

دسته بندی اسید های آمینه‌ی هلیکس های غشایی در پروتئین انتقال دهنده‌ی سروتونین

انسانی

علی شریعت پناهی^۱، محمد تقی زاده^{۲*}، بهرام گلایابی^۲، آرمین مددکار سیحانی^۲

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

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

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۳/۰۹

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۱۸

چکیده

مقدمه: پروتئین انتقال دهنده‌ی 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 ساختارها و دو مدل ساخته شده به روش همولوژی، به طالعه‌ی ترکیب اسید های آمینه‌ی 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 وسیله‌ی 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 الگوهای 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، 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 کش های میان لیپید های غشایی و پروتئین و نقش این بر هم کش ها است.

بحث و نتیجه گیری: بر اساس ضرایب همیستگی، 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 احتمالاً 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 یافته‌ها 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.

مقدمه

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 ای آن پرداخته است (۶)، در سایر مطالعات بخش غشایی مورد مطالعه قرار نگرفته است. در واقع در سایر مطالعات صورت گرفته بر روی ترکیب اسید های آمینه ای پروتئین های غشایی نیز اسید های آمینه ای بدون توجه به جهت گیری زنجیره ای جانبی رزیدوها مورد بررسی قرار گرفته اند. اغلب مطالعات صورت گرفته بر روی ترکیب اسید های آمینه ای 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، صرفا شامل تعدادی پروتئین هلیکسی با کیفیت و وضوح ساختاری بالا بوده اند (۸). در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۰ منتشر شده است، ترکیب اسید های آمینه ای تعدادی از پروتئین های دارای یک گنر 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 قبل بررسی نیست (۱)، مدل سازی به روش همولوژی ابزاری قدرتمند برای مطالعه ای 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

انتقال دهنده های دستگاه عصبی مرکزی در دو دسته ای SLC1 و SLC6 جای می گیرند. دسته ای 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 گلاسین (Gly) ایفا نقش می کنند (۱). پروتئین سرتا سر غشایی انتقال دهنده سروتونین انسانی که با نام های 5-HTT hSERT و SLC6A4 نیز معروف می شود، به خانواده دوم تعلق دارد. این انتقال دهنده با تسهیل انتقال سروتونین در دو سوی غشاء نقش مهمی را در تنظیم مقادیر خارج سلوی 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 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 وسوس اجباری OCD (Obsessive Compulsive Disorder) 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 ای 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 ارتباط و عملکرد بخش های مرتبط با غشاء و ترکیب اسید های آمینه، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. هم چنین با وجود

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 آمینه دسته‌ی رو به لومن در ارتباط هستند. بر اساس روش جدید دسته‌ی 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 PDB گرفته شد. سپس مدل سازی به روش همولوژی نیز با استفاده از دو الگوی متفاوت برای این پروتئین انجام شد. برای یافتن الگوهای 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

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 شده‌اند (۱۰، ۱۱). اسیدهای آمینه‌ی مختلف در قسمت غشایی بر اساس جهت گیری خود، برهمن 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 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 نشده‌اند. یکی از اهداف بررسی ساختارهای سه بعدی پروتئین 5-HTT در این کار، مشخص کردن ترکیب رزیدوهاست 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

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 تا یک، 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 هیدرопاتی، 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 ViewerLite در یک نرم افزار نمایش دهنده ساختار 5.0 (accelrys) صورت گرفت. مبنای این تقسیم بندی، جهت گیری زنجیره‌ی جانبی اسیدهای آمینه نسبت به غشای لبییدی بود. بر این اساس اسیدهای آمینه در یکی از ۴ دسته‌ی رزیدوهای رو به لبید، 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 هیدرопاتی 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 هیدرопاتی انجام شد. شکل ۱، پروفایل هیدرопاتی بر اساس شاخص کایت و دولیتل را برای نواحی مختلف ساختار اصلی پروتئین 5-HTT (5i6z) نشان می‌دهد. بررسی اسیدهای آمینه، دو بار و

