

На правах рукописи

Ли Аньбан

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА
ИОННОГО КАНАЛА НИКОТИНОВОГО
АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА**

Специальность 03.00.02 -биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2006

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор
Шайтан Константин Вольдемарович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук
Крупянский Юрий Фёдорович
(ИХФ им. Н.Н. Семёнова РАН)

доктор химических наук, профессор
Вржеш Пётр Владимирович
(МБЦ МГУ им. М. В. Ломоносова)

Ведущая организация: Российский университет дружбы народов

Защита диссертации состоится " " _____ 2006 г. в часов на
заседании диссертационного совета Д.501.001.96 при Московском
государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992,
г. Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики,
аудитория "Новая".

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета
МГУ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан " " _____ 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор

Т. Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Ионные каналы представляют собой интегральные белки, находящиеся в липидном бислое мембраны и опосредующие транспорт ионов через мембрану. Вопросы их функционирования составляют ключевую проблему в биофизике мембранных процессов и имеют важное прикладное значение для современной биомедицины. Лиганд-зависимые ионные каналы (например, никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nicotinic acetylcholine receptors, nAChR), серотониновый рецептор (5-гидрокситриптамиин, 5-НТ), глициновый рецептор, рецепторы γ -аминомасляной кислоты GABA_A и GABA_C), состоят в основном из пяти субъединиц и играют ключевую роль в передаче сигнала в нервной системе и нервно-мышечных соединениях.. Лиганд-зависимые ионные каналы функционально представляют собой интегральные белки канальной структуры, встроенные в липидную биомембрану и образующие пору. Они могут находиться в двух состояниях: закрытом и открытом, и могут переходить из закрытого состояния в открытое состояние при присоединении молекул лигандов. Лиганд-зависимые каналы обладают свойствами селективной проводимости ионов и гейтингом – процессом активации проводимости (открывания) канала в ответ на соединение с лигандами. Экспериментально установлено, что процесс открывания лиганд-зависимых ионных каналов определяется конформационными изменениями каналов после связывания с лигандами.

nAChR мышечного типа наиболее подробно исследован, и трёхмерная структура трансмембранного домена рецептора, выделенного из электрического органа электрического ската *Torpedo* была определена в закрытом состоянии с разрешением 9Å, 4,6Å и 4Å, а в открытом состоянии с разрешением 9Å. Полученные трехмерные структуры дают возможность для более детального изучения взаимосвязи структуры и функции лиганд-зависимых ионных каналов с помощью методов компьютерного моделирования. Множество исследований (Сэнсом, Ру, Санкарамакришнан) вычислительными методами уже проведены с использованием модели канала nAChR, в том числе некоторые исследования с использованием модели, основанной на определенной трёхмерной структуре. В то же время, пока еще нет исследований, проведенных методом управляемой молекулярной динамики, который можно использовать для изучения неравновесных процессов, например, процесса миграции ионов сквозь пору канала и процесса открытия ионного канала. В настоящее время актуальным является изучение процессов ионного транспорта и конформационных изменений, происходящих при функционировании канала nAChR методом управляемой молекулярной динамики.

Целью работы является построение динамической модели функционирования канальной части ацетилхолинового рецептора на основе данных по трёхмерной структуре трансмембранного домена.

Постановка задачи.

Для достижения этих целей необходимо было поставить и решить следующие основные задачи:

- Построить модель пентамерной структуры поры nAChR для исследования методом молекулярной динамики;
- Провести изучение динамики заряженных и незаряженных частиц внутри канала методом управляемой молекулярной динамики и установить возможные области ворот канала;
- Изучить влияние действия внешних сил и электростатических сил на прохождение частиц и конформацию канала;
- Изучить влияние заряженных остатков на движение ионов;
- Изучить возможный механизм открытия канала nAChR.

Научная новизна исследования

В настоящей работе впервые методами управляемой молекулярной динамики определено положение ворот канала nAChR и проведена оценка энергического барьера для ворот канала, исследовано влияние заряженных остатков на поддержание стабильности канала и прохождение ионов через канал.

Также впервые использована новая методика для изучения механизма открытия канала, суть которой состоит в приложении внешних моментов сил к внеклеточным концам α -M2 спиралей. Полученные результаты расчётов подтверждают гипотезу механизма открытия канала и позволяет понять детали процесса открытия канала, которые трудно выяснить экспериментально.

Теоретическое и практическое значение работы.

Данная работа посвящена изучению связи между структурой и функциями биомакромолекул, которая является одним из ключевых вопросов молекулярной биофизики. Изучение процесса прохождения ионов сквозь канал, определение положения ворот канала и механизма открытия канала могут быть полезны для выяснения детального механизма функционирования ацетилхолинового рецептора, а также других лиганд-зависимых рецепторов (глициновых рецепторов, рецепторов 5-HT, и рецепторов GABA_A и GABA_C). Выяснение детального механизма функционирования ацетилхолинового рецептора также может быть полезно при разработке новых лекарственных препаратов.

Достоверность результатов диссертации обеспечивается использованием универсальных законов и уравнений классической и квантовой механики и проведением тестовых расчётов систем, сравниваемых с экспериментальными

данными.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на Международной конференции «Ломоносов 2005» (Москва, 2005 г.), 3-ем съезде Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова (Москва, 2005 г.), Международной школе-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия» (Москва, 2005 г.), Международной конференции «Ломоносов 2006» (Москва, 2006 г.). Доклады о результатах работы были представлены на семинарах кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ и 2 находятся в печати.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа (страниц) состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературы (158 ссылки), иллюстрирована рисунками и содержит 3 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Функциональные и структурные особенности никотинового ацетилхолинового рецептора

Эта глава посвящена обзору литературы по структуре и функциям, никотинового ацетилхолинового рецептора.

Мышечный nAChR наиболее подробно исследован. Он располагается в постсинаптических мембранах скелетных мышечных волокон позвоночных, в синапсах электрического органа электрического ската и обеспечивает быструю нейротрансмиссию в синапсах никотиновых AChR. nAChR представляет собой 290-кДа гликопротеин, образованный 5 субъединицами (α , β , γ , α , δ). Он может быть подразделён на три домена: N-концевой внеклеточный домен, трансмембранный домен и относительно небольшой внутриклеточный домен. Внеклеточный домен формируется из β структурных внеклеточных частей всех пяти субъединиц, в этом домене находятся два сайта связывания лиганда.

Каждая цепь субъединицы пересекает мембрану четыре раза. Четыре α -спиральных сегмента (M1, M2, M3, M4) всех пяти субъединиц формируют трансмембранный домен. Трёхмерная структура трансмембранного домена рецептора была определена в закрытом состоянии с разрешением 9Å, 4,6Å и 4Å и в открытом состоянии с разрешением 9Å. Пять вторых α -спиралей трансмембранного домена

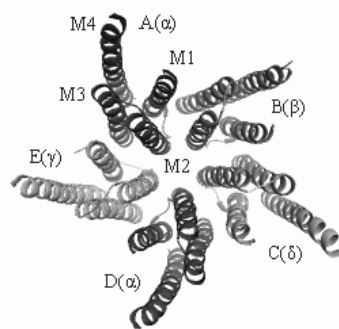


Рис. 1. Структура трансмембранного домена nAChR. Вид с внеклеточной стороны.

