

base estrutural para o reconhecimento de diferentes antidepressivos pelo transportador humano de serotonina

Jonathan A. Coleman¹ e Eric Gouaux^{1,2*}

Inibidores selectivos da recaptação da serotonina estão clinicamente prescritos antidepressivos que actuam por aumento das concentrações locais de neurotransmissores nas sinapses e em espaços extracelulares através do bloqueio do transportador da serotonina. Aqui nós relatamos estruturas de raios-X de variantes termoestáveis engenharia do transportador de serotonina humana ligado ao antidepressivos sertralina, fluvoxamina e paroxetina. As drogas impedem ligação da serotonina ao ocupar o local central de ligação ao substrato e estabilizando o transportador numa conformação exterior aberta. Estas estruturas explicar como resíduos no interior do local central orquestrar a ligação de diversos inibidores quimicamente e mediar transportador selectividade de drogas.

Em 1972, a sinalização de receptores serotoninérgicos, efectuando a absorção de serotonina (5-HT), a partir de espaços sinápticos em transportadores de serotonina (SERTs). SERTs influenciam a sinalização de 5-HT muitos aspectos do comportamento, incluindo a memória, a aprendizagem, sono, fome, dor, função sexual, e humor¹.

Um número substancial de nucleótido único polimorfismo nonsynonymous são conhecidos para afectar o transporte de 5-HT e são enriquecidos em famílias com desordens psiquiátricas, incluindo o transtorno obsessivo-compulsivo e síndrome de Asperger². Além disso, SERT é o alvo principal dos medicamentos terapêuticos utilizados no tratamento da depressão, distúrbios de ansiedade e desordem de hiperactividade com deficiência de atenção³.

5-HT também é encontrado no sistema circulatório, onde actua como um constritor vaso-, e alteradas as concentrações plasmáticas de 5-HT têm sido implicados em diversas patologias, incluindo hipertensão⁴. Os níveis plasmáticos de 5-HT são regulados por SERT, que armazena 5-HT em plaquetas, garantindo, assim, o fluxo sanguíneo estável⁵. Transportadores para dopamina (DAT) e norepinefrina estão relacionados com SERT na sequência de aminoácidos e em função biológica, e são também alvos bem estabelecido de agentes farmacológicos que influenciam a química do cérebro⁶.

Estes transportadores de monoamina explorar os gradientes de iões de Na⁺ e Cl⁻, tornando assim a absorção de neurotransmissor termodinamicamente favorável⁷. Transportadores de monoamina tem 12 transmembranares cinesinas (TMS), e TMS 05/01 e 10/06 TMS forma uma repetição invertida ical-topolog- contendo um local de ligação central para substrato e iões aproximadamente a meio caminho através da membrana⁸⁻¹⁰. Um vestibulo extracelular na conformação virada para o exterior^{8,10,11} forma uma segunda cavity, sítio alostérico, que, quando ocupado por ligandos, podem modular a actividade do transportador através da alteração da cinética de dissociação do ligando a partir do local central¹²⁻¹⁴. Substâncias que provocam dependência, tais como a cocaína e anfetamina ligam-se a transportadores de monoamina e podem inibir o transporte de neurotransmissor ou promover neurotransmissor efluxo, respectivamente^{15,16}. Os inibidores selectivos da recaptação da serotonina (SSRIs) são uma classe de pequenas moléculas que são altamente selectivos para SERT sobre DAT e norepinefrina, e que inibem a reabsorção de 5-HT com potência nanomolar¹⁷. SSRIs são normalmente utilizados no tratamento do transtorno depressivo maior e transtorno de ansiedade¹, e são os antidepressivos mais amplamente prescritos¹⁸.

SSRIs têm diversas estruturas químicas e, em muitos casos, não compartilham motivos estruturais comuns. A diversidade de SSRI estruturas químicas resultados em compostos com diferenças substanciais farmacológicas¹⁹. Por exemplo, a sertralina e fluvoxamina diferem na estrutura química de outros SSRIs tais como paroxetina, citalopram, fluoxetina e (fig. 1a); como consequência, estes compostos ligam-se com uma gama de afinidades para SERT. A sertralina contém um sistema de tetra-hidronaftaleno-anel ligado a uma amina secundária em conjunto com um meta- e para-grupo clorofenil substituído. A fluvoxamina, em contraste, consiste de uma porção de 2-aminoethoxime ligado a um grupo methoxybutyl e um grupo fenilo contendo um grupo metilo no trifluorinated para position. A fluoxetina também contém um grupo aromático trifluorinated mas em vez disso é acoplado a uma unidade propilamina fenil-. Paroxetina e citalopram também diferem cialmente nas estruturas dos seus substituintes aromáticos, amina, e halogenados.

Recentemente, temos resolvido estruturas de raios-X de uma construção termoestável, transporte-inactivo de SERT humano, denotado a construção TS3, no complexo com a paroxetina SSRIs e citalopram⁹. Utilizou-se a variante termoestável de SERT para facilitar a purificação e cristalização^{20,21}. No entanto, um dos ções mutação termoestabilizar envolve um resíduo (T439S) que está posicionado directamente dentro do local de ligação central, próximo do SSRIs ligado. modelagem computacional Além disso, recente de um complexo SERT-paroxetina de tipo selvagem, em que a estrutura do *Drosophila* DAT foi usada como uma placa para a tempe- estrutura SERT, produziu uma pose para paroxetina no local de ligação a SERT que é diferente da que se encontra na estrutura de cristal TS3 SERT²². À luz do estudo computacional e porque resíduo 439 está perto do local de ligação central, que foram motivadas para determinar as estruturas cristalinas do SERT-SSRI ligado na qual resíduo 439 é o de tipo selvagem aminoácido treonina.