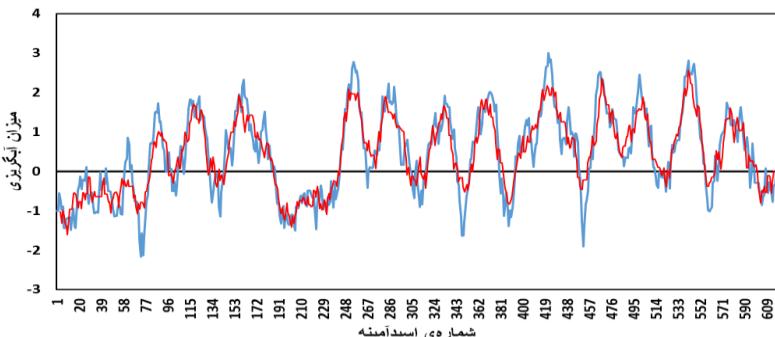
Dopamine Drosophila melanogaster (dDAT) (PDB ID: 4m48) با شباهت ۶۰٪ به عنوان الگو انتخاب شدند (۳). مدل سازی به روش همولوژی، با استفاده از اسکریپت‌های align2d و MODELLER 9v12 نرم افزار (۱۵) و با ساخت ۳۰۰۰ مدل برای هر یک از الگوها انجام شد. انتخاب بهترین مدل ابتدا به وسیله‌ی توابع ارزیابی نرم افزار MODELLER 9v12 و DOPE score شامل MolPdf انجام شد. برای محاسبه نمودار evaluate template و score، اسکریپت‌های 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 افزار Swiss pdb viewer v4.1 نسخه RMSD انجام شد (۱۶). هم ترازی کربن‌های آلفای ساختارها نیز در همین نرم افزار محاسبه شد.

نمودار هیدرопاتی: نمودار هیدرопاتی اسیدهای آمینه 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 روبه‌ی استاندارد نرم افزار در بررسی توالی، دو پنجره‌ی ۱۳ و ۱۹ تا یک 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 تا یک 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 تا یک (رزیدوی

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.

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.

