

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕЖСПИРАЛЬНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ
В СТРУКТУРАХ μ -ОПИОИДНОГО РЕЦЕПТОРА, СВЯЗАННОГО С АГОНИСТОМ
И АНТАГОНИСТОМ**

Хрусталева В.В.¹, Хрусталева Т.А.², Скоробогатый М.В.¹, Деменчук Е.А.¹

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь;

²Государственное научное учреждение «Институт физиологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

Реферат. В статье проанализированы различия между агонист-содержащей и антагонист-содержащей структурами μ -опиоидного рецептора. Среди множества различий выделены только те, которые произошли в

непосредственной близости от сайта связывания лиганда. Описан механизм активации μ -опиоидного рецептора за счет «скольжения» 6-й спирали в цитоплазму.

Ключевые слова: μ -опиоидный рецептор, водородная связь, гидрофобный контакт, агонист; антагонист.

Введение. Роль μ -опиоидных рецепторов в организме человека заключается в антиноцицепции: обезболивание необходимо для нормального протекания многих физиологических процессов [1]. Помимо повышения болевого порога стимуляция μ -опиоидных рецепторов вызывает побочные эффекты: эйфорию, угнетение дыхания, ослабление перистальтики желудочно-кишечного тракта [1]. Рецептор состоит из семи длинных трансмембранных α -спиралей и петель между ними (цитоплазматических и экстраклеточных). В полости между семью спиралями находится сайт связывания агонистов этого рецептора. Если связывание агониста с μ -опиоидным рецептором приводит к активации связанного с ним G-белка и к интернализации рецептора (удалению белка из клеточной мембраны внутрь цитоплазмы), то связывание с антагонистом не завершается передачей сигнала, а сам рецептор остается на клеточной мембране в неактивном состоянии [2]. Как именно передается сигнал от активированного рецептора к G-белку неизвестно, но установлено, что процессу интернализации предшествует фосфорилирование остатка Tyr166 [2]. По всей видимости, этот аминокислотный остаток становится доступным для фосфорилирования только после активации рецептора. Другими словами, связывание рецептора с агонистом заставляет Tyr166 перейти из толщи билипидного слоя в цитоплазму. Недавно путем рентгеноструктурного анализа были получены сведения о строении μ -опиоидного рецептора мыши со связанным антагонистом [3] и агонистом [2]. Появилась возможность выяснить, есть ли существенные различия в структуре рецептора, связанного с агонистом, и в структуре того же рецептора с антагонистом в сайте связывания.

Цель работы — изучение способа связывания агониста и его влияния на взаимное расположение аминокислотных остатков в трансмембранных альфа-спиралях μ -опиоидного рецептора.

Материалы и методы. В настоящем биоинформатическом исследовании мы использовали две 3D-структуры μ -опиоидного рецептора мыши: антагонист-содержащую структуру (идентификатор в PDB: 4DKL [3]) сравнивали с агонист-содержащей (5C1M [2]).

Каждая трансмембранная спираль обеих структур μ -опиоидного рецептора была перезаписана в отдельный PDB-файл. Затем были созданы и проанализированы PDB-файлы, содержащие пары из семи спиралей (они были перезаписаны как разные цепи). Для обнаружения водородных связей, гидрофобных контактов, ионных, π - π , катион- π , и π -S взаимодействий между аминокислотами разных трансмембранных спиралей был использован сервер PIC (Protein Interactions Calculator) [4]. Также мы использовали сервер PLIP (Protein-Ligand Interaction Profiler) [5] для установления природы взаимодействия молекул агониста и антагониста с μ -опиоидным рецептором. Для визуализации результатов использовались программы Jmol и RasMol.

Количественный анализ проводили с помощью t-теста для сравнения относительных величин. Число водородных связей и гидрофобных контактов для каждой из семи спиралей в данной структуре делили на количество аминокислотных остатков в семи трансмембранных спиралях. Затем сравнивали полученные относительные величины для одинаковых спиралей из агонист-содержащей и антагонист-содержащей структуры. Для более детального анализа проводили аналогичные расчеты для каждой пары спиралей (при этом делили число выявленных контактов на общее количество аминокислот только в двух сравниваемых спиралях).

