
- В траекториях, в которых не происходило связывания LY-соединений с вестибюлем, соединения диффундировали в мембрану.



## Оценка свободной энергии связи и отношения констант диссоциации

Чтобы оценить аффинности LY-соединений по отношению к вестибюлю, мы использовали докинг-инструмент Autodock Vina для генерации наиболее вероятных положений связывания. Из них мы выбрали такое, которое хорошо согласуется с нашими молекулярно-динамическими результатами.

Результаты скоринга, соответствующие этим положениям, равны -9.3 ккал/моль и -8.4 ккал/моль для LY303 и LY294, соответственно. Интерпретируемые как оценки свободной энергии связи, эти величины позволяют оценить отношение констант диссоциации следующим образом:

$$\frac{K_d^{\text{LY303}}}{K_d^{\text{LY294}}} = \frac{\exp(-\Delta G_{\text{bind}}^{\text{LY303}}/RT)}{\exp(-\Delta G_{\text{bind}}^{\text{LY294}}/RT)} = \exp((9.3 - 8.4) * 1000/RT) = 4.59,$$

где  $R = 1.98$  кал/(моль \* К) и  $T = 298.15$  К.

## Оценка свободной энергии связи и отношения констант диссоциации

Показано, что среднеквадратическое отклонение значений энергии связи, получаемых в ходе эксперимента, от величин, предсказываемых Autodock Vina, может достигать до 2.85 ккал/моль ([doi.org/10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334)).

Ввиду этого, чтобы получить независимое подтверждение полученным оценкам, мы дополнительно воспользовались докинг-инструментом SwissDock ([swissdock.ch](http://swissdock.ch)). Предсказанные им значения свободной энергии связи приблизительно равны -8.25 ккал/моль и -7.33 ккал/моль для LY303 и LY294, соответственно. Несмотря на то, что абсолютные значения этих энергий отличаются от предсказанных Autodock Vina величин, они дают примерно ту же оценку отношения констант диссоциации, равную 4.75.

Такая оценка отношения констант диссоциации хорошо согласуется с полученным в ходе эксперимента соотношением клеток, для которых *не* проявлялись антагонистические эффекты LY294 (23% клеток) и LY303 (4.8% клеток).

Комментарии и вопросы присылать по адресу

[oleg.lyamin@gmail.com](mailto:oleg.lyamin@gmail.com)