

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА ГАМК_A-РЕЦЕПТОРА ПО ГОМОЛОГИИ

© 2017 г. А.В. Россохин

Научный центр неврологии, 105064, Москва, пер. Обуха, 5

E-mail: alrossokhin@yahoo.com

Поступила в редакцию 16.09.16 г.

После доработки 11.04.17 г.

Проницаемость ионного канала для ионов и веществ, связывающихся в пору, зависит от площади поперечного сечения поры. Мы построили модели закрытого, открытого и десенситизированного $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -ГАМК_A-рецептора на основе известных структур как прокариотических, так и эукариотических лиганд-управляемых каналов. Мы использовали метод Монте-Карло минимизации энергии для оптимизации структуры моделей. Мы обнаружили значительные сужения поры, диаметр которых зависит от функционального состояния рецептора, в цитоплазматической, средней и экстраклеточной частях образующих пору М2-сегментов. Известно, что сужения в средней (кольцо остатков 9') и цитоплазматической (кольцо остатков 2') частях М2-спиралей формируют активационные и десенситизационные ворота ГАМК_A-рецептора. Наши расчеты предсказывают, что сужение в экстраклеточной части М2-спиралей (кольцо остатков 20'), также может выполнять воротную функцию в ГАМК_A-рецепторе, чья физиологическая роль пока не выяснена. Мы показали допустимость использования структур ряда прокариотических и эукариотических лиганд-управляемых каналов, выделенных у бактерий и низших животных, для моделирования по гомологии региона поры ГАМК_A-рецептора человека.

Ключевые слова: моделирование по гомологии, рецептор ГАМК_A, трансмембранный домен, диаметр поры, метод Монте-Карло, минимизация энергии.

Быстрое торможение в центральной нервной системе опосредуется активацией рецепторов γ -аминомасляной кислоты типа А (ГАМК_AР), сопряженных с хлорным каналом. ГАМК_AР является лиганд-управляемым ионным каналом, относящимся к семейству Cys-петельных рецепторов. В это семейство входят также катион-проводящие никотиновый ацетилхолиновый и серотониновый рецепторы (nAChR и 5-HT₃R), а также анионный глициновый рецептор (GlyR) [1].

ГАМК_AР представляет собой интегрированный в мембрану белковый макромолекулярный комплекс, состоящий из пяти субъединиц. Найдено 19 типов субъединиц (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , ρ_{1-3} , ϵ , π , δ и θ), из которых может состоять ГАМК_AР,

однако наиболее частой комбинацией в центральной нервной системе является $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ со стехиометрическим соотношением субъединиц 2 : 2 : 1 [2,3]. В структуре ГАМК_AР можно выделить экстраклеточный и трансмембранный домены (ЭКД и ТМД соответственно). ЭКД включает место связывания агониста ГАМК, расположенное в интерфейсе между α и β субъединицами. Трансмембранный сегмент каждой субъединицы состоит из четырех α -спиралей (М1–М4) и большой внутриклеточной петли, соединяющей спирали М3 и М4.

Пора ГАМК_AР формируется пятью спиралями М2 и обеспечивает энергетически оптимальное перемещение ионов хлора через гидрофобный барьер мембраны. Аминокислотные остатки, входящие в М2 сегменты различных субъединиц, определяют селективность и проводимость канала [4,5]. Для облегчения сравнения различных субъединиц выработана единая система обозначения остатков сегмента М2 [6]. Высококонсервативные остатки Arg в N-терминальной части М2-спирали принимаются за позицию 0'. Далее при движении в направлении внеклеточного вестибуля канала

Сокращения: ГАМК_AР – рецептор γ -аминомасляной кислоты типа А, nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор, HT₃R – серотониновый рецептор, GlyR – глициновый рецептор, ЭКД – экстраклеточный домен, ТМД – трансмембранный домен, ELIC – лиганд-управляемый канал из *Erwinia chrysanthemi*, GLIC – лиганд-управляемый канал из *Gloeobacter violaceus*, GluCl – глутамат-управляемый хлорный канал, метод МКМ – метод Монте-Карло минимизации энергии.

происходит увеличение номера остатка. Боковые цепи остатков в позициях $-2'$, $2'$, $6'$, $10'$, $13'$, $17'$ и $20'$ направлены внутрь поры.

ГАМК_AP является мишенью для различных классов фармакологических препаратов, таких как бензодиазепины, барбитураты, анестетики, стероиды и неконкурентные антагонисты [2,7]. Многие вещества из класса неконкурентных антагонистов, обладающие различной химической структурой, такие как пенициллин, пикротоксин, инсектициды (α -эндосульфат, линдан, фипронил), блокируют ГАМК_AP, связываясь в поро в районе колец $2'$ – $9'$ [8–11].

Проницаемость поры для различных веществ определяется как геометрией М2-спиралей, так и составом аминокислотных остатков, образующих стенки поры. Cys-петельные рецепторы могут находиться в трех функциональных состояниях: закрытом, открытом и десенситизированном. Очевидно, что конформационные изменения, возникающие при переходе ГАМК_AP из одного функционального состояния в другое, влияют на проницаемость поры. Оценка размеров поры позволяет предсказать, сможет ли тот или иной лиганд подойти к предполагаемому сайту связывания без стерических конфликтов со стенками поры.

Большинство программ молекулярной графики включают рутинные процедуры по построению ван-дер-ваальсовой поверхности белка (учитывающей ван-дер-ваальсовы радиусы отдельных атомов), что позволяет измерить диаметр поры канала как расстояние между противоположными точками на этой поверхности. Компьютерные программы HOLE [12], CAVER [13], MOLE [14], MolAxis [15] были разработаны для идентификации и анализа внутрибелковых полостей. Эти программы могут использоваться для оценки размеров поры различных ионных каналов, структуры которых были определены при помощи рентгеновской кристаллографии или криоэлектронной микроскопии [16–21].