(M2) формируют полость канала и играют роль как катион селективного фильтра, так и ворот канала. Другие сегменты (M1, M3, M4) формируют внешний цилиндр, отделяя спирали M2 от мембраны (рис. 1).

nAChR переходит из закрытого состояния в открытое при присоединении двух молекул лиганда. Сравнение структуры nAChR в закрытом и открытом состояниях показывает следующее. Ацетилхолин выбрасывается из пресинаптической мембраны в синаптическую щель и взаимодействует с сайтами рецептора постсинаптической мембраны, при этом внутренние β -листы внеклеточного домена α -субъединицы (A и D) поворачиваются [14]. Спирали M2 трансмембранного домена поворачиваются вокруг центральной оси канала по часовой стрелке на несколько градусов, что приводит к формированию открытого состояния канала. Хотя эти изменения в структуре канала известны, но детальный механизм процесса открытия канала до сих пор неясен.

Глава 2. Метод молекулярной динамики

В этой главе представлен литературный обзор по методу молекулярной динамики и применению метода к изучению динамики биологических объектов. Раскрыт смысл основных понятий: силовое поле, термостат, численное интегрирование, периодические граничные условия. Описаны особенности применения равновесной молекулярной динамики и неравновесной (или управляемой) молекулярной динамики (Steered Molecular Dynamics, SMD). В данной работе использован метод управляемой молекулярной динамики.

Глава 3. Молекулярная динамика канала nAChR и прохождения ионов сквозь канал nAChR

Эта глава посвящена построению модели поры канала nAChR, описанию метода расчетов, и анализа результатов и изучению динамики функционирования ионного канала nAChR.

Построение модели поры канала nAChR

Молекулярная структура поры канала nAChR в закрытом состоянии была взята из базы данных белковых структур (PDB ID: 1OED). Для построения модели были вырезаны пять трансмембранных сегментов M2, непосредственно участвующих в процессе переноса ионов. Использовалось полноатомное приближение. Для предотвращения концевых эффектов на C' концы цепей были добавлены остатки NME, на N' концы - остатки ACE. Таким образом, каждая из конечных цепей состояла из 34 остатков (рис. 2). Стабилизация канала осуществлялась с помощью углеводородного кольца из 105 остатков CH₂.

	241	251	255	269
A(α) :	<u>E</u> KMTLSISVLLSLTVFLLVIVELIPSTSSAVP			
B(β) :	EKMSLSISALLAVTVFLLLLADKVPETSLSP			
C(δ) :	EKMSTAISVLLAQAVFLLLSQRLPETALAVP			
D(α) :	EKMTLSISVLLSLTVFLLVIVELIPSTSSAVP			
E(γ) :	GQKCTLSISVLLAQTI F FLIAQKVPETSLNV			
	0'	9'	13'	20' 25'

Рис. 2. Последовательность остатков M2-цепей в модели канала. Приведена нумерация остатков в цепях рецептора. Верхние числа соответствуют номерам остатков в цепи α (принятым в PDB). Нижние числа приведены в соответствии с другой распространённой системой нумерации остатков в этом рецепторе (например, 9' соответствует остатку α -LEU251). Жирным шрифтом указаны остатки LEU (15'), которые близки к добавленному стабилизирующему углеводородному кольцу. Добавленные группы ACE и NME не указаны.

Были проведены исследования прохождения ионов и комплексов сквозь канал при различных условиях. Все расчёты были проведены с помощью программного комплекса ПУМА-Б с использованием метода управляемой молекулярной динамики, включающем в себя стандартный протокол молекулярной динамики, дополненный введением сил, действующих на ионы и комплексы (табл. 1).

Таблица 1 Протокол молекулярной динамики

Параметр	Значение
Потенциальное поле	AMBER99
Длина траектории при T=300 K	до 2 нс
Термостат	столкновительный
Масса виртуальных частиц в столкновительном термостате	m=18 a.e.m
Частота столкновений виртуальных частиц с атомами рассчитываемой системы	$\nu=55\text{пс}^{-1}$
Температура термостата	300K
Температура релаксации в начальный период расчёта	300K
Режим фиксации атомов	включён
Диэлектрическая проницаемость среды (ϵ)	варьировалась
Радиус обрезания кулоновских взаимодействий	$R_{\text{el}} = 20\text{\AA}$
Интервал обрезания для взаимодействий Ван-дер-Ваальса	$R_{\text{vdw}} = 15\text{-}16\text{\AA}$
Кубическая периодическая ячейка	$200\times 200\times 200\text{\AA}^3$
Алгоритм численного интегрирования	Верле

Метод определения начальных скоростей атомов	Генератор случайных чисел по распределению Максвелла
Шаг интегрирования	1 фс (0,1 фс в релаксации)
Шаг записи в траекторный файл	0,1 пс
Шаг записи файла контрольной точки	0,1 пс
Сила, действующая на атом или комплекс	Варьировалась

Для того чтобы препятствовать отделению стабилизирующего углеводородного кольца и схлопыванию канала, глубина ям для леннард-джонсовского (ЛД) взаимодействия между крайним атомом углерода в остатках 15' (α -LEU257) и соответствующим атомом кольца была увеличена до 5 ккал/моль. Чтобы препятствовать чрезмерному сближению цепей в процессе расчёта, атомы углерода остатков ACE и NME фиксировались.

Пробная частица помещалась в центре верхней (близкой к внеклеточной) области канала. Таким образом, система имела следующий вид:

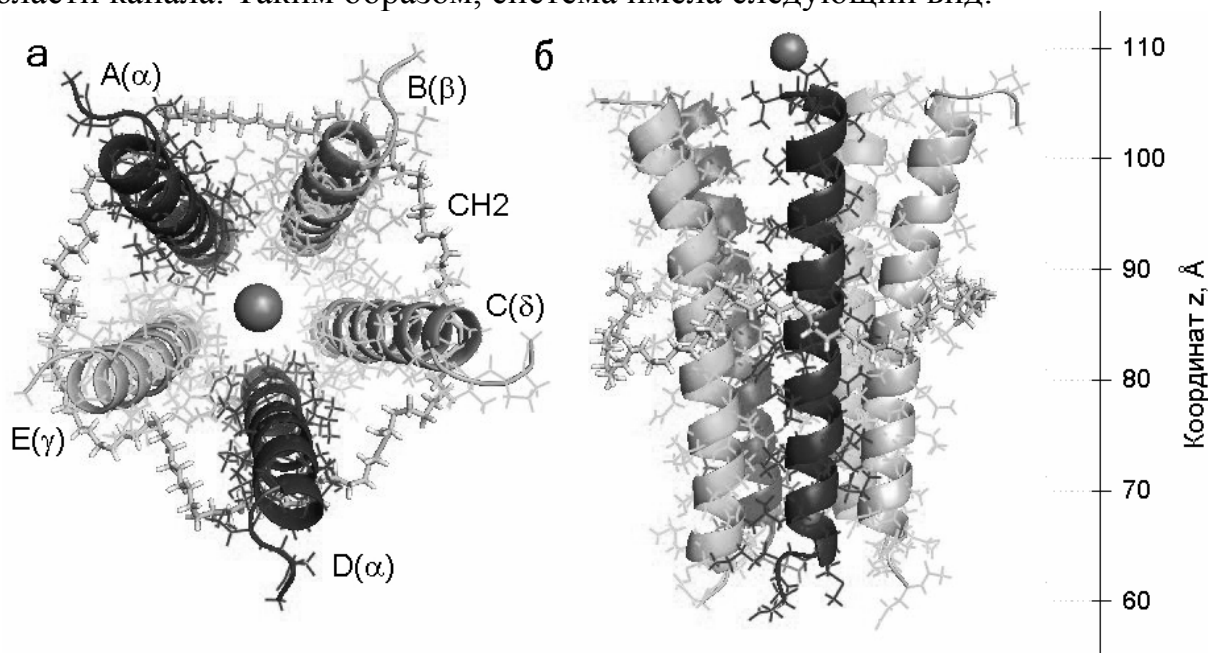


Рис. 3. Модель молекулы канала ацетилхолинового рецептора, включающей 5 трансмембранных сегментов M2. Сферой обозначена пробная частица (ион Na^+). Показано также добавленное кольцо, содержащее 105 сегментов CH_2 . а: вид сверху с внеклеточной стороны. б: вид сбоку. Приведённая справа шкала отображает масштаб изображённой структуры. Высота канала примерно $45\text{\AA}$.

