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

علی شریعت پناهی [۱]، محمد تقی زاده [۲*]، بهرام گلیایی [۲]، آرمین مددکار سبحانی [۲]

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 مطالعه‌ی ترکیب اسید های آمینه ی 5-HTT پرداخته شده است تا درک بهتری از نقش ساختاری و عملکردی هلیکس های غشایی در انتقال دهنده‌ها، و هم چنین مزایا و معایب استفاده از مدل‌های همولوژی در این مطالعات مشخص شود.

مواد و روش‌ها: ابتدا نواحی هلیکس های غشایی در 5-HTT به وسیله ی نمودار هیدروپاتی کایت و دولیتل مشخص شد. سپس اسیدهای آمینه‌ی 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 نرم‌افزار 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 دهنده‌ی سروتونین انسانی به دست آوریم. به طور مثال، علی رغم آن که اکثر رزیدوهای آب گریز هلیکس‌ها در دسته‌ی رو به لیپید قرار دارند، درصد قابل توجهی از آن‌ها در دسته‌ی رو به لومن حضور دارند. رزیدو های ایزو لوسین، لوسین، والین، ترئونین، آلانین و فنیل آلانین به ترتیب بیش ترین فراوانی را در دسته‌ی 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 نتیجه‌گیری: بر اساس ضرایب همبستگی، ترکیب رزیدو های دسته‌های رو به لیپید و راست پروتئین بیش ترین شباهت را به یکدیگر دارد. این نکته پیشنهاد می‌دهد که هلیکس های غشایی احتمالا در تغییر کنفورماسیون ناشی از باز و بسته شدن انتقال دهنده، دستخوش چرخش می‌شوند. هم چنین مقایسه‌ی ساختارهای حاصل از کریستالو گرافی با مدل‌ها نشان می‌دهد استفاده از الگویی با شباهت ۳۸٪ برای مدل سازی همولوژی پروتئین‌های انتقال دهنده، هلیکس های غشایی را به نحو نامناسبی مدل می‌کند. این یافته ها می‌توانند در درک بهتر ساختار و عملکرد هلیکس های غشایی پروتئین‌های انتقال دهنده موثر باشند.

واژه‌های کلیدی: مطالعه در سطح رزیدو، پروتئین انتقال دهنده سروتونین انسانی، مدل سازی همولوژی، پروتئین‌های انتقال دهنده، هلیکس‌های 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

مقدمه

انتقال دهنده های دستگاه عصبی مرکزی در دو دسته‌ی SLC1 و SLC6 جای می‌گیرند. دسته‌ی 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 بوتریک اسید (GABA) و گلایسین (Gly) ایفای نقش می‌کنند (۱). پروتئین سر تا سر غشایی انتقال دهنده‌ی سروتونین انسانی که با نام‌های 5-HTT، hSERT و SLC6A4 نیز معرفی می‌شود، به خانواده‌ی 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 می‌کند. اهمیت پروتئین‌های غشایی مانند انتقال دهنده سروتونین زمانی بیشتر مشخص می‌شود که بدانیم بیش از ۷۵٪ از اهداف دارویی، به یکی از خانواده های پروتئین های غشایی مرتبط می‌شوند (۲). در این میان، انتقال دهنده‌ی 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 می‌باشد (۳). مطالعات ژنتیکی صورت گرفته بر روی 5-HTT هم چنین علاوه بر افسردگی، نشان از دخیل بودن این پروتئین در بیماری‌هایی 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 می‌تواند الگوی مناسبی برای مدل سازی دیگر پروتئین‌های انتقال دهنده‌ی انسانی باشد.

علی رغم مطالعات گسترده‌ای که بر روی 5-HTT به روش‌های مختلف انجام شده، مطالعات چندانی در سطح رزیدو بر روی بخش‌های غشایی ساختار سه بعدی این پروتئین صورت نگرفته است و لذا این پروتئین از جنبه‌هایی مانند نحوه‌ی ارتباط و عملکرد بخش‌های 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 آمینه‌ی آن پرداخته است (۶))، در سایر مطالعات بخش غشایی مورد مطالعه قرار نگرفته است. در واقع در سایر مطالعات صورت گرفته برروی ترکیب اسیدهای آمینه‌ی پروتئین‌های غشایی نیز اسیدهای آمینه‌ی بدون توجه به جهت گیری زنجیره‌ی جانبی رزیدوها مورد بررسی قرار گرفته اند. اغلب مطالعات صورت گرفته برروی ترکیب اسیدهای آمینه‌ی پروتئین‌های سراسر غشایی، به بررسی آماری مجموعه داده‌هایی متشکل از تعدادی پروتئین با ساختار سه بعدی مشخص می‌پردازند که ساختار سه بعدی پروتئین 5-HTT در میان آن‌ها نیست. هم چنین در این مطالعات دسته بندی خاصی مشابه تحقیق حاضر، مشاهده نمی‌شود. در بعضی از این مطالعات، پروتئین‌های غشایی بررسی شده، از ساختارهای آلفا هلیکس و رشته های بتا تشکیل شده اند (۷) و پروتئین‌های بررسی شده در برخی مطالعات دیگر، صرفا شامل تعدادی پروتئین هلیکسی با کیفیت و وضوح ساختاری بالا بوده اند (۸). در مطالعه‌ی دیگری که در سال ۲۰۱۰ منتشر شده است، ترکیب اسید های آمینه‌ی تعدادی از پروتئین‌های 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 بیماری‌هایی نظیر افسردگی نقشی مهم ایفا می‌کنند (۳). کشف و طراحی این داروها به ویژه در سال‌های اخیر، مدیون استفاده از روش‌های 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 روش‌هایی 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 می‌شود. مدل سازی به روش همولوژی کاربردهای متفاوتی دارد و مدل‌های حاصل برای اهداف گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرند. به عنوان

