

Структура катион- и лиганд-связывающих центров натрий-кальциевого обменника человека по данным гомологичного моделирования

Шестакова Н.Н., Белинская Д.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН

n_shestakova@list.ru

Натрий-кальциевый обменник (NCX) рассматривается как одна из возможных фармакологических мишеней для управления нейропатической болью. При разработке новых лекарственных препаратов широко применяются методы компьютерного моделирования, однако для проведения расчетных экспериментов необходимо знание трехмерной структуры белка-мишени. Рентгеноструктурный анализ NCX человека до сих пор не проведен. Цель представленного исследования – методом гомологичного моделирования построить трехмерную модель катион- и лиганд-связывающих центров эукариотического NCX. По первичной последовательности NCX1 человека и трехмерной структуре бактериального натрий-кальциевого обменника NCX_Mj построена трехмерная структура NCX_Hs, моделирующая катион- и лиганд-связывающие сайты NCX1. Методом минимизации энергии улучшена ее геометрия. Качество модели оценено по 9 показателям. Согласно проведенной оценке, 94 % белковых структур из сравнительного набора имеют данные показатели хуже, чем полученная модель. Проведен сравнительный анализ комплексов NCX_Mj и NCX_Hs с катионами натрия, катионом кальция и трициклическим антидепрессантом дезипраминем. Сделан вывод, что структура бактериального натрий-кальциевого обменника может быть моделью для изучения механизма влияния противоболевых препаратов на работу NCX человека.

Ключевые слова: натрий-кальциевый обменник, гомологичное моделирование, биоинформатика, минимизация энергии, молекулярный докинг.

Structure of the Cation- And Ligand-Binding Sites of Human Sodium-Calcium Exchanger According to Homology Modeling

Shestakova N.N., Belinskaia D.A.

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences

Sodium-calcium exchanger (NCX) is considered as one of the possible pharmacological targets for the management of neuropathic pain. Computer modeling methods are widely used in drug design. However, computational experiments require knowledge of the three-dimensional structure of the target protein. Crystal structure of human NCX has not been obtained yet. The aim of the study presented is to construct a three-dimensional model of the cation- and ligand-binding sites of eukaryotic NCX using homologous modeling. Based on the primary sequence of human NCX1 and the three-dimensional structure of the bacterial sodium-calcium exchanger NCX_Mj, the three-dimensional structure (NCX_Hs) simulating the cation- and ligand-binding sites of NCX1 was constructed. Its geometry was improved by the method of energy minimization. The quality of the model was evaluated by nine parameters. According to the evaluation, these parameters are worse in 94 % of protein structures from the comparative dataset than in the obtained model. A comparative analysis of the complexes NCX_Mj and NCX_Hs with sodium cations, calcium cation and tricyclic antidepressant desipramine was performed. It has been concluded that the structure of the bacterial sodium-calcium exchanger can be a model for studying the mechanism of the effect of analgesic drugs on the work of human NCX.

Key words: sodium-calcium exchanger, homology modeling, bioinformatics, energy minimization, molecular docking.