Apesar da importância dos SSRIs na medicina e no estudo ical biophys- de SERT, há pouca explicação estrutural para a forma como estes ligantes diversos ligam a SERT²³. Até recentemente, o entendimento de como SSRIs estrutural ligam-se a SERT foi em grande parte, guiado por ies tensos estudos da leut homólogo bacteriana^{24,25}, modelagem computacional²⁶⁻³⁰, e, mais recentemente, as estruturas de SERT em complexo com parox-

¹ Instituto Vollum, Oregon Health & Science University, Portland, OR, EUA. ² Howard Hughes Medical Institute, Oregon Health & Science University, Portland, OR, EUA. *o email: gouauxe@ohsu.edu

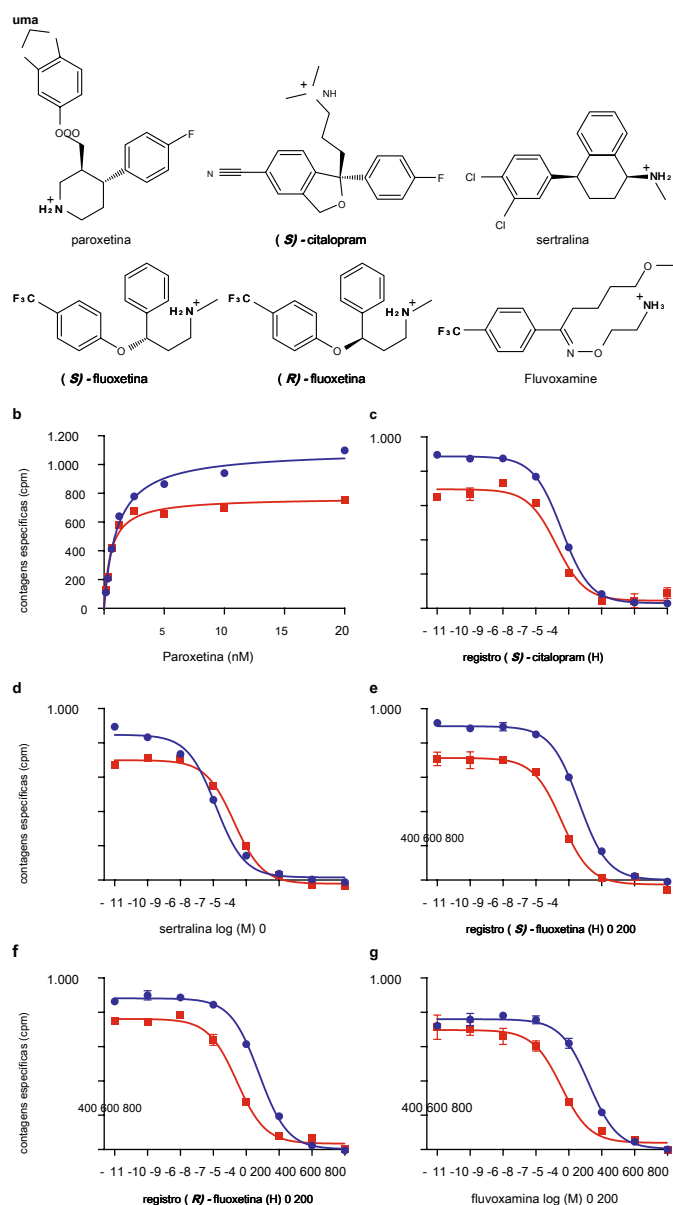


Fig. 1 | Saturação e experiências de ligação de competição. **a**, As estruturas químicas dos SSRIs. **b**, Ligação de saturação de [3 H] paroxetina para TS3 (vermelho, quadrados) e a TS2 (azul, círculos) variantes. **c–g**, experiências de competição entre a ligação de [3 H] paroxetina e os SSRIs frio indicada para variantes SERT TS3 e ts2, tal como descrito em **b**. Os gráficos apresentam os meios \pm SEM de medições em triplicado a partir de uma experiência representativa ($n = 3$ experiências independentes).

etine e citalopram⁹. Nós fundamentado que para acomodar vários SSRIs dentro do sítio de ligação central, resíduos revestem o sítio de ligação central pode adotar diferentes conformações. Assim, determinada estruturas de raios-X de Thr439 TS2 SERT em complexo com oxetine par- e a estrutura do transportador TS3 ligado a sertralina e fluvoxamina. Estas estruturas proporcionam uma visão sobre como dife- SSRIs otorrinolaringológicas são ligados dentro do local de ligação central da SERT.

resultados

A ligação de antidepressivos aos transportadores TS2 e TS3. Para investigar a capacidade dos TS3 e ts2 transportadores para se ligar antidepressivos, primeiro levada a cabo estudos de ligação utilizando [3 H] paroxetina (Fig. 1b). Paroxetina ligada com um K_d valor de $1,09 \pm 0,08$ e $0,63 \pm 0,07$ nM

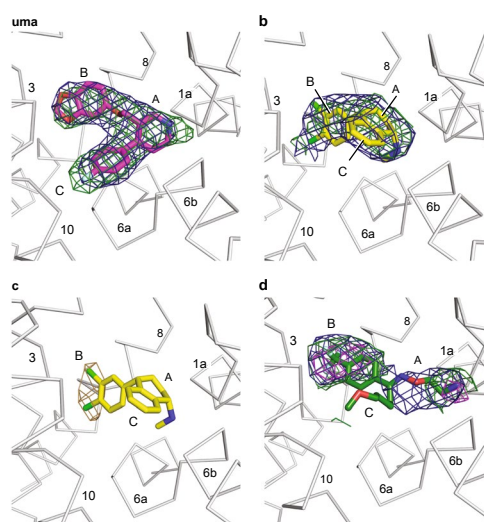


Fig. 2 | Antidepressivo ligação no local de ligação central. **a**, Omitir densidade de elétrons (malha verde) associado com a paroxetina, com contornos em quatro σ . densidade de elétrons a partir de um derivado de densidade de elétrons Pólder omita, mostrado na malha azul e com contornos em sete σ . **b**, densidade de elétrons para a sertralina derivado de um mapa omitir contornado a 2,5 σ ; o Pólder omitir a densidade de elétrons é contornos em 5 σ . **c**, densidade de elétrons diferença anômala (castanho claro) derivada a partir de sertralina e contornos em três σ . **d**, Densidade para fluvoxamina, derivado a partir de um mapa de densidade de elétrons e omitem contornos em 1 σ (verde) e dois σ (magenta), com o Pólder omitir densidade de elétrons com contornos em três σ . As posições aproximadas dos sublocais A, B, e C são mostrados.