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

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 سیتالو پرام، با پاکت اتصال این پروتئین هم پوشانی دارد. با استفاده از این نکته، عناصر ساختاری دخیل در اتصال با تمایل بالا نیز مشخص شده اند (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، اسید های آمینه‌ی هلیکس‌های غشایی یک ساختار حاصل از کریستالو گرافی بر اساس جهت 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 نشده اند. 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 ایجاد کننده‌ی 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 کریستالو گرافی اشعه ایکس پروتئین 5-HTT شامل ساختار پروتئین بدون لیگاند (PDB ID: 5i6z) و ساختار پروتئین دارای لیگاند اس- سیتالو پرام 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 کریستالو گرافی انتقال دهنده‌ی باکتریایی وابسته به سدیم/کلر لوسین (LeuTAa) (PDB ID: 2A65) با شباهت ۳۸٪ و انتقال دهنده‌ی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

دوپامین Drosophila melanogaster (dDAT) (PDB ID: 4m48) با شباهت ۶۰٪ به عنوان الگو انتخاب شدند (۳). مدل سازی به روش همولوژی، با استفاده از اسکریپت‌های 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 وسیله‌ی توابع ارزیابی نرم افزار MODELLER 9v12 شامل DOPE score و MolPdf انجام شد. برای محاسبه‌ی نمودار Dope score، اسکریپت‌های evaluate template و evaluate model از نرم افزار MODELLER مورد استفاده قرار گرفتند. در ادامه، ارزیابی مدل منتخب به وسیله خروجی‌های نرم افزار Procheck (که نمودار راماچاندران را نیز در بر می‌گیرد) صورت گرفت. در نهایت دو مدل به عنوان بهترین مدل‌ها بر اساس الگوی باکتریایی (Mdl-1) و الگوی بی مهره (Mdl-2) انتخاب شدند.

هم ترازی سه بعدی ساختارها: در ادامه هم ترازی سه بعدی ساختار دارای لیگاند سیتالو پرام (5i71) و هم چنین مدل‌ها (Mdl-1,Mdl-2) با ساختار اصلی 5-HTT بدون لیگاند (5i6z) به عنوان ساختار مرجع، توسط نرم افزارSwiss pdb viewer نسخه v4.1 انجام شد (۱۶). RMSD هم ترازی کربن‌های آلفای ساختارها نیز در همین نرم افزار محاسبه شد.

نمودار هیدروپاتی: نمودار هیدروپاتی اسیدهای آمینه‌ی 5-HTT، توسط ابزار شناسایی و آنالیز پروتئین ProtScale در ExPASy به دست آمد (۱۷). مقادیر محاسبه شده برای ۶۱۷ اسید آمینه‌ی پروتئین هدف (5i6z)، بر اساس شاخص کایت و دولیتل محاسبه شد که در میان شاخص‌های موجود از پر کاربرد ترین موارد در حوزه تعیین دامنه‌های غشایی پروتئین‌ها است. بنا بر رویه‌ی استاندارد نرم افزار در بررسی توالی، دو پنجره‌ی 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 بازه‌ای 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 بازه‌ی ۱۳ تایی (رزیدوی شماره‌ی 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 بازه‌ی ۱۹ تایی، بر اساس اعداد بدست آمده رسم نمودار صورت گرفت.

دسته بندی و آنالیزهای آماری رزیدوهای پروتئین: پس از مشخص شدن هلیکس‌های نواحی غشایی پروتئین توسط پروفایل هیدروپاتی، رزیدوهای قرار گرفته در هر دور از این هلیکس‌ها 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 زنجیره‌ی جانبی اسیدهای آمینه نسبت به غشای لیپیدی بود. بر این اساس اسیدهای آمینه در یکی از ۴ دسته‌ی رزیدوهای رو به لیپید، راست، چپ و رو به لومن قرار گرفتند. توضیحات بیشتر در بخش نتایج قابل مشاهده است (شکل ۲). هم چنین فراوانی‌های مطلق و نسبی ۲۰ نوع اسید آمینه، با توجه به تعداد کل اسیدهای آمینه‌ی 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 شده‌اند (۱۸). ضرایب همبستگی پیرسون نیز برای بررسی میزان همبستگی میان فراوانی نسبی اسیدهای آمینه‌ی ۴ دسته محاسبه شد.

