

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЕНОВ ГРУППЫ GRIN ЧЕЛОВЕКА И МАКАКИ-РЕЗУСА

**А.Ю. Костюхов<sup>1</sup>, Э.Б. Душанов<sup>1,2</sup>, А.С. Батова<sup>2</sup>, С.В. Аксёнова<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Государственный университет «Дубна», Дубна, Россия кафедра биофизики

<sup>2</sup>Объединённый институт ядерных исследований, Дубна, Россия

*Введение.* Макаки-резусы (*Macaca mulatta*) являются одними из наиболее широко известных не-человекообразных приматов, которые демонстрируют большое сходство с человеческой физиологией

и нейробиологией, и, в связи с этим, могут являться модельным объектом для многих биомедицинских исследований, в частности, связанных с радиобиологией. Геном макаки-резуса был расшифрован (секвенирован) относительно недавно 1. Это третий прочтённый геном примата (после человека 2 и шимпанзе 3). Полученный объем знаний о геноме макаки-резуса существенно ускоряет процесс понимания эволюционных изменений в организме человека.

Как известно, изменения в генах группы GRIN могут привести к таким нейродегенеративным болезням, как болезнь Альцгеймера, различные формы эпилепсии (генетическая и посттравматическая), энцефалопатии и др. Именно генами группы GRIN кодируются отдельные субъединицы синаптических NMDA-рецепторов. Текущие исследования, направленные на решение фундаментальных биологических и прикладных биомедицинских вопросов, опираются на различные генетические и геномные анализы. Поэтому геном макак-резусов является предметом большего изучения для правильной интерпретации результатов и экстраполяции этих результатов на человека.

Целью исследования является структурный анализ рецепторов NMDA человека и макаки-резуса. Решение задачи включает этапы сравнения пространственных (трёхмерных) белковых структур субъединиц синаптического рецептора NMDA человека и макаки-резуса, построения пространственных структур NMDA рецепторов для человека и макаки-резуса и непосредственного моделирования пор ионного канала NMDA-рецепторов человека и макаки-резуса.

*Материалы и методы.* Исследования со всевозможными подходами выравнивания геномных последовательностей в виде мономеров ДНК/РНК были проведены нами в работе 4, где использовались программы BLAST 5 и Jalview 6.

На данном этапе исследования поиск аминокислотных последовательностей с целью построения нужных структур рецепторов осуществлен в базах NCBI, UniProt и RCSB PDB. Построение NMDA-рецепторов, моделирование поры ионного канала и анализ полученных результатов проходило с использованием программ VMD 7, MODELLER 8, CHARMM-GUI 8, GROMACS 9 и HOLE 10.

На основе трёхмерных структур из UniProt были восстановлены недостающие аминокислотные остатки (а.о.) в моделях синаптических рецепторов, взятых из PDB. Для построения модели синаптического NMDA-рецепторов человека GluN1-GluN2C и GluN1-GluN3A были выбраны модели с кодом 8E97 и 8USW соответственно. Для восстановления недостающих участков использовалось выравнивание с помощью VMD, либо его комбинация с MODELLER. Список восстановленных/заменённых участков представлен в Таблице 1.

После этого было произведено попарное сравнение моделей из PDB с восстановленными структурами. Для рецепторов GluN1-GluN2C наибольшие различия наблюдались в цепи D, где среднеквадратичное отклонение (СКО) двух структур составляло 0,375 Å. Для рецепторов GluN1-GluN3A наибольшее сходство наблюдалось в цепи C (0,358 Å), а наибольшие различия в цепях B и D, где значение СКО составило 0,705 и 0,718 Å соответственно.

