

ВЛИЯНИЕ МУТАНТНЫХ ФОРМ СИНАПТИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ NMDA НА ОСЦИЛЛЯЦИИ В НЕЙРОННЫХ СЕТЯХ

Аксенова С.В., Батова А.С., Бугай А.Н., Душанов Э.Б.

Объединенный институт ядерных исследований
ул. Жолио-Кюри, 6, г. Дубна, 141980, РФ; e-mail: dushanov@jinr.ru
Поступила в редакцию: 24.07.2019

Аннотация. В работе было проведено молекулярно-динамическое моделирование активации ионного канала мутантных форм NMDA-рецептора. Анализировались би и тригетеромерные формы рецептора с различной композицией субъединиц. Проводимость ионного канала вычислялась по данным пакета HOLE, а также анализа связывания ионов магния. Анализ полученных структур позволил определить изменение проводимостей ионного канала, которые сильно уменьшались в случае двойных точковых мутаций и делеций. Полученные данные использовались в модели нейронной сети гиппокампа в пакете NEURON. В результате удалось исследовать влияние мутаций, кодирующих белковые субъединицы NMDA-рецепторов, на генерацию *тэта*- и *гамма*-ритмов.

Ключевые слова: ЦНС, гиппокамп, генные мутации, моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

Среди всех видов радиации наиболее высокой биологической эффективностью обладают тяжелые заряженные частицы, входящие в состав галактических космических лучей, а также используемые при радиационной терапии злокачественных опухолей. При оценке рисков радиационного воздействия для космонавтов в ходе межпланетных перелетов, а также пациентов с опухолями головного мозга необходимо иметь в виду возможное формирование нарушений со стороны центральной нервной системы [1]. В экспериментах на ускорителях по облучению лабораторных животных высокоэнергичными ионами железа наблюдался целый ряд эффектов, проявляющихся в выраженных нарушениях пространственной ориентации, снижения когнитивных функций, который связывается с повреждением механизмов синаптической передачи в различных структурах мозга и, прежде всего, в гиппокампе [2]. Нейрофизиологами при изучении нейродегенеративных заболеваний выявлено, что подобные нарушения имеют генетическую природу и связаны с возникновением мутаций в генах, кодирующих белки синаптических рецепторов [3]. Таким образом, можно полагать [4], что радиационные повреждения в генетических структурах нервных клеток в дальнейшем могут привести к синтезу мутантных форм белков, что может сказаться на их нормальном функционировании. Наиболее значимо это будет проявляться при возникновении кластерных повреждений ДНК, обуславливающих грубые нарушения генома и сопровождающихся возникновением структурных мутаций. С учетом этого представляет интерес рассмотреть влияние различных видов мутаций в генах нейронов гиппокампа на состояние синаптических рецепторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве объекта исследования был рассмотрен ионотропный рецептор глутамата NMDA (N-метил-D-аспаратат), который играет ключевую роль в регуляции синаптической пластичности, обучении и формировании различных видов памяти. Рецептор представляет собой гетеротетрамер из двух субъединиц — NR1 и NR2, кодируемых генами *GRIN1* и *GRIN2*, соответственно. В ходе работы было проведено молекулярно-динамическое (МД) моделирование процесса активации полноатомной структуры рецептора NMDA на базе пакетом NAMD. Рецептор был построен из мутантных форм белков, соответствующих субъединице NR2. При этом анализировались одиночные и двойные точковые мутации, а также одна структурная мутация (делеция), приводящие к нейродегенеративным заболеваниям, таким как различные формы эпилепсии, аутизм, умственная отсталость [3]. Кроме бигетеромерной структуры рецептора NMDA также рассмотрели его тригетеромерные структуры с различной композицией субъединиц NR2a и NR2b, соответствующих генам *GRIN2A* и *GRIN2B*.

Первый этап моделирование осуществлён методом молекулярной динамики с помощью пакета NAMD [5]. Молекулярные структуры закрытых тетрамеров – бигетеромера (субъединицы NR1/NR2b) и тригетеромера (субъединицы NR1/NR2a/NR2b) были сформированы на основе кристаллических структур 5FXJ и 5UP2 базы PDB [6], добавлением недостающих аминокислотных остатков путём восстановления и выравнивания программой MODELLER [7]. Процесс, происходящий при активации ионотропных рецепторов, был смоделирован с помощью утилиты TelForces в среде NAMD [5]. Суть такой модели активации заключается в том, что модельная структура лиганд-связывающего домена неактивного рецептора приводится к активному состоянию, заданное шаблоном, прикладывая соответствующие силы к атомам Ca. В качестве шаблонных структур активных состояний были выбраны кристаллические структуры 5FXG для субъединиц NR1/NR2b, 2A5T – для субъединиц NR1/NR2a. При этом для тригетеромерной структуры использованы их комбинация. Таким образом, переход лиганд-связывающего домена в активированную конформацию вызывает открытие ионного канала в трансмембранном домене рецептора NMDA.