یافته های پژوهش

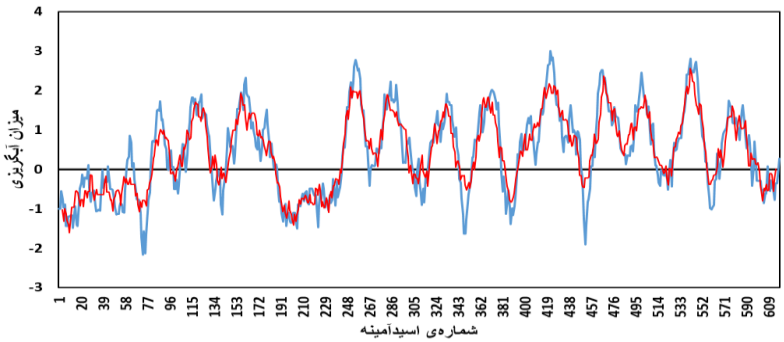
تعیین رزیدوهای غشایی 5-HTT: مشخص کردن رزیدوهای در ارتباط با غشا با استفاده از ساختار حاصل از کریستالو گرافی، در مرحله اول نیازمند بررسی نواحی آب گریز پروتئین است. مشخص کردن مرزهای بین نواحی غشایی و غیر غشایی در هلیکس‌های غشایی با استفاده از پروفایل هیدروپاتی انجام شد. شکل ۱، پروفایل هیدروپاتی بر اساس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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

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.

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



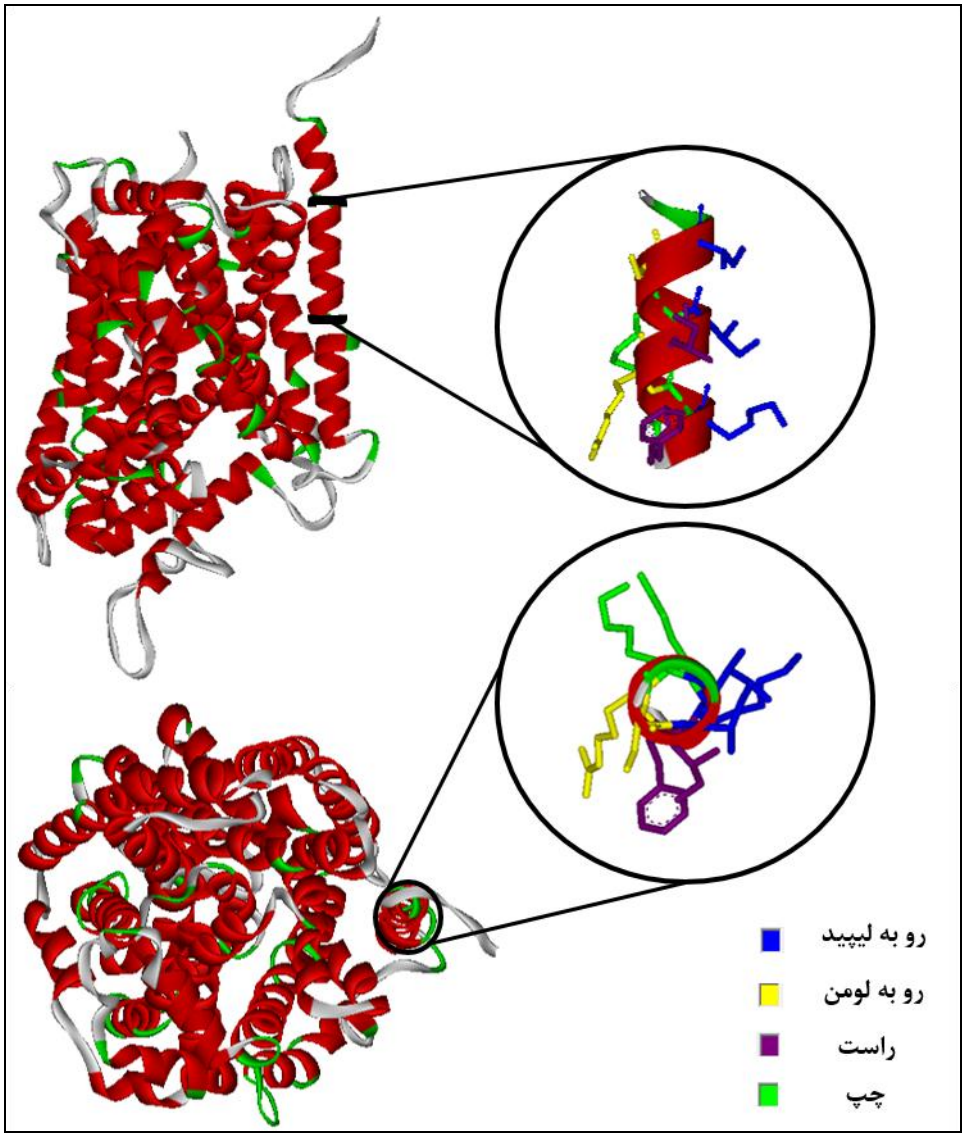
شکل ۱. پروفایل هیدروپاتی برای پروتئین 5-HTT (5i6z). منحنی آبی رنگ حاصل بررسی رزیدوها با پنجره ی ۱۳ تایی و منحنی قرمز رنگ حاصل بررسی با پنجره ی ۱۹ تایی هستند.

