

УДК 544.165:544.187.2:548.3

**РОЛЬ КОНСЕРВАТИВНОЙ МЕЖСПИРАЛЬНОЙ ВОДОРОДНОЙ СВЯЗИ
SER74—TRP158 В САЙТЕ СВЯЗЫВАНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА
В КОНФОРМАЦИОННОЙ СТАБИЛЬНОСТИ β_2 -АДРЕНОРЕЦЕПТОРА
(МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ)**

Т.В. Богдан, Е.С. Алексеев

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Россия
E-mail: chemist2014@yandex.ru

Статья поступила 12 мая 2016 г.

С целью выяснения роли эволюционно консервативной межспиральной водородной связи (МВС) Ser74—Trp158 в поддержании конформационной устойчивости β_2 -адренорецептора в настоящей работе с помощью метода молекулярной динамики исследовано конформационное поведение рецептора при наличии и отсутствии МВС. Получено, что разрыв МВС Ser74—Trp158 может вызвать дальнейшие конформационные трансформации (сдвиги спиралей, изменения конформации отдельных аминокислотных остатков). Мутация S74A в рецепторе, которая делает невозможным образование МВС, также приводит к конформационным перестройкам: в присутствии холестерина мутированный рецептор переходит в конформацию, близкую к активной форме.

DOI: 10.15372/JSC20170224

Ключевые слова: β_2 -адренорецептор, межспиральная водородная связь Ser74—Trp158, мутация S74A, молекулярно-динамическое моделирование.

ВВЕДЕНИЕ

β_2 -Адренорецептор (β_2 AR) (рис. 1, а) является представителем родосиноподобных семи-спиральных мембранных рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR). β_2 AR управляет сокращениями гладких мышц органов и тканей, и с его функционированием связаны проявления ряда заболеваний: гипертонии, бронхиальной астмы, дисфункции родовой деятельности и другие. Роль мембранных рецепторов состоит в передаче сигнала из внеклеточного пространства внутрь клетки, что происходит путем последовательной смены конформаций рецептора: сначала под действием молекулы гормона изменяется конформация внеклеточного участка, далее последовательно изменяются конформации трансмембранной и внеклеточной частей — рецептор активируется. Таким образом, активная и неактивная формы рецептора отличаются, прежде всего, сдвигами и поворотами трансмембранных спиралей и отдельных аминокислотных остатков. Образование молекулярных комплексов рецепторов с различными лигандами, а также внесение точечных мутаций в аминокислотную последовательность этих белков смещает конформационное равновесие в сторону определенного ансамбля конформеров, стабилизируя функционально-значимые формы рецептора [1, 2]. Состав липидных мембран также оказывает влияние на конформационно-динамическое поведение рецепторов GPCR-семейства [3—5]. Например, в обогащенных холестерином мембранах термическая стабильность β_2 -адренорецептора увеличивается [3, 5], а при дефиците холестерина механизм передачи сигнала