Было смоделировано несколько структур NMDA, каждая из которых встроена в фосфолипидную мембрану POPC, которая имеет свойства, аналогичные свойствам мембраны в области синапса. Первая структура была выбрана как нативная; другие имели одну или несколько миссенс-мутаций в субъединице NR2b: p.Arg540His, p.Asn615Ile, p.Val618Gly, а также одну делецию p.Phe671_Gln671del, которая локализована в линкере M3-D2. Эти мутации, соответственно, локализованы внеклеточном глутамат-связующем домене (LBD-D1) и в петле между M2 и M3 (рис. 1), образующей ионный канал, и имеют фенотипы, связанные с различными неврологическими заболеваниями, включая синдром Веста и фокальную эпилепсию [8]. Моделирование методом МД включало четыре этапа: динамика с фиксацией остовных атомов рецептора (20 нс); 20 наносекундная динамика без каких-либо фиксаций атомов; быстрая активация с использованием утилиты TclForces (2 нс); моделирование активных структур (80 нс). Для моделирования свойств водного раствора с удовлетворительной плотностью использовался пакет SOLVATE [9], концентрация ионов – 0,1 моль/л.

В ходе моделирования изменения радиуса ионного канала рассчитывались с помощью программы HOLE [10]. В результате стало возможным оценить разницу между проводимостью открытого ионного канала рецептора нативной и мутантной форм белка. Предполагая, что радиус канала зависит от координаты z вдоль оси симметрии рецептора, которая перпендикулярна мембране, проводимость канала G можно оценить по следующей формуле:

$$\frac{1}{G} = \int_0^L \frac{dz}{\pi \sigma r^2(z)}, \quad (1)$$

где σ – ионная проводимость; L и r – длина ионного канала и эффективный радиус пор соответственно. Таким образом, соотношение проводимости нативных и мутантных форм было оценено по следующей формуле:

$$\frac{G_{mut}}{G_{wild}} = \int_0^L \frac{dz}{r_{wild}^2} \bigg/ \int_0^L \frac{dz}{r_{mut}^2}. \quad (2)$$

Следует отметить, что таким подходом можно измерять только механическую проницаемость ионных каналов. Для учета блока ионов Mg^{2+} рецепторного канала NMDA необходимо проанализировать особенности его связывания. Здесь мы опираемся на ранее опубликованные результаты [8, 11], выполненные с применением метода теории функционала плотности и доказанные экспериментально.

Анализ геометрии пор с использованием HOLE был рассмотрен с молекулярной структурой, которая была уравновешена после стадии активации. Среднеквадратичное отклонение атомов (RMSD) стабилизировалось при 0,9, 1,0 и 1,16 Å в течение 5 нс для различных мутаций и при 0,95 для рецептора дикого типа. После этого мы усреднили все геометрии, полученные за последние 50 нс моделирования.

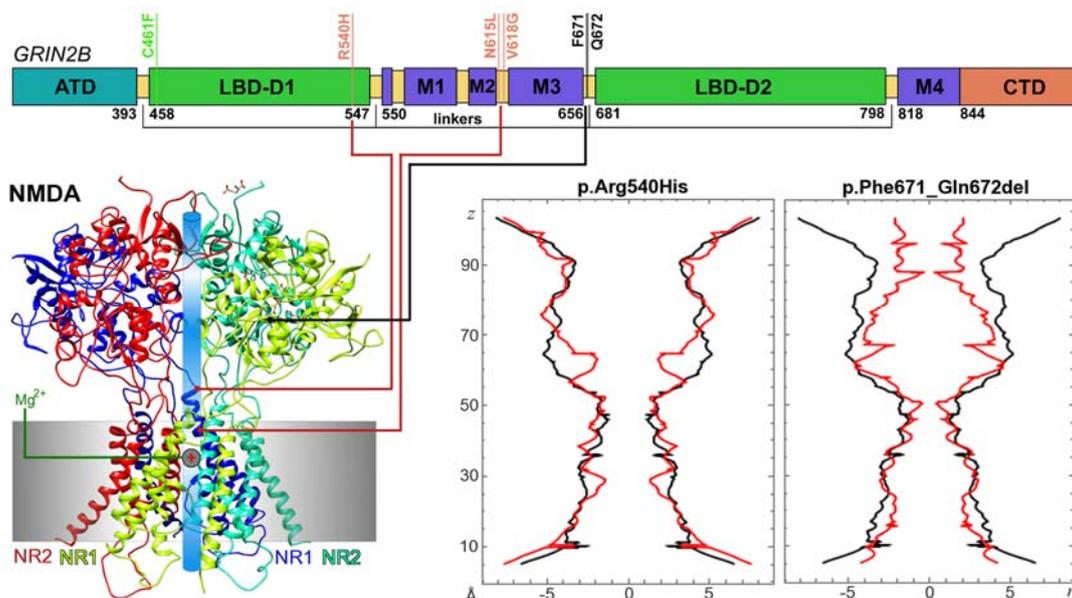


Рисунок 1. NMDA рецептор – тетрамер, состоящий из субъединиц NR1 и NR2. Отмеченные сверху мутации в гене *GRIN2* приводят к нарушению проницаемости ионного канала рецептора. На графиках приведено сравнение геометрии ионного канала для точечной мутации p.Arg540His и делеции p.Phe671_Gln672del (красный) относительно нативного варианта (черный)

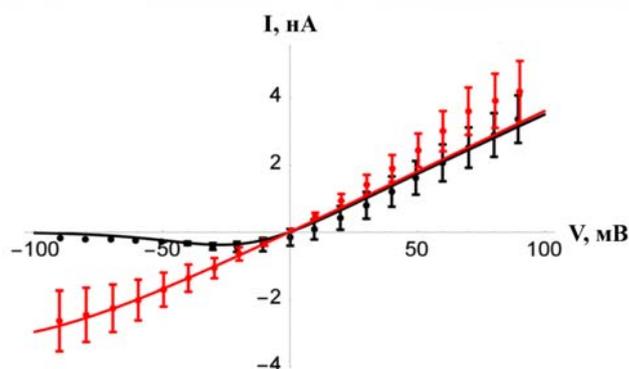


Рисунок 2. Сравнение расчетных (кривые) и экспериментальных (точки) вольт-амперных характеристик NMDA рецептора в случае нативного варианта (черный) и точковой мутации p.Asn615Leu (красный). Экспериментальные значения приведены по данным работы [11]

Количественный анализ геометрии канала в нативной и рассматриваемой мутантных формах рецептора (рис. 1) позволяет оценить соответствующее изменение ионной проводимости, которое определяет формирование потенциала постсинаптического действия.

Макроскопический ионный ток I_m через отдельный рецептор NMDA рассчитывался по формуле [15]

$$I_m = \frac{G_m}{1 + c[Mg^{2+}] \exp(-qV)} \quad (3)$$

где G_m – максимальная проводимость; V – потенциал постсинаптической мембраны; a и q – феноменологические константы [15], которые отражают связывание магния и электрохимические свойства, соответственно. Эти параметры обычно выводятся из экспериментальных данных. В ходе расчетов нами изучены вариации G_m и c в соответствии с моделируемой структурой. Значения параметров были нормированы относительно нативного варианта, для которого они составляли $G_m = 1$; $c = 0,28 \text{ mM}^{-1}$ и $q = 0,062 \text{ mV}^{-1}$.

Расчет коэффициентов для проводимости одновалентных ионов (Na^+) на основе реконструкции радиуса пор согласно формулам (2), (3) представлен в таблице 1. Таким образом, максимальная ионная проводимость полностью активированного канала изменяется незначительно между нативным вариантом и рассматриваемыми точечными мутантными формами, но имеет значение для делеции. Здесь мы приходим в соответствие с измерениями, выполненными Феделе и др. [11] (рис. 2). Снижение времени активации вариантов p.Arg540His и p.Asn615Leu может значительно влиять на кинетику рецептора. Соответствующая оценка макроскопического времени открытия/закрытия выходит за рамки примененного молекулярно-динамического метода.

Как упоминалось выше, *тета*- и *гамма*- колебания, возникающие в гиппокампе, имеют фундаментальное значение для обучения и памяти. Существует ряд моделей нейронных сетей гиппокампа различной сложности [12]. Мы использовали модель из [13], воспроизводящую колебания нейронной популяции области гиппокампа CA3 и содержащую в общей сложности 1200 нервных клеток: 800 пирамидных нейронов, 200 oriens lacunosum-moleculare (OLM) и 200 корзинчатых интернейронов. Модель пирамидальных нейронов учитывает некоторые морфологические особенности клетки и поэтому разделена на несколько сегментов: один для базальных дендритов, второй для сомы (тела) клетки, остальные три для апикальных дендритов. Интернейроны описываются односегментными моделями ввиду достаточности такого представления для воспроизведения электрической активности этих клеток.

Динамика единичного элемента модели определяется уравнениями типа Ходжкина-Хаксли. Выбор токов и их параметров не изменился по сравнению с предыдущими работами [13, 14]. Все ячейки содержали ток утечки, натриевые и калиевые каналы с задержкой выпрямления тока для генерации потенциалов действия. Во всех группах пирамидальных нейронов был добавлен калиевый ток А-типа для быстрой инактивации потенциалов действия, гиперполяризационный ток Н-типа для обеспечения взрывной активности. OLM-клетки

Таблица 1. Параметры для расчета NMDA ионного тока

Мутации	N_m/N_b	B_b	$u, \text{ \AA}$	G_{mut}/G_{nat}	$c, \text{ mM}^{-1}$	$q, \text{ mV}^{-1}$
Нативная форма	1	2	1,87	1,00	0,280	0,062
p.Arg540His	2	2	1,99	0,93	0,093	0,058
p.Asn615Leu	4	1	4,60	1,03	0,018	0,025
p.Val618Gly	3	1	1,95	1,06	0,025	0,059
p.Phe671 Gln672del	1	2	4,15	0,37	0,280	0,028

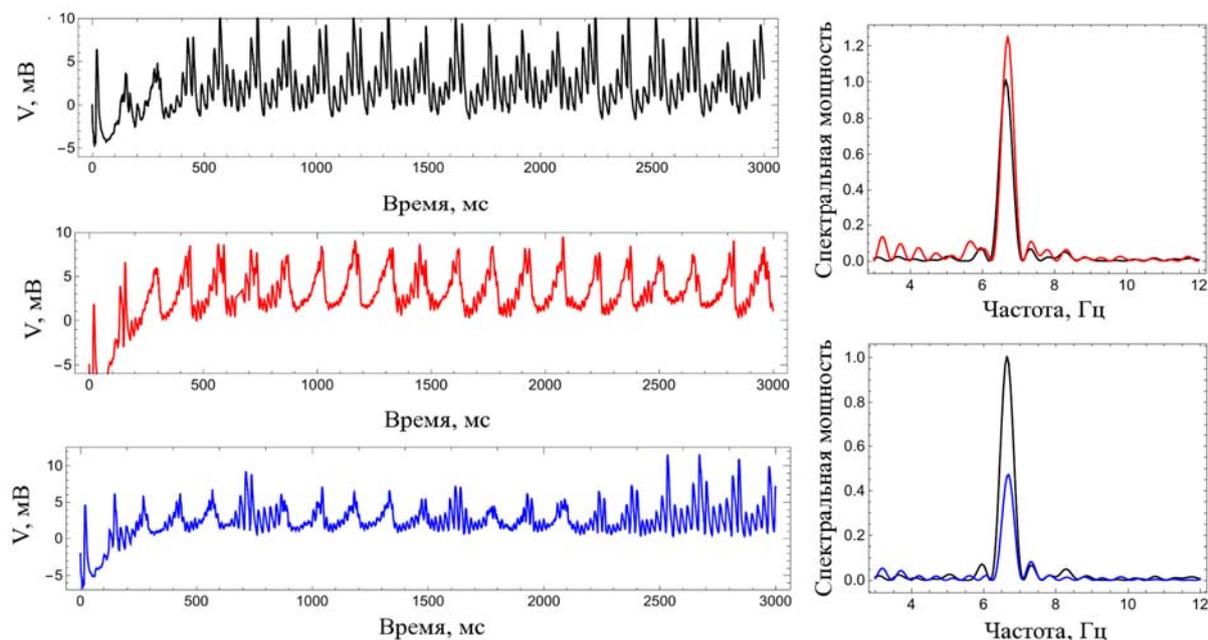


Рисунок 3. Расчет потенциала локального поля V коллективных колебаний нейронной сети и соответствующих спектров в θ -диапазоне частот для случаев нативной формы рецептора (черный), мутации p.Arg540His (красный) и делеции p.Phe671_Gln672del (синий)

дополнительно имеют калиевый ток для длительной деактивации, высокопороговый кальций-зависимый калиевый ток и гиперполяризационный ток h-типа.

Все нейроны в сети связаны синаптическими контактами, образующими обратные связи. Пространственная архитектура сети принципиально не отличается от реальной морфологии. Все пирамидальные нейроны посылают возбуждающие сигналы в интернейроны и другие пирамидальные клетки через синапсы AMPA и NMDA. Интернейроны связаны друг с другом и пирамидальными нейронами с помощью тормозных синапсов GABA(A). Для имитации входных сигналов от ЕС и других областей головного мозга к пирамидальным клеткам и OLM-интернейронам добавляется стимуляция постоянного тока, соответственно. Для модуляции *theta*-ритма от MS к интернейронам применялись ритмические сигналы GABA(A). Код модели 139421 из базы ModelDB был изменен в среде моделирования NEURON в соответствии с расчетными свойствами NMDA-рецепторов по формуле (3).

Для моделирования коллективных колебаний (ритмов), генерируемых нейронными сетями, рассчитывался потенциал локального поля, представляющий собой суммарную активность по всем пирамидальным клеткам областей CA1-CA3 гиппокампа. После выполнения Фурье-преобразования рассчитывалась спектральная мощность сигнала в частотных диапазонах 4-7 Гц (*theta*-ритм) и 30-50 Гц (*gamma*-ритм). В результате удалось исследовать влияние мутаций, кодирующих белковые субъединицы NMDA-рецепторов, на генерацию ритмов нейронной сетью (рис. 3). Все исследованные виды мутаций приводили к подавлению *gamma*-осцилляций. Рассмотренные «эпилептические» мутации вызывают либо небольшое повышение частоты *theta*-ритма (p.Arg540His), либо изменение спектра колебаний (p.Asn615Leu, p.Val618Gly). Однако было выявлено, что подача в нейронную сеть сигнала-возмущения может вызвать очень сильное изменение спектрального состава колебания (эпилептический разряд), что согласуется с клиническими данными [8, 11]. Это объясняется отсутствием связывания магния, что приводит к исчезновению порога в вольт-амперной характеристике одиночного рецептора и перевозбуждению нейронной сети. В случае делеций, напротив, было выявлено падение спектральной мощности *theta*-ритма примерно в два раза. Таким образом, сложные генетические повреждения в наибольшей степени будут приводить к ухудшению работы ионного канала NMDA-рецептора, что может объяснить нарушения функций ЦНС после действия плотно-ионизирующих излучений [2, 4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен подход, позволяющий количественно учесть влияние мутаций в генах нейронов гиппокампа на состояние синаптических рецепторов. Модельный подход был опробован на известных из эксперимента эффектах от мутаций в трансмембранном домене, приводящих к эпилептическим расстройствам. Анализ полученных структур позволил определить изменение проводимостей ионного канала, которые сильно уменьшались в случае делеции. Точковые мутации вызывают незначительные изменения проводимости ионного канала, однако, в ряде случаев могут приводить к нарушению связывания ионов магния. По характеру активности нейронной сети и соответствующей электроэнцефалограмме можно судить о макроскопическом эффекте конкретного типа мутантной структуры.

Полученные результаты могут быть применены при выявлении причин нейродегенеративных заболеваний, а также при оценке возможных когнитивных нарушений, возникающих в результате воздействия радиации и других негативных факторов внешней среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 17-29-01007).

Список литературы / References:

