

## دسته بندی اسید های آمینه ی هلیکس های غشایی در پروتئین انتقال دهنده ی سروتونین انسانی

علی شریعت پناهی<sup>۱</sup>، محمد تقی زاده<sup>۲\*</sup>، بهرام گلیایی<sup>۲</sup>، آرمین مددکار سبحانی<sup>۲</sup>

(۱) گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

(۲) مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۰

### چکیده

**مقدمه:** پروتئین انتقال دهنده ی سروتونین انسانی (5-HTT) اهمیت بالایی در مطالعات طراحی دارو دارد و به تازگی شش ساختار حاصل از کریستالو گرافی از آن در دسترس قرار گرفته است. در این پژوهش با استفاده از دو مورد از این ساختار ها و دو مدل ساخته شده به روش همولوژی، به مطالعه ی ترکیب اسید های آمینه ی 5-HTT پرداخته شده است تا درک بهتری از نقش ساختاری و عملکردی هلیکس های غشایی در انتقال دهنده ها، و هم چنین مزایا و معایب استفاده از مدل های همولوژی در این مطالعات مشخص شود.

**مواد و روش ها:** ابتدا نواحی هلیکس های غشایی در 5-HTT به وسیله ی نمودار هیدروپاتی کایت و دولیتل مشخص شد. سپس اسیدهای آمینه ی هلیکس های غشایی با استفاده از روشی نوین بر مبنای موقعیت رزیدو ها نسبت به غشای لیپیدی به ۴ دسته (رو به لیپید، رو به لومن، راست و چپ) تقسیم شدند. هم چنین دو مدل سه بعدی از 5-HTT نیز با استفاده از نرم افزار MODELLER و بر اساس الگو هایی با شباهت ۳۸ و ۶۰ درصد ساخته شد.

**یافته های پژوهش:** با استفاده از روش دسته بندی ابداعی توانستیم نتایج جدید و جالبی در مورد نحوه توزیع رزیدو های مختلف در ساختار انتقال دهنده ی سروتونین انسانی به دست آوریم. به طور مثال، علی رغم آن که اکثر رزیدو های آب گریز هلیکس ها در دسته ی رو به لیپید قرار دارند، درصد قابل توجهی از آن ها در دسته ی رو به لومن حضور دارند. رزیدو های ایزو لوسین، لوسین، والین، ترئونین، آلانین و فنیل آلانین به ترتیب بیش ترین فراوانی را در دسته ی رو به لیپید دارند. بنا بر این الگوهای سه بعدی جایگیری این رزیدو ها، تعیین کننده بیشتر بر هم کنش های میان لیپید های غشایی و پروتئین و نقش این بر هم کنش ها است.

**بحث و نتیجه گیری:** بر اساس ضرایب همبستگی، ترکیب رزیدو های دسته های رو به لیپید و راست پروتئین بیش ترین شباهت را به یکدیگر دارد. این نکته پیشنهاد می دهد که هلیکس های غشایی احتمالا در تغییر کنفورماسیون ناشی از باز و بسته شدن انتقال دهنده، دستخوش چرخش می شوند. هم چنین مقایسه ی ساختارهای حاصل از کریستالو گرافی با مدل ها نشان می دهد استفاده از الگویی با شباهت ۳۸٪ برای مدل سازی همولوژی پروتئین های انتقال دهنده، هلیکس های غشایی را به نحو نامناسبی مدل می کند. این یافته ها می توانند در درک بهتر ساختار و عملکرد هلیکس های غشایی پروتئین های انتقال دهنده موثر باشند.

**واژه های کلیدی:** مطالعه در سطح رزیدو، پروتئین انتقال دهنده سروتونین انسانی، مدل سازی همولوژی، پروتئین های انتقال دهنده، هلیکس های غشایی

\* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Email: mtaghizadeh@alumni.ut.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

انتقال دهنده های دستگاه عصبی مرکزی در دو دسته ی SLC1 و SLC6 جای می گیرند. دسته ی بزرگ تر SLC6 در جا به جایی مونو آمین های بیوژنیک مانند دوپامین (DA)، نور آدرنالین (NA) و سروتونین (5-HT) و اسید های آمینه ای مانند گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) و گلیسین (Gly) ایفا نقش می کنند (۱). پروتئین سر تا سر غشایی انتقال دهنده ی سروتونین انسانی که با نام های 5-HTT، hSERT و SLC6A4 نیز معرفی می شود، به خانواده ی دوم تعلق دارد. این انتقال دهنده با تسهیل انتقال سروتونین در دو سوی غشاء نقش مهمی را در تنظیم مقادیر خارج سلولی این انتقال دهنده عصبی ایفا می کند. اهمیت پروتئین های غشایی مانند انتقال دهنده سروتونین زمانی بیشتر مشخص می شود که بدانیم بیش از ۷۵٪ از اهداف دارویی، به یکی از خانواده های پروتئین های غشایی مرتبط می شوند (۲). در این میان، انتقال دهنده ی سروتونین انسانی (5-HTT) به طور ویژه هدف طیف وسیعی از داروهای درمان افسردگی و اضطراب، و همچنین تعدادی از ترکیبات روانگردان مانند آمفتامین و اکستازی می باشد (۳). مطالعات ژنتیکی صورت گرفته بر روی 5-HTT هم چنین علاوه بر افسردگی، نشان از دخیل بودن این پروتئین در بیماری هایی نظیر نشانگان وسواس اجباری OCD (Obsessive Compulsive Disorder)، اختلالات دو قطبی و اوتیسم دارد (۴). با توجه به اهمیت بالای 5-HTT در مطالعات طراحی دارو، ساختار سه بعدی حاصل از کریستالو گرافی آن به تازگی تعیین شده و در پایگاه داده PDB قرار گرفته است (۵). این ساختار می تواند الگوی مناسبی برای مدل سازی دیگر پروتئین های انتقال دهنده ی انسانی باشد.

علی رغم مطالعات گسترده ای که بر روی 5-HTT به روش های مختلف انجام شده، مطالعات چندانی در سطح رزیدو بر روی بخش های غشایی ساختار سه بعدی این پروتئین صورت نگرفته است و لذا این پروتئین از جنبه هایی مانند نحوه ی ارتباط و عملکرد بخش های مرتبط با غشاء و ترکیب اسیدهای آمینه، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. هم چنین با وجود

مطالعاتی که بر روی پروتئین های غشایی دیگر صورت گرفته است، (به جز یک مورد که به جدا سازی یک هلیکس غشایی و بررسی ترکیب اسید های آمینه ی آن پرداخته است (۶))، در سایر مطالعات بخش غشایی مورد مطالعه قرار نگرفته است. در واقع در سایر مطالعات صورت گرفته بر روی ترکیب اسیدهای آمینه ی پروتئین های غشایی نیز اسیدهای آمینه ی بدون توجه به جهت گیری زنجیره ی جانبی رزیدوها مورد بررسی قرار گرفته اند. اغلب مطالعات صورت گرفته بر روی ترکیب اسیدهای آمینه ی پروتئین های سراسر غشایی، به بررسی آماری مجموعه داده هایی متشکل از تعدادی پروتئین با ساختار سه بعدی مشخص می پردازند که ساختار سه بعدی پروتئین 5-HTT در میان آن ها نیست. هم چنین در این مطالعات دسته بندی خاصی مشابه تحقیق حاضر، مشاهده نمی شود. در بعضی از این مطالعات، پروتئین های غشایی بررسی شده، از ساختارهای آلفا هلیکس و رشته های بتا تشکیل شده اند (۷) و پروتئین های بررسی شده در برخی مطالعات دیگر، صرفاً شامل تعدادی پروتئین هلیکسی با کیفیت و وضوح ساختاری بالا بوده اند (۸). در مطالعه ی دیگری که در سال ۲۰۱۰ منتشر شده است، ترکیب اسید های آمینه ی تعدادی از پروتئین های دارای یک گذر غشایی مورد بررسی قرار گرفته است (۹).