В настоящее время известны структуры различных Cys-петельных рецепторов, выделенных у разных организмов от бактерий до человека. В 2008 и 2009 гг. впервые с достаточно высоким разрешением 3,3 и 2,9 Å были получены рентгеновские структуры прокариотических гомо-олигомерных лиганд-управляемых каналов ELIC (*Erwinia chrysanthemi*) [21] и GLIC (*Gloeobacter violaceus*) [19]. Оба рецептора являются катионпроводящими. ELIC активируется первичными аминами (в частности, ГАМК) [22,23], GLIC чувствителен к повышению уровня pH [24]. ELIC был закристаллизован в закры-

том состоянии, структура GLIC доступна как в закрытом, так и открытом состояниях.

Наряду с ГАМК_A и глициновыми рецепторами у беспозвоночных, насекомых и других низших организмов существуют хлорпроводящие пентамерные ионные каналы, активируемые глутаматом [25]. В 2011 г. с разрешением 3,3 Å была получена рентгеновская структура глутамат-управляемого хлорного канала (GluCl), выделенного у нематоды (*Caenorhabditis elegans*) [20]. В Protein Data Bank доступны структуры GluCl, соответствующие закрытому и открытому состояниям. Авторы работы [18] при помощи методов криоэлектронной микроскопии получили структуры гомо-олигомерного α_1 -GlyR позвоночных (*Danio rerio*) в комплексе с глицином/ивермектином, глицином и стрихнином с разрешением 3,8, 3,9 и 3,9 Å соответственно. В последние годы были опубликованы рентгеновские структуры человеческих гомо-олигомерных α_3 -GlyR (закрытое состояние) и β_3 -ГАМК_AP (десенситизированное состояние), полученные с разрешением 3 Å [16,17].

Мы использовали методику гомологического моделирования для построения структурных моделей ТМД ГАМК_AP, соответствующих закрытому, открытому и десенситизированному состояниям рецептора, используя в качестве шаблона известные структуры как прокариотических, так и эукариотических пентамерных лиганд-управляемых рецепторов [16–21]. Наши модели позволяют предсказать значительное сужение поры на уровнях колец остатков $-2'$, $9'$ и $20'$. Зависимость диаметра этих колец от функционального состояния ГАМК_AP предполагает их участие в воротных механизмах рецептора. Мы показали допустимость использования структур GLIC, ELIC и GluCl, выделенных у бактерий и низших животных, для моделирования по гомологии региона поры ГАМК_AP человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярное моделирование позволяет с атомарной точностью строить и изучать модели таких сложных белков, как ионные каналы. Однако далеко не всегда известна структура изучаемого канала. В этом случае применяется методика моделирования по гомологии, которая подразумевает общность трехмерных структур у белков, имеющих общее эволюционное происхождение. При этом известные структуры родственных белков используются в качестве шаблонов для построения модели исследуемого белка.

Структуры лиганд-управляемых каналов, использованные при построении моделей ТМД ГАМК_AР

Рецептор	Организм	Агонист	Селективность	Функциональное состояние рецептора	PDB код
ELIC	Бактерия <i>Erwinia chrysanthemi</i>	Первичные амины, ГАМК	Na ⁺ , K ⁺	Закрытое	2VL0
GLIC	Бактерия <i>Gloeobacter violaceus</i>	Протоны	Na ⁺ , K ⁺	Закрытое	4ZZB
–	–	–	–	Открытое	2XQ3
GluCl	Нематода <i>Caenorhabditis elegans</i>	Глутамат	Cl ⁻	Закрытое	4TNV
–	–	–	–	Открытое	3RIF
α_1 GlyR	Рыбы, <i>Danio rerio</i>	Глицин	Cl ⁻	Закрытое	3JAD
–	–	–	–	Открытое	3JAE
–	–	–	–	Десенситизированное	3JAF
α_3 GlyR	Человек	Глицин	Cl ⁻	Закрытое	5CFB
β_3 ГАМК _A Р	Человек	ГАМК	Cl ⁻	Десенситизированное	4COF

Примечание. PDB код – код структуры в базе данных Protein Data Bank.

Мы построили модели ТМД ГАМК_AР $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -конфигурации, соответствующие закрытому, открытому и десенситизированному состояниям рецептора. При построении моделей мы использовали в качестве шаблонов структуры как прокариотических [19,21], так и эукариотических [16–18,20] пентамерных гомо-олигомерных лиганд-управляемых каналов (таблица). Гомо-олигомерный β_3 -ГАМК_AР [16] наилучшим образом подходит для построения модели гетеромерного ГАМК_AР (рис. 1). Структура этого прототипа соответствует десенситизированному состоянию рецептора. GlyR является близким гомологом ГАМК_AР. Следовательно, рентгеновские и электронномикроскопические структуры α_1 - и α_3 -GlyR, соответствующие закрытому, открытому и десенситизированному состояниям [17,18], хорошо подходят в качестве шаблонов при моделировании ГАМК_AР. Мы использовали также прототипы более далеких по филогенетической лестнице гомологов, таких как глутамат-управляемый хлорный канал GluCl беспозвоночных [20] и бактериальные лиганд-управляемые каналы GLIC и ELIC [19,21]. Сравнение этих моделей с моделями, полученными на основе структур, выделенных у позвоночных и человека, позволит установить правомерность применения данных прототипов для моделирования региона поры ГАМК_AР.

Построению моделей предшествовало выравнивание аминокислотных последовательностей шаблонов и ГАМК_AР. Выравнивание последовательностей М2-сегментов ГАМК_AР, GlyR, GluCl, ELIC и GLIC осуществляли относительно высококонсервативных остатков Pro 23' (рис. 2а). Из рис. 2а видно, что в области М2-сегментов ГАМК_AР, GlyR и GluCl имеют высокий уровень гомологии (превышающий 63%). Уровень гомологии М2-сегментов ГАМК_AР с последовательностями бактериальных каналов ELIC и GLIC можно охарактеризовать как низкий (не превышает 18 и 24% соответственно).