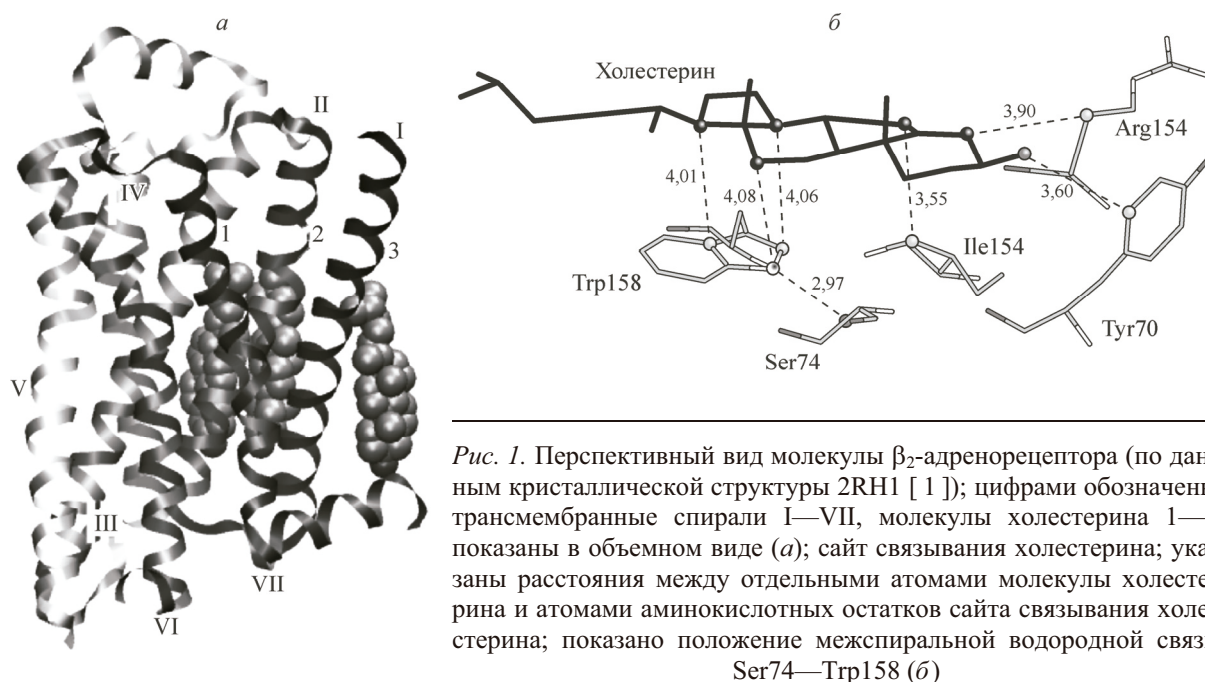


Рис. 1. Перспективный вид молекулы β_2 -адренорецептора (по данным кристаллической структуры 2RH1 [1]); цифрами обозначены трансмембранные спирали I—VII, молекулы холестерина 1—3 показаны в объемном виде (а); сайт связывания холестерина; указаны расстояния между отдельными атомами молекулы холестерина и атомами аминокислотных остатков сайта связывания холестерина; показано положение межспиральной водородной связи Ser74—Trp158 (б)

изменяется [4]. Эти данные свидетельствуют о способности холестерина стабилизировать определенные конформационные формы, отвечающие за функциональное поведение рецептора.

В ряду родственных семиспиральных трансмембранных рецепторов положение участка прикрепления молекулы холестерина сохраняется — она находится во "впадине" между II и IV спиралями. В работе [3] для ряда мембранных рецепторов был охарактеризован консенсусный мотив аминокислотных остатков, которые находятся в контакте с молекулой холестерина. В работе [6] авторы, проводя эволюционный анализ, обратили внимание, что в сайте связывания холестерина (CCX) β_2 -адренорецептора существует межспиральная водородная связь (МВС) между аминокислотными остатками серина Ser74 и триптофана Trp158 (см. рис. 1, б) — одного из остатков, составляющих консенсусный мотив. Данная МВС является эволюционно консервативной и также существует в ряду родственных рецепторов. Ранее в литературе было показано, что подобные межспиральные водородные связи отвечают за поддержание конформации трансмембранной области рецептора [7].

С целью установить роль высококонсервативной МВС Ser74—Trp158 в конформационных переходах β_2 -адренорецептора, в настоящей работе с помощью метода классической молекулярной динамики исследовано поведение рецептора при наличии и при отсутствии данной МВС. Были рассмотрены две модели рецептора: нативный и мутированный, в мутированном рецепторе вследствие замены остатка Ser74 на Ala74 МВС отсутствовала.

МОЛЕКУЛЯРНО-ДИНАМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ

Создание модели. В качестве модели β_2 AR были взяты данные рентгеноструктурного эксперимента наилучшим разрешением [1], PDB ID: 2RH1 [8]. В независимой части кристаллографической элементарной ячейки данной структуры находятся две молекулы рецептора, на каждую из которых приходится одна молекула обратного агониста каразолола и три молекулы холестерина (см. рис. 1, а). Для создания модели рецептора в гидратированном липидном бислое использовали координаты одной из независимых молекул. Аминокислотные остатки с Asn1002 по Tyr1161, соответствующие искусственно введенной аминокислотной последовательности (Т4-лизоцим) для получения кристаллов хорошего качества, были удалены. Молекулу рецептора помещали в модельную мембрану с помощью сервиса CHARMM Membrane Builder [9].

В качестве компонента липидного бислоя был выбран липид 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицерофосфохолин (POPC). Моделирование проводили в тетрагональной расчетной ячейке ($X = Y \neq Z$). Длину оси X (и Y) определяли числом молекул POPC в бислое (140), при этом отношение площади поверхности липида (4781 \AA^2) к площади поверхности рецептора (2500 \AA^2) составило 1,91. Полученный липидный слой был окружен молекулами воды, длину оси Z определяли толщиной водного слоя, она была не менее 15 \AA с каждой стороны.