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، 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.

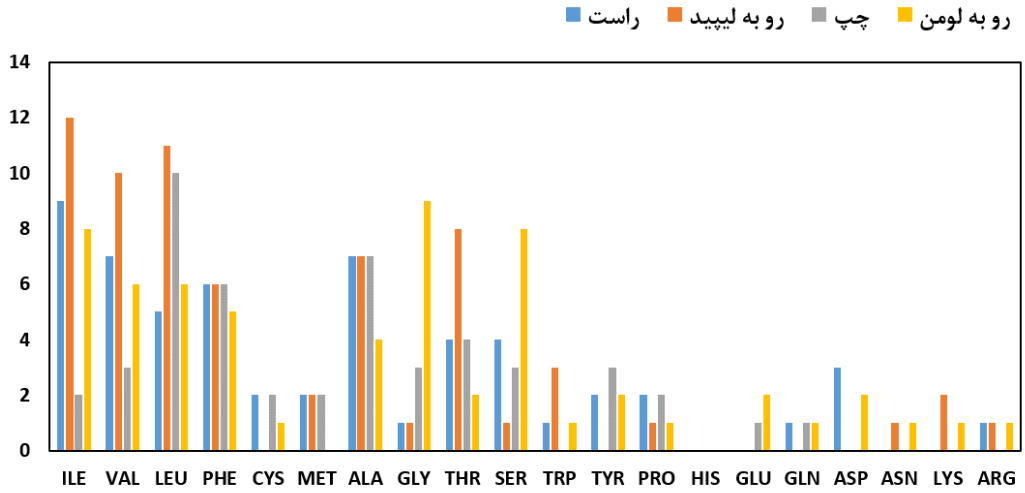
میزان فراوانی ۲۰ اسید آمینه‌ی طبیعی در میان این ۴ دسته در شکل ۳ قابل مشاهده است. در این نمودار، اسیدهای آمینه بر اساس افزایش عدد شاخص هیدروپاتی کایت و دولیتل، به ترتیب از چپ به راست منظم شده اند. فراوانی نسبی این رزیدوها در ۲۳۳ اسید آمینه‌ی انتخاب شده از ساختار اصلی نیز به این صورت است: ایزولوسین (۰/۱۳)، والین (۰/۱۱)، لوسین (۰/۱۴)، فنیل آلانین (۰/۱)، سیستئین (۰/۰۲)، متیونین (۰/۰۲)، آلانین (۰/۱)، گلایسین (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 عمکرد 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 گلایسین، 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.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]



شکل ۲. نحوه‌ی دسته بندی رزیدوهای ساختار پروتئین 5-HTT. ۴ دسته رزیدوی بررسی شده با رنگ‌های آبی (رو به لیپید)، زرد (روبه 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 نحوه‌ی بررسی آورده شده اند.



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).

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

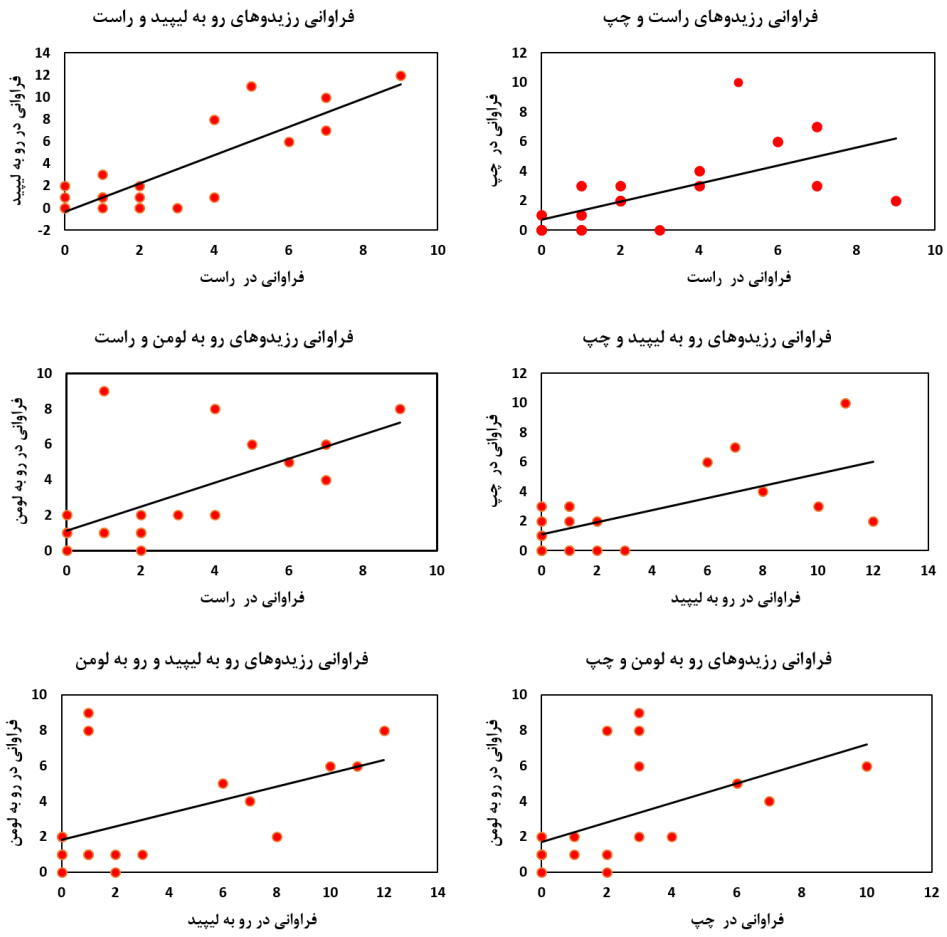
همبستگی دسته‌های چهارگانه‌ی انتخابی در هلیکس‌های غشایی 5-HTT: در میان ۴ دسته‌ی به دست آمده، برخی اسیدهای آمینه فراوانی‌های نسبی مشابهی داشتند. به عنوان مثال بیشتر رزیدوها در دسته‌های رو به لیپید و راست فراوانی‌های نسبی مشابهی داشتند و روند تغییرات فراوانی نسبی در این دو دسته به یکدیگر شباهت داشت. دسته‌هایی 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، کم ترین 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 احتمالا 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 ترازی‌های سه بعدی میان ساختارها (شکل ۵) نشان داد میزان RMSD هم ترازی کربن‌های آلفای ساختار مرجع با ساختارهای Mdl-1، Mdl-2 و ساختار 5i71 به ترتیب ۸/۶، 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.