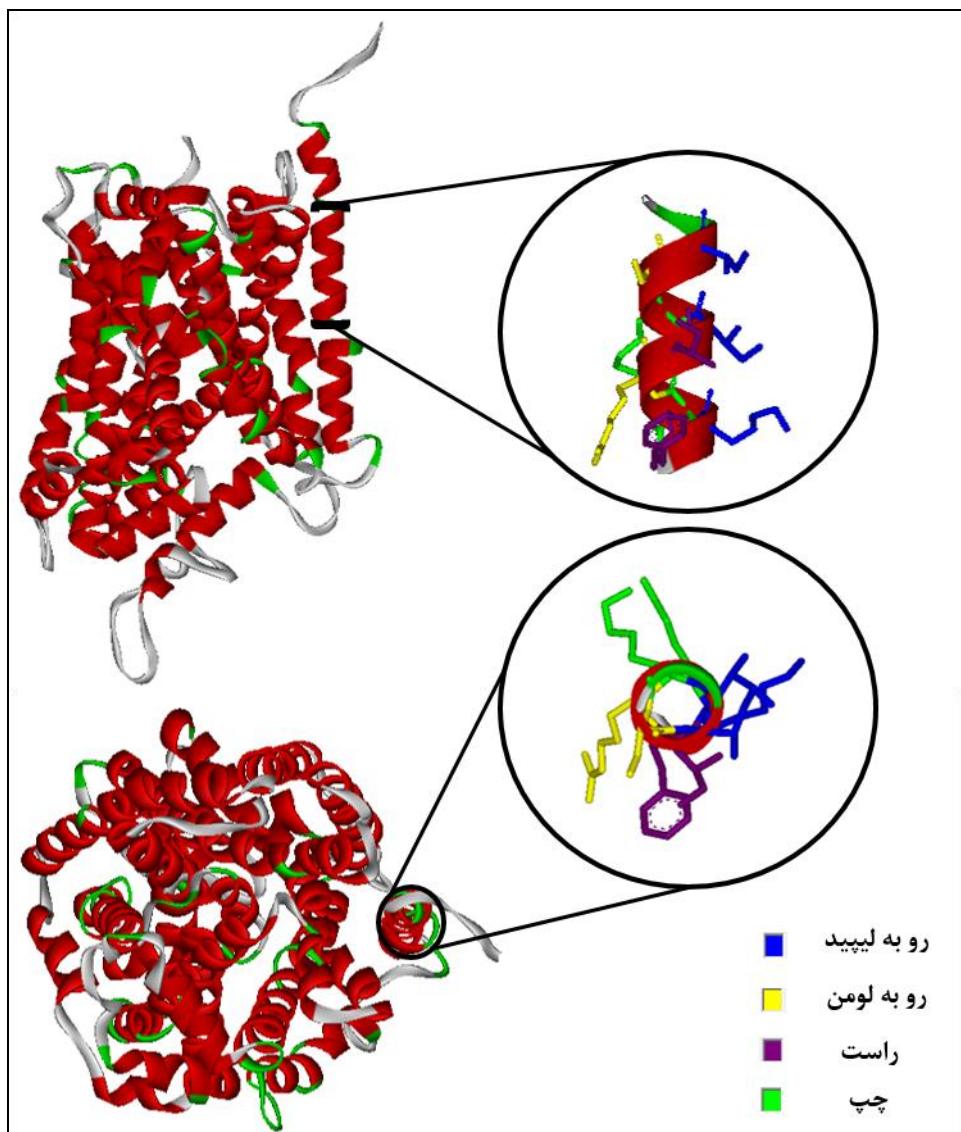


شکل ۱. پروفایل هیدروپاتی برای پروتئین 5-HTT-5 (5i6z). منحنی آبی رنگ حاصل بررسی رزیدوها با پنجره‌ی ۱۳ تایی و منحنی قرمز رنگ حاصل بررسی با پنجره‌ی ۱۹ تایی هستند.

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 (۱۳/۰)، والین (۱۱/۰)، لوسین (۰/۱۴)، فنیل آلانین (۱۱/۰)، سیستئین (۰/۰۲)، متیونین (۰/۰۲)، آلانین (۱۱/۰)، گلاسین (۰/۰۶)، ترئونین (۰/۰۷)، سرین (۰/۰۶)، تریپتوфан (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 بیشتری داشتند. بنا بر این می‌توان گفت الگوهای سه بعدی جایگیری این رزیدوها تعیین کننده‌ی بیشتر بر هم کنش‌های پروتئین با غشا لیپیدی و عمرکرد ناشی از این برهmekنش‌ها 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 گلاسین، ایزو لوسین و سرین بیشتر ترین فراوانی را داشتند. از میان ۳ اسید آمینه‌ی حجیم (آروماتیک) در دسته‌ی رو به لیپید، فقط فنیل آلانین فراوانی چشم گیری داشت.

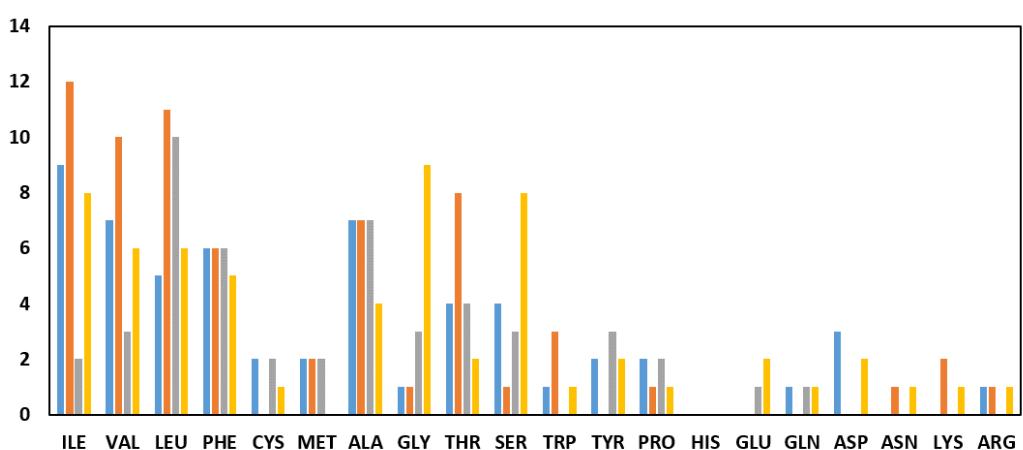
آنالیز رزیدوهای هلیکس‌های غشایی 5-HTT در مرحله بعدی، تمام رزیدوهای رو به لیپید ساختار پروتئین ۵-HTT که در ارتباط با غشا هستند، با دقت مشخص و آنالیز شدند. با در نظر گرفتن "i" به عنوان اسید آمینه‌ای با زنجیره‌ی جانبی رو به لیپید (که در تماس با لیپیدهای غشایی هستند)، اسیدهای آمینه‌ی $i+1$ و $i+3$ به ترتیب راست، رو به لومن و چپ نامیده شدند (شکل ۲). به دلیل آن که در هر دور از هلیکس‌ها به طور متوسط $3/6$ 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 ۲۳۳ مرحله‌ی قبل تعدادی کنار گذاشته شدند و در نهایت 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 رزیدوهای در هیچ کدام از موقعیت‌های $i+1$ 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. نحوه‌ی دسته بندی رزیدوهای ساختار پروتئین 5-HTT. دسته رزیدوی بورسی شده با رنگ‌های آبی (رو به لیپید)، زرد (رو به لومن)، بنفش (راست) و سبز (چپ) در شکل مشخص شده‌اند. در بالا تصویر پروتئین از پهلو و در پایین تصویر پروتئین از بالا، جهت کمک به درک بهتر نحوه‌ی بورسی آورده شده‌اند.

