

П. Е. Кузнецов, Н. Б. Кузнецова, С. В. Шульгин,
А. В. Шантроха, Е. Н. Дубас

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПЕТЕЛЬ ССК₂ РЕЦЕПТОРА И ИХ СВЯЗЫВАНИЯ С ТЕТРАПЕПТИДОМ ССК-4

¹ Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского

С помощью методов молекулярного моделирования по частичным экспериментальным данным получены равновесные конформации первой и второй внеклеточных петель рецептора холецистокинин-2. Сконструирована модель пространственной структуры фрагмента активного центра ССК₂ рецептора, состоящего из 3 внеклеточных петель, с лигандом тетрапептидом ССК-4. С использованием полученной модели рассмотрен механизм лиганд-рецепторного взаимодействия. В результате молекулярного моделирования обнаружена возможность одновременного переноса протона и электронной плотности с лиганда ССК-4 на аминокислоты рецептора ССК₂. Полученная модель лиганд-рецепторного взаимодействия может служить инструментом для предсказания фармакологического профиля ряда аналогов ССК-4.

Холецистокининовые рецепторы второго типа (ССК₂), локализованные в центральной нервной системе, вовлечены в формирование психоэмоционального состояния человека. Мощным агонистом ССК₂ рецепторов является тетрапептид ССК-4 (Trp-Met-Asp-Phe-NH₂), являющийся С-концевым фрагментом холецистокинина (гастроинтестинального гормона ССК-33, далее ССК) [1]. Молекулярный механизм лиганд-рецепторного взаимодействия ССК-4 и ССК₂ рецепторов в настоящее время до конца не изучен.

ССК-рецепторы относятся к классу родопсиновых рецепторов и к мембранным G-протеин-связывающим белкам (GPCR) [2]. Они состоят из 7 трансмембранных доменов, 3 внеклеточных и 3 внутриклеточных петель. Имеют внеклеточный N-концевой и внутриклеточный C-концевой участки. На рис. 1 представлена схема ССК₂ рецептора согласно данным [3].

Известно, что во взаимодействии с лигандом ССК-8 (Asp-Tyr(SO₃H)-Met-Cly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) участвуют 3 внеклеточных петли ССК₂ рецептора [4]. По данным ЯМР-спектроскопии определена пространственная структура лишь одной внеклеточной петли этого белка — EC3 (аминокислотные остатки 352 – 379, см. Protein Data Bank, www.spdb.org).

Гомология ССК₂ с близкими по структуре белками родопсинового типа позволяет предсказать трехмерную структуру всех внеклеточных петель ССК₂ рецептора. При этом надежность прогноза будет существенно повышаться при учете связывания ССК₂ рецептора с лигандами.

Известны трехмерные структуры петель родопсинового рецептора, аминокислотные последовательности которых наиболее близки к аминокислотной последовательности соответствующих петель рецептора ССК₂ (гомология аминокислотных последовательностей составляет около 35 %). Вместе с тем, фрагменты ССК₂, с которыми взаимодействуют его лиганды, име-

ют гомологию 60 %, что обеспечивает большую точность моделирования.

Наибольший интерес представляют структуры петель EC1 и EC2 рецептора ССК₂, участвующих в связывании с естественным лигандом. На основе пространственных структур петель родопсинового рецептора нами путем точечных аминокислотных замен были сконструированы атомные модели 2 внеклеточных петель ССК₂ рецептора, пространственные структуры которых не известны (EC1 и EC2). Полученные структуры каждой петли оптимизировались последовательно методами молекулярной механики с применением модельного потенциала BIO+ [5] и полуэмпирическим квантово-химическим PM3 [6, 7], реализованными в программном комплексе HyperChem 7e. Для уточнения геометрии и имитации водного микроокружения петли помещали в кубическую ячейку (длина ребра 56,1 Å) с молекулами воды (плотность 1 г · см⁻³) и проводили расчеты полученного комплекса методом молекулярной динамики (силовое поле CHARMM 22 [8], шаг по времени составлял 0,2 фс, расчетное время составляло 10 пс, температуру системы принимали равной 300 °К). В результате моделирования были получены равновесные конформации 2 внеклеточных петель ССК₂ рецептора, приведенные на рис. 2.