1. Введение

Натрий-кальциевый обменник (NCX) представляет собой трансмембранный белок цитоплазматической мембраны, транспортирующий ионы кальция и натрия по механизму антипорта. В настоящее время NCX рассматривается как одна из возможных фармакологических мишеней для регуляции кальция в клетке, в том числе для снятия синдромов нейропатической боли [1–2]. В наших исследованиях мы показали, что NCX может быть одной из молекулярных мишеней противоболевого действия трициклических антидепрессантов (ТСА) [3]. При разработке новых лекарственных препаратов широко применяются методы компьютерного моделирования, однако для расчетных экспериментов *in silico* необходимо знание трехмерной структуры белка-мишени. Рентгеноструктурный анализ (РСА) NCX человека ещё не проведен. Предполагается следующая структурная организация эукариотического NCX [4]: 10 трансмембранных доменов TM1-10, два кальций-связывающих домена CBD1-2 и натрий-связывающий домен NRD. При отсутствии экспериментальных данных трехмерная структура макромолекулярной мишени может быть получена методом гомологичного моделирования – построения 3D-модели белка по его первичной последовательности и известным трехмерным структурам гомологичных белков [5]. К настоящему моменту методом РСА получена трехмерная структура NCX бактерии *Methanococcus jannaschii* (NCX_Mj), представляющая собой 10 трансмембранных спиралей TM1-10 [6]. Внутриклеточные ион-связывающие домены у бактериального NCX отсутствуют. Известно, что домены TM2, TM3, TM7 и TM8 в структуре NCX образуют коридор для обмена ионами. Ранее методами молекулярного моделирования мы выявили, что сайт связывания ТСА на поверхности NCX_Mj расположен между доменами TM2, TM3, TM6 и TM7 [7]. Цель данной работы – методом гомологичного моделирования на основе известной трехмерной структуры NCX_Mj сконструировать трехмерную структуру NCX человека и протестировать её в вычислительных экспериментах. Из-за низкой гомологии между бактериальным и эукариотическим обменником, в представленном исследовании мы построили 3D-модель NCX человека (NCX_Hs) на основе первичных последовательностей его доменов TM2, TM3, TM6, TM7 и TM8, чтобы охватить ион- и лиганд-связывающие области. Остальные аминокислоты в полученной модели соответствуют первичной последовательности NCX_Mj.

2. Методы

Выравнивание первичных последовательностей трансмембранных доменов TM2, TM3, TM6, TM7 и

TM8 NCX человека и NCX_Mj проводили с помощью программы Multalin [8]. Использовали первичные последовательности из базы данных UniProt [9], код Q57556 для NCX_Mj и код P32418 для NCX1 человека. Эта изоформа была выбрана по той причине, что именно NCX1 был объектом большинства экспериментальных исследований, посвященных натрий-кальциевому обменнику.

Для построения трехмерной модели NCX_Hs использовали программу Modeller 9.24 [10]. Лучшая модель среди сгенерированных структур была выбрана на основе z-оценки дискретно-оптимизированной энергии белка (Discrete Optimized Protein Energy, DOPE). Чем значение z-оценки ниже, тем ниже вероятность найти среди других возможных конформаций этого белка более энергетически выгодную [11]. Согласно литературным данным, значение z-оценки DOPE должно быть отрицательным, чем оно меньше (больше по модулю), тем более реалистична построенная модель. На практике значения z-оценки DOPE менее –1 считаются приемлемыми [12].

Структуру отобранной модели оптимизировали путём минимизации энергии с применением метода сопряженных градиентов с помощью программного пакета NAMD с использованием силового поля CHARMM22 [13]. Качество полученной структуры оценивали с помощью онлайн-сервиса MolProbity [14]. Критерии оценки подробно описаны в нашем предыдущем исследовании [15]. На основе анализа описанных критериев алгоритм программы рассчитывает суммарную оценку качества модели, выражающуюся в процентах. Для тестирования полученной модели, с помощью программы Autodock Vina [16] был проведен молекулярный докинг ТСА дезипрамина в лиганд-связывающие сайты NCX_Mj и NCX_Hs. Параметры процедуры описаны в нашей предыдущей работе [7].

3. Результаты и обсуждение

На первом этапе было проведено выравнивание первичных последовательностей доменов TM2, TM3, TM6, TM7 и TM8 NCX_Mj и человека (изоформа NCX1) (рис. 1,а). Красными буквами на рисунке отмечены аминокислоты с высоким соответствием между двумя организмами, синими буквами – с низким, черными буквами обозначена нейтральная замена. Как видно из рисунка, степень гомологии между NCX_Mj и NCX1 невысока. Тем не менее, функционально значимые аминокислоты практически не подверглись эволюционным изменениям. Так, в молекуле NCX_Mj аминокислотные остатки Thr50, Ser51, Glu54, Ser77, Asn81, Thr209, Ser210, Glu213, Ser236 и Asp240 участвуют в процессе обмена ионами натрия и кальция, связывая катионы металлов с помощью атомов кислорода своих боковых радикалов. В молекуле NCX1 этим аминокислотам соответствуют Ser144, Ser145, Glu148, Ser174, Asn178, Thr845, Ser846, Asp849, Ser873 и Asn877 (рис. 1,а).