Расчетная ячейка состояла из одной молекулы рецептора, одной молекулы обратного агониста каразолола, 140 молекул POPC и 15200 молекул воды, всего 58286 атомов (**система 1**). Размеры расчетной ячейки составили $77,76 \times 77,76 \times 101,94 \text{ \AA}$. Минимизацию энергии полученной системы проводили с помощью программного пакета GROMACS [10].

Для исследования поведения рецептора в отсутствие MBC была проведена мутация исходного β_2 -адренорецептора: аминокислотный остаток серина Ser74 был замещен на остаток аланина Ala74. В качестве исходной модели для мутированного рецептора была взята предварительно минимизированная система **1**, в которой OH-группа в аминокислотном остатке Ser74 была замещена на атом водорода, после чего энергия полученной системы была минимизирована (**система 2**).

Поскольку исследуемая MBC находится в непосредственной близости от ССХ, была создана **система 3** — с молекулами холестерина (расположенными как в кристаллической структуре 2RH1). Кроме того, была создана система с мутированным рецептором (без MBC) с молекулами холестерина — **система 4**. В качестве исходной модели для системы **4** была взята предварительно минимизированная структура из системы **3**.

Энергию моделируемых систем минимизировали методом скорейшего спуска с шагом $0,01 \text{ нм}$ с помощью программного пакета GROMACS [10]. Минимизацию энергии проводили до тех пор, пока значение силы, действующей на один атом, не превышало $100 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{нм}^{-1}$.

Молекулярно-динамическое моделирование. Молекулярно-динамические траектории были получены с помощью программного пакета GROMACS на базе суперкомпьютера "Ломоносов" НИВЦ МГУ. Моделирование проводили с наложением периодических граничных условий в NPT -ансамбле при давлении $P_x = P_y = 2 \text{ атм}$ и $P_z = 1 \text{ атм}$ и при $T = 323,0 \text{ К}$. Выбор данных условий моделирования, как и в работе [11], обусловлен стремлением увеличить конформационную подвижность рецептора и, соответственно, количество конформационных состояний. Для молекул рецептора и липидов использованы параметры силового поля CHARMM36 [12], для молекул воды — TIP4P. Параметры для каразолола заимствованы из силового поля CHARMM27 [13]. Для интегрирования уравнений движения использовали алгоритм leap-frog с шагом интегрирования $0,002 \text{ пс}$. Для поддержания постоянных температуры и давления использовали термостат Нозе—Гувера и баростат Берендсена. Для вычисления кулоновских взаимодействий использовался алгоритм PME (Particle-Mesh Ewald) с радиусом отсечения 10 \AA . Радиус отсечения ван-дер-ваальсовых взаимодействий также составил 10 \AA .

Были получены молекулярно-динамические траектории с записью точек траектории каждые 10 пс : для системы с немутированным рецептором — две траектории длиной 650 нс (**система 1**) и 500 нс (**система 1a**), для системы с мутированным рецептором — одна траектория длиной 650 нс (**система 2**), для немутированного рецептора с холестерином — две траектории длиной 650 нс и 450 нс (**системы 3** и **3a** соответственно), для системы с мутированным рецептором в присутствии холестерина (**система 4**) — 650 нс .

Конформационные изменения рецептора отслеживали по торсионным углам отдельных аминокислотных остатков и расстояниям между остатками в функционально значимых сайтах связывания холестерина и агониста, а также во внутриклеточной области рецептора.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В первую очередь мы проанализировали, как ведет себя MBC Ser74—Trp158 за время моделирования. На рис. 2 приведены изменения длины водородной связи $O \dots N$ (расстояния между атомом кислорода аминокислотного остатка серина Ser74 и атомом азота индольного кольца