Использовались следующие пробные частицы: 1) незаряженные комплексы $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6$ и $\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_6$, с ван-дер-ваальсовыми параметрами, эквивалентными иону натрия и атому хлора, формально гидратированных шестью молекулами воды (ван-дер-ваальсовый радиус $3,63\text{\AA}$ и $3,71\text{\AA}$, соответственно); 2) заряженные комплексы $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ и $\text{Cl}^-(\text{H}_2\text{O})_6$, с ван-дер-ваальсовыми параметрами, эквивалентными ионам натрия и хлора, гидратированных шестью

молекулами воды (ван-дер-ваальсовый радиус 3,63Å и 4,73Å, соответственно).

В процессе релаксации дополнительные силы к частицам не прикладывались. После релаксации к пробной частице прикладывалась внешняя сила F вдоль нормали к мембране (координата z) с внеклеточной во внутриклеточную сторону.

Движение частиц в канале под действием внешней силы

Проведен ряд вычисленных экспериментов, в которых к частицам прикладывались различные внешние силы.

Кинетика прохождения незаряженной пробной частицы сквозь пору канала представлена на рис. 4. Под действием внешней силы $F=1\text{ ккал}/(\text{моль}\cdot\text{Å})$ незаряженные комплексы $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6$ и $\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_6$ застревают в канале, в области с координатой $z\approx 86\text{Å}$.

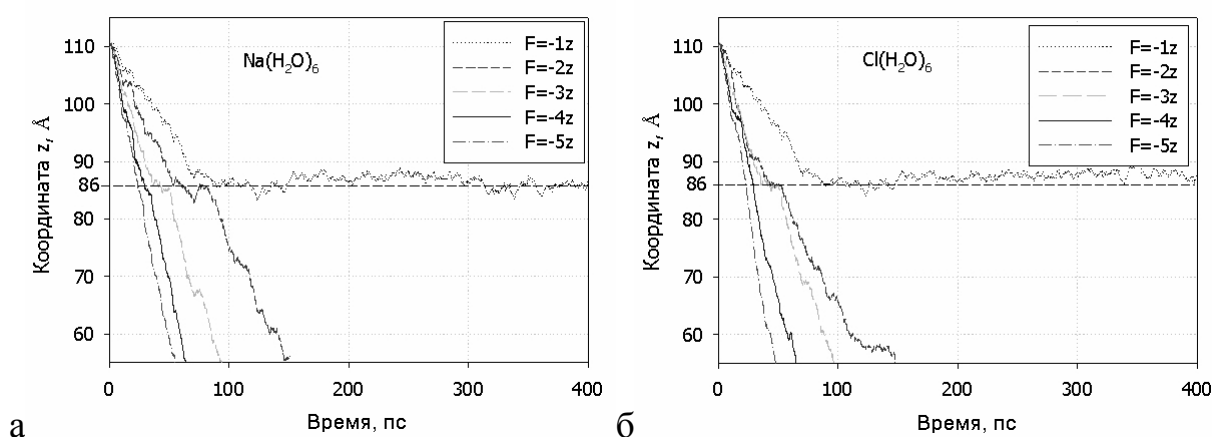


Рис. 4. Миграция незаряженных комплексов $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6$ и $\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})_6$ сквозь пору канала ацетилхолинового рецептора. Знак «-» обозначает направление сил вдоль нормали к мембране (координата z) с внеклеточной стороны во внутриклеточную сторону.

Рассмотрение структуры канала показывает, что в этой области находятся остатки 13' – A-VAL255, B-VAL261, C-Val269, D-VAL255 и E-ILE264, которые образуют незаряженное кольцо, формирующее ван-дер-ваальсовские ворота канала. Прохождение пробной частицы оказывается невозможным из-за стерических препятствий, так как диаметр гидратированного иона натрия и хлора превышает диаметр канала в этой области координат ($\sim 6\text{Å}$ при $z\approx 86\text{Å}$).

Увеличение внешней силы до $2\text{ ккал}/(\text{моль}\cdot\text{Å})$ приводит к пробному прохождению области ворот, хотя наблюдается заметное торможение пробной частицы в области $z\approx 86\text{Å}$ на время около 20 пс. Дальнейшее увеличение внешней силы приводит к уменьшению времени прохождения частицы через канал и полному исчезновению торможения частицы в области $z\approx 86\text{Å}$ при $F=5\text{ ккал}/(\text{моль}\cdot\text{Å})$.

Торможение частиц в канале происходит вследствие наличия локальных энергетических минимумов (ловушек), отделенных от соседних состояний барьером, создаваемым воротами канала. Данные по кинетике прохождения

изучаемого комплекса области ворот показывают, что крутизна энергического барьера ворот составляет около 2ккал/(моль·Å). С другой стороны, это означает, что энергетический профиль ворот канала весьма чувствителен к внешним воздействиям и ворота могут быть открыты под действием относительно небольшой силы, приложенной, в частности, к верхним остаткам M2 спиралей α-субъединицы (см. главу 4).

Положительно заряженный комплекс $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ притягивается к отрицательно заряженным остаткам ASP или GLU, находящим в положении 20' и 24', что препятствует прохождению иона при значениях внешней силы до 10ккал/(моль·Å) (рис. 5а). Однако при силе больше 11ккал/(моль·Å), он успешно проходит через канал. При прохождении частицы наблюдается торможение в области $z \approx 86\text{Å}$ на время порядка 10 пс. Дальнейшее увеличение внешней силы (до значений 18-20ккал/(моль·Å)) приводит к существенному уменьшению времени прохождения частицы через канал (менее 20пс) и полному исчезновению торможения частицы в области $z \approx 86\text{Å}$.

Отрицательно заряженный комплекс $\text{Cl}^-(\text{H}_2\text{O})_6$ не двигается вдоль оси канала, а выходит поперек канала, пока приложенная внешняя сила не достигнет величин более 5ккал/(моль·Å) (на рис. не показано). Комплекс $\text{Cl}^-(\text{H}_2\text{O})_6$ начинает проходить через канал, но затем притягивается к остатку A-LYS242 (0') (внешняя сила $F = 5\text{ккал/(моль·Å)}$). Когда внешняя сила больше 6ккал/(моль·Å), связь между комплексом $\text{Cl}^-(\text{H}_2\text{O})_6$ и остатком A-LYS242 разрушается, и комплекс проходит сквозь канал (рис. 5б).