Минимальным пептидным фрагментом, узнаваемым ССК₂ рецептором, является тетрапептид ССК-4. ССК-4 проявляет выраженную селективность к ССК₂ рецептору, тогда как ССК-8 связывается как с ССК₁, так и ССК₂ рецепторами [9]. Наиболее вероятная биологически активная конформация (БАК) для ССК-4 была получена в соответствии с литературными данными по связыванию аналогов ССК-4 с ССК₂ рецептором [4] и нашими исследованиями [10]. Полученная БАК ССК-4 представлена на рис. 3.

Чтобы провести моделирование взаимодействия ССК-4 и рецептора, необходимо установить, в какой

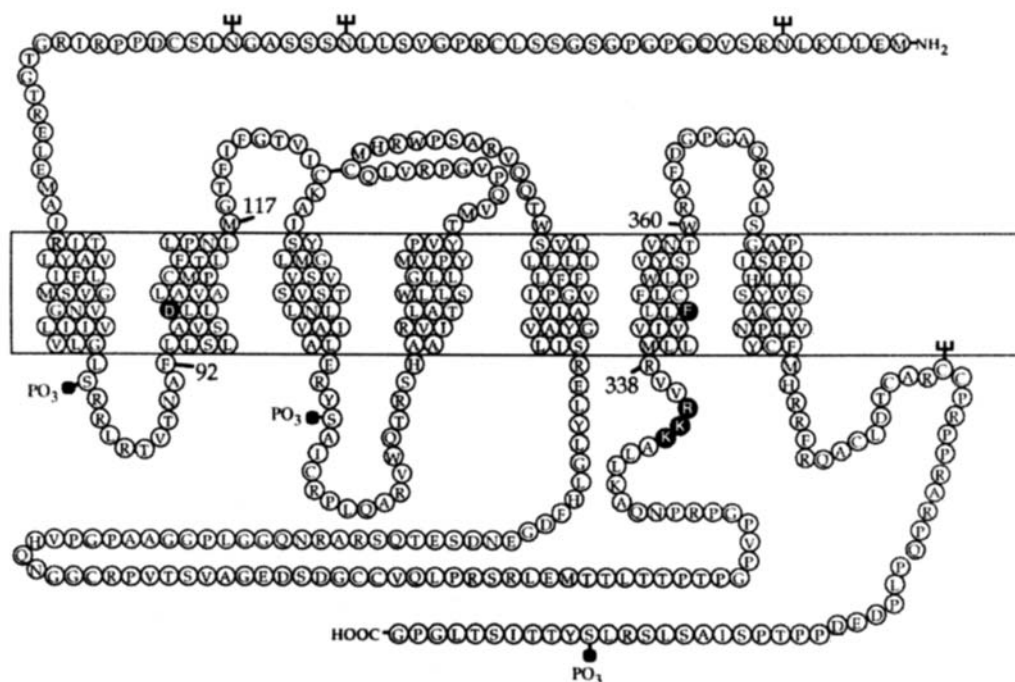


Рис. 1. Схема ССК₂-рецептора.

ионизированной форме находится ССК-4, а также определить модель взаимодействия.

Известно, что N-концевая аминогруппа в биологических объектах практически всегда протонирована. Однако C-концевой амид в молекуле ССК-4 также может быть протонирован, в связи с внутримолекулярным переносом протона с Asp на амидный азот, что может быть с позиций термодинамики более вероятно. Наконец, существует вероятность одновременного протонирования N-концевой аминогруппы и C-концевой амидной группы в молекуле ССК-4.

Из экспериментальных данных (ЯМР-спектроскопия) работы [4] известно, что в связывании ССК-4 с ССК₂ рецептором большую роль играют:

- водородные связи между атомами Asp³² (здесь и далее верхний индекс относится к аминокислотной последовательности полипептида ССК, фрагментом которого является ССК-4; нижний индекс — к аминокислотной последовательности рецептора ССК₂), NH₃⁺-группы Phe³³ ССК-4 и атомами аминокислотных остатков рецепторных петель: Phe₁₁₀, Thr₁₁₁, Asn₁₁₅ и Thr₁₁₉ первой внеклеточной петли (EC1), His₂₀₇ второй внеклеточной петли (EC2);

- кулоновские связи между аминокислотой Asp³² и остатком, локализованным в EC2;

- гидрофобные взаимодействия между аминокислотами Met³¹ и Pro₃₇₁, Trp³⁰ и Phe₃₇₄.