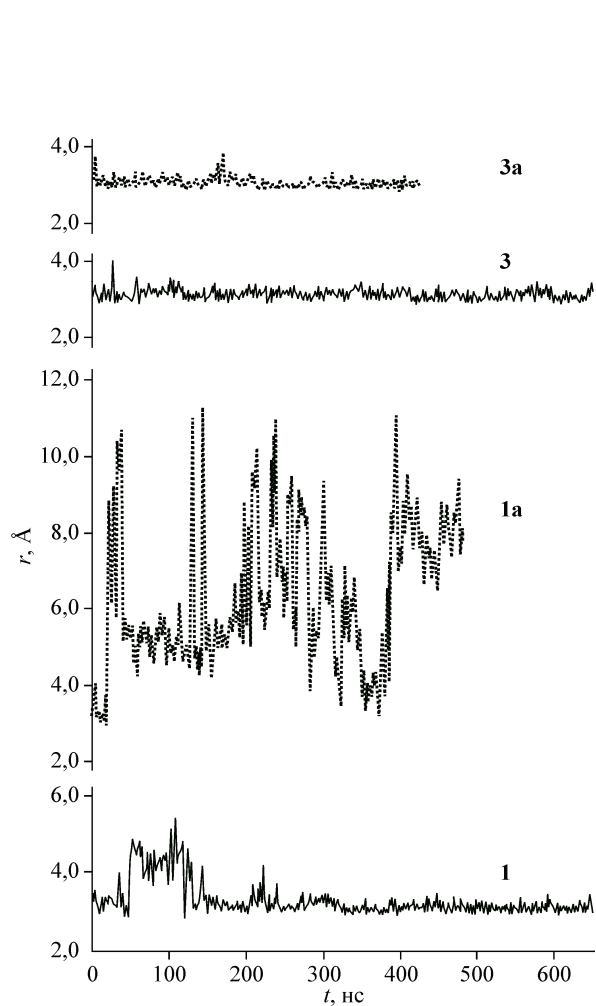


Рис. 2. Изменение расстояния между атомами азота и кислорода, вовлеченными в образование водородной связи Ser74—Trp158

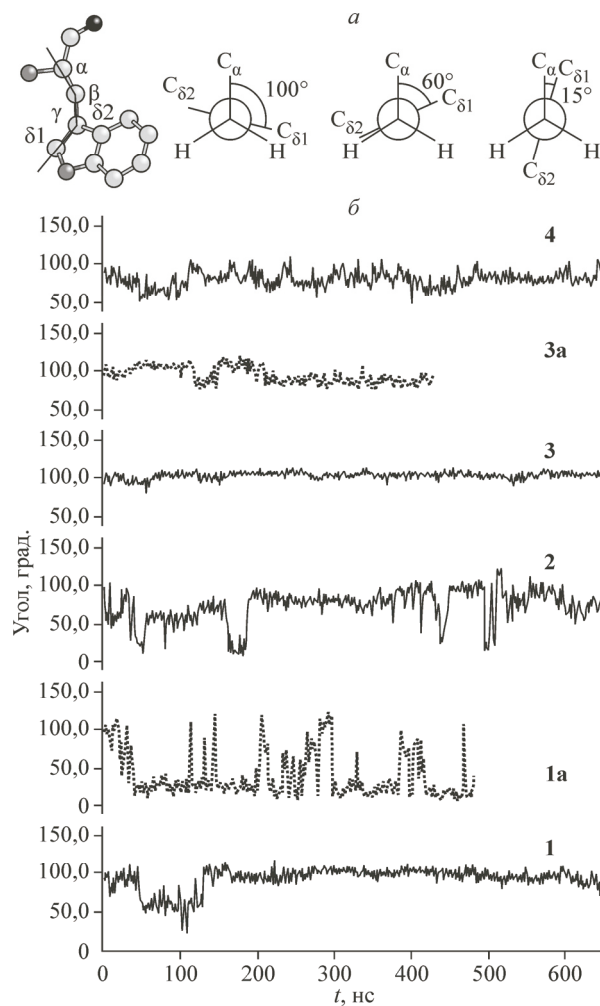


Рис. 3. Изменение торсионного угла остатка Trp158 за время моделирования: атомы, образующие торсионный угол, и проекции Ньюмана для конформаций с углами 100°, 60° и 20° (а); значение угла для систем **1**, **1a**, **3**, **3a** (б)

остатка триптофана Trp158) для идентичных систем **1** и **1a**. Оказалось, что в системе **1** МВС была разорвана с 50 по 150 нс моделирования, далее восстановилась и сохранялась до конца времени моделирования. В системе **1a** МВС разорвалась через 20 нс от начала моделирования и более не восстанавливалась. Таким образом, исследуемая водородная связь не является устойчивой.