**Таблица 1. Восстановленные участки в структурах рецепторов GluN1-GluN2C (8E97) и GluN1-GluN3A (8USW) человека (а.о. – аминокислотные остатки).**

8E97			8USW		
Субъединица	Цепь	а.о.	Субъединица	Цепь	а.о.
GluN1	A	585-601	GluN1	A/C	580-627
	B	585-601			799-847
GluN2C		C	799-847	GluN3A	B/D
	438-446		494-510		
	538-597		663-739		
	614-622	914-925			
	D	577-595	956-976		
		615-622			

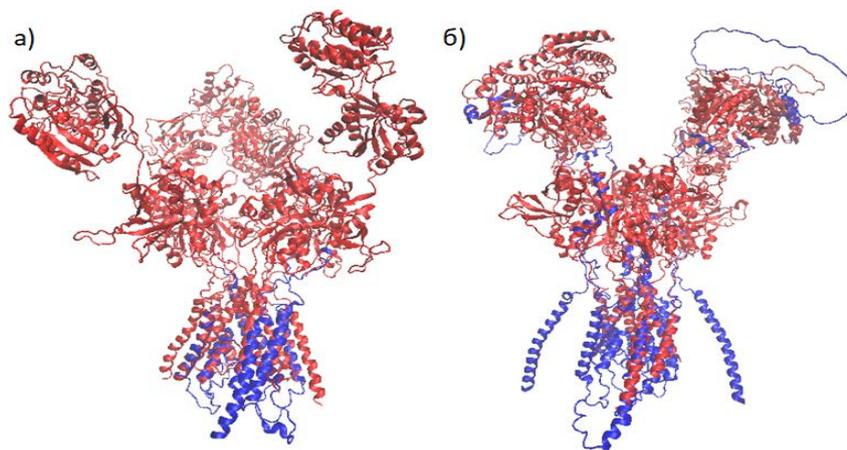


Рис. 1. Восстановленные модели NMDA рецепторов человека: а) структура 8E97; б) структура 8USW. Восстановленные участки структур выделены синим цветом

*Результаты.* На основе модели рецептора человека GluN1-GluN3A, полученной нашей исследовательской группой, была построена модель данного рецептора для макаки-резус. Для этого с помощью NCBI-BLAST были найдены отличия в аминокислотных последовательностях человека и макаки-резус. Далее, с помощью выравнивания в VMD была произведена замена аминокислот. Таким образом, в субъединицах GluN1 с целью получения новой структуры для макаки были заменены а.о.: 415, 657, 810, 844, 845, 846, а в субъединицах GluN3A замене подлежали участки: 71, 93, 117, 118, 121, 387, 457, 479, 551, 622, 676, 690, 722, 830, 885, 902, 909, 968 – 976.

Для модельной структуры GluN1-GluN3A была построена топология с помощью пакета Charmm-GUI 8. В результате получена молекулярная система рецептор-мембрана-вода, где мембрана представляла собой липидный бислой из 410 молекул POPC в одном слое, гидратированной 164056 молекулами воды. В молекулярной структуре также присутствуют 8 ионов  $Mg^{2+}$  в качестве магниевого блока ионного канала рецептора, 441 ион  $Na^+$  и 439 ионов  $Cl^-$ . Далее, полученная полноатомная молекулярная система подверглась моделированию методом молекулярной динамики (МД) с помощью пакета Gromacs 9. На Рис. 2 представлена суперпозиция рецепторов человека (голубой) и макаки резус (синий) спустя 30 нс моделирования методом МД. Расчет СКО показал, что значение отклонения по всей длине рецепторов после уравнивания составило  $8,6 \text{ \AA}$  и после моделирования –  $17,8 \text{ \AA}$ .

Построены двухмерные изображения ионных каналов, а также графики, показывающие изменение их размера на протяжении всей длины (см. Рис. 3). Наименьшие различия обнаружены в лиганд-связывающем домене. Наибольшие различия наблюдаются в N-конце. В области трансмембранного домена изменения радиуса канала у макаки-резуса происходит более плавно, чем у человека и минимальный радиус составляет  $1,3 \text{ \AA}$ , у человека радиус ионного канала меняется скачкообразно и составляет  $2,3 \text{ \AA}$ . После 30 нс моделирования размер канала в области TMD стабилизировался и составил  $0,7$  и  $1,0 \text{ \AA}$  (Рис. 3).