مهارکننده های 5-HTT و سایر انتقال دهنده های SLC6 با بیش از ۳۰ ساختار دارویی تایید شده، در درمان بیماری هایی نظیر افسردگی نقشی مهم ایفا می کنند (۳). کشف و طراحی این داروها به ویژه در سال های اخیر، مدیون استفاده از روش های حائز اهمیت بیو انفورماتیکی نظیر مدل سازی است. با توجه به این که ساختار سه بعدی بیش از ۶۰ درصد پروتئین های دارای اهمیت دارویی (به علت غشایی بودن و عدم امکان تهیه ی کریستال) با استفاده از روش هایی مانند کریستالو گرافی اشعه ایکس قابل بررسی نیست (۱)، مدل سازی به روش همولوژی ابزاری قدرتمند برای مطالعه ی این اهداف مهم دارویی و طراحی دارو های جدید محسوب می شود. مدل سازی به روش همولوژی کاربردهای متفاوتی دارد و مدل های حاصل برای اهداف گوناگون مورد استفاده قرار می گیرند. به عنوان

مثال مطالعات صورت گرفته در زمینه طراحی دارو با استفاده از مدلی همولوژی از 5-HTT با کیفیت بالا، تا کنون منجر به شناسایی هلیکس‌ها و اسیدهای آمینه‌ی دخیل در پاکت اتصال این پروتئین شده‌اند (۴) هم چنین با استفاده از مدل‌های ساخته شده به روش همولوژی نشان داده شده است که پاکت اتصال داروهایی از گروه SSRI مانند سیتالوپرام، با پاکت اتصال این پروتئین هم پوشانی دارد. با استفاده از این نکته، عناصر ساختاری دخیل در اتصال با تمایل بالا نیز مشخص شده‌اند (۱۰، ۱۱). اسیدهای آمینه‌ی مختلف در قسمت غشایی بر اساس جهت گیری خود، برهم کنش‌های متفاوتی با غشاء دارند و لذا عملکردهای متفاوتی از خود نشان می‌دهند. در این مقاله، بر روی اختصاصیت جایگاه رزیدوها تمرکز شده است و برای نخستین بار، اسیدهای آمینه‌ی هلیکس‌های غشایی یک ساختار حاصل از کریستالوگرافی بر اساس گیری در هلیکس‌ها یا به عبارت دیگر بر اساس موقعیت اسیدهای آمینه در هلیکس (نسبت به غشا) به ۴ دسته تقسیم شده‌اند. این در حالی است که در هیچ یک از مطالعات قبلی، رزیدوهای دارای جهت گیری‌های مختلف به این روش از یکدیگر جدا نشده‌اند. یکی از اهداف بررسی ساختارهای سه بعدی پروتئین 5-HTT در این کار، مشخص کردن ترکیب رزیدوهایی است که در ارتباط با لیپیدهای غشایی قرار می‌گیرند. اهمیت این رزیدوها بویژه در مطالعات بالینی بسیار بالاست چرا که بیشتر جهش‌های ایجادکننده‌ی نا هنجاری‌های روانی، نواحی مرتبط با لیپیدهای غشایی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۲). هم چنین بر هم کنش لیپیدهای غشایی نظیر کلسترول با پروتئین، در تنظیم فعالیت انتقالی آن نقش ایفا می‌کند (۱۳). چنان که می‌دانیم از میان ۳ یا ۴ رزیدویی که در هر دور از هلیکس حضور دارند، تنها زنجیره‌ی جانبی یکی از رزیدوها رو به غشا و در میان لیپیدهای غشایی قرار می‌گیرد و رزیدوهای دیگر در این ناحیه نبوده و جایگاه‌های دیگری دارند. به عنوان مثال رزیدوهای قرار گرفته در موقعیت‌های چپ و راست دسته‌ی رو به لیپید، در بر هم کنش‌های هلیکس- هلیکس نقش دارند و رزیدوهای قرار گرفته در موقعیت پشت دسته

اول نیز در این روش تقسیم بندی، بیشتر با فضای لومن پروتئین در ارتباط هستند و لذا به آن‌ها دسته‌ی روی به لومن گفته می‌شود. این به آن معناست که مولکول‌هایی که از فضای کانالی 5-HTT عبور می‌کنند، با اسیدهای آمینه‌ی دسته‌ی رو به لومن در ارتباط هستند. بر اساس روش جدید دسته بندی رزیدوها در پژوهش حاضر مشخص شد که ترکیب اسیدهای آمینه در این جایگاه‌هایی که در بالا به آن‌ها اشاره شد، تفاوت‌های زیادی با یکدیگر دارند. به طور کلی می‌توان گفت این مطالعات، گامی رو به جلو در زمینه‌ی ایجاد ارتباط بین ترکیب اسیدهای آمینه و نقش عملکردی پروتئین در خانواده‌ی انتقال دهنده‌های سدیمی نورو ترانسمیترها محسوب می‌شود. علاوه بر این، یافته‌های این پژوهش می‌تواند به متخصصان طراحی پروتئین اجازه دهد هلیکس‌های غشایی مناسب تری برای یک پروتئین انتقال دهنده‌ی غشایی طراحی کنند. این نتایج هم چنین شناخت ماهیت هلیکس‌های غشایی که در ساختار انتقال دهنده‌ها دیده می‌شوند را ممکن کرده و به درک بهتر مکانیزم عملکرد پروتئین‌های انتقال دهنده و پروتئین‌های مشابه با آن‌ها کمک می‌کند.

### مواد و روش‌ها

ساختارهای سه بعدی مورد استفاده: ابتدا دو ساختار حاصل از کریستالوگرافی اشعه ایکس پروتئین 5-HTT شامل ساختار پروتئین بدون لیگاند (PDB ID: 5i6z) و ساختار پروتئین دارای لیگاند اس- سیتالوپرام در پاکت اتصال مرکزی (PDB ID: 5i71) از پایگاه داده PDB گرفته شد. سپس مدل سازی به روش همولوژی نیز با استفاده از دو الگوی متفاوت برای این پروتئین انجام شد. برای یافتن الگوهایی با شباهت قابل قبول و آغاز مدل سازی، ابتدا توالی پروتئین 5-HTT انسان (Lot. P31645) از Uniprot گرفته شد و سپس توسط ابزار BLAST همین پایگاه، علیه PDB جستجو صورت گرفت (۱۴). بر این اساس ساختارهای حاصل از کریستالوگرافی انتقال دهنده‌ی باکتریایی وابسته به سدیم/کلر لوسین (LeuTAA) (PDB ID: 2A65) با شباهت ۳۸٪ و انتقال دهنده‌ی

شماره ی ۷) نسبت داده شد. سپس با حرکت یک واحدی پنجره به سمت جلو، همین روند برای رزیدوهای بعدی نیز تکرار شد. پس از تکرار همین روش با بازه ی ۱۹ تایی، بر اساس اعداد بدست آمده رسم نمودار صورت گرفت.

دسته بندی و آنالیزهای آماری رزیدوهای پروتئین: پس از مشخص شدن هلیکس های نواحی غشایی پروتئین توسط پروفایل هیدروپاتی، رزیدوهای قرار گرفته در هر دور از این هلیکس ها به ۴ دسته تقسیم شدند. این دسته بندی اسیدهای آمینه، پس از بررسی رزیدو به رزیدوی ساختار 5-HTT از زوایای گوناگون در یک نرم افزار نمایش دهنده ساختار ViewerLite 5.0 (accelrys) صورت گرفت. مبنای این تقسیم بندی، جهت گیری زنجیره ی جانبی اسیدهای آمینه نسبت به غشای لیپیدی بود. بر این اساس اسیدهای آمینه در یکی از ۴ دسته ی رزیدوهای رو به لیپید، راست، چپ و رو به لومن قرار گرفتند. توضیحات بیشتر در بخش نتایج قابل مشاهده است (شکل ۲). هم چنین فراوانی های مطلق و نسبی ۲۰ نوع اسید آمینه، با توجه به تعداد کل اسیدهای آمینه ی بررسی شده از پروتئین که شامل ۲۹۹ رزیدو بوده است، محاسبه و بر اساس آن نمودار فراوانی ترسیم شد. اسیدهای آمینه در نمودار فراوانی به ترتیب و بر اساس افزایش عدد شاخص هیدروپاتی کایت و دولیتل از چپ به راست منظم شده اند (۱۸). ضرایب همبستگی پیرسون نیز برای بررسی میزان همبستگی میان فراوانی نسبی اسیدهای آمینه ی ۴ دسته محاسبه شد.

### یافته های پژوهش

تعیین رزیدوهای غشایی 5-HTT: مشخص کردن رزیدوهای در ارتباط با غشا با استفاده از ساختار حاصل از کریستالو گرافی، در مرحله اول نیازمند بررسی نواحی آب گریز پروتئین است. مشخص کردن مرزهای بین نواحی غشایی و غیر غشایی در هلیکس های غشایی با استفاده از پروفایل هیدروپاتی انجام شد. شکل ۱، پروفایل هیدروپاتی بر اساس شاخص کایت و دولیتل را برای نواحی مختلف ساختار اصلی پروتئین 5-HTT (5i6z) نشان می دهد. بررسی اسیدهای آمینه، دو بار و

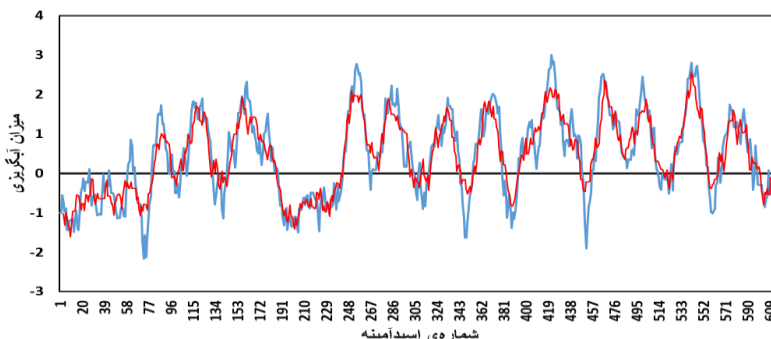
دوپامین *Drosophila melanogaster* (dDAT) (PDB ID: 4m48) با شباهت ۶۰٪ به عنوان الگو انتخاب شدند (۳). مدل سازی به روش همولوژی، با استفاده از اسکریپت های align2d و model single نرم افزار MODELLER 9v12 (۱۵) و با ساخت ۳۰۰۰ مدل برای هر یک از الگوها انجام شد. انتخاب بهترین مدل ابتدا به وسیله ی توابع ارزیابی نرم افزار MODELLER 9v12 شامل DOPE score و MolPdf انجام شد. برای محاسبه ی نمودار Dope score اسکریپت های evaluate template و evaluate model از نرم افزار MODELLER مورد استفاده قرار گرفتند. در ادامه، ارزیابی مدل منتخب به وسیله خروجی های نرم افزار Procheck (که نمودار رامچاندران را نیز در بر می گیرد) صورت گرفت. در نهایت دو مدل به عنوان بهترین مدل ها بر اساس الگوی باکتریایی (Mdl-1) و الگوی بی مهره (Mdl-2) انتخاب شدند.