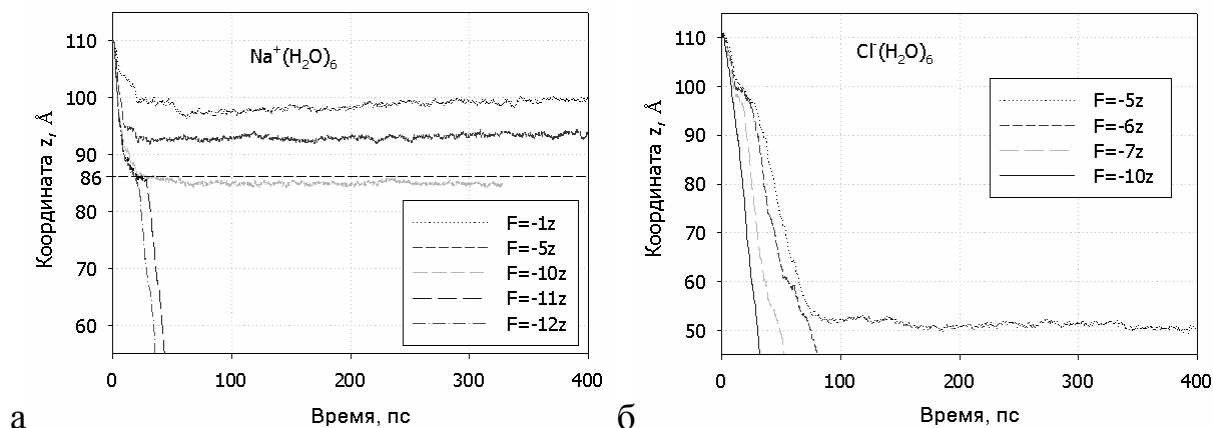


Рис. 5. Миграция заряженных комплексов $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ и $\text{Cl}^-(\text{H}_2\text{O})_6$ сквозь пору канала ацетилхолинового рецептора.

Приведенные выше данные показывают, что в закрытом состоянии торможение ионов в канале происходит за счёт двух составляющих: стерических препятствий и электростатических взаимодействий иона с заряженными боковыми группами. Стерические препятствия формируют энергический барьер ван-дер-ваальсовских ворот с крутизной не более

2ккал/(моль·Å). Функция зарядовой селективности канала выполняется за счет электростатических сил притяжения и отталкивания между ионами и отрицательно заряженными остатками ASP и GLU, находящимися в верхней области канала (20' и 24'). Барьеры, сформированные за счет электростатических взаимодействий с заряженными боковыми группами аминокислотных остатков имеют в закрытом состоянии канала существенно большую крутизну - около 8-9ккал/(моль·Å).

Влияние диэлектрической проницаемости среды на динамику прохождения комплекса.

Так как динамика прохождения ионов через канал наиболее чувствительна к электростатическим взаимодействиям, проводилась серия численных экспериментов при разных значениях диэлектрической проницаемости ϵ . Характерно, что увеличение диэлектрической проницаемости (и ослабление вклада электростатических взаимодействий) приводит к увеличению проницаемости канала. Кинетика прохождения заряженной частицы $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ сквозь пору канала при различных ϵ представлена на рис. 6. Крутизна энергетического барьера, вызванного вкладом электростатических взаимодействий, уменьшается в ряду 11, 5, 3, 2 и 3 ккал/(моль·Å) при увеличении значений диэлектрической проницаемости соответственно $\epsilon = 1, 2, 3, 4$ и 5. На рис.6 видно заметное уменьшение критического значения силы для преодоления ворот канала при переходе от $\epsilon=1$ к $\epsilon=2$, связанное с ослаблением электростатических взаимодействий между катионом и отрицательно заряженными остатками. На рис. 7 показана кинетика прохождения $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ сквозь пору nAChR под действием внешней силы $F=5$ ккал/(моль·Å) при разных значениях ϵ . Видно заметное уменьшение времени прохождения комплекса при переходе от $\epsilon=2$ к $\epsilon=3$. Дальнейшее увеличение диэлектрической проницаемости среды приводит к сильному ослаблению ($\epsilon=3, 4$) и полному исчезновению ($\epsilon=5$) вклада электростатических взаимодействий в кинетику прохождения катиона через канал. Весьма показательно, что расчёты, проведенные для аниона хлора в канале глицинового рецептора, дают сходные результаты для влияния значений диэлектрической проницаемости среды ϵ на проницаемость канала.

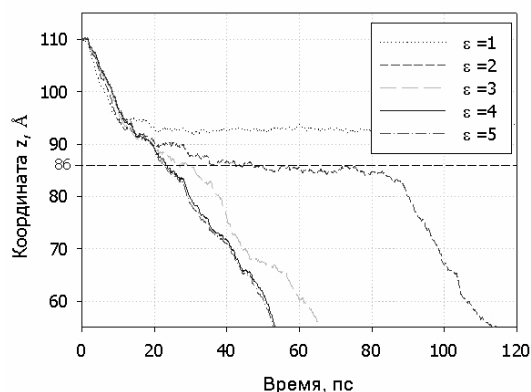
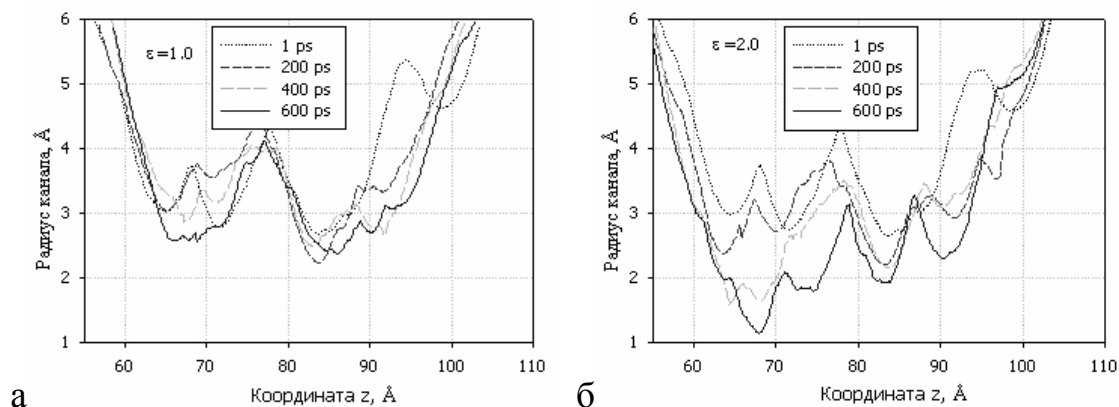


Рис. 6. Динамика прохождения комплекса $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ сквозь пору nAChR под действием внешней силы $F=5\text{ккал}/(\text{моль}\cdot\text{\AA})$ при разных значениях диэлектрической проницаемости ϵ .

Отметим, что степень ионизации отрицательно заряженных остатков, расположенных при входе в канал, зависит от pH среды и может влиять на работу канала. Если отрицательно заряженные остатки, расположенные в начальной области канала не полностью ионизированы, то результаты моделирования с ослабленным кулоновским взаимодействием более соответствуют реальной ситуации. Т.е. сила, необходима для преодоления электростатических взаимодействий между заряженными боковыми группами с заряженным комплексом $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$, может составлять менее $8\text{--}9\text{ккал}/(\text{моль}\cdot\text{\AA})$.

