

**Глеб Новиков
Виктор Сивожелезов
Константин Шайтан**

**Исследование конформационной динамики родопсин-
подобных рецепторов**

**Глеб Новиков
Виктор Сивожелезов
Константин Шайтан**

**Исследование
конформационной динамики
родопсин-подобных
рецепторов**

Монография

LAP LAMBERT Academic Publishing

Impressum / Выходные данные

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek: Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Alle in diesem Buch genannten Marken und Produktnamen unterliegen warenzeichen-, marken- oder patentrechtlichem Schutz bzw. sind Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Inhaber. Die Wiedergabe von Marken, Produktnamen, Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen u.s.w. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Библиографическая информация, изданная Немецкой Национальной Библиотекой. Немецкая Национальная Библиотека включает данную публикацию в Немецкий Книжный Каталог; с подробными библиографическими данными можно ознакомиться в Интернете по адресу <http://dnb.d-nb.de>.

Любые названия марок и брендов, упомянутые в этой книге, принадлежат торговой марке, бренду или запатентованы и являются брендами соответствующих правообладателей. Использование названий брендов, названий товаров, торговых марок, описаний товаров, общих имён, и т.д. даже без точного упоминания в этой работе не является основанием того, что данные названия можно считать незарегистрированными под каким-либо брендом и не защищены законом о брендах и их можно использовать всем без ограничений.

Coverbild / Изображение на обложке предоставлено: www.ingimage.com

Verlag / Издатель:

LAP LAMBERT Academic Publishing

ist ein Imprint der / является торговой маркой

AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Heinrich-Böcking-Str. 6-8, 66121 Saarbrücken, Deutschland / Германия

Email / электронная почта: info@lap-publishing.com

Herstellung: siehe letzte Seite /

Напечатано: см. последнюю страницу

ISBN: 978-3-659-41743-6

Zugl. / Утверд.: Pushchino, Moscow Region, Institute of cell biophysics, PhD thesis., 2013

Copyright / АВТОРСКОЕ ПРАВО © 2013 AV Akademikerverlag GmbH & Co. KG

Alle Rechte vorbehalten. / Все права защищены. Saarbrücken 2013

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	6
Структура и динамика семи-трансмембранных рецепторов.....	9
Родопсин-подобные рецепторы.....	13
Конформационная динамика 7-ТМ рецепторов.....	16
Общие представления о конститутивной активности 7-ТМ рецепторов. ...	19
Методы исследования.....	22
Метод анализа главных компонент.....	22
Метод молекулярной динамики.....	24
Метод управляемой молекулярной динамики.....	27
Моделирование молекулярной динамики A_{2A} рецептора в окружении	
ПОГФ-вода.....	28
Расчет сдвига РКа для титруемых аминокислотных остатков рецептора.30	
Моделирование молекулярной динамики β -2-адренорецептора в	
комплексах с лигандами.....	31
Результаты и их обсуждение.....	34
Исследование конформационной подвижности родопсин-подобных	
рецепторов методом анализа главных компонент.....	34
Исследование конформационной подвижности аденозинового рецептора в	
окружении липиды-вода методом “управляемой” молекулярной динамики.47	
Исследование влияния связывания лигандов на конформационную динамику	
β -2-адренорецептора методом “управляемой” молекулярной динамики... 60	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	72
ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ.....	74
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	75

Приложение 1. СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

7-ТМ – семи-трансмембранный;

Å - ангстрем;

АГК – анализ главных компонент

ВП- внеклеточная петля;

ВНП- внутриклеточная петля;

ГК- главная компонента;

МВШ- модель Моно-Уаймена-Шанже;

МД- молекулярная динамика;

нс- наносекунда;

нм- нанометр;

пс- пикосекунда;

ПОГФ - 1-Пальмитоил-2-олеил-глицеро-3-фосфат-этанолламин;

СКО- среднее квадратичное отклонение;

ТМ- трансмембранный;

ТМ1, ТМ I - первый трансмембранный домен (одна из семи α -спиралей);

ТМД- трансмембранный домен;

PDB- белковый банк данных (protein data bank);

EDA- Essential Dynamics Analysis (метод анализа основной динамики);

EDS- Essential Dynamics Sampling (метод перебора основной динамики);

EXC- Extracellular (loop)- обычно служит для обозначения внеклеточных петель рецептора;

GPCR- G-protein-coupled receptors (рецепторы, сопряженные с действием G-белка);

IC – Intracellular (loop) – обычно служит для обозначения внутриклеточных петель рецептора;

PCA – Principal Components Analysis (метод анализа главных компонент);

PC- principal component (главная компонента);

RMSD- среднее квадратическое отклонение (СКО);

TMD- Transmembrane Domain (трансмембранный домен, обычно служит для обозначения одной из α -спиралей рецептора);

β 2-ар- β -адренергический рецептор;

A2A – аденозиновый рецептор подкласса A2A;

Приложение 2. Основные определения.

Обозначение аминокислот. Существует два альтернативных способа обозначения аминокислотных остатков в 7-ТМ рецепторах. Наиболее традиционный способ - нумерация остатков от N- к C- концу полипептидной цепи. Например, Lys-15, означает остаток лизина в 15 позиции, относительно N-конца. Кроме того, существует альтернативная нумерация, предложенная Баллестеросом и Вейнштейном (Ballesteros-Weinstein nomenclature). Согласно этой номенклатуре, каждому аминокислотному остатку приписывается два номера, разделенные точкой (например, Trp-6.48). При этом, первое число соответствует номеру α спирали, в которой расположен этот остаток, а второе (двузначное) число отражает степень консервативности данного остатка среди родопсин-подобных 7-ТМ рецепторов. Во втором случае, наиболее консервативный остаток имеет индекс x.50. Таким образом, остаток Trp-6.48 обозначает высококонсервативный остаток триптофана из VI спирали рецептора. Подобная система удобна для обозначения высококонсервативных остатков в 7-ТМ рецепторах, имеющих неидентичное положение в полипептидной цепи различных рецепторов. Например, в вышеуказанном примере Trp-6.48, в случае родопсина соответствует остатку Trp-275, а в случае аденозинового рецептора - Trp-265.

Активация - переход рецептора в подсостояние, обладающее повышенной аффинностью к специфическому трансдьюссеру, с последующей его активацией и запуском определенного биохимического каскада.

Аллостерия - феномен структурного и энергетического сопряжения между пространственно-удаленными участками белка. Например, в случае, когда связывание лиганда в ортостерическом сайте приводит к конформационным изменениям во внутриклеточной области рецептора, считается, что два данных участка аллостерически сопряжены.

Трансдьюссер – английский термин, принятый для обозначения внутриклеточных посредников (обычно, белков), принимающих участие в передаче внутриклеточного сигнала, непосредственно взаимодействуя с внутриклеточным сегментом молекулы-рецептора.

Множественная эффективность - способность одного рецептора активировать несколько различных трансдьюсеров, в зависимости от связывания различных лигандов. В этом случае говорят, что рецептор способен осуществлять сигнализацию, по различным путям, переключение между которыми связано со стабилизацией его различных конформаций. Например, сигнализация, в случае β -2-адренергического рецептора может протекать либо через G_s , либо через G_i - белки. В первом случае активация рецептора сопровождается повышением уровня цАМФ, а во втором - его снижением.

Существуют рецепторы с более выраженной “множественной эффективностью”, в рамках которой связывание различных лигандов активирует принципиально различные пути сигнализации.

Микро-переключатели- высококонсервативные остатки 7-ТМ рецепторов, для которых характерна повышенная степень динамики их боковых групп (ротамерная изомеризация по двугранному углу χ -1). Для всех 7-ТМ рецепторов обнаружено, по крайней мере, три подобных структурных элемента: (1) солевой мостик (ионный замок), образуемый остатками Arg- 3.50 (мотив DRY) и Glu – 6.32 из цитоплазматической области третьей, а так же шестой спиралей, соответственно; (2) ротамерный переключатель-высококонсервативный остаток триптофана (Trp-6.48, мотив CWxP), расположенный в районе лиганд-связывающей области; (3) остаток Tug-7.53 (мотив NPxxY) из седьмой спирали рецептора.

Конформация (биологическое определение)- специфическое подсостояние рецептора, только находясь в котором этот белок способен активировать специфический биохимический каскад. В рамках этого определения, конформационная динамика- это переход из одного функционально-значимого подсостояния макромолекулы в другое, сопровождаемое изменением биологической активности.

Конформация (структурное определение)- специфическое подсостояние рецептора, в структурном плане характеризуемое специфическими значениями двугранных углов ϕ и ψ полипептидно остова. В рамках этого определения, конформационная динамика- это переход из одного структурного подсостояния в другое (изменение пространственной архитектуры в рамках нативной укладки, например, колебания альфа-спиралей, либо движения петель).

Конститутивная (спонтанная) активность — явление лиганд-независимого перехода рецептора в активное подсостояние.

Ортостерический (лиганд-связывающий) участок- лиганд-связывающая область, обычно расположенная внутри 7-ТМ α -спирального пучка родопсин-подобных рецепторов.

Аллостерический (лиганд-связывающий) участок- лиганд-связывающая область рецептора, расположенная в альтернативной позиции, относительно его ортостерического участка. Лиганды, связывающиеся в этой области, получили название аллостерических модуляторов.

Отрицательная эффективность- функциональное свойство обратных агонистов, связанное со снижением уровня конститутивной активности рецептора, ниже его базового значения.

Функциональные классы лигандов 7-ТМ рецепторов.

Полный агонист- лиганд, связывание которого вызывает максимальный уровень активности рецептора, относительно его апо формы.

Частичный агонист- лиганд, опосредующий суб-максимальный уровень активности рецептора, даже при связывании в насыщающей концентрации.

Обратный агонист- лиганд, снижающий уровень базовой (конститутивной) активности, до минимального значения.

Нейтральный антагонист- лиганд, не влияющий на уровень базовой активности рецептора. Обычно связывание нейтральных антагонистов стерически блокирует ортостерический карман рецептора, препятствуя проникновению в эту область других лигандов.

Введение.

Семи-трансмембранные (7-ТМ) рецепторы играют первостепенную роль в межклеточных коммуникациях, аутокринных и паракринных регуляциях клеточных функций, а также в процессах подвижности и адгезии клеток [1]. В этой связи, исследование этих белков всегда было одним из основных направлений клеточной физиологии, биофизики и фармакологии. Помимо чисто академического интереса, экспериментальный и теоретический анализ 7-ТМ рецепторов имеет важное прикладное значение. Достаточно сказать, что как минимум половина известных лекарственных препаратов являются лигандами этих белков [2, 3]. Долгое время считалось, что переход рецептора в активное состояние является прямым следствием его взаимодействия с агонистом. Тем не менее, в существующих представлениях об активации этих белков все еще много неясного. Одним из важных функциональных свойств лиганд-активируемых рецепторов является существование их лиганд-независимой (конститутивной) активности *in vivo* [4]. Принимая во внимание огромное число заболеваний, связанных с повышенной конститутивной активностью, клетка должна выступать в роли своеобразного реостата, задача которого сводится к минимизации числа спонтанно активированных рецепторов. С другой стороны, благодаря появлению большого числа рентгеновских структур родопсин-подобных рецепторов, был установлен ряд структурных особенностей, связанных с их активацией. Например, было показано, что этот процесс сопровождается структурными изменениями на уровне отдельных трансмембранных (ТМ) α -спиралей рецептора [5]. Тем не менее, в случае β -адренергических рецепторов конформация этих белков, закристаллизованных с полными агонистами, чаще соответствовала их неактивной форме. Эти данные в совокупности свидетельствуют о том, что связывание агонистов является необходимым, но недостаточным условием для перехода рецептора в активную конформацию. В этой связи, необходимо ясное понимание того, какие именно конформации рецептора соответствуют

его истинно активному состоянию, и каким именно путем в конформационном пространстве движется рецептор для его достижения. Согласно современным представлениям, рецептор представляет собой ансамбль структурно близких подсостояний, между которыми осуществляется непрерывный перебор [6, 7]. При этом, любое внешнее воздействие (например, связывание лигандов, изменение концентрации электролитов, либо же введение мутаций) приводит к перераспределению исходного равновесия, повышая статистический вес отдельных подсостояний [8]. В работах Кенакина показано, что каждое функциональное подсостояние рецептора является в сущности конформационным суб-ансамблем. При этом, находясь в различных подсостояниях рецептор обладает специфической аффинностью по отношению к различным трансдюсерам (Рис.1) [9, 10].

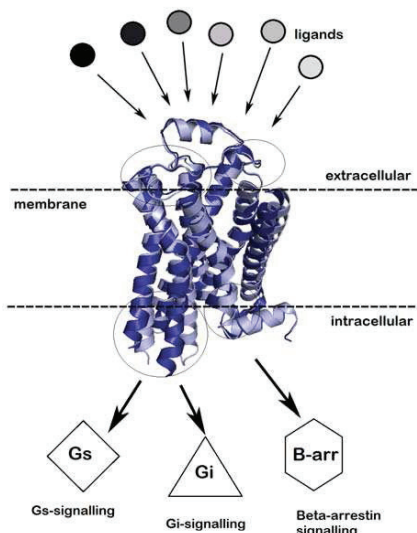


Рис. 1. Схема концепции “множественной эффективности”, служащей для описания функциональных аспектов 7-ТМ рецепторов, на примере β -2-адренорецептора. В кружки выделены области молекулы рецептора с наиболее выраженной структурной динамикой. В нижней части рисунка показаны возможные пути передачи сигнала.

Опираясь на эту концепцию, актуален поиск методов, позволяющих получить полноценное представление относительно полного спектра возможных подсостояний лиганд-активируемых рецепторов. Одной из перспективных альтернатив для реализации этой идеи заключается в проведении вычислительных экспериментов [11-13]. Например, используя метод молекулярной динамики удастся детектировать наиболее короткоживущие (менее стабильные) подсостояния исследуемых белков. Эти конформеры, зачастую остающиеся “незамеченными” современными экспериментальными методами, так же могут обладать функциональной значимостью. Например, известно, что активация многих рецепторов эндогенными агонистами нередко приводит к возникновению нежелательных побочных эффектов, связанных с активацией дополнительных сигнальных каскадов. Таким образом, учитывая подобную “функциональную плюрипотентность”, задача современного дизайна лекарств сводится к разработке лигандов, стабилизирующих наиболее узкие области предсуществующего конформационного пространства рецептора.

Приведенный на последующих страницах материал поможет читателю сформировать наглядное представление о том, каким образом методы молекулярного моделирования, в совокупности с анализом экспериментальных данных, могут быть эффективно использованы для исследования столь комплексного биологического явления, как сигнальная трансдукция. Эта работа была проведено в три основных этапа. На первом шаге, используя экспериментальные выборки фоторецептора родопсина, а так же трёх лиганд-активируемых рецепторов, было проведено исследования конформационной подвижности мембранных рецепторов, на основании сравнения их пространственных структур. На следующем этапе методами молекулярной динамики исследовалась конформационная подвижность апо формы аденозинового рецептора. На этом шаге была установлена взаимосвязь между лиганд-независимой (конститутивной) активностью рецептора и его конформационной подвижностью. Наконец, на заключительном этапе методом молекулярной динамики было исследовано влияние связывания

ортостерических лигандов на структурную подвижность β -2-адренорецептора. В этой части нами было установлено, что связывание низкомолекулярных веществ может существенно влиять на предсуществующее конформационное равновесие рецептора. Таким образом, полученные результаты помимо фундаментальной значимости применимы так же в области биотехнологии для разработки и дизайна новых лекарственных препаратов.

Структура и динамика семи-трансмембранных рецепторов.

Родопсин-подобные рецепторы относятся к первому (A) и наиболее обширному подклассу сигнальных белков, получивших название семи-трансмембранных (7-ТМ) рецепторов. Детальные представления об организации пространственной структуры этих белков были получены, прежде всего, благодаря методу рентген кристаллографии [14]. Прежде всего, замечательна высокая степень сходства в организации пространственных структур, при низкой (до 20-30%) гомологии по их аминокислотным последовательностям. При этом, наиболее структурно-консервативный трансмембранный домен этих белков состоит из семи α -спиралей (ТМ1-ТМ7), располагающихся против часовой стрелки, если смотреть со стороны внутриклеточного пространства. Эти α -спирали объединены между собой в “змеевидной” манере, с помощью внеклеточных и внутриклеточных петель. Результаты спектроскопических исследования бактериородопсина (еще одного 7-ТМ белка, не являющегося, однако, GPCR), свидетельствуют в пользу того, что общая архитектура α -спирального пучка 7-ТМ рецепторов неслучайна [15]. В цитируемой работе было показано, что именно семь α -спиралей является минимальным числом для создания пространственного окружения лиганда. На рисунке 2 показана пространственная топология 7-ТМ рецепторов, на примере родопсина млекопитающих, а ниже приведено подробное описание каждого домена этих белков.

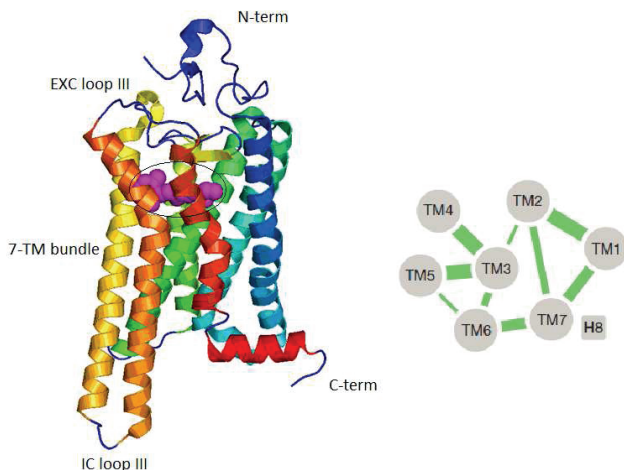


Рис. 2. Слева показана пространственная топология зрительного рецептора родопсина млекопитающих (картинка сделана на основании пространственной структуры pdb id 1gzl). Градиент цвета α -спиралей белка соответствует ходу полипептидной цепи от N к C-концу. На картинке подписаны области внеклеточных (EXC), а так же внутриклеточных (IC) петель рецептора (показаны синим цветом). Лиганд ретиналь изображен в виде шаровой модели. Справа- показана пространственная топология 7-ТМ участка со стороны внутриклеточного пространства. На этом рисунке толщина зеленых линий соответствует среднему числу нековалентных контактов между отдельными α -спиралями.

Анализ пространственных структур различных рецепторов показал, что наибольшие структурные отличия этих белков локализованы в их внеклеточных петлях [16]. В отличие от фотоактивируемого родопсина, все гормон-активируемые рецепторы содержат в данной области специфические аминокислотные последовательности (мотивы), ответственные за первичное узнавание и связывание различных лигандов [17, 18]. Внеклеточный участок родопсина характеризуется достаточно компактной, жесткой пространственной структурой. Подобная архитектура способствует изоляции ретиналь-связывающей области фоторецептора от молекул растворителя. При этом, наиболее ключевым значением обладает вторая внеклеточная петля (ВП2), образующая короткую β -шпильку. Кроме того, подобный жесткий

внеклеточный сегмент фоторецептора снижает общую подвижность внеклеточных концов его ТМ спиралей. С другой стороны, в случае β -адренорецептора наблюдается обратная картина, с более доступной для растворителя, структурно гибкой внеклеточной областью. В частности, из анализа кристаллографических структур данного белка видно, что его ВПЗ не взаимодействует с прочими внеклеточными участками, а ВП2 образует короткую α -спираль. Повышенная структурная пластичность этой области лиганд-активируемых рецепторов является необходимым фактором обеспечения их функциональной избирательности, по отношению к различным лигандам. Наконец, во всех 7-ТМ рецепторах показано наличие нескольких высоко-консервативных дисульфидных связей, дополнительно стабилизирующих конформацию ВП2 этих белков. Показано, что пространственная жесткость этого участка необходима для избирательности рецепторов, по отношению к различным лигандам [18].

