

ОПИС ВЛАСТИВОСТЕЙ ДІЇ $P2X_3$ РЕЦЕПТОРА ЗА ДОПОМОГОЮ КІНЕТИЧНОЇ МОДЕЛІ

О. В. Кононенко¹, В. В. Хмиз²

¹ Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,
Фізико-технічний інститут

² Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Анотація

Здійснено опис принципів побудови кінетичної моделі роботи $P2X_3$ рецепторів, а саме: модель Соколової та модель Кароль. З'ясовано, що відповідність між експериментальними та теоретичними результатами не свідчить про достовірність обраної моделі, тим самим ставить під сумнів модель Соколової. Зроблено висновок, що дію рецепторів $P2X_3$ можна описати за допомогою простої алостеричної моделі з двома відкритими станами.

Ключові слова: $P2X_3$ рецептор, циклічна модель, десенситизація, алостерична модель

Вступ

АТФ-активовані рецептори $P2X_3$ виражаються сенсорними нейронами, що сигналізують про різні форми болю. Швидка десенситизація (в межах 100 мс) та дуже повільне відновлення від десенситизації (що вимагає декількох хвилин) є однією з ознак рецепторів $P2X_3$ [1]. Розкриття молекулярних механізмів цього явища може допомогти зрозуміти основу ноцицептивної трансдукції.

Кінетичне моделювання є ефективним інструментом для розуміння явища десенситизації лігандних рецепторів, наприклад, певних підтипів рецепторів $P2X$, таких як $P2X_1$ або $P2X_2$. В даній роботі буде розглянуто моделі, які описують десенситизацію рецепторів $P2X_3$.

1. Принципи комп'ютерного моделювання

Метод комп'ютерного моделювання ґрунтується на наборі диференціальних рівнянь з ймовірністю виникнення кожного рецепторного стану. Далі ця система вирішується за допомогою методу Рунге-Кутти.

Модель Соколової

Перша модель десенситизації рецепторів $P2X_3$ була запропонована Соколовою та ін. [2] у 2006 році. Розробка кінетичної моделі відбувалася в декілька кроків:

Крок 1. Для початку було досліджено як сигмоїдна залежність відновлення від десенситизації може вказати на певні основні риси взаємодії агоністів/рецепторів. Приймаючи набір лінійних реакцій, що ведуть до різних рецепторних станів, в яких кожна ступінь переходу є незалежною, було побудовано ряд теоретичних кривих (побудова ступеня відновлення

від часу в лінійних масштабах) з різним ступенем сигмоїдності в залежності від кількості станів (рис.1). Перевірка цих кривих показала, що відновлення стає дуже повільним з великою кількістю станів, тоді як значення точки перегину рухається в межах двох відносно вузьких меж і очевидно насичується, коли кількість станів більше, ніж 7.

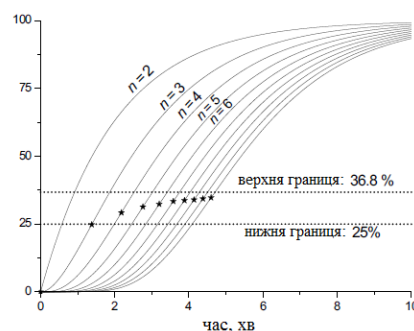


Рис. 1. Відновлення від десенситизації може бути забезпечено сигмоїдним періодом в залежності від кількості рецепторних станів, припускаючи незалежність об'єктів, пов'язаних з агоністами [2].

Ці спостереження в сукупності передбачали, що сигмоїдний час відновлення АТФ від десенситизації повинен базуватися на мультиреакційному процесі, поняття якого відповідає стехіометрії трьох молекул АТФ, пов'язаних з одним рецептором [1].

Крок 2. Наступним кроком здійснювалась перевірка, чи можуть бути застосованими існуючі кінетичні моделі, отримані для інших іонотропних рецепторів для рецептора $P2X_3$. Є, принаймні, три основні реакційні схеми: 1) послідовна схема, що використовується, наприклад, для рецепторів $P2X_1$; 2) біфуркаційна схема широко використовується для опису

десенситизації рецепторів ГАМК_A; 3) циклічна схема рецепторів ацетилхоліну. Для початкового вибору моделі було використано наступні критерії: 1) здатність імітувати потоки АТФ з відповідним курсом часу, включаючи повну десенситизацію; 2) повільне відновлення з курсом сигмоїдального часу. З такими вимогами ні послідовна модель, ні модель біфуркації не зможуть відтворити сигмоподібне відновлення, характерне для швидкої повної десенситизації струму. Таким чином підтверджується, що процес, який відповідає за криву сигмоподібного відновлення рецепторів $P2X_3$, потребує чітких шляхів реакції на початок та відновлення після десенситизації за аналогією з іншими іонотропними рецепторами. Оскільки циклічна модель містить таку функцію, було розглянуто, чи може бути доцільним моделювати роботу рецептора $P2X_3$.

Крок 3. Було висунуто припущення, що дисоціація агоніста з рецепторів була радикальним етапом процесу відновлення від десенситизації. Оскільки швидке відновлення від експериментальної десенситизації має швидкість $0,25\text{с}^{-1}$, було обрано константу швидкості, яка є верхньою межею переходу D-R.

Крок 4. Припускаючи, що десенситизація могла б розвиватися із замкнених рецепторів без їх активації, було винайдено циклічну модель, як показано на рисунку 2.

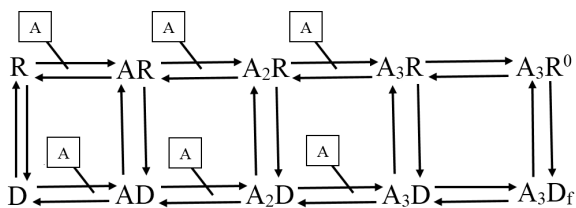


Рис. 2. Циклічна модель для роботи $P2X_3$, де R - стан релаксації рецептора, A - агоніст, R_0 - активізований рецептор, D_f - стрімко розвинутий десенситизований стан, тоді як більш повільні десенситизовані стани позначаються D.

Крок 5. Було знайдено константи швидкості циклічної моделі з найкращою придатністю до експериментальних результатів для різних агоністів, таких як АТФ, α , β -метилен АТФ, β , γ -метилен АТФ та 2-метилтіо-АТФ.

Створена модель адекватно імітувала всі характеристики (швидке настання, пік і спад) струму, викликаного АТФ.

Модель Кароль

У 2007 році Кароль та ін. [3] поставили під сумнів модель Соколової. Оскільки не маємо структурної інформації, яка б припускала, що окремі субмолекулярні області будуть відповідати за активацію та десенситизацію, було дещо спрощено схему і опущено швидкозростаючий десенситизований стан « A_3D_f » (рис. 3).

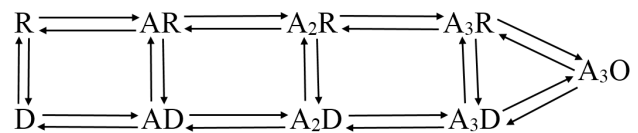


Рис. 3. Нова модель роботи $P2X_3$ рецепторів, де R - стану спокою; D - десенситизовані стани; O - відкритий стан.

У випадку циклічної схеми, найпростішим можливим способом побудови моделі є використання алостеричної моделі олігомерних білків, як було описано Монодом та ін. в 1965 [4]. Визначаючи модель як «алостеричну», малося на увазі, що вона відповідає трьом основним умовам: 1) модель ґрунтується на концепції, що агоністи можуть зв'язуватися з різними конформаційними станами рецептора, але з різною спорідненістю; 2) співвідношення афінності рівне співвідношенню рівноваги затримки з n порівняно з $n + 1$ зв'язаних агоністів; і 3) субодиниці рецептора змінюють їх конформацію узгоджено.

Перше припущення є розумним і обґрунтованим у випадку більшості рецепторів. Що стосується другої умови, було розглянуто спосіб зменшення кількості вільних параметрів (наприклад, від 17 до 8 у випадку стартової моделі Кароль [3], показаної на рисунку 3), і спосіб підтримувати мікроскопічну оборотність. Модель, побудована за допомогою цієї умови, якщо і здатна добре відтворювати експериментальні дані, то це ще не є доказом того, що фактична поведінка рецептора узгоджується з цим припущенням. Третє припущення (тобто немає рецепторів змішаної конформації, наприклад, одна субодиниця є відкритою, дві субодиниці – закриті) майже напевно не відповідали дійсній поведінці рецепторів. Тим не менш, було вирішено ввести це спрощення, оскільки модель без цього обмеження не відтворює експериментальні дані краще, але без необхідності ускладнює схему конформацій.

Однак, така модель погано описувала експериментальні дані. Проблема, як було з'ясовано, полягала в наступному: з констант часу спаду з високою концентрацією агоністів відомо, що десенситизація з відкритого стану відбувається досить швидко. Якщо вважати, що тільки один відкритий стан (A_3O), то відкриті рецептори будуть ізомеризовані в десенситизовану конформацію з тією ж швидкістю, незалежно від загальної заповнюваності ділянок зв'язування в цілому популяції рецепторів. З цієї причини агоністи низької концентрації не викликають значного струму, оскільки рецептори досягають відкритого стану з низькою швидкістю, але десенситизують при постійному, високому рівні. Тому для відтворення експериментальних даних знадобилася більш повна десенситизація відкритого стану при більш низькому рівні заповнення агоністів. Щоб це стало можливим, було припущено, що існує принаймні ще один додатковий відкритий стан з повільною швидкістю десенситизації. Таким чином, низька концентрація агоністів викликає порівняно великий струм з повільною

кінетиною, як це спостерігалось експериментально [3]. Отже, була створена інша модель, в яку було додано ще один відкритий стан рецепторів і спочатку передбачалося, що ці рецептори відкриваються і закриваються такими ж темпами (рис. 4).

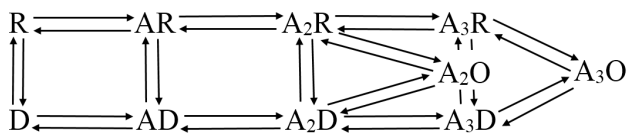


Рис. 4. Модель з двома відкритими станами.

2. Результати

Отже, звичайна алостерична модель здатна відтворити кінетичну поведінку рецептора. Насправді, для досягнення цього необхідна дуже проста модель. Головне питання, звичайно, не те, що експерименти розповідають про властивості моделі (тобто, чи можливо побудувати модель, яка відтворює експериментальні дані), а те, що модель розповідає про об'єкт наших експериментів (тобто кінетика та спорідненість $P2X_3$ рецепторів, чи наша модель допомагає зрозуміти механізм властивостей рецептора). Соколова та ін. [2] переконливо стверджувала, що модель рецептора $P2X_3$ повинна бути циклічною, і вона повинна мати три обов'язкових стани. Однак, Кароль та ін. [3] показала, що, крім відкритого стану (A_3R^0), також слід врахувати напружений відкритий стан і що простий алостеричний механізм може адекватно описувати поведінку рецептора, включаючи деякі нез'ясовані явища, такі як різниця в кількості разів між значеннями IC_{50} і EC_{50} , децю велика різниця між часовими константами десенситизації та відновлення, наприклад. Той факт, що модель Кароль так просто пояснює і так легко відтворює експериментально отримані явища, безумовно, важливо, однак, звичайно, не доводить, що рецептори дійсно активують і десенситизують за допомогою цього механізму (тобто, що суб'єкти рецептора змінюють їх конформацію узгоджено). Неконцентрована ізомеризація субодиноць була доведена в ряді іонних каналів. Проте, у разі рецепторів $P2X_3$, було припущено, що часткова заповнюваність місць зв'язування агоністів різко збільшує спорідненість решти (без зайнятості) сайтів зв'язування; інакше жодна модель не зможе відтворити експериментальну поведінку. Алостерична модель є не єдиним способом, але найпростішим для пояснення підвищеної спорідненості вільних ділянок зв'язування частково окупованих рецепторів. Одним з можливих альтернативних механізмів є те, що, хоча одиничні винятки можуть існувати, сусідні суб'єкти можуть впливати один на одного. Ізомеризація однієї субодиноць в результаті зв'язування з агоністом може збільшити ймовірність ізомеризації сусідніх субодиноць, таким чином, впливаючи на спорідненість їх місць зв'язування (як це передбачалося в послідовній моделі Кошланда та ін. [5]).

Висновки

У даній статті було розглянуто принципи побудови кінетичної моделі процесу десенситизації $P2X_3$ рецепторів, зокрема на прикладі моделі Соколової та Кароль. Дійсність висновків, отриманих з моделювання, очевидно, залежить від того, чи модель достеменно відображає фактичний механізм активації рецепторів та десенситизацію. Той факт, що модель досить добре відтворює всі експериментальні результати (концентраційна залежність швидкості активації, швидкості спаду, амплітуди струму та ін.), це не доводить, таким чином модель Соколової не є достовірною. Кароль підкреслила, що є багато невизначених точок щодо механізму активації та десенситизації: оскільки властивості одного каналу рецепторів $P2X_3$ виключають проведення належного аналізу, кількість пов'язаних відкритих та закритих станів, а також фактичних констант швидкості не може бути визначена. Однак, завдяки їй, можна стверджувати, що дія рецепторів $P2X_3$ може бути описаною за допомогою простої алостеричної моделі з додатковим відкритим станом, тому варто використовувати модель Кароль як базову. Додатковий відкритий стан характеризується зниженням ступеня десенситизації, що означає, що у випадку тривалого застосування агоніста низька концентрація може бути такою ж ефективною, як висока концентрація за обсягом потоку заряду. Подальші експериментальні та моделюючі дані допоможуть удосконалити молекулярні механізми, що беруть участь у процесі рецептора $P2X_3$, що є досить важливим, оскільки рецептори $P2X_3$ приймають участь у відчуттях болю, тому важливим є регулювання їх активності, а розуміння того, як біль обробляється на кожному етапі периферичної та центральної нервової системи, є передумовою для розробки нових методів лікування болю.

Перелік використаних джерел

1. North R. A. Molecular physiology of P2X receptors. 2002. — *Physiol Rev* 82:1013–1067.
2. Sokolova E., Skorinkin A., Moiseev I., Agrachev A., Nistri A. and Giniatullin R. Experimental and modeling studies of desensitization of P2X3 receptors. 2006. — *Mol Pharmacol* 70:373–382.
3. Karoly R., Mike A., Illes P., and Gerevich Z. The Unusual State-Dependent Affinity of P2X3 Receptors Can Be Explained by an Allosteric Two-Open-State Model. 2008. — *Mol Pharmacol* 73:224–234.
4. Monod J., Wyman J., and Changeux JP. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. 1965. — *J Mol Biol* 12:88–118.
5. Koshland DE Jr, Nemethy G., and Filmer D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. 1966. — *Biochemistry* 5:365–385.