Изменение эффективного радиуса канала было определено с помощью программного пакета HOLE. На рис. 7 приведен радиус канала в разные моменты времени при разных значениях ϵ . Согласно этим данным радиус внеклеточного входа в канал составляет около $6\text{\AA}$. Радиус средней части канала равен приблизительно $3\text{\AA}$. Канал наиболее узок в области с координатой $z \approx 82\text{\AA}$, которая соответствует воротам канала. В этой области находятся остатки 13', которые образуют незаряженное кольцо, которое, по-видимому, и формирует ван-дер-ваальсовские ворота канала.



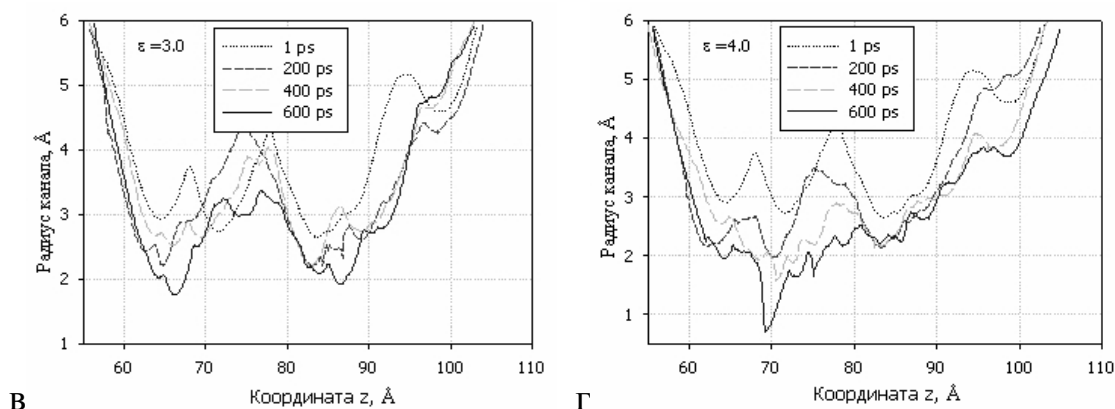


Рис. 7. Проекция эффективного радиуса канала nAChR на ось z в моменты времени $\tau=1$ пс, $\tau=200$ пс, $\tau=400$ пс и $\tau=600$ пс при значении диэлектрической проницаемости $\epsilon=1$ (а), $\epsilon=2$ (б), $\epsilon=3$ (в) и $\epsilon=4$ (г).

Как видно из рисунков, при значении диэлектрической проницаемости $\epsilon=1$ радиус канала немного уменьшается в верхней области (с координатой $z=85-100$ Å) и нижней области (с координатой $z \approx 60-75$ Å), но радиус канала в средней области изменяется относительно мало. В других случаях с при увеличении значения ϵ радиус канала флуктуирует с большей амплитудой. Так, радиус канала в области с координатой $z \approx 60-70$ Å может становиться менее 1 Å.

Рассмотрение структуры канала в разные моменты времени показывает, что при увеличении значения ϵ боковые цепи остатков, выстилающих внутреннюю поверхность поры канала, самостоятельно выдвигаются к центру поры канала, что и вызывает уменьшение радиуса канала. Можно полагать, что кулоновское отталкивание играет существенную роль в стабилизации конформации канала.

Динамика множественного прохождения $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ сквозь канал.

Для выяснения взаимного влияния ионов при прохождении через канал ацетилхолинового рецептора проводились следующие вычислительные эксперименты. Во внеклеточную область канала nAChR помещались одновременно шесть заряженных комплексов $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$, к которым прикладывались одинаковые внешние силы F , направленные с внеклеточной стороны во внутриклеточную сторону. Как и в случае единичного иона при внешней силе менее 5 ккал/(моль·Å), ни один комплекс $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ не проходит сквозь канал nAChR. Наблюдается притяжение к отрицательно заряженным остаткам ASP и GLU (всех шести катионов при значениях силы до 2 ккал/(моль·Å), четырёх катионов – при 4 ккал/(моль·Å)). Однако при внешней силе 5 ккал/(моль·Å) один из ионов проходит через канал (рис. 8а). При большем значении силы число ионов, прошедших через канал возрастает (2 при 7 ккал/(моль·Å) – рис. 8б, 3 при 9 ккал/(моль·Å) и 4 при 11 ккал/(моль·Å)).

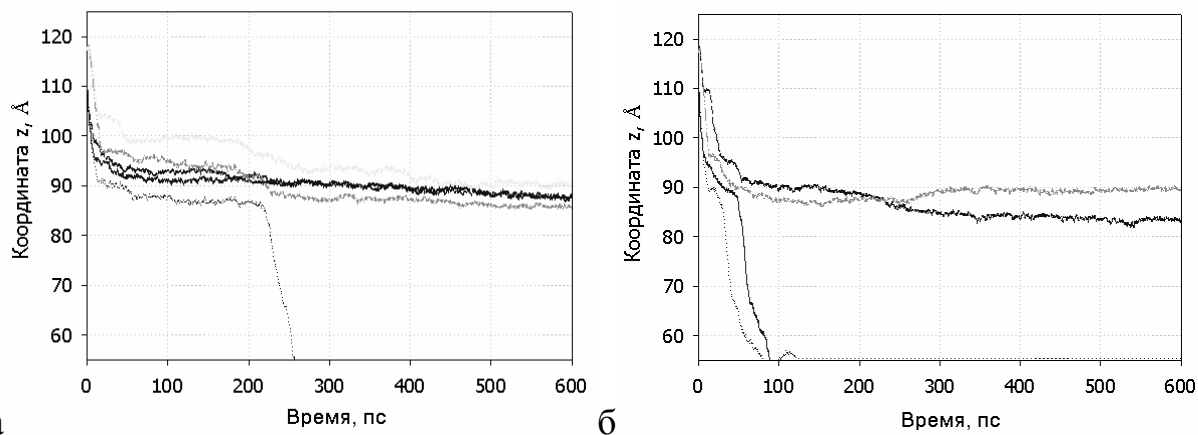


Рис. 8. Динамика движения комплексов $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ в поре канала nAChR под действием внешней силе $F=5\text{ккал}/(\text{моль}\cdot\text{\AA})$ (а) и $F=7\text{ккал}/(\text{моль}\cdot\text{\AA})$ (б).

Сравнение кинетики миграции ионов (рис. 8 и рис. 5) показывает, что кулоновский энергетический барьер при прохождении положительно заряженных частиц уменьшается при одновременном присутствии нескольких положительно заряженных частиц в канале. Это обусловлено экранированием отрицательно заряженных остатков и сглаживанием энергетического профиля для иона в канале.

Глава 4. Механизм открытия канала nAChR

Механизм открытия канала nAChR до сих пор не вполне ясен. Открытым остается вопрос о том, как вращения β -листов внеклеточного домена α -субъединиц передаются на трансмембранные α -спирали M2, и каким образом поворот α -спиралей вызывает открытие поры канала. Предполагается наличие в α -субъединицах между изгибами $\beta 1/\beta 2$ (которые располагаются между β -листами $\beta 1$ и $\beta 2$ и находятся прямо над C' концом спиралей M2) внеклеточного домена и концами спиралей M2 трансмембранного домена структуры типа “разъема” (pin-socket) – внеклеточный концевой остаток α -VAL46 (α -VAL44 в AChBP) внеклеточных изгибов $\beta 1/\beta 2$ входит в карман, образованный α -SER269÷ α -PRO272 (остатки между M2 и M3) в трансмембранном домене. Таким образом, поворот внеклеточных β -листов передается на трансмембранные α -M2 сегменты и вызывает вращение всех M2 спиралей кооперативно, что и приводит к открытию канала.