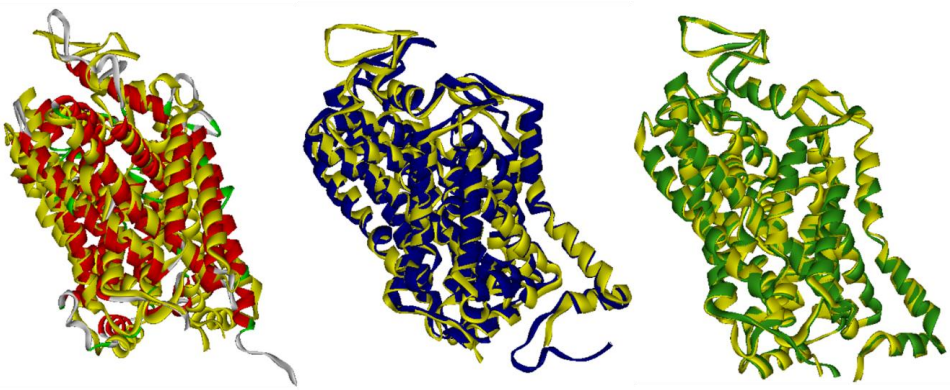
جدول ۱، ضرایب همبستگی میان دسته‌های متناظر اسید آمینه در ساختارهای ذکر شده را نشان می‌دهد. بر اساس جدول، بیشترین میزان همبستگی میان دسته‌های اسید آمینه در ساختارهای 5i6z و 5i71 دیده شد که این مسئله با توجه به RMSD اندک میان دو ساختار (۰/۵۱) تایید می‌شود. در مورد ساختارهای مدل Mdl-1 و Mdl-2، اختلاف در 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، می تواند منجر به اختلافی ۶ آنگسترومی در RMSD مدل ساخته شده با ساختار حاصل از کریستالو گرافی این پروتئین شود که مقداری قابل توجه است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]



شکل ۴. نمودار پراکندگی فراوانی نسبی انواع اسیدهای آمینه‌ی پروتئین 5-HTT (5i6z) در میان ۴ دسته‌ی انتخابی.



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

جدول ۱. مقایسه‌ی ضرایب همبستگی میان دسته‌های اسید آمینه‌ی 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	۱/۰۰
راست – راست	۰/۶۸	۰/۸۱	۱/۰۰
رو به لومن – رو به لومن	۰/۶۲	۰/۹۱	۱/۰۰
چپ – چپ	۰/۸	۰/۸۲	۱/۰۰

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

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 بر هم کنش انتقال دهنده‌های غشایی و غشای لیپیدی بپردازد نیز اندک است (۱۹). با توجه به این که تعیین ساختار پروتئین 5-HTT به روش کریستالو گرافی 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 کریستالو گرافی 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 کریستالو گرافی اشعه‌ی 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 کریستالو گرافی 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 سیتالو پرام (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 برروی 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 وآب‌گریز 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، پرا کنش اسیدهای آمینه‌ی ۱۵ پروتئین غشایی که مجموعاً دارای ۱۲۹ هلیکس هستند مورد مطالعه قرار گرفته است (۷). دو روش استفاده شده برای بررسی پرا کنش 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. هردو 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 بر هم 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 درمورد ساختار و عملکرد پروتئین غشایی 5-HTT پیشنهاد می‌دهد.