às variantes TS3 e TS2, respectivamente (unilateral aluno de t -teste $P < 0,05$). Em seguida, medimos a K_{eq} valores para vários SSRIs por petição com- com [3 H] paroxetina (Fig. 1c–g). Com a exceção de traline ser-, SSRIs ligado com um pouco menor afinidade para TS3 que a ts2. O K_{eq} Os valores foram 10 ± 1 e 7 ± 1 nM para (*S*)-citalopram (Fig. 1c, $P > 0,05$); $2,0 \pm 0,2$ e 7 ± 1 nM para a sertralina (Fig. 1d, $P > 0,05$); 35 ± 3 e 10 ± 1 nM para (*S*)-fluoxetina (Fig. 1e, $P < 0,05$); 41 ± 4 e 9 ± 1 nM para (*R*)-fluoxetina (Fig. 1f, $P < 0,05$); e 69 ± 9 e 10 ± 2 nM para a fluvoxamina (Fig. 1g, $P < 0,05$) de ligao para TS3 e ts2, respectivamente. Estas constantes de dissociação e as diferenças relativas nas constantes de dissociação entre os SSRIs concordam bem com resultados dos relatórios anteriores³¹. A presença do mutante Y110A, tanto no TS3 e as variantes ts2 torna inativo no transporte de 5-HT²⁰.

interações transportadores-antidepressivo no local central. A estrutura de paroxetina ligada a TS2 foi determinada com dados ção difração que se estendem até um espaçamento de Bragg de 3,6 Å. A densidade de elétrons para várias das cadeias laterais para os resíduos no portão intracelular e dentro da dobradiça C-terminal e hélice também foi melhor resolvido na estrutura TS2 relatado aqui que na estrutura TS3 relatado anteriormente, permitindo, assim, para a modelagem mais abrangente de estas regiões (complementar Fig. 1), incluindo a parte da sequencia de reconhe- cimento para SEC24C^{32,33}. Apesar da resolução moderada dos dados de difração, as características de densidade eletrônica no site central eram de qualidade suficiente para permitir-nos para posicionar paroxetina. Descobrimos que o anel de piperidina é melhor acomodados no subsítio A, o benzodioxol é melhor acomodados no subsítio B, e o grupo fluorofenil é melhor acomodados no subsítio C (Fig. 2a e Tabela 1). Encaixe de paroxetina na orientação oposta, com o benzodioxol no subsítio C e a fluorofenil no subsítio B, produz um mau encaixe com a densidade de elétrons e produz confrontos em sublocais A e C (Fig suplementar. 2). As estruturas de sertralina e fluvoxamina foram resolvidos em complexo com ts3 em 3,5-Å e 3,8-Å resolutamente lução, respectivamente. Omitir mapas e Fourier diferença anômala

Tabela 1 | A coleta de dados e estatísticas de refinamento

	TS2-paroxetina (APO 6AWN)	TS3-fluvoxamina (APO 6AWP)	TS3-sertralina (APO 6AWo)	TS3-sertralina (APO 6AWQ)
Coleção de dados	APS24-IDE	APS24-IDE	APS24-IDE	ALS 5.0.2
grupo espacial	C 222 ₁	C 222 ₁	C 222 ₁	C 222 ₁
dimensões da célula				
uma, b, c (Å)	129,2, 162,8, 140,8	129,5, 163,9, 141,0	129,0, 162,0, 140,8	130,6, 165,9, 142,7
α, β, γ (°)	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Comprimento de onda	0,979	0,979	0,979	1,771
Resolução (Å) _{uma}	53,17-3,62 (3,73-3,62)	30,00-3,80 (3,94-3,80)	40,0-3,53 (3,62-3,53)	20,00-4,05 (4,14-4,05)
R _{meas} (%)	6,2 (41,6)	6,2 (49,0)	5,8 (58,9)	10,4 (59,8)
EU/σ Eu	9,0 (1,7)	8,4 (1,9)	13,1 (1,7)	11,1 (2,5)
Compleitude (%)	92,6 (90,7)	95,5 (95,7)	98,7 (86,7)	98,1 (98,1)
Redundância	2,6 (2,2)	3,6 (3,0)	5,5 (3,2)	10,1 (6,9)
CC _{1/2} (%)	99,9 (21,9)	99,9 (28,3)	99,9 (16,0)	99,9 (20,3)
requisite				
Resolução (Å)	53,26-3,62 (3,75-3,62)	28,96-3,80 (3,94-3,80)	38,91-3,53 (3,66-3,53)	
reflexões No.	16974 (1529)	14768 (1328)	18289 (1615)	
R _{trabalho} / R _{teste} (%)	25,6 (37,8) / 26,3 (37,0)	24,6 (40,3) / 26,9 (43,7)	27,3 (41,4) / 28,4 (42,3)	
átomos No.	7.703	7.680	7.678	
Proteína	7599	7598	7598	
Ligando / ião	104	81	79	
agua	0	1	1	
B factores				
proteicos	157,7	206,4	196,9	
Ligando / ião	151,9	206,6	187,3	
agua	-	225,0	182,0	
comprimentos rms				
desvios Bond (a)	0,009	0,009	0,008	
ângulos de ligação (°)	1,08	1,01	0,96	

uma Os valores entre parênteses são para shell de mais alta resolução.

mapas foram usadas para posicionar sertralina com o anel diclorofenil no subsítio B e a amina e os grupos tetra-hidronaftaleno em sublocais A e C, respectivamente (Fig. 2b, c). A densidade de amina fluvox- não era contínuo, mas descobrimos densidade para o loxime aminoethy- e trifluoro grupos aromáticos em sublocais A e B (Fig. 2d); não foi observada densidade para a porção methoxybutyl, provavelmente por causa da sua flexibilidade. 'Omitir' mapa A Polder³⁴ foi usado para recuperar ainda mais a densidade fluvoxamina e a posicioná-la de forma mais precisa dentro sublocais A e B. A colocação de resíduos envolvidos na ligação de drogas no local central foi guiada por características de densidade electrónica e por interações químicas com o fármaco (Figura suplementar. 3) . Nenhuma densidade foi observada no local alostérico com os complexos de sertralina e fluvoxamina, sertralina de acordo com sendo um inibidor alostérico menos potente da dissociação de citalopram a partir do local central do que o citalopram¹³. Actualmente, não existe informação sobre se fluvoxamina se liga o sítio alostérico e influências ligando dissociação a partir do local central.