1. Григорьев А.И., Красавин Е.А., Островский М.А. К вопросу о радиационном барьере при пилотируемых межпланетных полетах. *Вестник Российской академии наук*, 2017, т. 87, № 1, с. 65-69. [Grigoriev A.I., Krasavin E.A., Ostrovsky M.A. On the radiation barrier in manned interplanetary flights. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2017, vol. 87, no. 1, pp. 65-69. (In Russ.)]
2. Shi L., Adams M.M., Long A., Carter C.C., Bennett C., Sonntag W.E., Nicolle M.M., Robbins M., D'Agostino R.Jr., Brunso-Bechtold J.K. Spatial learning and memory deficits after whole-brain irradiation are associated with changes in NMDA receptor subunits in the hippocampus. *Radiat. Res.*, 2006, vol. 166, pp. 892-899.
3. Burnashev N., Szepietowski P. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2015, vol. 20, pp. 73-82.
4. Boreyko A.V., Bugay A.N., Bulanova T.S., Dushanov E.B., Jezkova L., Kulikova E.A., Smirnova E.V., Zadneprianeț M.G., Krasavin E.A. Clustered DNA double-strand breaks and neuroradiobiological effects of accelerated charged particles. *Physics of Particles and Nuclei Letters*, 2018, vol. 15, no. 5, pp. 551-561.
5. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kale L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput Chem.*, 2005, vol. 26, no. 16, pp. 1781-1802.
6. Tajima N., Karakas E., Grant T., Simorowski N., Diaz-Avalos R., Grigorieff N., Furukawa H. Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature*, 2016, vol. 534, no. 7605, pp. 63-68.
7. Sali A., Blundell T. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.*, 1993, vol. 234, no. 3, pp. 779-815.
8. Lemke J.R., Hendrickx R., Geider K., Laube B., Schwake M., Harvey R.J., James V.M., Pepler A., Steiner I., Hortnagel K., Neidhardt J., Ruf S., Wolff M., Bartholdi D., Caraballo R., Platzer K., Suls A., Jonghe P.D., Biskup S., Weckhuysen S. GRIN2B mutations in west syndrome and intellectual disability with focal epilepsy. *Ann Neurol.*, 2014, vol. 75, no. 1, pp. 147-154.
9. Grubmüller H., Groll V. Solvate. *Max Plank Institute for Biophysical Chemistry*, 2013. URL: <http://www.mpibpc.mpg.de/grubmueller/solvate>
10. Smart O.S., Neduvell J.G., Wang X., Wallace B.A., Sansom M.S. HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J. of Molec. Graphics*, 1996, vol. 14, no. 6, pp. 354-360.
11. Fedele L., Newcombe J., Topf M., Gibb A., Harvey R.J., Smart T.G., Disease-associated missense mutations in GluN2B subunit alter NMDA receptor ligand binding and ion channel properties. *Nat. Commun.*, 2018, vol. 9, p. 957.
12. Cutsuridis V., Graham B.P., Cobb S., Vida I. Hippocampal Microcircuits. *A Computational Modeler's Resource Book*. Springer-Verlag New York, 2010. ISBN: 978-1-4419-0995-4. P. XI, 617.
13. Neymotin S.A., Lazarewicz M.T., Sherif M., Contreras D., Finkel L.H., Lytton W.W. Ketamine disrupts theta modulation of gamma in a computer model of hippocampus. *J. Neurosci.*, 2011, vol. 31, no. 32, pp. 11733-11743.
14. Tort A.B., Rotstein H.G., Dugladze T., Gloveli T., Kopell N.J. On the formation of gamma-coherent cell assemblies by oriens lacunosum-moleculare interneurons in the hippocampus. *PNAS*, 2007, vol. 104, no. 33, pp. 13490-13495.
15. Jahr C., Stevens C. Voltage dependence of NMDA-activated macroscopic conductances predicted by single-channel kinetics. *J. Neurosci.*, 1990, vol. 10, no 9, pp. 3178-3182.

EFFECT OF MUTANT FORMS OF SYNAPTIC NMDA RECEPTORS ON OSCILLATIONS IN NEURAL NETWORKS

Aksenova S.V., Batova A.S., Bugay A.N., Dushanov E.B.

Joint Institute for Nuclear Research

Joliot Curie str, 6, 141980, Dubna, Russia; e-mail: dushanov@jinr.ru

Abstract. In the present work, molecular dynamics simulation of the ion channel activation of mutant forms of the NMDA receptor was carried out. The bi and triheteromeric forms of the receptor with different compositions of the subunits were analyzed. The conductivity of the ion channel was calculated according to the HOLE program, as well as by analyzing the binding of magnesium ions. The analysis of the structures obtained made it possible to determine the change in the conductivities of the ion channel, which strongly decreased in the case of double point mutations and deletions. The data obtained were used in the hippocampal neural network model in the NEURON package. As a result, it was possible to investigate the effect of mutations encoding the protein subunits of the NMDA receptors on the generation of *theta* and *gamma* rhythms.

Key words: *CNS, hippocampus, gene mutations, modelling.*