При построении моделей ГАМК_AР стартовая геометрия главных цепей модели фиксировалась в соответствии со структурой шаблона. Стартовые значения торсионных углов остатков, идентичных с остатками шаблона, принимались равными величинам торсионных углов в шаблоне. «All-trans»-конформация была использована в качестве стартовой в случае не совпадения остатков ГАМК_AР и шаблона. Метод Монте-Карло минимизации энергии (МКМ) [26] был использован нами для оптимизации геометрии моделей. Суть этого подхода состоит в сочетании случайных изменений координат модели с последующим градиентным спуском в ближайший энергетический минимум.

Минимизация энергии осуществлялась в пространстве внутренних координат модели

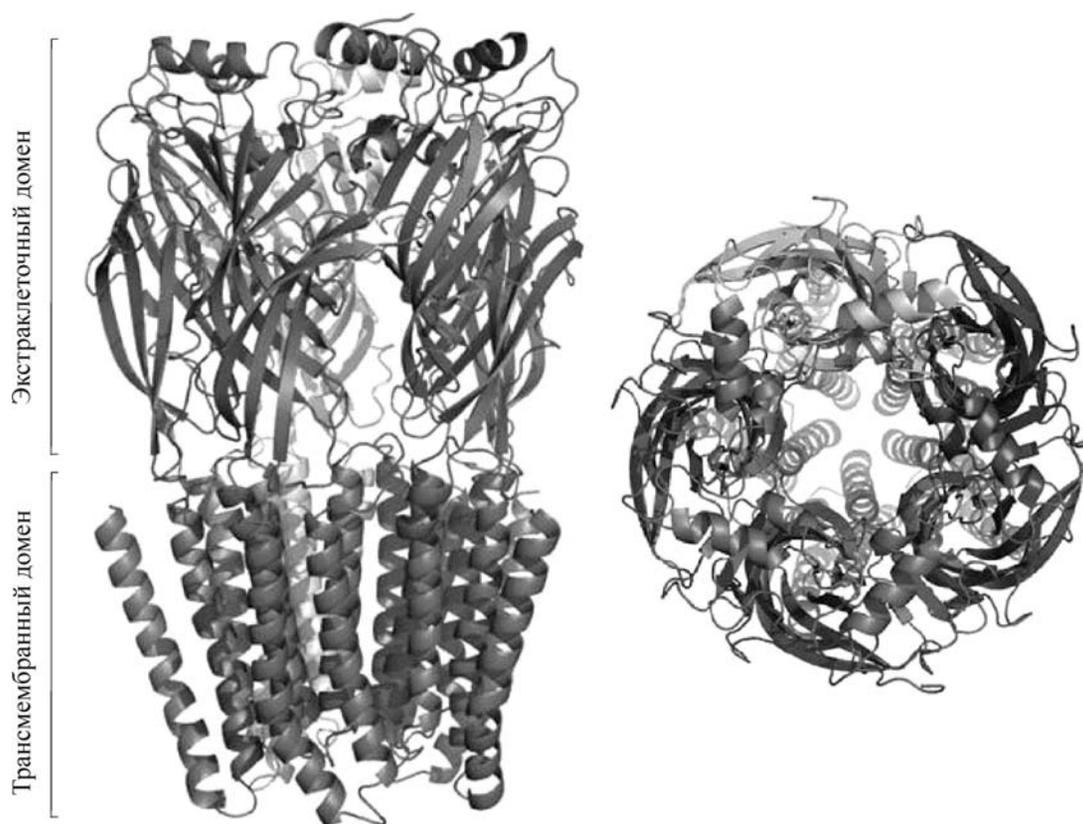


Рис. 1. Структура гомо-олигомерного β_3 -ГАМК_A-рецептора. Координаты структуры взяты из работы [16]. Показан вид из плоскости мембраны (слева) и экстраклеточного пространства (справа). На рисунке слева выделены экстраклеточный и трансмембранный домены.

при помощи пакета компьютерных программ ZMM (<http://www.zmmsoft.com>). Внутренними координатами моделей являются длины валентных связей, валентные и торсионные углы, а также декартовы координаты и эйлеровы углы, определяющие положение отдельных молекул. Каждая МКМ-траектория завершалась, если 10000 последовательных изменений координат модели не приводили к уменьшению энергии.

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия рассчитывали с использованием силового поля AMBER [27] с расстоянием отсечки 9 Å. При вычислении электростатических взаимодействий между ионизированными группами отсечку не применяли. Мы использовали выражение диэлектрической проницаемости как функции расстояния между парами атомов и степени их экспозиции в водное окружение [28]. Для пептидных цепей использовали стандартную валентную геометрию и заряды на атомах. В процессе расчетов валентные углы пептидов удерживались жесткими.

В наших расчетах МКМ-протокол применяли в два этапа. На первом этапе геометрию модели оптимизировали с использованием сис-

темы ограничителей. Изменения координат C_α атомов относительно координат шаблона были ограничены при помощи потенциальных параболических функций с плоским дном. Энергия ограничителя равнялась нулю, если отклонение не превышало 1 Å, и росла пропорционально квадрату отклонения при превышении этого значения. Минимизация энергии модели с системой ограничителей позволяет избежать деформации заданной шаблоном структуры в результате стерических конфликтов, неизбежных в стартовой геометрии модели. На втором этапе МКМ протокол применяли без каких-либо ограничителей. Различие между структурами, найденными с применением и без применения системы ограничителей, позволяет оценить, была ли получена стабильная структура после первого этапа расчетов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы использовали компьютерную программу CAVER 3.0 [13] для определения диаметра поры ГАМК_AР. Визуализация пространства внутри поры рецептора, находящегося в закрытом, открытом и десенситизированном состоя-