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

کنش زنجیره‌های جانبی آن‌ها با لیپیدهای غشایی است. براساس داده‌های ذکر شده در بخش نتایج، ترکیب اسیدهای آمینه‌ی ۱۲ هلیکس غشایی 5-HTT نشان دهنده‌ی حضور ۶۲ درصدی رزیدوهای آب گریز در این نواحی است. این در حالی است که میانگین این میزان در هلیکس‌های غشایی گیت‌های غشایی (سایر ترانسپورترها و کانال‌های یونی) به ٪۶۸/۵ می‌رسد (۸). این داده‌ها نشان دهنده‌ی کم تر بودن میزان آب - گریزی بخش غشایی 5-HTT از حد میانگین پروتئین های سراسر غشایی است. بنا بر این می‌توان نتیجه گرفت که بر هم کنش‌های هیدروفوب این پروتئین با لیپیدهای غشایی، از حد میانگین بر هم کنش پروتئین‌های غشایی کم تر است. علی رغم نزدیک بودن مقادیر شاخص هیدروپاتی در میان سه اسید آمینه‌ی 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 زنجیره‌های 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 رزیدوهای هلیکس‌ها است، تعدد رزیدوهای هلیکس ساز لوسین که در بخش‌های ساختاری مرتبط با غشا دیده می‌شود امری عادی است (۲۱). نکته دیگر این که میانگین فراوانی رزیدوهای آروماتیک در نواحی هلیکسی گیت‌های غشایی (به جز انتقال دهنده‌ی سروتونین انسانی) ٪۸ است (۸)، در حالی که مطالعه حاضر نشان می‌دهد این میزان در 5-HTT به حدود ٪۱۵ افزایش می‌یابد. یکی از فراوان ترین اسیدهای آمینه در ساختار پروتئین 5-HTT رزیدوی آروماتیک فنیل آلانین است که بالا ترین فراوانی را در میان رزیدوهای آروماتیک پروتئین نیز دارا است. از میان رزیدوهای آروماتیک پس از فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان به ترتیب از بالا ترین فراوانی برخور دارند. لازم به ذکر است علت کم تر بودن فراوانی تیروزین نسبت به فنیل آلانین ممکن است گروه هیدرو کسیل موجود در اسید آمینه‌ی تیروزین باشد که تنها تفاوت میان ساختار زنجیره‌ی جانبی در این دو اسید آمینه است. عدم وجود تیروزین در دسته رو به لیپید نیز در این جا جالب توجه است.

زنجیره‌ی جانبی آن دسته از رزیدوها که "رو به لیپید" نام گذاری شده‌اند، در میان لیپیدهای غشایی قرار می‌گیرد. داده‌های حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند بیش ترین تعداد اسیدهای آمینه‌ی آب گریز (٪۷۲) در دسته‌ی رو به لیپید جای دارند و دسته‌های راست، چپ و رو به لومن نیز به ترتیب با ۶۶،۶۵ و ۴۹ درصد از رزیدوهای آب گریز در جایگاه‌های بعدی قرار دارند. ایزو لوسین و لوسین دارای بلند ترین زنجیره‌ی جانبی در میان اسیدهای آمینه‌ی آب گریز می‌باشند و در عین حال هیدروفوب ترین رزیدوهای به کار رفته در ساختار انتقال دهنده‌ی سروتونین هستند. با توجه به وظیفه‌ی رزیدوهای دسته‌ی رو به لیپید در بر هم کنش با لیپیدهای غشایی، مشاهده‌ی بیش ترین حضور مربوط به این دو اسید آمینه در این دسته، خارج از انتظار نبوده است. علاوه بر این، مطالعات جهش زایی نشان می‌دهد تغییر در رزیدوهای Ile425 و Leu550 که در همین دسته قرار می‌گیرند، میزان فعالیت انتقال سروتونین و پایداری انتقال دهنده را تغییر می‌دهد (۵). این مسئله نقش مهم رزیدوها در دسته‌ی رو به لیپید را نشان می‌دهد. پس از لوسین و ایزو لوسین، والین نیز با داشتن زنجیره‌ی جانبی کوتاه تر (در میان رزیدوهای هیدروفوب آلیفاتیک) در درجه‌ی بعدی فراوانی قرار می‌گیرد. از سایر گروه‌های اسید آمینه‌ای که فراوانی قابل توجهی در دسته‌ی رو به لیپید دارند می‌توان به رزیدوهای آروماتیک اشاره کرد. فنیل آلانین و تریپتوفان موجود در دسته‌ی اسیدهای آمینه‌ی رو به لیپید، رزیدوهای آروماتیکی هستند که در ارتباط مستقیم با لیپیدهای غشایی قرار دارند (این در حالی است که فراوانی تیروزین در این دسته صفر است). آن چه به عنوان نقش اصلی این رزیدوها مشخص شده، کمک به اتصال و جهت گیری پروتئین‌ها در غشای لیپیدی است (۲۲, ۱۹). رزیدوهایی که فراوانی آن‌ها در دسته‌ی رو به لیپید صفر است، علاوه بر تیروزین شامل گلوتامین و رزیدوهای دارای بار الکتریکی منفی مانند آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید اند. انتظار می‌رود فراوانی رزیدوهای دارای بار الکتریکی مثبت مانند لایزین و آرژنین در دسته‌ی رو به لیپید که با لیپیدهای غشایی در تماس هستند، صفر باشد. اما مجموع فراوانی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