Для выбора ионизированной формы ССК-4 на основании данных ЯМР-спектроскопии нами были сконструированы 3 комплекса 3 ионизированных форм ССК-4 с фрагментом ССК₂ — с теми аминокислотами рецептора, которые образуют с ССК-4 водородные связи (рис. 4). Из сравнения характеристик комплекса видно, что энтальпия образования комплек-

са с внутримолекулярным переносом протона в ССК-4 на 32 ккал/моль ниже таковой для комплекса с протонированной N-концевой аминогруппой ССК-4. Такое сравнение уместно, т.к. количество атомов в рассматриваемых системах одинаковое. Что касается третьего комплекса с 2 протонами, то число внутримолекулярных водородных связей ССК-4 в этом комплексе не соответствует экспериментальным данным ЯМР-спектроскопии.

Таким образом, выбранная нами ионизированная форма ССК-4 характеризуется свернутой с Z-образной конформацией (рис. 3), тремя внутримолекулярными водородными связями и внутримолекулярным переносом протона от –COOH группы Asp³² к C-концевой амидной группе. Две внутримолекулярные водородные связи обуславливают Z-образный поворот пептидной цепи около Met и Asp аминокислотных остатков, третья водородная связь длиной 1,61 Å между атомом водорода амидной группы и атомом кислорода группы –COO⁻ Asp³² формирует сближение “активных” концевых групп (COO⁻ группы Asp³² и C-концевой NH₃⁺-группы) в молекуле ССК-4, что обеспечивает эффективное взаимодействие с рецептором.

Необычно малая длина водородной связи свидетельствует о насыщении валентной оболочки “активных” групп электронной плотностью. Действительно, ВЗМО в молекуле ССК-4 (метод расчета — PM3) характеризуется энергией — 8,55 эВ (112 молекулярная орбиталь), однако энергии орбиталей 108 – 111 различаются незначительно, т.е. эти орбитали близки к вырождению. Разность энергий 108-й и 111-й орбиталей составляет всего 0,15 эВ (3 ккал/моль). Фактически, 8 электронов расположены вблизи ВЗМО (разность энергий 111-й и 112-й орбиталей составляет 0,6 эВ),

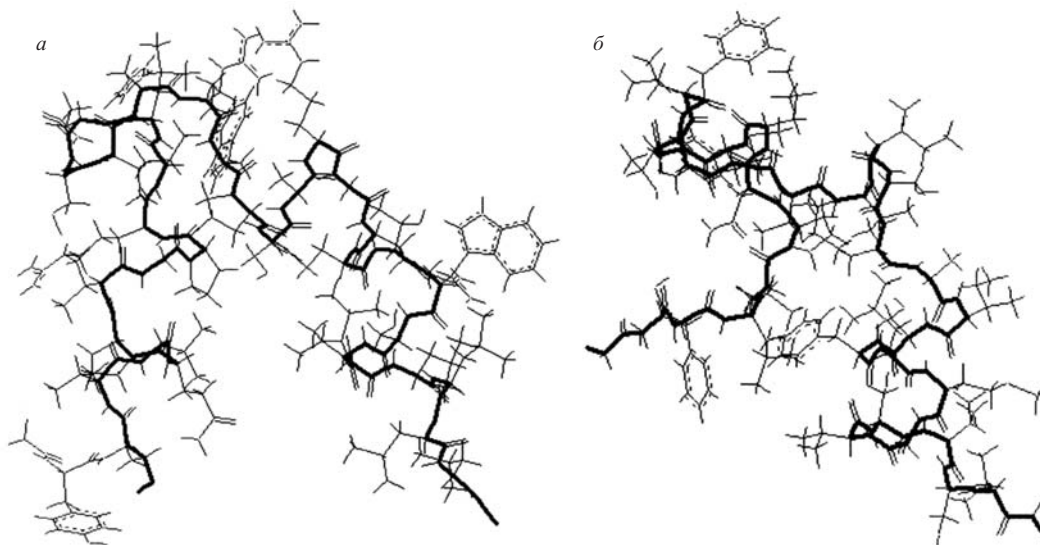


Рис. 2. Оптимизированные вероятные конформации внеклеточных петель рецептора ССК₂; *a* — первая внеклеточная петля (EC1, аминокислотные остатки 110 – 140), *б* — вторая внеклеточная петля (EC2, аминокислотные остатки 192 – 221).

что может обуславливать перенос электронной плотности с молекулы ССК-4 на рецептор.

Таким образом, на первом этапе данной работы в результате молекулярного моделирования по частичным экспериментальным данным была получена пространственная структура комплекса активного центра ССК₂ рецептора с ССК-4 (рис. 4). Полученный комплекс использован для изучения некоторых особенностей механизма лиганд-рецепторного взаимодействия.

Из литературы известно [11, 12], что взаимодействие лигандов с рецепторами запускает цепь биохимических реакций, приводящих к характерному ответу клетки. Вероятнее всего, при взаимодействии лиганда с рецептором на поверхности клетки, с лиганда на ре-

цептор передается некий сигнал, индуцирующий дальнейшие “превращения” внутри клетки. Что представляет собой сигнал можно оценить, исследуя полученный комплекс активного центра ССК₂ рецептора и лиганда тетрапептида ССК-4.

Поскольку “активные” группы выбранной ионизированной формы ССК-4 обладают особыми свойствами в виде повышенной электронной плотности, естественно предположить перенос этой электронной плотности на рецептор через водородные связи. Однако возможна и другая модель взаимодействия ССК-4 и рецептора — перенос электронной плотности путем ее миграции вместе с протоном. Обе предложенные модели можно проанализировать и сравнить, исследуя

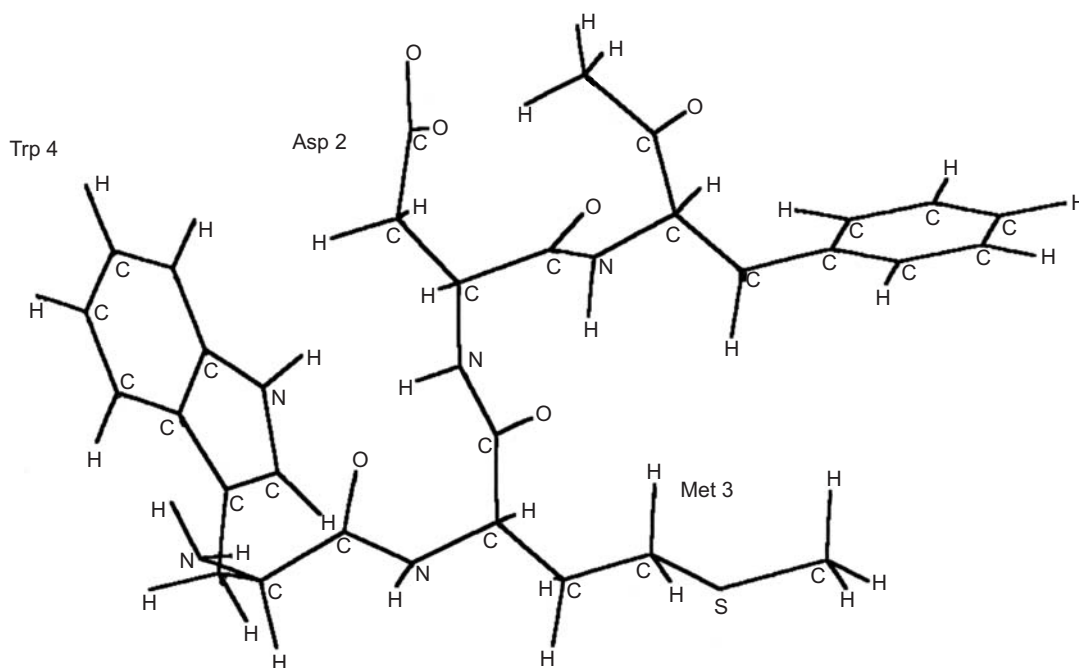


Рис. 3. Биологически активная конформация тетрапептида ССК-4.

