

## **TÈCNiques BIOINFORMÀTIQUES APLICADES A LA MODELITZACIÓ I SIMULACIÓ DE L'ESTRUCTURA I L'ACTIVITAT DE RECEPTORS ACOBLATS A PROTEÏNES G**

XAVIER DEUPÍ, MIREIA OLIVELLA i LEONARDO PARDO\*

*Laboratori de Medicina Computacional. Unitat de Bioestadística. Facultat de Medicina.  
Universitat Autònoma de Barcelona. 08193 Bellaterra.*

\*Autor corresponent. Adreça electrònica: [Leonardo.Pardo@uab.es](mailto:Leonardo.Pardo@uab.es).

*Paraules clau: Receptors acoblats a proteïnes G, modelització, dinàmica molecular, TSHr, CCR5.*

*Key Words: G protein-coupled receptors, modeling, molecular dynamics, TSHr, CCR5.*

### **RESUM**

El receptor de la tirotròpina (TSHr) i el receptor de quimiocines CCR5 pertanyen a la família dels receptors acoblats a proteïnes G. Hi ha diverses malalties associades al seu funcionament anòmal, des del desenvolupament de tumors a la tiroide fins a la sida. La dificultat de cristallitzar aquests receptors, ja que són proteïnes de membrana, fa que només es conegui l'estructura tridimensional d'una proteïna d'aquesta família, la rodopsina. Partint d'aquesta estructura s'han utilitzat tècniques bioinformàtiques per a desenvolupar models tridimensionals teòrics de TSHr i CCR5. Mitjançant la comparació de seqüències i la cerca en bases de dades d'estructures tridimensionals s'han identificat els residus Asp<sup>6.44</sup> i Asn<sup>7.49</sup> en el TSHr i el motiu Thr-X-Pro (TXP) en la segona hèlix transmembranosa del CCR5, que són específics d'aquestes subfamílies. A través de simulacions de dinàmica molecular s'ha explorat el comportament dinàmic d'aquests motius i el seu paper en el mecanisme d'activació dels receptors.

### **SUMMARY**

The thyrotropin receptor (TSHr) and the chemokine receptor CCR5 belong to the family of G protein-coupled receptors. Several diseases, such as the development of thyroid adenomas or AIDS, are related to its malfunction. These membrane proteins are particularly diffi-

cult to structurally characterize, so only the high resolution structure of bovine rhodopsin is available. Starting from this structure and applying bioinformatic tools we have developed theoretical models of the THS $\alpha$  and CCR5 structure. Inspection of sequence alignments and survey of structural databases have lead to the identification of Asp<sup>6.44</sup> and Asn<sup>7.49</sup> in THS $\alpha$  and a Thr-X-Pro (TXP) motif in the second transmembrane helix of CCR5, specific within these subfamilies. The dynamic behaviour of these motifs and its role in the activation mechanism have been studied by molecular dynamics simulations.

## INTRODUCCIÓ

Els receptors acoblats a proteïnes G (GPCR) constitueixen la família més important de proteïnes que es troba a l'organisme, amb més de 1000 d'identificats fins ara (Horn *et al.*, 1998). Aquestes proteïnes es troben a la membrana de la cèl·lula i s'encarreguen de transmetre els senyals extracel·lulars cap al seu interior.

Els GPCR són capaços d'unir una gran varietat de lligands en la seva regió extracel·lular, com amines biogèniques, pèptids, glicoproteïnes, lípids, nucleòtids, ions i proteases, i, a més a més, transmeten estímuls externs com la llum, l'olor i el sabor (Ji *et al.*, 1998). La unió de lligands agonistes estableix els receptors en una conformació activa que afavoreix la unió en la seva regió intracel·lular de proteïnes G. La formació del complex ternari lligand-receptor-proteïna G afavoreix l'intercanvi de GDP a GTP en la subunitat  $\alpha$  de la proteïna G. Aquest intercanvi afavoreix la divisió de la proteïna G heterotrimèrica en les subunitats  $\alpha$  i  $\beta\gamma$ , que són capaces d'influir en diversos sistemes efectors com, per exemple, l'estimulació o inhibició d'adenilat ciclase, l'activació de fosfolipases i la regulació de l'activitat dels canals de calci i potassi (Hamm, 1998).

D'acord amb el model del complex ternari de l'activació dels GPCR (Samama *et al.*, 1993; Leff, 1995), els receptors es troben en equilibri entre les conformacions inactiva i activa. En la proteïna nativa existeixen una sèrie d'interaccions intramoleculares que

mantenen el receptor en un estat inactiu. Els agonistes s'uneixen amb alta afinitat a la conformació corresponent a l'estat activat i estableixen canvis conformacionals en alguns residus clau i, d'aquesta manera, desplacen l'equilibri cap a la conformació activa. L'estabilització de la forma activa del receptor també pot ser provocada per la mutació de certs residus. Els canvis locals en l'estructura tridimensional del receptor en unir un lligand o patir una mutació desencadenen una sèrie de canvis, com la protonació de certs residus o el moviment d'estructures secundàries (Gether *et al.*, 1998). Aquests canvis inicien el procés de transducció del senyal.

Diverses malalties es troben associades al funcionament anòmal dels GPCR (Whitehead *et al.*, 2001; Marinissen *et al.*, 2001). Així doncs, aquests són sistemes que tenen un alt interès farmacèutic, i s'estima que el 60 % dels fàrmacs prescrits estan dirigits a actuar selectivament sobre aquesta família de receptors (Gurrath, 2001).

En el camp de la recerca farmacèutica, un dels mètodes que s'utilitzen per a trobar compostos amb activitat farmacològica és l'anomenat *disseny racional de fàrmacs*. Aquest procediment consisteix en l'estudi de les interaccions moleculars específiques de reconeixement entre les molècules del fàrmac i de l'objectiu al qual aquest va dirigit; per exemple, un GPCR. Amb aquesta informació, es dissenyen molècules que actuen específicament sobre un receptor determinat. Aquests dissenys *in silico* seran