Результаты и их обсуждение. Используя сервер, подсчитывающий белковые взаимодействия (PIC), мы установили, как именно семь трансмембранных спиралей μ -опиоидного рецептора мыши соединены друг с другом. Важно отметить, что в кристаллическую структуру 4DKL входит антагонист морфина — β -FNA. Данная молекула образует множественные гидрофобные и полярные связи с радикалами аминокислот, формирующими внутреннюю поверхность трансмембранных спиралей, а также одну ковалентную связь. Наличие β -FNA в лиганд-связывающем домене может нарушать взаимодействие между трансмембранными спиралями, существовавшее до связывания. К сожалению, кристаллическая структура апо-формы μ -опиоидного рецептора не получена, но получена структура того же μ -опиоидного рецептора мыши, связанного с агонистом BU72 (5C1M). Итак, мы сравнили все межспиральные связи в 4DKL (структуре, содержащей антагонист) и 5C1M (структуре, содержащей агонист) с помощью сервера PIC.

В структуре с агонистом образуется 39 межспиральных водородных связей, в то время как в структуре с антагонистом образуются 52 водородные связи. Эти различия, однако, не являются достоверными, т. е. утверждать, что связывание антагониста приводит к увеличению частоты образования межспиральных водородных связей по всему рецептору нельзя.

Ионные, катион- π связи, а также взаимодействия «ароматическое кольцо – сера» и «ароматическое кольцо – ароматическое кольцо» в обеих структурах μ -опиоидного рецептора встречаются редко. Анализ гидрофобных связей показал, что в структуре с агонистом содержится 100 межспиральных гидрофобных контактов, в структуре с антагонистом — 110, что не является достоверным количественным различием.

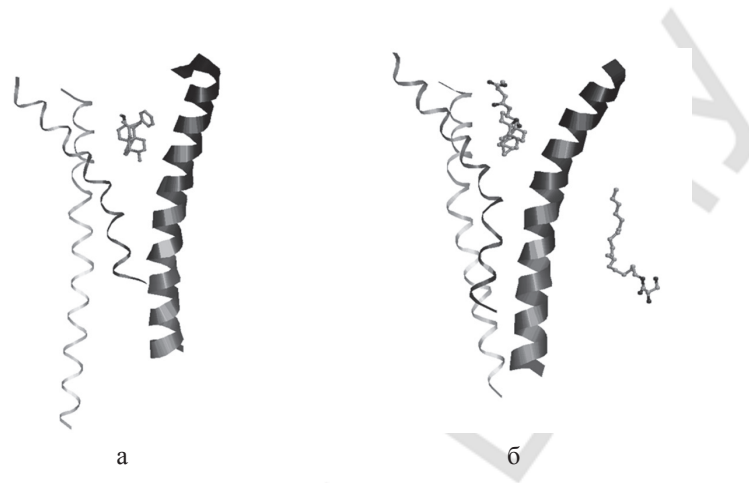


Рисунок — Структура 6 (светло-серая, слева), 7 (темно-серая, слева) и 3-й (справа) альфа-спиралей μ -опиоидного рецептора в связанном с агонистом (А) и антагонистом (Б) состоянии

Если проверить достоверность различий в количестве контактов между отдельными спиральями, то выяснится, что количество гидрофобных контактов между 5 и 6-й спиральями в структуре с агонистом достоверно превышает таковое для структуры с антагонистом. По всей вероятности, это различие можно объяснить отсутствием в структуре с агонистом лизоцима, который был специально встроен между 5 и 6-й спиральями в структуру рецептора, связанного с антагонистом, с целью ее стабилизации [3]. Структура с агонистом была стабилизирована специфической наночастицей (фрагментом антитела), которая связалась с нижней частью рецептора [2]. Изменения в сети водородных связей в цитоплазматической части рецептора, вероятнее всего, вызваны взаимодействиями с лизоцимом и наночастицей, а не природой лиганда, связанного с полостью между спиральями. Если сфокусироваться на межспиральных водородных связях в области, окружающей лиганд, то придется заключить, что есть лишь 13 агонист-специфичных и 13 антагонист-специфичных связей. Конкретную информацию о них можно найти в таблицах 1, 3. В них гидрофобные взаимодействия отмечены как «Н», водородные связи между боковыми цепями как «SS», водородные связи между основной цепью и боковой как «MS», между ароматическими остатками как «AA», между серой и ароматическим остатком как «AS», между катионом и π -системой как «CP», ионные — как «I».

Одним из наиболее явных различий между агонист-содержащей и антагонист-содержащей структурами является измененная геометрия 3-й спирали (рисунок). В антагонист-содержащей структуре у 3-й петли есть более сильный изгиб: рядом с аминокислотным остатком Met151 расположен «излом». В агонист-содержащей структуре 3-я спираль является более линейной. Действительно, Met151 образует водородную связь с His297 (6-я петля) только в присутствии антагониста. Другие водородные связи 3-й спирали, образуемые в присутствии антагониста: Asn150 – Ala113 (две водородные связи со 2-й спиралью) и Ser145 – Met203 (с 4-й спиралью). В агонист-содержащей структуре водородные связи, образуемые 3-й спиралью, иные: Asp147 – Thr120, Ser154 – Asp114 (со 2-й спиралью) и Lys141 – Met203 (с 4-й спиралью). Различия, указанные выше, отражают «распрямление изгиба» 3-й спирали в отсутствие антагониста.

Другим важным отличием агонист-содержащей и антагонист-содержащей структуры μ -опиоидного рецептора является геометрия 6-й спирали. Как мы отметили выше, в присутствии антагониста 6-я спираль образует только одну водородную связь Met151 – His297 с 3-й спиралью (а также 8 гидрофобных взаимодействий), в то время как в агонист-содержащей структуре эти спирали образуют всего 4 гидрофобные связи, одно π - π взаимодействие и ни одной водородной связи. Сходная ситуация (уменьшение количества водородных связей) была отмечена для 6 и 7-й спиралей. В присутствии антагониста образуются 5 уникальных водородных связей: Cys292 – Leu324 (основная цепь – боковая цепь), Cys292 – Asn328 (две водородные связи), Tyr299 – Gln314 (боковая цепь – основная цепь), Tyr299 – Ser317 (боковая цепь – боковая цепь). В присутствии агониста образуются 3 уникальные водородные связи: Cys292 – Leu324 (боковая цепь – боковая цепь), Cys292 – Gly325 (боковая цепь – боковая цепь) и Tyr299 – Gln314 (боковая цепь – боковая цепь).

Таблица 1. — Сведения о контактах между трансмембранными α -спиралями, общих для структур μ -опиоидного рецептора, связанного с антагонистом и с агонистом. Здесь и далее водородные связи вблизи сайта связывания выделены жирным шрифтом

	1	2	3	4	5	6	7
1							
2	H Ala68 – Tyr128 H Ile71 – Tyr128 H Met72 – Leu129 H Tyr75 – Leu121 H Tyr75 – Tyr128 H Val78 – Leu121 H Leu83 – Ala115 H Phe87 – Ala115 H Val89 – Ile101 H Val89 – Ala111 H Met90 – Phe108 H Met90 – Ala111 H Met90 – Leu112 H Ile93 – Ile105 H Ile93 – Phe108 H Val94 – Phe108 MS Cys79 – Thr118 MS Leu112 – Met90 AA Tyr57 – Tyr128 AS Phe108 – Met90						
3		H Leu139 – Phe123 H Val143 – Phe123 H Ile146 – Leu116 H Leu158 – Leu110 H Met161 – Tyr106 H Met161 – Ile107 SS Thr157 – Asn109 (три связи)					
4		H Ala102 – Ala184 H Ile105 – Pro181 H Ile105 – Ala184 H Tyr106 – Ala184 H Tyr106 – Val187	H Ile144 – Val202 H Ile 144 – Ala206 H Tyr148 – Ile198 H Tyr148 – Val202 H Tyr149 – Trp192 H Tyr149 – Leu200 H Phe152 – Ile198 H Phe156 – Leu194 SS Ser196 – Tyr149 AA Tyr149 – Trp192				
5			H Tyr148 – Leu232 H Met151 – Val236 H Met151 – Ala240 H Phe152 – Val236 H Phe152 – Phe239 H Phe152 – Ala240 H Ile155 – Ala240 H Ile155 – Pro244 H Phe156 – Phe239 H Leu158 – Ile248 H Val 163 – Ile247 H Tyr166 – Leu254 H Tyr166 – Met255 H Val169 – Met255 H Val169 – Leu259 MS Cys159 – Met255 MS Cys170 – Met255 SS Arg258 – Tyr166	H Ile198 – Leu232 H Ile198 – Val236 H Val202 – Leu232			
6						H Phe237 – Ile301 H Val245 – Ile290 H Ile248 – Val286 H Tyr252 – Val286	
7	H Leu74 – Ala323 H Val78 – Tyr326 H Val89 – Pro333 MS Asn86 – Ser329 (две связи)	H Leu110 – Tyr336 H Ala117 – Tyr326 H Leu121 – Tyr326 SS Gln124 – Tyr326 (три связи)	SS Tyr326 – Asp147				H Met281 – Leu339 H Val284 – Leu335 H Val285 – Leu335 H Val285 – Tyr336 H Val288 – Leu331 H Val288 – Leu335 H Pro295 – Leu324 H Ile296 – Trp318 H Ile296 – Ile322 H Tyr299 – Trp318 H Val300 – Trp318 SS Asn328 – Cys292 AA Tyr299 – Trp318 AS Tyr299 – Cys321 CP Trp318 – Lys303

Таблица 2. — Сведения о контактах между трансмембранными α -спиралями, уникальных для структуры μ -опиоидного рецептора, связанного с агонистом

	1	2	3	4	5	6		
1								
2	H Met90 – Ala115							
3		SS Thr120 – Asp147 SS Asp114 – Ser154						
4		H Ala102 – Pro181	H Ile142 – Met203 MS Lys141 – Met203 SS Asn191 – Thr160 (три связи)					
5			H Tyr148 – Val236 H Phe156 – Met243 MS Cys170 – Leu254 MS Cys170 – Arg258 SS Arg165 – Tyr252	H Leu194 – Phe239 H Met205 – Leu232				
6			H Ile155 – Trp293 AA Met151 – Trp293		H Ile234 – Ile301 H Phe237 – Ile298 H Phe241 – Phe289 H Phe241 – Trp293 H Pro244 – Phe289 H Val245 – Phe289 H Ile248 – Phe289 H Tyr252 – Val282 H Tyr252 – Val285 H Met255 – Ile278 H Met255 – Val282 H Ile256 – Leu275 H Ile256 – Ile278 H Ile256 – Val282 H Leu259 – Leu275 H Leu259 – Ile278 AA Phe241 – Phe289			
7	H Ile71 – Val316 H Leu74 – Phe320 H Tyr75 – Ile322 H Val78 – Ala323 H Leu88 – Phe338 H Val89 – Ala337 H Val89 – Phe338 MS Gly82 – Cys330 MS Val78 – Cys330 SS Tyr75 – His319	H Ile107 – Ala337 SS Asp114 – Asn332 SS Asp114 – Ser329	H Leu158 – Tyr336 H Met161 – Tyr336 SS Asp147 – Tyr326 (дополнительная) I Arg165 – Asp340 AS Met161 – Tyr336 CP Arg165 – Tyr336				H Val291 – Leu324 MS Gly325 – Cys292 SS Cys292 – Leu324 SS Tyr299 – Glu341 I 277 – Glu341	

Приведенные выше факты позволили сделать следующий вывод: 6-я спираль способна несколько легче «соскальзывать» относительно двух других спиралей (3 и 6-й) в присутствии агониста, чем в присутствии антагониста. Она не образует связи с 1, 2 и 4-й спиралями в присутствии агониста, но в то же время в присутствии антагониста образует два гидрофобных взаимодействия со 2-й спиралью. Для сравнения: 5-я спираль образует достоверно больше связей с 6-й спиралью в присутствии агониста, но все эти связи являются гидрофобными или π - π взаимодействиями. Эти изменения показывают, что 6-я спираль может быть своего рода мобильным элементом, передающим сигнал через изменения во внутриклеточной петле между 5 и 6-й спиралями.