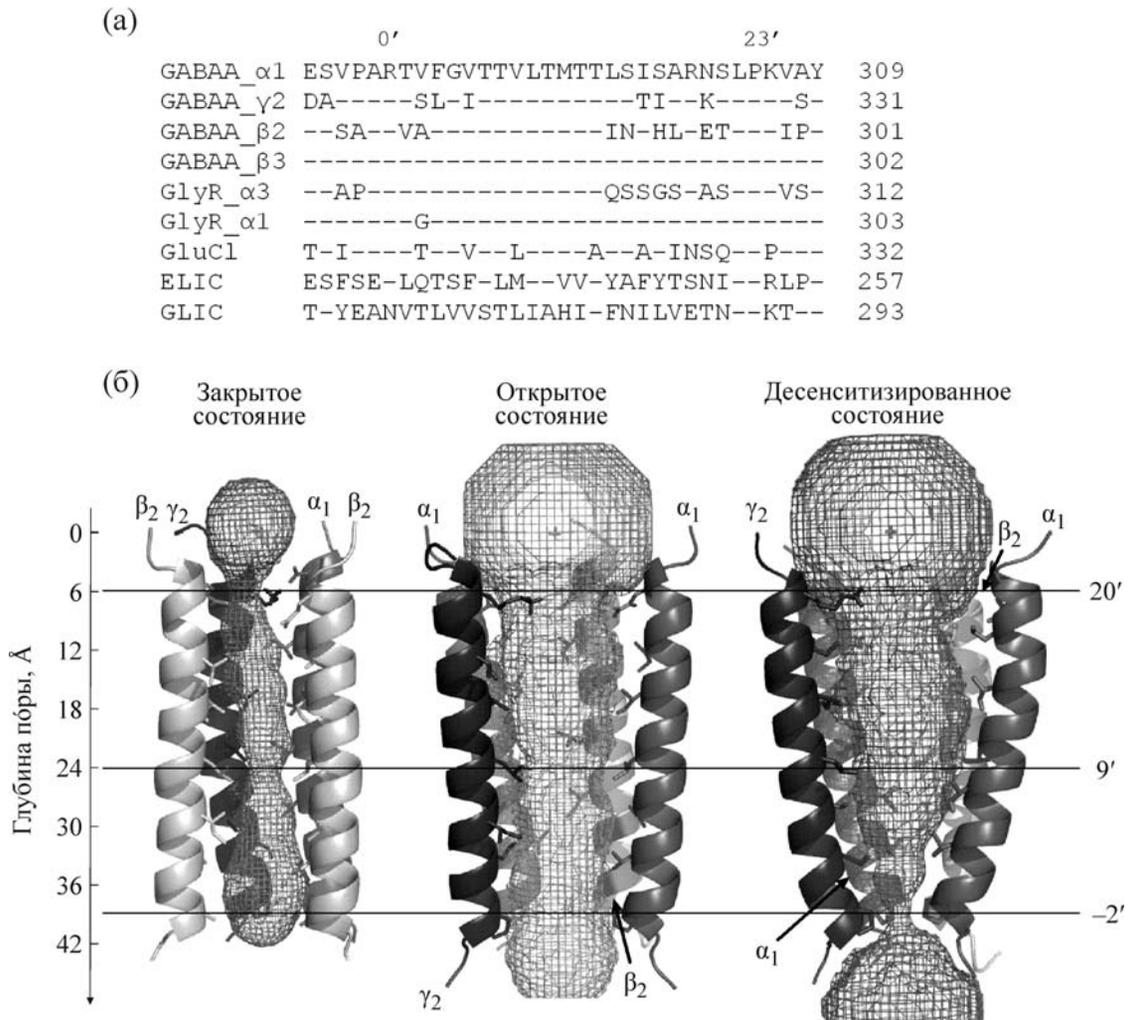


Рис. 2. Текстовое и графическое представление образующих пору М2-сегментов. (а) – Выравнивание аминокислотных последовательностей различных субъединиц рецепторов ГАМК_A, Gly, GluCl, ELIC и GLIC. Прочерки в линиях указывают на совпадение остатков в данной линии с остатками в линии предыдущей. Последовательности взяты из базы данных UniProt с идентификационными номерами ГАМК_A-α₁ – P14867, ГАМК_A-β₂ – P47870, ГАМК_A-β₃ – P28472, ГАМК_A-γ₂ – P18507, GlyR_α₁ – O93430, GlyR_α₃ – O75311, GluCl – G5EBR3, ELIC – P0C7B7, GLIC – Q7NDN8. (б) – Визуализация пространства внутри поры моделей, соответствующих закрытому (слева, шаблон α₃-GlyR), открытому (в центре, шаблон α₁-GlyR) и десенситизированному (справа, шаблон β₃-ГАМК_AP) состояниям, выполненная при помощи компьютерной программы CAVER 3.0. На рисунке изображены только М2-сегменты различных субъединиц ГАМК_AP. Фронтальная субъединица удалена для ясности. На оси слева отражена глубина поры. Горизонтальные линии указывают на уровни основных сужений поры –2', 9' и 20'.

нии, представлена на рис. 2б. На рис. 3а,в,д показаны графики зависимости диаметра от глубины поры в моделях закрытого, открытого и десенситизированного ГАМК_AP, построенных на основе структур различных прототипов (таблица). Нулевое значение на оси абсцисс соответствует входу в экстраклеточный вестибуль поры. Из рис. 3 хорошо видно, что размер и геометрия поры в разных функциональных состояниях рецептора значительно различаются.