Конформационные изменения в сайте связывания холестерина, происходящие во время разрыва МВС, мы отслеживали по изменению торсионного угла $C_\alpha-C_\beta-C_\gamma-C_{\delta 1}$ в аминокислотном остатке триптофана Trp158 (рис. 3): при сохранении МВС данный торсионный угол составляет около 100°, а при разрыве МВС в системе **1** уменьшается до 60°, а в системе **1a** — до 20°, последнее сопровождается значительным увеличением расстояния между спиралью II и IV (до 10 Å). Значение торсионного угла 100° отвечает заслоненной конформации остатка триптофана. Таким образом, энергия образования МВС Ser74—Trp158 компенсирует нахождение остатка Trp158 в энергетически невыгодной конформации.

При наличии молекулы холестерина в сайте связывания (в системах **3** и **3a**) наблюдается сохранение значения торсионного угла $C_\alpha-C_\beta-C_\gamma-C_{\delta 1}$ в аминокислотном остатке Trp158

близким к 100° (см. рис. 3). При этом длина водородной связи N...O составляет $3,2 \text{ \AA}$ и практически не изменяется за время моделирования, что свидетельствует о сохранении МВС (системы **3** и **3a**, см. рис. 2). Таким образом, если в системах без молекул холестерина (**1** и **1a**) водородная связь может разрываться, то в системах с холестерином МВС Ser74—Trp158 сохраняется и конформация ССХ остается стабильной.

Кроме того, торсионный угол остатка Trp158 в системах с холестерином (**3**, **3a**, **4**) практически не изменялся за время моделирования, а в системах без холестерина (**1**, **1a**, **2**) — изменялся значительно. Таким образом, в системах с холестерином мы наблюдаем сохранение МВС Ser74—Trp158 и стабилизацию геометрии ССХ. Но не исключена и другая зависимость: успешное "прикрепление" молекулы холестерина к рецептору происходит именно при наличии МВС Ser74—Trp158.

Наиболее интересен вопрос о связи конформационных изменений в ССХ с изменениями во внутриклеточном пространстве, поскольку последние отвечают за процесс запуска биохимических реакций в клетке. Прежде всего, исследователи обращают внимание на состояние так называемого "ионного замка" — солевого мостика, образованного остатками Arg131 и Glu268 [14]. Состояние с разрушенным солевым мостиком исследователи относят к конформации, близкой к активному состоянию рецептора, а с образованным — к неактивному. На рис. 4 приведены расстояния между атомами C_α аминокислотных остатков Arg131 и Glu268 (расстояние C—C) и между атомом азота боковой цепи Arg131 и атомом кислорода боковой цепи Glu268 (расстояние N—O). Оказалось, что только для системы **1** после кратковременного разрыва МВС Ser74—Trp158 на 50 нс происходит переход системы к устойчивому состоянию с образованным солевым мостиком. В системах **2** и **3** большую часть времени моделирования солевой мостик оказывается разрушенным, хотя наблюдаются кратковременные переходы к состоянию с образованным мостиком. В системах **3a** и **4** образования солевого мостика за время моделирования не наблюдали, т.е. в данном случае системы близки к активному состоянию. Таким образом, при разрыве водородной связи возможны конформационные трансформации рецептора как в сторону активной формы, так и в сторону неактивной.

Близость системы к активации (готовности передачи сигнала из внеклеточного пространства внутрь клетки) можно оценить по изменению конформации отдельных аминокислотных остатков в сайте связывания агониста-гормона, вызывающего процесс активации рецептора. В работе [2] при исследовании кристаллических форм рецептора в активном состоянии было показано, что наиболее значимой характеристикой перехода к активному состоянию в сайте связывания агониста является угол между плоскостями, образованными атомами углерода боковых цепей остатков Ile121 и Phe282. Используя данные эксперимента, описанные в работах [1] и [15], мы определили, что в активированном рецепторе (структура которого описана в работе [15]) этот угол принимает значения, близкие к 90° , тогда как в неактивном состоянии его величина принимает значения, близкие к 40° или 140° (согласно результатам рентгеноструктурного исследования конформации рецептора, близкой к активной [1]). На рис. 5 показано изменение данного угла для исследованных систем. В системах с немутированным рецептором (**1**, **1a**, **3** и **3a**) данный угол принимает значения, отвечающие неактивному состоянию рецептора. В системе **2** исследуемый угол большую часть времени моделирования соответствовал неактивной форме рецептора, однако в первые 100 нс моделирования наблюдали значение угла, соответствующее активной форме. В случае системы **4** (мутированный рецептор в присутствии холестерина) данный угол большую часть времени флуктуировал вокруг значения 90° , т.е. данная система была наиболее близка к активному состоянию. Таким образом, наличие МВС Ser74—Trp158 в немутированном рецепторе препятствует его активации, а отсутствие МВС в мутированном рецепторе делает переход к активной конформации более вероятным.