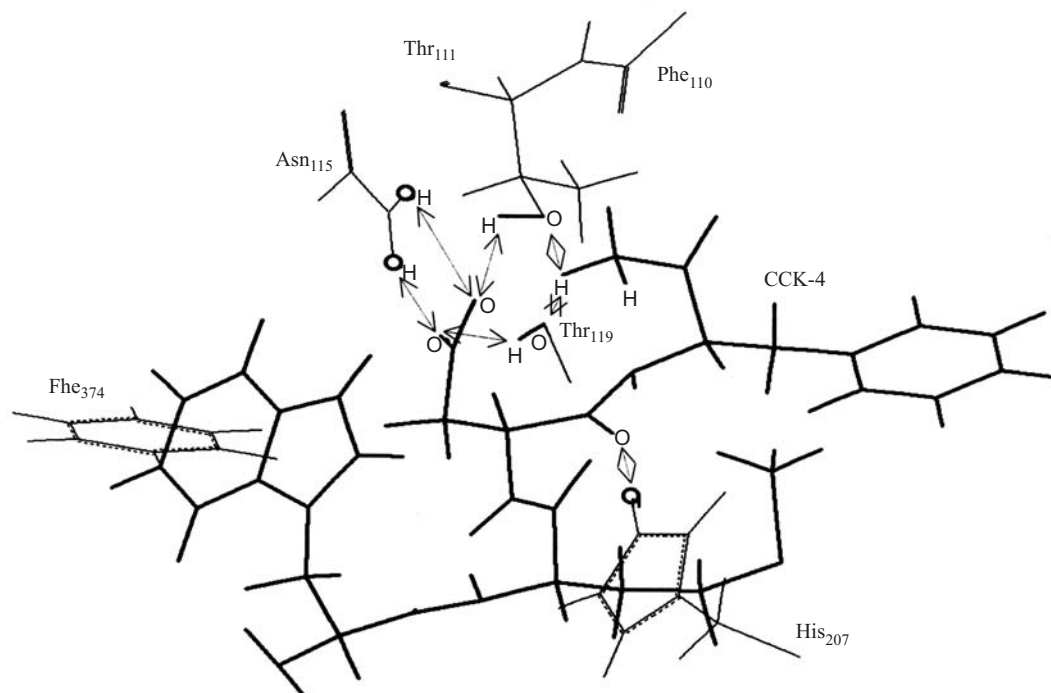


Рис. 4. Молекула ССК-4 и атомы аминокислот рецепторных петель, участвующие в образовании водородных связей; пунктирными стрелочками показаны водородные связи между атомами тетрапептида и аминокислотных остатков рецепторных петель.

2 комплекса: до и после переноса протона от “активных” групп ССК-4 на рецептор.

Рассмотрим возможность переноса протона. Из экспериментальных данных [4] известно, что в комплексе лиганд – рецептор образуется 9 водородных связей, причем 6 из них образуют атомы кислорода $-\text{COO}^-$ группы Asp аминокислоты ССК-4. Проведенное моделирование показывает, что между $-\text{COO}^-$ группой Asp³², концевым амидом молекулы ССК-4 и рецептором не может быть образовано более 5 водородных связей. Поэтому возникла идея о переносе протона с лиганда на рецептор, что реализует недостающую водородную связь. Особенностью вероятной биологически активной конформации ССК-4 является наличие протонированной С-концевой амидной группы ($-\text{NH}_3^+$), что, как отмечено в работе [10], является, вероятно, необходимым условием для взаимодействия с рецептором. В активный центр ССК₂ рецептора входит аминокислота аспарагин (Asn₁₁₅). При низких значениях локального рН ацетамидная группа Asn₁₁₅ способна присоединять протон [13]. Таким образом, существует возможность переноса протона с NH_3^+ группы ССК-4 на $-\text{NH}_2$ группу Asn₁₁₅, расстояние между которыми составляет 3 Å.

Данное предположение проверяли квантово-химическим расчетом 2 комплексов с локализацией протона:

на ССК-4 на С-концевой NH_2 -группе (комплекс до переноса протона);

на NH_2 -группе в Asn₁₁₅ первой внеклеточной петли ССК₂ рецептора (комплекс после переноса протона).

Оптимизацию геометрии комплексов проводили последовательно методом молекулярной механики с

применением модельного потенциала ВЮ⁺ и полуэмпирическим квантово-химическим методом РМЗ. При этом фиксировались водородные связи между атомами молекулы ССК-4 и соответствующими атомами аминокислот внеклеточных петель активного центра ССК₂ рецептора. Расчет характеристик комплекса позволил рассмотреть возможность миграции протона при взаимодействии ССК-4 с рецептором ССК₂. До миграции протона перенос электронной плотности с ССК-4 на рецептор минимален. После переноса протона на Asn₁₁₅ энтальпия образования комплекса уменьшается на 86 ккал · моль⁻¹, что свидетельствует о термодинамической разрешенности этого процесса. Одновременный перенос электронной плотности с ССК-4 на рецептор составляет 0,34 ат. ед.