A estrutura da variante TS2 SERT em complexo com paroxetina revelou apenas pequenas perturbações na pose do inibidor e as conformações de resíduos envolvidos na ligação do ligando em com- paração com a estrutura TS3-paroxetina (Fig. 3a, b). Acreditamos que esta semelhança é porque o grupo hidroxilo da treonina 439 enfrenta subsítio B, tal como a serina nesta posição, e, assim, ambos os resíduos estão em posição de participar em interações com ligandos no local central. Especula-se que a variante TS2 tem uma maior afinidade para a paroxetina, pelo menos, em parte por causa do hidroxilo da Ser439 é mais estreita

(3,9 Å) do que o grupo hidroxilo de Thr439 (5,2 Å) com o ligando benzodi- oxol oxigénio. Um estudo recente usando a foto-cross-linking também favorece a colocação de paroxetina coerentes com as constantes nossas estruturas³⁵. No entanto, estudos adicionais com maior resolução será necessária para definir mais definitivamente as interações ligando-transportador. Os grupos amina de sertralina e fluvoxamina também ocupam subsítio A, interagindo com Asp98 e Try95 (Fig. 3c, d), Resuos cruciais para a ligação de drogas³⁶⁻³⁸. Em subsítio B, Ser439 está dentro de 4,5 e 3,9 Å dos átomos de halogeneto de sertralina e fluvoxamina enquanto interações matic ArO- são formados entre Tyr176 e as drogas. A cadeia lateral de Ile172 adopta uma conformação semelhante à que, no estado de paroxetina, encaixando perfeitamente entre substituintes em sublocais B e C. Em subsítio C, Phe341 forma uma interacção face-a-face com o anel de naftaleno de sertralina enquanto Phe335 forma uma cara interacção -para-borda com a porção naftaleno. Nos plex com- fluvoxamina, Phe341 (ref. ²⁶), assume uma conformação rotamico semelhante à do complexo da sertralina, ao passo que a conformação de Phe335 está mais perto ao observado nas estruturas de paroxetina.

Discussão

As comparações de estruturas de sertralina e fluvoxamina complexos para as estruturas previamente determinados de SERT com oxetine par- e (S) - citalopram revelou diferenças importantes nas posições dos resíduos em subsítio C. No complexo sertralina, em relação à paroxetina e (S) - complexos de citalopram, Phe341 foi invertida 'para cima', o enchimento de um espaço que não está ocupada por ligando, e, portanto, pode

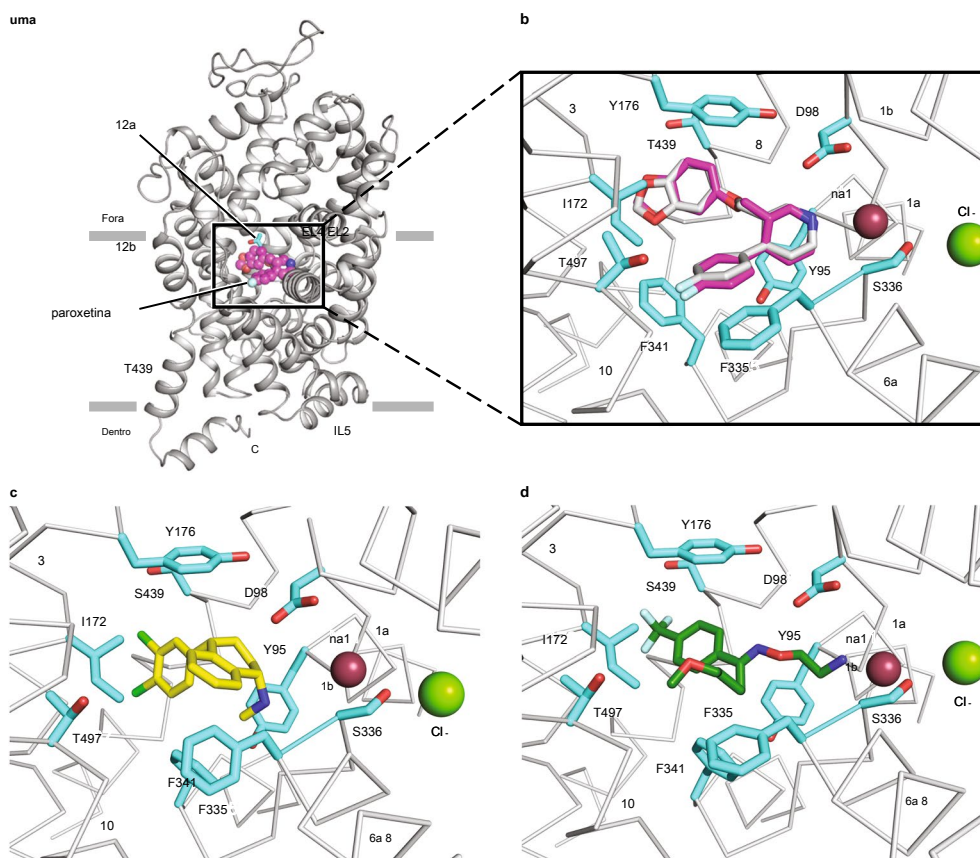


Fig. 3 | reconhecimento antidepressivo. **uma**, visão global da variante TS2 do transportador da serotonina em representação de banda desenhada; Thr439 e paroxetina est representados como bastões e esferas. **b**, Interações de paroxetina (magenta) com resuos no sio de ligao central da variante ts2. A posição de paroxetina na variante TS3 é sobreposta em cinza. **c**, Interações de sertralina (amarelo) com resuos no sio de ligao central. **d**, Interações de fluvoxamina (verde) com resuos no sio de ligao central.