Семи-трансмембранный домен родопсин-подобных рецепторов наиболее структурно консервативен. Известно, что для различных рецепторов, среднеквадратичное отклонение (СКО) между их отдельными α -спиралями, не превышает 1.5 Å. Функции 7-ТМ домена заключаются в (1) заякоревании рецептора в мембране, (2) создании лиганд-связывающего кармана, а так же (3) проведении сигнала о динамике внеклеточной среды, по направлению в цитоплазматическое пространство клетки. В то время как для осуществления первых двух функций очевидна необходимость структурной стабильности α -спирального домена, то проведение сигнала обеспечивается, главным образом, за счет конформационных изменений в отдельных α -спиралях рецептора. В структурном плане, считается, что третья α -спираль выполняет наиболее ключевую роль, ответственную за стабилизацию всего α -спирального пучка этих белков (рис. 2). Из этого рисунка видно, что этот участок полипептидной цепи расположен в центральной области всего 7-ТМ пучка, образуя систему нековалентных взаимодействий с остальными α -спиралями. С другой стороны, для V-VII α спиралей, напротив свойственна повышенная степень структурной

подвижности. Например, колебания в их цитоплазматических участках могут являться основными предпосылками для создания области, комплиментарной для связывания специфических трансдьюсеров. Из анализа пространственных структур родопсин-подобных рецепторов было установлено наличие трёх высоко-консервативных пролинов в их V-VII спиралях. В мембранном окружении эти остатки выполняют роль своеобразных “шарниров”, обеспечивая тем самым гибкость внеклеточных участков отдельных α -спиралей рецептора. Кроме этого, в рамках ТМ домена родопсин-подобных рецепторов, был обнаружен целый ряд высококонсервативных мотивов (“микрорепереклюкателей”), так же непосредственно связанных с функциональной динамикой этих белков [19, 20]. С другой стороны, расположение ортостерического лиганд-связывающего кармана значительно варьирует среди различных рецепторов. Например, локализация этого участка в родопсине, а так же обоих классов β -адренорецепторов достаточно схожа [16, 19]. В этих рецепторах, лиганды связываются в цитоплазматической области, между их ТМ5-ТМ7 доменами. С другой стороны, лиганд-связывающий карман аденозинового рецептора локализован несколько иначе, по сравнению с родопсином и β -адренорецепторами. В последнем случае, этот участок немного сдвинут по направлению к ВП2. Таким образом, лиганд располагается в этой области, более перпендикулярно относительно плоскости мембраны, с более сильным углублением во внеклеточную область рецептора, доступную растворителю.

Цитоплазматический домен родопсин-подобных рецепторов представлен тремя внутриклеточными петлями (ВНП1- ВНП3), а так же длинным С-концевым сегментом [16]. Известно, что ВНП2, а так же ВНП3 ответственны за взаимодействие со специфическими G-белками, в то время как С-конец содержит потенциальные сайты фосфорилирования для специфических протеин-киназ. Впоследствии, фосфорилированный С-конец может связываться с β -аррестинами, опосредующими либо сигнализацию по G-белок-независимым каскадам, либо потерю чувствительности рецептора, с

возможной его интернализацией (обратимым “уходом” в цитоплазматическое пространство клетки) [21]. Экспериментально показано, что в случае бета-адренорецепторов, изолированный фрагмент ВНПЗ *in vivo* обладает способностью к активации G-белков. По функциональному поведению эта область напоминает функциональное поведение белков, лишенных пространственной структуры в нативном состоянии (intrinsic disorder proteins) [22]. В последнем случае конформационная гибкость этих молекул ответственна за возможность их взаимодействия с различными партнерами. По аналогии с этим, гибкость внутриклеточного участка лиганд-активируемых рецепторов связана с их “функциональной-избирательностью”, по отношению к различным трансдьюсерам. В заключении стоит отметить, что уникальная пространственная архитектура рецептора одновременно включает как более конформационно подвижные участки (например, петли), осуществляющие связывание с другими молекулами, а так же более структурно стабильный сегмент, состоящий из семи α -спиралей. Таким образом, пространственной архитектуре рецептора свойственна определенная степень структурной подвижности, непосредственно связанной с его биологической функцией.

Родопсин-подобные рецепторы.

В этой главе приведены основные сведения по функциональным свойствам каждого из рецепторов, которые были исследованы в настоящей работе. *Родопсин* является пигментом оболочки зрительной сетчатки, ответственным за формирование фоторецепторных клеток, а так же за первичные процессы светового восприятия [23]. Этот фоторецептор обладает исключительной чувствительностью к свету, обеспечивая живые организмы зрением, даже в условиях с бедным освещением. Известно, что поглощение светового кванта приводит к фотообесцвечиванию родопсина, сопровождаемая его инактивацией. Последнее связано с изомеризацией хромофора 11-цис-ретинала в полностью-транс форму. Подобные внутримолекулярные изменения

впоследствии передаются на цитоплазматическую поверхность рецептора, ответственную за связывание с α субъединицей Трансдуцина (G_i). Активация этого G-белка, в свою очередь, приводит к активации эффектора фосфодиэстеразы, действие которой вызывает снижение концентрации внутриклеточного цАМФ. Последнее приводит к закрытию специфических Na^+ и Ca^{2+} каналов, вызывая гиперполяризацию мембраны клеток палочек, а так же остановку выброса нейромедиатора глутамата. Снижение ионной силы вызывает активацию гуанилатциклазы, что влечет за собой быстрый подъем уровня цГМФ, приводящий вновь к открытию Na^+ и Ca^{2+} каналов. Спустя короткое время, α -субъединица трансдуцина инактивируется за счет медленного гидролиза связанного ГТФ и вновь ассоциируется с комплексом β , γ -субъединиц. Наконец, инактивированный родопсин распадается на опсин и полностью *транс*-ретиаль, который изомеризуется в *цис*-ретиаль под действием ретиаль-изомеразы. Стоит отметить, что родопсин является единственным 7-ТМ рецептором, для которого специфический лиганд является одновременно обратным и полным агонистом, в зависимости от наличия светового освещения. В функциональном плане это является прямым следствием крайне низкого уровня конститутивной активности фоторецептора *in vivo*, по сравнению с лиганд-активируемыми рецепторами.

Адренергические рецепторы относятся к классу метаботропных GPCRs, являясь мишенями производных катехоламина, в частности норадреналина и адреналина [24]. В настоящее время известно три подкласса β -адренорецепторов, локализованных чаще на мембранах клеток гладкой мускулатуры. В частности, этот тип рецепторов преобладает на гладких мышцах бронхиол, а так же артериях скелетных мышц. Кроме этого, эти рецепторы найдены на мембранах клеток печени, адипоцитах, слюнных желез, а так же на мембране тучных клеток, лимфоцитов и тромбоцитов. Известно, что сигнализация через адренорецепторы приводит к симпатическому ответу, который проявляется в увеличении частоты сердечных сокращений, расширении зрачков, мобилизации энергии, а так же отводу кровотока от

внутренних органов, по направлению к поперечнополосатой мускулатуре. На молекулярном уровне, активация этих рецепторов связана с передачей сигнала, через специфический G_s (стимуляторный) белок. Взаимодействие этого трансдьюсера с рецептором приводит к его распаду на α -субъединицу, которая осуществляет обмен ГДФ на ГТФ, а так же β и γ субъединицы, обладающие собственной активностью. На следующем этапе, активированная α субъединица G_s белка взаимодействует с мембранным ферментом аденилатциклазой. Данный эффектор катализирует превращение АТФ в цАМФ, выполняющего роль вторичного мессенджера при активации протеинкиназы А (цАМФ-зависимой А-киназы). Наконец, активированные каталитические субъединицы протеинкиназы принимают участие в фосфорилировании других белков-субстратов. Относительно недавно стало так же известно, что в ряде случаев адренорецепторы могут осуществлять передачу сигнала как посредством других G-белков, так и по G-белок независимым путям (например, через β -аррестины) [21]. В последнем случае, активация β -аррестинов может приводить либо к потере чувствительности рецептора, либо к запуску MAPK-зависимых сигнальных каскадов [25, 26]. Таким образом, в отличие от родопсина, передача сигнала через адренорецепторы может проходить по широкому спектру биохимических каскадов, посредством активации различных молекул трансдьюсеров и эффекторов.

Аденозиновые рецепторы принадлежат к отдельному подклассу пуринергических GPCR, для которых аденозин является эндогенным лигандом [27]. На основании специфической селективности к химическим аналогам аденозина, а также различий в биохимических и фармакологических свойствах, аденозиновые рецепторы делят на четыре подтипа (A_1 , A_{2A} , A_{2B} и A_3) [28]. Известно, что действие белков из A_1 и A_{2A} подклассов связано с работой сердца, выполняя регуляцию миокардиального потребления кислорода, а так же коронарного кровяного потока. Наряду с этим, A_{2A} рецептор имеет особое значение в противовоспалительных процессах. Наконец, оба подтипа этих рецепторов так же выполняют ключевую физиологическую роль на уровне

головного мозга, регулируя высвобождение специфических нейротрансмиттеров (дофамин и глутамат). Известно, что активация A₁- и A₃-рецепторов вызывает снижение уровня цАМФ, в то время, как активация A_{2a}- и A_{2b}-рецепторов, напротив, приводит к его увеличению. Последнее, как и в случае β-адренорецепторов, связано с типом G-белка, посредством которого осуществляется передача сигнала. Кроме того, стимуляция A₁-рецепторов вызывает активацию калиевых и деактивацию кальциевых каналов, а стимуляция A_{2a}-рецепторов приводит к ингибированию функциональной активности D₂-дофаминовых рецепторов. Последнее имеет важное значение в развитии неврологических и психических заболеваний. Таким образом, лиганды аденозиновых рецепторов обладают широким применением в области фармакологии, что в свою очередь делает крайне важной и актуальной задачу изучения пространственной архитектуры этих белков, способствуя разработки более эффективных и селективных лигандов.

Конформационная динамика 7-ТМ рецепторов.

Многочисленные экспериментальные данные указывают на то, что передача сигнала может происходить за счет конформационных изменений в молекуле рецептора [29]. До недавнего времени, основные представления о функционировании мембранных рецепторов были получены на основании исследований фоторецептора родопсина млекопитающих [23]. Известно, что поглощение светового кванта родопсином приводит к фотоизомеризации его хромофора 11-цис-ретиная в полностью-транс форму [30]. Эта реакция является основной предпосылкой более крупномасштабных структурных изменений во внутриклеточной области отдельных трансмембранных (ТМ) спиралей фоторецептора. Методом рентген кристаллографии расшифровано более двух десятков структур этого белка, которые соответствуют различным стадиям его фотоактивации (фотоинтермедиатам) [31]. Исследуя подобное конформационное разнообразие можно попытаться оценить взаимосвязь динамики, наблюдаемой при сравнении различных экспериментальных

структур (например, по степени движения отдельных α -спиралей), а так же функции этого белка (передачи зрительного сигнала). Благодаря появлению новых экспериментальных структур бета-адренергических, а так же аденозинового рецепторов стало известно, что активация этих белков, в структурном плане, происходит по схожему сценарию [5]. Первые представления о характере подобных внутримолекулярных движений были получены из биохимических и биофизических исследований. Например, в работах Хуббелля и Корана методами спектроскопии ЭПР, а так же цистеинового спин-меченья было показано, что движение шестой спирали (ТМ6) родопсина было связано с его фотоактивацией [32]. В последствии, детальные подробности этого явления для различных 7-ТМ рецепторов удалось получить, используя флуоресцентные методы, а так же ИК спектроскопию и ЯМР [33-35]. Дальнейшие исследования показали, что конформационные движения цитоплазматических участков V-VII спиралей рецептора в последствии распространяются на их внутриклеточные петли [36, 37]. Подобное структурное поведение, связывающее динамику внеклеточной и внутриклеточной областей, хорошо вписывается в рамки модели "множественной эффективности" [38]. На рисунке 1 был показан пример, отражающий основные принципы этой концепции. Центральной идеей является то, что связывание различных лигандов стабилизирует различные подсостояния (конформации) рецептора. В результате, это приводит к активации различных G-белков, либо же к передачи сигнала по G-белок независимым путям [39]. С другой стороны, связывание других лигандов может ингибировать передачу сигнала, вызывая потерю чувствительности рецептора [40]. В настоящее время существует несколько теоретических моделей для описывания "функциональной избирательности" 7-ТМ рецепторов. В основу этих моделей лежит концепция энергетической поверхности, изначально предложенная для описания процесса сворачивания белков [41, 42]. Согласно этой концепции, каждому конформационному подсостоянию белка характерно определенное значение свободной энергии. При этом, наиболее устойчивые конформации

характеризуются минимальным значением этой величины. Подобная иерархичная классификация конформационных подсостояний впервые использовалась при исследовании функционирования миоглобина [43]. На рисунке 3А показан пример идеализированного энергетического ландшафта, состоящего из гладких холмов и впадин. Подобное представление в большей степени соответствует дву-стадийному описанию функционирования белка. Таким образом, два минимума свободной энергии соответствуют неактивной (R) и активной (R*) конформациям рецептора. При этом, одной из этих подсостояний может быть стабилизировано, вследствие влияния внешних факторов, например, связывания лигандов, G-белков, точечных мутаций, либо изменения окружающих условий. На рисунке 3В показано, что в силу неровности поверхностей (явление энергетической вырожденности) каждая впадина в сущности включает несколько подсостояний, с близкими значениями свободной энергии. Таким образом, совокупность всех доступных подсостояний рецептора условно можно разделить на несколько ярусов.

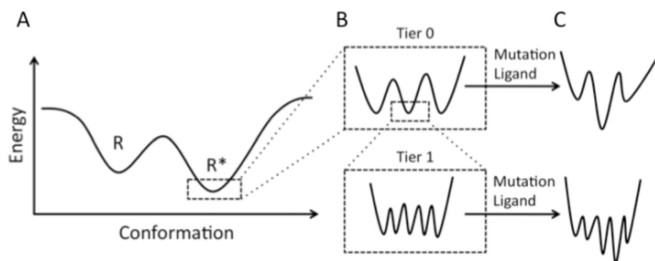


Рис. 3. Использование представлений о поверхности свободной энергии для описания конформационной динамики белков. Рисунок взят из работы [44].

Одна из подобных моделей, связывающей “множественную эффективность” 7-ТМ рецепторов с их конформационной динамикой через поверхность свободной энергии, была предложена в группах Кобилки и Вайдехи [7, 45]. В этих работах функциональный рецептор представлен ансамблем подсостояний (конформеров), между которыми происходит непрерывный перебор. При этом, структурные процессы, сопровождающие активацию рецептора (переход из одного подсостояния в другое), наглядно изображаются в виде фазовых

диаграмм. Эти графики являются проекциями конформационных изменений рецептора на плоскость его энергетического ландшафта, форма которого зависит от динамики внутримолекулярных химических связей. Таким образом, наиболее термодинамически допустимые конформации (обладающие балансом между внутренней энергией и конформационной энтропией) должны преобладать в подобном ансамбле. Важно, что основные постулаты подобной теоретической модели нашли дальнейшее подтверждение в исследованиях Кенакина [9]. В цитируемой работе, на основании анализа экспериментальных данных, автором была показана взаимосвязь между эффективностью 7-ТМ рецепторов, а так же их структурной подвижностью. В общем случае, каждое функциональное подсостояние рецептора (обладающее аффинностью по отношению к специфическому эффектору) следует рассматривать как ансамбль его структурно-близких подсостояний (конформеров). При этом, любое внешнее воздействие, например связывание лигандов, должно приводить к перераспределению подобных степеней свободы, стабилизируя отдельные области предсуществующего конформационного пространства рецептора. Таким образом, в действительности энергетическая поверхность, описывающая функциональные аспекты 7-ТМ рецепторов, - многомерна. В совокупности, эти данные указывают на необходимость исследования функциональных аспектов лиганд-активируемых рецепторов, с точки зрения их конформационной динамики, на основании теории статистических ансамблей.

Общие представления о конститутивной активности 7-ТМ рецепторов.

В настоящее время известно, что большинству родопсин-подобных рецепторов свойственна определенная степень агонист-независимой активности [4, 46]. Это явление впервые было обнаружено экспериментально на примере δ -опиоидного рецептора Коста и Герцем [47]. В цитируемой работе впервые был введен термин конститутивной активности, под которым понимался базовый уровень сигнализации рецептора, наблюдаемый в

отсутствии внешнего стимула. Открытие этого феномена в 7-ТМ рецепторах произошло одновременно с открытием нового функционального класса их лигандов, получивших название обратных агонистов. В функциональном плане, этим веществам свойственна отрицательная эффективность- явление снижения базового уровня активности рецептора, относительно его апо формы. Через несколько лет, независимыми исследователями экспериментально было обнаружено существование определенной доли агонист-независимой активности и для других родопсин-подобных рецепторов. Подобная функциональная картина, одновременно с открытием обратных агонистов, была так же отмечена для 5-гидрокситриптаминового и мускаринового рецепторов. Несколько позднее схожие закономерности удалось наблюдать для допаминового, гистаминового, а так же аденозинового рецепторов. Таким образом, проявление конститутивной активности свойственно большинству лиганд-активируемых 7-ТМ рецепторов. Поскольку до сих пор до конца невыяснено функциональное значение этого явления, спонтанная активация может являться функционально-необходимым явлением для ряда рецепторов, в плане регуляции их биохимических каскадов. С другой стороны, структурные детали, которые могли бы явиться предпосылками явления конститутивной активности лиганд-активируемых рецепторов, по большому счету остаются так и невыясненными. В наиболее простом случае функциональное поведение рецептора можно представить, в рамках физико-химического равновесия между его неактивным (R), а так же активным (R^*) подсостояниями. Таким образом, общая доля активированного рецептора (R^*), а так же количество энергии, необходимое для перехода в это подсостояние, будет определять конечный уровень его конститутивной активности. Некоторое понимание структурных механизмов данного явления был сделан благодаря открытию мутаций, влияющих на проявление конститутивной активности рецептора *in vivo* (конститутивно активные мутации, КАМ). Экспериментально показано, что введение КАМ в различные области рецептора, сдвигает равновесие между его двумя подсостояниями. Таким образом, одни мутации могут приводить к

усилению агонист-независимой активности рецептора, в то время как другие - к её снижению. Экспериментальным подтверждением подобного явления является α -1-адренорецептор. Для этого белка впервые был показан целый ряд точечных мутаций, влияющих на его активность [48]. Важно, что эти участки локализовались в областях, динамическое поведение которых было связано с активацией родопсин-подобных рецепторов. Например, замещение аланинового остатка на лейцин в цитоплазматическом участке VI спирали, приводило к существенному усилению базовой активности рецептора. Подобное явление удалось объяснить благодаря обнаружению высококонсервативных остатков в различных родопсин-подобных рецепторах, получивших название “микро-переключателей” (Micro-switches) [19]. Эти остатки выполняют роль стабилизирующих мостиков, связывая друг с другом отдельные ТМ спирали рецептора. Таким образом, мутация на уровне одного микро-переключателя (например, замена заряженной аминокислоты на аланин) может приводить к дестабилизации подобных контактов, повышая в итоге конформационную подвижность целых α -спиралей. В структурном плане, наблюдаемое явление имеет аналогию со связыванием полного агониста, так же способствующее разрыву стабилизирующих взаимодействий в ортостерической области рецептора. Наиболее важно то, что для различных рецепторов впоследствии был обнаружен целый ряд КАМ, локализующихся практически в каждой α -спирали этих белков, в удалении от их ортостерических областей [49-51]. Эти данные указывают на то, что в пространственной архитектуре рецепторов существует целая сеть высококонсервативных структурных элементов, ответственных за стабилизацию различных функционально-значимых подсостояний этих белков. В этой связи становится очевидной необходимость исследования явления спонтанной активации 7-ТМ рецепторов на основании их структурной подвижности.

Методы исследования.

Метод анализа главных компонент.

Метод анализа главных компонент (Principal componential analysis, PCA) — один из основных способов уменьшения размерности исходных данных, с наименьшей потерей значимой информации [52, 53]. Обычно, расчет главных компонент (ГК) сводится к вычислению собственных векторов и собственных значений ковариационной матрицы исходных данных. Наряду с этим, метод главных компонент широко используется в структурной биоинформатике, для исследования функционально значимых движений в макромолекулах. Согласно центральной идее этого метода, основные направления наиболее коллективных флуктуаций (то есть, синхронные колебания большого числа атомов), вносят наибольший вклад в наблюдаемую конформационную подвижность белков. При этом, функционально-значимые движения этих макромолекул могут быть описаны небольшим числом коллективных степеней свободы, называемых главными компонентами. Наконец, тот факт, что лишь незначительная доля из общего числа возможных степеней свободы вносят наиболее существенный вклад в функционально-значимую динамику биомолекул, существенно облегчает последующий анализ их внутримолекулярных движений. Последние могут быть получены из траекторий молекулярной динамики, либо же в ходе сравнения набора экспериментальных структур исследуемого белка.

Рассмотрим траекторию из N атомов $F(X_i, Y_i, Z_i)$, где $i = 1, 2, \dots, N$. При анализе ансамблей экспериментальных структур исследуемого белка, на первом шаге проводится расчёт ковариационной матрицы C , состоящей из $3N \times 3N$ элементов, Расчет ковариационной матрицы C осуществляется из выражения:

$$\langle \Delta R \Delta R^T \rangle = m^{-1} \sum_A [\Delta R^{(A)} \Delta R^{(A)T}] \quad (1)$$

, где R – это набор координат какой-либо точки траектории, суммирование осуществляется по всем m исследуемым структурам, а ΔR является показателем отклонения конкретной структуры A , относительно усредненной структуры $\langle R \rangle$. Индекс T означает транспонирование исходной матрицы. Последующая диагонализация матрицы C , с помощью преобразования 2:

$$C = \sum_{i=1}^m \sigma_i p_i p_i^T \quad (2)$$

приводит к вычислению главных компонент (собственных векторов) p_i , а так же соответствующих им значений дисперсии (собственных значений) σ_i . Здесь, σ_i представляет наибольшую дисперсию системы, а p_i ($3N$ -мерный вектор) описывает смещение N -оснований, представленных в данном случае их C -атомами, по данной наиболее изменчивой моде, называемой первой главной компонентой. Наконец, среднеквадратичное отклонение между исследуемыми структурами может быть найдено в результате суммирования диагональных элементов матрицы C , из выражения 3:

$$\langle RMSD \rangle = [tr(C) / N]^{1/2} \quad (3)$$

Из выражений 2 и 3 очевидно, что именно первая главная компонента (p_1), которой соответствует наибольшее значение дисперсии σ_1 , вносит основной вклад в усредненное среднеквадратичное отклонение $\langle SKO \rangle$. Рассчитанные собственные вектора (главные компоненты, $[P_1, P_2, \dots, P_n]$) используются в качестве координатных осей N -мерного пространства макромолекулы, задающие границы области её конфигурационного пространства. При этом, пространственные координаты каждой структуры из ансамбля $Q(t)$ выражаются в векторной форме $\mathbf{q} = [x_1, x_2, \dots, x_N]$, где x_i - i координата в исходном N -мерном пространстве. Новое отображение исходных координат в коллективном подпространстве главных компонент задается проекцией декартовых координат исследуемой структуры на эту плоскость (выражение 4).

$$X_i = V_i(T) \cdot (q_i - \langle q \rangle) \quad (4)$$

В выражении 4 член $v_i(T)$ соответствует i собственному вектору, q_i являются векторными координатами i -ого конформера, а $\langle q \rangle$ - координатами усредненной структуры. Проекция ансамбля конформеров $Q(T)$ на N -мерное пространство главных компонент (выражение 4) позволяет получить распределение конформеров на плоскости выбранных коллективных координат. Анализ подобных распределений позволяет получить общие представления о сечении поверхности свободной энергии исследуемой молекулы по выбранным реакционным координатам (главным компонентам). На этих проекциях области с более высокой плотностью конформеров будут соответствовать наиболее стабильным подсостояниям белка с большим значением энтропии. Таким образом, метод анализа главных компонент позволяет получить представление как о потенциальной энергии (динамики межатомных расстояний), так и об энтропийной составляющей (плотностей ансамблей конформеров) исследуемых конформационных движений в макромолекулах.

Метод молекулярной динамики.

В основу метода молекулярной динамики (МД) лежит численное решение классических уравнений движения Ньютона, относительно многоатомной системы. В рамках данного метода, все атомы исследуемой системы представляют собой материальные точки, а поведение отдельного атома описывается классическими уравнениями движения:

$$m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = F_i \quad (5)$$

где i – номер атома ($1 \leq i \leq n$, n – полное число атомов в системе), m_i - масса атома, r_i – радиус-вектор атома, F_i – равнодействующая сил, действующих на атом. В настоящее время известно, что данное приближение хорошо работает,

если частоты колебаний материальных точек не превышают величину $k_b T/h$, где k_b – постоянная Больцмана, T – температура, а h – постоянная Планка.

Численное интегрирование уравнения (1) дает траекторию системы с известными в каждый момент времени скоростями и координатами каждого атома, а также значения энергии системы. Равнодействующая сила складывается из двух составляющих:

$$F_i = -\frac{\partial U(\mathbf{r}_1, \dots, \mathbf{r}_n)}{\partial \mathbf{r}_i} + \mathbf{F}_i^{ex} \quad (6)$$

Это, во-первых, градиент потенциальной энергии системы U , включающей в себя сумму всех взаимодействий атомов, а во-вторых, дополнительная сила $\mathbf{F}_i^{ex}$, определяемая взаимодействиями с молекулами среды (то есть, суммарное внешнее воздействие). Первая составляющая – сила, действующая на данный атом со стороны всех остальных атомов. Данная величина рассчитывается как производная потенциальной энергии системы.

Задав координаты и скорости всех частиц в начальный момент времени, численно решают уравнения движения, вычисляя на каждом шаге совокупность действующих сил, а так же новые координаты и скорости частиц. При этом, температура определяется как средняя кинетическая энергия, приходящаяся на одну степень свободы системы:

$$T(t) = \frac{1}{3Nk_B} \sum_{i=1}^N m_i v_i^2, \quad v_i = \frac{d\mathbf{r}_i}{dt}. \quad (7)$$

В выражении 7, N – полное число степеней свободы молекулы, k_B – постоянная Больцмана. В случае изолированной системы $N=3n-6$, поскольку сохраняется ее полный импульс и момент импульса. Кроме того, в этом случае сохраняется полная энергия системы, а температура получается усреднением ее мгновенных значений $T(t)$ по некоторому интервалу времени. Исследование функциональных аспектов белков методом МД позволяет рассматривать статистический перебор энергетически-допустимых подсостояний (конформеров) данных макромолекул, формирующих их статистические

ансамбли. В рамках проведенной серии вычислительных экспериментов, в качестве движущей силы описанного выше перебора мы использовали стохастическую динамику Ланжевена, представляющую собой вариант молекулярной динамики, с введением стохастической температуры. Уравнение Ланжевена добавляет члены, для выражения сил трения, а так же случайного шума к уравнению Ньютона:

$$m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = -m_i \gamma \frac{dr_i(t)}{dt} + F_i(r) + \dot{r} \quad (8)$$

В данном выражении γ является константой трения (1/пс), а $\dot{r}$ —случайная сила. Для получения статистически достоверных результатов оба данных значения должно удовлетворять флуктационно-диссипативной теореме:

$$\langle \dot{r}(t) \dot{r}(t+s) \rangle = 2k_B T \gamma \delta(s) \quad (9)$$

Наконец, фрикционный параметр γ для i -ого атома, выражается через константу трения $\gamma_i = m_i / \tau$, где m_i – масса соответствующего атома. В случае, когда величина γ порядка временной шкалы расчета, то в системе поддерживается постоянная температура. В процессе расчета траектории МД, равнодействующая сила находится как градиент потенциала, который включает в себя сумму всех взаимодействий атомов в системе. Потенциальная энергия системы складывается из нескольких вкладов:

$$U = U_b + U_v + U_\phi + U_f + U_{qq} + U_{vdw} + U_{Hb} \quad (10)$$

где U_b – потенциальная энергия валентных связей, U_v – валентных углов, U_ϕ – торсионных углов, U_f – плоских групп и псевдоторсионных углов, U_{qq} – кулоновских сил, U_{vdw} – взаимодействий Ван-дер-Ваальса, U_{Hb} – водородных связей. Каждый член в формуле 10 определенным образом зависит от внутренних координат молекулярной системы: длин связей, величины валентных углов и т.д. Функциональный вид зависимостей и параметры взаимодействий выбираются из определенных физических соображений, чтобы

добиться более точного воспроизведения тех или иных экспериментальных данных (спектральных, калориметрических, кристаллографических) или результатов квантово-химических расчетов для заданного набора химических соединений.

Метод управляемой молекулярной динамики.

Статистическая сходимость рассчитанных траекторий является одним из ключевых вопросов любого виртуального эксперимента [54]. В большинстве реальных экспериментов, проводимых в среде *in vitro*, измеряемые величины (температура, давление, характерные времена, амплитуды флуктуаций и т.д.) являются средними значениями по ансамблю, т.е. по бесконечному множеству точных копий изучаемой системы. Имея дело с траекторией, производят вычисления средних значений вдоль траектории, т.е. по времени. Для изучения процессов, характерное время которых превышает достижимые методом МД времена траекторий, все чаще используется метод неравновесной (управляемой) молекулярной динамики. При равновесной молекулярной динамике атомы движутся под действием сил взаимодействия с другими атомами системы. В рамках неравновесной МД на отдельные атомы системы, как правило, налагается дополнительный потенциал, который стимулирует молекулярные процессы по определенным степеням свободы. Одним из подобных методов является Essential Dynamics Sampling (EDS) [55]. Поскольку конформационные движения макромолекул вносят существенный вклад в ковариантные изменения позиций отдельных атомов, то метод главных компонент (называемый в этом случае Анализом Основной Динамики, Essential Dynamics Analysis (EDA) является эффективным способом для анализа траекторий МД. Полученные результаты могут использоваться для ограничения движения макромолекул по избранным степеням свободы, при последующем расчете траекторий МД. С помощью расчета матрицы ковариаций из исходной траектории МД получают наиболее коллективные

высокоамплитудные колебания атомов. В итоге, позиция вдоль выбранных мод может фиксироваться при расчете последующей траектории, за счет увеличения расстояния относительно исходной конформации исследуемого белка в заданном конформационном подпространстве. В нашем случае это подпространство было образовано первыми тремя низкочастотными модами, рассчитанными методом PCA для экспериментальной выборки аденозинового, а так же β -2-адренорецептора, во второй и третьих главах настоящей работы, соответственно. Впервые применение подобного метода для исследования функциональных аспектов белков было сделано на примере изучения междоменных движений куриного лизоцима, а так же других ферментов [56-58]. Кроме того, известны примеры использования этого метода, для исследования сворачивания белка [42, 59].

Моделирование молекулярной динамики A_{2A} рецептора в окружении ПОГФ-воды.

Для моделирования липидного окружения рецептора была создана модель гидрированного липидного би-слоя, состоящего из 256 молекул липидов 1-Пальмитоил-2-олеил-глицеро-3-фосфат-этаноламин (ПОГФ), а так же 10500 молекул воды (модель одиночных точечных зарядов). Даная система была уравновешена в условиях, соответствующих изобарно-изотермическому (NPT) ансамблю (табл.3). При этом, значения выбранной температуры и давления соответствовали точки фазового перехода липидов (310K, 1 атм); время моделирования- 50 нс. На следующем шаге, модель аденозинового рецептора была помещена в уравновешенную систему окружения, при помощи утилиты g_membed. Наконец, в полученную систему были так же добавлены ионы соли NaCl, в соответствии с физиологической концентрацией (0.15 ммоль\литр). В итоге, полученная система состояла из 1 молекулы аденозинового рецептора, 202 молекул липидов, а так же 10300 молекул воды.

На рисунке 4 представлен общий вид системы аденозинового рецептора в явно-заданном окружении ПОГФ-вода.

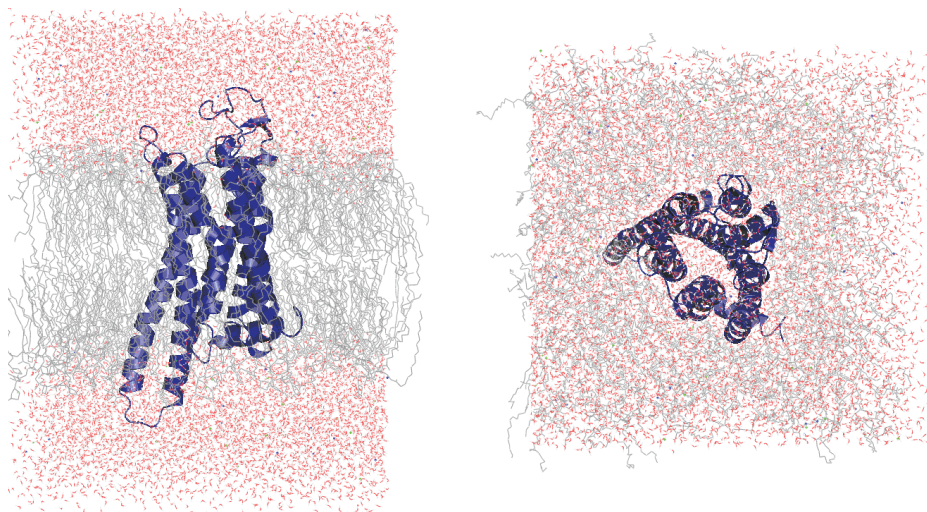


Рис. 4. Модель инактивированного подсостояния аденозинового рецептора, в окружении ПОГФ-вода, используемая в качестве стартовой структуры для расчета траектории МД. Пространственная структура рецептора показана в виде ленточной модели.

Полученная система была минимизирована (5000 шагов, алгоритм steepest descent minimization), а так же уравновешена в три этапа. На первом этапе, была произведена короткая симуляция (длительность 100пс), с наложением гармонических ограничений на все атомы рецептора. В данном случае симуляция проводилась в микроканоническом (NVT) ансамбле, до полной стабилизации температуры системы (310K). На двух последующих этапах система моделировалась в изобарно-изотермическом (NPT) ансамбле с наложением гармонических ограничений на все атомы рецептора (длительность 5 нс), а так же только на его боковые цепи (длительность 10нс), соответственно. В таблице 1 представлен подробный протокол моделирования системы рецептора в окружении ПОГФ-вода.

Табл. 1. Основные параметры моделирования GROMACS для системы рецептора в окружении ПОГФ-вода

Интегратор	SD (стохастическая динамика Ланжевена)
Шаг интегрирования	2 фемптосекунды
Частота обновления межатомных взаимодействий (nslist)	5 фемптосекунд
Алгоритм расчета межатомных взаимодействий	grid
Периодически-граничные условия	xyz
Дистанция обрезания для взаимодействий ближнего-действия (glist)	1.2 нм. PME (метод Particle Mesh Ewald)
Тип учёта Кулоновских взаимодействий	1.2 нм.
Радиус обрезания Кулоновских взаимодействий	
Тип учёта Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий	Cut-off 1.2 нм.
Радиус обрезания Ван-дер-ваальсовых взаимодействий	
Ограничения	Все связи (алгоритм LINCS)
Моделирование термостата	Поддержание постоянной температуры в условиях стохастической динамики, с характерными временами релаксации кинетической энергии 2 пс.
Моделирование баростата	Система моделировалась в изобарно-изотермическом (NPT) ансамбле с использованием алгоритма Parrinello-Rahman (баростат Паринелло-Рахмана) в условиях Semiisotropic (независимое масштабирование x-y, а так же z векторов периодической ячейки) с поддержанием постоянного давления 1 атм.

Расчет сдвига рКа для титруемых аминокислотных остатков рецептора.

Расчет логарифмических констант кислотности (рКа) для каждого из титруемых в нейтральном диапазоне pH остатков рецептора (Asp, Glu, His) был произведен при помощи серверов ProPKa (<http://proPKa.ki.ku.dk/>), а так же H++

(<http://biophysics.cs.vt.edu/index.php>). В соответствии с полученными результатами, в используемой нами модели аденозинового рецептора были установлены подходящие степени протонирования для всех титруемых остатков. В частности, в полностью протонированной форме были остатки Asp-52 ($pK > 8.0$, нейтральный), а так же His-278 ($pK > 8.0$, положительно заряженный). Остаток His-264 так же рассматривался в полностью протонированной форме, вследствие его кулоновского взаимодействия с соседним Glu-13.

Моделирование молекулярной динамики β -2-адренорецептора в комплексах с лигандами.

Постановка вычислительных экспериментов проводилась при помощи пакета программ Gromacs, с использованием потенциального поля Gromos 54A7 (модель “объединенных” атомов). Исходная пространственная модель β -2-адренорецептора была создана на основании экспериментальной структуры этого белка, соответствующей его неактивной форме (pdb id 2rh1). Недостающие атомы этой экспериментальной структуры были восстановлены при помощи программы pdb2pqr, при помощи которой так же были определены степени протонированности титруемых остатков. Отсутствующие в кристалле пространственные координаты третьей внутриклеточной петли (IC3) рецептора были восстановлены при помощи алгоритма Superlooper (<http://bioinf-applied.charite.de/superlooper/>). На следующем шаге, модель рецептора была помещена в уравновешенную систему липидно-водного окружения, при помощи утилиты g_membed. В полученную систему были так же добавлены ионы соли NaCl, в соответствии с физиологической концентрацией. В итоге, модель апо рецептора (система 1) состояла из одной молекулы β -2-адренорецептора, 202 молекул 1-Пальмитоил-2-олеил-глицеро-3-фосфат-этаноламин (ПОГФ) липидов (модель объединенных атомов, основанная на параметрах Бергера), а так же ~ 12000 молекул воды и 142 ионов (Рис.5).

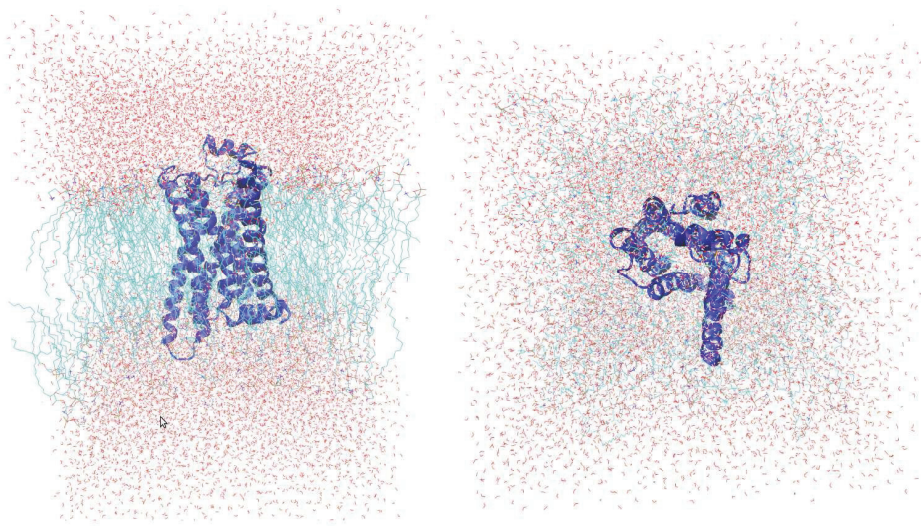


Рис. 5. Модель инактивированного подсостояния β -2-адренорецептора, в окружении ПОГФ-вода, используемая в качестве стартовой структуры для расчета траектории МД. Пространственная структура рецептора показана в виде ленточной модели.

Для моделирования β -2-адренорецептора в комплексах с лигандами (системы 2 и 3) были созданы две дополнительные системы. При этом, параметризация полного агониста (изопrenalина), а так же обратного агониста (ICI 118,551) проводилась на сервере ATB (<http://compbio.biosci.uq.edu.au/atb/index.py>), с использованием алгоритма PM3. Используемые пространственные конформации лигандов, а так же их точное расположение в ортостерическом кармане рецептора в обоих случаях соответствовала рентгено-структурным данным (pdb ids 2y03, 3ny8). На рисунке 6 показаны модели β -2-адренорецептора, в комплексе с полным агонистом изопrenalином (рис.6, справа), а так же обратным агонистом ICI 118,551 (рис.6, слева).

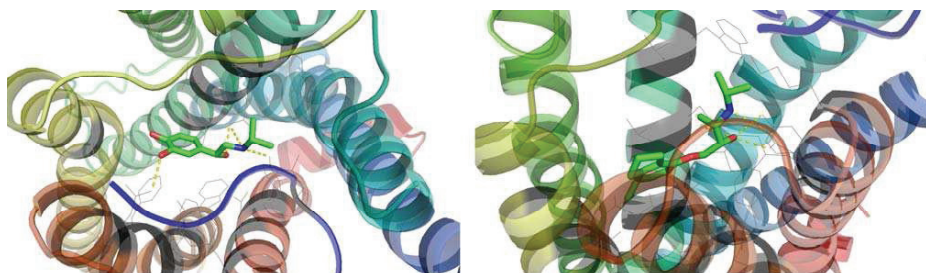


Рис. 6. Молекулярные комплексы β -2-адренорецептора с полным агонистом изопреналином (слева), а так же обратным агонистом ICI 118,551 (справа). Пространственная конформация рецептора показана в виде ленточной модели, а аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные во взаимодействие с лигандами,- в виде палочек. Водородные связи между полярными остатками лигандов, а так же рецептора показаны в виде прерывистых линий.

Созданные нами системы (Рис. 6) были минимизированы, после чего было проведено их уравнивание в изобарно-изотермическом (NPT) ансамбле в два этапа: с наложением гармонических ограничений на все атомы рецептора (длительность моделирования 1 нс), а так же только на атомы его главного остова (длительность моделирования 5 нс). Визуализация полученных комплексов выявила образование гибких водородных связей между гидроксильными группами, расположенными на ароматическом кольце полного агониста, а так же остатками рецептора Asn-293, Ser-203 и Ser-204. С другой стороны, было установлено образование более устойчивых водородных связей между амино-, а так же гидроксильной группой обоих лигандов, расположенных на их “хвосте”, а так же остатков рецептора Asn-312 и Asp-113. Эти нековалентные взаимодействия наблюдались экспериментально в комплексах β -адренорецептора с различными агонистами. После этого методом EDS для трёх систем производился расчет траекторий МД длительностью 100 нс. Моделирование проводилось с теми же параметрами, что использовались нами при симуляции аденозинового рецептора (табл.1).

Результаты и их обсуждение.

Исследование конформационной подвижности родопсин-подобных рецепторов методом анализа главных компонент.

Целью этого этапа исследований было построение диаграмм, характеризующих функционально-значимые движения родопсин-подобных рецепторов, одновременно по нескольким биологически-значимым степеням свободы. На первом шаге методом главных компонент исследовалась структурная динамика зрительного рецептора родопсина, на основании выборки его кристаллографических структур. С этой целью, мы решили проанализировать все существующие структуры родопсина и попытаться отдельно выделить сразу несколько типов конформационных движений, имеющих возможное биологическое значение. Для экспериментальной выборки пространственных структур родопсина (20 структур) был произведен расчет матрицы ковариаций, используя координаты C- α атомов в качестве исходных данных. Диагонализация этой матрицы позволяет получить представления о наиболее коллективных и крупномасштабных движениях, наблюдаемых по отдельным главным компонентам при сравнении структур из каждой выборки (Рис.7).

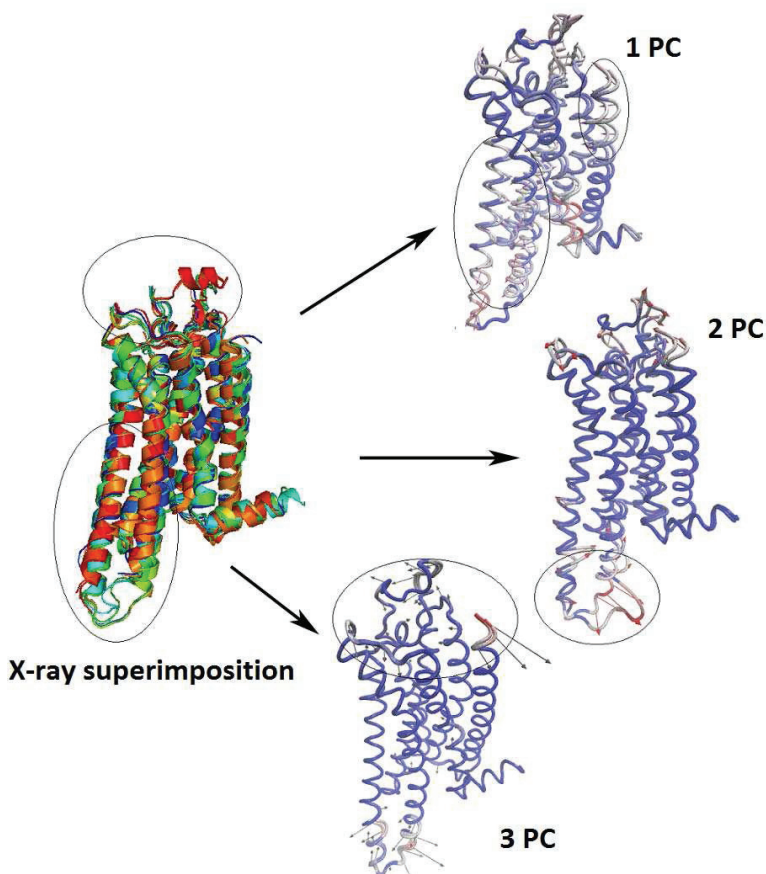


Рис. 7. Исследование структурной динамики рецептора методом главных компонент, на основании кристаллографической выборки этого белка. Диагонализация матрицы ковариаций приводит к расчету ортонормированного базиса собственных векторов вдоль которых можно наблюдать биологически-значимые движения макромолекулы.

В конечном счете, ансамбль структур фоторецептора был спроецирован на плоскость первых двух низкочастотных мод (Рис. 8). На этой проекции, структуры фоторецептора группируются в соответствии с биологически-значимыми признаками: подвижности цитоплазматических сегментов V и VI спиралей по первой моде, а так же третьей внутриклеточной петли - по второй. При этом, значения на осях соответствуют среднеквадратичному отклонению,

рассчитанному при пространственной суперимпозиции всех C- α атомов каждой из структур. Это позволяет классифицировать ансамбль пространственных структур одновременно по двум биологически-значимым модам движений.

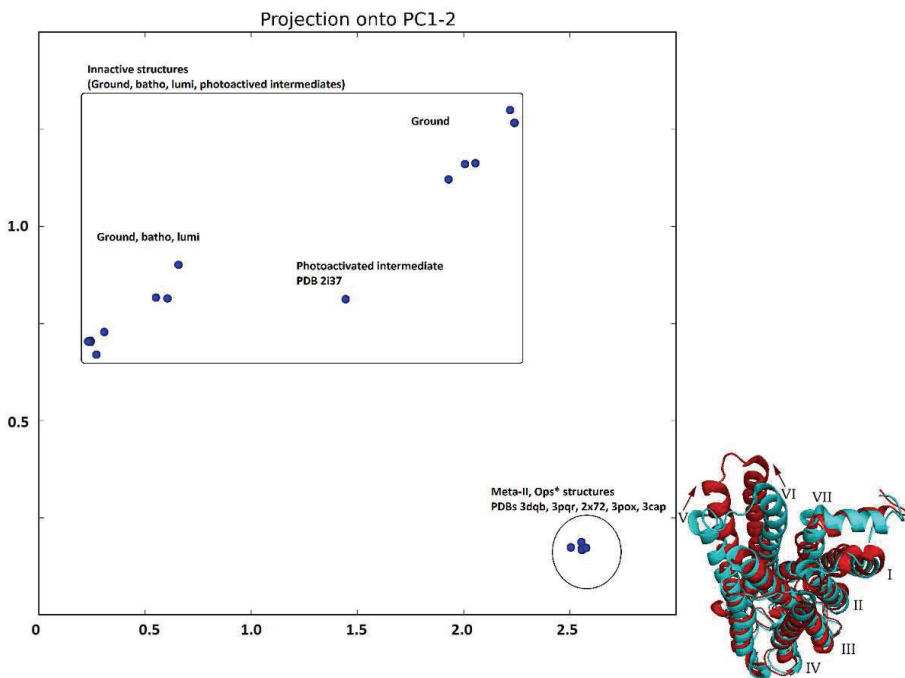


Рис. 8. Результаты PCA анализа 20 кристаллографических структур родопсина млекопитающих. Показана проекция ансамбля исследуемых структур на две главные компоненты. Согласно полученному распределению, первая ГК кластеризует все неактивные (более широкое распределение- в левой и средней части графика), а так же активные (Мета-ii, Опсины) структуры на две отдельные группы. По второй ГК прослеживается дальнейшая дифференцировка исследуемых структур на уровне 1 кластера, по степени движения внутриклеточных петель.

В результате, по первой главной компоненте структуры родопсина (синие точки на графике рис.8) группировались в соответствии с наиболее крупномасштабными движениями V и IV ТМ спиралей фоторецептора. Иными словами, по первой ГК можно было выделить все активные (соответствующие

meta-ii конформации) структуры фоторецептора, относительно неактивных (темновых) форм. По второй главной компоненте, наблюдалось более тонкое распределение в рамках кластера инактивированных структур. Таким образом, по ГК-2 структуры группировались, в соответствии с движением внутриклеточных петель (в особенности 3 ВНП) фоторецептора. Анализ кристаллографических структур, соответствующих фотоактивированному состоянию родопсина (структуры pdb ids 2x72, 3dqb, 3pqg) показал, что именно цитоплазматический участок 3 ВНП непосредственно контактирует с С-концевым сегментом трансдуцина. Таким образом, структурная динамика этого участка, наблюдаемая по ГК 2, может быть непосредственно связана с инициацией связывания G-белка.

На следующем шаге проводилось сравнительное исследование пространственных структур трёх гормон-активируемых рецепторов: двух классов β -адренергических, а так же аденозинового A_{2A} рецепторов. Для этого, было проведено множественное пространственное выравнивание всех исходных 48 кристаллографических структур мембранных рецепторов, относительно “неактивной” структуры родопсина (pdb id 1gzm). Результаты данного расчета показали, что гормон-активируемые рецепторы из трёх исследуемых выборок, а так же фоторецептор родопсин, обладают очень схожей пространственной архитектурой их 7-ТМ α -спиральных пучков ($СКО \leq 2.5 \text{ \AA}$). На рисунке 9 представлен результат пространственной суперпозиции, на примере четырех кристаллографических структур, соответствующих неактивным конформациям каждого из исследуемых рецепторов.

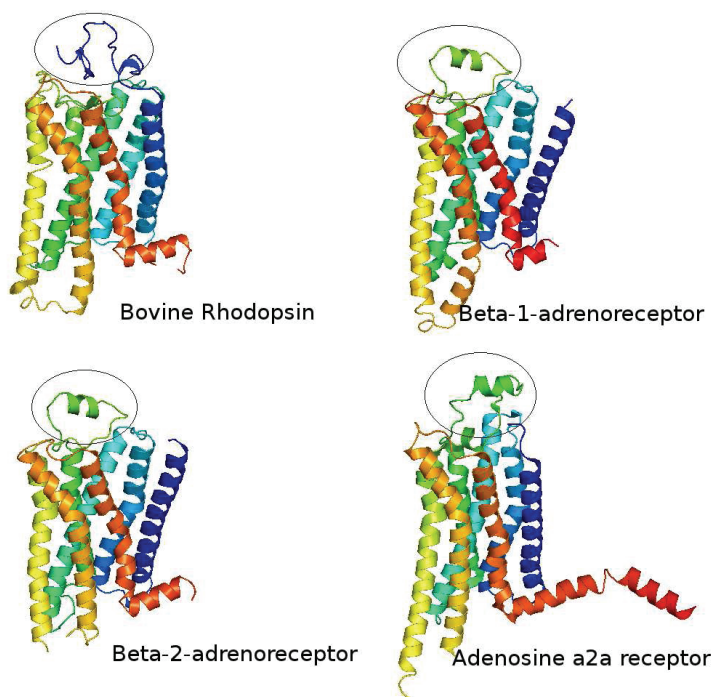


Рис. 9. Сравнение пространственных укладок фоторецептора родопсина, а так же трёх гормон-активируемых GPCR. Из рисунка видно, что общая топология укладки ТМ пучка практически идентична для всех четырёх белков, при низком сходстве по их аминокислотным последовательностям (~40% для ТМ сегментов).

Из рисунка 9 видно, что основные структурные отличия в родопсин-подобных рецепторах проявляются главным образом на уровне организации их внеклеточных петель. Эти структурно гибкие сегменты образуют в лиганд-активируемых рецепторах "воротный участок", ответственный за доступ в ортостерический карман. Кроме того, для среднего участка второй внеклеточной петли лиганд-активируемых рецепторов характерна конформация α -спирали. Наконец, повышенная динамика внеклеточной области первой и третьей спиралей, а так же отсутствующий N-концевой сегмент во всех данных структурах, также свидетельствуют о повышенной гибкости внеклеточного сегмента этих белков в целом. В функциональном плане, подобная структурная

гибкость обеспечивает обратимую диффузию лиганда из внеклеточного пространства в область ортостерического кармана [60]. С другой стороны, в случае родопсина, его внеклеточный участок, напротив, особенно плотно упакован, препятствуя диффузии ретиналя во внеклеточное пространство. В структурном плане данный участок фоторецептора состоит из двух β -шпилек (выделено кружком на рис.9), одна из которых образована на длинном N-концевом участке данного белка, а вторая- из его второй внеклеточной петли. Пространственное сближение обеих β -шпилек приводит к образованию мотива β -сэндвича, еще сильнее стабилизирующего внеклеточную область рецептора. Совокупность подобных структурных отличий накладывает непосредственный отпечаток на функционально-значимое динамическое поведение 7-ТМ рецепторов, наблюдаемое *in vivo*. Считается, что фотоактивация родопсина носит более линейный характер (прямой переход из неактивного подсостояния в фотоактивированное, через ряд последовательных фотоинтермедиатов), по сравнению с более динамическим поведением (возможности сигнализации по нескольким альтернативным каскадам) лиганд-активируемых рецепторов [61]. Именно, в последнем случае было показано наличие нескольких биологически-значимых активных конформаций данных белков [38, 62]. Стабилизация одного из данных подсостояний, за счет связывания специфического лиганда, в итоге приводит к активации различных G-белков. В этой связи, пространственная структура гормон-активируемых рецепторов в большей степени нуждается в повышенной структурной гибкости, для быстрой адаптации к внешним факторам (связыванию различных лигандов), а так же последующей инициации структурных изменений внутриклеточной области.

На следующем этапе для каждого из исследованных нами рецепторов был произведен расчет матрицы ковариаций, используя координаты C- α атомов, взятых из их пространственных структур, в качестве исходных данных. Таблица 2 содержит основные сведения о первых трёх низкочастотных модах (главных компонентах), в частности об их вкладе в структурную изменчивость, а так же степень коллективности (показатель кооперативности структурных

движений). Из представленных данных очевидно, что первая ГК дает представления о наиболее крупномасштабных движениях исследуемых белков. Эти движения наиболее высокоамплитудны в случае β -2-адренорецептора и наиболее коллективны (т.е. включают согласованные флуктуации большого числа аминокислот) в случае родопсина. С другой стороны, движения по ГК-3 носят более локальный характер (более низкая изменчивость соответствует низкоамплитудным движениям), при высокой степени коллективности.

Табл. 2. Основные свойства низкочастотных мод (1-3 главных компонент, ГК) четырех исследованных выборок рецепторов. Показаны результаты общей изменчивости (Изм., в %), а так же степени коллективности для каждой главной компоненты.

ГК	Родопсин (20 структур)		β -1-адренорецептор (10 структур)		Аденозиновый A_{2A} рец. (11 структур)		β -2 адренорецептор (8 структур)	
	Изм. %	Кол.	Изм. %	Кол.	Изм. %	Кол.	Изм. %	Кол.
1	63.90	0.34	63.33	0.12	62.44	0.22	89.49	0.21
2	24.45	0.08	19.86	0.37	33.87	0.21	6.70	0.20
3	3.31	0.56	8.14	0.44	8.70	0.44	3.78	0.36

Примечательно, что из трёх исследованных рецепторов, коллективность подвижности внеклеточных петель была максимальна в случае родопсина (табл. 2). В функциональном плане, подвижность этой области фоторецептора наименее значима, по сравнению с гормон-активируемыми рецепторами, в которых за счет динамики внеклеточных петель достигается избирательное связывание этих белков с различными лигандами. Это наблюдение согласуется с величиной изменчивости (Табл.2) для каждой из исследуемых выборок рецепторов, которая максимальна в случае аденозинового рецептора и минимальна в родопсине. С другой стороны, высокая степень коллективности

движений внутриклеточной области различных рецепторов может быть консервативным свойством пространственной архитектуры этого участка.

На следующем шаге, экспериментальные выборки исследуемых рецепторов были спроецированы на плоскость первой и третьей главных компонент. Используя проекцию родопсина в качестве контроля, были получены аналогичные проекции для трёх гормон-активируемых GPCR. Выбор этих белков был сделан на основании того, что для двух из них (β -2-адренорецептора, а так же аденозинового рецептора) совсем недавно появились новые экспериментальные структуры, соответствующие активной форме. Кроме того, существовали литературные данные, согласно которым некоторые активные структуры данных белков являлись, в действительности, их частично-активированными формами [63]. В пользу этого свидетельствовали различия в отклонении отдельных ТМ спиралей, наблюдаемые в этих структурах. В качестве примера, можно привести структуры аденозинового A2A рецептора, полученные в комплексе с различными агонистами (pdb ids 3qak, 2ydo, 2ydv) [64]. В этих структурах амплитуда движения VI ТМ домена была ниже, по сравнению с фотоактивированным (meta-ii) родопсином. Таким образом, все три структуры были более близки к его meta-i фотоинтермедиату. Схожую закономерность ранее удалось выявить и для некоторых структур β -2ар. Например, при анализе структуры (pdb id 3pds), полученной в комплексе с полным агонистом, не были найдены значимые движения отдельных ТМ доменов, относительно неактивной формы данного белка (например, pdb id 2rh1) [65]. С другой стороны, в двух последних структурах β -2ар (pdb ids 3p0g, 3sn6), закристаллизованных в тройственном комплексе с агонистом и с G-белком (либо имитирующим его фрагментом антитела), напротив удалось наблюдать значительные отклонения V и VI ТМ домена (12-14 Å) , относительно его неактивных структур [66]. Наконец, экспериментальная выборка структур β -1-адренорецептора (β -1ар) также представляла отдельный интерес. Согласно литературным данным, часть этих структур, закристаллизованных в неактивной конформации (например, pdb ids 2y00-

2y04), в действительности была получена в частично-активной форме, по сравнению с более новыми структурами этого же рецептора [67, 68]. При этом, две последних структуры β -1ар (pdb ids 2ycw и 2ysx) в большей степени соответствовали темновому состоянию родопсина, в то время, как более старые структуры данного белка имели большее структурное сходство с его мета-фотоинтермедиатом (например, pdb id 2i37). Существование частично-активных структур гормон-активируемых GPCR могло являться следствием конститутивной активности (наличием определенной доли активированных апо рецепторов) данных белков, отсутствующей в случае родопсина [69]. На рисунке 10 показаны проекции кристаллографических выборок родопсина и β -1-адренорецептора, на плоскость первой и третьей главных компонент.

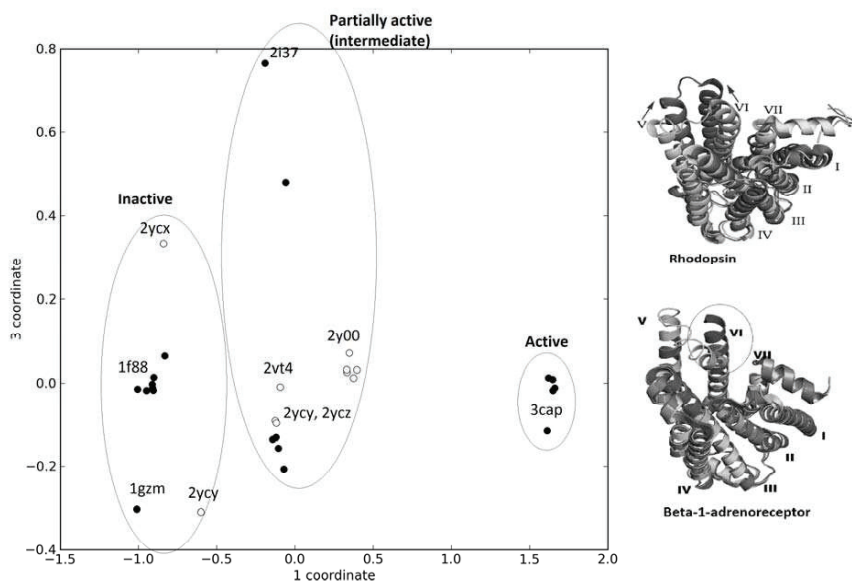


Рис. 10. Проекция кристаллографических структур родопсина млекопитающих (черные точки), а так же β -1-адренорецептора (белые точки) на плоскость первой и третьей главных компонент (на рисунке обозначены как 1 coordinate и 3 coordinate, соответственно). Справа в виде ленточных моделей показано сравнение конформационной подвижности внутриклеточной области бета-1-адренорецептора (внизу), а так же фоторецептора родопсина (сверху).

Из рисунка видно, что контрольную выборку родопсина (черные точки) по ГК-1 можно разделить на три кластера: слева- структуры соответствующие неактивной конформации фоторецептора, а справа- его фотоактивированные структуры (meta-ii- подобные). Наконец, структуры среднего кластера соответствуют фотоинтермедиатам (например, структура 2i37). При этом, попавшие в средний кластер структуры фоторецептора могли активировать трансдуцин, в искусственных клеточных системах [70]. Это означало, что конформация структур из правого кластера отражала финальную стадию фотоцикла родопсина, а не его структурные изменения, требуемые для связывания G-белка. Это так же подтверждается тем фактом, что конформация структур meta-ii (pdb id 3pqr) идентична (СКО < 0.5 Å) структурам конститутивно активных опсинов (pdb id 2x72), попавших с ними в общий кластер. Белые точки на рисунке 10 соответствуют структурам из экспериментальной выборки β -1ar. На полученной проекции видно, что по первой ГК эти структуры группируются в два кластера: в один из которых попали темновые структуры родопсина (левый кластер), а во второй- его фотоинтермедиатные формы (средний кластер). Полученное распределение для β -1-адренорецептора хорошо согласуется с литературными данными некоторых пространственных структур данного белка, в частности с pdb кодами 2усу, 2усw, 2усх, 2усz [67]. В цитируемой работе было показано, что две из этих структур (pdb ids 2усw и 2усх) были закристаллизованы в неактивной форме. Это подтверждалось наличием специфических полярных контактов (ионных замков), ограничивающих движения V и VI ТМ доменов рецептора. Наряду с этим, в двух других структурах (pdb ids 2усу и 2усz) данные внутримолекулярные взаимодействия, напротив, отсутствовали. Это, в свою очередь, приводило к отклонению цитоплазматических концов V и VI ТМ спиралей. Таким образом, обе данные структуры могли быть частично активными, несмотря на присутствие антагонистов в комплексе вместе с ними. Наконец, в более ранних структурах β -1ar, закристаллизованных так же в комплексах с агонистами, подобные стабилизирующие ионные замки так же

отсутствовали [71]. Это указывало на то, что эти структуры (pdb ids 2y00-2y04) могли быть также частично активными. Последнее подтверждается характером распределения этих структур, установленное на полученной диаграмме (рис. 10). На этой проекции большинство структур β -1ар находятся в среднем кластере вместе с фотоинтермедиатами родопсина, и лишь две структуры (pdb ids 2yucw и 2yux) попали в левый кластер, совместно с его темновыми формами. Важно, что при помощи парного сравнения экспериментальных структур достаточно сложно прийти к подобным выводам. Например, различия между двумя структурами родопсина, которые были взяты из левого и среднего кластеров, - очень незначительны ($\text{CKO} < 1.0 \text{ \AA}$, рис.8, слева). Наряду с этим, отличия во внутриклеточной области V и VI ТМ доменов в двух структурах β -1ар, которые были так же взяты из среднего и левого кластеров, - гораздо более выражены. При этом, усредненное значение $\langle \text{CKO} \rangle$ между этими структурами так же не превышает $1 \text{ \AA}$ (рис. 10, справа). Наконец, в случае β -1ар, по третьей главной компоненте (ГК 3) была выявлена более локальная динамика внеклеточной области данного белка. В частности, при сравнении этих структур были выявлены различия, на уровне $1\text{-}1.5 \text{ \AA}$ во второй и третьей внеклеточных петлях. Функциональная значимость движений внеклеточных участков гормон-активируемых рецепторов обусловлена тем, что эта область ответственна за первичное связывание молекулы лиганда [60, 72]. С другой стороны, в случае родопсина, обладающего более жесткой пространственной укладкой данной области, движения по третьей ГК были гораздо менее амплитудными. При этом, динамика в данной области фоторецептора носила более коллективный характер (синхронное движения одновременно всех петель), по сравнению с адренорецепторами (выраженного движения второй петли). Стоит отметить, что для более детального исследования структурных движений внеклеточных петель 7-ТМ рецепторов, требуется большее количество их экспериментальных структур, полученных с различными лигандами. С другой стороны, траектории молекулярной динамики могут быть так же полезны для проведения подобных исследований. На рисунке 11

показаны полученные распределения для кристаллографических структур β -2-адренорецептора (β -2ар), а так же родопсина (черные точки).

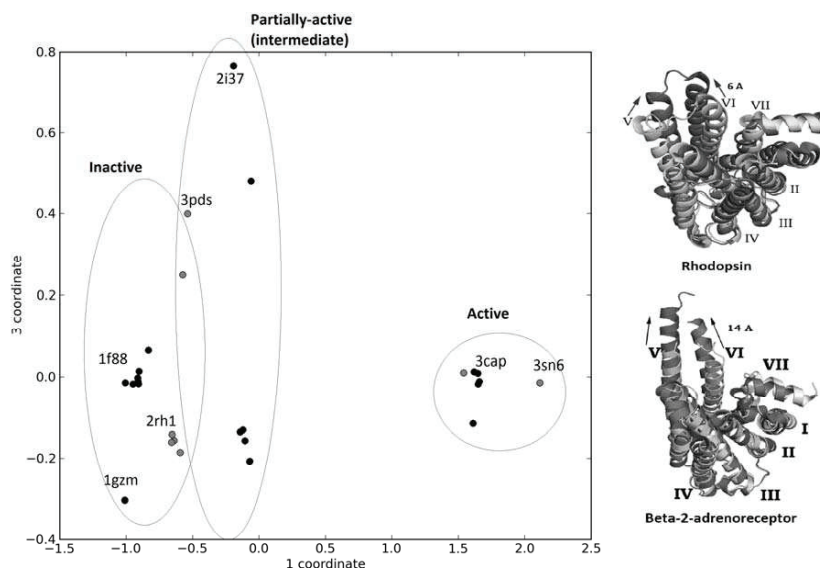


Рис. 11. Проекция кристаллографических структур родопсина млекопитающих (черные точки), а так же β -2-адренорецептора (серые точки) на плоскость первой и третьей главных компонент (на рисунке обозначены как 1 coordinate и 3 coordinate, соответственно). Числовые значения по осям соответствуют модулю среднеквадратичного отклонения в ангстремах. Справа в виде ленточных моделей показано сравнение конформационной подвижности внутриклеточной области бета-2-адренорецептора (внизу), а так же фоторецептора родопсина (сверху).

При анализе данной диаграммы видно, что большинство экспериментальных структур β -2ар по ГК-1 группируется между первым и вторым кластером родопсиновых структур. Это указывает на конформационное сходство этих структур, несмотря на присутствие различных лигандов в их комплексах. Тем не менее, промежуточное расположение данных структур, относительно распределения родопсина, может свидетельствовать так же о том, что некоторые из данных структур могут быть частично активными. Это предположение нашло подтверждение в литературе [65, 73]. В цитируемых

работах было показано отсутствие ионных замков между высококонсервативными остатками (мотив DRY) в структурах адренорецепторов, закристаллизованных с различными антагонистами. Наконец, две структуры β -2ар, попавшие в правый кластер на рисунке 25, соответствуют активным формам данного рецептора (pdb ids 3p0g, 3sn6). В этих структурах, белок был закристаллизован в тройственных комплексах, включающих помимо рецептора молекулу агониста и специфического G-белка (либо его аналога) [66]. При сравнительном анализе конформационной динамики, наблюдаемой в структурах β -2ар, было установлено, что отклонение VI спирали в последнем случае, было гораздо более выражено, по сравнению с фотоактивированным родопсином (рис.11 справа). На диаграмме рисунка 11 видно, что одна из структур β -2ар, закристаллизованная в комплексе с G-белком, (pdb id 3sn6) существенно расширяет правый кластер по первой главной компоненте. Наконец, при анализе полученного распределения структур β -2ар было установлено, что дисперсия по ГК-3 была непосредственно связана с более локальной динамикой, на уровне отдельных внеклеточных петель этого белка. Общая закономерность подобных движений, была сходна с β -1ар. Обращает внимание, что структура 3pds, полученная в комплексе с полным агонистом в неактивной конформации (из-за отсутствия G-белка), по ГК-3 группируется отдельно, относительно прочих неактивных структур этого белка, закристаллизованных с антагонистами (Рис. 11). Это свидетельствует о конформационных различиях во внеклеточных петлях β -2-адренорецептора (в частности, второй и третьей петлей), в зависимости от присутствия различных лигандов в ортостерическом кармане. Наряду с этим, в двух “активных” структурах β -2-адренорецептора, подобный широкий разброс по ГК-3, напротив, отсутствует, как и в случае активных структур родопсина. Последнее может свидетельствовать о сниженной подвижности внеклеточной области активированных форм 7-ТМ рецепторов, по сравнению с их интермедиатными структурами. В пользу этого, так же свидетельствует наибольшая ширина среднего кластера интермедиатных структур, наблюдаемая

во всех экспериментальных выборках. Таким образом, по степени движений отдельных внеклеточных петель так же можно судить о степени активности рецептора. Схожие закономерности так же были получены для третьей исследуемой выборки пространственных структур аденозинового рецептора. В последнем случае так же наблюдался более широкий разброс экспериментальных структур в рамках кластера неактивных форм, свидетельствуя о повышенной конформационной гибкости внеклеточного сегмента лиганд-активируемых рецепторов в неактивном подсостоянии. В заключении хотелось бы отметить, что несмотря на ряд установленных закономерностей, относительно небольшое количество пространственных структур в каждой из экспериментальных выборок рецепторов не позволяет делать статистически-значимых выводов, относительно полученных картин распределения. В связи с этим в двух последующих главах была проведена серия вычислительных экспериментов, результаты которых сравнивались с полученными на первом этапе распределениями.

Исследование конформационной подвижности аденозинового рецептора в окружении липиды-вода методом “управляемой” молекулярной динамики.

В рамках этого этапа была проведена серия вычислительных экспериментов, направленных на исследование особенностей процесса конститутивной активности аденозинового рецептора. Несмотря на то, что экспериментально удалось детектировать явление лиганд-независимой активации многих 7-ТМ рецепторов, до настоящего времени отсутствуют какие-либо предпосылки структурных механизмов, лежащих в основе этого явления, а так же до конца неясна его биологическая значимость. Для проведения этого исследования моделирование аденозинового рецептора проводилось в двух различных режимах, доступных в протоколе Essential Dynamics Sampling. На первом этапе был произведен расчет траектории МД для апо формы аденозинового рецептора в режиме направленного

моделирования. В этом случае, начиная от конформации аденозинового рецептора, соответствующей его неактивному подсостоянию (pdb id 3eml), была явно задана конечная точка моделирования, соответствующая конформации этого белка, наблюдаемой в его кристаллографической структуре в комплексе с полным агонистом (pdb id 3qak). Анализ полученной траектории показал, что уже спустя 500 пикосекунд система достигала заданной точки. На рисунке 12 представлена проекция полученной траектории на первый и третий собственные вектора (ГК 1 и 3), рассчитанные для ансамбля кристаллографической выборки аденозинового рецептора методом главных компонент. Из этого рисунка видно, что к концу направленной симуляции (бирюзовый квадрат на рис. 12) рецептор попадал в область своего конформационного пространства, которая соответствовала его частично-активному подсостоянию. На рисунке 12 справа представлена пространственная суперпозиция двух структур аденозинового рецептора, соответствующих исходной (показана светлым цветом), а так же конечной (показана красным) точкам направленного моделирования. Из этого рисунка видно, что общий характер внутримолекулярных движений, наблюдаемых на траектории МД, полностью соответствовал подвижности этого белка, наблюдаемой при сравнении его экспериментальных структур. В частности, на полученной траектории МД удалось наблюдать движение цитоплазматических участков V и VI спиралей рецептора, по направлению от плоскости 7-ТМ пучка (выделено в кружок). Кроме того, обращает внимание деспирализация цитоплазматического участка VI спирали рецептора.

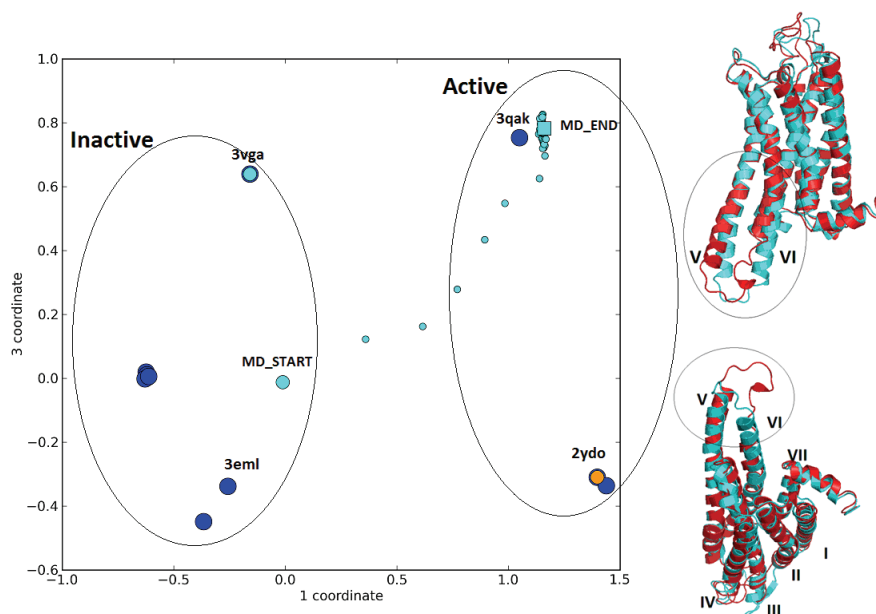


Рис. 12. Суперпозиция проекции снимков направленной МД, а так же результатов проекции кристаллографических структур A_{2A} рецептора на две главные компоненты (ГК 1 и 3) кристаллографической выборки данного белка. Крупные точки соответствуют экспериментальным структурам рецептора, а светлые точки- снимкам МД, сделанным, на протяжении траектории направленной МД, с интервалом в 10 пс. Справа в виде ленточной модели показана пространственная суперимпозиция со стороны внеклеточного (сверху) и внутриклеточного пространства (справа) двух конформаций рецептора, наблюдаемых в начале (светлым), а так же конце (темным) направленного моделирования.

Схожее структурное поведение наблюдалось нами ранее при моделировании аденозинового рецептора методом равновесной МД, а так же при моделировании β -2-адренорецептора методом управляемой МД. В последнем случае, на траектории наблюдалась обратимая деспирализация шестой α -спирали рецептора, при его движении в активную конформацию. Стоит отметить, что во всех кристаллографических структурах, соответствующих частично-активной форме данного белка (pdb id 3qak, 2ydo, 2ydv), данный

участок так же был частично в неупорядоченной форме, либо вовсе отсутствовал в экспериментальной структуре, в связи с его низкой электронной плотностью. Это свидетельствует о повышенной структурной гибкости цитоплазматической области VI ТМД в аденозиновом рецепторе. В функциональном плане, подобная конформационная гибкость рецептора может быть связана с его возможностью взаимодействия с различными G-белками. Подобная взаимосвязь между конформационной лабильностью белка в специфических областях и возможностью его взаимодействия с другими белками хорошо известна и для водорастворимых белков [74-76]. При этом, общий характер структурной подвижности цитоплазматической области рецептора имеет сходство с аналогичным явлением, наблюдаемым в случае белков, лишенных пространственной структуры (Intrinsic Unstructured Proteins, IUP) [22]. Обратимая дестабилизация отдельных элементов вторичной структуры, расположенных в наиболее конформационно подвижных областях, известна так же во многих ферментах и моторных белках [77, 78]. Одно из подобных явлений, получившее название конформационного крэкинга, связано с преодолением высоких потенциальных барьеров, при переходе белка из одной конформации в другую [79]. В качестве другого схожего явления выступает механизм “fly-casting”, в рамках которого дестабилизация отдельных участков белка связана с его специфичностью, по отношению к широкому спектру партнеров [80]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что в мембранных рецепторах скорее всего действует комбинация обоих механизмов. На следующем шаге проводился расчет траектории управляемой МД для апо формы аденозинового рецептора, в режиме свободного моделирования. В рамках этой системы, рецептору позволялось свободно перемещаться по заданному конформационному подпространству. На рисунке 13 показана проекция траектории МД на первую и третью главные компоненты (ГК 1 и 3), рассчитанные для выборки экспериментальных структур аденозинового рецептора. Анализ подобных графиков позволяет проследить за “движением” рецептора в его конформационном пространстве, используя рентгеновские

структуры этого белка в качестве “реперных точек”. Из рисунка видно, что на траектории МД (зеленые точки) наблюдалось движение аденозинового рецептора из неактивного (левый кластер экспериментальных структур), по направлению к частично-активированному состоянию (правый кластер). Это явление носило спонтанный характер, в силу отсутствия каких-либо внешних факторов, стимулирующих переход рецептора в активное подсостояние. Детальный анализ полученной проекции выявил характерное би-модальное распределение конформеров аденозинового рецептора, на протяжении рассчитанной траектории. На рис. 13 справа показана плотность конформеров на единицу подпространства, образованного первой главной компонентой (проекция траектории на эту ГК).

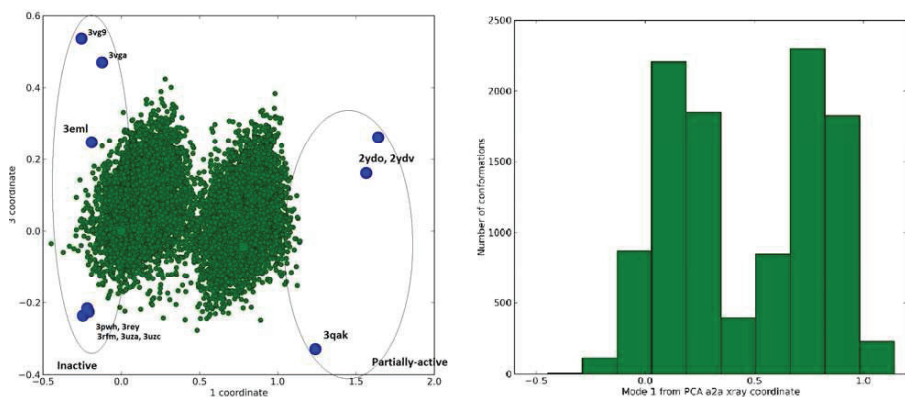


Рис. 13. Слева- суперпозиция проекции снимков управляемой МД (режим exploring), а так же результатов проекции кристаллографических структур A_{2A} рецептора на первую и третью главные компоненты (ГК 1 и 3). Крупные точки соответствуют экспериментальным структурам рецептора, а совокупность мелких точек- снимкам МД, сделанным на протяжении рассчитанной траектории с интервалом в 10 пикосекунд. Справа- проекция снимков этой же траектории на плоскость первой главной компоненты, соответствующей наиболее крупномасштабным движениям аденозинового рецептора в распределении его структур.

Из этого рисунка очевидно существование двух наиболее устойчивых подсостояний аденозинового рецептора, наблюдаемых на траектории МД. При этом, первое подсостояние (левый кластер конформеров), соответствует

конформации аденозинового рецептора, наблюдаемой в его кристаллографических структурах (например, 3eml). С другой стороны, конформеры из правого кластера в структурном плане были более близки к частично-активным структурам (3qak) аденозинового рецептора. Полученная картина распределения свидетельствует о том, что общий характер подвижности рецептора, наблюдаемой на траектории МД, соответствует диффузии между отдельными конформационными кластерами (наиболее устойчивыми подсостояниями белка). Подобное спонтанное ‘движение’ рецептора между его отдельными подсостояниями находится в соответствии с концепцией Моно Уаймена и Шанже, свидетельствуя скорее в пользу предсуществующего ансамбля конформеров апо рецептора, по сравнению с индуцированным соответствием [8]. На рисунке 14 показано сравнение двух графиков усредненных среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) для каждого аминокислотного остатка рецептора, в случае его экспериментальной выборки (показано синим цветом, PCA), а так же траектории МД (показано зеленым цветом, EDA).

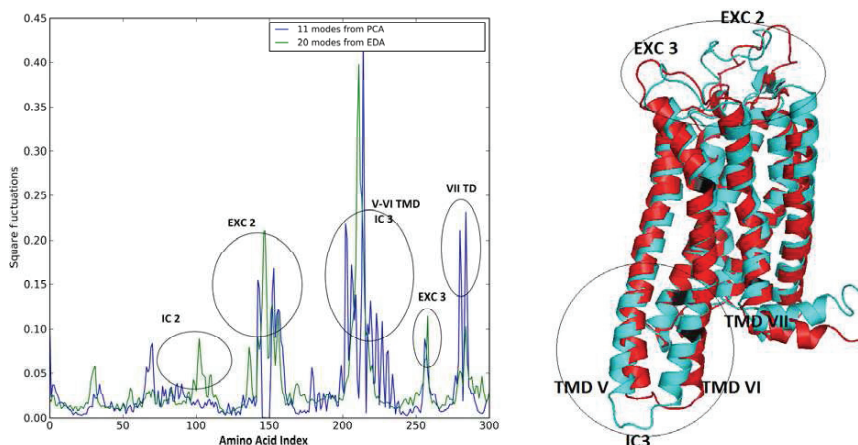


Рис. 14. Сравнение графиков усредненных среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) для каждого аминокислотного остатка рецептора, в случае его экспериментальной выборки (темным цветом, обозначено как PCA), а так же моделирования направленной МД в режиме exploring (светлым цветом, показано как EDA).

В обоих случаях, максимумы графиков соответствуют аминокислотным остаткам с наиболее выраженной структурной подвижностью. Из правой части рисунка 14 видно, что наиболее выраженная подвижность была характерна для аминокислотных остатков, расположенных в интервалах 100-120 (вторая внутриклеточная петля, IC-2) и 150-170 (вторая внеклеточная петля, EXC 2). Наиболее же выраженные флуктуации наблюдались в области аминокислот 200-240, соответствующей цитоплазматическим участкам V и VI ТМ спиралей рецептора, а так же третьей внутриклеточной петли (IC 3). Наконец, менее выраженная подвижность наблюдались в области третьей внеклеточной петли (EXC 3), а так же цитоплазматического конца VII спирали (VII TMD). Из рисунка 14 очевидно, что повышенная структурная гибкость в некоторых участках аденозинового рецептора, установленная нами при сравнении его экспериментальных структур, в целом соответствуют аналогичному явлению, наблюдаемому на траектории МД. В последнем случае колебания второй внутриклеточной петли были выражены сильнее, а динамика на уровне VII ТМД, напротив, была менее выражена, по сравнению с экспериментом. Наконец, на траектории МД, смещения на уровне V и VI ТМД наблюдались главным образом на уровне цитоплазматических концов этих спиралей, в то время как для “активных” экспериментальных структур (например, 3qak) было характерно “выпячивание” центральной области VI ТМД. Стоит отметить, что структурные движения аденозинового рецептора, наблюдаемые на траектории направленной МД, сильнее напоминали события, наблюдаемые при сравнении экспериментальных структур β -1 и β -2 адренорецептора и родопсина. Например, в двух недавних структурах β -1 удалось наблюдать характерное “обратное движение” цитоплазматической области VI ТМД [67]. В случае же экспериментальных структур аденозинового рецептора, динамика на уровне цитоплазматических концов его V и IV спиралей была выражена значительно слабее. Это указывало на то, что ни одна из существующих экспериментальных структур этого белка не соответствовала его полностью активной форме. Сравнение пространственных структур показало, что пространство в их

цитоплазматической области было недостаточным для связывания G-белка. Совокупность подобных наблюдений указывает на то, что на траектории МД удалось наблюдать спонтанное движение рецептора, по направлению к одному из его активных подсостояний, детектируемым рентгеноструктурным анализом. На рисунке 15 с двух различных ракурсов показана пространственная суперпозиция двух структур, соответствующих начальной фазе моделирования, а так же моменту, соответствующему конечному моменту симуляции.

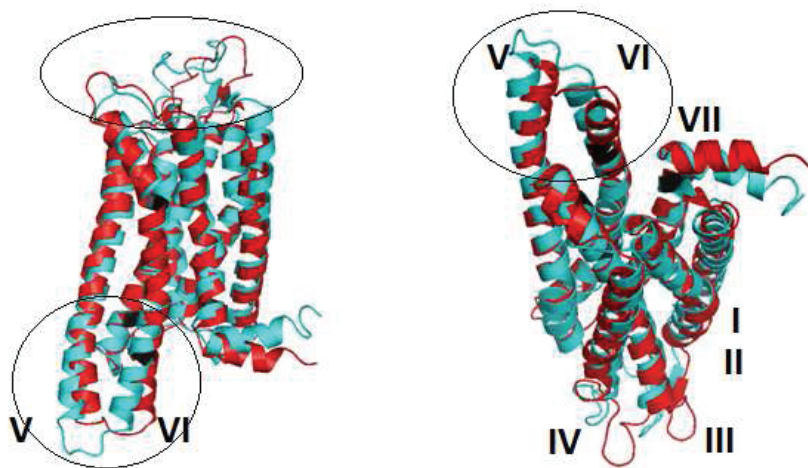


Рис. 15. Пространственная суперпозиция начальной (показано светлым цветом), а так же конечной (темным цветом) конформаций A_{2A} рецептора, полученных из траектории МД. В левой части рисунка показано сравнение обеих структур с фронтальной стороны, а в правой- со стороны внутриклеточного пространства.

Из полученной суперпозиции видно небольшое отклонение цитоплазматического участка V спирали вправо, а так же более значительное смещение VI спирали, по направлению к плоскости α -спирального пучка. Схожая по амплитудам и направлениям подвижность цитоплазматических участков V и VI спиралей наблюдалось так же в некоторых структурах β -1-адренорецептора (например, в структурах 2усw и 2усх) [81]. В последнем случае подвижность внутриклеточного участка VI ТМД была связана с

необычной конформацией ионного замка (солевого мостика между остатками Arg и Glu из III и VI спиралей рецептора), наблюдаемой только в этих экспериментальных структурах [81]. Совокупность этих данных свидетельствует о повышенной структурной гибкости цитоплазматических областей V и VI ТМ спиралей гормон-активируемых рецепторов, наблюдаемой в этих белках в отсутствии каких-либо внешних факторов. Таким образом, наблюдаемая нами повышенная конформационная гибкость цитоплазматической области рецептора, функционально необходимая для осуществления специфического связывания различных трансдьюсеров, является естественным свойством пространственной архитектуры этих белков. Отталкиваясь от результатов вышецитируемой работы, мы решили попытаться установить возможную взаимосвязь между движениями цитоплазматических концов отдельных α -спиралей аденозинового рецептора с динамикой его отдельных “микро-переключателей”. Для этого по рассчитанной нами траектории был произведен расчет эволюции для ротамерной изомеризации боковой группы остатка Trp-246 (вращения по двугранному углу χ -1, рис. 16), а так же динамики ионного замка (расстояния между остатками Arg-102 из III спирали и Glu-228 из VI спирали, рис. 17, слева). Кроме этого, анализировалась динамика расстояния между боковыми группами Arg-102, а так же третьим микро-переключателем, Tyr-288 (рис. 17, справа).

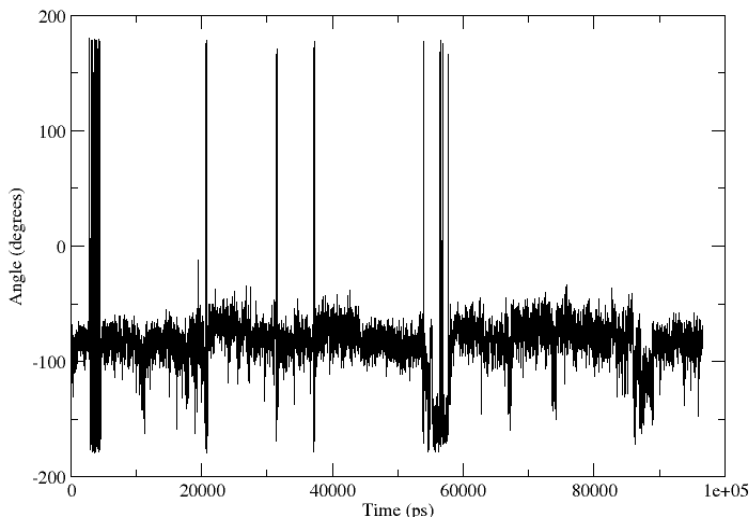


Рис. 16. Подвижность боковой группы остатка Tgr-246, на протяжении рассчитанной траектории направленной МД. Показана зависимость значения двугранного угла $\chi-1$ (в градусах, по оси ординат) боковой группы Tgr-246, от времени симуляции (в пикосекундах, по оси абсцисс).

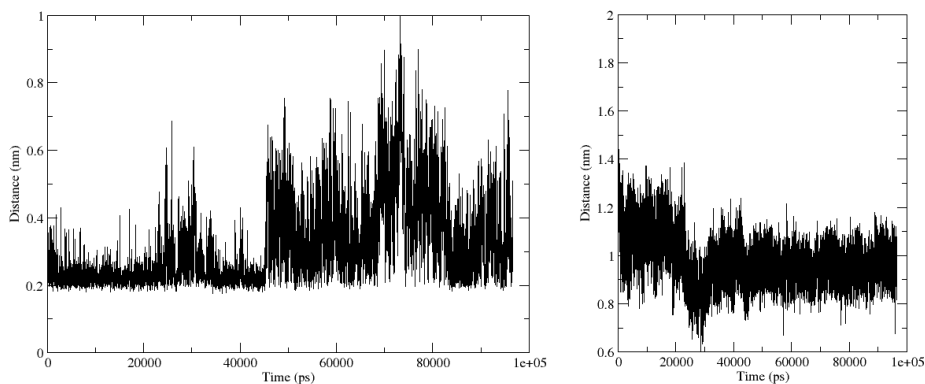


Рис. 17. Слева показана динамика ионного замка (солевой мостик между остатками Arg-102 и Glu-228), а справа- изменение расстояния между боковыми группами Arg-102 и Tgr-288, на протяжении 100нс симуляции направленной МД. В обоих случаях, по оси абсцисс показано время моделирования в пикосекундах, а по оси ординат- расстояние (Distance, в ангстремах) между полярными атомами боковых групп остатков Arg-102 и Glu-228 (слева), а так же Arg-102 и Tgr-288 (справа).

Анализ этих графиков выявил моменты времени, на протяжении которых наблюдались наиболее согласованные структурные изменения в трёх микропереключателях. Прежде всего, была установлена корреляция между структурной динамикой ионного замка, а так же удаленного от этой области ротамерного переключателя (Trp-246). Например, переход (переключение) боковой группы остатка Trp-246 из гош в транс форму, наблюдаемый начиная с 54 наносекунды моделирования, совпадал по времени с наиболее продолжительной дестабилизацией ионного замка (Рис. 18 в центре). Примечательно, что спустя небольшой промежуток времени, боковая группа остатка Trp-246 ре-изомеризовалась в первоначальное (гош) состояние (обратное переключение), а полярная боковая группа Arg-102 остатка образовывала устойчивое катион-π стэкинг взаимодействие с ароматическим радикалом остатка Tyr-288 (Рис. 18, справа).

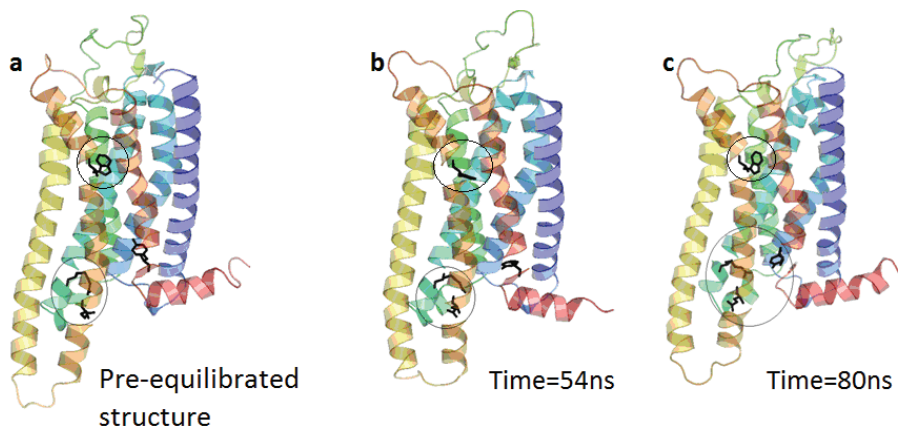


Рис. 18. Динамика микро-переключателей, наблюдаемая на траектории МД. На рисунке а показано исходное состояние рецептора, а на рисунках б и с - его снимки, сделанные по траектории МД в моменты времени 54 и 80 нс, соответственно. Замечательно общее нестабильное поведение ионного замка (выделено в кружок), на протяжении всего моделирование. При этом, в случае б отмечался первый разрыв ионного замка, сопровождающийся так же ротамерной изомеризацией боковой группы остатка Trp-246 из гош в транс форму. Наконец в последнем случае удалось так же наблюдать стабилизацию боковой группы остатка Arg-102 за счет её образования полярного контакта с боковой группой остатка Tyr-288.

Детальный анализ обоих графиков позволил установить корреляцию между динамикой ионного замка, а так же подвижностью боковой группы ротамерного переключателя (Tyr-246). Например, кратковременная изомеризация (переключение) боковой группы остатка Tyr-246 из гош в транс форму, наблюдаемая начиная с 54 наносекунды, совпадала по времени с продолжительной дестабилизацией ионного замка. Примечательно, что спустя небольшой промежуток времени, боковая группа остатка Tyr-246 ре-изомеризовалась в первоначальное (гош) состояние (обратное переключение), а боковая группа Arg-102 образовывала полярное взаимодействие с ароматическим радикалом остатка Tyr-288 (Рис. 19).

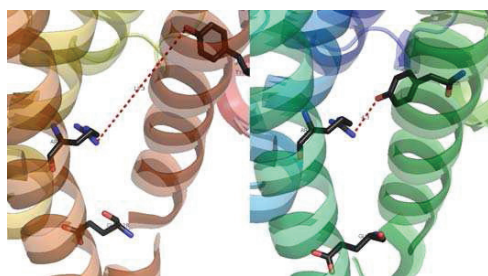


Рис. 19. Стабилизация полярного взаимодействия между боковой группой Arg-102 (III спираль) и Tyr-288 (VII спираль). На рисунке слева показаны ротамерные формы этих остатков в начале, а на рисунке справа- в конце моделирования. Во втором случае образование полярного контакта между боковыми группами Arg-102 и Tyr-288 приводило к стабилизации α -спиралей рецептора в конформации аденозинового рецептора, близкой к его активной форме.

Стоит отметить, что в рамках установленного нами согласованного действия пространственно-удаленных (расстояние порядка 20 ангстрем) микро-переключателей возникает вопрос о механизме их коммутации. Известно, что в районе ортостерической области этих белков обычно присутствует несколько высоко-консервативных фенилаланинов. Ароматические боковые группы этих аминокислот могут играть роль связующего звена (например, посредством π - π стэкинг взаимодействий) между внеклеточной и внутриклеточной областями рецептора. В работе Дрора методом молекулярной динамики было показано,

что наличие этой области выполняет функцию “мягкого сцепления”, придавая пространственной архитектуре рецептора дополнительную гибкость [82]. Наблюдаемое нами сближение боковой группы Туг-288 с боковой группой Arg-102 приводило к образованию полярного контакта между третьей и седьмой спиралями аденозинового рецептора. Это, в свою очередь, стабилизировало специфическую конформацию этого белка, близкую к его частично активным структурам. Кроме этого, экспериментальные данные указывают на то, что на конформационную подвижность этих микропереключателей может влиять связывание различных трансдьюсеров. Например, известно, что боковая группа остатка Glu-228 непосредственно образует полярный контакт с G-белком. Таким образом, трансдьюсер так же может выступать в роли своеобразного аллостерического модулятора, оказывая влияние на динамику внутриклеточной области рецептора. Наряду с этим, пространственно удаленный от этой области ротамерный переключатель (Тгр-246), расположен в районе ортостерического лиганд-связывающего кармана 7-ТМ рецепторов. В этой связи, связывание лиганда может быть одним из внешних факторов, способствующих стабилизации специфической ротамерной формы боковой группы данного остатка. Эти структурные закономерности непосредственно указывают на взаимосвязь между конформационной подвижностью вне- и внутриклеточных сегментов родопсин-подобных рецепторов, подчеркивая аллостерическую природу этих белков. Подобные закономерности, в свою очередь, позволяют объяснить ряд экспериментально установленных фактов. Например, известно, что не только связывание различных лигандов повышает аффинность рецептора к различным G-белкам, но и, напротив, избирательность рецептора к различным лигандам определяется предшествующим связыванием различных трансдьюсеров [83]. Совокупность полученных нами данных указывает на то, что “микропереключатели” в 7-ТМ рецепторах выполняют роль внутреннего регуляторного механизма, ответственного за стабилизацию функционально-значимых подсостояний этих белков.

Исследование влияния связывания лигандов на конформационную динамику β -2-адренорецептора методом “управляемой” молекулярной динамики.

Многочисленные экспериментальные данные указывают на то, что для лиганд-активируемых рецепторов характерно динамичное поведение, обусловленное непрерывным перебором между ансамблем их конформаций [10]. Поскольку энергетические барьеры между различными подсостояниями этих белков достаточно низки, основной движущей силой подобного конформационного перебора являются тепловые флуктуации окружающей среды [84]. Таким образом, структурная гибкость этих белков непосредственно связана с их функциональностью. В соответствии с принципом Ле Шателье, наиболее вероятным механизмом функционирования рецептора является перераспределение его внутренней энергии по предсуществующим конформационным степеням свободы, в ответ на изменение внешних условий [10]. Для проверки этого предположения нами было исследовано влияние присутствия ортостерических лигандов β -2-адренорецептора на его конформационную подвижность. Экспериментальные данные указывают на то, что связывание лигандов должно скорее влиять на предсуществующие степени свободы рецептора, а не являться движущей силой индуцированного соответствия. В этой связи, в рамках проведенных нами вычислительных экспериментов логично было сравнить конформационное поведение рецептора в случае его апо формы, а так же в комплексе с различными лигандами. На рисунке 19 показана проекция рассчитанной траектории МД для системы 1 на плоскость первой и третьей главных компонент основного подпространства.

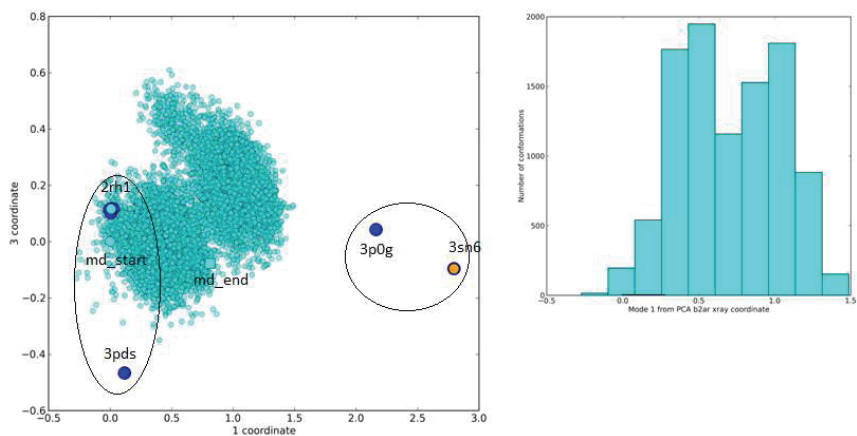


Рис. 19. Слева- проекция снимков траектории МД апо-формы β -2-адренорецептора, а так же кристаллографической выборки этого белка на плоскость основного подпространства (ГК 1 и ГК3). Крупные точки соответствуют экспериментальным структурам β -2-адренорецептора, а совокупность светлых точек- снимкам МД, сделанным с интервалом в 10 пс. Справа- проекция снимков этой же траектории на плоскость первой главной компоненты.

Из этого рисунка видно, что на протяжении 100 наносекунд моделирования для апо β -2-адренорецептора было характерно спонтанное движение, по направлению к его активному подсостоянию (правому кластеру экспериментальных структур). При этом, на проекции траектории МД на плоскость первой главной компоненты наблюдалось би-модальное распределение конформеров рецептора (правая часть рисунка 19), с максимальной плотностью в двух областях его конформационного пространства. При этом, одно из подсостояний структурно соответствовало исходной точке моделирования (кристаллографической структуре pdb id 2rh1), а в другом имелись признаки, характерные для активации родопсин-подобных 7-ТМ рецепторов (смещение VI спирали на 2-2.5 Å). В функциональном плане, конформационная гибкость отдельных α -спиралей лиганд-активируемых рецепторов, сопровождающая переход рецептора из одного подсостояния в другое, может являться необходимым условием обеспечения их

“функциональной избирательности” [7, 9]. Согласно цитируемым работам, различные внешние факторы (например, связывание лигандов) стабилизируют отдельные области предсуществующего конформационного пространства рецептора, меняя форму поверхности его свободной энергии [45]. Таким образом, особенности пространственной архитектуры этих белков предопределяют их функциональное поведение, а внешние факторы приводят к перераспределению энергии по предсуществующим степеням свободы. В этой связи, наблюдаемая *in vivo* конститутивная активность (лиганд-независимый переход рецептора в конформации, активирующие трансдьюссеры) является следствием существования компенсации между конформационной подвижностью этих белков, необходимой для их функционирования по нескольким каскадам, а так же их высокоспецифичностью. В этой связи, рецептор должен обладать тонким балансом между обоими вышеупомянутыми факторами, определяющими его функциональность. Наконец, на уровне клетки, лиганд-независимая (конститутивная) активность рецептора является крайне нежелательным явлением. В подтверждение этого, известно множество заболеваний, связанных с повышенной конститутивной активностью многих 7-ТМ рецепторов [4, 46, 50]. В этом случае, клетка должна выступать в роли своеобразного реостата, регулируя уровень спонтанной активности этих белков, с помощью различных внешних факторов (ортостерических лигандов, аллостерических модуляторов, концентрации электролитов итп). Для исследования влияния ортостерических лигандов на структурные особенности β -2-рецептора было проведено моделирование этого белка в комплексе с полным и обратным агонистом (системы 2 и 3, соответственно). На рисунке 20 красными точками показана проекция полученной траектории МД для рецептора в комплексе с полным агонистом на плоскость первой и третьей ГК. На этом же графике светлые точки соответствуют проекции траектории МД, рассчитанной для апо рецептора.

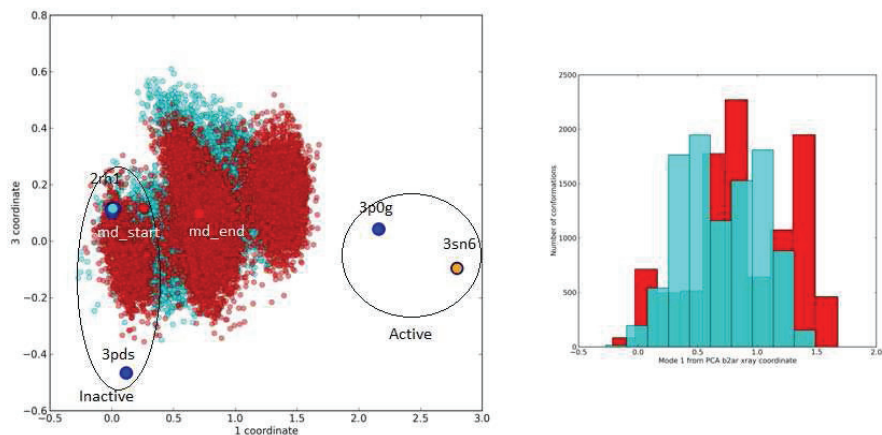


Рис. 20. Слева- суперпозиция проекции снимков траектории неравновесной МД апо-формы β -2-адренорецептора (светлым), комплекса этого белка с полным-агонистом (темные точки), а так же проекции кристаллографических структур на первую и третью главные компоненты (ГК 1 и 3) его экспериментальной выборки. Синие крупные точки соответствуют экспериментальным структурам.

Из этих диаграмм видно, что присутствие полного агониста в ортостерическом кармане рецептора приводит к значительному перераспределению плотности его конформеров, по сравнению с его апо формой. Характер полученного распределения показывает, что связывание этого лиганда сдвигает равновесие в сторону активного подсостояния рецептора (правый кластер на левой диаграмме рис 20), по сравнению с его апо формой. Из правой части рисунка 20 видно, что присутствие полного агониста в большей степени стабилизирует интермедиатное подсостояние рецептора, не исключая при этом из ансамбля конформации, соответствующие неактивному подсостоянию. Последнее так же подтверждается данными рентгеноструктурного анализа, при помощи которого была получена пространственная структура β -2-адренорецептора в неактивном подсостоянии, в комплексе с полным агонистом (pdb id 3eml) [65]. Это указывает на то, что связывание полных агонистов является необходимым, но недостаточным фактором стабилизации конформации рецептора, наблюдаемой

в его активных рентгеновских структурах (pdb id 3sn6). Эти соображения так же находят подтверждение экспериментально. Согласно калориметрическим оценкам, энергии связывания полных агонистов (основной вклад, как правило, за счет нескольких водородных связей) недостаточно для инициации крупномасштабных структурных изменений (движений отдельных α -спиралей рецептора на амплитуды порядка 6-8 Å), наблюдаемых при сравнении кристаллографических структур β -2-адренорецептора в активном и неактивном подсостояниях. В этой связи, связывание агонистов должно приводить к открытию новых путей в конформационном пространстве рецептора, двигаясь по которым этот белок с большей вероятностью мог попадать в активные подсостояния, по сравнению с его апо-формой. На рисунке 21 приведён график среднеквадратичных флуктуаций для каждого аминокислотного остатка рецептора, рассчитанный по траекториям системы 1 (апо рецептор, светлый график), а так же системы 2 (комплекс рецептора с полным агонистом, темный график).

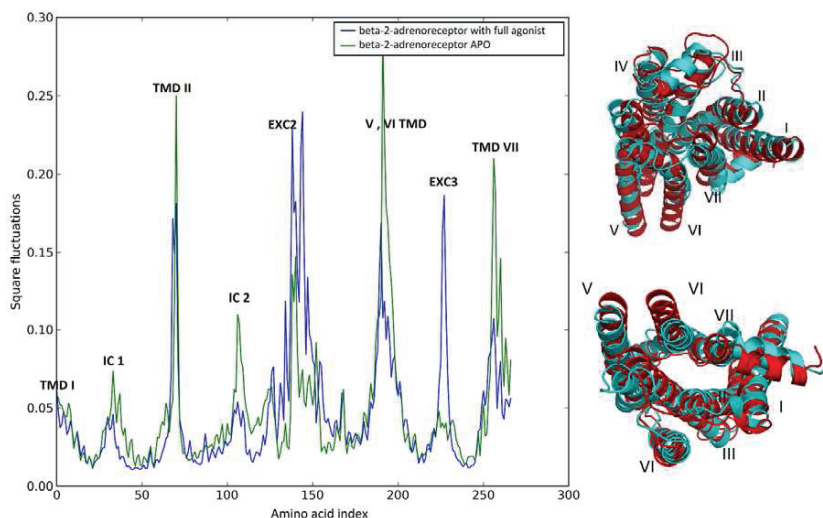


Рис. 21. Сравнение графиков усредненных среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) для каждого аминокислотного остатка β -2-адренорецептора. Диаграммы характеризуют конформационную подвижность β -2-адренорецептора, в случае его апо формы, а так же в комплексе с полным агонистом.

Из этой диаграммы видно, что в обоих случаях для рецептора было характерно выраженное динамическое поведение, в особенности в области его цитоплазматических концов V-VII спиралей. При этом, наиболее заметные структурные отличия, в случае рецептора, моделируемого в комплексе с полным агонистом, наблюдалась на уровне подвижности его второй и третьей внеклеточных петель. Это указывает на то, что присутствие лиганда в ортостерическом кармане рецептора отражается на подвижности его внеклеточного (лиганд узнающего) участка. Подобные закономерности наблюдались так же ранее и для других 7-ТМ рецепторов, в том числе при анализе их экспериментальных выборок [17, 18, 85, 86]. Эти данные свидетельствуют о существовании структурной взаимосвязи между пространственно удаленными сегментами рецептора, осуществляющими специфические функции (например, связывание лигандов, либо трансдьюсеров). С другой стороны, при моделировании рецептора в комплексе с полным агонистом нами не были отмечены крупномасштабные движения в цитоплазматических концах V и VI α -спиралей, наблюдаемые в рентгеновских структурах β -2-адренорецептора (амплитуда отклонения более 10 ангстрем), а так же родопсина. Анализ траекторий МД для апо рецептора, а так же его комплекса с полным агонистом выявил лишь незначительные по амплитуде флуктуации цитоплазматических концов V и VI спиралей рецептора (колебания порядка 3 Å), приводящие к открытию-закрытию цитоплазматической области белка. При этом, конформация рецептора с более открытой цитоплазматической областью на траектории МД реализовалась чаще в случае системы, в комплексе с полным агонистом. Иными словами, связывание этого лиганда смещало физико-химическое равновесие рецептора, по направлению к его экспериментально наблюдаемым активным конформациям, повышая статистический вес этого подсостояния в предсуществующем ансамбле. На рисунке 22 темными точками показана проекция траектории, рассчитанной для рецептора в комплексе с обратным агонистом (системы 3), на плоскость

основного подпространства, относительно траектории его апо формы (светлые точки).

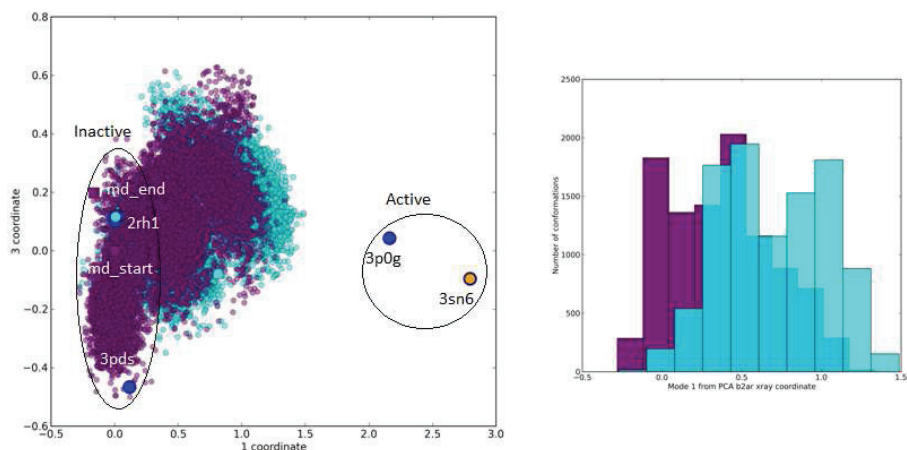


Рис. 22. Слева- суперпозиция проекции снимков траектории неравновесной МД апо-формы β -2-адренорецептора (светлым), комплекса этого белка с обратным-агонистом (темные точки), а так же проекции кристаллографических структур на первую и третью главные компоненты (ГК 1 и 3) его экспериментальной выборки. Синие крупные точки соответствуют экспериментальным структурам рецептора, а совокупность бирюзовых и красных точек- снимкам МД, сделанным, с интервалом в 10 пс. Справа- проекция снимков обеих траекторий на плоскость первой главной компоненты, соответствующей наиболее крупномасштабным движениям β -2-адренорецептора в распределении его структур.

Из полученного распределения видно, что связывание этого лиганда существенно сдвигает физико-химическое равновесие рецептора, по направлению к его неактивному подсостоянию (левому кластеру экспериментальных структур). Важно, что при моделировании рецептор в комплексе с обратным агонистом в его ансамбле практически всегда отсутствовали конформации, наблюдаемые в системе с полным агонистом (рис. 21). Таким образом, связывание обратного агониста приводило к значительному увеличению конформационной жесткости белка, существенно ограничивая область его доступного конформационного пространства. Эти

наблюдения подтверждаются графиком среднеквадратичных флуктуаций (Рис. 23), анализ которого выявил менее выраженные колебания в структурно гибких областях рецептора.

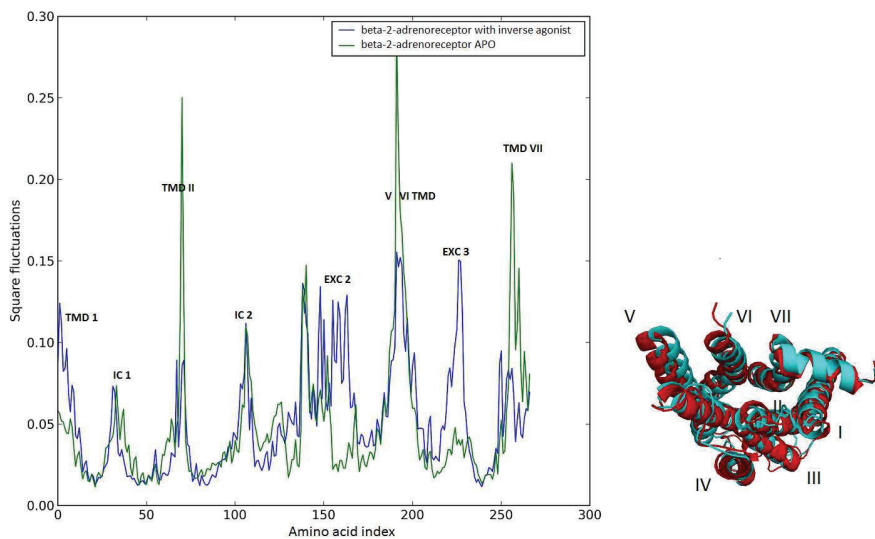


Рис. 23. Сравнение графиков усредненных среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) для каждого аминокислотного остатка β -2-адренорецептор. Диаграммы характеризуют конформационную подвижность β -2-адренорецептора, в случае его апо формы (светлый график), а так же в комплексе с обратным агонистом (темный график).

Из этого рисунка видно, что связывание обратного агониста приводит лишь к незначительному изменению в подвижности внеклеточных петель (амплитуда порядка 1.5 Å), выполняющих функцию воротного участка в ортостерический карман рецептора. При этом, подвижность в α -спиралях рецептора была выражена значительно слабее, по сравнению с его двумя другими моделями.

Полноатомное разрешение метода молекулярной динамики, позволила установить взаимосвязь между спонтанным поведением рецептора с его структурными особенностями. Во второй части этой работы мы показали, что разрыв ионного замка (солевого мостика между Arg-3.50 и Glu-6.30) в цитоплазматическом участке рецептора (используется номенклатура

аминокислот Баллестероса-Вейнштейна) связаны с переходом рецептора в активную конформацию. Таким образом, конформационная подвижность боковых групп этих остатков является внутренним регуляторным механизмом, ответственным за стабилизацию функционально-значимых под-состояний рецептора. Например, низкий уровень pH может приводить к частичному протонированию остатка Arg-3.50, боковая группа которого доступна растворителю. Эти условия могут быть связаны с повышенной конститутивной активностью рецепторов, за счёт дестабилизации ионного замка [87]. В подтверждение этому для рецептора в комплексе с различными агонистами (систем 2 и 3) был проведен расчет динамики расстояния между заряженными боковыми группами остатков Arg-131 и Glu-268 в ходе 100 нс моделирования (рис. 24). Из этого графика видно, что присутствие полного агониста в ортостерическом кармане рецептора приводило к полной дестабилизации ионного замка на протяжении всего моделирования. В противоположность этому, полярный контакт между остатками Arg-131 и Glu-268 практически полностью сохранялся в случае системы рецептора с обратным агонистом. Важно, что динамическое поведение ионного замка коррелирует по времени с переходом рецептора из одного подсостояния в другое, являясь предпосылкой подвижности цитоплазматических участков VI спирали в случае системы с полным агонистом.

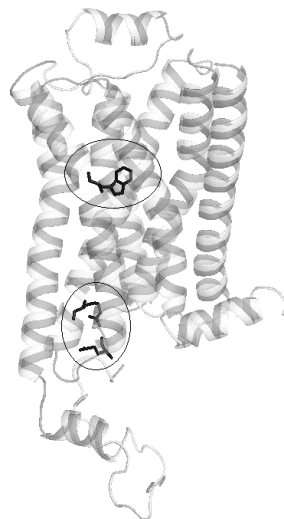
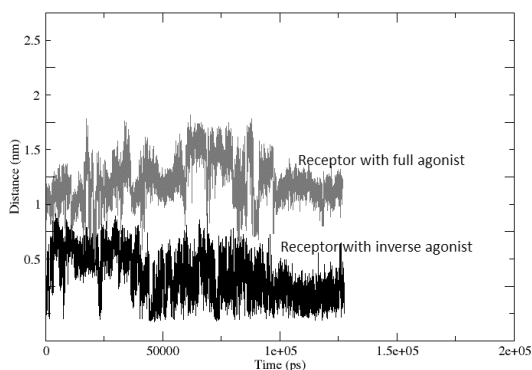


Рис. 24. Динамика ионного замка (солевого мостика между остатками Arg-131 и Glu-268) в ходе 130нс симуляции в случае рецептора в комплексе с полным агонистом (показано серым цветом), а так же обратным агонистом (показано черным цветом). По оси абсцисс показано время моделирования в пикосекундах, по оси ординат- расстояние (в нанометрах) между полярными атомами боковых групп ионного замка.

Из рисунка 24 видно, что моменты времени, соответствующие разорванному ионному замку (расстояние между полярными атомами боковых цепей Arg-131 и Glu-268 $> 5 \text{ \AA}$) соответствуют флуктуациям (2.5 $\text{\AA}$) внеклеточных концов V и VI α -спиралей. Таким образом, агонист-регулируемая динамика ионного замка является внутренним регуляторным механизмом конформационной подвижности родопсин-подобных рецепторов. С другой стороны, обращает внимание пространственная удаленность ортостерического кармана от ионного замка (обе области выделены на рис.24 справа в кружки). Это подчеркивает аллостерическую природу рецепторов (передача информации на пространственно удаленные расстояния), посредством системы высококонсервативных остатков. Например, в работе Дрора показано, что гидрофобный кластер в центральной области рецептора (главным образом, образованный остатками Ile-121 и Phe-282) выполняет роль “гибкого

сцепления” между внеклеточной и внутриклеточными сегментами этого белка [82].

В результате проведенной серии вычислительных экспериментов удалось связать спонтанную активность рецептора с его конформационной подвижностью, а так же оценить влияние лигандов на это явление. Замечательно, что образование комплексов рецепторов с низкомолекулярными веществами (энергия связывания порядка нескольких водородных связей) приводило к значительному сдвигу физико-химического равновесия по наиболее коллективным степеням свободы. Известно, что на каждую степень свободы приходится энергия порядка 1 kT , где k - Больцмановская константа, а T - абсолютная температура. В случае, если мы имеем дело с коллективными движениями, которые могут быть описаны одной низкочастотной модой, то вклад внутренних степеней свободы становится незначительным. Иными словами, величина энергии одной коллективной степени свободы так же может не превышать нескольких kT . Таким образом, низкочастотные моды являются наименее энергозатратными путями движения между биологически-значимыми под-состояниями макромолекул (“мягкие” моды в соответствии с [88]). С другой стороны, изменение структурной подвижности рецептора при его взаимодействии с различными лигандами имеет важную физиологическую значимость. Например, повышенная концентрация обратных агонистов в тканях может являться универсальным механизмом ингибирования спонтанной активности этих белков *in vivo*. Это указывает на роль клетки в качестве реостата, осуществляющего регуляцию функционирования рецептора через его конформационную динамику. Не лишним будет так же сказать, что общий характер полученных нами распределений (рис. 20 и 22) хорошо согласуется с последними экспериментальными данными [89]. В цитируемой работе, используя комбинацию методов ЯМР-спектроскопии и молекулярной динамики, авторами были получены диаграммы, аппроксимирующие движение рецептора по его поверхности свободной энергии. В последнем случае, значение свободной энергии в отдельных участках конформационной

координаты сильно коррелировало с плотностью распределения конформеров, которая наблюдалась на наших диаграммах. Совокупность наших наблюдений, а так же вышецитированных результатов свидетельствует о существовании общих структурно-функциональных закономерностей в родопсин-подобных рецепторах. Результаты реальных экспериментов, а так же компьютерные предсказания показывают, что для этих белков характерно непрерывное блуждание в областях конформационного пространства, границы которого предопределены на уровне пространственных укладок этих белков. При этом, взаимодействия с различными внешними факторами приводят к стабилизации отдельных областей предсуществующего конформационного пространства, повышая их статистический вес. Иными словами, ансамбль функционально-значимых подсостояний рецептора предопределен на уровне его пространственной архитектуры, и может быть использованы клеткой, в соответствии с её физиологическими потребностями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа является примером использования методов исследования в среде *in silico*, для изучения особенностей столь комплексного биологического процесса, как клеточная сигнализация. Используя методы молекулярной динамики, в совокупности с биоинформатическим анализом, удалось (i) связать ряд ключевых функциональных особенностей рецепторов с их конформационной динамикой, а так же (ii) выделить отдельные коллективные моды движений исследуемых белков, каждая из которых имеет уникальное функциональное значение. Наряду с этим, структурные движения лиганд-активируемых рецепторов, наблюдаемые в ходе вычислительных экспериментов, удалось связать с процессом спонтанной активации этих белков. Было показано, что конститутивная активность этих белков, регистрируемая *in vivo*, непосредственно связана с их динамической природой, предопределенной в некоторой степени на уровне пространственной архитектуры. Наконец, анализ полученных результатов позволил связать конформационные движения в рецепторах с подвижностью боковых групп их отдельных высоко-консервативных остатков. В последнем случае, была показана роль этих “микро-переключателей” как внутренних регуляторных элементов, стабилизирующих функционально-значимые подсостояния родопсин-подобных рецепторов. Таким образом, были получены детальные представления о наиболее ключевых аспектах активации родопсин-рецепторов с точки зрения их конформационной динамики.

Показанная в работе структурная подвижность лиганд-активируемых рецепторов в литературе нередко сравнивается со своеобразным “конформационным хаосом”. При этом, различные внешние факторы, например связывание лигандов, аллостерических модуляторов, а так же влияние специфического окружения (например, липидного состава мембраны, pH, либо концентрации электролитов), значительно ограничивают отдельные

конформационные степени свободы, выделяя из них наиболее биологически-значимые. Таким образом, ансамбль возможных подсостояний этих белков предопределен на уровне их пространственной укладки, и отдельные конформации могут быть использованы клеткой, в соответствии с её физиологическими потребностями. Следовательно, функционально-значимая динамика данных макромолекул, наблюдаемая *in vivo*, может быть эволюционно отобранной посредством естественного отбора, действующего на уровне их пространственной архитектуры.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Методом главных компонент было проведено исследование структурной подвижности родопсин-подобных рецепторов на основании выборок их экспериментальных структур. В результате по отдельным главным компонентам удалось разделить все структуры, в соответствии с их активностью, а так же связать структурную подвижность рецепторов с процессом их активации.
2. Методом молекулярной динамики удалось наблюдать спонтанное движение лиганд-активируемых рецепторов по направлению к их активным подсостояниям. Подобная конститутивная активность непосредственно связана с конформационной динамикой исследованных рецепторов. Показано, что структурная гибкость лиганд-активируемых рецепторов является необходимым фактором их функциональности.
3. Методом молекулярной динамики удалось оценить влияние различных факторов на конформационную динамику лиганд активируемых рецепторов. В силу особенностей своей пространственной архитектуры рецептор непрерывно “блуждает” по доступным конформациям, а различные внешние факторы стабилизируют некоторые из этих подсостояний, повышая их статистический вес.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант No. 12-04-31541) и Министерства Образования и Науки РФ (No.07.514.11.4125). Авторам хотелось бы поблагодарить Колесникова С.С. за проведение внутрилабораторных семинаров, посвященных вопросам внутриклеточной сигнализации. Кроме того, отдельная благодарность выражается Балабаеву Н.К. за любезно предоставленный доступ к вычислительному центру ИМПБ для проведения расчетов молекулярной динамики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Wettschureck N., Offermanns S.* "Mammalian G proteins and their cell type specific functions" // *Physiological reviews* - 2005 - 85,- pp. 1159-1204.
2. *Congreve M., Marshall F.* "The impact of GPCR structures on pharmacology and structure - based drug design" // *Br J Pharmacol* - 2010 - 159,- pp. 986-996.
3. *Bosier B., Hermans E.* "Versatility of GPCR recognition by drugs: from biological implications to therapeutic relevance" // *Trends Pharmacol Sci* - 2007 - 28,- pp. 438-446.
4. *Costa T., Cotecchia S.* "Historical review: Negative efficacy and the constitutive activity of G-protein-coupled receptors" // *Trends Pharmacol Sci* - 2005 - 26,- pp. 618-624.
5. *Deupi X., Standfuss J.* "Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors" // *Curr Opin Struct Biol* - 2011 -,.-
6. *Boehr D. D., Nussinov R., Wright P. E.* "The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition" // *Nat Chem Biol* - 2009 - 5,- pp. 789-796.
7. *Vaidehi N., Kenakin T.* "The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity" // *Current opinion in pharmacology* - 2010 - 10,- pp. 775-781.
8. *Canals M., Lane J. R., Wen A., Scammells P. J., Sexton P. M., Christopoulos A.* "A Monod-Wyman-Changeux mechanism can explain G protein-coupled receptor (GPCR) allosteric modulation" // *J Biol Chem* - 2012 - 287,- pp. 650-659.
9. *Kenakin T.* "Efficacy at G-protein-coupled receptors" // *Nature Reviews Drug Discovery* - 2002 - 1,- pp. 103-110.
10. *Kenakin T. P.* "7TM receptor allostery: putting numbers to shapeshifting proteins" // *Trends Pharmacol Sci* - 2009 - 30,- pp. 460-469.
11. *Klepeis J. L., Lindorff-Larsen K., Dror R. O., Shaw D. E.* "Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function" // *Curr Opin Struct Biol* - 2009 - 19,- pp. 120-127.
12. *Johnston J. M., Filizola M.* "Showcasing modern molecular dynamics simulations of membrane proteins through G protein-coupled receptors" // *Curr Opin Struct Biol* - 2011 - 21,- pp. 552-558.
13. *Durrant J. D., McCammon J. A.* "Molecular dynamics simulations and drug discovery" // *BMC biology* - 2011 - 9,- pp. 71.
14. *Yonath A.* "X-ray crystallography at the heart of life science" // *Curr Opin Struct Biol* - 2011 -,.-
15. *White S. H.* "Biophysical dissection of membrane proteins" // *Nature* - 2009 - 459,- pp. 344-346.
16. *Mustafi D., Palczewski K.* "Topology of class A G protein-coupled receptors: insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors" // *Mol Pharmacol* - 2009 - 75,- pp. 1-12.

17. Wheatley M., Simms J., Hawtin S., Wesley V., Wootten D., Conner M., Lawson Z., Conner A., Baker A., Cashmore Y. "Extracellular loops and ligand binding to a subfamily of Family A G-protein-coupled receptors" // *Biochemical Society Transactions* - 2007 - 35,- pp. 717.
18. Bokoch M. P., Zou Y., Rasmussen S. G., Liu C. W., Nygaard R., Rosenbaum D. M., Fung J. J., Choi H. J., Thian F. S., Kobilka T. S., Puglisi J. D., Weis W. I., Pardo L., Prosser R. S., Mueller L., Kobilka B. K. "Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor" // *Nature* - 2010 - 463,- pp. 108-112.
19. Nygaard R., Frimurer T. M., Holst B., Rosenkilde M. M., Schwartz T. W. "Ligand binding and micro-switches in 7TM receptor structures" // *Trends Pharmacol Sci* - 2009 - 30,- pp. 249-259.
20. Ahuja S., Smith S. O. "Multiple switches in G protein-coupled receptor activation" // *Trends Pharmacol Sci* - 2009 - 30,- pp. 494-502.
21. Rosenbaum D. M., Rasmussen S. G. F., Kobilka B. K. "The structure and function of G-protein-coupled receptors" // *Nature* - 2009 - 459,- pp. 356-363.
22. Tompa P. "Intrinsically unstructured proteins" // *Trends Biochem Sci* - 2002 - 27,- pp. 527-533.
23. Berg J. M., Tymoczko J., Stryer L. "Biochemistry" // *WH Freeman and Co* - 2006 -, -.
24. Woo A. Y., Xiao R. P. "beta-Adrenergic receptor subtype signaling in heart: from bench to bedside" // *Acta Pharmacol Sin* - 2012 - 33,- pp. 335-341.
25. Azzi M., Charest P. G., Angers S., Rousseau G., Kohout T., Bouvier M., Piñeyro G. "Beta-Arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors" // *Science Signalling* - 2003 - 100,- pp. 11406.
26. Reiter E., Ahn S., Shukla A. K., Lefkowitz R. J. "Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors" // *Annu Rev Pharmacol Toxicol* - 2012 - 52,- pp. 179-197.
27. Fredholm B. B. "Adenosine receptors as drug targets" // *Exp Cell Res* - 2010 - 316,- pp. 1284-1288.
28. Иванов А., Баскин И., Палюлин В., Зефиоров Н. "Молекулярное моделирование аденозиновых рецепторов" // *Вестник Московского Университета* - 2002 - 43,- pp. 231-236.
29. Park P. S., Lodowski D. T., Palczewski K. "Activation of G protein-coupled receptors: beyond two-state models and tertiary conformational changes" // *Annu Rev Pharmacol Toxicol* - 2008 - 48,- pp. 107-141.
30. Okada T., Ernst O. P., Palczewski K., Hofmann K. P. "Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies" // *Trends Biochem Sci* - 2001 - 26,- pp. 318-324.
31. Novikov G., Sivozhelezov V., Shebanova A., Shaitan K. "Classification of rhodopsin structures by modern methods of structural bioinformatics" // *Biochemistry (Moscow)* - 2012 - 77,- pp. 435-443.
32. Hubbell W. L., Altenbach C., Hubbell C. M., Khorana H. G. "Rhodopsin structure, dynamics, and activation: a perspective from crystallography, site-

- directed spin labeling, sulfhydryl reactivity, and disulfide cross-linking" // *Advances in protein chemistry* - 2003 - 63,- pp. 243-290.
33. Gether U., Lin S., Kobilka B. K. "Fluorescent labeling of purified β_2 adrenergic receptor" // *Journal of Biological Chemistry* - 1995 - 270,- pp. 28268-28275.
 34. Kobilka B. K., Gether U. "Examination of Ligand-Induced Conformational Changes in the β_2 -Adrenergic Receptor by Fluorescence Spectroscopy" // *Advances in Pharmacology* - 1997 - 42,- pp. 470-473.
 35. Peleg G., Ghanouni P., Kobilka B. K., Zare R. N. "Single-molecule spectroscopy of the β_2 adrenergic receptor: Observation of conformational substates in a membrane protein" // *Proceedings of the National Academy of Sciences* - 2001 - 98,- pp. 8469-8474.
 36. Sprang S. R. "Cell signalling: Binding the receptor at both ends" // *Nature* - 2011 - 469,- pp. 172-173.
 37. Schwartz T. W., Frimurer T. M., Holst B., Rosenkilde M. M., Elling C. E. "Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model" // *Annu Rev Pharmacol Toxicol* - 2006 - 46,- pp. 481-519.
 38. Rajagopal S., Rajagopal K., Lefkowitz R. J. "Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors" // *Nat Rev Drug Discov* - 2010 - 9,- pp. 373-386.
 39. Hinsen K. "Analysis of domain motions by approximate normal mode calculations" // *Proteins Structure Function and Genetics* - 1998 - 33,- pp. 417-429.
 40. Ma S., Dai Y. "Principal component analysis based methods in bioinformatics studies" // *Brief Bioinform* - 2011 - 12,- pp. 714-722.
 41. Kumar S., Ma B., Tsai C. J., Sinha N., Nussinov R. "Folding and binding cascades: dynamic landscapes and population shifts" // *Protein Science* - 2000 - 9,- pp. 10-19.
 42. Daidone I., Amadei A., Roccatano D., Nola A. D. "Molecular dynamics simulation of protein folding by essential dynamics sampling: folding landscape of horse heart cytochrome c" // *Biophys J* - 2003 - 85,- pp. 2865-2871.
 43. Frauenfelder H., Sligar S. G., Wolynes P. G. "The energy landscapes and motions of proteins" // *Urbana* - 1991 - 51,- pp. 61801.
 44. Park P. S. H. "Ensemble of G protein-coupled receptor active states" // *Current Medicinal Chemistry* - 2012 - 19,- pp. 1146.
 45. Deupi X., Kobilka B. K. "Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function" // *Physiology (Bethesda)* - 2010 - 25,- pp. 293-303.
 46. Bond R. A., IJzerman A. P. "Recent developments in constitutive receptor activity and inverse agonism, and their potential for GPCR drug discovery" // *Trends Pharmacol Sci* - 2006 - 27,- pp. 92-96.
 47. Costa T., Herz A. "Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins" // *Proceedings of the National Academy of Sciences* - 1989 - 86,- pp. 7321-7325.

48. Johnson J., Liggett S. "Cardiovascular pharmacogenomics of adrenergic receptor signaling: clinical implications and future directions" // *Clinical Pharmacology & Therapeutics* - 2011 - 89,- pp. 366-378.
49. Vassart G., Costagliola S. "G protein-coupled receptors: mutations and endocrine diseases" // *Nature Reviews Endocrinology* - 2011 - 7,- pp. 362-372.
50. Smit M. J., Vischer H. F., Bakker R. A., Jongejan A., Timmerman H., Pardo L., Leurs R. "Pharmacogenomic and structural analysis of constitutive g protein-coupled receptor activity" // *Annu Rev Pharmacol Toxicol* - 2007 - 47,- pp. 53-87.
51. Pauwels P. J., Wurch T. "Review: amino acid domains involved in constitutive activation of G-protein-coupled receptors" // *Molecular neurobiology* - 1998 - 17,- pp. 109-135.
52. Ma S., Dai Y. "Principal component analysis based methods in bioinformatics studies" // *Brief Bioinform* - 2011 -,.-
53. Hayward S., Kitao A., Go N. "Harmonicity and anharmonicity in protein dynamics: a normal mode analysis and principal component analysis" // *Proteins* - 1995 - 23,- pp. 177-186.
54. Шайтан К. "Молекулярная динамика пептидов" // *Методическое пособие* --,-.
55. Amadei A., Linssen A., De Groot B., Van Aalten D., Berendsen H. "An efficient method for sampling the essential subspace of proteins" // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* - 1996 - 13,- pp. 615-625.
56. Snow C., Qi G., Hayward S. "Essential dynamics sampling study of adenylate kinase: comparison to citrate synthase and implication for the hinge and shear mechanisms of domain motions" // *Proteins* - 2007 - 67,- pp. 325-337.
57. Daidone I., Roccatano D., Hayward S. "Investigating the accessibility of the closed domain conformation of citrate synthase using essential dynamics sampling" // *J Mol Biol* - 2004 - 339,- pp. 515-525.
58. Hayward S., Kitao A., Berendsen H. J. C. "Model - free methods of analyzing domain motions in proteins from simulation: A comparison of normal mode analysis and molecular dynamics simulation of lysozyme" // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* - 1998 - 27,- pp. 425-437.
59. Narzi D., Daidone I., Amadei A., Di Nola A. "Protein Folding Pathways Revealed by Essential Dynamics Sampling" // *Journal of Chemical Theory and Computation* - 2008 - 4,- pp. 1940-1948.
60. Peeters M. C., van Westen G. J., Li Q., AP I. J. "Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation" // *Trends Pharmacol Sci* - 2011 - 32,- pp. 35-42.
61. Kenakin T. "Functional selectivity and biased receptor signaling" // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* - 2011 - 336,- pp. 296-302.
62. Niesen M. J., Bhattacharya S., Vaidehi N. "The role of conformational ensembles in ligand recognition in G-protein coupled receptors" // *J Am Chem Soc* - 2011 - 133,- pp. 13197-13204.

63. *Deupi X, Standfuss J.* "Structural insights into agonist-induced activation of G-protein-coupled receptors" // *Curr Opin Struct Biol* - 2011 - 21,- pp. 541-551.
64. *Lebon G., Warne T., Edwards P. C., Bennett K., Langmead C. J., Leslie A. G., Tate C. G.* "Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation" // *Nature* - 2011 - 474,- pp. 521-525.
65. *Rosenbaum D. M., Zhang C., Lyons J. A., Holl R., Aragao D., Arlow D. H., Rasmussen S. G., Choi H. J., Devree B. T., Sunahara R. K., Chae P. S., Gellman S. H., Dror R. O., Shaw D. E., Weis W. I., Caffrey M., Gmeiner P., Kobilka B. K.* "Structure and function of an irreversible agonist-beta(2) adrenoceptor complex" // *Nature* - 2011 - 469,- pp. 236-240.
66. *Rasmussen S. G., DeVree B. T., Zou Y., Kruse A. C., Chung K. Y., Kobilka T. S., Thian F. S., Chae P. S., Pardon E., Calinski D., Mathiesen J. M., Shah S. T., Lyons J. A., Caffrey M., Gellman S. H., Steyaert J., Skinotis G., Weis W. I., Sunahara R. K., Kobilka B. K.* "Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex" // *Nature* - 2011 - 477,- pp. 549-555.
67. *Moukhametzianov R., Warne T., Edwards P. C., Serrano-Vega M. J., Leslie A. G., Tate C. G., Schertler G. F.* "Two distinct conformations of helix 6 observed in antagonist-bound structures of a beta1-adrenergic receptor" // *Proc Natl Acad Sci U S A* - 2011 - 108,- pp. 8228-8232.
68. *Warne T., Serrano-Vega M. J., Baker J. G., Moukhametzianov R., Edwards P. C., Henderson R., Leslie A. G., Tate C. G., Schertler G. F.* "Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor" // *Nature* - 2008 - 454,- pp. 486-491.
69. *Milligan G.* "Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective" // *Molecular pharmacology* - 2003 - 64,- pp. 1271-1276.
70. *Salom D., Lodowski D. T., Stenkamp R. E., Le Trong I., Golczak M., Jastrzebska B., Harris T., Ballesteros J. A., Palczewski K.* "Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin" // *Proc Natl Acad Sci U S A* - 2006 - 103,- pp. 16123-16128.
71. *Warne T., Moukhametzianov R., Baker J. G., Nehme R., Edwards P. C., Leslie A. G., Schertler G. F., Tate C. G.* "The structural basis for agonist and partial agonist action on a beta(1)-adrenergic receptor" // *Nature* - 2011 - 469,- pp. 241-244.
72. *Brunskole I., Strasser A., Seifert R., Buschauer A.* "Role of the second and third extracellular loops of the histamine H(4) receptor in receptor activation" // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* - 2011 - 384,- pp. 301-317.
73. *Vanni S., Neri M., Tavernelli I., Rothlisberger U.* "Observation of "ionic lock" formation in molecular dynamics simulations of wild-type beta 1 and beta 2 adrenergic receptors" // *Biochemistry* - 2009 - 48,- pp. 4789-4797.
74. *Yamniuk A. P., Vogel H. J.* "Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides" // *Molecular biotechnology* - 2004 - 27,- pp. 33-57.
75. *Nobeli I., Favia A. D., Thornton J. M.* "Protein promiscuity and its implications for biotechnology" // *Nature biotechnology* - 2009 - 27,- pp. 157-167.

76. Tawfik O. K. D. S. "Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective" // *Annual review of biochemistry* - 2010 - 79,- pp. 471-505.
77. Whitford P. C., Miyashita O., Levy Y., Onuchic J. N. "Conformational transitions of adenylate kinase: switching by cracking" // *J Mol Biol* - 2007 - 366,- pp. 1661.
78. Vale R. D., Milligan R. A. "The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins" // *Science* - 2000 - 288,- pp. 88-95.
79. Whitford P. C., Sanbonmatsu K. Y., Onuchic J. N. "Biomolecular dynamics: order-disorder transitions and energy landscapes" // *Reports on Progress in Physics* - 2012 - 75,- pp. 076601.
80. Shoemaker B. A., Portman J. J., Wolynes P. G. "Speeding molecular recognition by using the folding funnel: the fly-casting mechanism" // *Proceedings of the National Academy of Sciences* - 2000 - 97,- pp. 8868-8873.
81. Moukhametzanov R., Warne T., Edwards P. C., Serrano-Vega M. J., Leslie A. G. W., Tate C. G., Schertler G. F. X. "Two distinct conformations of helix 6 observed in antagonist-bound structures of a $\beta 1$ -adrenergic receptor" // *Proceedings of the National Academy of Sciences* - 2011 - 108,- pp. 8228-8232.
82. Dror R. O., Arlow D. H., Maragakis P., Mildorf T. J., Pan A. C., Xu H., Borhani D. W., Shaw D. E. "Activation mechanism of the beta2-adrenergic receptor" // *Proc Natl Acad Sci U S A* - 2011 - 108,- pp. 18684-18689.
83. Qin K., Sethi P. R., Lambert N. A. "Abundance and stability of complexes containing inactive G protein-coupled receptors and G proteins" // *Faseb J* - 2008 - 22,- pp. 2920-2927.
84. Kobilka B. K., Deupi X. "Conformational complexity of G-protein-coupled receptors" // *Trends Pharmacol Sci* - 2007 - 28,- pp. 397-406.
85. Scarselli M., Li B., Kim S. K., Wess J. "Multiple residues in the second extracellular loop are critical for M3 muscarinic acetylcholine receptor activation" // *J Biol Chem* - 2007 - 282,- pp. 7385-7396.
86. Peeters M., Van Westen G., Li Q., Ijzerman A. "Importance of the extracellular loops in G protein-coupled receptors for ligand recognition and receptor activation" // *Trends Pharmacol Sci* - 2011 - 32,- pp. 35-42.
87. Ghanouni P., Schambye H., Seifert R., Lee T. W., Rasmussen S. G., Gether U., Kobilka B. K. "The Effect of pH on $\beta 2$ Adrenoceptor Function EVIDENCE FOR PROTONATION-DEPENDENT ACTIVATION" // *Journal of Biological Chemistry* - 2000 - 275,- pp. 3121-3127.
88. Bahar I. "On the functional significance of soft modes predicted by coarse-grained models for membrane proteins" // *The Journal of general physiology* - 2010 - 135,- pp. 563-573.
89. Nygaard R., Zou Y., Dror R. O., Mildorf T. J., Arlow D. H., Manglik A., Pan A. C., Liu C. W., Fung J. J., Bokoch M. P. "The Dynamic Process of $\beta < sub>2</sub>$ -Adrenergic Receptor Activation" // *Cell* - 2013 - 152,- pp. 532-542.



MoreBooks!
publishing



yes **i want morebooks!**

Покупайте Ваши книги быстро и без посредников он-лайн – в одном из самых быстрорастущих книжных он-лайн магазинов! окружающей среде благодаря технологии Печати-на-Заказ.

Покупайте Ваши книги на
www.more-books.ru

Buy your books fast and straightforward online - at one of world's fastest growing online book stores! Environmentally sound due to Print-on-Demand technologies.

Buy your books online at
www.get-morebooks.com



VDM Verlagsservicegesellschaft mbH

Heinrich-Böcking-Str. 6-8
D - 66121 Saarbrücken

Telefon: +49 681 3720 174
Telefax: +49 681 3720 1749

info@vdm-vsg.de
www.vdm-vsg.de