Таким образом, из 2 рассматриваемых моделей наиболее вероятна та, в которой перенос электронной плотности с лиганда на рецептор осуществляется вместе с протоном. При этом, чем больше величина донированной на рецептор электронной плотности, тем более агонистические свойства проявляет лиганд. Соединение, образующее водородные связи с активным центром рецептора, но не проявляющее донорные свойства, относится к антагонистам.

В заключение необходимо отметить электронодонорные свойства ССК-4. В предлагаемой модели фармакофорная группа ССК-4 содержит 4 близких к вырождению энергетических уровня (8 электронов), близких к ВЗМО. Это соответствует тому, что гетероциклические и ароматические соединения являются донорами электронной плотности. В данном случае Trp³⁰ и Phe³³ могут придавать ССК-4 электронодонорные свойства.

Таким образом, предлагаемая модель взаимодействия ССК-4 и рецептора ССК₂ основана на переносе протона и электронной плотности с лиганда на рецептор. Дальнейшее моделирование данного взаимодействия следует проводить с учетом выбранной ионизированной формы ССК-4, разработанной модели и рассчитанных равновесных конформаций 2 внеклеточных петель ССК₂ рецептора.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 07-04-13590 ОФИ-Ц).

ЛИТЕРАТУРА

1. K. Taghzouti, I. Léna, F. Dellu, et al., *Psychopharmacology*, **143**(2), 141 – 149 (1999).
2. Y. M. Lee, M. Beinborn, E. W. McBride, et al., *J. Biol. Chem.*, **268**(11), 8164 – 8169 (1993).
3. B. Pommier, C. Marie-Claire, S. Nascimento, et al., *J. Neurochem.*, **85**(2), 454 – 461 (2003).
4. C. Giragossian and D. F. Mierke, *Biochemistry*, **41**(14), 4560 – 4566 (2002).
5. J. C. Smith and M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 805 – 812 (1992).
6. J. J. P. Stewart, *Comput. Aided Mol. Des.*, **4**(1), 1 – 7 (1990).
7. M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, and J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**(15), 3902 – 3909 (1985).
8. A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, et al., *J. Phys. Chem. B*, **102**(18), 3586 – 3616 (1998).
9. B. Bellier, M. Million, S. DaNascimento, et al., *J. Med. Chem.*, **43**(20), 3614 – 3623 (2000).
10. P. E. Kuznetsov, N. B. Kuznetsova, S. V. Schulgin, et al., *SPIE Proc.*, **6165**, 448 – 458 (2006).
11. Ю. А. Овчинников, *Биоорганическая химия*, Просвещение, Москва (1987), сс. 239 – 245.
12. Р. Геннис, *Биомембраны: Молекулярная структура и функции*, Пер. с англ., Мир, Москва (1997) сс. 435 – 449.
13. Б. П. Никольский (ред.), *Справочник химика*, Т. 3, Химия, Москва (1965), с. 98.

Поступила 12.02.07

MOLECULAR MODELING OF A THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF ССК-2 RECEPTOR EXTRACELLULAR LOOPS AND THEIR BINDING WITH ССК-4 TETRAPEPTIDE

P. E. Kuznetsov, N. B. Kuznetsova, S. V. Schulgin, A. V. Shantroha, E. N. Dubas

Saratov State University, Saratov, 410026 Russia;

Equilibrium conformations of the cholecystokinin-2 (ССК-2) receptor first and second extracellular loops were determined using the results of molecular modeling and partial experimental data. A model of the spatial structure of an active center fragment of the ССК-2 receptor, consisting of three extracellular loops, with a ССК-4 tetrapeptide ligand is designed. A mechanism of the ligand – receptor interaction involving this model structure has been considered. The results of molecular modeling shows the possibility of the simultaneous transport of proton and electron density from ССК-4 ligand to amino acids of ССК-2 receptor. The proposed model of the ligand – receptor interaction can be used for predicting the structure – activity relationships and pharmacological profile of ССК-4 analogs.