ВЫВОДЫ

Эволюционно консервативная МВС Ser74—Trp158 расположена в трансмембранной области рецептора $\beta_2\text{AR}$, между II и IV спиралями, вблизи сайта связывания холестерина. В ре-

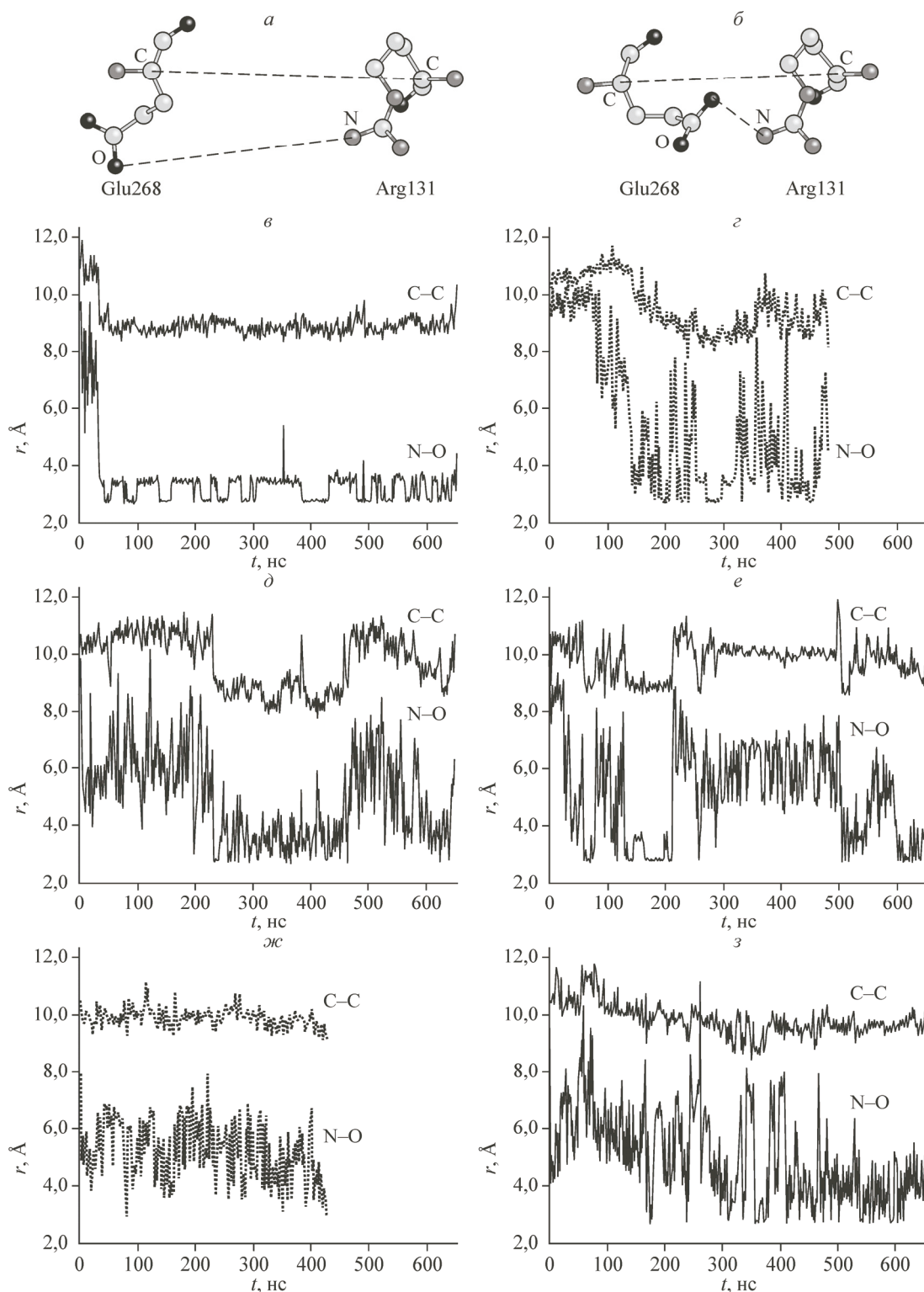


Рис. 4. Состояние солевого мостика между аминокислотными остатками аргинина Arg131 и глутаминовой кислоты Glu268: состояние с разрушенным солевым мостиком (а); состояние с образованным солевым мостиком (б); расстояния C—C между атомами C_{α} аминокислотных остатков Arg131 и Glu268 и N—O между атомами азота боковой