

УДК: 577.352.465

Молекулярное моделирование и динамика комплексов серотонинового 5-HT₃ рецептора с лигандами

А. В. Попинако

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Биологический факультет,
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: popinakoav@gmail.com

Получено 19 июня 2011 г.,
после доработки 10 августа 2011 г.

Вопрос взаимодействия определенного рецептора с лигандами является ключевым в области клеточной сигнализации, но решается он на молекулярном уровне. Для улучшения понимания молекулярных механизмов взаимодействия серотонинового рецептора с лигандами были применены различные биофизические методы компьютерного моделирования. Модель трехмерной структуры надмембранного домена серотонинового 5-HT₃ рецептора человека была построена по гомологии с никотиновым ацетилхолиновым рецептором nAChR (PDB ID: 2BG9). Методом докинга были получены комплексы 5-HT₃ рецептора с лигандами. Методом молекулярной динамики исследовано взаимодействие серотонинового 5-HT₃ рецептора с лигандами и показана роль различных факторов в стабилизации комплексов.

Ключевые слова: мембранные рецепторы, лиганды, молекулярная динамика

Molecular modeling and dynamics of serotonin 5-HT₃ receptor and ligands

A. V. Popinako

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninskie Gory 1, bld 12, Moscow, 119991

Abstract. — The problem of ligand binding to certain receptor proteins is of central importance in cellular signaling, but it is still unresolved at a molecular level. In order to enhance our understanding of the molecular mechanisms we used a biophysical approach to study a serotonin-gated ion channel. The molecular model of 5-HT₃ receptor extracellular domain was created using computer-based homology modeling. The docking method was used for building complexes of the 5-HT₃ receptor and ligands. Some different activities were investigated by the method of molecular dynamics

Keywords: membrane receptors, ligands, molecular dynamics

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2011, vol. 3, no. 3, pp. 329–334 (Russian).

Работа проведена при финансовой поддержке РФФИ (10-04-01182) и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы».

© 2011 Анна Владимировна Попинако

Введение

Работа ионных каналов (ИК) обеспечивает многие жизненно важные процессы на уровне целого организма. С нарушением функций ИК связаны такие болезни, как: мигрень, неврологические заболевания, шизофрения, депрессия, зависимость [Thompson, Lummis, 2007] и различные виды каналопатий [Kass, 2005]. Разработка способов лечения данных заболеваний невозможна без исследования взаимодействий различных форм лигандов и каналов с целью создания препаратов нового поколения с заданной активностью и селективностью.

Представители семейства лиганд-зависимых ионных каналов (ИК) определяют широкий спектр физиологических функций и традиционно вызывают интерес как потенциальные мишени для лекарств. Данные каналы присутствуют в различных типах клеток, включая и клетки прокариот. Изучение пространственной структуры, динамики ИК представляет также общебиологический интерес, так как способствует пониманию общих механизмов работы каналов на молекулярном уровне. В данной работе проводится анализ динамики взаимодействия серотонинового 5-HT₃ рецептора с лигандами. Данные структурного анализа сопоставлены с результатами молекулярно-динамических расчетов. Были выявлены остатки, оказывающие влияние на связывание рецептора с лигандами, и показана роль различных факторов в стабилизации комплексов.

По данным D. C. Reeves, эволюционно 5-HT₃ рецептор — самый древний представитель семейства каналов цис-петли суперсемейства лиганд-зависимых ионных каналов [Reeves, Lummis, 2002]. Возможно, этот рецептор является общим предком всего семейства лиганд-зависимых ионных каналов.

Представители рецепторов цистеиновой петли никотиновый ацетилхолиновый рецептор, GABA_A рецептор, GABA_C рецептор (ГАМК), глициновый рецептор и серотониновый 5-HT₃ рецептор имеют схожее строение [Thompson, Lester, Lummis, 2010] и представляют собой пентамеры белковых трансмембранных субъединиц, расположенных псевдосимметрично вокруг центральной проводящей ионы поры. Каждая субъединица рецептора состоит из надмембранного (с сайтами присоединения лиганда), трансмембранного и внутриклеточного доменов (Рис. 1а).