Мы построили пять моделей ТМД ГАМК_AP в закрытом состоянии на основе гомо-олиго-

мерных структур рецепторов ELIC (2VL0, здесь и далее в скобках указан код структуры в базе данных PDB), GLIC (4ZZB), GluCl (4TNV), α₁ и α₃ GlyR (3JAD и 5CFB). Геометрия М2-сегментов поры в значительной мере совпадает у всех пяти моделей (рис. 3а). Исключением являются внеклеточный вестибуль канала ГАМК_AP-GLIC и внутриклеточный вестибуль канала ГАМК_AP-ELIC. В обоих случаях наблюдаемые отклонения скорее всего связаны с особенностями кристаллизации белков прототипов. Например, в случае ГАМК_AP-GLIC деформация

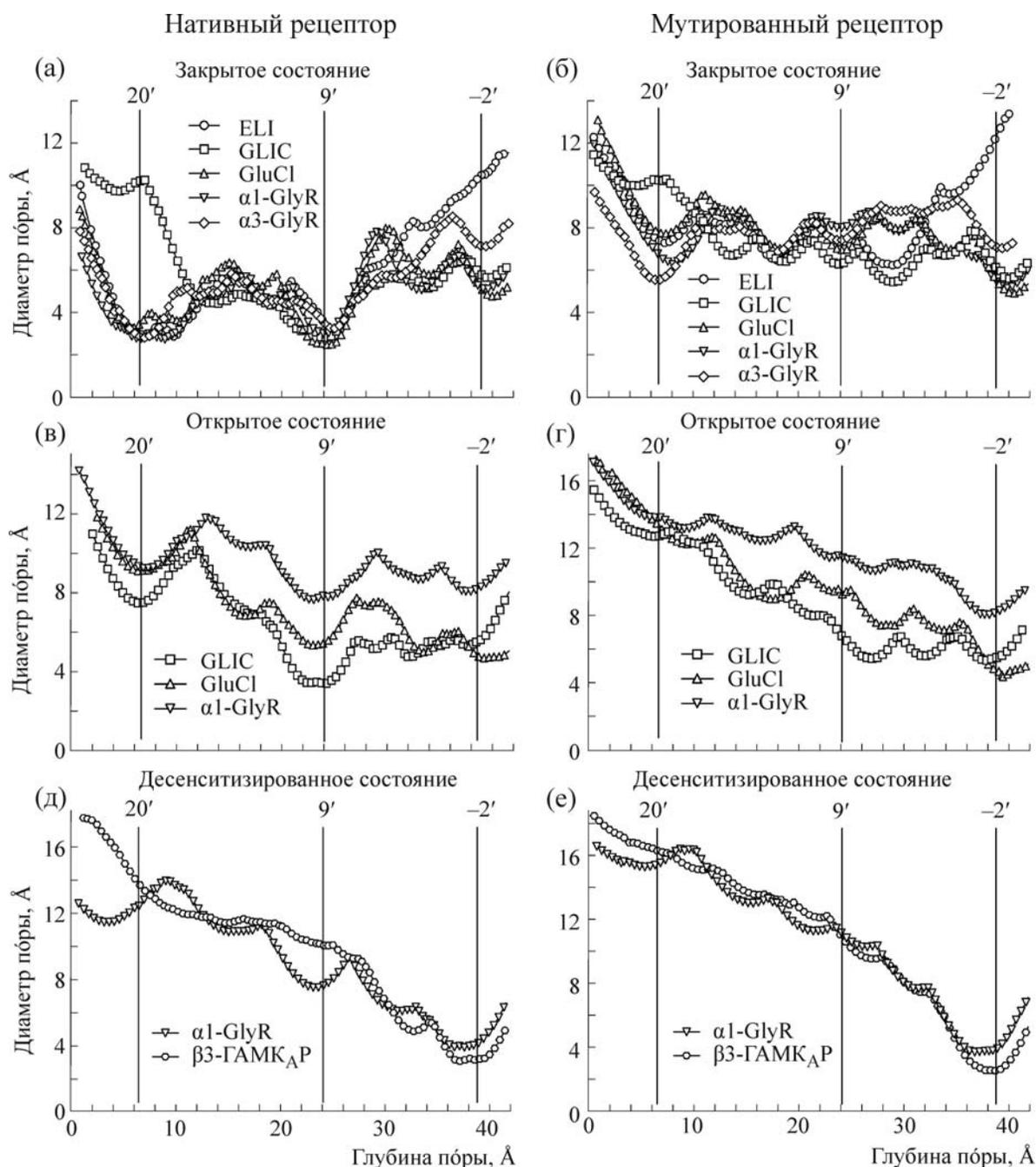


Рис. 3. Изменение диаметра от глубины поры в моделях $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -ГАМК_AР, соответствующих закрытому (а,б), открытому (в,г) и десенситизированному (д,е) состояниям рецептора. Зависимости (а), (в) и (д) получены для нативного ГАМК_AР, зависимости (б), (г) и (е) – для моделей мутированного ГАМК_AР с замещенными на Ala остатками М2-сегментов, боковые цепи которых направлены в пору. Различные кривые на графиках соответствуют моделям, построенным на основе структур гомо-олигомерных рецепторов ELIC, GLIC, GluCl, α_1 - и α_3 -GlyR, а также β_3 -ГАМК_AР (см. таблицу). Вертикальные линии указывают на уровни поры -2', 9' и 20'.

верхней (экстраклеточной) части М2-спиралей приводит к тому, что боковые цепи остатков 20' оказываются направленными в сторону, противоположную оси поры.

Также мы построили три модели ТМД ГАМК_AР в открытом состоянии на основе

структур рецепторов GLIC (2XQ3), GluCl (3RIF), α_1 GlyR (3JAE) и две модели, соответствующие десенситизированному состоянию, на основе структур α_1 GlyR (3JAF) и β_3 ГАМК_AР (4COF). В отличие от закрытого и десенситизированного состояний (рис. 3а,д), кривые на

рис. 3в (открытое состояние) в значительной степени не совпадают друг с другом. Мы связываем это с тем, что закрытое и десенситизированное состояния являются более стабильными, в то время как структуры шаблонов, отнесенных к открытому состоянию рецептора, на самом деле отражают разные степени открытости поры.

Из рис. 3а,в,д следует, что пора ГАМК_AР имеет широкий внешний вестибуль и сужается в направлении внутриклеточного пространства. В закрытом канале диаметр поры изменяется от 10 Å (максимальное значение в точке 0 Å по оси абсцисс) до 4,7 Å (минимальное значение в точке 40 Å по оси абсцисс). Аналогично в открытом состоянии размеры внешнего и внутреннего вестибулей составляют 14,0 и 4,6 Å, а в десенситизированном – 17,6 и 3,0 Å соответственно. Сужение поры носит немонотонный характер. На кривых можно выделить участки как уменьшения, так и увеличения значений диаметра поры. Минимумы на кривых, соответствующих местам сужения поры.