رو به لومن ■ رو به لیپید ■ راست ■ چپ ■

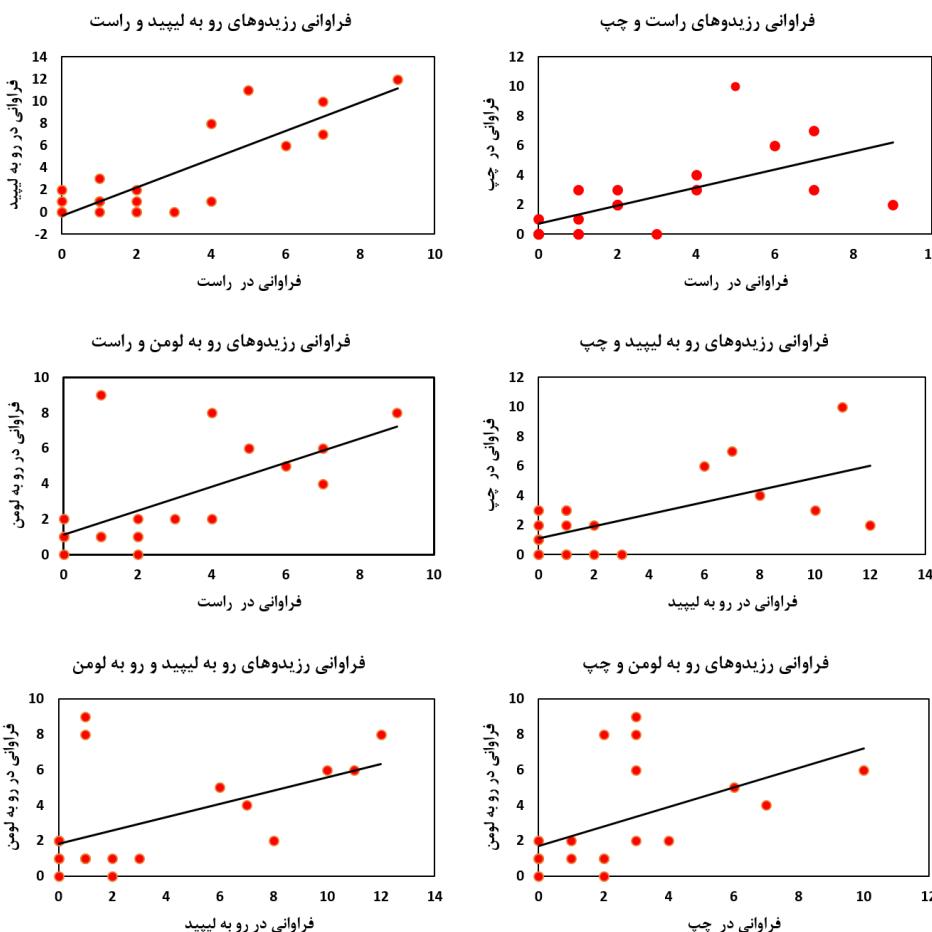


شکل ۳. نمودار فراوانی انواع اسیدهای آمینه در میان رزیدوهای رو به لیپید، راست، چپ و رو به لومن از ساختار کریستالو گرافی پروتئین 5-HTT (5i6z).