interagir com o anel de naftaleno de sertralina; Phe335 sofre uma rotação de cerca de $\sim 90^\circ$ a sua β -C γ ligação (c2) para acomodar a mudança conformacional de Phe341 (Fig. 4b). No fluvoxamina com-plex, Phe341 está numa posição semelhante à que a sertralina em com-plex, mas Phe335 adopta uma conformação mais semelhante ao que no paroxetina e (S)-complexos de citalopram (fig. 4b, c). Observamos também que Thr497 é deslocado por ~ 1 -Å (C α -C α distância) nos complexos de sertralina e fluvoxamina em comparação com os complexos de paroxetina, provavelmente porque a paroxetina é a única droga com um substituinte fluorado na subsítio C, um substituinte que interage com Thr497.

A superposição de todos os quatro complexos de SSRI revelaram diferentes posicionamentos dos vários substituintes da droga dentro do local ing bind- central (Fig. 4d-j), Resultando assim em diferenças de van der Waals (> 4 Å), aromático (4,5-7 Å)³⁸, e iônica (~ 4 Å)⁴⁰ interações. Advertimos que, por causa do modesto resolução, a precisão dessas medições contém algum grau de erro. Estimou-se a incerteza padrão na posição ligando através do cálculo do erro de coordenadas medido pelo índice de precisão de difração⁴¹. A incerteza é de 0,4 Å para o ligando de paroxetina, 0,5 Å para a sertralina,

0,6 Å para a fluvoxamina, e 0,3 Å para (S)-citalopram. Em subsítio A, a distância a partir da amina de sertralina e (S)-citalopram para Asp98 é mais longa, enquanto que a distância para a amina de fluvoxamina e oxetine par- é mais curto. Em contraste, o posicionamento da amina a Tyr95 é mais longe para a fluvoxamina e paroxetina, ao passo que a amina de (S)-citalopram e sertralina é mais igualmente colocada entre Asp98 e Tyr95. Em subsítio B, o *meta* cloro de sertralina e o flúor de (S)-citalopram engata com Ser439 enquanto os átomos de flúor de amina fluvox- e o oxigénio de forma paroxetina mesmo interações mais estreitas

com Ser439 / Thr439, embora a distância não é suficientemente estreita de modo a formar uma ligação de hidrogénio para os halogenetos⁴². A mais curta distância para Ser439 / Thr439 no complexo fluvoxamina e no TS2-paroxetina contra os complexos TS3-paroxetina pode também explicar, pelo menos em parte, as diferenças na afinidade observada para a fluvoxamina e fluoxetina em comparação com outros ISRSs uma falta grupo trifluoro no subsítio B. os substituintes aromáticos dos SSRIs estão dispostas $\sim 90^\circ$ em relação ao Tyr176 e Ile172 no subsítio B, mas as distâncias a Tyr176 e Ile172 divergem entre inibidores. Em subsítio C, do grupo naftaleno de sertralina está localizada 'mais elevado' do que os grupos zofuran e Ben-fluorofenil de (S)-citalopram e paroxetina.

A mutação associada ao autismo raro em DAT (Thr356Met) foi recentemente mostrado para estabilizar a conformação exterior aberta em leut e para induzir a locomoção hiperactivo em moscas⁴³. absorção de dopamina do mutante DAT é marcadamente diminuída como resultado da catálise de efluxo de dopamina. O resíduo equivalente em SERT é Thr371, que está localizado em TM7, perto de Na1 e Cl- locais de ligação de iões. Thr371 provavelmente interage com Tyr289 em TM5, e substituição de uma cadeia lateral de metionina maior iria perturbar esta interação e, potencialmente, evitar o encerramento da porta extracelular.

Juntos, o SERT-SSRI complexos proporcionar novas perspectivas sobre farmacóforos como de diferentes drogas participar em interações dentro do local de ligação do centro, os quais estabilizam a conformação aberta outward- do transportador. Através de análise de estrutura, como as mutações alteram as funções de transportadores de neurotransmissores pode ser determinada mais precisamente. Prevemos que esses estudos devem fornecer um modelo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento de depressão e ansiedade.