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

انتظار می‌رود رزیدو های دسته های راست و چپ بیشتر در بر هم کنش های هلیکس- هلیکس شرکت داشته باشند. این بر هم کنش‌ها نقشی مهم در حفظ ساختار سوم پروتئین‌های غشایی دارند (۲۴, ۲۳). در واقع، این بر هم کنش های پهلو به پهلوی هلیکس‌ها در غشای لیپیدی است که منجر به شکل گیری 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 آب گریز و کوچک آلانین با داشتن زنجیره‌ی جانبی کوتاه، نقش مهمی در این بر هم‌کنش‌ها 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 هم خوانی دارد (۷). رزیدوی لوسین در دسته چپ بیش ترین فراوانی را دارد. لوسین در بر هم کنش‌های هلیکس- هلیکس در ساختارهای موتیفی معروفی مانند زیپ لوسینی نقش دارد. لذا می‌توان انتظار داشت که این اسید آمینه در پروتئین 5-HTT در بر هم کنش‌های هلیکس- هلیکس نقش داشته باشد.

یکی از نتایج بسیار جالب در این کار، وجود ضریب همبستگی ۸۴ درصدی میان دسته های راست و رو به لیپید است. چنین ضریب همبستگی بالایی، این احتمال را مطرح می‌کند که هلیکس های 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 برروی مکانیزم عملکرد انتقال دهنده های غشایی تا کنون چنین فرضیه‌ای مطرح نشده است (۲۷, ۲۶)، با این حال پیشنهاد چرخش هلیکس ها در این مطالعه می‌تواند راه گشای 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. همان طور که مشخص است، مولکول‌های آب دائما در حال عبور از لومن پروتئین هستند و بنابراین رزیدوهای آب دوست، بیشتر ترکیب رزیدوهای رو به لومن را تشکیل داده اند. نتایج ذکر شده در بخش یافته‌ها هم چنین تایید می‌کند که علی رغم وجود کمترین تعداد اسیدهای آمینه‌ی آب گریز در دسته‌ی رو به لومن (در میان ۴ دسته)، درصد رزیدوهای آب گریز 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 بنزنی، دارای بخش آب گریز است و یون سدیم نیز تمایل به بر قراری بر هم کنش الکترو استاتیک با بخش‌های دارای بار منفی دارد. بر هم کنش‌های سروتونین در این جا می‌تواند توجیهی برای حضور اسیدهای آمینه‌ی آب گریز در دسته‌ی رو به لومن باشد. یکی از نکات قابل توجه، نوع و درصد حضور رزیدو ها در این دسته است. بیش ترین فراوانی اسیدهای آمینه در دسته‌ی رو به لومن به ترتیب مربوط به گلایسین (۱۵٪)، سرین و ایزو لوسین (۱۳٪) و کم ترین 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، احتمالا به دلیل لزوم شکل گیری 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 کم ترین

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

همبستگی را با دسته‌ی رو به لومن دارند، کم ترین فراوانی رزیدوهای کوچک دیده می‌شود. بر اساس ساختار حاصل از کریستالو گرافی پروتئین 5-HTT (5i6z)، جهت گیری زنجیره‌ی 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، می‌توان گفت رزیدوهایی از فضای کانالی که در جا به جایی و اتصال لیگاندهایی نظیر داروهای ضد افسردگی به این پروتئین نقش دارند، در این دسته قرار می‌گیرند. بر اساس یافته‌های قبلی، تعدادی از اسیدهای آمینه‌ی موثر در اتصال داروی ضد افسردگی اس- سیتالو پرام به پاکت مرکزی 5-HTT شامل Tyr95، Ala169، Ile172 و Ser438 هستند (۵). مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از ساختار کوکریستال و نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد تمامی این رزیدوها در دسته‌ی رو به لومن قرار می‌گیرند. بنا بر این این نکته نیز تایید کننده‌ی نقش رزیدوهای دسته‌ی رو به لومن در بر هم کنش با لیگاند است.

در این مطالعه مقایسه‌ی دسته‌های چهارگانه‌ی 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 هلیکس‌های غشایی یک پروتئین انتقال دهنده ارائه می‌دهد. 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 دهنده‌ی دوپامین Drosophila melanogaster با شباهت ۶۰ و یکسانی ۴۴ درصد استفاده شد. تفاوت ۲۲ درصدی میزان شباهت توالی‌های الگو با توالی پروتئین هدف (5-HTT)، در ساخت مدل‌های سه بعدی، منجر به ایجاد تفاوت‌های چشم گیری در میزان فراوانی اسیدهای آمینه شده است که توسط ضرایب همبستگی میان ۴ دسته‌ی آمینو اسیدی تایید می‌شود. بر اساس داده‌های بخش نتایج، میانگین ضرایب همبستگی میان دسته‌های ۴ گانه‌ی 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 دسته‌های رو به لومن دو مدل با ساختار مرجع به بیش ترین مقدار(۲۹٪) می‌رسد. ضرایب همبستگی میان ساختارهای مرجع و Mdl-2 نشان دهنده‌ی ضریب همبستگی۰/۹۳ رزیدوها در دسته‌ی رو به لیپید، ۰/۹۱ در رو به لومن، ۰/۸۲ در چپ و ۰/۸۱ در دسته‌ی 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 می‌شود که بدانیم ضریب همبستگی در دو ساختار کریستالو گرافی دارای لیگاند و بدون لیگاند سیتالو پرام (در پاکت اتصال مرکزی) کاملا برابر است.