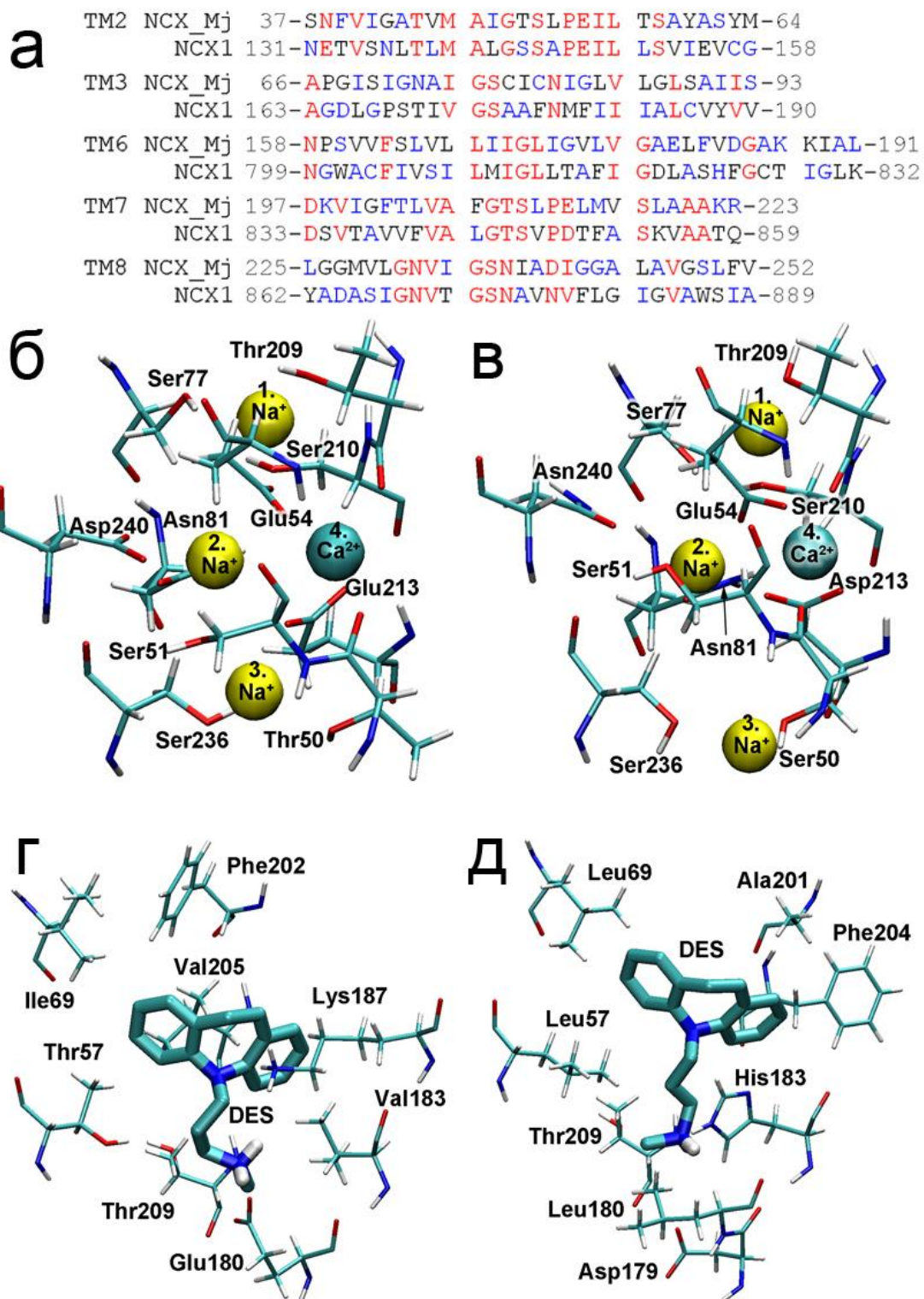


Рис. 1. Структурный анализ катион- и лиганд-связывающих сайтов натрий-кальциевого обменника (NCX) бактерии *Methanococcus jannaschii* (NCX_Mj) и гомологичной модели NCX1 человека (NCX_Hs, сохранена нумерация аминокислот, соответствующая последовательности NCX_Mj): (а) выравнивание первичных последовательностей трансмембранных доменов TM2, TM3, TM6, TM7 и TM8 NCX_Mj и NCX1; (б) катион-связывающие центры NCX_Mj по данным рентгеноструктурного анализа; (в) катион-связывающие центры NCX_Hs по данным гомологичного моделирования; (г) молекула дезипрамина (DES) в лиганд-связывающем сайте NCX_Mj и (д) в лиганд-связывающем сайте NCX_Hs по данным молекулярного докинга.

На следующем этапе в первичной последовательности NCX_Mj участки TM2, TM3, TM6, TM7 и TM8 были заменены аминокислотами

доменов TM2, TM3, TM6, TM7 и TM8 NCX1 человека. Затем с помощью программы Modeller на основе трёхмерной структуры NCX_Mj (код 3u5v из

базы данных белковых структур PDB [6]) было сгенерировано 10 возможных трёхмерных структур этой гибридной первичной последовательности. Минимальное значение z-оценки DOPE среди полученных моделей составляло -1.09 , эта модель и была выбрана для дальнейшей обработки и анализа. Полученная структура была оптимизирована методом минимизация энергии. До минимизации энергия молекулы NCX_Hs составляла $+3.1 \times 10^4$ ккал/моль, после минимизации – -0.3×10^4 ккал/моль. Проверка итоговой структуры с помощью программы MolProbity показала, что построенная модель NCX_Hs не испытывает каких-либо серьезных стерических наложений, не имеет множественных нарушений в конформации аминокислотных остатков. Суммарная оценка качества MolProbity составляет 1.94: 94 % структур из сравнительного набора имеют перечисленные показатели хуже, чем данная модель.

На следующем шаге мы проанализировали сайты связывания ионов в полученной структуре. На рисунке 1,б представлены аминокислоты NCX_Mj, участвующие в связывании катионов натрия и кальция согласно данным PCA. В связывании катиона натрия в позиции 1 принимают участие аминокислоты Ser77, Thr209 и Ser210; в позиции 2 – аминокислоты Ser51, Asn81 и Asp240; в позиции 3 – аминокислоты Thr50 и Ser236. Катион кальция в позиции 4 удерживают аминокислоты Glu54 и Glu213. В сгенерированной модели NCX_Hs катион натрия в позиции 1 взаимодействует с остатками Ser77, Thr209 и Ser210 (сохранена нумерация, соответствующая последовательности NCX_Mj); натрий в позиции 2 – с аминокислотами Ser51, Asn81 и Asn240; натрий в позиции 3 – с аминокислотами Ser50 и Ser236. Катион кальция в позиции 4 взаимодействует с COO⁻ группами остатков Glu54 и Asp214. Таким образом, в отношении ион-связывающих сайтов модель NCX_Hs хорошо согласуется экспериментальными данными.