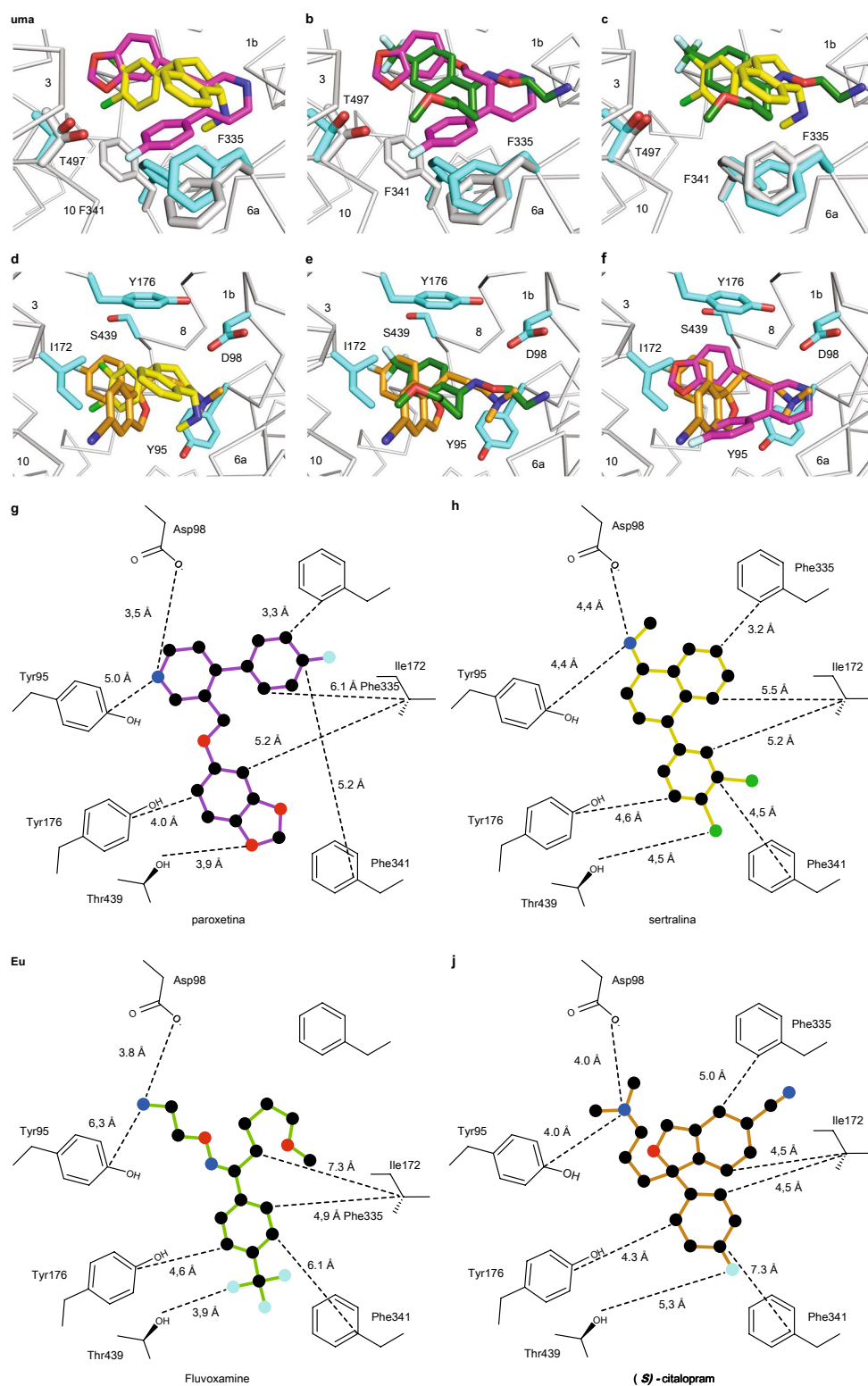


Fig. 4 | Comparações de posturas de ligação SSRI e estruturas de ligação a-sítio central. **uma,** Comparação de TS3-sertralina (amarelo) e complexos TS2-paroxetina (magenta). **b,** Comparação de TS3-fluvoxamina (verde) e ts2-paroxetina de ligação. **c,** TS3-fluvoxamina contra-TS3 sertralina. **d,** A superposição de ts3-sertralina e ts3- (S)-citalopram (laranja). **e,** TS3-fluvoxamina contra ts3- (S)-citalopram. **f,** TS2-paroxetina contra ts3- (S)-citalopram. 2D representação de resíduos de ligação ao fármaco seleccionado. **g - j,** Distâncias de cada resíduo de várias posições de drogas, mostrado para TS2-paroxetina (**g**) TS3-sertralina (**h**), TS3-fluvoxamina (**i**), e ts3- (S)-citalopram (**j**).

Métodos

Métodos, incluindo declarações de disponibilidade de dados e quaisquer associados códigos de adesão e referências, estão disponíveis em <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0026-8>.

Recebidos: 08 de outubro de 2017; Aceito: 27 Dezembro de 2017; Publicado: xx

Published online: 29 January 2018

referências

- Kristensen, AS et al. SLC6 transportadores de neurotransmissores: estrutura, função e regulação. *Pharmacol. Rev.* **63**, 585-640 (2011).
- Berger, M., Grey, JA & Roth, BL O expandido biologia de serotonina. *Annu. Rev. Med.* **60**, 355-366 (2009).
- Hahn, MK & Blakely, RD O impacto funcional de SLC6 transportador variação genética. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 401-441 (2007).
- Watts, SW, Morrison, SF, Davis, RP & Barman, SM Serotonina e regulação da pressão arterial. *Pharmacol. Rev.* **64**, 359-388 (2012).
- Brenner, B. et al. Plasma níveis de serotonina e do transportador de serotonina plaquetária. *J. Neurochem.* **102**, 206-215 (2007).
- Broer, S. & Gether, U. O soluto de suporte 6 da família dos transportadores. *Br. J. Pharmacol.* **167**, 256-278 (2012).
- Rudnick, G. Ion-acoplado transporte neurotransmissor: termodinâmicas vs determinações cinéticas de estequiometria. *Methods Enzymol.* **296**, 233-247 (1998).
- Penmatsa, A., Wang, KH & Gouaux, E. estrutura de raios-X do transportador de dopamina elucidada mecanismo antidepressivo. *Natureza* **503**, 85-90 (2013).
- Coleman, JA, verde, EM & Gouaux, estruturas de raios-X e E. mecanismo de transportador de serotonina humano. *Natureza* **532**, 334-339 (2016).
- Yamashita, A., Singh, SK, Kawate, T., Jin, Y. & Gouaux, E. estrutura de cristal de um homólogo bacteriana de Na⁺/Cl⁻ transportadores de neurotransmissores dependentes. *Natureza* **437**, 215-223 (2005).
- Singh, SK, Piscitelli, CL, Yamashita, A. & Gouaux, armadilhas inibidor competitivo E. A leut numa conformação aberta-a-out. *Ciência* **322**, 1655-1661 (2008).
- Wennogle, LP & Meyerson, LR serotonina modula a dissociação de [³H] imipramina de locais de reconhecimento de plaquetas humano. *EUR. J. Pharmacol.* **86**, 303-307 (1982).
- Chen, F. et al. Caracterização de um sítio de ligação citalopram alostérico no transportador da serotonina. *J. Neurochem.* **92**, 21-28 (2005).
- Plenge, P. et al. Estérico mutagênese obstáculo no vestibulo extracelular conservada impede alostérico de ligação dos anti-depressivos para o transportador de serotonina. *J. Biol. Chem.* **287**, 39316-39326 (2012).
- Kahlig, KM et al. Anfetamina induz dopamina efluxo por um canal transportador de dopamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **102**, 3495-3500 (2005).
- Ramamoorthy, S. et al. Antidepressivo e sensível à cocaína transportador de serotonina humana: clonagem molecular, expressão, e localização cromossômica. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **90**, 2542-2546 (1993).
- Andersen, J., Kristensen, AS, Bang-Andersen, B. & Strømgaard, K. avanços recentes na compreensão da interação de drogas antidepressivas com serotonina e norepinefrina transportadores. *Chem. Commun. (Camb.)* **25**, 3677-3692 (2009).
- Mojtabai, R. & Olsson, M. Proporção de antidepressivos prescritos, sem um diagnóstico psiquiátrico está crescendo. *Aff saúde. (Millwood)* **30**, 1434-1442 (2011).
- Vetulani, J. & Nalepa, I. Antidepressivos: passado, presente e futuro. *EUR. J. Pharmacol.* **405**, 351-363 (2000).
- verde, EM, Coleman, JA & Gouaux, E. termoestabilização do transportador da serotonina humana numa conformação ligada ao antidepressivo. *PLoS One* **10**, e0145688 (2015).
- Coleman, JA, verde, EM & Gouaux, E. termoestabilização, a expressão, purificação e cristalização do transportador da serotonina humana ligado a S-citalopram. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/54792> (2016).
- Davis, BA, Nagarajan, R., Forrest, LR & Singh, SK Mecanismo de paroxetina (Paxil) inibição do transportador da serotonina. *Sci. Rep.* **6**, 23789 (2016).
- Andersen, J. et al. determinantes moleculares de reconhecimento selectivo dos antidepressivos nos transportadores de norepinefrina e serotonina humanos. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **108**, 12137-12142 (2011).
- Wang, H. et al. base estrutural para a acção por diversas antidepressivos sobre transportadores de amins biogénicas. *Natureza* **503**, 141-145 (2013).
- Zhou, Z. et al. especificidade antidepressivo do transportador de serotonina sugerido por três estruturas leut-SSRI. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 652-657 (2009).
- Andersen, J. et al. mapeamento mutacional e modelagem do sítio de ligação para (S)-citalopram no transportador de serotonina humano. *J. Biol. Chem.* **285**, 2051-2063 (2010).
- Gabrielsen, M. et al. mecanismo molecular da inibição do transportador de serotonina elucidado por um novo protocolo de acoplamento flexível. *EUR. J. Med. Chem.* **47**, 24-37 (2012).
- Grouleff, J., Ladefoged, LK, Koldsø, H. & Schiøtt, transportadores B. Monoamine: insights de dinâmica molecular. *Frete. Pharmacol.* **6**, 235 (2015).
- Koldsø, H., Grouleff, J. & Schiøtt, B. Insights para a ligação do ligando para os transportadores-de modelação de homologia de monoamina para LeuBAT e dDAT. *Frete. Pharmacol.* **6**, 208 (2015).
- Andersen, J. et al. A base molecular para a inibição da reabsorção de serotonina selectiva pelo agente antidepressivo fluoxetina (Prozac). *Mol. Pharmacol.* **85**, 703-714 (2014).
- Tavoulari, S., Forrest, LR & Rudnick, G. fluoxetina (Prozac) de ligao para transportador de serotonina é modulada por cloreto e alterações conformacionais. *J. Neurosci.* **29**, 9635-9643 (2009).
- Koban, F. et al. Uma ponte salina que liga o primeiro elo intracelular com o terminal C facilitando a dobragem do transportador da serotonina. *J. Biol. Chem.* **290**, 13.263-13.278 (2015).
- Sucic, S. et al. Alternando a clientela: uma lisina residente no terminal C do transportador da serotonina específica a sua preferência para o complexo II SEC24C componente proteína de revestimento. *J. Biol. Chem.* **288**, 5330-5341 (2013).
- Liebschner, D. et al. mapas Polder: melhorar os mapas omit por excluindo solvente grandes quantidades. *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.* **73**, 148-157 (2017).
- Rannversson, H., Andersen, J., Bang-Andersen, B. & Strømgaard, K. Mapeamento do local de ligação para o escitalopram e paroxetina no transportador de serotonina humano usando a foto-reticulantes geneticamente codificados. *ACS Chem. Biol.* **12**, 2558-2562 (2017).
- Henry, LK et al. Tyr-Ile-95 e 172 em segmentos transmembranares 1 e 3 dos transportadores de serotonina humanos interagem para estabelecer o reconhecimento de elevada afinidade de antidepressivos. *J. Biol. Chem.* **281**, 2012-2023 (2006).
- Barker, SR et al. reconhecimento de elevada afinidade dos antagonistas do transportador de serotonina definidos por mutagênese de varimento de espécies: um resíduo aromático no domínio transmembrana eu dita reconhecimento espécies-selectivos de citalopram e mazindol. *J. Biol. Chem.* **273**, 19459-19468 (1998).
- Sorensen, L. et al. Interação de antidepressivos com os transportadores de norepinefrina e serotonina: estudos mutacionais do bolso de ligação ao substrato S1. *J. Biol. Chem.* **287**, 43694-43707 (2012).
- Anjana, R. et al. interações aromático-aromáticos em estruturas de proteínas e complexos proteína-ADN: um estudo com base na orientação e a distância. *Bioinformática* **8**, 1220-1224 (2012).
- Kumar, S. & Nussinov, R. interações electrostáticas de curto alcance em proteínas. *ChemBioChem* **3**, 604-617 (2002).
- Dinesh Kumar, KS et al. Online_DPI: um servidor web para calcular o índice de precisão de difração de uma estrutura proteica. *J. Appl. Crystallogr.* **48**, 939-942 (2015).
- Steiner, T. distâncias-ligação de hidrogénio para os iões de halogeneto em estruturas cristalinas orgânicos e organometálicos: up-to-date estudo base de dados. *Acta Crystallogr. B* **54**, 456-463 (1998).
- Hamilton, PJ et al. De novo mutação no gene disfunção associados dopamina do transportador de dopamina com desordem do espectro autista. *Mol. Psiquiatria* **18**, 1315-1323 (2013).