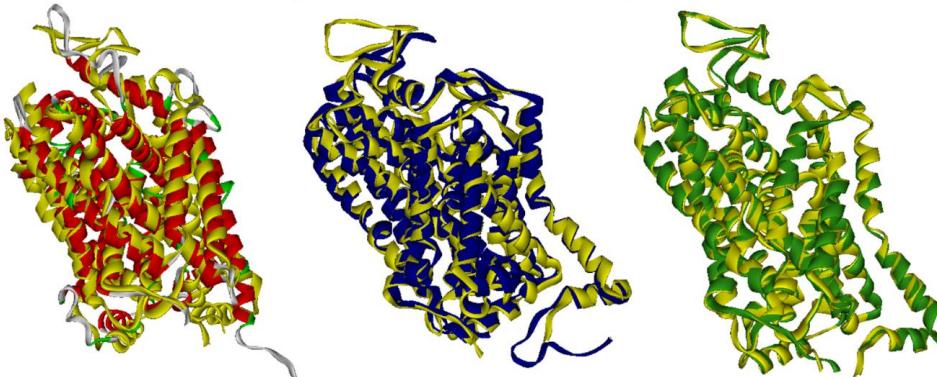
گرفت. یکی از این ساختارها، پروتئین دارای لیگاند اس-سیتالو پرام در پاکت اتصال مرکزی (5i71) است که رزیدوهای ۴۷ تا ۶۱۵ آن در ساختار کریستالو گرافی هستند و دیگری، ساختار اصلی پروتئین بدون لیگاند (5i6z) است که رزیدوهای ۴۷ تا ۶۱۷ آن کریستالو گرافی شده است. هم چنین برای بررسی دقیق تر، دو مدل سه بعدی از ۵-HTT نیز به روش همولوژی و با استفاده از الگوهای باکتریایی (LeuTAA) و بی مهره (dTAT) ساخته شد. نتایج هم ترازی‌های سه بعدی میان ساختارها (شکل ۵) نشان داد میزان RMSD هم ترازی کربن‌های آلای ساختار مرجع با ساختارهای Mdl-2، Mdl-1 و ساختار 5i71 به ترتیب ۰/۶، ۰/۸ و ۰/۰ است. بنا بر این ۵-HTT دارای لیگاند سیتالو پرام (5i71) بیش ترین انطباق را با ساختار مرجع (Mdl-1) (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 متاظر 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 (۰/۰۵۱) تایید می‌شود. در مورد ساختارهای Mdl-1 و Mdl-2 اختلاف در درصد شباهت مدل گوها 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 ۰/۰۷۴ برای Mdl-1، به ۰/۰۸۷ 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 ۵-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.

همبستگی دسته‌های چهارگانه‌ی انتخابی در هلیکس‌های غشایی ۵-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 (۰/۰۵) 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، ۰/۰۵۳ 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 ۵-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 ۵-HTT در مطالعه‌ی حاضر، از میان ۶ ساختار به دست آمده از پروتئین ۵-HTT به روش کریستالو گرافی که در سال ۲۰۱۶ در قالب مقاله‌ای در مجله Nature ارائه شده (۵)، دو ساختار مورد استفاده قرار



شکل ۴. نمودار پراکنده‌گی فراوانی نسبی انواع اسید های آمینه پروتئین 5-HTT (5i6z) در میان ۴ دسته های 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. مقایسه ضرایب همبستگی میان دسته های اسید های آمینه ساختارهای Mdl-1، Mdl-2 و 5i71 با ساختار مرجع (5i6z).

نام دسته / نام ساختار	5i71	MDL-2	MDL-1
رو به لیپید - رو به لیپید	+/++	+/٩٣	+/٨٧
раст - راست	+/++	+/٨١	+/٦٨
رو به لومن - رو به لومن	+/++	+/٩١	+/٦٢
چپ - چپ	+/++	+/٨٢	+/٨

اساس موقعیت زنجیره‌های جانی آن‌ها در ارتباط با غشا است. این گونه بررسی و تقسیم بندی، برای نخستین بار است که در مطالعات صورت گرفته بروی ترکیب اسیدهای آمینه‌ی پروتئین‌ها انجام می‌گیرد. از نزدیک ترین روش‌های بررسی به این روش، می‌توان به نحوی 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، آب‌دوست باردار و آب‌دوست 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. 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

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 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 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 بی‌مهره (Mdl-2) را انجام داده ایم.