هم تراز ی سه بعدی ساختارها: در ادامه هم تراز ی سه بعدی ساختار دارای لیگاند سیتالو پرام (5i71) و هم چنین مدل ها (Mdl-1, Mdl-2) با ساختار اصلی 5-HTT بدون لیگاند (5i6z) به عنوان ساختار مرجع، توسط نرم افزار viewer pdb swiss نسخه 4.1 انجام شد (۱۶). RMSD هم تراز ی کربن های آلفای ساختارها نیز در همین نرم افزار محاسبه شد.

نمودار هیدروپاتی: نمودار هیدروپاتی اسیدهای آمینه ی 5-HTT، توسط ابزار شناسایی و آنالیز پروتئین ProtScale در ExPASy به دست آمد (۱۷). مقادیر محاسبه شده برای ۶۱۷ اسید آمینه ی پروتئین هدف (5i6z)، بر اساس شاخص کایت و دولیتل محاسبه شد که در میان شاخص های موجود از پر کاربرد ترین موارد در حوزه تعیین دامنه های غشایی پروتئین ها است. بنا بر رویه ی استاندارد نرم افزار در بررسی توالی، دو پنجره ی ۱۳ و ۱۹ تایی به طور جداگانه و در دو نوبت در ابزار ProtScale انتخاب شدند تا میزان آب گریزی رزیدوها محاسبه شود. در این روش ابتدا بازه ی ۱۳ تایی از اسیدهای آمینه از رزیدوی اول تا سیزدهم انتخاب شد. سپس میزان آب گریزی برای رزیدوهای کل این بازه محاسبه و به رزیدوی میانی بازه ی ۱۳ تایی (رزیدوی

در مجموع ۶۸/۵٪ اسیدهای آمینه پروتئین، یعنی ۳۷۳ از تعداد کل ۵۴۴ اسید آمینه، بالای خط سیاه رنگ قرار گرفته و آب گریز به حساب آمده‌اند.

با استفاده از دو پنجره‌ی ۱۳ و ۱۹ تایی صورت گرفته است که پیشتر در بخش روش‌ها درباره‌ی آن توضیح داده شد. رزیدوهای آمینو اسیدی قرار گرفته در بالای خط آستانه‌ی سیاه رنگ در شکل ۱، آب گریز هستند.

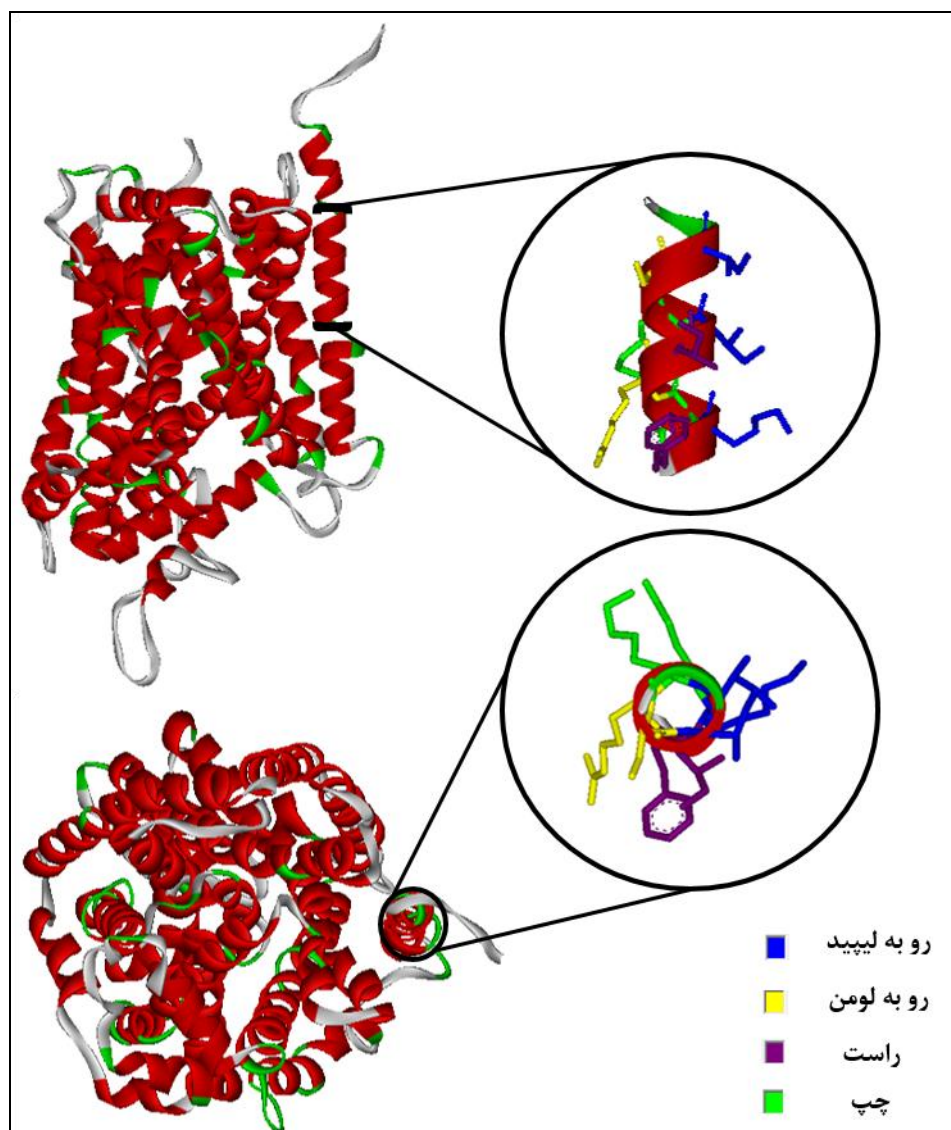


شکل ۱. پروفایل هیدروپاتی برای پروتئین 5-HTT (5i6z). منحنی آبی رنگ حاصل بررسی رزیدوها با پنجره‌ی ۱۳ تایی و منحنی قرمز رنگ حاصل بررسی با پنجره‌ی ۱۹ تایی هستند.

هیدروپاتی کایت و دولیتل، به ترتیب از چپ به راست منظم شده‌اند. فراوانی نسبی این رزیدوها در ۲۳۳ اسید آمینه‌ی انتخاب شده از ساختار اصلی نیز به این صورت است: ایزولوسین (۰/۱۳)، والین (۰/۱۱)، لوسین (۰/۱۴)، فنیل آلانین (۰/۱)، سیستئین (۰/۰۲)، متیونین (۰/۰۲)، آلانین (۰/۱)، گلايسین (۰/۰۶)، ترئونین (۰/۰۷)، سرین (۰/۰۶)، تریپتوفان (۰/۰۲)، تیروزین (۰/۰۳)، پرولین (۰/۰۲)، هیستیدین (۰)، گلوتامیک اسید (۰/۰۱)، گلوتامین (۰/۰۱)، آسپارتیک اسید (۰/۰۲)، آسپارژین (۰/۰۱)، لایزین (۰/۰۱) و آرژنین (۰/۰۱). در میان اسیدهای آمینه رو به لیپید به ترتیب ایزو لوسین، لوسین، والین، ترئونین، آلانین و فنیل آلانین فراوانی بیش تری داشتند. بنا بر این می‌توان گفت الگوهای سه بعدی جایگیری این رزیدوها تعیین کننده‌ی بیشتر بر هم کنش‌های پروتئین با غشا لیپیدی و عملکرد ناشی از این برهمکنش‌ها است. در دسته‌ی سمت راست این اسیدهای آمینه میزان ایزو لوسین، والین و آلانین و در دسته‌ی سمت چپ میزان لوسین، آلانین و فنیل آلانین از سایرین بیشتر بود. در دسته‌ی رو به لومن نیز گلايسین، ایزو لوسین و سرین بیش ترین فراوانی را داشتند. از میان ۳ اسید آمینه‌ی حجیم (آروماتیک) در دسته‌ی رو به لیپید، فقط فنیل آلانین فراوانی چشم گیری داشت.