Хотя такой механизм теоретически возможен, до сих пор нет его экспериментальных подтверждений. Чтобы изучить механизм открытия канала, в данной работе произведен ряд расчетов, моделирующих возможные взаимодействия между изгибами $\beta 1/\beta 2$ и внеклеточными концами α -M2 спиралей (и возможные процессы открытия канала nAChR). Использована такая

же модель канала nAChR и такие же параметры расчетов, как и в главе 3. Как и в проведенных расчетах в главе 3, вначале частица помещалась в центр верхней (близкой к внеклеточной) области канала. Кулоновские эффекты в данной работе не рассматривались, а изменение просвета канала отслеживалось по прохождению незаряженного комплекса радиуса 3,63 Å сквозь пору канала. После релаксации (1 пс) к частице прикладывалась внешняя сила $F=1 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{Å})$ вдоль оси нормали мембраны, под действия которой комплекс не проходит через канал в закрытом состоянии (см. рис. 4а).

Для моделирования возможных воздействий внутренних изгибов $\beta 1/\beta 2$ внеклеточного домена α -субъединиц на верхние остатки α -M2 спиралей были добавлены следующие типы внешних сил (после релаксации):

- К атомам СТ остатков α -SER269 и α -ALA270 (цепей А и D), которые находятся на верхнем (внеклеточном) конце α -M2 спиралей, прикладывались силы, вдоль нормали канала к мембране (координата z) с внутриклеточной стороны во внеклеточную сторону (выдвигающими спирали вверх) (рис. 9а). Ниже обозначены «I».
- К атомам СТ остатков α -SER269 и α -ALA270 (цепей А и D), прикладывались вращающие моменты сил ($F=1 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{Å})$), поворачивающие α -M2 спирали вокруг оси канала, направленные по часовой стрелке и против часовой стрелки (рис. 9б, на котором показаны только моменты сил, направленные по часовой стрелке). Ниже обозначены «II» и «III».
- К атомам СТ остатков α -THR267, α -SER268, α -SER269 и α -ALA270 (цепей А и D), прикладывались вращающие моменты сил ($F=1 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{Å})$), поворачивающие α -спирали против часовой стрелки относительно оси («закручивание» спирали) и по часовой стрелке относительно оси («вывинчивание» спирали) (рис. 9в, на котором показаны только моменты сил, направленных против часовой стрелки относительно оси.). Ниже обозначены «IV» и «V».

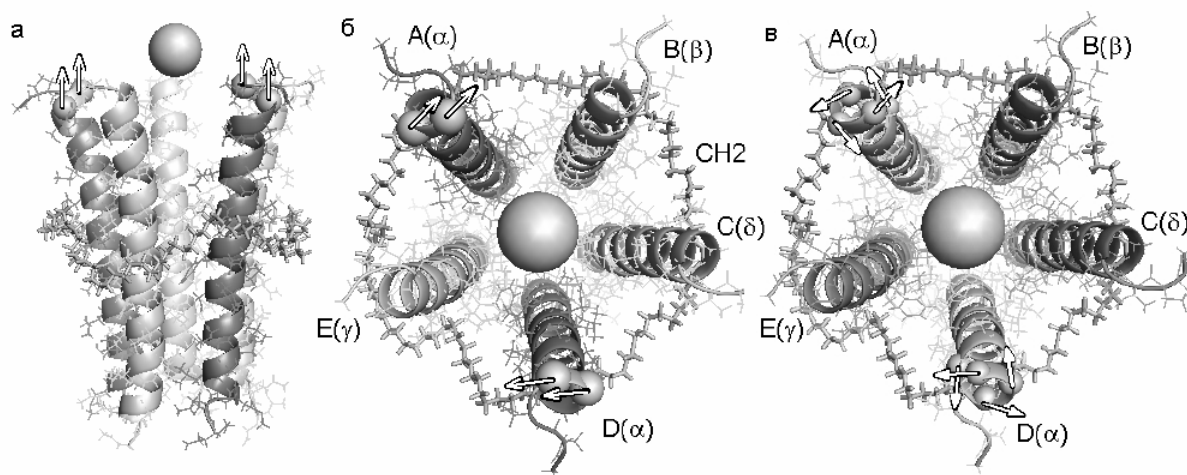


Рис. 9. Схема приложенных внешних сил при моделировании канала nAChR на модели. Стрелками показано направление приложенных сил.

В контрольном эксперименте, в котором к незаряженному комплексу прикладывалась внешняя сила $F=1\text{ ккал}/(\text{моль}\cdot\text{\AA})$, а к атомами спиралей не прикладывались силы, прохождение комплекса оказывалось невозможным из-за стерических препятствий (рис. 4а, а также кривая «0» на рис. 10). Аналогичная ситуация возникала и в численных экспериментах под действием моментов сил, приложенных к спиральным участкам и направленных по часовой стрелке вокруг оси канала («III»), а также вокруг осей α -M2 спиралей («V»). В этих случаях комплекс застревает в канале, в области с координатой $z\approx 86\text{\AA}$ (результаты не показаны).

В других трёх расчётах («I», «II» и «IV») комплекс вначале тормозился в области $z\approx 86\text{\AA}$, но через некоторое время продолжал движение сквозь пору. Далее частица ненадолго задерживалась в области $z\approx 75\text{\AA}$, и после этого успешно проходила через канал (за суммарное время $\tau\approx 340, 480$ и 480 пс в расчётах «I», «II» и «IV», соответственно). Кинетика прохождения незаряженного комплекса сквозь пору канала представлена на рис. 10.

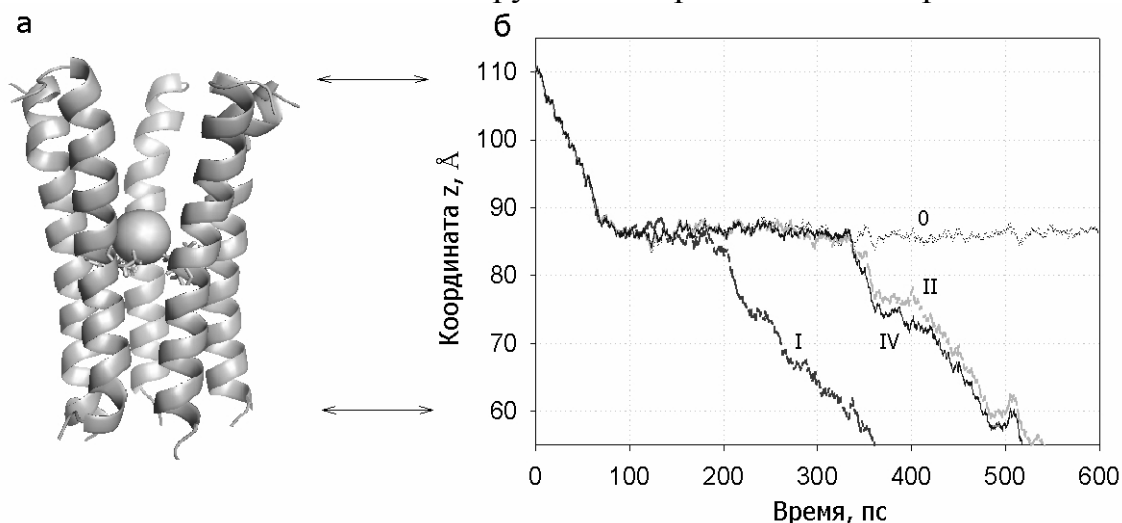


Рис. 10. а: молекулярная структура канала в момент времени $\tau=200$ пс после приложения внешней действия. Пробная частица показана шариком. Остатки 13' изображены с боковыми цепями. **б:** Кинетика перемещения незаряженного комплекса (3,63Å) в канале pAChR под действием $F=1$ ккал/(моль•Å). 0 – в контрольном расчёте, к спиралям не прикладывались никаких внешних сил; значение «I», «II» и «IV» – см. объяснения в тексте.