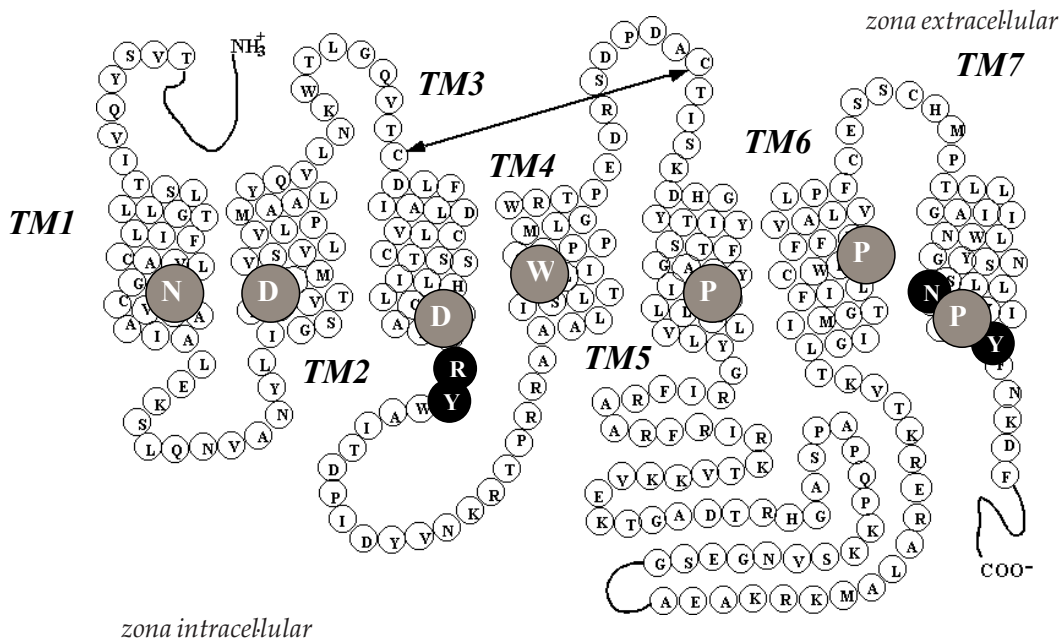


FIGURA 1. Representació esquemàtica de l'estructura general dels GPCR. La figura mostra la disposició en set hèlixs que travessen la membrana connectades per llaços. El residu més conservat en cada hèlix, que s'utilitza en el mètode de numeració de Ballesteros *et al.* (vegeu «Mètodes»), es ressaltava amb fons gris. Altres residus molt conservats es ressaltaven amb fons negre.

després provats experimentalment, i podran esdevenir caps de sèrie a partir dels quals es desenvolupin fàrmacs més actius (Muller, 2000). Per a utilitzar la tècnica del disseny racional cal partir d'una estructura tridimensional de l'objectiu farmacològic.

La dificultat de cristallitzar proteïnes de membrana ha fet que fins fa poc no s'hagi pogut resoldre mitjançant difracció de raigs X la primera estructura tridimensional d'un membre de la família dels GPCR, la rodopsina bovina (Palczewski *et al.*, 2000). L'estructura revela una disposició en forma de set hèlixs  $\alpha$  que travessen la membrana cel·lular connectades entre elles a través de llaços intracel·lulars i extracel·lulars (figura 1). Aquesta disposició ja havia estat proposada fruit d'estudis de mutagènesi dirigida i d'estructures de baixa resolució obtingu-

des mitjançant difracció d'electrons (Unger *et al.*, 1997; Baldwin *et al.*, 1997). La seqüència a la zona transmembranosa de tots els GPCR està molt conservada, cosa que fa suposar que existeix una gran similitud estructural en aquesta regió. Això permet utilitzar l'estructura tridimensional de la regió transmembranosa de la rodopsina per a modelitzar altres GPCR. També, la necessitat d'unir de forma específica una gran diversitat de lligands en la regió extracel·lular fa pensar en l'existència de característiques estructurals diferenciades i específiques per a cada receptor particular. Per a desenvolupar models específics de GPCR caldrà, doncs, tenir en compte aquestes divergències.

El receptor de la tirotròpina (TSHr) s'engloba dins de la família 1 dels GPCR, con-

cretament dins la subfamília dels receptors d'hormones glicoproteiques (Gether, 2000). Aquest receptor es caracteritza per la presència d'un gran fragment aminoterminal, amb dominis rics en leucina, on s'uneixen els seus agonistes naturals, les hormones glicoproteiques (Costagliola *et al.*, 1998; Da Costa *et al.*, 1998). El TSHr mostra activitat constitutiva, és a dir, exhibeix certa activitat en absència d'agonistes. Aquest comportament també s'explica mitjançant el model del complex ternari, que proposa que si la barrera energètica entre les conformacions inactiva i activa del receptor és suficientment baixa, part de la població pot passar espontàniament de l'estat inactiu a l'estat activat, cosa que es tradueix en activació constitutiva en absència de senyal. Certes mutacions poden incrementar de manera molt important aquesta activitat constitutiva (Scheer *et al.*, 1996), i algunes d'elles es troben de forma natural i estan associades a diverses malalties (Allen *et al.*, 1991; Duprez *et al.*, 1997). En aquest treball es mostra com l'anàlisi d'aquestes mutacions a nivell molecular en el context del receptor es pot utilitzar per a estudiar el mecanisme general d'activació dels GPCR i per a identificar-ne alguns dels residus implicats.

El CCR5 pertany a la subfamília dels receptors de quimiocines, dins també de la família 1 dels GPCR, i respon a quatre quimiocines naturals: RANTES, MIP1-a, MIP1-B i MCP2. La importància d'aquesta proteïna rau en el fet que es tracta d'un coreceptor del virus d'immunodeficiència humana (VIH), i la majoria dels homozigots que presenten la mutació CCR5A32 no s'expressen en la superfície cel·lular i, per tant, no uneixen el VIH, i així prevenen de la infecció del virus (Liu *et al.*, 1996). Per tant, la inactivació d'aquest receptor mitjançant antagonistes selectius podria portar a un possible mètode terapèutic per a combatre la infecció del VIH. Diversos estudis mostren com els resi-

duos de Pro, Thr o Ser distorsionen les hèlixs  $\alpha$  (Blundell *et al.*, 1983; Barlow *et al.*, 1988; Ballesteros *et al.*, 2000). A la segona regió transmembranosa (TM2) dels receptors de quimiocines es troba un motiu de seqüència Thr-residu hidrofòbic-Pro (TXP) característic i molt conservat. Els resultats mostren que aquesta combinació de Thr i Pro aporta unes característiques estructurals específiques a la TM2 que afectarien la conformació de la resta del receptor.

## MATERIALS I MÈTODES

### Numeració dels residus

Per a identificar els residus dins d'una seqüència determinada s'ha utilitzat el sistema de numeració de Ballesteros i Weinstein (Ballesteros *et al.*, 1994), on la posició de cada residu s'especifica mitjançant dos nombres: el primer correspon a l'hèlix en la qual es troba el residu, i el segon defineix la seva posició relativa al residu més conservat en aquella hèlix, al qual se li assigna arbitràriament la posició 50. Per exemple, Asn<sup>674</sup> del receptor TSHr humà correspon a Asn<sup>749</sup>, ja que es troba immediatament abans de la Pro altament conservada de TM7.

### Modelització del TSHr

El domini transmembranós del TSHr s'ha construït mitjançant modelització comparativa, utilitzant com a patró l'estructura tridimensional de la rodopsina bovina. Per a construir el model, primer s'alineen les seqüències de rodopsina i del receptor per modelitzar utilitzant com a punts de referència els residus altament conservats presents en els dominis transmembranosos de tota la família dels GPCR (figura 1). A continuació, se substitueix la seqüència del receptor sobre les coordenades atòmiques de

l'esquelet peptídic de la rodopsina. Allà on els residus coincideixen, a més a més es mantenen les coordenades de les cadenes laterals. En els residus que difereixen, les orientacions de les cadenes laterals s'escullen utilitzant una biblioteca de rotàmers que té en compte la configuració de l'esquelet peptídic (McGregor *et al.*, 1987). Aquesta estructura s'utilitza com a punt de partida per a l'estudi posterior mitjançant simulacions de dinàmica molecular, tal com s'exposa més endavant.

#### **Anàlisi del domini estructural TXP en bases de dades d'estructures tridimensionals de proteïnes i simulacions de dinàmica molecular**

S'ha portat a terme una cerca de segments d'hèlix  $\alpha$  que continguin els motius TXP o SXP, on X denota qualsevol residu, en una edició recent del Protein Data Bank (Berman *et al.*, 2000). En aquesta cerca s'inclouen tant proteïnes globulars com transmembranoses, a causa de la migradesa d'estructures tridimensionals de proteïnes de membrana. Es van inspeccionar les estructures amb una resolució igual o superior a 3 Å, i es van eliminar aquells segments que presentaven més d'una Pro, o bé altres residus de Thr o Ser a prop de la Pro. A més a més, es van eliminar aquelles estructures on hi havia molècules d'aigua interaccionant amb l'esquelet de l'hèlix  $\alpha$ , ja que provoquen distorsions que no es donen en l'entorn hidrofòbic de les proteïnes de membrana. L'angle de doblegament d'aquestes estructures es calcula com a l'angle entre els eixos de l'hèlix abans i després de la Pro.

Per a conèixer les propietats conformacionals de les hèlix  $\alpha$  que contenen el motiu TXP s'han portat a terme simulacions de dinàmica molecular del pèptid Ace-Ala11-X-Ala11-Nme, on X és AAP, TAP o SAP. Les Ser i Thr s'han estudiat en diverses confor-

macions, ja que el patró de ponts d'hidrogen intramolecular depèn de la conformació de la cadena lateral (Ballesteros *et al.*, 2000). Aquestes simulacions s'han portat a terme en les condicions que s'exposen a continuació.

#### **Simulacions de dinàmica molecular**

En aquestes simulacions s'estudia l'evolució temporal de les propietats estructurals de les regions transmembranoses. Per a representar l'entorn hidrofòbic del cor de la membrana lipídica on es troben immersos aquests receptors s'utilitza una capsula de molècules de metà. La densitat de 0,4-0,5 g+cm<sup>-3</sup> de la capsula de metans és d'aproximadament la meitat de la densitat observada en la membrana cel·lular. Això és degut a la diferent distància d'equilibri entre els carbonis a la caixa de metans i a la cadena policarbonada del lípid. Aquesta aproximació ha estat validada tot comparant els angles de torsió  $\phi$  i  $\psi$  de l'esquelet de proteïnes de membrana depositades al Protein Data Bank i simulacions de dinàmica molecular (Olivella *et al.*, 2002). És important ressaltar que l'estructura dels llaços que connecten les hèlixs transmembranoses, i que estan exposades a l'entorn hidrofílic, no està modelitzada a causa de la falta d'homologia entre les diferents famílies de GPCR. Això no ens permet modelitzar la interfase amb aigua. Aquest mètode o d'altres similars ja han estat emprats prèviament per a estudiar el comportament dinàmic de proteïnes de membrana (Aqvist *et al.*, 2000; Govaerts *et al.*, 2001; Govaerts *et al.*, 2001). El sistema receptor-metà se sotmet a 500 iteracions de minimització d'energia, i 1,5 ns de dinàmica molecular a volum constant fent servir el mètode *particle mesh Ewald* per a avaluar les interaccions electroestàtiques. Tots els càlculs de dinàmica molecular s'han portat a terme utilitzant el programa

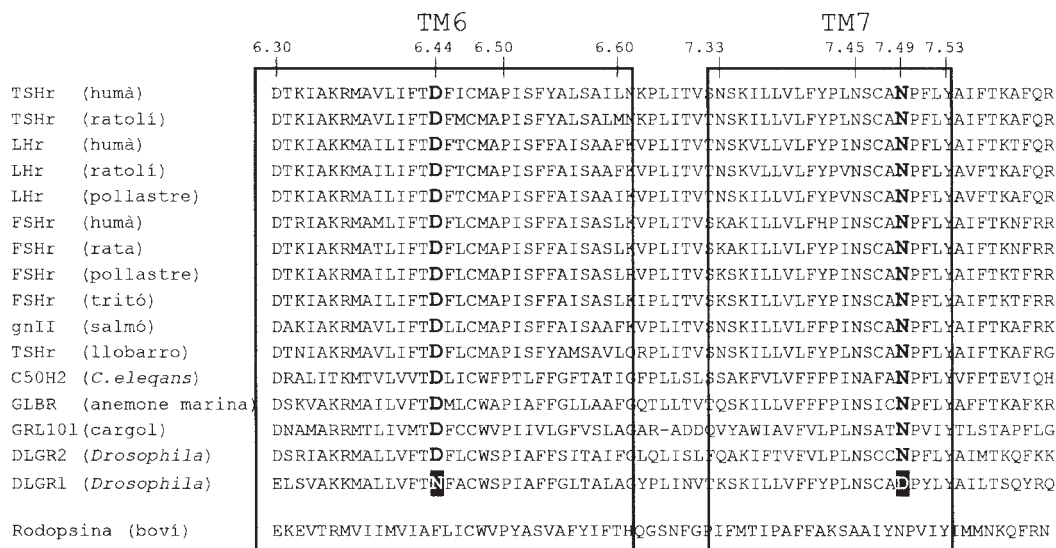


FIGURA 2. Alineament múltiple de seqüències de les regions TM6-ECL3-TM7 de receptors de glicohormones i de la rodopsina bovina. Per claredat, només es mostren les seqüències d'alguns receptors de diversos organismes, des de mamífers fins a anemones marines, i la de la rodopsina bovina. Per a identificar els residus s'utilitza el sistema de numeració generalitzat de Ballesteros *et al.* (vegeu «Mètodes»). Els residus Asp 6.44 i N7.45 es mostren en negreta, i els residus intercanviats es resalten. Els límits de les hèlixs s'han escollit d'acord amb els observats en l'estructura tridimensional de la rodopsina bovina.

AMBER 5. Aquest programari s'ha mostrat capaç de reproduir canvis conformationals del DNA i de les proteïnes (Duan *et al.*, 1998).

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

### TShr com a model per l'estudi del mecanisme d'activació dels GPCR

L'alineament de les seqüències de TM6 i TM7 dels receptors de glicohormones (figura 2) permet veure els motius de seqüència conservats dins d'aquesta família com, per exemple, Pro<sup>6.50</sup> a TM6 o NPxxY a TM7. Mentre que aquests dos motius es troben altament conservats en tots els GPCR, l'Asp<sup>6.44</sup> només es troba conservat dins de la família

dels receptors de glicohormones; dins de la família de la rodopsina, aquesta posició està ocupada per una Phe o una Tyr en un 81 % dels casos.

L'estudi d'aquest alineament revela un fet notable: en la seqüència corresponent al receptor DLGR1 de *Drosophila* la posició 6.44 està ocupada per una Asn en lloc de l'Asp conservat dins d'aquesta família. En aquesta mateixa seqüència la posició 7.49 ja no correspon a la Asn del motiu NPxxY, sinó que correspon a un Asp, és a dir, que aquestes dues posicions es troben intercanviades. Aquests tipus de mutacions correlacionades suggereixen una interacció directa entre ambdós residus (Larson *et al.*, 2000). A més a més, en l'estructura cristal·logràfica de la rodopsina, aquestes dues posicions es troben encarades i prou a prop per a poder per-

metre una interacció entre les cadenes laterals. Per altra banda, la mutació de Asp<sup>6.44</sup> ha estat trobada en una serie d'adenomes de la tiroide, i està associada a l'activació constitutiva del receptor. Així doncs, s'hipotetitzava que la interacció entre Asp<sup>6.44</sup> i Asn<sup>7.49</sup> és important per a mantenir el receptor en la seva conformació inactiva.

Per a comprovar aquesta hipòtesi es van portar a terme una sèrie de simulacions de dinàmica molecular dels dominis transmembrànics del receptor de TSH, i es van analitzar les interaccions entre els residus de TM6 i TM7. Durant tota la simulació del model de la proteïna nativa, es pot observar com Asp<sup>6.44</sup> i Asn<sup>7.49</sup> interaccionen mitjançant una interacció de pont d'hidrogen. Aquesta interacció entre TM6 i TM7 en realitat involucra una xarxa més complexa d'interaccions. Per exemple, Asn<sup>7.45</sup>, que es troba just per sobre de Asn<sup>7.49</sup>, interacciona també amb Asp<sup>6.44</sup> i amb Asn<sup>7.49</sup>, mentre que Asp<sup>6.44</sup> també forma un pont d'hidrogen amb Ser<sup>3.39</sup>. Per a comprovar en el model la importància d'aquestes interaccions en l'estructura i l'activitat del receptor s'han portat a terme simulacions de dinàmica molecular sobre diferents mutants del TSHr, que eliminen o bé modifiquen aquestes interaccions (figura 3).

D6.44A: L'absència de la cadena polar en la posició 6.44 comporta l'eliminació de la interacció amb Asn<sup>7.49</sup>, cosa que obliga a una reestructuració de les cadenes laterals dels residus involucrats en les interaccions entre TM6 i TM7. Per exemple, en aquest mutant s'observa com Asn<sup>7.49</sup> rota per poder interaccionar amb Asp<sup>2.50</sup>.

D6.44N: En aquest mutant, en canvi, es mantenen les interaccions entre TM6 i TM7, ja que les dues Asn en les posicions 6.44 i 7.49 poden interaccionar mitjançant enllaços de pont d'hidrogen. A més a més, Asn<sup>7.49</sup> forma una interacció addicional amb Thr<sup>6.43</sup>.

N7.49A: En aquest mutant es perd la

interacció entre 7.49 i 6.44, ja que Ala i Asn no poden interaccionar mitjançant interaccions de pont d'hidrogen. Malgrat això, TM6 i TM7 encara interaccionen mitjançant l'enllaç de pont d'hidrogen format entre Asp<sup>6.44</sup> i Asn<sup>7.45</sup>. Asp<sup>6.44</sup> també interacciona amb Thr<sup>6.43</sup>.

N7.49D: En aquest mutant es produeix un canvi molt important en la xarxa d'interaccions entre les hèlixs TM6 i TM7. La repulsió electrostàtica entre Asp<sup>6.44</sup> i Asp<sup>7.49</sup>, ambdós aspàrtics en aquest mutant, fa que el primer s'allunyi de TM7 i vagi cap a TM3, i formi dos ponts d'hidrogen amb Ser<sup>3.36</sup> i Ser<sup>3.39</sup>, mentre que el segon interacciona amb Asn<sup>7.45</sup> i Thr<sup>6.43</sup>.

D6.44N/N7.49D: En aquest mutant, que correspon al receptor de *Drosophila*, el patró de la xarxa de ponts d'hidrogen està invertit respecte al de la proteïna nativa, però es mantenen les interaccions entre TM6 i TM7. L'aspàrtic Asp<sup>7.49</sup> interacciona amb Asn<sup>6.44</sup> i Asn<sup>7.45</sup>. A més, Asn<sup>6.44</sup> interacciona amb Asn<sup>7.45</sup> i Ser<sup>3.39</sup>.

Com s'ha vist, hi ha diverses raons que apunten envers l'existència d'una interacció directa entre Asp<sup>6.44</sup> i Asn<sup>7.49</sup> en el TSHr. Es proposa com a hipòtesi que aquesta interacció entre Asp<sup>6.44</sup> i Asn<sup>7.49</sup> manté el receptor en la conformació inactiva, i que les mutacions que la trenquin portaran l'activació espontània del receptor mutant. Per exemple, la mutació N7.49D provoca la repulsió electrostàtica entre les posicions 6.44 i 7.49, i provoca l'activació del receptor. El receptor es podria tornar a l'estat inactiu rescatant aquesta interacció mitjançant la mutació complementària D6.44N, i obtindríem aleshores la situació corresponent al receptor de *Drosophila*. Aquesta hipòtesi s'ha comprovat experimentalment: la mutació N7.49D augmenta l'activació constitutiva més de quinze vegades, mentre que la doble mutació N7.49D/D6.44N recupera l'activitat basal de la proteïna nativa (Govaerts *et al.*, 2001).

Les simulacions de dinàmica molecular suporten aquesta hipotètica interacció, ja que en la proteïna nativa la interacció Asn<sup>7.49</sup>-Asp<sup>6.44</sup> es manté durant tota la trajectòria, i

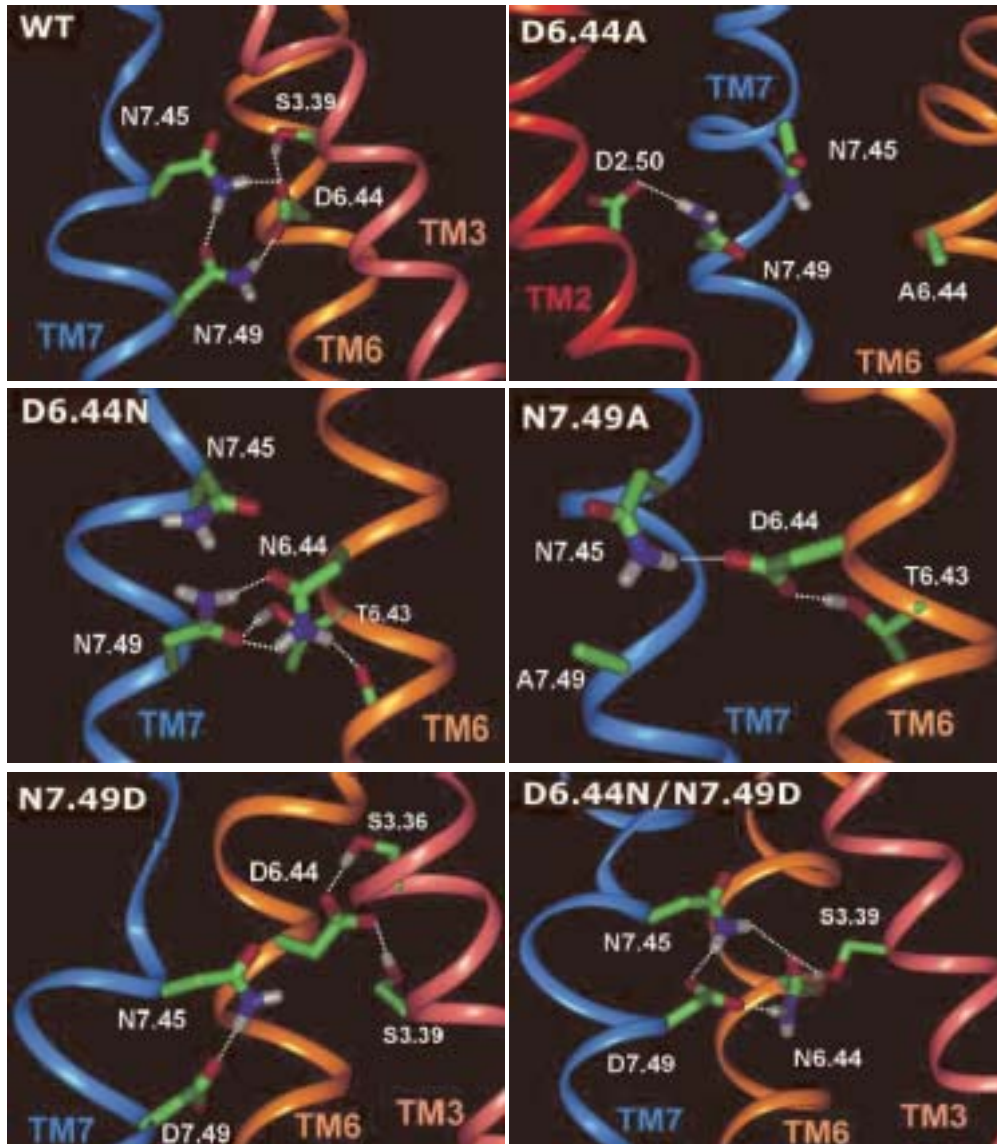


FIGURA 3. Estructures representatives dels diferents models de TSHr. Per a cada sistema s'ha escollit una estructura representativa de la simulació de dinàmica molecular. Les etiquetes dels panells indiquen el mutant que es representa. Es mostra una visió local de les hèlixs TM6 i TM7, on les hèlixs es mostren com cintes acolorides i les cadenes laterals dels residus d'interès com barres sòlides. Els àtoms de carboni es mostren en verd, els de nitrogen en blau, els d'oxigen en vermell i els d'hidrogen en blanc. Els enllaços per pont d'hidrogen es representen mitjançant línies de punts blancs. Els residus estan numerats segons l'esquema general de numeració de Ballesteros *et al.* (vegeu «Mètodes»).



això indica que aquesta interacció encaixa bé en el model tridimensional de la rodopsina. El mateix passa amb les simulacions del doble mutant D6.44N/N7.49D. Les simulacions, a més a més, poden ajudar a proposar una explicació als diversos fenotips associats amb els diversos mutants del TSHr. En la completa eliminació de la interacció Asn<sup>7.49</sup>-Asp<sup>6.44</sup>, per exemple, les mutacions N7.49D o D6.44A provoquen els majors augments de l'activitat basal, mentre que l'afebliment de la interacció només comporta un augment moderat de l'activitat constitutiva, per exemple en els mutants D6.44N i D6.44N/N7.45D (Govaerts *et al.*, 2001). Cal remarcar que, encara que el mutant N7.49A no està constitutivament activat i uneix el lligand amb la mateixa afinitat que la proteïna nativa, no es veu activat en absolut per la hormona. Això permet deduir que aquest residu duu a terme algun paper important durant l'activació. Es proposa que, un cop el receptor s'activa i es trenca la interacció entre Asp<sup>6.44</sup> i Asn<sup>7.49</sup>, aquest últim residu s'orientaria cap als residus Asp<sup>2.50</sup>-Asn<sup>1.50</sup>,

altament conservats en els GPCR (figura 4). D'aquesta manera s'alteraria la xarxa d'interaccions que estableix l'estat inactiu del receptor, cosa que podria portar a una reorganització que provoqués canvis en l'estructura global del receptor, com moviments de les TM3 i TM6, que portessin a l'estabilització de la conformació activa. Asp<sup>6.44</sup> només està conservat en la família dels receptors de glicohormones. En la resta de GPCR, el seu paper en el manteniment de l'estat inactiu del receptor el podrien realitzar la Tyr o Phe que es troben en aquesta posició, mitjançant un tipus diferent d'interacció amb els residus propers.

#### Estudi de la influència del motiu TXP en l'estructura del CCR5

L'anàlisi de la seqüència aminoacídica dels receptors de quimiocines revela la presència d'una Thr a la posició 2.56 i una Pro a 2.58 que constitueixen un motiu TXP altament conservat, que també es troba present en altres receptors de pèptids. En alguns ca-

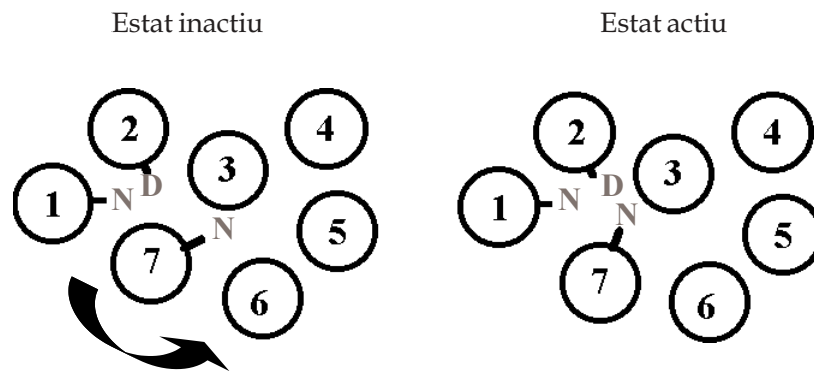


FIGURA 4. Model del primer pas de l'activació del TSHr. En estat inactiu l'Asn<sup>7.49</sup> interacciona amb Asp<sup>6.44</sup> (no es mostra a la figura). La unió d'un agonista o certes mutacions trenquen aquesta interacció, i fan que l'Asn<sup>7.49</sup> es reorienti cap als residus Asn<sup>1.50</sup> i Asp<sup>2.50</sup>. D'aquesta manera es reorganitzen les interaccions polars d'aquesta regió del receptor, i es provoquen canvis que el porten a l'activació.

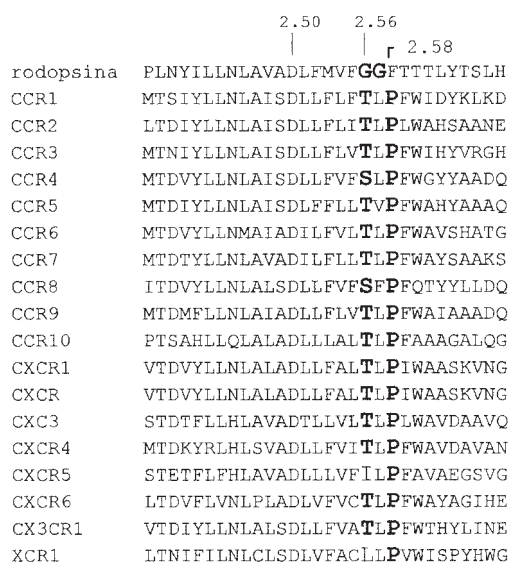


FIGURA 5. Alineament de les seqüències del fragment TM2 de diversos receptors de quimiocines i de la rodopsina bovina. Per claredat només es mostren seqüències corresponents a humans. Els residus estan numerats segons l'esquema general de Ballesteros *et al.* (vegeu «Mètodes»). Els motius TXP i SXP estan marcats en negreta. S'ha afegit a l'alineament la seqüència corresponent al segment TM2 de la rodopsina bovina, cosa que permet observar l'alt grau de conservació en la regió citosòlica.

La posició 2.56 és ocupada per una Ser, i forma, doncs, un motiu SXP (figura 5). En canvi, en la rodopsina, les posicions 2.56 i 2.57 estan ocupades per dues Gli. L'alineament de seqüències també mostra com l'estructura primària de les quimiocines a la part citosòlica és molt semblant a la de la rodopsina, però que a partir del motiu TXP aquestes presenten diferències en l'estructura primària que ens apunta envers una estructura i funció característica en la part més extracel·lular del receptor.

La cerca de motius TXP i SXP realitzada en el Protein Data Bank dóna com a resultat sis segments, que presenten un elevat angle d'inclinació, de fins a 49° (taula 1). L'angle d'inclinació que provoca la Pro en solitari és

aproximadament d'uns 25°; per tant, sembla que la presència de residus de Ser o Thr provoca un increment d'aquest angle. Tot i així, el reduït nombre de casos fa que aquest resultat només sigui orientatiu.

Per a entendre aquest canvi en la magnitud de l'angle de doblegament s'han emprat simulacions de dinàmica molecular d'una hèlix  $\alpha$  model que conté els motius AAP, TAP i SAP. Els resultats es mostren en la taula 2. Per cada motiu estructural es mostra la mitjana en graus i la desviació estàndard de l'angle d'inclinació obtingut en les simulacions. Cada valor s'obté sobre una mostra de 100 estructures igualment espaciades durant la dinàmica. S'ha utilitzat una anàlisi de la variància d'un factor i una prova *t* de Dunnet unilateral per a determinar si els angles d'inclinació dels diferents motius difereixen significativament del control AAP. Els asteriscs denoten diferències significatives respecte el control AAP ( $p < 0,001$ ). Aquests resultats mostren de quina manera per al sistema AAP l'angle d'inclinació és d'uns 20°, valor que concorda amb l'obtingut en altres estudis de la distorsió provocada per la Pro (Barlow *et al.*, 1988). En canvi, la presència de Ser o Thr dues posicions abans de la Pro fa que l'angle d'inclinació augmenti fins a 28-35°. Això és degut a la capacitat d'aquests residus de formar un pont d'hidrogen entre la seva cadena lateral i el l'esquelet de l'hèlix. A més a més, l'anàlisi de les simulacions indica que la magnitud i la direcció de la inclinació de l'hèlix  $\alpha$  depenen de les conformacions de Ser i Thr. Aquestes conformacions es diferencien en l'orientació de l'hidroxil de la cadena lateral, que indueix diferents tipus de pont d'hidrogen intramolecular (Gray *et al.*, 1984). Així, en les conformacions  $g^+$  i  $g^-$  de la Thr i  $g^+$  de la Ser el pont d'hidrogen intramolecular es forma amb el carbonil en la posició i-4, mentre que en la conformació  $g^-$  de la Ser es forma amb el carbonil en i-3 (figura 6a i 6b).

<i>PDB id</i>	<i>Motiu</i>	<i>Segment helical</i>	<i>Posició Pro</i>	<i>Angle d'inclinació</i>
1VHB	TVP	A7→A20	A15	28°
1FIY	TDP	823→856	838	44°
1B7E	TDP	349→379	373	49°
1RVE	SRP	B37→B59	B50	26°
1AR1	SLP	A219→A248	A236	35°
1AR1	SLP	B85→B103	B98	29°

TAULA 1. Angles d'inclinació dels motius (T/S)XP trobats al Protein Data Bank.

Aquest petit canvi en la xarxa d'interaccions que estableix l'hèlix  $\alpha$  provoca un gran canvi en la seva estructura global, incrementa l'angle d'inclinació fins a 35° i canvia la direcció del doblegament. Estructures representatives de les simulacions dels sistemes TAPg+ i SAP g- s'han superposat sobre la de AAP, que s'utilitza com a sistema de referència (figura 6c).

Si s'observa l'estructura tridimensional de la rodopsina sembla que les dues glicines a les posicions 2.56 i 2.57 provoquen que TM2 s'apropi a TM1, a causa de l'increment de flexibilitat que proporcionen aquests residus. En aquesta regió, el CCR5 presenta un motiu TVP. La informació obtinguda de les simulacions del motiu TXP s'ha utilitzat per a estudiar els canvis estructurals que pot provocar aquesta diferència en les seqüències. Sobre el segment TM2 de l'estructura de la rodopsina s'han

superposat les estructures resultants de les simulacions de les hèlixs  $\alpha$  model amb els motius TAP i AAP (figura 6d). Aquest exercici de modelització permet observar que mentre que la presència d'una prolina sola provocaria que TM2 s'aproximés cap a la TM3, la presència de la TAP doblega encara més la TM2 cap a la TM3 i la dirigeix cap el centre del receptor. Així doncs sembla que el motiu TXP provocaria un acostament entre la TM2 i TM3, mitjançant la modulació del doblegament induït per Pro. Aquesta hipòtesi es veu reforçada per la presència a la part extracel·lular de la TM2 i TM3 de residus aromàtics, que podrien estabilitzar aquest acostament a través d'interaccions de tipus hidrofòbic.

## CONCLUSIONS

Mitjançant modelització molecular s'ha estudiat el paper de la interacció entre els residus Asp<sup>6.44</sup> i Asn<sup>7.49</sup> del TSHr en el seu mecanisme d'activació. Es planteja la hipòtesi que el trencament d'aquesta interacció fa que Asn<sup>7.49</sup> s'orienti cap als residus Asp<sup>2.50</sup>-Asn<sup>1.50</sup>, i desencadeni canvis en l'estructura del receptor que portarien a l'estabilització de la conformació activa.

Per altra banda, s'ha identificat el motiu de seqüència TXP en els receptors de quimiocines. L'anàlisi de bases de dades d'estructures i de simulacions de dinàmica mo-

<i>Motiu</i>	<i>Angle de torsió</i>	<i>Desviació estàndard</i>
AAP	19.9°	7.3
TAP g+	28.4*	7.1
TAP g-	26.6*	7.8
SAP g+	30.1*	11.9
SAP g-	35.0*	10.0
CAP g+	31.3*	10.8
VAP	21.0°	5.5

TAULA 2. Angle d'inclinació mesurat en les diferents simulacions.

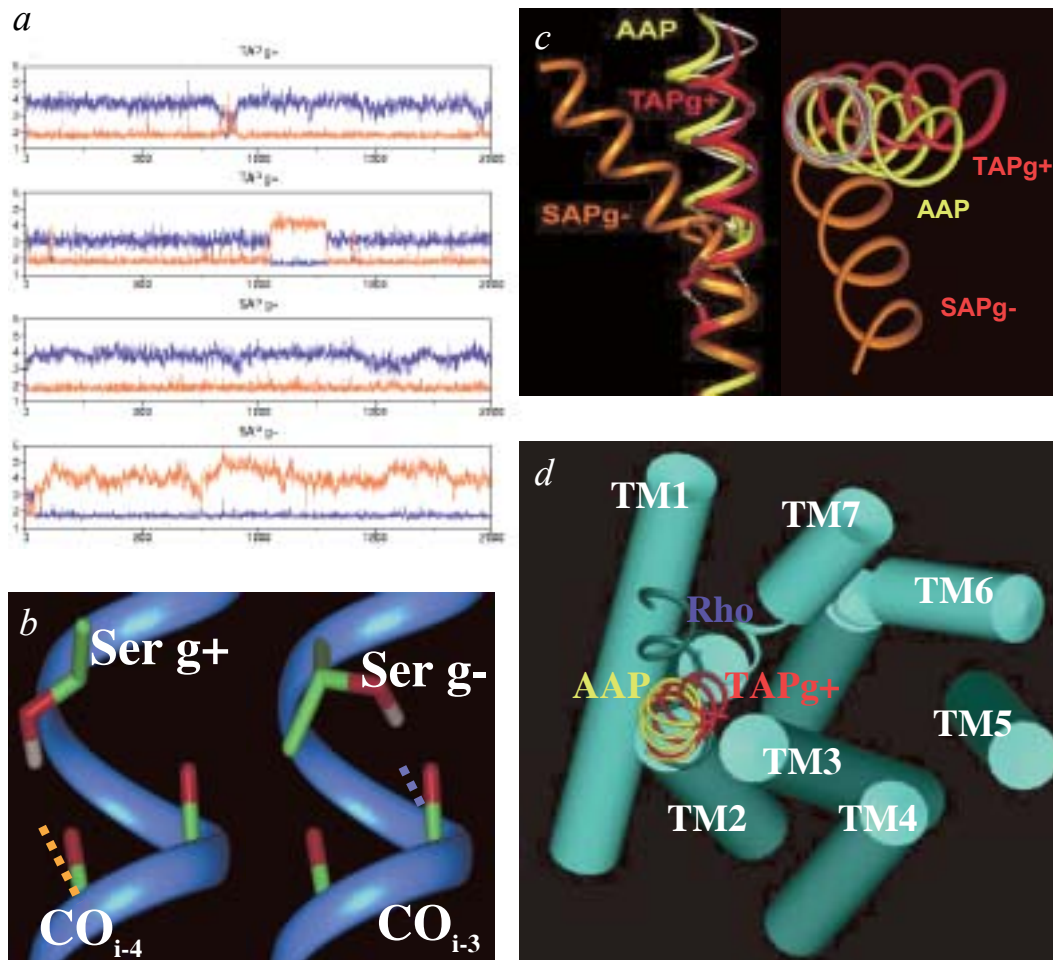


FIGURA 6. Influència del motiu TXP en el CCR5. *a*) Patró dels ponts d'hidrogen intramoleculars. La figura representa la distància del pont d'hidrogen (en Å) d'acord amb el temps transcorregut en la simulació (en ps). Es pot veure com TAP  $g^+$  i  $g^-$  i SAP  $g^+$  formen el pont d'hidrogen amb el residu  $i-4$  (en taronja), mentre SAP  $g^-$  el forma amb  $i-3$  (en blau). *b*) Representació del pont d'hidrogen entre la cadena lateral i el carbonil del residu en  $i-4$  (taronja) i el carbonil del residu en  $i-3$  (blau). *c*) Efecte dels motius estructurals AAP i TAP $g^+$  en la conformació de les hèlixs  $\alpha$ . En la figura es mostren estructures representatives extretes de les simulacions de dinàmica molecular dels sistemes AAP (en groc) i TAP $g^+$  (en vermell) en el context de l'estructura tridimensional de la rodopsina bovina (Rho). Les dues hèlixs estan superposades sobre TM2 de la rodopsina per la regió citoplasmàtica, que és la que mostra un grau més alt de conservació de seqüència. *d*) Nou model del CCR5. Les hèlixs de rodopsina es mostren com cilindres de color turquesa, excepte la part extracel·lular de TM2, que es mostra com una cinta. La perspectiva de la figura correspon a la visió del receptor des de la part extracel·lular. Es pot veure com la influència de la Thr sobre la distorsió causada per la Pro fa que l'hèlix es doblegui cap a l'interior del receptor.

lecular mostren que aquest motiu té la capacitat d'accentuar i modular el doblegament de les hèlixs  $\alpha$  induït per la Pro. Amb aquesta informació s'ha desenvolupat un nou mo-

del específic per al CCR5, on es pot veure com la part extracel·lular de TM2 es col·loca en el centre del receptor i molt a prop de TM3.

Així doncs, aquest treball representa un pas més envers la construcció de models tridimensionals de GPCR, que ens poden permetre entendre el funcionament d'aquests receptors (Govaerts *et al.*, 2001a; Govaerts *et al.*, 2001b) i ens pot ajudar en el disseny de lligands selectius (López-Rodríguez *et al.*, 2001).