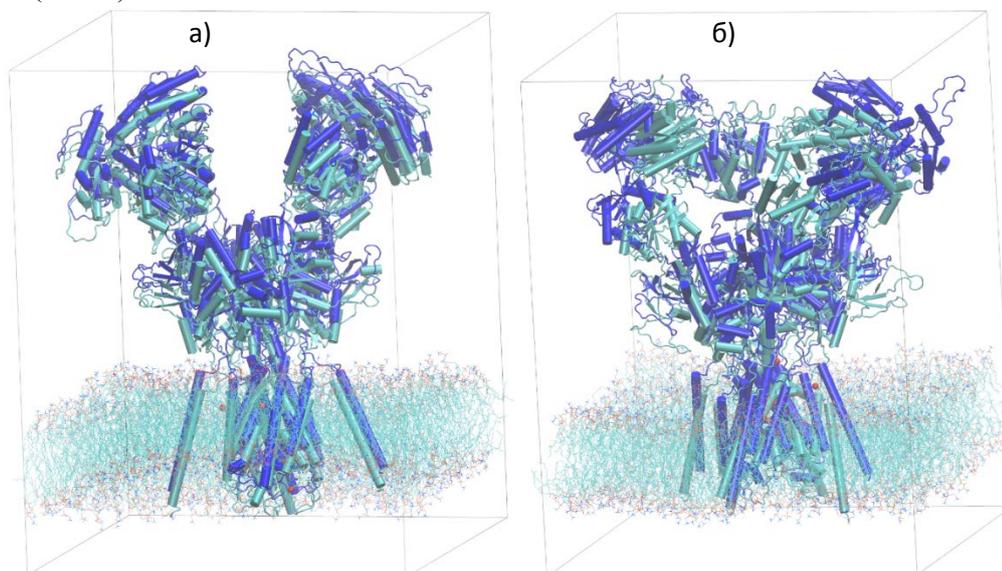


Рис. 2. Суперпозиция структуры рецептора NMDA GluN1-GluN3A человека (голубой) и макаки резус (синий) до (а) после 30 нс (б) моделирования. Красные шарики – ионы магния в области ионного канала

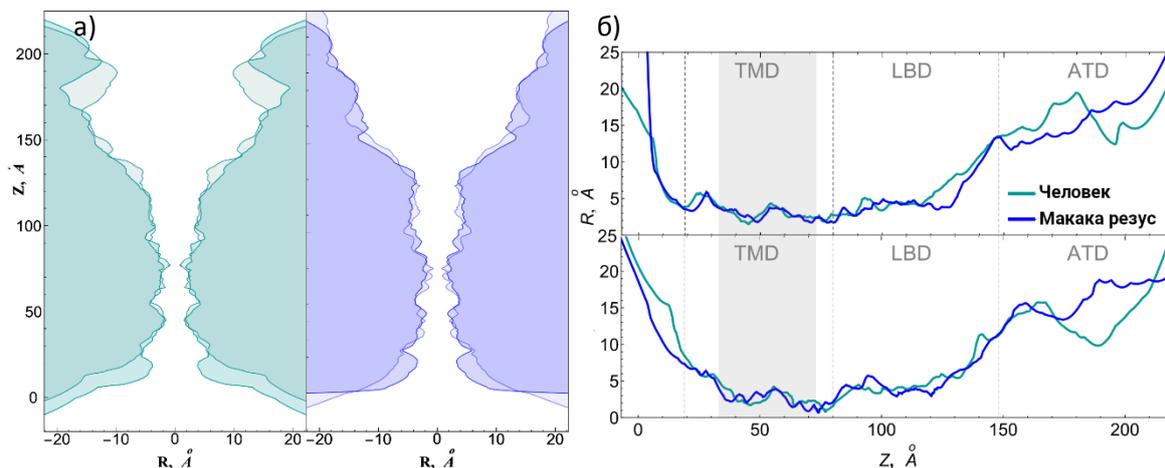


Рис. 3. Сравнение размера ионного канала человека и макаки резус: а) ионный канал NMDA рецепторов человека и макаки до (зелёный и синий) и после (прозрачно зелёный и синий) моделирования; б) радиус ионных каналов человека и макаки с указанием локализации в доменах рецепторов ( $R$  – радиус натрий ионного канала на разных участках относительно  $Z$  – длины рецептора, пунктиром отмечено разделение TMD – трансмембранного, образующего пору ионного канала, LBD – лиганд-связывающего и ATD – N-концевого доменов)