Графики закрытого и открытого состояний имеют три четко выраженных минимума на глубине 6, 24 и 39 Å (рис. 3а,в). Первый минимум соответствует сужению поры на уровне кольца остатков 20' (α_1 Asn275, β_2 Glu270, γ_2 Lys285), второй формируется кольцом остатков 9' (α_1 Leu264, β_2 Leu259, γ_2 Leu274) и последний – кольцом остатков –2' (α_1 Pro253, β_2 Ala248, γ_2 Pro263). В закрытом канале можно выделить еще один минимум на глубине 34 Å, образованный кольцом остатков 2' (α_1 Val257, β_2 Ala252, γ_2 Ser267).

В закрытом состоянии (рис. 3а) кольца остатков 20' и 9' являются слишком узкими (2,8–3,4 и 2,5–3,4 Å соответственно, здесь и далее указывается минимальное и максимальное значения среди различных кривых для данного уровня поры) для прохождения дегидратированного иона хлора, диаметр которого по разным оценкам варьирует от 3,6 до 4,4 Å [29,30]. В открытом состоянии (рис. 3в) кольцо 20' расширяется до 7,4–9,3 Å, что обеспечивает свободное прохождение даже полностью гидратированного иона хлора, диаметр которого составляет 6,6 Å [31]. Размер кольца 9' варьирует в наших моделях в более широком диапазоне 3,4 Å (ГАМК_AР-GLIC), 5,3 Å (ГАМК_AР-GluCl) и 7,6 Å (ГАМК_AР- α 1-GlyR).

Интересно отметить, что в десенситизированном состоянии (рис. 3д) сужения поры на уровнях 20' и 9' практически исчезают, при этом происходит существенное расширение

внешнего и сужение внутреннего вестибулей поры. Диаметр кольца остатков –2' составляет 3,0–3,6 Å, указывая, таким образом, на непродвижающийся статус десенситизированного рецептора.

Для того чтобы оценить вклад геометрии М2-спиралей в формирование просвета поры, мы модифицировали наши модели, замещая остатки с направленными в пору боковыми цепями (за исключением Gly и Pro) на Ala. Далее в тексте мы будем называть такие модели Ala-мутированными. Изменение диаметра от глубины поры в Ala-мутированных моделях ГАМК_AР, соответствующих закрытому, открытому и десенситизированному состояниям, показаны на рис. 3б,г,е.

Как и ожидалось, пора в Ala-мутированных моделях становится существенно шире по сравнению с нативными моделями ГАМК_AР, за исключением уровня –2', остатки которого (3 Pro и 2 Ala) не изменяются в модифицированных моделях. Сравнение рис. 3а и 3б показывает, что в Ala-мутированных моделях пора на уровнях 20' и 9' становятся шире 5,5–7,7 и 6,2–7,9 Å соответственно. В Ala-мутированных моделях закрытого ГАМК_AР можно выделить семь минимумов, которые соответствуют семи кольцам (от –2' до 20') остатков с направленными в пору боковыми цепями (рис. 3б). Интересно отметить, что в открытой и десенситизированной поре Ala-мутированных моделей отсутствуют минимумы на кривых в точках, соответствующих уровням 20' и 9' (рис. 3г,е), что подчеркивает роль боковых цепей нативных аминокислотных остатков в формировании геометрии поры ГАМК_AР.

Кривые на рис. 3б,г,е отражают изменение геометрии М2-сегментов при переходе канала из одного функционального состояния в другое. В закрытой поре оси М2-спиралей фактически коллинеарны оси поры (рис. 3б). В открытом состоянии возникает наклон осей М2-спиралей, при котором остатки 20' удаляются от оси поры (рис. 3г). В десенситизированном состоянии этот наклон несколько увеличивается с приближением остатков –2' к оси поры (рис. 3е).

ОБСУЖДЕНИЕ

Начало работам по моделированию Cys-петельных рецепторов положила структура nAChR электрического ската (*Torpedo marmorata*), полученная при помощи криоэлектронной микроскопии [32]. Однако разрешение этой структуры оказалось достаточно низким (9 Å).

При таком разрешении удалось определить только, что рецептор является пентамером с центральной симметрией и его поры образована α -спиральными сегментами. Позднее разрешение удалось поднять до 4 Å [33,34]. Именно эта структура долгое время традиционно использовалась для гомологического моделирования ГАМК_AР и других Cys-петельных рецепторов [9,35–37].

Однако позднее, когда появилось достаточно большое количество рентгеновских и криоэлектронномикроскопических структур пентамерных лиганд-управляемых каналов, полученных с высоким разрешением [16–21], выяснилось, что существует расхождение в области ТМД между структурой nAChR, описанной в работе [34], и структурами других Cys-петельных рецепторов. Это расхождение заключается в существовании одновиткового сдвига аминокислотных остатков в М2-сегментах [9,38]. Если в модели [34] начало М2-спиралей приходится на остатки 0', то в других структурах – на остатки –3'. По этой причине мы не использовали структуру nAChR из работы [34] в качестве прототипа в нашем исследовании.

Одной из задач нашей работы было оценить возможность использования прототипов, полученных у бактерий [19,21] и низших животных [20], для моделирования ТМД ГАМК_AР человека. Бактериальные лиганд-управляемые каналы GLIC и ELIC являются в какой-то степени упрощенными гомологами человеческих тормозных рецепторов, у них отсутствует N-терминальная α -спираль, дисульфидные связи в ЭКД и большая внутриклеточная петля между сегментами М3 и М4 [38]. Структура GluCl достаточно хорошо подходит для гомологического моделирования тормозных рецепторов высших позвоночных и человека: во-первых, это хлорпроводящий канал; во-вторых, у GluCl отсутствуют все вышеперечисленные особенности бактериальных каналов; в-третьих, уровень гомологии М2 сегментов, как мы отмечали выше, превышает 63%.