В заключении, мы провели молекулярный докинг TCA дезипрамина в лиганд-связывающие сайты структур NCX_Mj и NCX_Hs. Результат представлен на рисунках 1,г и 1,д. В случае NCX_Mj положительно заряженная аминогруппа дезипрамина взаимодействует с COO⁻ группой аминокислотного остатка Glu180 (рис. 1,г). неполярная трициклическая группа лиганда связывается в окружении алифатических аминокислот Ile69, Val183, Phe202, Val 205 и CH₃-группы Thr57. Также в связывании дезипрамина участвует положительно заряженный лизин Lys187. Лиганд-связывающий сайт NCX_Mj не пересекается с сайтами связывания ионов, и влияние дезипрамина на обмен ионов, по всей видимости, осуществляется через аллостерическую модуляцию: конформация белка после связывания препарата меняется, что в свою очередь влияет на связывание натрия и кальция. В непосредственной близости от дезипрамина, сорбированного в NCX_Mj,

расположен аминокислотный остаток Thr209, взаимодействующий с одним из катионов натрия (рис. 1,б). Мы полагаем, что он может играть ключевую роль в передаче «конформационной» информации от лиганд-связывающего кармана NCX_Mj к ион-связывающим аминокислотам.

В случае NCX_Hs один из полярных атомов водорода аминогруппы дезипрамина взаимодействует с COO⁻-группой аминокислотного остатка Asp179 (рис. 1,д). CH₃-группа связывается возле аминокислоты Leu180. неполярная трициклическая группа лиганда связывается в окружении алифатических аминокислот Leu57, Leu69, Ala201 и Phe204. Мы полагаем, что роль лизина Lys187 из структуры NCX_Mj в модели NCX_Hs играет аминокислотный остаток His183, который легко может протонироваться и принимать положительно заряженную форму. Как и в случае бактериального обменника, в случае NCX человека Thr209, по всей видимости, является основным передатчиком конформационных изменений в процессе аллостерической модуляции.

В целом, несмотря на низкую гомологию первичных последовательностей, общие характеристики лиганд-связывающих сайтов натрий-кальциевых обменников бактерии и человека схожи: в структуре сайтов содержится отрицательно заряженная аминокислота, положительно заряженная аминокислота и несколько алифатических аминокислот. По этой причине, в обеих белковых молекулах дезипрамин связывается в схожей конфигурации. Однако Glu180 в структуре NCX_Mj расположен ближе к алифатическим аминокислотам, чем Asp179 в структуре NCX_Hs, поэтому во втором случае дезипрамин связывается в более вытянутой конформации (рис. 1,г и 1,д).

В заключение следует оговорить ограничения построенной нами модели. На качество любой модели, не основанной на экспериментальной структуре высокого разрешения, влияет несовершенное силовое поле и ограничения методов минимизации энергии [17]. Методом молекулярного докинга в данном случае можно выявить основные стерические, гидрофобные и электростатические детерминанты взаимодействия препарата с сайтом связывания, но невозможно определить значение свободной энергии связывания и, следовательно, предсказать эффективность лекарственного средства [18]. Такая гибридная модель не может быть использована для расчёта конформационных изменений структуры методом молекулярной динамики. С другой стороны, выявленные сходства в структуре сайтов прокариотического и эукариотического обменников позволяют заключить, что препараты влияют на конформационные изменения NCX_Mj и NCX1 по схожему механизму. Поэтому мы полагаем, что структура бактериального обменника может быть моделью для изучения механизма влияния

трициклических антидепрессантов на работу NCX человека.

4. Благодарности

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290427-7 и поддержке гранта РФФИ №18-015-00023.

5. Список литературы

1. Jaggi A.S., Singh N. Therapeutic targets for the management of peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 2011. V. 10. № 5. P. 589–609. doi: [10.2174/187152711796235041](https://doi.org/10.2174/187152711796235041).
2. Belinskaia D.A., Belinskaia M.A., Barygin O.I., Vanchakova N.P., Shestakova N.N. Psychotropic Drugs for the Management of Chronic Pain and Itch. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2019. V. 12. № 2. P. 99. doi: [10.3390/ph12020099](https://doi.org/10.3390/ph12020099).
3. Stepanenko Y.D., Boikov S.I., Sibarov D.A., Abushik P.A., Vanchakova N.P., Belinskaia D., Shestakova N.N., Antonov S.M. Dual action of amitriptyline on NMDA receptors: enhancement of Ca-dependent desensitization and trapping channel block. *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 19454. doi: [10.1038/s41598-019-56072-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-56072-z).
4. Emery L., Whelan S., Hirschi K.D., Pittman J.K. Protein Phylogenetic Analysis of Ca(2+)/cation Antiporters and Insights into their Evolution in Plants. *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 1. doi: [10.3389/fpls.2012.00001](https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00001).
5. Vyas V.K., Ukawala R.D., Ghatge M., Chintha C. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. *Indian J. Pharm. Sci.* 2012. V. 74. № 1. P. 1–17. doi: [10.4103/0250-474X.102537](https://doi.org/10.4103/0250-474X.102537).
6. Liao J., Li H., Zeng W., Sauer D.B., Belmares R., Jiang Y. Structural insight into the ion-exchange mechanism of the sodium/calcium exchanger. *Science*. 2012. V. 335. № 6069. P. 686–690. doi: [10.1126/science.1215759](https://doi.org/10.1126/science.1215759).
7. Белинская Д.А., Шестакова Н.Н. Поиск сайтов связывания трициклических антидепрессантов с натрий-кальциевым обменником методами молекулярного моделирования. В: *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей*. Под ред. Зинченко В.П., Бережнов А.А. Серпухов: Типография Пятый Формат, 2019. С. 751–756.
8. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988. V. 16. № 22. P. 10881–10890. doi: [10.1093/nar/16.22.10881](https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881).
9. The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019. V. 47. № D1. P. D506–D515. doi: [10.1093/nar/gky1049](https://doi.org/10.1093/nar/gky1049).
10. Sali A., Blundell T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. № 3. P. 779–815. doi: [10.1006/jmbi.1993.1626](https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626).
11. Shen M.Y., Sali A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. *Protein Sci.* 2006. V. 15. № 11. P. 2507–2524. doi: [10.1110/ps.062416606](https://doi.org/10.1110/ps.062416606).
12. Абдуллатыпов А.В. *Моделирование структуры белков по гомологии: методическое руководство для школы молодых ученых*. Пушкино: ИФПБ РАН, 2016. 17 с.
13. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kalé L., Schulten K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1781–1802. doi: [10.1002/jcc.20289](https://doi.org/10.1002/jcc.20289).
14. Davis I.W., Leaver-Fay A., Chen V.B., Block J.N., Kapral G.J., Wang X., Murray L.W., Arendall W.B. 3rd, Snoeyink J., Richardson J.S., Richardson D.C. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 2007. V. 35. P. W375–W383. doi: [10.1093/nar/gkm216](https://doi.org/10.1093/nar/gkm216).
15. Taborskaya K.I., Belinskaya D.A., Avdonin P.V., Goncharov N.V. Building a three-dimensional model of rat albumin molecule by homology modeling. *J. Evol. Biochem. Phys.* 2017. V. 53. № 5. P. 384–393. doi: [10.1134/S0022093017050040](https://doi.org/10.1134/S0022093017050040).
16. Trott O., Olson A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. № 2. P. 455–461. doi: [10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334).
17. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. Modeling P-loops domain of sodium channel: homology with potassium channels and interaction with ligands. *Biophys. J.* 2005. V. 88. № 1. P. 184–197. doi: [10.1529/biophysj.104.048173](https://doi.org/10.1529/biophysj.104.048173).
18. Tikhonov D.B., Zhorov B.S. Homology modeling of Kv1.5 channel block by cationic and electroneutral ligands. *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1838. № 3. P. 978–987. doi: [10.1016/j.bbamem.2013.11.019](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.11.019).