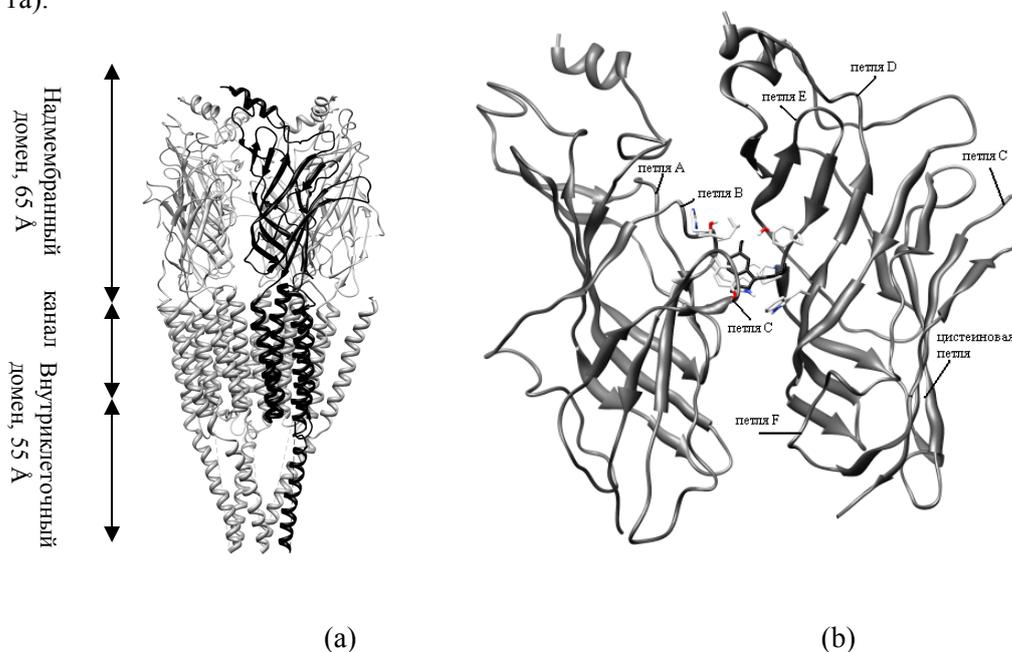


Рис. 1. (а) Схема типичной субъединицы представителя семейства рецепторов цистеиновой петли. (б) Надмембранный домен рецептора цистеиновой петли и лиганд-связывающий сайт

Все рецепторы цистеиновой петли обладают уникальным свойством: один и тот же белок является одновременно и рецептором, и ионным каналом. Данная особенность позволяет рецепторам преобразовывать химический сигнал пресинаптического высвобождения нейромедиатора в синапсах в постсинаптический электрический потенциал.

Таким образом, лиганд-зависимые каналы обладают двумя основными свойствами: селективной проводимостью ионов, которая определяется внутренним интерьером поры, и гейтингом — процессом активации проводимости (открывания) канала в ответ на связывание с лигандами. Пора канала может находиться в двух состояниях: закрытом и открытом, переход между которыми происходит под действием связывания двух молекул лиганда с надмембранной частью рецептора. Экспериментально установлено, что процесс активации лиганд-зависимых ионных каналов определяется конформационными изменениями каналов после связывания с лигандами.

В лиганд-связывающем сайте рецепторов цистеиновой петли при помощи дисульфидных связей между остатками цистеина сформирована петля для присоединения лиганда (Рис. 1b).

Мессенджер серотонинового 5-HT₃ рецептора — серотонин (5-гидрокситриптамин). Он связывается с надмембранной частью серотонинового рецептора и запускает пассивный транспорт ионов через мембрану. На данный момент изучение взаимодействия лигандов-модуляторов, изменяющих реакцию рецептора и 5-HT₃ рецептора, представляет особый интерес для разработки и производства новых лекарственных препаратов. Специфическое блокирование нервной проводимости позволяет использовать некоторые лиганды в качестве избирательно действующих агентов при электрофизиологических и клинических исследованиях.

Таким образом, изучение взаимодействия мишеней и высокоселективных лигандов актуально не только при разработке новых лекарств, но и для фундаментальных исследований.

В работе изучалось взаимодействие надмембранной части серотонинового рецептора, моделируемого по гомологии и молекулами серотонина, оланзапина.

Материалы и методы

С помощью программы для докинга Leadfinder [Fedor, Novikov, 2011] и моделирования по гомологии в программе MODELLER [Fiser, Sali, 2003] были получены модели структур комплексов серотониновый рецептор — лиганд (рис. 1b).

Сравнение структуры внеклеточного домена 5-HT₃ со структурой nAChR показывает, что петля С играет ключевую роль в связывании с лигандом. Петля С выполняет большое относительное смещение при соединении лиганда с мишенью [Thompson and Lummis, 2006].