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

زنجیره‌های 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، ۵۸ 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 Leu550 و Ile425 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 آیفاٽیک) 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 تریپوفان 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 (۱۹، ۲۲). 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 لاژین و آرژین در دسته‌ی رو به لیپید که با لیپیدهای غشایی در تماس هستند، صفر باشد. اما مجموع فراوانی

کنش زنجیره‌های جانبی آن‌ها با لیپیدهای غشایی است. براساس داده‌های ذکر شده در بخش تایج، ترکیب اسیدهای آمینه‌ی ۱۲ هیلیکس غشایی 5-HTT نشان دهنده‌ی حضور ۶۲ درصدی رزیدوهای آب گریز در این نواحی است. این در حالی است که میانگین این میزان در هیلیکس‌های 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 پروتئین‌های سراسر غشایی است. بنا بر این می‌توان تیجه گرفت که بر هم کنش‌های هیدروفوب این پروتئین با لیپیدهای غشایی، از حد میانگین بر هم کنش پروتئین‌های غشایی کم تر است. علی‌رغم 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 احتمالاً باعث این فراوانی بیش تر است. با توجه به این که فضای نمونه در این مطالعه متشکل از رزیدوهای هیلیکس‌ها است، تعدد رزیدوهای هیلیکس 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 هیلیکسی 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 تریپوفان 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 هیدروکسیل موجود در اسید آمینه‌ی تیروزین باشد که تنها تفاوت میان ساختار زنجیره‌ی جانبی در این دو اسید آمینه است. عدم وجود تیروزین در دسته‌ی رو به لیپید نیز در این جا جالب توجه است.

۲۶)، با این حال پیشنهاد چرخش هلیکس‌ها در این مطالعه می‌تواند راه گشای مطالعه‌ی بیشتر در این مورد و به طور کلی در مورد نحوه 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 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 ۵-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 برقراری 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 رزیدوها 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، احتمالاً 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

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

انتظار می‌رود رزیدوهای دسته‌های راست و چپ بیشتر در بر هم کنش‌های هلیکس- هلیکس شرکت داشته باشند. این بر هم کنش‌ها نقشی مهم در حفظ ساختار سوم پروتئین‌های غشایی دارند (۲۳، ۲۴). در واقع، این بر هم کنش‌های پهلو 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 آب گریز و کوچک آلانین با داشتن زنجیره‌ی جانبی کوتاه، نقش مهمی در این بر هم کنش‌ها 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 دسته‌های راست و رو به لیپید است. چنین ضریب همبستگی بالایی، این احتمال را مطرح می‌کند که هلیکس‌های غشایی در جریان تغییر کنفورماتیونی ناشی از باز و بسته شدن کanal انتقال دهنده چهار 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 بروی مکانیزم عملکرد انتقال دهنده‌های غشایی تا کنون چنین فرضیه‌ای مطرح نشده است (۲۷).

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 ضریب همبستگی ۹۳٪ رزیدوها در دسته رو به لبیید، ۹۱٪ در رو به لومن، ۸۲٪ در چپ و ۸۱٪ در دسته راست است. در حالی که مقادیر متضاد این ضرایب در Mdl-1 به ترتیب ۸۷٪، ۸۰٪ و 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 ای دسته های ۴ گانه دستخوش تغییرات جدی می شوند که منجر به تغییر ترکیب رزیدوها این دسته ها می شود. این بدین معنی است که رزیدوها هر کدام 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 Mdl ضعیف تر (Mdl-1) و مدل بهتر (Mdl-2) با ساختار مرجع، جا به جایی مکانی رزیدوها با تغییر الگو را در همه 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 کرین های آلفای مدل ها و ساختار مرجع در حالت هم ترازی 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

همبستگی را با دسته های رو به لومن دارند، کم ترین فراوانی رزیدوها کوچک دیده می شود. بر اساس ساختار حاصل از کریستالو گرافی پروتئین 5-HTT (5i6z)، جهت گیری زنجیره ای جانبی رزیدوها 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 رزیدوها ای از فضای کانالی که در جا به جایی و اتصال لیگاندهایی نظیر داروهای ضد افسردگی به این پروتئین نقش دارند، در این دسته قرار می گیرند. بر اساس یافته های قبلی، تعدادی از اسیدهای آمینه مثر در اتصال داروی ضد افسردگی اس - سیتالو پرام به پاکت مرکزی 5-HTT شامل Tyr95، Ala169، Ille172 و Ser438 هستند (۵). مقایسه نتایج به دست آمده از ساختار کوکریستال و نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان می دهد تمامی این رزیدوها در دسته رو به لومن قرار می گیرند. بنا بر این نکته نیز تایید کننده نقش رزیدوها در دسته رو به لومن در بر هم کش با لیگاند است.