**Заключение.** Для каждого из генов семейства GRIN у человека на базе NCBI было найдено два возможных варианта нуклеотидной последовательности (НП), из сборок генома T2T-CHM13v2.0 и GRCh38.p14 12. Каждая из них сравнивалась с одной и той же нуклеотидной последовательностью обезьяны. Для последовательностей человека и макаки-резуса проводилось парное выравнивание по всей длине последовательности. Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что в процессе эволюции наибольшие изменения претерпел ген GRIN3B, для него обнаружено наименьшее соответствие последовательностей (процент идентичности ~90%). Наиболее консервативными являются варианты последовательностей – GRIN1 (96%), GRIN2C (95%), GRIN2D (94%).

Проведенный в работе сравнительный анализ структур NMDA-рецепторов человека (*Homo sapiens*) и макаки-резуса (*Macaca mulatta*), кодируемых генами группы GRIN, выявил структурные различия в NMDA-рецепторах человека и макаки-резуса, которые могут иметь важные последствия для биомедицинских исследований. Наибольшие различия сосредоточены в аминоконцевом домене (ATD), что указывает на потенциальные межвидовые различия в функциональных и фармакологических свойствах рецепторов. Особое значение имеет обнаруженная большая ширина ионного канала у человека, которая обуславливает более высокую проводимость по сравнению с макакой-резусом. Эти структурные особенности необходимо учитывать при экстраполяции экспериментальных данных, полученных на макаках-резусах, на человека в контексте изучения нейродегенеративных заболеваний и других прикладных исследований.

### Литература

- Gibbs R. A. et al. Evolutionary and biomedical insights from the rhesus macaque genome // *Science*. – 2007. – Т. 316. – №. 5822. – С. 222-234.
- Venter J. C. et al. The sequence of the human genome // *Science*. – 2001. – Т. 291. – №. 5507. – С. 1304-1351.
- Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium, Watson Robert H., Lander Eric S., Wilson Richard K. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome // *Nature*. – 2005. – Т. 437. – №. 7055. – С. 69-87.
- Костюхов А.Ю. Сравнительный анализ генов группы GRIN человека и обезьяны *Macaca mulatta* // Выпускная квалификационная работа, Университет «Дубна», 2023, 34 стр.
- Pevsner J. *Bioinformatics and functional genomics*. – John Wiley & Sons, 2015.
- Waterhouse A. M. et al. Jalview Version 2 – A multiple sequence alignment editor and analysis workbench // *Bioinformatics*. – 2009. – Т. 25. – №. 9. – С. 1189-1191.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *Journal of molecular graphics*. – 1996. – Т. 14. – №. 1. – С. 33-38.
- Webb B., Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER // *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]*. – 2016. – Т. 54. – С. 5.6.1-5.6.37.
- Lemkul J.A. Introductory Tutorials for Simulating Protein Dynamics with GROMACS // *The Journal of Physical Chemistry. B*. – 2024. – Т. 128. – №. 39. – С. 9418-9435.
- Smart O.S., Neduvilil J.G., Wang X., и др. HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models // *Journal of Molecular Graphics*. – 1996. – Т. 14. – №. 6. – С. 354-360, 376.

11. Kern N.R., Lee J., Choi Y.K., и др. CHARMM-GUI Multicomponent Assembler for Modeling and Simulation of Complex Multicomponent Systems // bioRxiv: The Preprint Server for Biology. – 2023.
12. [https://en.m.wikipedia.org/wiki/Reference\\_genome#Human\\_reference\\_genome](https://en.m.wikipedia.org/wiki/Reference_genome#Human_reference_genome)