Таблица 1. Номера остатков в петлях для двух А-субъединиц 5-HT₃ рецептора человека. Черным цветом обозначены важные для связывания лигандов остатки

Петли	Последовательность	Номера остатков (субъединица 1)	Номера остатков (субъединица 2)
A	SIPTDSI W VPDIL I NE F V	75–92	284–301
B	CSLTFTS W LHTIQD	137–150	346–359
C	YFREFSMESSN Y AEMKF	183–200	392–409
D	TTY I W Y RQ Y WTDEFL	47–61	256–270
E	Y V Y I RHQGEVQ N Y	102–114	311–323
F	W RLPEKVKSDR S VFMNQGE	156–174	365–383

Согласно литературным данным [Thompson and Lummis, 2006], важные для связывания с лигандом остатки (Phe 300, Glu 299 в петле А и Trp 353 в петле В и некоторые другие) являются консервативными остатками в серотониновом и ацетилхолиновом рецепторах. Этот реги-

он, включающий петлю С, петлю В, петлю А и соседние листы субъединицы, участвует в формировании кармана сайта связывания лигандов [Thompson and Lummis, 2006].

Были проведены расчеты молекулярной динамики и с их помощью оценена стабильность комплексов, конформационные преобразования и изменения энергии.

После стабилизации полной энергии систем был проведен расчет рабочих траекторий со следующим протоколом:

- пакет молекулярной динамики: Gromacs;
- потенциальное поле: OPLS;
- интегратор sd;
- используемые термостаты: стохастическая динамика;
- постоянная термостатирования: $\tau = 0.2$ пс;
- длина траектории: 1.5 нс;
- тип воды spc;
- температура термостата: 300 К;
- радиус обрезания для кулоновских взаимодействий $Rel = 2$ нм;
- радиус обрезания для сил Ван-дер-Ваальса $RVdW = 2$ нм;
- шаг интегрирования: $dt = 2$ фс.

Система стремится к уменьшению поверхности. В связи с этим производилась фиксация С-альфа атомов углерода концевых остатков субъединиц.

Результаты и обсуждения

Были рассчитаны потенциальная энергия системы и энергетические вклады с целью детальной характеристики энергии взаимодействия серотонина с комплексом (Рис. 2).

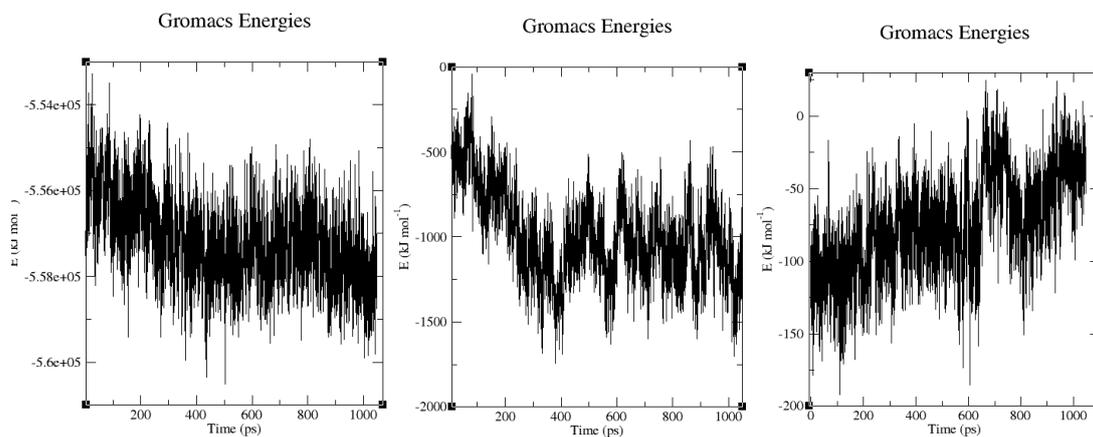


Рис. 2 Потенциальная энергия системы и энергетические вклады. Справа налево: (а) — потенциальная энергия системы, (б) — кулоновские взаимодействия между субъединицами 1–2, (с) — кулоновские взаимодействия между серотонином и субъединицами

Из Рис. 2 видно, что суммарная средняя энергия системы уменьшается и через 400 пс достигает равновесия, что связано с динамической релаксацией. Причем энергия кулоновских взаимодействий между субъединицами 1–2 также уменьшается, а между серотонином и субъединицами растет.

Через 800 пс петля С смещается, и начинается перестройка остатков, непосредственно взаимодействующих с лигандом, что вызывает небольшое увеличение потенциальной энергии на временах в диапазоне от 700 пс до 900 пс. Далее конформация белка приходит в равновесное состояние и значение энергии стабилизируется.