Шестая спираль начинается с 272-го аминокислотного остатка в структуре с антагонистом и с 268-го остатка в структуре с агонистом, С-концевой остаток (306-я аминокислота) одинаков для обеих структур. Это значит, что в структуре с агонистом на N-конце присутствует дополнительный виток спирали. Как можно увидеть на рисунке (*a* — структура с агонистом), С-конец 6-й спирали смещен вниз относительно его положения на рисунке *b* (структура с антагонистом). Известно, что остаток Tyr166 (расположен на С-конце 3-й спирали) фосфорилируется только в рецепторе, активированном агонистом [2]. Поэтому можно предположить, что при связывании антагониста рецептором 6-я спираль не может соскользнуть вниз, а 3-я спираль приобретает свой характерный изгиб. В результате этого Tyr166 должен быть расположен ближе к мембране и не подвергаться фосфорилированию. Когда с рецептором связывается агонист, 6-я спираль «соскальзывает» вниз и выпрямляет изгиб 3-й спирали, делая Tyr166 доступным для фосфорилирования.

Седьмая спираль образует гораздо более прочные связи с 1 и 3-й спиралями в структуре с агонистом, чем в структуре с антагонистом. Она образует 4 дополнительных водородных связи с 1-й спиралью и дополнительную связь между Asp147 и Tyr326 3-й спирали. Согласно результатам алгоритма PLIP, Asp147 образует водородную связь с антагонистом и не образует водородных связей с агонистом. По всей вероятности, из-за этого Asp147 не вовлечен в образование водородных взаимодействий с аминокислотами других спиралей в структуре с антагонистом.

Другой регион с отклонениями в сети водородных связей расположен на наружной поверхности рецептора. В структуре, связывающей антагонист, образуются дополнительные водородные связи между 2 и 4-й, 3 и 4-й, 3 и 5-й спиралями. Видимо, они сформировались из-за связывания в данной зоне поверхностно активной молекулы, используемой для стабилизации структуры (рисунок *b*). Можно утверждать, что связывание лиганда стабилизирует структуру белка, способствуя образованию новых внутрибелковых взаимодействий. Однако связывание μ -опиоидного агониста сопряжено с уменьшением количества таких связей не в целом во всей структуре, а в конкретных специфических сайтах, что делает эти сайты более мобильными (а именно 6-ю спираль).

С 2015 г. исследователи получили возможность сравнить агонист-содержащую и антагонист-содержащую структуру μ -опиоидного рецептора. Естественно, первичный анализ был проведен самими кристаллографистами, снявшими рентген как для одной [2], так и другой структуры [3]. Однако анализ касался в основном взаимоотношений лигандов с рецептором, а не контактов между аминокислотными остатками внутри самого рецептора. Нельзя забывать и том, что различные биоинформатические алгоритмы дают разные результаты по количеству и типам связей между аминокислотными остатками. В данной работе мы отдельно рассматривали связи между каждой парой спиралей.

Таблица 3. — Сведения о контактах между трансмембранными α -спиралями, уникальных для структуры μ -опиоидного рецептора, связанного с антагонистом. Водородные связи вблизи сайта связывания выделены жирным шрифтом

	1	2	3	4	5	6	
1							
2	H Ala68 – Leu129 H Ile69 – Leu129 MS Asn86 – Ala111 (две связи) MS Lys100 – Val94 MS Lys100 – Tyr96						
3		H Met161 – Leu110 H Ala117 – Ile146 MS Ala113 – Asn150 (две связи)					
4		H Leu112 – Trp192 H Ala113 – Trp192 H Leu116 – Trp192 MS Ile105 – Asn188 SS Asn109 – Trp192	MS Thr157 – Asn191 MS Asn191 – Thr153 SS Arg179 – Asp164 SS Ser145 – Met203 SS Thr157 – Asn191 I Arg179 – Asp164				
5			H Phe156 – Pro244 H Ile155 – Val245 MS Cys159 – Pro244 MS Cys170 – Met255 SS Tyr166 – Arg258				
6		H Ile107 – Met281 H Leu110 – Val285	H Met161 – Val282 H Met161 – Val285 H Val169 – Leu275 H Leu158 – Val285 H Leu158 – Val286 SS His297 – Met151		H Tyr252 – Leu283		
7	H Tyr75 – Ala323 H Tyr75 – Tyr326 H Val81 – Val334 H Val89 – Tyr336 AA Tyr75 – Tyr326	H Ile107 – Tyr336 MS Asp114 – Ser329 SS Tyr128 – His319				H Met281 – Tyr336 H Val284 – Leu339 H Val285 – Leu339 MS Cys292 – Leu324 MS Tyr299 – Gln314 SS Asn328 – Cys292 (две дополнительные связи) SS Ser317 – Tyr299 SS Asp340 – Met281 (две связи)	