Мы использовали метод Монте-Карло минимизации энергии для оптимизации геометрии моделей ГАМК_AР. Этот метод широко используется при моделировании структуры и функций как потенциал-зависимых, так и лиганд-управляемых ионных каналов [9,39,40]. Однако следует отметить, что другие вычислительные подходы также могут быть использованы для решения подобных задач. Одним из таких подходов является метод молекулярной динамики, в котором внешние силы прилагаются к одному или нескольким атомам модели, а затем вы-

числяются и анализируются траектории релаксации системы. В качестве примера можно привести работу [41], в которой управляемая молекулярная динамика была использована для исследования размеров поры аквапорина Z *E. Coli*.

Наши расчеты показали, что геометрия М2-сегментов в моделях, построенных на основе структур рецепторов GLIC, ELIC, GluCl и их высших гомологов α_1 -GlyR, α_3 -GlyR и β_3 -ГАМК_AР, в целом хорошо совпадает. Расхождения в моделях закрытого состояния ГАМК_AР-GLIC и ГАМК_AР-ELIC, наблюдаемые в области внеклеточного и внутриклеточного vestibule канала, связаны скорее всего с особенностями кристаллизации прототипов GLIC и ELIC.

Модели, построенные на основе различных прототипов, предсказывают стабильность закрытого и десенситизированного состояний и вариабельность открытого состояния ГАМК_AР. Несовпадение кривых на графике зависимости диаметра от глубины поры открытого ГАМК_AР указывает на то, что прототипы GLIC, GluCl и α_1 GlyR отражают различные степени открытости рецептора.

Геометрия поры канала определяется не только геометрией М2-спиралей, но и конформацией направленных в пору боковых цепей. Для того чтобы оценить вклад собственно геометрии М2 спиралей, мы построили Ala-мутированные модели, в которых все аминокислотные остатки с направленными в пору боковыми цепями (за исключение остатков Pro и Gly) были заменены на Ala. Полученные таким образом результаты также не выявили существенных различий в геометрии поры в моделях, построенных на основе различных прототипов.

Мы охарактеризовали пору ГАМК_AР в закрытом, открытом и десенситизированном состояниях. Мы показали, что ГАМК_AР имеет широкий внешний vestibule и по мере продвижения вглубь канала происходит немонотонное сужение поры. Диаметр внешнего vestibule поры увеличивается по мере перехода канала из закрытого в открытое и затем в десенситизированное состояния. Наши модели предсказывают, что места наибольшего сужения поры ГАМК_AР расположены на уровнях –2', 9' и 20'. Аналогичный результат был получен нами ранее при изучении зависимости размеров поры ГАМК_AР от гибкости боковых цепей аминокислотных остатков [42].

Ранее было высказано предположение, что наиболее узким участком открытого ГАМК_AР является N-терминальное окончание М2-спи-

ралей [5]. Однако наши модели предсказывают, что наибольшее сужение поры в открытом и закрытом состояниях приходится на кольцо остатков 9' (середина поры), которое является частью активационных ворот ГАМК_AР [43]. Мы показали, что диаметр кольца остатков 9' в закрытом рецепторе не превышает диаметра дегидратированного иона хлора. При конформационном переходе рецептора из закрытого в открытое состояние диаметр кольца 9' увеличивается настолько, что становится возможным прохождение даже полностью гидратированного иона хлора. Таким образом, наши данные подтверждают участие остатков кольца 9' в активационном механизме ГАМК_AР.

Помимо активационных ворот предполагается также существование у ГАМК_AР десенситизационных ворот [18,44,45]. Было показано, что взаимодействие между участками сегментов М2 и М3 близкими к внутриклеточному вестибюлю поры регулирует временные характеристики десенситизации ГАМК_AР [46]. Мы установили, что наиболее узким участком поры в десенситизированном состоянии является кольцо остатков -2', расположенное в районе внутриклеточного вестибюля. В открытом и закрытом состояниях диаметр этого кольца увеличивается, что предполагает участие остатков -2' в механизме десенситизационных ворот ГАМК_AР.

Мы обнаружили также значительное сужение поры на уровне 20' в закрытом ГАМК_AР. Диаметр этого кольца увеличивается почти в три раза в открытом канале, а в десенситизированном рецепторе сужение поры в этом месте практически исчезает. Зависимость диаметра кольца остатков 20' от функционального состояния рецептора позволяет предположить участие остатков этого уровня в воротном механизме ГАМК_AР, физиологическая роль которого пока не выяснена.

ВЫВОДЫ

При помощи вычислительных методов мы определили диаметр поры в статических моделях ГАМК_AР, соответствующих закрытому, открытому и десенситизированному состояниям. Модели ТМД ГАМК_AР $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -конфигурации были построены на основе рентгеновских и криоэлектронномикроскопических структур как прокариотических, так и эукариотических гомопентамерных лиганд-управляемых каналов (GLIC, ELIC, GluCl, α_1 - и α_3 -GlyR, β_3 -ГАМК_AР). Полученные нами модели предсказывают существование трех основных сужений поры на