## BIBLIOGRAFIA

- ALLEN, L. F.; R. J. LEFKOWITZ; M. G. CARON; S. COTECCHIA (1991). «G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, pàg. 11354-11358.
- AQVIST, J.; V. LUZHKOV (2000). «Ion permeation mechanism of the potassium channel». *Nature*, núm. 404, pàg. 881-884.
- BALDWIN, J. M.; G. F. SCHERTLER; V. M. UNGER (1997). «An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors». *J. Mol. Biol.*, núm. 272, pàg. 144-164.
- BALLESTEROS, J. A.; X. DEUPI; M. OLIVELLA; E. E. HAAKSMA; L. PARDO (2000). «Serine and threonine residues bend alpha-helices in the chi(1) = g(-) conformation». *Biophys. J.*, núm. 79, pàg. 2754-2760.
- BALLESTEROS, J. A.; H. WEINSTEIN (1995). «Integrated methods for the construction of three dimensional models and computational probing of structure-function relations in G-protein coupled receptors». *Methods Neurosci.*, núm. 25, pàg. 366-428.
- BARLOW, D. J.; J. M. THORNTON (1988). «Helix geometry in proteins». *J. Mol. Biol.*, núm. 201, pàg. 601-619.
- BERMAN, H. M.; J. WESTBROOK; Z. FENG; G. GILLILAND; T. N. BHAT; H. WEISSIG; I. N. SHINDYALOV; AND P. E. BOURNE (2000). «The Protein Data Bank». *Nucleic Acids Res.*, núm. 28, pàg. 235-242.
- BLUNDELL, T.; D. BARLOW; N. BORKAKOTI; J. THORNTON (1983). «Solvent-induced distortions and the curvature of alpha-helices». *Nature*, núm. 306, pàg. 281-283.
- COSTAGLIOLA, S.; D. KHOO; G. VASSART (1998). «Production of bioactive amino-terminal domain of the thyrotropin receptor via insertion in the plasma membrane by a glycosylphosphatidylinositol anchor». *FEBS Lett.*, núm. 436, pàg. 427-433.
- DA COSTA, C. R.; A. P. JOHNSTONE (1998). «Production of the thyrotrophin receptor extracellular domain as a glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane protein and its interaction with thyrotrophin and autoantibodies». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 11874-11880.
- DUAN, Y.; P. A. KOLLMAN (1998). «Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution». *Science*, núm. 282, pàg. 740-744.
- DUPREZ, L.; J. PARMA; S. COSTAGLIOLA; J. HERMANS; J. VAN SANDE; J. E. DUMONT; G. VASSART (1997). «Constitutive activation of the TSH receptor by spontaneous mutations affecting the N-terminal extracellular domain». *FEBS Lett.*, núm. 409, pàg. 469-474.
- GETHER, U. (2000). «Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors». *Endocr. Rev.*, núm. 21, pàg. 90-113.
- GETHER, U.; B. K. KOBILKA (1998). «G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 17979-17982.
- GOVAERTS, C.; C. BLANPAIN; X. DEUPI; S. BALLET; J. A. BALLESTEROS; S. J. WODAK; G. VASSART; L. PARDO; M. PARMENTIER (2001a). «The TXP motif in the second transmembrane helix of CCR5. A structural determinant of chemokine-induced activation». *J. Biol. Chem.*, núm. 276, pàg. 13217-13225.
- GOVAERTS, C.; A. LEFORT; S. COSTAGLIOLA; S. J. WODAK; J. A. BALLESTEROS; J. VAN SANDE; L. PARDO; G. VASSART (2001b). «A conserved Asn in transmembrane helix 7 is an on/off switch in the activation of the thyrotropin receptor». *J. Biol. Chem.*, núm. 276, pàg. 22991-22999.
- GRAY, T. M.; B. W. MATTHEWS (1984). «Intrahelical hydrogen bonding of serine, threonine and cysteine residues within alpha-helices and its relevance to membrane-bound proteins». *J. Mol. Biol.*, núm. 175, pàg. 75-81.
- GURRATH, M. (2001). «Peptide-binding g protein-coupled receptors: new opportunities for drug design». *Curr. Med. Chem.*, núm. 8, pàg. 1257-1299.
- HAMM, H. E. (1998). «The many faces of G protein signaling». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 669-672.
- HORN, F.; J. WEARE; M. W. BEUKERS; S. HORSCH; A. BAIROCH; W. CHEN; O. EDVARDSEN; F. CAMPAGNE; G. VRIEND (1998). «GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors». *Nucleic Acids Res.*, núm. 26, pàg. 275-281.
- Ji, T. H.; M. GROSSMANN; I. Ji (1998). «G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions». *J. Biol. Chem.*, núm. 273, pàg. 17299-17302.
- LARSON, S. M.; A. A. DI NARDO; A. R. DAVIDSON (2000). «Analysis of covariation in an SH3 domain sequence alignment: applications in tertiary contact prediction and the design of compensating hydrophobic core substitutions». *J. Mol. Biol.*, núm. 303, pàg. 433-446.
- LEFF, P. (1995). «The two-state model of receptor activation». *Trends Pharmacol. Sci.*, núm. 16, pàg. 89-97.

- LIU, R.; W. A. PAXTON; S. CHOE; D. CERADINI; S. R. MARTIN; R. HORUK; M. E. MACDONALD; H. STUHLMANN; R. A. KOUP; N. R. LANDAU (1996). «Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection». *Cell*, núm. 86, pàg. 367-377.
- LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M. L.; M. J. MORCILLO; E. FERNÁNDEZ; M. L. ROSADO; L. PARDO; K.-J. SCHAPER (2001). «Synthesis and Structure-Activity Relationships of a New Model of Arylpiperazines. 6. Study of the 5-HT<sub>1A</sub> Affinity/Selectivity by Classical Hansch Analysis, Artificial Neural Network, and Computational Simulation of Ligand Recognition». *J. Med. Chem.*, núm. 44, pàg. 198-207.
- MARINISSEN, M. J.; S. GUTKIND (2001). «G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms». *Trends Pharmacol. Sci.*, núm. 22, pàg. 368-376.
- MCGREGOR, M. J.; S. A. ISLAM; M. J. STERNBERG (1987). «Analysis of the relationship between side-chain conformation and secondary structure in globular proteins». *J. Mol. Biol.*, núm. 198, pàg. 295-310.
- MULLER, C. E. (2000). «Adenosine receptor ligands-recent developments part I. Agonists». *Curr. Med. Chem.*, núm. 7, pàg. 1269-1288.
- OLIVELLA, M.; X. DEUPI; C. GOVAERTS; L. PARDO (2002). «Influence of the Environment in the Conformation of  $\alpha$ -Helices Studied by Protein Database Search and Molecular Dynamics Simulations». *Biophys. J.*, núm. 82, pàg. 3207-3213.
- PALCZEWSKI, K.; T. KUMASAKA; T. HORI; C. A. BEHNKE; H. MOTOSHIMA; B. A. FOX; T. I. LE; D. C. TELLER; T. OKADA; R. E. STENKAMP; M. YAMAMOTO; M. MIYANO (2000). «Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor». *Science*, núm. 289, pàg. 739-745.
- SAMAMA, P.; S. COTECCHIA; T. COSTA; R. J. LEFKOWITZ (1993). «A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 4625-4636.
- SCHER, A.; F. FANELLI; T. COSTA; P. G. DE BENEDETTI; S. COTECCHIA (1996). «Constitutively active mutants of the alpha 1B-adrenergic receptor: role of highly conserved polar amino acids in receptor activation». *EMBO J.*, núm. 15, pàg. 3566-3578.
- UNGER, V. M.; P. A. HARGRAVE; J. M. BALDWIN; G. F. SCHERTLER (1997). «Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices». *Nature*, núm. 389, pàg. 203-206.
- WHITEHEAD, I. P.; I. E. ZOHN; C. J. DER (2001). «Rho GTPase-dependent transformation by G protein-coupled receptors». *Oncogene*, núm. 20, pàg. 1547-1555.