Применение методов статистической обработки данных возможно только для выявления достоверности в количественных различиях между двумя структурами. Действительно, в данной работе мы доказали, что гидрофобных контактов между 5 и 6-й α -спиралями в агонист-содержащей структуре достоверно больше, чем в антагонист-содержащей. Однако причина этого кроется не в том, что агонист приводит к иным структурным перестройкам в рецепторе, нежели чем антагонист, а в особенностях подготовки 7ТМС рецептора к снятию рентгена (т. е. это артефакт, а не биохимический феномен). Различия же в характере взаимодействий между другими спиралями являются скорее качественными: только детальный анализ каждого взаимодействия способен позволить приблизиться к пониманию механизмов активации и блокировки рецептора.

Детальное сравнение межспиральных контактов агонист-содержащего и антагонист-содержащего μ -опиоидного рецепторов выявило несколько новых фактов. Связывание антагониста сопряжено с образованием новых водородных межспиральных взаимодействий конкретно между 6 и 3-й и 6 и 7-й спиралями. Эти связи должны стабилизировать не только положение 6-й спирали, но и изогнутую форму 3-й спирали. Водородные связи между антагонистом и рецептором должны стабилизировать структуру комплекса «лиганд–рецептор» в т. ч. и за счет возникновения нескольких дополнительных водородных связей между трансмембранными спиралями рецептора.

Заключение. По результатам биоинформатического анализа можно заключить, что связывание антагониста стимулирует образование дополнительных водородных связей между остатками аминокислот 3 и 6-й, а также 3 и 7-й α -спиралей μ -опиоидного рецептора. Поскольку сведения о структуре рецептора без лигандов отсутствуют, нельзя исключить и того, что перечисленные выше взаимодействия присутствуют в апо-форме, но разрушаются при связывании рецептора с агонистом. Так или иначе эти связи должны предотвращать «скольжение» 6-й спирали в цитоплазму и обуславливать образование характерного изгиба 3-й спирали. Полученная информация важна для поиска агонистов и антагонистов μ -опиоидных рецепторов путем молекулярного докинга.

Літэратура

1. Synthesis of tripeptides containing D-Trp substituted at the indole ring, assessment of opioid receptor binding and in vivo central antinociception / R. De Marco [et al.] // *J. Med. Chem.* — 2014. — Vol. 57, iss. 15. — P. 6861–6866.
2. Structural insights into μ -opioid receptor activation / W. Huang [et al.] // *Nature*. — 2015. — Vol. 524, № 7665. — P. 315–321.
3. Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist / A. Manglik [et al.] // *Nature*. — 2012. — Vol. 485, № 7398. — P. 321–326.
4. Tina, K.G. PIC: Protein Interactions Calculator / K.G. Tina, R. Bhadra, N. Srinivasan // *Nucleic Acids Res.* — 2007. — Vol. 35. — P. 473–476.
5. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler / S. Salentin [et al.] // *Nucleic Acids Res.* — 2015. — Vol. 43, № 1. — P. 443–447.

COMPARATIVE ANALYSIS OF INTERHELICAL CONTACTS IN STRUCTURES OF μ -OPIOID RECEPTOR BOUND BY AGONIST AND ANTAGONIST

Khrustalev V.V.¹, Khrustaleva T.A.², Skorobogatiy M.V.¹, Demenchuk E.A.¹

¹*Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus;*

²*Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus*

The differences between agonist-containing and antagonist-containing structures of μ -opioid receptor have been analyzed in this article. Among numerous differences we selected those which happened near the ligand binding site. The mechanism of the μ -opioid receptor activation due to the “sliding” of the 6th helix into the cytoplasm has been described.

Keywords: μ -opioid receptor; hydrogen bond; hydrophobic contact; agonist; antagonist