уровнях колец остатков -2', 9' и 20', чей диаметр зависит от функционального состояния рецептора. Мы показали также, что структуры GLIC, ELIC и GluCl, выделенные у бактерий и низших животных, могут быть использованы для гомологического моделирования ТМД ГАМК_AР человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 15-04-02010.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. B. Hille, *Ionic channels of excitable membrane*, 3 ed. (Sinauer Associates Inc., Sunderland Massachusetts USA, 2001).
2. W. Sieghart, *Adv. Pharmacol.* **54**, 231 (2006).
3. W. Hevers and H. Luddens, *Mol. Neurobiol.* **18** (1), 35 (1998).
4. J. L. Galzi, A. Devillers-Thiery, N. Hussy, et al., *Nature* **359** (6395), 500 (1992).
5. A. Keramidas, A. J. Moorhouse, P. R. Schofield, et al., *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86** (2), 161 (2004).
6. C. Miller, *Neuron* **2** (3), 1195 (1989).
7. R. W. Olsen, *Neurochem. Res.* **39** (10), 1924 (2014).
8. L. Chen, K. A. Durkin, and J. E. Casida, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** (13), 5185 (2006).
9. A. V. Rossokhin, I. N. Sharonova, J. V. Bukanova, et al., *Mol. Cell. Neurosci.* **63**, 72 (2014).
10. B. E. Erkkila, A. V. Sedelnikova, and D. S. Weiss, *Biophys. J.* **94** (11), 4299 (2008).
11. B. S. Zhorov and P. D. Bregestovski, *Biophys. J.* **78** (4), 1786 (2000).
12. O. S. Smart, J. G. Neduelil, X. Wang, et al., *J. Mol. Graph.* **14** (6), 354 (1996).
13. E. Chovancova, A. Pavelka, P. Benes, et al., *PLoS Comput. Biol.* **8** (10), e1002708 (2012).
14. M. Petrek, P. Kosinova, J. Koca, et al., *Structure* **15** (11), 1357 (2007).
15. E. Yaffe, D. Fishelovitch, H. J. Wolfson, et al., *Proteins* **73** (1), 72 (2008).
16. P. S. Miller and A. R. Aricescu, *Nature* **512** (7514), 270 (2014).
17. X. Huang, H. Chen, K. Michelsen, et al., *Nature* **526** (7572), 277 (2015).
18. J. Du, W. Lu, S. Wu, et al., *Nature* **526** (7572), 224 (2015).
19. N. Bocquet, H. Nury, M. Baaden, et al., *Nature* **457** (7225), 111 (2009).
20. R. E. Hibbs and E. Gouaux, *Nature* **474** (7349), 54 (2011).
21. R. J. Hilf and R. Dutzler, *Nature* **452** (7185), 375 (2008).
22. I. Zimmermann and R. Dutzler, *PLoS Biol.* **9** (6), e1001101 (2011).
23. R. Spurny, J. Ramerstorfer, K. Price, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** (44), E3028 (2012).

24. N. Bocquet, L. Prado de Carvalho, J. Cartaud, et al., *Nature* **445** (7123), 116 (2007).
25. R. J. Howard, J. R. Trudell, and R. A. Harris, *Pharmacol. Rev.* **66** (2), 396 (2014).
26. Z. Li and H. A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (19), 6611 (1987).
27. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 765 (1984).
28. D. P. Garden and B. S. Zhorov, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **24** (2), 91 (2010).
29. R. D. Shannon, *Acta Crystallogr. Section A* **32** (5), 751 (1976).
30. P. F. Lang and B. C. Smith, *Dalton Trans.* **39** (33), 7786 (2010).
31. D. E. Conway, *Ionic hydration in chemistry and biophysics* (Elsevier, New York, 1981).
32. N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **229** (4), 1101 (1993).
33. A. Miyazawa, Y. Fujiyoshi, and N. Unwin, *Nature* **423** (6943), 949 (2003).
34. N. Unwin, *J. Mol. Biol.* **346** (4), 967 (2005).
35. M. O'Mara, B. Cromer, M. Parker, et al., *Biophys. J.* **88** (5), 3286 (2005).
36. M. Ernst, S. Bruckner, S. Boresch, et al., *Mol. Pharmacol.* **68** (5), 1291 (2005).
37. R. Hawthorne, B. A. Cromer, H. L. Ng, et al., *J. Neurochem.* **98** (2), 395 (2006).
38. P. J. Corringer, M. Baaden, N. Bocquet, et al., *J. Physiol.* **588** (Pt 4), 565 (2010).
39. A. Rossokhin, G. Teodorescu, S. Grissmer, et al., *Mol. Pharmacol.* **69** (4), 1356 (2006).
40. A. Rossokhin, T. Dreker, S. Grissmer, et al., *Mol. Pharmacol.* **79** (4), 681 (2011).
41. G. Hu, L. Y. Chen, and J. Wang, *J. Mol. Model.* **18** (8), 3731 (2012).
42. A. V. Rossokhin and B. S. Zhorov, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **30** (7), 559 (2016).
43. P. S. Miller and T. G. Smart, *Trends Pharmacol. Sci.* **31** (4), 161 (2010).
44. G. D. Cymes, Y. Ni, and C. Grosman, *Nature* **438** (7070), 975 (2005).
45. J. E. Carland, A. J. Moorhouse, P. H. Barry, et al., *J. Biol. Chem.* **279** (52), 54153 (2004).
46. M. Gielen, P. Thomas, and T. G. Smart, *Nat. Commun.* **6**, 6829 (2015).

Homology Modeling of Transmembrane Domain of GABA_A Receptor

A.V. Rossokhin

Research Center of Neurology, per. Obukha 5, Moscow, 105064 Russia

Permeability of ion channels for ions and substances binding inside the pore depends on the cross-sectional area of the pore. We have built the models of the closed, open and desensitized $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA_A receptor based on the known structures of both prokaryotic and eukaryotic ligand-gated channels. We employed Monte Carlo energy minimizations for optimization of the model structures. We found significant pore constrictions whose diameter depends on the functional state of the receptor in the cytoplasmic, middle and extracellular parts of the pore forming M2 segments. It is known that constrictions in the middle (residues ring 9') and cytoplasmic (residues ring 2') parts of M2 helices form the activation and desensitization gates of GABA_A receptor. Our computations predict that constriction in the extracellular part of M2 helices (residues ring 20') may also serve as the gate in GABA_A receptor whose physiological role is still unclear. Our results imply that the structures of a series of prokaryotic and eukaryotic ligand-gated channels found in bacteria and lower organisms can be used for homology modeling of the pore region of human GABA_A receptor.

Keywords: homology modeling, GABA_A receptor, transmembrane domain, pore diameter, Monte-Carlo method, energy minimization