цепи остатка Arg131 и кислородом боковой цепи остатка Glu268 для системы **1** (в); то же для системы **1a** (з); то же для системы **2** (д); то же для системы **3** (е); то же для системы **3a** (ж); то же для системы **4** (з)

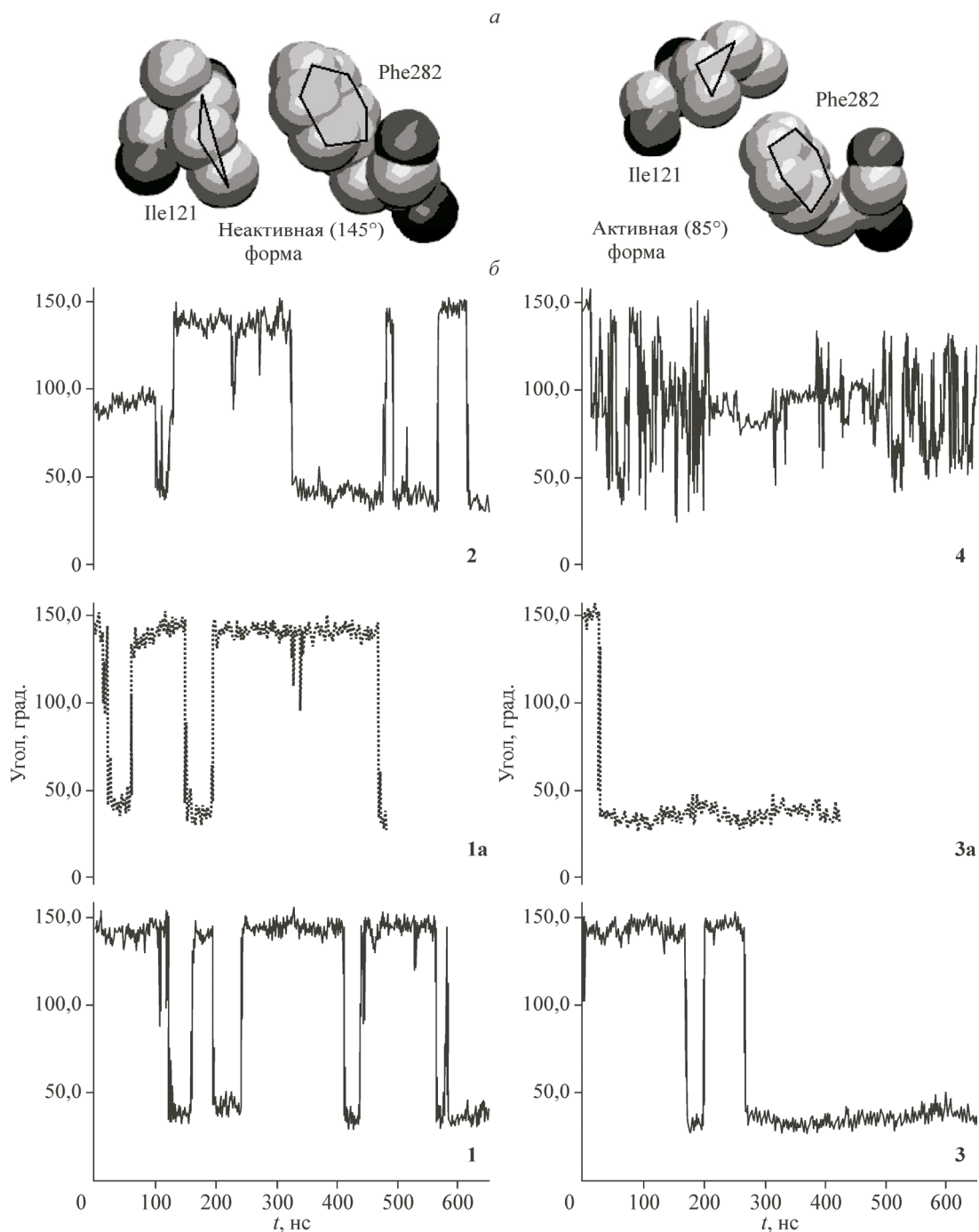


Рис. 5. Изменение угла между плоскостями, образованными атомами углерода боковых цепей аминокислотных остатков Phe121 и Phe282 в сайте связывания агониста: атомы, через которые построены плоскости (*a*); изменение угла между плоскостями для исследованных систем (*b*)