На Рис. 2b показано изменение кулоновских взаимодействий между двумя субъединицами. Так же как и для полной потенциальной энергии, в первые 300 пс наблюдается резкое уменьшение кулоновской энергии, что обусловлено конформационной перестройкой С-петли. При этом аминокислотные остатки рецептора сближаются и образуются водородные связи, удерживающие С-петлю в открытом состоянии. Далее, после 800 пс кулоновская энергия обеих систем выходит на плато, при этом видно, что средняя кулоновская энергия системы 2 субъединиц ниже, чем комплекса и серотонина (рРис. 2с). Таким образом, взаимодействие рецептора с серотонином является энергетически выгодным. Всплеск средней кулоновской энергии между комплексом и серотонином (Рис. 2с), вероятно, связан с поворотом серотонина в сайте связывания.

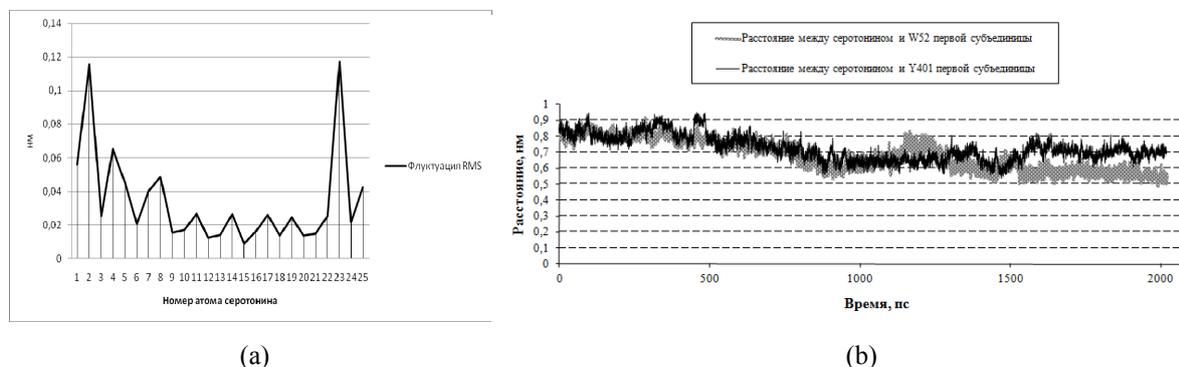


Рис. 3. (a) Флуктуации атомов серотонина. (b) Изменение средноквадратичного отклонения для серотонина и остатка W52. (c) Изменение средноквадратичного отклонения для серотонина и Y401

Из Рис. 3а видно, что наиболее подвижны водороды NH₂ и OH групп. Вероятно, они образуют водородные связи с окружением. Важную роль при взаимодействии с лигандом также играют стекинг-взаимодействия. Ароматические остатки кармана связывания Y 401, W 52 и серотонин лежат друг над другом в стопке (Рис. 1b), что обеспечивает дополнительную стабилизацию комплекса — стекинг взаимодействие (Рис. 3b,c).

Аналогичная картина наблюдается при взаимодействии серотонинового рецептора с молекулами других лигандов (оланзапина): стекинг-взаимодействия между ароматическими остатками рецептора и лигандов играют решающую роль в стабилизации комплекса.

Данные молекулярной динамики показывают, что взаимодействие рецептора с лигандами является энергетически выгодным. Состояние С-петли рецептора регулируют кулоновские взаимодействия, а при взаимодействии с лигандами основную роль играет стекинг-взаимодействие.

Список литературы

- Andrew J. Thompson, Sarah C. R. Lummis.* The 5-HT₃ receptor as a therapeutic target. // *Expert Opin Ther Targets.* — 2007, April. 11(4). — Pp. 527–540.
- Robert S. Kass.* The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease. // *J. Clin. Invest.* Volume 115. Issue 8. — 2005. — 115(8):1986–1989.

- Reeves D. C., Lummis S. C.* The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel (review). // *Mol. Membr. Biol.* — 2002, Jan–Mar.; 19(1): 11–26.
- Thompson A. J., Lester H. A., Lummis S. C.* The structural basis of function in Cys-loop receptors. // *Q. Rev. Biophys.* — 2010, Nov.; 43(4): 449–99.
- Fedor N. Novikov, Alexey A. Zeifman, Oleg V. Stroganov, Viktor S. Stroylov, Val Kulkov and Ghermes G. Chilov.* CSAR Scoring Challenge Reveals the Need for New Concepts in Estimating Protein–Ligand Binding Affinity. // *J. Chem. Inf. Model.* Article ASAP. May 25, 2011.
- Fiser A., Sali A.* MODELLER: Generation and refinement of homology-based protein structure models. // *Macromolecular Crystallography, Pt D* 374, 2003, 461.
- A. J. Thompson and S. C. R. Lummis.* 5-HT₃ receptors. // *Curr. Pharm. Des.* — 2006, 12(28): 3615–3630.