Радиус канала в момент времени $t=400$ пс приведен на рис. 11а. Как видно, радиус канала в расчёте с моментом сил, приложенным против часовой стрелки относительно оси α -M2 спиралей («IV») отличается от других случаев: радиус в области с координатой $z=82\div85$ Å заметно больше, чем в других случаях.

Усредненное изменение радиуса канала в области значений $z=82\div85$ Å, что соответствует воротам канала, приведено на рис. 11б. Изменения радиуса канала при разных стартах в начальные 200пс качественно похожи. Радиус ворот канала в численных экспериментах с моментом сил, направленным против часовой стрелки относительно оси («IV»), составляет около 2,75Å (от 2,2Å до 2,8Å). Радиус ворот канала в контрольном расчёте («0») монотонно уменьшался (менее 1,5Å после $t=600$ пс). В других двух расчётах («I» и «II») после $t=400$ пс, радиус ворот канала составлял 1,5÷2,6Å, – Хотя в момент прохождения иона радиус ворот канала в этих двух расчётах составлял более 2,8Å (рис. 10). По-видимому, значение 2,8Å для радиуса ворот канала – критическое для прохождения комплекса через канал. Можно предположить, что большие частицы могут проходить через канал только в случае, в котором прикладывались моменты сил, поворачивающие α -спирали против часовой стрелки относительно оси («IV»), и не могут проходить в двух других случаях («I» и «II»)

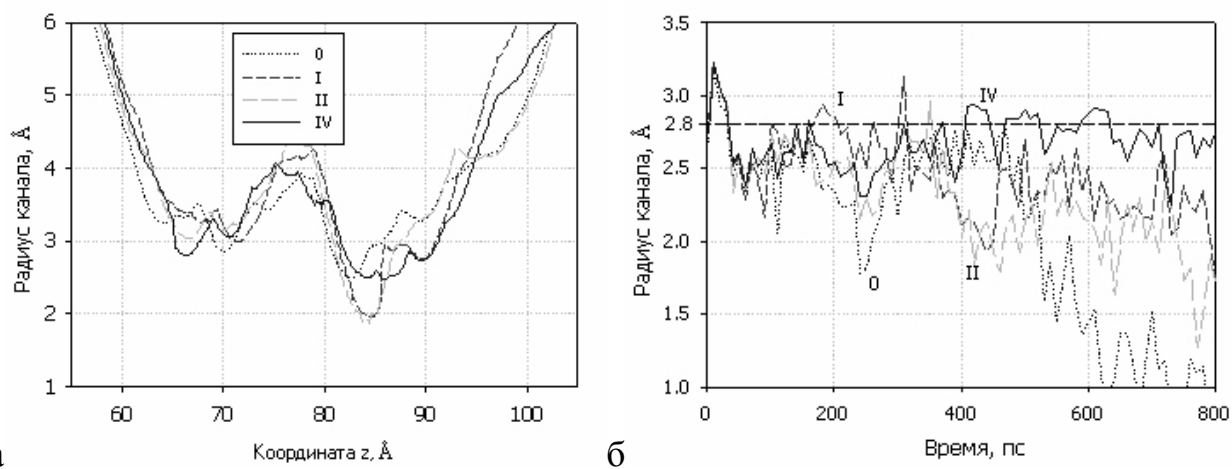


Рис. 11. а: Проекция эффективного радиуса канала pAChR на ось в моменты времени $\tau=400$ пс. **б:** Изменение радиуса канала в области значений $z=82\div85$ Å. Обозначения «0», «I», «II», «IV» – как на рис. 10.

Отметим, что радиусы ворот канала, даваемые программой HOLE – 2,7-2,8Å – оказываются заниженными по сравнению с радиусом проникающей сферы в МД эксперименте (3,63Å). Это обусловлено двумя факторами. Программа HOLE использует тяжелоатомное силовое поле AMBER84 (в МД экспериментах мы используем полноатомное силовое поле AMBER99). Второй фактор связан с динамическими эффектами деформации поры канала (т.е. частица расталкивает окружающие атомы в поре канала).

Изменение конформации в области ворот канала в моменты времени $t=600$ пс и $t=1$ пс показаны на рис. 12. В расчёте с моментом сил, направленным против часовой стрелки относительно оси («IV»), главные цепи А, В, С и D поворачиваются по часовой стрелке вокруг центральной оси канала и выдвигаются чуть наружу. Главная цепь Е поворачивается против часовой стрелки и отклоняется к центру канала. Все спирали двигаются кооперативно, таким образом, ворота канала открываются. Результат хорошо коррелирует с наблюдаемой в эксперименте изменением конформации канала при переходе в открытое состояние.

Динамика канала в других расчётах («III» и «V» не показаны, «0», «I» и «II» показаны на рис. 12) существенно отличается. Спираль выдвигались по-разному, радиус канала значительно уменьшался, симметричность расположения цепей в области ворот нарушалась, и конформация канала изменялась на менее благоприятную для прохождения иона.