в результате настоящего исследования получено, что процессы образования или разрыва МВС Ser74—Trp158 сопровождаются изменением геометрических характеристик сайта связывания холестерина. При нахождении молекулы холестерина в сайте связывания конформация сайта остается неизменной и МВС Ser74—Trp158 сохраняется. В отсутствие холестерина в сайте связывания рецептора возможен разрыв МВС Ser74—Trp158, что может вызвать дальнейшие конформационные трансформации (сдвиги спиралей, изменения конформации отдельных аминокислотных остатков).

кислотных остатков). Мутация в рецепторе, которая делает невозможным образование МВС, также приводит к конформационным перестройкам: в присутствии холестерина мутированный рецептор переходит в конформацию, близкую к активной форме. Таким образом, образование МВС Ser74—Trp158 важно для поддержания рецептора в неактивном состоянии. Ранее мы отмечали, что наличие холестерина в сайте связывания немутированного рецептора способствует нахождению рецептора в конформационном состоянии, промежуточном между активной и неактивной формой [12]. В настоящем исследовании получено, что данное состояние рецептора будет сохраняться только в случае образования МВС Ser74—Trp158.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S., Kobilka T.S., Choi H.J., Kuhn P., Weis W.I., Kobilka B.K., Stevens R.C. // *Science*. – 2007. – **318**, N 5854. – P. 1258.
2. Rosenbaum D.M., Zhang C., Lyons J.A., Holl R., Aragao D., Arlow D.H., Rasmussen, Choi H.J., DeVree B.T., Sunahara R.K., Chae P.S., Gellman S.H., Dror R.O., Shaw D.E., Weis W.I., Caffrey M., Gmeiner P. // *Nature*. – 2011. – **469**. – P. 236.
3. Hanson M.A., Cherezov V., Griffith M.T., Roth C.B., Jaakola V.-P., Chien E.Y.T., Velasquez J., Kuhn P., Stevens R.C. // *Structure*. – 2008. – **16**, N 6. – P. 897.
4. Xiang Y., Rybin V.O., Steinberg S.F., Kobilka B. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – **277**, N 37. – P. 34280.
5. Zoicher M., Zhang C., Rasmussen S.G.F., Kobilka B.K., Müller D.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. – **109**, N 50. – P. E3463 – E3472.
6. Adamian L., Naveed H., Liang J. // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2011. – **1808**, N 4. – P. 1092.
7. Adamian L., Liang J. // *Proteins: structures, functions, and genetics*. – 2002. – **47**, N 2. – P. 202.
8. <http://pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2rh1>.
9. Jo S., Lim J.B., Klauda J.B., Im W. // *Biophys. J.* – 2009. – **97**, N 1. – P. 50.
10. Berendsen H.J.C., Spoel D. van der, Drunen R. van. // *Comp. Phys. Comm.* – 1995. – **91**, N 1. – P. 43.
11. Alekseev E.S., Bogdan T.V. // *Russ. Chem. Bull.* – 2013. – **62**, N 12. – P. 2567.
12. MacKerell Jr. A.D., Banavali N., Foloppe N. // *Biopolymers*. – 2000. – **56**, N 4. – P. 257.
13. Dror R.O., Arlow D.H., Borhani D.W., Jensen M.Ø., Piana S., Shaw D.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – **106**, N 12. – P. 4689.
14. Ballesteros J.A., Jensen A.D., Liapakis G., Rasmussen S.G., Shi L., Gether U., Javitch J.A. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – **276**. – P. 29171.
15. Rasmussen S.G.F., Choi H.J., Fung J.J., Pardon E., Casarosa P., Chae P.S., DeVree B.T., Rosenbaum D.M., Thian F.S., Kobilka T.S., Schnapp A., Konetzki I., Sunahara R.K., Gellman S.H., Pautsch A., Steyaert J., Weis W.I., Kobilka B.K. // *Nature*. – 2011. – **469**. – P. 175.