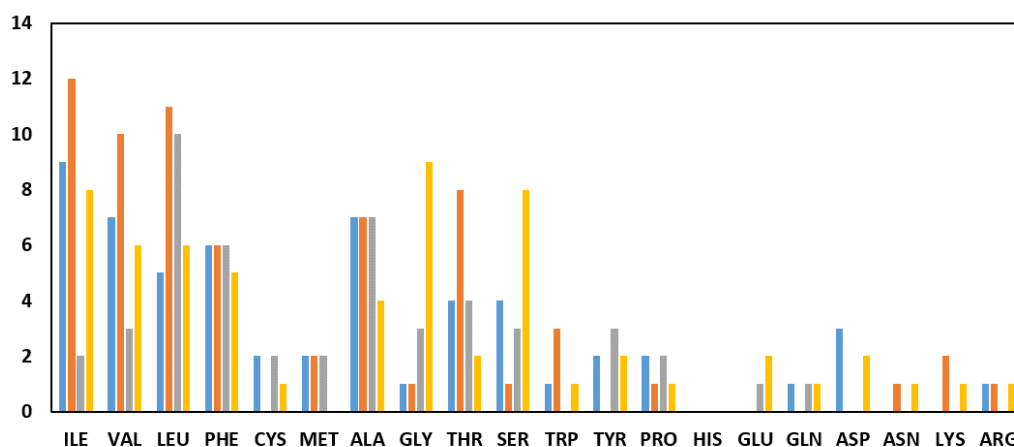
آنالیز رزیدوهای هلیکس‌های غشایی 5-HTT: در مرحله بعدی، تمام رزیدوهای رو به لیپید ساختار پروتئین 5-HTT که در ارتباط با غشا هستند، با دقت مشخص و آنالیز شدند. با در نظر گرفتن "i" به عنوان اسید آمینه‌ای با زنجیره‌ی جانبی رو به لیپید (که در تماس با لیپیدهای غشایی هستند)، اسیدهای آمینه‌ی i+1، i+2 و i+3 به ترتیب راست، رو به لومن و چپ نامیده شدند (شکل ۲). به دلیل آن که در هر دور از هلیکس‌ها به طور متوسط ۳/۶ رزیدو قرار می‌گرفت، علاوه بر استفاده از فرمول بالا به جهت گیری تک تک رزیدوها نیز توجه شد. در آنالیز ساختار اصلی حاصل از کریستالو گرافی (5i6z) برای بررسی دقیق تر، از ۳۷۳ اسید آمینه‌ی انتخاب شده در مرحله‌ی قبل تعدادی کنار گذاشته شدند و در نهایت ۲۳۳ رزیدو باقی ماندند. این اسیدهای آمینه‌ی حذف شده یا در نواحی هلیکس‌های غشایی حضور نداشتند و یا در دو انتهای هلیکس‌ها جای گرفته بودند. به عبارت دیگر این رزیدوها در هیچ کدام از موقعیت‌های i+1، i+2 و i+3 قرار نمی‌گرفتند. به این ترتیب کل ۲۳۳ رزیدوی غشایی انتخاب شده به ۴ دسته‌ی رو به لیپید، راست، رو به لومن و چپ تقسیم شدند.

میزان فراوانی ۲۰ اسید آمینه‌ی طبیعی در میان این ۴ دسته در شکل ۳ قابل مشاهده است. در این نمودار، اسیدهای آمینه بر اساس افزایش عدد شاخص



شکل ۲. نحوه ی دسته بندی رزیدوهای ساختار پروتئین 5-HTT. ۴ دسته رزیدوی بررسی شده با رنگ های آبی (رو به لیپید)، زرد (رو به لومن)، بنفش (راست) و سبز (چپ) در شکل مشخص شده اند. در بالا تصویر پروتئین از پهلو و در پایین تصویر پروتئین از بالا، جهت کمک به درک بهتر نحوه ی بررسی آورده شده اند.

رو به لومن چپ رو به لیپید راست

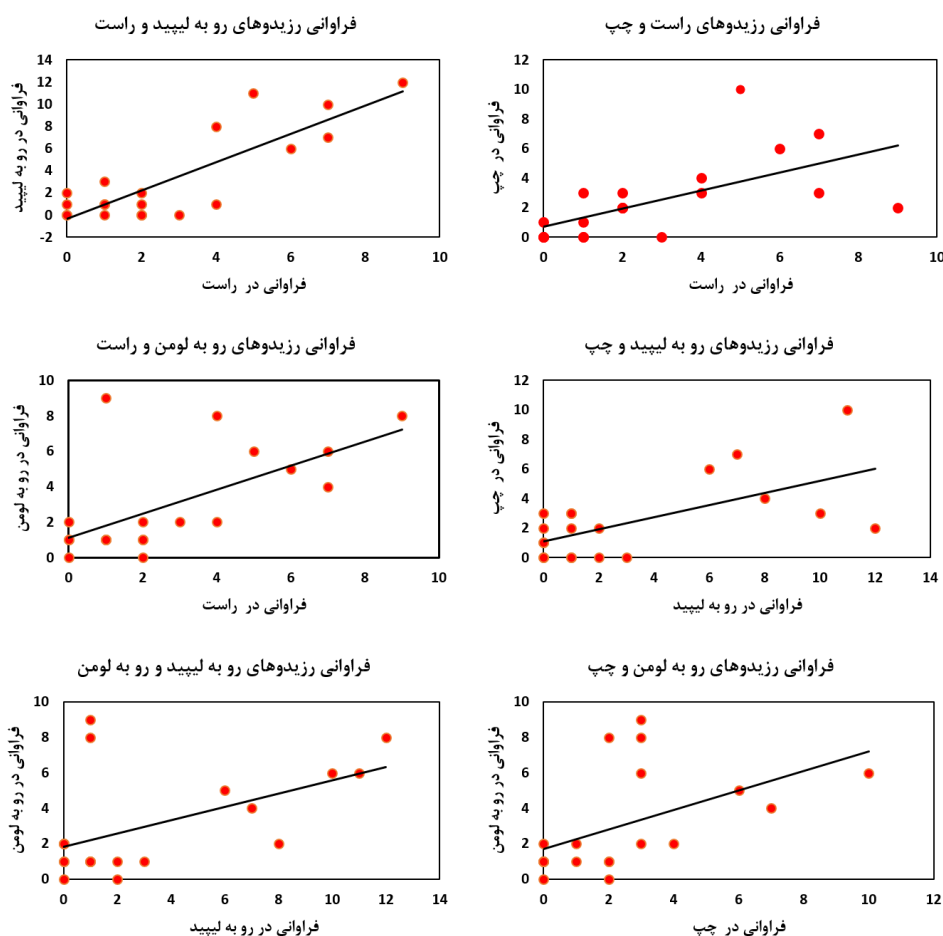


شکل ۳. نمودار فراوانی انواع اسیدهای آمینه در میان رزیدوهای رو به لیپید، راست، چپ و رو به لومن از ساختار کریستالو گرافی پروتئین 5-HTT (5i6z).

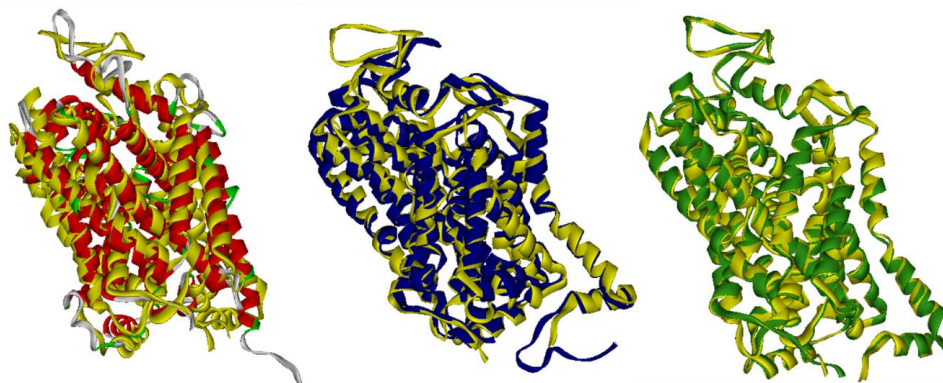
همبستگی دسته‌های چهارگانه‌ی انتخابی در هلیکس‌های غشایی 5-HTT: در میان ۴ دسته‌ی به دست آمده، برخی اسیدهای آمینه فراوانی‌های نسبی مشابهی داشتند. به عنوان مثال بیشتر رزیدوها در دسته‌های رو به لیپید و راست فراوانی‌های نسبی مشابهی داشتند و روند تغییرات فراوانی نسبی در این دو دسته به یکدیگر شباهت داشت. دسته‌هایی که اسیدهای آمینه در آن‌ها فراوانی‌های نسبی مشابهی داشتند، همبستگی بالایی با یکدیگر نشان می‌دهند: چنان که ضریب همبستگی فراوانی نسبی رزیدوهای مختلف در دسته‌های رو به لیپید و راست ۰/۸۴ به دست آمد. هم چنین فراوانی نسبی اسیدهای آمینه‌ی دسته‌های راست و رو به لومن همبستگی بسیاری (۰/۶۳) با یکدیگر دارد؛ در حالی که به دلیل تفاوت‌های زیاد و عدم تقارن میان اسیدهای آمینه‌ی چپ و رو به لومن، کم‌ترین میزان همبستگی (۰/۵) دیده می‌شود. ضرایب همبستگی فراوانی نسبی رزیدوها میان دسته‌های دیگر نیز عبارت است از ۰/۶۱ برای دسته‌های راست و چپ، ۰/۶۳ برای دسته‌های چپ و رو به لیپید، ۰/۵۳ برای دسته‌های رو به لیپید و رو به لومن. نمودار پراکندگی فراوانی انواع اسیدهای آمینه در میان ۴ دسته‌ی انتخابی در شکل ۴ دیده می‌شود. همبستگی بالا میان دسته رو به لیپید و راست احتمالاً می‌تواند نشان از چرخش هلیکس‌ها در تغییر کنفورماسیونی پروتئین 5-HTT باشد. به گونه‌ای که در اثر تبدیل کنفورماسیون رو به درون سلول به حالت رو به بیرون سلول برای این پروتئین، جایگاه رزیدوهای رو به لیپید و دسته راست تا حدودی با هم عوض می‌شود. مقایسه‌ی ساختارهای کریستالو گرافی و مدل‌های پروتئین 5-HTT در مطالعه‌ی حاضر، از میان ۶ ساختار به دست آمده از پروتئین 5-HTT به روش کریستالو گرافی که در سال ۲۰۱۶ در قالب مقاله‌ای در مجله‌ی Nature ارائه شده (۵)، دو ساختار مورد استفاده قرار

گرفت. یکی از این ساختارها، پروتئین دارای لیگاند اس-سیتالو پرام در پاکت اتصال مرکزی (5i71) است که رزیدوهای ۴۷ تا ۶۱۵ آن در ساختار کریستالو گرافی هستند و دیگری، ساختار اصلی پروتئین بدون لیگاند (5i6z) است که رزیدوهای ۴۷ تا ۶۱۷ آن کریستالو گرافی شده است. هم چنین برای بررسی دقیق تر، دو مدل سه بعدی از 5-HTT نیز به روش همولوژی و با استفاده از الگوهای باکتریایی (LeuTaa) و بی مهره (dDAT) ساخته شد. نتایج هم ترازوی‌های سه بعدی میان ساختارها (شکل ۵) نشان داد میزان RMSD هم ترازوی کربن‌های آلفای ساختار مرجع با ساختارهای Mdl-1، Mdl-2 و ساختار 5i71 به ترتیب ۰/۶، ۲/۶ و ۰/۵۱ است. بنا بر این 5-HTT دارای لیگاند سیتالو پرام (5i71) بیش ترین انطباق را با ساختار مرجع (5i6z) دارد و مدل‌های دو (Mdl-2) و یک (Mdl-1) نیز در رتبه‌های بعدی میزان شباهت قرار می‌گیرند.

جدول ۱، ضرایب همبستگی میان دسته‌های متناظر اسید آمینه در ساختارهای ذکر شده را نشان می‌دهد. بر اساس جدول، بیشترین میزان همبستگی میان دسته‌های اسید آمینه در ساختارهای 5i71 و 5i6z دیده شد که این مسئله با توجه به RMSD اندک میان دو ساختار (۰/۵۱) تایید می‌شود. در مورد ساختارهای مدل Mdl-1 و Mdl-2، اختلاف در درصد شباهت الگوها منجر به تغییر ضرایب همبستگی شد، به گونه‌ای که افزایش ۲۲ درصدی شباهت از الگوی باکتریایی به الگوی بی مهره، منجر شد میانگین ضرایب همبستگی از ۰/۷۴ برای Mdl-1 به ۰/۸۷ برای Mdl-2 بهبود پیدا کند. هم چنین مقایسه‌ی مقادیر RMSD ذکر شده در بالا نشان می‌دهد اختلاف ۲۲ درصدی در میزان شباهت دو الگوی مدل سازی با توالی 5-HTT می‌تواند منجر به اختلافی ۶ آنگسترومی در RMSD مدل ساخته شده با ساختار حاصل از کریستالو گرافی این پروتئین شود که مقداری قابل توجه است.



شکل ۴. نمودار پراکنده فراوانی نسبی انواع اسیدهای آمینه ی پروتئین 5-HTT (5i6z) در میان ۴ دسته ی انتخابی.



شکل ۵. به ترتیب از چپ به راست: نتایج هم تراز ی سه بعدی ساختارهای Mdl-1 (قرمز)، Mdl-2 (آبی) و 5i71 (سبز) با ساختار مرجع (5i6z) (زرد).

جدول ۱. مقایسه ی ضرایب همبستگی میان دسته های اسید آمینه ی ساختارهای Mdl-1، Mdl-2 و 5i71 با ساختار مرجع (5i6z).

| نام دسته / نام ساختار     | MDL-1 | MDL-2 | 5I71  |
|---------------------------|-------|-------|-------|
| رو به لیپید - رو به لیپید | +۰/۸۷ | +۰/۹۳ | +۰/۰۰ |
| راست - راست               | +۰/۶۸ | +۰/۸۱ | +۰/۰۰ |
| رو به لومن - رو به لومن   | +۰/۶۲ | +۰/۹۱ | +۰/۰۰ |
| چپ - چپ                   | +۰/۸  | +۰/۸۲ | +۰/۰۰ |

## بحث و نتیجه گیری

علی رغم اهمیت بالای پروتئین 5-HTT در تحقیقات طراحی دارو، میزان اطلاعات در سطح رزیدو (residue-level information) درباره‌ی این پروتئین در مطالعاتی که تا کنون انجام شده است قابل توجه نیست. تعداد مطالعاتی که در سطح مولکولی به بررسی برهم کنش انتقال دهنده‌های غشایی و غشای لیپیدی پرداخته‌اند نیز اندک است (۱۹). با توجه به این که تعیین ساختار پروتئین 5-HTT به روش کریستالوگرافی اشعه ایکس اخیراً انجام شده است، می‌توان گفت استفاده از ساختاری سه بعدی به این صورت و برای بررسی ترکیب اسیدهای آمینه‌ی این پروتئین تاکنون انجام نگرفته است. مطالعه‌ی پروتئین‌های غشایی در سطح رزیدو، اغلب با استفاده از تعداد کم و یا حتی یک ساختار حاصل از کریستالوگرافی به انجام رسیده است (۱۹) که این مسئله به دلیل وجود تعداد اندک ساختارهایی از انتقال دهنده‌های غشایی است که از روش‌های تجربی به دست آمده باشند. به عنوان مثال در سال ۲۰۰۴، ترکیب اسیدهای آمینه‌ی تعدادی از انتقال دهنده‌های غشایی با استفاده از ۴ ساختار به دست آمده به روش کریستالوگرافی اشعه ایکس تعیین شده است (۸). البته در این مقاله یا مطالعات دیگر دسته بندی رزیدوهای مربوط به هلیکس‌های غشایی بررسی نشده است. در پژوهش حاضر تنها به بررسی ساده‌ی ترکیب رزیدوها پرداخته نشده، بلکه با استفاده از روش جدید دسته بندی رزیدوهای هلیکس‌های غشایی، آنالیزهای مختلفی نیز صورت گرفته است. ما در ابتدا از ساختار حاصل از کریستالوگرافی پروتئین 5-HTT (5i6z) برای بررسی ترکیب و جهت گیری زنجیره‌های جانبی رزیدوهای انتقال دهنده‌ی سروتونین انسانی استفاده شد. در ادامه نیز مقایسه‌ی میان این رزیدوها با رزیدوهای ساختارهای دارای لیگاند سیتالوپرام (5i71) و مدل‌های ساخته شده از پروتئین بر اساس الگوهای همولوگ‌های باکتریایی (Mdl-1) و بی مهره (Mdl-2) را انجام داده ایم.

روش جدید استفاده شده، شامل دسته بندی اسیدهای آمینه‌ی یک پروتئین غشایی به ۴ دسته بر

اساس موقعیت زنجیره‌های جانبی آن‌ها در ارتباط با غشا است. این گونه بررسی و تقسیم بندی، برای نخستین بار است که در مطالعات صورت گرفته بر روی ترکیب اسیدهای آمینه‌ی پروتئین‌ها انجام می‌گیرد. از نزدیک ترین روش‌های بررسی به این روش، می‌توان به نحوه‌ی مطالعه‌ی بخشی از سیستم جا به جایی دوتایی آرژنین در کلروپلاست (cpTat) اشاره کرد که یک جزء پروتئینی آن به نام Hcf106 دارای هلیکسی آمفی پاتیک است (۶). در این بررسی با استفاده از روشی متفاوت با روش مطالعه‌ی حاضر، ابتدا این هلیکس از نظر داشتن دو نیم-هلیکس آب‌دوست و آب‌گریز بررسی شده و سپس ترکیب رزیدوهای هر نیم هلیکس در قالب ۳ دسته مشخص شده است. این ۳ دسته شامل رزیدوهای آب‌گریز، آب دوست باردار و آب دوست بدون بار هستند. در بررسی دیگری، پراکنش اسیدهای آمینه‌ی ۱۵ پروتئین غشایی که مجموعاً دارای ۱۲۹ هلیکس هستند مورد مطالعه قرار گرفته است (۷). دو روش استفاده شده برای بررسی پراکنش رزیدوها در این مطالعه، شامل بررسی بر مبنای توالی اسیدهای آمینه‌ی این ساختارها و بررسی بر اساس مختصات کربن‌های آلفا نسبت به مرکز غشای لیپیدی است. هر دو مطالعه‌ی فوق نوعی از تقسیم بندی را برای اسیدهای آمینه‌ی هلیکس‌های مورد نظر (در اولی یک هلیکس آمفی پاتیک از پروتئین Hcf106 و در دومی ۱۲۹ هلیکس غشایی از ۱۵ پروتئین) ارائه کرده اند. با این حال در مطالعات ذکر شده، توجه به جهت گیری رزیدوها نسبت به لیپیدهای غشایی ملاک دسته بندی نبوده است. به دلیل اهمیت بالای انتقال دهنده‌های غشایی مانند 5-HTT و برهم کنش این پروتئین‌ها با غشا، پژوهش حاضر به طور اختصاصی ساختار پروتئینی را از این جنبه‌ی پایه‌ای مورد بررسی قرار داده است. مطالعه‌ی داده‌های حاصل از این روش بررسی رزیدوها، اطلاعات جدیدی در مورد ساختار و عملکرد پروتئین غشایی 5-HTT پیشنهاد می‌دهد.

قسمت عمده‌ی ترکیب اسیدهای آمینه‌ی هلیکس‌های غشایی در 5-HTT به رزیدوهای آب‌گریز تعلق دارد که نقشی اثر گذار در تشکیل هلیکس دارند (۲۰). علت این فراوانی هم چنین قابلیت برهم

کنش زنجیره های جانبی آن ها با لیپید های غشایی است. براساس داده های ذکر شده در بخش نتایج، ترکیب اسید های آمینه ی ۱۲ هلیکس غشایی 5-HTT نشان دهنده ی حضور ۶۲ درصدی رزیدو های آب گریز در این نواحی است. این در حالی است که میانگین این میزان در هلیکس های غشایی گیت های (سایر ترانسپورترها و کانال های یونی) به ۶۸/۵٪ می رسد (۸). این داده ها نشان دهنده ی کم تر بودن میزان آب - گریزی بخش غشایی 5-HTT از حد میانگین پروتئین های سراسر غشایی است. بنا بر این می توان نتیجه گرفت که بر هم کنش های هیدروفوب این پروتئین با لیپید های غشایی، از حد میانگین بر هم کنش پروتئین های غشایی کم تر است. علی رغم نزدیک بودن مقادیر شاخص هیدروپاتی در میان سه اسید آمینه ی آب گریزی که بیش ترین فراوانی را در بخش غشایی 5-HTT دارند، لوسین و ایزو لوسین فراوانی بیشتری نسبت به والین دارند. طول بیشتر زنجیره های جانبی لوسین و ایزو لوسین نسبت به والین احتمالا باعث این فراوانی بیش تر است. با توجه به این که فضای نمونه در این مطالعه متشکل از رزیدو های هلیکس ها است، تعدد رزیدو های هلیکس ساز لوسین که در بخش های ساختاری مرتبط با غشا دیده می شود امری عادی است (۲۱). نکته دیگر این که میانگین فراوانی رزیدو های آروماتیک در نواحی هلیکسی گیت های غشایی (به جز انتقال دهنده ی سروتونین انسانی) ۸٪ است (۸)، در حالی که مطالعه حاضر نشان می دهد این میزان در 5-HTT به حدود ۱۵٪ افزایش می یابد. یکی از فراوان ترین اسید های آمینه در ساختار پروتئین 5-HTT رزیدوی آروماتیک فنیل آلانین است که بالا ترین فراوانی را در میان رزیدو های آروماتیک پروتئین نیز دارا است. از میان رزیدو های آروماتیک پس از فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان به ترتیب از بالا ترین فراوانی برخوردارند. لازم به ذکر است علت کم تر بودن فراوانی تیروزین نسبت به فنیل آلانین ممکن است گروه هیدرو کسید موجود در اسید آمینه ی تیروزین باشد که تنها تفاوت میان ساختار زنجیره ی جانبی در این دو اسید آمینه است. عدم وجود تیروزین در دسته رو به لیپید نیز در این جا جالب توجه است.

زنجیره ی جانبی آن دسته از رزیدو ها که "رو به لیپید" نام گذاری شده اند، در میان لیپید های غشایی قرار می گیرد. داده های حاصل از این مطالعه نشان می دهند بیش ترین تعداد اسید های آمینه ی آب گریز (۷۲٪) در دسته ی رو به لیپید جای دارند و دسته های راست، چپ و رو به لومن نیز به ترتیب با ۶۶، ۴۹ و ۴۹ درصد از رزیدو های آب گریز در جایگاه های بعدی قرار دارند. ایزو لوسین و لوسین دارای بلند ترین زنجیره ی جانبی در میان اسید های آمینه ی آب گریز می باشند و در عین حال هیدروفوب ترین رزیدو های به کار رفته در ساختار انتقال دهنده ی سروتونین هستند. با توجه به وظیفه ی رزیدو های دسته ی رو به لیپید در بر هم کنش با لیپید های غشایی، مشاهده ی بیش ترین حضور مربوط به این دو اسید آمینه در این دسته، خارج از انتظار نبوده است. علاوه بر این، مطالعات جهش زایی نشان می دهد تغییر در رزیدو های Ile425 و Leu550 که در همین دسته قرار می گیرند، میزان فعالیت انتقال سروتونین و پایداری انتقال دهنده را تغییر می دهد (۵). این مسئله نقش مهم رزیدو ها در دسته ی رو به لیپید را نشان می دهد. پس از لوسین و ایزو لوسین، والین نیز با داشتن زنجیره ی جانبی کوتاه تر (در میان رزیدو های هیدروفوب آلفاتیک) در درجه ی بعدی فراوانی قرار می گیرد. از سایر گروه های اسید آمینه ی که فراوانی قابل توجهی در دسته ی رو به لیپید دارند می توان به رزیدو های آروماتیک اشاره کرد. فنیل آلانین و تریپتوفان موجود در دسته ی اسید های آمینه ی رو به لیپید، رزیدو های آروماتیکی هستند که در ارتباط مستقیم با لیپید های غشایی قرار دارند (این در حالی است که فراوانی تیروزین در این دسته صفر است). آن چه به عنوان نقش اصلی این رزیدو ها مشخص شده، کمک به اتصال و جهت گیری پروتئین ها در غشای لیپیدی است (۲۲، ۱۹). رزیدو هایی که فراوانی آن ها در دسته ی رو به لیپید صفر است، علاوه بر تیروزین شامل گلوتامین و رزیدو های دارای بار الکتریکی منفی مانند آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید اند. انتظار می رود فراوانی رزیدو های دارای بار الکتریکی مثبت مانند لایزین و آرژنین در دسته ی رو به لیپید که با لیپید های غشایی در تماس هستند، صفر باشد. اما مجموع فراوانی

لایزین و آرژنین در این دسته حدود ۵٪ است. این رزیدو ها در دو ناحیه‌ی "کمربندی" در نیمه‌های بالایی و پایینی بخش غشایی 5-HTT حضور پیدا می‌کنند، لذا به نظر می‌رسد وظیفه‌ی یک رزیدوی آرژنین و دو رزیدوی لایزین (در ناحیه کمربند داخلی) برهمکنش با سرهای باردار لیپیدهای غشایی است.

انتظار می‌رود رزیدوهای دسته‌های راست و چپ بیشتر در برهم‌کنش‌های هلیکس-هلیکس شرکت داشته باشند. این برهم‌کنش‌ها نقشی مهم در حفظ ساختار سوم پروتئین‌های غشایی دارند (۲۳، ۲۴). در واقع، این برهم‌کنش‌های پهلوی به پهلوی هلیکس‌ها در غشای لیپیدی است که منجر به شکل‌گیری ساختار تا خورده‌ی نهایی شده، و بهترین حالت برای مجاورت هلیکس‌ها با هم و تشکیل صحیح ساختار سوم را به دست می‌دهد (۲۵). در این میان، رزیدوی آب‌گریز و کوچک آلانین با داشتن زنجیره‌ی جانبی کوتاه، نقش مهمی در این برهم‌کنش‌ها ایفا می‌کند (۷). داده‌های حاصل از بررسی ساختار در این مطالعه نشان می‌دهند این اسید آمینه در دسته‌های راست و چپ به مقدار زیادی حضور دارد و مقدار آن در هر دو دسته برابر است (شکل ۳) که این مشاهده با یافته‌های قبلی هم‌خوانی دارد (۷). رزیدوی لوسین در دسته چپ بیش‌ترین فراوانی را دارد. لوسین در برهم‌کنش‌های هلیکس-هلیکس در ساختارهای موتیفی معروفی مانند زیپ لوسینی نقش دارد. لذا می‌توان انتظار داشت که این اسید آمینه در پروتئین 5-HTT در برهم‌کنش‌های هلیکس-هلیکس نقش داشته باشد.

یکی از نتایج بسیار جالب در این کار، وجود ضریب همبستگی ۸۴ درصدی میان دسته‌های راست و رو به لیپید است. چنین ضریب همبستگی بالایی، این احتمال را مطرح می‌کند که هلیکس‌های غشایی در جریان تغییر کنفورماسیونی ناشی از باز و بسته شدن کانال انتقال دهنده دچار چرخش می‌شوند. این چرخش به گونه‌ای است که جایگاه رزیدوهای رو به لیپید و راست را، حداقل در بعضی از هلیکس‌ها با یکدیگر جا به جا می‌کند. البته در سایر بررسی‌های مکانیکی صورت گرفته بر روی مکانیزم عملکرد انتقال دهنده‌های غشایی تا کنون چنین فرضیه‌ای مطرح نشده است (۲۷).