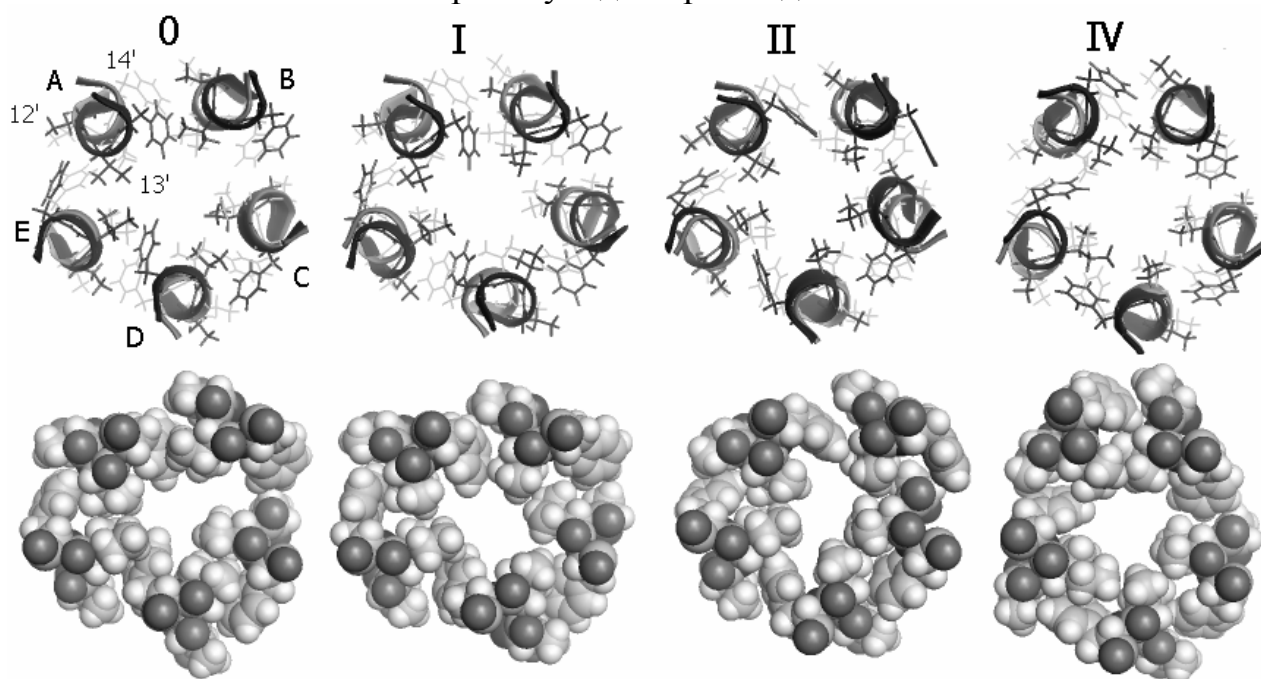


Рис. 12. Конформация ворот канала в расчётах. Верхний ряд: сравнение конформаций остатков 12', 13' и 14' в моменты времени $t=1$ пс (боковые цепи остатков показаны серыми тонкими линиями) и $t=600$ пс (боковые цепи остатков показаны черными толстыми линиями) в расчётах «0», «I», «II» и «IV». Нижний ряд: остатки 12',

13' и 14' в моменты времени $t=600\text{пс}$ в расчётах «0», «I», «II» и «IV», показаны ван-дер-ваальсовыми шариками. Обозначения «0», «I», «II» и «IV» – так же на рис. 10.

Таким образом, только в случае, когда к верхним (внеклеточная сторона) остаткам α -M2 спиралей прикладывают моменты сил, направленные против часовой стрелки относительно оси, остатки 13', которые формируют ворота канала, и их соседние остатки – 12' и 14' – двигаются кооперативно и вызывают открытие канала. Это подтверждает гипотезу о механизме открытия канала за счет передачи вращательного момента на верхние остатки α -M2 (субъединиц A и D) в результате конформационных изменений внеклеточного домена после связывания лиганда. Конформационные изменения α -M2 спиралей в процессе открытия канала передаются только за счёт вращательного движения петли $\beta 1/\beta 2$ внеклеточного домена относительно оси, направленного против часовой стрелки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе были поставлены задачи построения модели переноса частиц в пору лиганд-зависимого ионного канала – никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR), изучения свойств ворот канала и возможного механизма открытия канала nAChR при прохождении частиц в пору канала. На основе проведенных численных экспериментов определено нахождение ворот канал, оценен энергический барьер ворот и подтверждена гипотеза об открытии канала за счёт поворота M2 спиралей субъединиц.

На основе экспериментально определенной трёхмерной структуры трансмембранного домена nAChR построена упрощенная модель поры канала, состоящая из пяти α -спиральных M2 участков, которые непосредственно формируют пору канала и взаимодействуют с проходящими ионами. Для стабилизации канала на пентамерную структуру было одето углеводородное кольцо, состоящее из 105 остатков CH_2 .

Показано, что остатки 13' – A-VAL255, B-VAL261, C-VAL269, D-VAL255 и E-ILE264, находящиеся в области с координатой $z \approx 82\text{\AA}$, по-видимому, формируют ван-дер-ваальсовые ворота канала. Катион $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$ притягивается к отрицательно заряженным остаткам ASP и GLU. Барьеры, сформированные за счет электростатических взаимодействий с заряженными боковыми группами аминокислотных остатков, имеют в закрытом состоянии канала существенно большую крутизну – около $8\text{--}9\text{ккал}/(\text{моль}\cdot\text{\AA})$. Редукция электростатических взаимодействий облегчает прохождение катиона, хотя и уменьшает конформационную стабильность канала.

В работе также впервые использована новая методика для изучения

механизма открытия канала, в которой внешние моменты сил прикладываются на внеклеточные концы α -M2 спиралей, что приводит в конечном итоге к открытию канала. Анализ изменений радиуса канала и конформации ворот канала показывает, что ворота канала nAChR открываются только под действием момента сил приложенного на внеклеточные концы α -M2 спиралей и направленного против часовой стрелки относительно оси. Это показывает каким образом изгибы $\beta 1/\beta 2$ могут действовать на α -M2 спирали и демонстрирует детальный механизм процесса открытия канала. Наши данные подтверждают гипотезу о механизме открытия канала за счет передачи вращательного момента на верхние остатки α -M2 (субъединиц A и D) в результате конформационных изменений внеклеточного домена после связывания лиганда. Рецепторы, входящие в семейство лиганд-зависимых ионных каналов, возможно, работают по одинаковому механизму.

На основании вышеизложенных результатов можно сделать следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. Остатки 13' – A-VAL255, B-VAL261, C-VAL269, D-VAL255 и E-ILE264, находящиеся в области с координатой $z \approx 82 \text{ \AA}$ в канале nAChR, образуют незаряженное кольцо, которое и формирует главные ван-дер-ваальсовы ворота канала.
2. Крутизна ван-дер-ваальсовского энергического барьера, создаваемого остатками 13', составляет меньше $2 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{\AA})$. Большой энергический барьер создают отрицательно заряженные остатки GLU и ASP, которые располагаются в верхней области канала и играют роль электростатического фильтра, отбирающего положительно заряженные ионы.
3. Стабильная конформация канала поддерживается кулоновским отталкиванием между отрицательно заряженными остатками.
4. При одновременном присутствии нескольких положительно заряженных ионов в канале, электростатический барьер для прохода ионов уменьшается. Например, для комплекса $\text{Na}^+(\text{H}_2\text{O})_6$, с $11 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{\AA})$ до $5 \text{ ккал}/(\text{моль} \cdot \text{\AA})$.
5. Ворота канала открываются при действии момента сил, направленного против часовой стрелки относительно оси (сила прикладывалась к верхним остаткам M2). Это подтверждает гипотезу о механизме открытия канала за счет передачи вращательного момента на верхние остатки α -M2 (субъединиц A и D) в результате конформационных изменений внеклеточного домена после связывания лиганда. Рецепторы, входящие в семейство лиганд-зависимых ионных каналов, возможно, работают по одинаковому механизму.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ли Аньбан – Динамика прохождения ионов и гидратированных комплексов сквозь мембрану гетеромерного ацетилхолинового рецептора, состоящего из TM2 фрагментов // Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2005». М.:МГУ. -2005. –Т. 2. – С. 23.
2. Шайтан К.В., Терешкина К.Б., Турлей Е.В., Левцова О.В., Ли А., Голик Д.Н. – методы управляемой динамики для молекулярного дизайна сложных мембранных структур // Материалы третьего съезда Общества биотехнологов России им. Ю.А. Овчинникова, Макс Пресс, Москва, 2005. – С. 26
3. Ли А-Б., Терёшкина К.Б., Шайтан К.В. – Механизм открытия канала ацетилхолинового рецептора // Сборник тезисов международной школы-конференции молодых ученых «Системная биология и биоинженерия», Москва, 2005. – С.108
4. Ли Аньбан – Моделирование открытия канала никотинового ацетилхолинового рецептора // Сборник тезисов Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2006». М.:МГУ. -2006. – Т. IV. – С. 56.
5. Шайтан К.В., Турлей Е.В., Голик Д.Н., Терешкина К.Б., Левцова О.В., Федик И.В., Шайтан А.К., Ли А., Кирпичников М.П.. – Динамический молекулярный дизайн био- и наноструктур // Российский химический журнал. – 2006.2. – Т. L. – С. 53-65