در این مطالعه مقایسه دسته های چهار گانه 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 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 ای آمینو اسیدی تایید می شود. بر اساس داده های بخش نتایج، میانگین ضرایب همبستگی میان دسته های ۴ گانه ای ساختار مرجع (5i6z) و مدل اول (Mdl-1) در مقایسه

هليكس‌ها با ۷۲٪، مربوط به دسته‌ی رو به لپید است. اين در حالی است که در دسته‌های راست، چپ و رو به لومن سهم رزيدوهای آب دوست بيشتر بوده و به ويژه در دسته‌ی رو به لومن به ۴۹٪ می‌رسد. تركيب اسيد آمينه‌ای دسته‌های رو به لپید و راست بيشترین شباخت را با يكديگر دارد و کم ترين شباخت در تركيب اسيدهای آمينه نيز ميان دسته‌های چپ و رو به لومن دیده می‌شود. استفاده از بررسی‌های نظير آن چه در اين مطالعه صورت گرفته است، شناخت بهتری از نحوه ارتباط با غشا و عملکرد پروتئين 5-HTT و به واسطه آن، عملکرد خانواده انتقال دهنده‌های غشایي نورو ترانسمیترها به دست می‌دهد. از اين نوع دسته بندی جديده می‌توان در بررسی كيفيت مدل‌های ساختاري مربوط به پروتئين‌های غشایي غني از هليكس استفاده کرد.

سياسگزاری

بدينوسيله از همکاری آقایان عبدالله شيرازی، حبيب طاهری و دکتر رهبر قاسمی صميمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

الگوهای با حداقل يکسانی (۳۰٪) را تاييد کرده و نشان می‌دهد در مورد مدل‌سازی انتقال دهنده‌های غشایي نيز می‌توان بر اين يافته‌ها تکيه کرد.

اهميٌت باليني پروتئين 5-HTT در طراحی داروهای ضد افسردگی در کنار غشایي بودن آن، منجر شده مطالعه‌ی ساختار و تركيب اسيدهای آمينه‌ی اين پروتئين اهميٌت خاصی بيايد. آن چه در اين پژوهش به انجام رسيد، آناليز و دسته بندی تركيب اسيدهای آمينه‌ی هليكس‌های غشایي 5-HTT با روشی مبتنی بر جهت گيري زنجيره‌ی جانبي رزيدوهای است. اهميٌت چنین روش ابداعی دسته بندی در اين مقاله آن است که اساس ساختار بسياري از پروتئين‌های سر تا سر غشایي، هليكس‌های غشایي آن‌هاست: چنان که بخش اعظم رزيدوهای اين پروتئين‌ها در هليكس‌های غشایي آن‌ها قرار می‌گيرد. بنا بر اين دسته بندی رزيدوهای هليکسی بر اساس جهت گيري زنجيره‌های جانبي می‌تواند در جنبه‌های مختلف آناليز ساختاري اين گروه از پروتئين‌ها و كسب اطلاعات جديد سودمند باشد. تركيبات رزيدوهای به دست آمده در هر کدام از دسته‌ها، اطلاعات جالبي درباره عملکرد اسيدهای آمينه در هر کدام از موقعیت‌های چهارگانه به دست می‌دهد. بيشترین حضور رزيدوهای آب گريز در

References:

- Wang CI, Lewis RJ. Emerging structure function relationships defining monoamine NSS transporter substrate and ligand affinity. *Biochem Pharmacol* 2010; 15;79:1083-91.
- Arkin IT, Brunger AT. Statistical analysis of predicted transmembrane α -helices. *Biochim Biophys Act Mole Enzymol* 1998; 8;1429:113-28.
- Andersen J, Olsen L, Hansen KB, Tabouret 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.
- 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 dioxyamphetamine. *J Biol Chem* 2010; 285:11270-80.
- Coleman JA, Green EM, Gouaux E. X-ray structures and mechanism of the human serotonin transporter. *Nature* 2016; 532:334-9.
- 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.
- Ulmschneider MB, Sansom MS. Amino acid distributions in integral membrane protein structures. *Biochim Biophys Act Biom* 2001; 1512:1-4.

8. Hildebrand PW, Preissner R, Frommel C. Structural features of transmembrane helices. *FEBS Lett* 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. Sinding 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 hydrophobic 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 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 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⁺ 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 A¹, Taghizadeh M^{2*}, Goliae B², Madadkar Sobhani A²

(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

* Corresponding author Email: mtaghizadeh@alumni.ut.ac.ir

Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences