

УДК 577.322.3

## СТРУКТУРНЫЙ МЕХАНИЗМ ИОННОЙ ПРОВОДИМОСТИ КАНАЛА TRPV1

© 2023 г. Ю. А. Трофимов<sup>1,2,\*</sup>, А. С. Минаков<sup>3</sup>, Н. А. Крылов<sup>1,4</sup>, Р. Г. Ефремов<sup>1,4,5</sup>

Представлено академиком РАН А.Б. Рубиным

Поступило 18.11.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принято к публикации 14.12.2022 г.

Так называемый эффект “гидрофобного затвора” — один из возможных механизмов управления проводимостью воды и ионов через поры ионных каналов. Эффект затвора возникает в узких участках проводящей поры, выстланных неполярными остатками. В закрытом состоянии канала такие участки могут находиться в дегидратированном состоянии, блокируя перенос воды и ионов без полной окклюзии поры. В открытом же состоянии гидрофобный затвор достаточно широк, чтобы обеспечить устойчивую гидратацию и проводимость. В некоторых каналах перенос через открытый гидрофобный затвор может быть облегчен полярными остатками, помогающими полярным/заряженным частицам преодолевать энергетический барьер, создаваемый неполярной средой. В данной работе исследовано поведение ионов  $\text{Na}^+$  и их гидратных оболочек в открытой поре ионного канала TRPV1 с помощью моделирования молекулярной динамики. Показано, что полярные группы остатков аспарагина координируют молекулы воды таким образом, чтобы восстанавливать гидратную оболочку ионов в гидрофобном затворе поры, что обеспечивает транспорт ионов через затвор в полностью гидратированном состоянии.

**Ключевые слова:** TRPV1, ионные каналы, гидрофобный затвор, ионная проводимость

**DOI:** 10.31857/S2686738923700221, **EDN:** QIDHBZ

Во многих типах ионных каналов некоторые участки внутренней поверхности их трансмембранных пор выстланы неполярными остатками, образующими своего рода “пояса” гидрофобно-

сти. Когда канал находится в закрытом/неактивном состоянии, сужения подобных поясов предотвращают самопроизвольную диффузию воды и ионов через пору. При активации белка радиус сужений (т.н. “активационных ворот”) увеличивается и возникает эффективный транспорт молекул воды и ионов через канал. Данный эффект, известный как “гидрофобный затвор”, способен блокировать перенос воды и ионов без полной окклюзии поры (обычно при радиусе сужения между  $C_\alpha$  атомами  $\leq 4 \text{ \AA}$ ) [1]. По-видимому, в некоторых каналах транспортировке через гидрофобные затворы могут способствовать полярные “группы-помощники” аминокислотных остатков белка, которые помогают полярным/заряженным веществам (таким как вода и ионы) преодолевать энергетический барьер, создаваемый неполярным окружением затвора.

Ярким примером ионного канала с подобным механизмом работы активационных ворот является TRPV1. Ранее мы проводили расчеты молекулярной динамики (МД) TRPV1 для изучения гидрофобной организации его поры в открытом и закрытом состояниях, а также изучали аномальную динамику молекул воды в ограниченном объеме его поры [2, 3]. В данной работе мы исследовали с помощью МД-моделирования поведе-

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

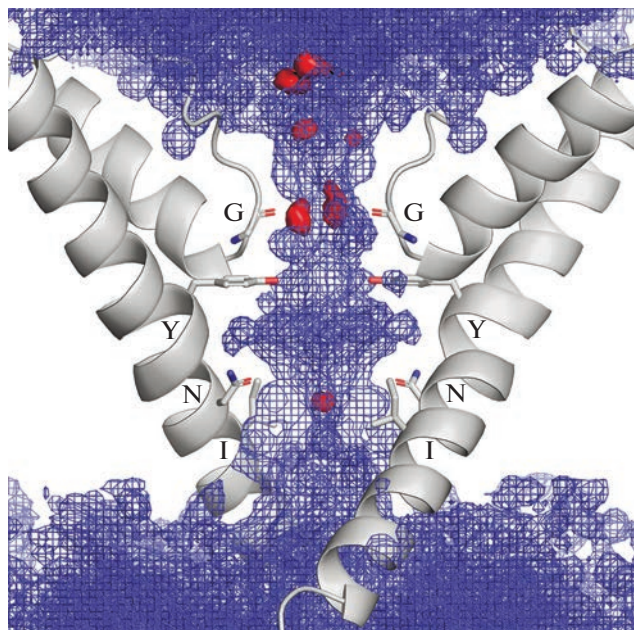
<sup>2</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Национальный исследовательский ядерный университет МИФИ”, Москва, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Москва, Россия

<sup>4</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Национальный исследовательский университет “Высшая школа экономики”, Москва, Россия

<sup>5</sup> Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования “Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)”, Московская область, Долгопрудный, Россия

\*e-mail: YuTrofimov@gmail.com



**Рис. 1.** Структура поры TRPV1 (PDB ID 7L2W, [4]). Показаны только две расположенные по диагонали субъединицы. Образующие пору спирали изображены в ленточном представлении, обозначены остатки, выстилающие пору: Gly643 (G), Tyr671 (Y), Asn676 (N) и Ile679 (I). На структуру белка наложены распределения плотности молекул воды (синяя сетка, порог  $0.03 \text{ мол./\AA}^3$ ) и ионов  $\text{Na}^+$  (красная поверхность, порог  $0.03 \text{ ион./\AA}^3$ ), усредненные по траектории МД.

ние ионов  $\text{Na}^+$  и организацию их гидратных оболочек в открытой поре TRPV1 крысы [4], в первую очередь, в окрестности активационных ворот. Показано, что структура ворот организована таким образом, чтобы восстановить гидратационную оболочку иона. Основываясь на результатах МД, предложен механизм транспорта ионов через гидрофобный затвор в полностью гидратированном состоянии благодаря координации молекул воды гидратной оболочки иона полярными группами аспарагина, расположенными в окрестности затвора.

TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) — неселективный катионный канал, главным образом экспрессируемый в сенсорных нейронах, чувствительный к высокой температуре ( $>43^\circ\text{C}$ ), низким значениям pH (5.9), механическим стимулам и ряду химических веществ, в частности, капсаицину и анандамиду [5–7]. TRPV1 является гомотетрамером, в центре которого находится пора, образованная трансмембранными  $\alpha$ -спиралями смежных субъединиц. Пора TRPV1 представляет собой канал нанометрового масштаба, доступный для молекул воды и ионов, стенки которого обладают гетерогенными физико-химическими свойствами [2]. В поре есть два “бутылочных горлышка”: фильтр и активационные ворота. Самая узкая область фильтра сформирована по-

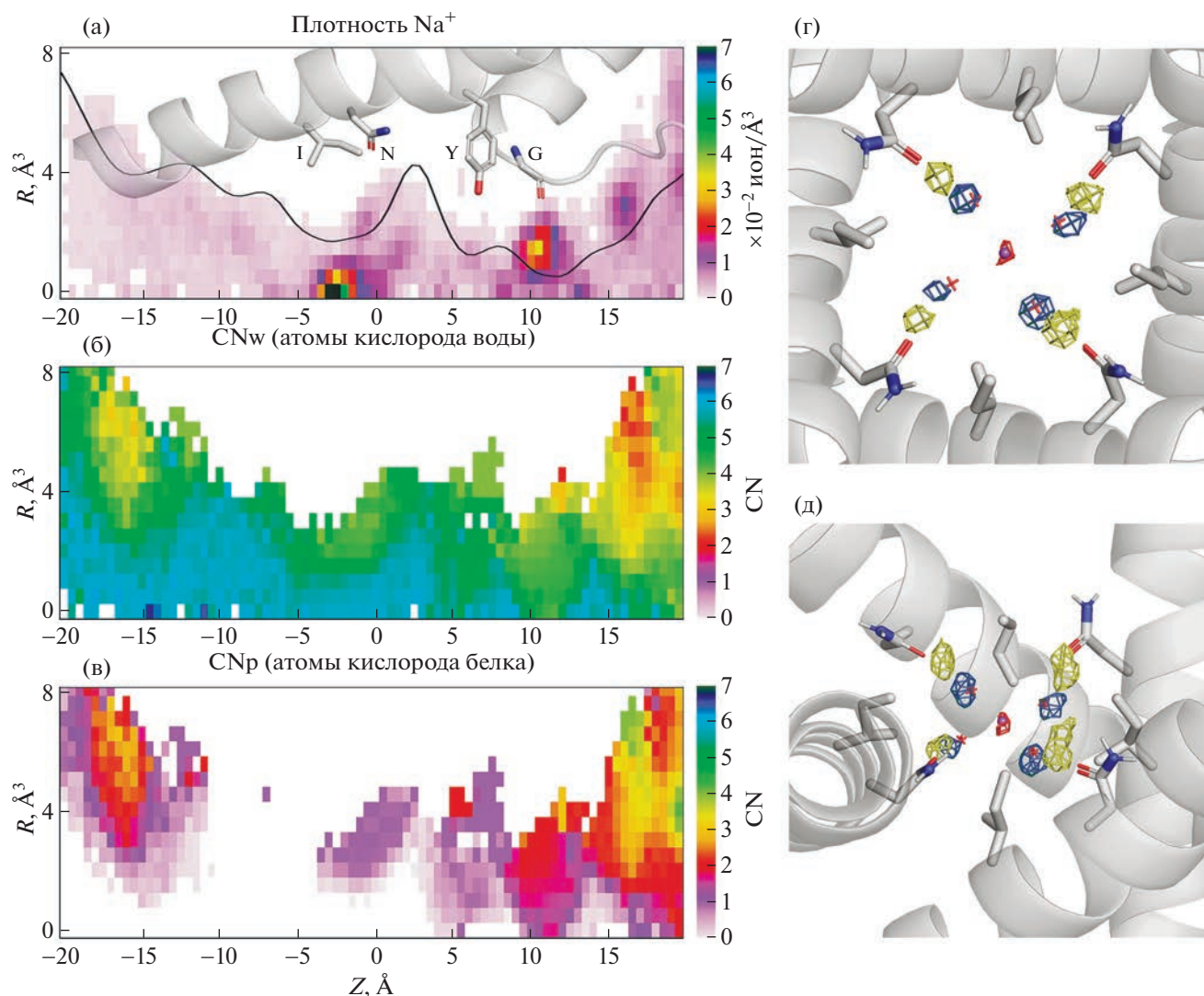
лярными карбонильными группами Gly643. Ворота образованы неполярными боковыми цепями остатков Ile679, они создают гидрофобный затвор в поре, контролируя проводимость канала (рис. 1). Согласно экспериментальным данным, двойная замена Ile679Ala + Ala680Gly, по-видимому, создает “всегда открытый” фенотип канала [8]. Полярные боковые цепи Asn676 ориентированы внутрь поры и направлены в окрестность ворот, что может предотвращать образование гидрофобного затвора при активации канала. Также предполагается, что Asn676 может являться своеобразным помощником гидратации поры [3, 9],

В данной работе проведено МД-моделирование открытого канала TRPV1 (PDB ID 7L2W, [4]), встроенного в гидратированный липидный бислой. Анализ данных МД показал, что, несмотря на гидрофобные свойства стенок, пора полностью гидратирована. Ионы  $\text{Na}^+$  проникают в области полярного фильтра и гидрофобного затвора активационных ворот, локализуясь в них (рис. 1).

Для детального анализа поведения гидратной оболочки ионов в поре были рассчитаны двумерные распределения плотности ионов, а также средние значения координационного числа молекул воды и атомов кислорода белка в первой координационной сфере ионов  $\text{Na}^+$  ( $\text{CN}_w$  и  $\text{CN}_p$  соответственно) в зависимости от координаты вдоль оси поры ( $Z$ ) и расстояния от оси ( $R$ ) (рис. 2).

В распределении плотности ионов наблюдаются два максимума: при  $Z = 9\text{--}13 \text{ \AA}$  (фильтр) и при  $Z = -5\text{--}0 \text{ \AA}$  (ворота). Локализация ионов в фильтре смещена от оси поры, при этом две молекулы воды из координационной сферы иона замещаются двумя атомами кислорода Gly643. В результате сохраняется полная сольватная оболочка иона, состоящая из 6 атомов кислорода. Следуя в направлении ворот, ионы снова отклоняются от оси поры на  $2\text{--}4 \text{ \AA}$  и связываются с атомом кислорода боковой цепи Asn676 (сиреневая область при  $Z = -2.5\text{--}5 \text{ \AA}$  на рис. 2в), теряя при этом 2 молекулы воды. Затем ионы заходят в створ ворот, восстанавливая гидратную оболочку до 6 молекул воды. В воротах наиболее высокая плотность ионов наблюдается на оси поры, т.е. ровно по центру гидрофобного затвора.

Пространственное распределение плотности гидратной оболочки ионов, локализованных в затворе, показывает, что молекулы воды группируются вокруг иона в вершинах квадрата — основания октаэдра, что соответствует форме гидратной оболочки  $\text{Na}^+$  в свободной воде [11]. Среднее расстояние между атомами кислорода воды и  $\text{Na}^+$  составляет  $2.33 \text{ \AA}$ , как в свободной воде. Молекулы воды локализируются в гидрофобном окружении боковых цепей Ile679 благодаря образованию во-



**Рис. 2.** (а) Распределение плотности  $\text{Na}^+$  вдоль оси поры ( $Z$ ) в зависимости от расстояния от оси ( $R$ ). Цветовая шкала — значения плотности,  $\times 10^{-2}$  ион/ $\text{\AA}^3$ . Наложены порообразующие спирали одной из субъединиц белка и радиус поры, рассчитанный через объем, доступный растворителю (черная линия). (б–в) — Распределения значений  $\text{CNw}$  и  $\text{CNr}$  вдоль оси поры в зависимости от  $R$ , цветовая шкала — значения  $\text{CN}$ . (г–д) — распределения  $\text{Na}^+$  (красный), атомов кислорода воды в его гидратной оболочке (синий) и водородных связей вода — Asn676 (желтый), усредненные по траектории МД. Показаны боковые цепи Asn676 и Ile679, фиолетовая сфера и красные кресты — модель  $\text{Na}^+$  и его сольватной оболочки в свободной воде: (г) — вид сверху; (д) — вид сбоку.

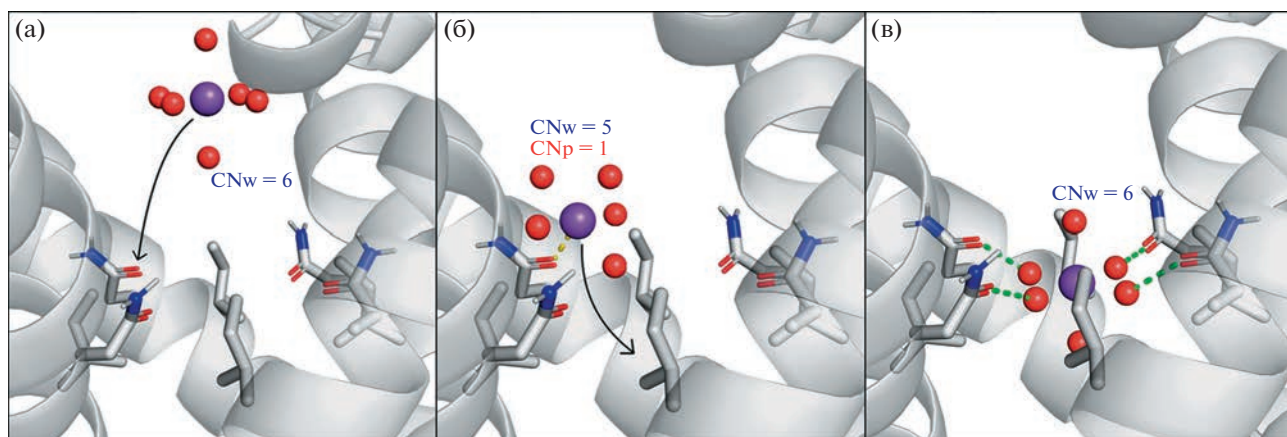
дородных связей с боковых цепей остатков Asn676 (рис. 2г–2д).

На основании результатов моделирования предположен следующий механизм транспорта ионов через гидрофобный затвор TRPV1. Во внутреннем объеме поры канала ионы связываются с атомом кислорода боковой цепи остатка Asn676 одной из субъединиц, теряя при этом 1–2 молекулы воды из своей гидратной оболочки (рис. 3б), а затем проникают в ворота, восстанавливая полную гидратную оболочку — 6 молекул воды (рис. 3в).

Структура ворот организована таким образом, что атомы кислорода боковых цепей Asn676 коор-

динируют 4 молекулы воды непосредственно в створе ворот, в гидрофобном окружении боковых цепей Ile679. При этом расположение молекул воды соответствует геометрии и размерам гидратной оболочки  $\text{Na}^+$  в свободной воде.

Ранее в литературе широко обсуждалось наличие гидрофобных затворов в ионных каналах различных типов [1, 12–14]. Однако, насколько нам известно, единственным механизмом управления проводимостью подобных затворов предполагалось увеличение диаметра гидрофобных участков, приводящее к их гидратации и снижению энергетического барьера для прохождения ионов в гидратированном состоянии. В данной работе



**Рис. 3.** Механизм транспорта  $\text{Na}^+$  через гидрофобный затвор открытого TRPV1. Показаны остатки Ile679 и Asn676. Фиолетовая сфера — ион  $\text{Na}^+$ , красные сферы — атомы кислорода молекул воды, указаны CN для воды (CNw) и белка (CNp). Стрелки обозначают направление движения ионов через затвор. Желтая пунктирная линия — контакт между ионом  $\text{Na}^+$  и атомом кислорода Asn676, зеленые — водородные связи между атомом кислорода Asn676 и молекулами воды гидратной оболочки иона.

на примере ворот открытого канала TRPV1 показано, что геометрия гидрофобного створа и распределение в нем зарядов могут быть устроены таким образом, чтобы структурировать воду оптимальным для гидратации ионов образом. Согласно представленным результатам, этот процесс в TRPV1 в основном регулируется остатками Asn676, которые временно “предоставляют” 4 молекулы воды в гидратную оболочку  $\text{Na}^+$ . Поскольку TRPV1 является неселективным катионным каналом, и другие типы ионов с различными формами гидратных оболочек могут проходить через пору (например, квадратная антипризма в случае  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{2+}$  [11]). Представляется вероятным, что подвижные боковые цепи Asn676 способствуют пространственной адаптации молекул воды для различных катионов, обеспечивая таким образом их транспортировку в неполярной среде. Предлагаемый молекулярный механизм транспорта катионов через гидрофобный затвор поры ионного канала ранее не был сформулирован. Полученные результаты будут полезны для понимания деталей ионной проводимости как белков подсемейства TRPV, так и других ионных каналов, в которых наблюдается эффект гидрофобного затвора.

## МЕТОДЫ

Структура канала TRPV1 в открытом состоянии (PDB ID 7L2W, [4]) была помещена в полностью гидратированный липидный бислой, имитирующий мембрану нейрона, с молярным соотношением компонентов пальмитоилолеил-фосфатидилхолин (ПОФХ) / пальмитоилолеил-фосфатидилэтаноламин (ПОФЭ) / холестерин, равным 2/1/1. МД-моделирование проводили с помощью программного пакета GROMACS [15]

версии 2021.4, силового поля Amber99sd-ildn [16] и модели воды TIP3P [17]. Для ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  использовали параметры потенциала Леннарда-Джонса, оптимизированные для учета взаимодействий ионов с водой [18]. Фактические значения  $\sigma$  и  $\epsilon$  для  $\text{Na}^+$  составляли 2.439 Å и 0.3658 кДж/моль, а для  $\text{Cl}^-$  — 4.478 Å и 0.1489 кДж/моль. Были рассчитаны и проанализированы три независимые траектории МД продолжительностью по 200 нс.

Ось поры (Z) определяли как прямую, перпендикулярную плоскости бислоя.  $Z = 0$  задавали как точку, соответствующую положению центра масс  $\text{C}_\alpha$  атомов остатков 642, 643, 644, 645, 671, 675, 676, 679, 680, 683, 686, 687, выстилающих стенки поры. Пространственные распределения молекул воды,  $\text{Na}^+$  и водородных связей рассчитывали как значения их плотности, усредненные по траектории МД, и показывали в виде изоповерхностей, аналогично работе [3]. Двумерные распределения плотности были получены из пространственных распределений. Радиус координационной сферы ионов  $\text{Na}^+$  был принят равным 3.25 Å.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят суперкомпьютерный центр “Политехнический” Санкт-Петербургского политехнического университета, центр “Дальневосточный вычислительный ресурс” ИАКП ДВО РАН (<https://cc.dvo.ru>) и Межведомственный суперкомпьютерный центр РАН за предоставленные вычислительные ресурсы.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

(Соглашение № 075-15-2020-773). Суперкомпьютерные расчеты были поддержаны в рамках Программы фундаментальных исследований НИУ ВШЭ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rao S., Lynch C.I., Klesse G., et al. Water and hydrophobic gates in ion channels and nanopores // *Faraday Discuss.* 2018. V. 209. P. 231.
2. Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., et al. Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. 33112.
3. Trofimov Y.A., Krylov N.A., Efremov R.G. Confined dynamics of water in transmembrane pore of TRPV1 ion channel // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. 4285.
4. Zhang K., Julius D., Cheng Y. Structural snapshots of TRPV1 reveal mechanism of polymodal functionality // *Cell.* 2021. V. 20 (184). P. 5138.
5. Benarroch E.E. TRP channels: Functions and involvement in neurologic disease // *Neurology.* 2008. V. 8 (70). P. 648.
6. Birder L.A., Nakamura Y., Kiss S., et al. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1 // *Nat. Neurosci.* 2002. V. 9 (5). P. 856.
7. Chuang H.H., Prescott E.D., Kong H., et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-mediated inhibition // *Nature.* 2001. V. 6840 (411). P. 957.
8. Lubova K.I., Chugunov A.O., Volynsky P.E., et al. Probing temperature and capsaicin-induced activation of TRPV1 channel via computationally guided point mutations in its pore and TRP domains // *Int. J. Biological Macromol.* 2020. V. 158. P. 1175.
9. Kasimova M., Yazici A., Yudin Y. et al. Ion channel sensing: are fluctuations the crux of the matter? // *J. Phys. Chem. Lett.* 2018. V. 9. P. 1260.
10. Susankova K., Ettrich R., Vyklicky L., et al. Contribution of the putative inner-pore region to the gating of the transient receptor potential vanilloid subtype 1 channel (TRPV1) // *J. Neurosci.* 2007. V. 28 (27). P. 7578.
11. Persson I. Hydrated metal ions in aqueous solution: How regular are their structures? // *Pure Appl. Chem.* 2010. V. 82 (10). P. 1901.
12. Rao S., Klesse G., Stansfeld P.J., et al. A heuristic derived from analysis of the ion channel structural proteome permits the rapid identification of hydrophobic gates // *PNAS.* 2019. V. 28 (116). P. 13989.
13. Beckstein O., Sansom M.S.P. A hydrophobic gate in an ion channel: The closed state of the nicotinic acetylcholine receptor // *Physical Biology.* 2006. V. 2 (3). P. 147.
14. Yonkunas M., Kurnikova M. The hydrophobic effect contributes to the closed state of a simplified ion channel through a conserved hydrophobic patch at the pore-helix crossing // *Front. Pharmacol.* 2015. V. 6. P. 284.
15. Hess B., Kutzner C., Spoel D.V.D. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation // *J. Chem. Theory and Computation.* 2008. V. 3 (4). P. 435.
16. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., et al. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field // *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics.* 2010. V. 8 (78). P. 1950.
17. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 2 (79). P. 926.
18. Joung I.S., Cheatham T.E. Determination of alkali and halide monovalent ion parameters for use in explicitly solvated biomolecular simulations // *J. Phys. Chem. B.* 2008. V. 30 (112). P. 9020.

## STRUCTURAL MECHANISM OF IONIC CONDUCTIVITY OF THE TRPV1 CHANNEL

Yu. A. Trofimov<sup>a,b,#</sup>, A. S. Minakov<sup>c</sup>, N. A. Krylov<sup>a,d</sup>, and R. G. Efremov<sup>a,d,e</sup>

<sup>a</sup> Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute), Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russian Federation

<sup>e</sup> Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: YuTrofimov@gmail.com

Presented by Academician of the RAS A.B. Rubin

The so-called “hydrophobic gating” is widely discussed as a putative mechanism to control water and ion conduction via ion channels. This effect can occur in narrow areas of the channels pore lined by non-polar residues. In the closed state of the channel, such regions may spontaneously transit to a dehydrated state to block water and ions transport without full pore occlusion. In the open state, the hydrophobic gate is wide enough to provide sustainable hydration and conduction. Apparently, the transport through the open hydrophobic gate may be facilitated by some polar residues that assist polar/charged substances to overcome the energy barrier created by nonpolar environment. In this work, we investigated the behavior of Na<sup>+</sup> ions and their hydration shells in the open pore of the rat TRPV1 ion channel by molecular dynamics simulations. We show that polar protein groups coordinate water molecules in such a way as to restore the hydration shell of ions in the hydrophobic gate that ensures ion transport through the gate in a fully hydrated state.

**Keywords:** TRPV1, ion channels, hydrophobic gate, ionic conductivity