(۲۶)، با این حال پیشنهاد چرخش هلیکس‌ها در این مطالعه می‌تواند راه‌گشای مطالعه‌ی بیشتر در این مورد و به طور کلی در مورد نحوه‌ی عملکرد این انتقال دهنده‌ی غشایی باشد.

رزیدوهایی که رو به لومن پروتئینی هستند و زنجیره‌ی جانبی آن‌ها پشت رزیدوهای رو به غشا قرار گرفته، با نام دسته‌ی "رو به لومن" شناسایی و معرفی شده‌اند. همان‌طور که مشخص است، مولکول‌های آب دائماً در حال عبور از لومن پروتئین هستند و بنابراین رزیدوهای آب دوست، بیشتر ترکیب رزیدوهای رو به لومن را تشکیل داده‌اند. نتایج ذکر شده در بخش یافته‌ها هم چنین تایید می‌کند که علی‌رغم وجود کمترین تعداد اسیدهای آمینه‌ی آب‌گریز در دسته‌ی رو به لومن (در میان ۴ دسته)، درصد رزیدوهای آب‌گریز در این دسته هم چنان بالاست. انتقال دهنده‌های غشایی ساختاری متفاوت با کانال‌ها دارند و در مورد 5-HTT، فضای میانی انتقال دهنده محل عبور سروتونین و یون سدیم است. ساختار سروتونین با داشتن حلقه‌ی بنزی، دارای بخش آب‌گریز است و یون سدیم نیز تمایل به برقراری برهم‌کنش الکترو استاتیک با بخش‌های دارای بار منفی دارد. برهم‌کنش‌های سروتونین در این جا می‌تواند توجیهی برای حضور اسیدهای آمینه‌ی آب‌گریز در دسته‌ی رو به لومن باشد. یکی از نکات قابل توجه، نوع و درصد حضور رزیدو ها در این دسته است. بیش‌ترین فراوانی اسیدهای آمینه در دسته‌ی رو به لومن به ترتیب مربوط به گلايسین (۱۵٪)، سرین و ایزو لوسین (۱۳٪) و کم‌ترین فراوانی مربوط به متیونین و هیستیدین (۰٪) است. البته هیستیدین در هر چهار گروه فراوانی صفر دارد. بنا بر این چنان که قابل مشاهده است، فراوانی اسیدهای آمینه‌ی کوچک در دسته‌ی رو به لومن از سایر اسیدهای آمینه بیشتر است. می‌توان گفت که فراوانی بالای اسیدهای آمینه‌ی کوچک در این دسته، احتمالاً به دلیل لزوم شکل‌گیری فضای خالی لومن جهت عبور سروتونین و یون است. لازم به ذکر است که کمترین میزان همبستگی میان چهار دسته مربوط به دسته‌های رو به لومن و رو به لیپید، و نیز رو به لومن و چپ می‌باشد. در این دو دسته‌ای که کم‌ترین

همبستگی را با دسته ی رو به لومن دارند، کم ترین فراوانی رزیدوهای کوچک دیده می شود. بر اساس ساختار حاصل از کریستالو گرافی پروتئین 5-HTT (5i6z)، جهت گیری زنجیره ی جانبی رزیدوهای قرار گرفته در این دسته بیشتر به سمت لومن پروتئینی است. با توجه به این جهت گیری و البته ساختار کوکریستال 5-HTT که به همراه سیتالو پرام در جایگاه اتصال مرکزی به دست آمده است، می توان گفت رزیدوهایی از فضای کانالی که در جا به جایی و اتصال لیگندهایی نظیر داروهای ضد افسردگی به این پروتئین نقش دارند، در این دسته قرار می گیرند. بر اساس یافته های قبلی، تعدادی از اسیدهای آمینه ی موثر در اتصال داروی ضد افسردگی اس- سیتالو پرام به پاکت مرکزی 5-HTT شامل Tyr95، Ala169، Ile172 و Ser438 هستند (۵). مقایسه ی نتایج به دست آمده از ساختار کوکریستال و نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد تمامی این رزیدوها در دسته ی رو به لومن قرار می گیرند. بنا بر این این نکته نیز تایید کننده ی نقش رزیدوهای دسته ی رو به لومن در بر هم کنش با لیگاند است.

در این مطالعه مقایسه ی دسته های چهارگانه ی دو مدل ساخته شده به روش همولوژی (Mdl-1 و Mdl-2) و دو ساختار کریستالو گرافی (5i6z و 5i71)، روشی جدید برای سنجش میزان صحت مدل سازی همولوژی در مدل کردن هلیکس های غشایی یک پروتئین انتقال دهنده ارائه می دهد. در ساخت مدل اول، الگویی باکتریایی با شباهت ۳۸ و یکسانی (identity) ۲۲ درصد مورد استفاده قرار گرفت. در ساخت مدل دوم نیز از الگوی انتقال دهنده ی دوپامین *Drosophila melanogaster* با شباهت ۶۰ و یکسانی ۴۴ درصد استفاده شد. تفاوت ۲۲ درصدی میزان شباهت توالی های الگو با توالی پروتئین هدف (5-HTT)، در ساخت مدل های سه بعدی، منجر به ایجاد تفاوت های چشم گیری در میزان فراوانی اسیدهای آمینه شده است که توسط ضرایب همبستگی میان ۴ دسته ی آمینو اسیدی تایید می شود. بر اساس داده های بخش نتایج، میانگین ضرایب همبستگی میان دسته های ۴ گانه ی ساختار مرجع (5i6z) و مدل اول (Mdl-1) در مقایسه

با میانگین همین ضرایب برای مدل دوم (Mdl-2) ۱۳٪ کم تر است. میزان این اختلاف در ضرایب همبستگی میان دسته های رو به لومن دو مدل با ساختار مرجع به بیش ترین مقدار (۲۹٪) می رسد. ضرایب همبستگی میان ساختارهای مرجع و Mdl-2 نشان دهنده ی ضریب همبستگی ۰/۹۳ رزیدوها در دسته ی رو به لیپید، ۰/۹۱ در رو به لومن، ۰/۸۲ در چپ و ۰/۸۱ در دسته ی راست است. در حالی که مقادیر متناظر این ضرایب در Mdl-1 به ترتیب ۰/۸۷، ۰/۶۲، ۰/۸۰ و ۰/۶۸ است. اهمیت این تفاوت زمانی معلوم می شود که بدانیم ضریب همبستگی در دو ساختار کریستالو گرافی دارای لیگاند و بدون لیگاند سیتالو پرام (در پاکت اتصال مرکزی) کاملاً برابر است. آن چه می توان نتیجه گرفت این است که با تغییر الگوی مورد استفاده در ساخت مدل، اسیدهای آمینه ی دسته های ۴ گانه دستخوش تغییرات جدی می شوند که منجر به تغییر ترکیب رزیدوهای این دسته ها می شود. این بدین معنی است که رزیدوهای هرکدام از این دسته ها ممکن است در موقعیت های دیگر مکانی و در نتیجه در یکی دیگر از دسته ها قرار بگیرند؛ مساله ای که به معنی تغییری اساسی در این مدل ها است. بررسی ضرایب همبستگی تک تک دسته های اسید آمینه ای مدل ضعیف تر (Mdl-1) و مدل بهتر (Mdl-2) با ساختار مرجع، جا به جایی مکانی رزیدوها با تغییر الگو را در همه ی دسته ها نشان می دهد. این استفاده از ضرایب همبستگی در بررسی میزان صحت مدل ها، در مطالعات پیشین ارزیابی مدل سازی همولوژی مورد استفاده قرار نگرفته است (۲۸-۳۰). در مطالعات پیشین سنجش میزان صحت مدل، عموماً از روش های معمول نظیر بررسی RMSD میان کربن های آلفای مدل ها و ساختار مرجع در حالت هم تراز ی سه بعدی (superimposed) استفاده شده است.

با توجه به این یافته ها همچنین می توان نتیجه گرفت در مدل سازی پروتئین های غشایی نظیر ترانسپورترها که ساختاری مشابه 5-HTT دارند، استفاده از الگویی با همسانی کمتر از ۳۰٪ نتایج غیر قابل قبولی ارائه داده و مدل را تقریباً غیر قابل استفاده می کند. این نتیجه، یافته های قبلی (یعنی استفاده از

الگوهای با حداقل یکسانی ۳۰٪ را تایید کرده و نشان می‌دهد در مورد مدل‌سازی انتقال دهنده‌های غشایی نیز می‌توان بر این یافته‌ها تکیه کرد.

اهمیت بالینی پروتئین 5-HTT در طراحی داروهای ضد افسردگی در کنار غشایی بودن آن، منجر شده مطالعه‌ی ساختار و ترکیب اسیدهای آمینه‌ی این پروتئین اهمیت خاصی بیابد. آن چه در این پژوهش به انجام رسیده، آنالیز و دسته‌بندی ترکیب اسیدهای آمینه‌ی هلیکس‌های غشایی 5-HTT با روشی مبتنی بر جهت‌گیری زنجیره‌ی جانبی رزیدوها است. اهمیت چنین روش ابداعی دسته‌بندی در این مقاله آن است که اساس ساختار بسیاری از پروتئین‌های سر تا سر غشایی، هلیکس‌های غشایی آن‌هاست؛ چنان که بخش اعظم رزیدوهای این پروتئین‌ها در هلیکس‌های غشایی آن‌ها قرار می‌گیرد. بنا بر این دسته‌بندی رزیدوهای هلیکسی بر اساس جهت‌گیری زنجیره‌های جانبی می‌تواند در جنبه‌های مختلف آنالیز ساختاری این گروه از پروتئین‌ها و کسب اطلاعات جدید سودمند باشد. ترکیبات رزیدوهای به دست آمده در هر کدام از دسته‌ها، اطلاعات جالبی درباره‌ی عملکرد اسیدهای آمینه در هر کدام از موقعیت‌های چهارگانه به دست می‌دهد. بیشترین حضور رزیدوهای آب‌گریز در

هلیکس‌ها با ۷۲٪، مربوط به دسته‌ی رو به لیپید است. این در حالی است که در دسته‌های راست، چپ و رو به لومن سهم رزیدوهای آب دوست بیشتر بوده و به ویژه در دسته‌ی رو به لومن به ۴۹٪ می‌رسد. ترکیب اسید آمینه‌ای دسته‌های رو به لیپید و راست بیشترین شباهت را با یکدیگر دارد و کم‌ترین شباهت در ترکیب اسیدهای آمینه نیز میان دسته‌های چپ و رو به لومن دیده می‌شود. استفاده از بررسی‌هایی نظیر آن چه در این مطالعه صورت گرفته است، شناخت بهتری از نحوه‌ی ارتباط با غشا و عملکرد پروتئین 5-HTT و به واسطه آن، عملکرد خانواده‌ی انتقال دهنده‌های غشایی نورو ترانسمیترها به دست می‌دهد. از این نوع دسته‌بندی جدید می‌توان در بررسی کیفیت مدل‌های ساختاری مربوط به پروتئین‌های غشایی غنی از هلیکس استفاده کرد.

### سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری آقایان عبدالله شیرازی، حبیب طاهری و دکتر رهبر قاسمی صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

### References:

1. Wang CI, Lewis RJ. Emerging structure function relationships defining monoamine NSS transporter substrate and ligand affinity. *Biochem Pharmacol* 2010; 15;79:1083-91.
2. Arkin IT, Brunger AT. Statistical analysis of predicted transmembrane  $\alpha$ -helices. *Biochim Biophys Acta Mole Enzymol* 1998;8;1429:113-28.
3. Andersen J, Olsen L, Hansen KB, Taboureau O, Jorgensen FS, Jorgensen AM, et al. Mutational mapping and modeling of the binding site for S-citalopram in the human serotonin transporter. *J Biol Chem* 2010;285:2051-63.
4. Field JR, Henry LK, Blakely RD. Transmembrane domain 6 of the human serotonin transporter contributes to an

aqueously accessible binding pocket for serotonin and the psychostimulant 3, 4-methylene dioxymethamphetamine. *J Biol Chem* 2010;285:11270-80.

5. Coleman JA, Green EM, Gouaux E. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature* 2016;532:334-9.

6. Zhang L, Liu L, Maltsev S, Lorigan GA, Dabney-Smith C. Investigating the interaction between peptides of the amphipathic helix of Hcf106 and the phospholipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta Biom* 2014;1838:413-8.

7. Ulmschneider MB, Sansom MS. Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Acta Biom* 2001;1512:1-4.

8. Hildebrand PW, Preissner R, Frommel C. Structural features of transmembrane helices. *FEBS Let* 2004 13;559:145-51.
9. Worch R, Bokel C, Hofinger S, Schwille P, Weidemann T. Focus on composition and interaction potential of single pass transmembrane domains. *Proteomics* 2010;10:4196-208.
10. Sinning S, Musgaard M, Jensen M, Severinsen K, Celik L, Kolds H, et al. Binding and orientation of tricyclic antidepressants within the central substrate site of the human serotonin transporter. *J Biol Chem* 2010; 12;285:8363-74.
11. Ravna AW, Sylte I, Dahl SG. Molecular mechanism of citalopram and cocaine interactions with neurotransmitter transporters. *J Pharmacol Exp Therap* 2003;307:34-41.
12. Hahn MK, Blakely RD. The functional impact of SLC6 transporter genetic variation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47:401-41.
13. Scanlon SM, Williams DC, Schloss P. Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. *Biochemistry* 2001;40:10507-13.
14. Tusnady GE, Dosztanyi Z, Simon I. Transmembrane proteins in the protein data bank identification and classification. *Bioinformatics* 2004;20:2964-72.
15. Webb B, Sali A. Protein structure modeling with Modeller. *Protein Struc Pred* 2014;1-5.
16. Guex N, Peitsch MC. SWISS model and the Swiss Pdb viewer an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18:2714-23.
17. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud SE, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *Humana Pre* 2005;22:141-6.
18. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mole Biol* 1982;157:105-32.
19. Pantano DA, Klein ML. Characterization of membraneprotein interactions for the leucine transporter from *Aquifex aeolicus* by molecular dynamics calculations. *J Phys Chem B* 2009;113:13715-22.
20. Chou PY, Fasman GD. Structural and functional role of leucine residues in proteins. *J Mole Biol* 1973;74:263-81.
21. Melicheroik M, Holubekova A, Hianik T, Urban J. Effect of the aminoacid composition of model  $\alpha$ -helical peptides on the physical properties of lipid bilayers and peptide conformation a molecular dynamics simulation. *J Mole Mod* 2013;19:4723-30.
22. Jesus AJ, Allen TW. The role of tryptophan side chains in membrane protein anchoring and hydrophobic mismatch. *Biochim Biophys Acta Biome* 2013;1828:864-76.
23. Adamian L, Liang J. Helix helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins. *J Mole Biol* 2001;311:891-907.
24. Degrado WF, Gratkowski H, Lear JD. How do helix-helix interactions help determine the folds of membrane proteins? Perspectives from the study of homo oligomeric helical bundles. *Protein Sci* 2003;12:647-65.
25. Bowie JU. Helix packing in membrane proteins. *J Mole Biol* 1997;272:780-9.
26. Forrest LR, Zhang YW, Jacobs MT, Gesmonde J, Xie L, Honig BH, et al. Mechanism for alternating access in neurotransmitter transporters. *Proceed National Acad Sci* 2008;105:10338-43.
27. Shi L, Quick M, Zhao Y, Weinstein H, Javitch JA. The mechanism of a neurotransmitter sodium symporter inward release of Na<sup>+</sup> and substrate is triggered by substrate in a second binding site. *Mole Cell* 2008;30:667-77.
28. Forrest LR, Tang CL, Honig B. On the accuracy of homology modeling and sequence alignment methods applied to membrane proteins. *Biophys J* 2006;91:508-17.
29. Modi V, Xu Q, Adhikari S, Dunbrack RL. Assessment of template based modeling of protein structure in CASP11. *Proteins Struc Fun Bioinform* 2016;84:200-20.

30. Kufareva I, Katritch V, Stevens RC, Abagyan R. Advances in GPCR modeling evaluated by the GPCR Dock 2013

assessment meeting new challenges. Structure 2014;22:1120-39.

## Clustering Membrane Helical Residues in the Human Serotonin Transporter

Shariatpanahi A<sup>1</sup>, Taghizadeh M<sup>2\*</sup>, Goliaei B<sup>2</sup>, Madadkar Sobhani A<sup>2</sup>

(Received: February 6, 2017 Accepted: May 20, 2017)

### Abstract

**Introduction:** Recently, 6 crystallographic structures of the pharmacologically important human serotonin transporter protein (5-HTT) were reported. In the present survey, two of these crystallographic structures and two homology models were used to study the distribution of 5-HTT's residues based on their position and orientation. The aim here was to understand the structural and functional roles of membrane helices better in transporters and the costs/benefits of using homology models in such studies.

**Materials & methods:** The membrane helical segments of 5-HTT were identified using a KD-hydrophathy plot. The classification of membrane helical residues into 4 groups (Lipid-facing, Lumen-facing, Right and Left) was done using a novel method considering residue positions. Also two 3D structural models of 5-HTT were generated using MODELLER based on templates with 38% and 60% similarities.

**Findings:** Although the majority of hydrophobic residues in membrane helices

were in the Lipid-facing cluster, a considerable percentage of them laid within the Lumen-facing cluster. In the Lipid-facing cluster, Ile, Leu, Val, Thr, Ala and Phe were the most frequent residues, respectively. Thus, their 3D positioning patterns were responsible for most of protein-lipid interactions and the functions of these interactions.

**Discussion & conclusions:** Judging by the correlation coefficients, Lipid-facing and Right clusters are the most similar. This suggests that helices may rotate during the outward-inward conformational switch of the transporters. Our model-crystal structure comparisons demonstrate that in the case of membrane transporters, using a template with 38% similarity, results in poor modeling of the membrane helices. These findings can help us understand the structure and function of membrane helices in transporter proteins better.

**Keywords:** Residue-level study, 5-HTT, Homology modeling, Membrane helices, Membrane transporters

1. Dept of Cell and Molecular Biology, Tehran University, Tehran, Iran

2. Institute of Biochemistry and Biophysics, Tehran University, Tehran, Iran

\* Correspondin authorEmail: mtaghizadeh@alumni.ut.ac.ir