آن چه می‌توان نتیجه گرفت این است که با تغییر الگوی مورد استفاده در ساخت مدل، اسیدهای آمینه‌ی دسته‌های ۴ گانه دستخوش تغییرات جدی می‌شوند که منجر به تغییر ترکیب رزیدوهای این دسته‌ها می‌شود. این بدین معنی است که رزیدوهای هرکدام از این دسته‌ها ممکن است در موقعیت‌های دیگر مکانی و در نتیجه در یکی دیگر از دسته‌ها قرار بگیرند: مساله‌ای که به معنی تغییری اساسی در این مدل‌ها است. بررسی ضرایب همبستگی تک تک دسته‌های اسید آمینه‌ای مدل ضعیف تر (Mdl-1) و مدل بهتر (Mdl-2) با ساختار مرجع، جا به جایی مکانی رزیدوها با تغییر الگو را در همه‌ی دسته‌ها نشان می‌دهد. این استفاده از ضرایب همبستگی در بررسی میزان صحت مدل‌ها، در مطالعات پیشین ارزیابی مدل سازی همولوژی مورد استفاده قرار نگرفته است (۲۸-۳۰). در مطالعات پیشین سنجش میزان صحت مدل، عموما از روش‌های معمول نظیر بررسی RMSD میان کربن‌های آلفای مدل‌ها و ساختار مرجع در حالت هم ترازی سه بعدی (superimposed) استفاده شده است.

با توجه به این یافته‌ها همچنین می‌توان نتیجه گرفت در مدل‌سازی پروتئین‌های 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 تقریبا غیر قابل استفاده می‌کند. این نتیجه، یافته‌های قبلی (یعنی استفاده از

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

الگوهایی 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 دسته بندی ترکیب اسیدهای آمینه‌ی هلیکس‌های غشایی 5-HTT با روشی مبتنی بر جهت گیری زنجیره‌ی جانبی رزیدوها است. اهمیت چنین روش ابداعی دسته بندی 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 دسته بندی رزیدوهای هلیکسی بر اساس جهت گیری 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 هرکدام از موقعیت‌های چهارگانه به دست می‌دهد. بیشترین حضور رزیدوهای آب گریز 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 کم ترین 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 دسته بندی 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 Pharmacol2010 15;79:1083-91.

2. Arkin IT, Brunger AT. Statistical analysis of predicted transmembrane α-helices. Biochim Biophys Act Mole Enzymol1998;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. Nature2016;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 Act Biom 2014;1838:413-8.

7. Ulmschneider MB, Sansom MS. Amino acid distributions in integral membrane protein structures. Biochim Biophys Act Biom2001;1512:1-4.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

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. Proteomics2010;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 Chem2010; 12;285:8363-74.

11. Ravna AW, Sylte I, Dahl SG. Molecular mechanism of citalopram and cocaine interactions with neurotransmitter transporters. J Pharmacol ExpTherap2003;307:34-41.

12. Hahn MK, Blakely RD. The functional impact of SLC6 transporter genetic variation. Annu Rev Pharmacol Toxicol2007; 47:401-41.

13. Scanlon SM, Williams DC, Schloss P. Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. Biochemistry2001;40:10507-13.

14. Tusnady GE, Dosztanyi Z, Simon I. Transmembrane proteins in the protein data bank identification and classification. Bioinformatics2004;20:2964-72.

15. Webb B, Sali A. Protein structure modeling with Modeller. Protein Struc Pred2014:1-5.

16. Guex N, Peitsch MC. SWISS model and the Swiss Pdb viewer an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis1997;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 Biol1982;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 B2009;113:13715-22.

20. Chou PY, Fasman GD. Structural and functional role of leucine residues in proteins. J Mole Biol1973;74:263-81.

21. Melicheroik M, Holubekova A, Hianik T, Urban J. Effect of the aminoacid composition of model α-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 Act Biome2013;1828:864-76.

23. Adamian L, Liang J. Helix helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins. J Mole Biol2001;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 Sci2003;12:647-65.

25. Bowie JU. Helix packing in membrane proteins. J Mole Biol1997;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+ 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 J2006;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 Bioinform2016;84:200-20.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

30. Kufareva I, Katritch V, Stevens RC, Abagyan R. Advances in GPCR modeling evaluated by the GPCR Dock 2013 assessment meeting new challenges. Structure2014;22:1120-39.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]

Clustering Membrane Helical Residues in the Human Serotonin Transporter

Shariatpanahi A[1], Taghizadeh M[2], Goliaei B[2], Madadkar Sobhani A[2]*

(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-hydropathy 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*

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-04-23]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.57]