Agradecimentos

Agradecemos L. Vaskalis para assistência com figuras, H. Owen para obter ajuda com preparação do manuscrito, e os membros do laboratório de EG para discussão. Reconhecemos o pessoal do Centro Berkeley de Biologia Estrutural na fonte luminosa avançada ea Equipe Acesso Collaborative Northeastern no Advanced Photon Source para obter ajuda com a coleta de dados. JAC é apoiado por uma bolsa de pós-doutorado Banting da Canadian Institutes of Health Research. Estamos particularmente grato a B. Lacroute e

J. Lacroute por seu apoio generoso, bem como para financiamento dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH) (5R37MH070039) para EGE é suportado como um investigador do Howard Hughes Medical Institute.

Contribuições do autor

JAC e EG concebido o projeto. JAC realizou a purificação de proteínas, cristalografia, e ensaios bioquímicos. JAC e EG escreveu o manuscrito.

Interesses competitivos

Os autores declaram não haver interesses financeiros concorrentes.

Informação adicional

Informação suplementar acompanha este papel na <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0026-8>.

Reprints e permissões de informações está disponível em www.nature.com/reprints.

Correspondência e pedidos de materiais devem ser endereçadas ao EG

Nota do Editor: Springer Nature permanece neutro em relação às reivindicações jurisdicionais em publicados mapas e afiliações institucionais.

Métodos

SERT constrói. A variante TS3^{20,21} contém as mutações termostabilizar Y110A, I291A, e T439S, assim como as mutações do cisteínas expostos à superfície Cys554, Cys580 e Cys622 para alanina. O gene TS3 SERT é então fundida com sequências para a expressão de um fluoróforo GFP do C-terminal seguido de uma etiqueta Strep duplo e, finalmente, um marcador de purificação decahistidina. A construo TS2 foi gerado por mutação de Ser439 por treonina para reverter a mutação termostabilizar na posição 439 da construo TS3 para uma treonina.

Expressão e purificação. SERT construções foram expressas através de transdução mediada por baculovírus de mamífero HEK293S GnTI- células⁴⁴. As células foram solubilizadas em um tampão composto por Tris 50 mM, pH 8, 150 mM de NaCl, 20 mM

n-dodecil-β - d-maltosido (DDM), e hemissuccinato de colesterol 2,5 mM (CHS). SERT detergente-solubilizado foi purificado por meio de cromatografia de afinidade de Strep-Tactin em um tampão composto por Tris 20 mM, pH 8, e NaCl 100 mM (TBS), contendo 1 mM de DDM, CHS 0,2 mM, glicerol a 5%, e 25 μM lipídico (1-palmitoil-2-oleoil *sn*-glicerol-3-fosfocolina, 1-palmitoil-2-oleoil *sn*-glicerol-3-fosfoetanolamina, e 1-palmitoil-2-oleoil *sn*-glicerol-3-fosfoglicerol numa razão molar de 1: 1: 1). Após eluição da coluna, a proteína resultante foi digerido por trombina e EndoH. SERT foi então combinado com o fragmento de anticorpo recombinante (Fab) 8B6 em uma razão molar de 1: 1,2 SERT / 8B6, e o complexo foi purificado por cromatografia de exclusão de tamanho em TBS suplementado com 40 mM

n-octil β - d-maltósido, CHS 0,5 mM, glicerol a 5%, e 25 μM da mistura de lipídios descrito acima. Antes da cristalização, o complexo SERT-8B6 purificado foi concentrada para 2 mg / ml; Os inibidores foram adicionados à solução de proteína para alcançar uma concentração final de 50 μM, e uma quantidade adicional de 8B6 Fab foi adicionado de modo que a concentração final de Fab foi adicionado 1 μM.

Cristalização. Os cristais do complexo SERT-Fab foram cultivadas por difusão de vapor gota hanging- a 4 ° C com uma proporção de 2 μl de proteínas para uma μl solução de l reservatório contendo Tris 50-100 mM, pH 8,5, 25-75 mM de Li₂ ASSIM₄, Na 25-75 mM₂ ASSIM₄, 33.5- 36% de PEG 400, e 0,5% de ácido 6-amino-hexanóico.

A coleta de dados e refinamento da estrutura. Os cristais foram directamente piscam arrefecida em azoto líquido. Os dados foram coletados no avançada Photon Source (Argonne National Laboratory, beamline 24 ID-E) e na Fonte de Luz Avançado (Lawrence Berkeley National Laboratory, beamline 5.0.2). conjuntos de dados de raios-X foram tratados com XDS⁴⁵. substituição molecular foi realizada com coordenadas (APO 516X)⁴⁶. A partir da determinação da estrutura antes de SERT⁹ em PHASER⁴⁷.

Várias iterações de refinamento e construção de modelo manual foram realizadas em PHENIX⁴⁸ e Coot⁴⁹ até que os modelos convergiram para aceitável *R* factores e estereoquímica. Polder omitem mapas foram calculados excluindo solvente grandes quantidades, como

anteriormente descrito³⁴. As estatísticas Ramachandran-Iote foram como se segue: paroxetina ts2-, 95,5% favorecido, 4,5% permitido, 0% anulado; TS3-fluvoxamina, 95,2% favorecido, 4,8% permitido, 0% anulado; TS3-sertralina, 95,0% favorecido, 5,0% permitido, 0% anulado.

Radioligando Os ensaios de ligao. Experiências de ligação de saturação de ensaios de proximidade de cintilação (ZPE) utilizados⁴⁸ e uma solução contendo 10 nM de SERT, 0,5 mg / mL de pérolas de Cu-YSI, TBS, DDM 1 mM, CHS 0,2 mM, e 0,15-20 nM [³ H] paroxetina. Experiências de ligação de competição foram também realizadas com ZPE, no mesmo tampão que a experiências e ligandos de ligação em concentrações de 5 nM para a saturação [³ H] paroxetina e em 0.01-100,000 nM para os competidores frios. Cada ponto de dados foi medida em triplicado e cada experiência foi repetida três vezes. As barras de erro para cada ponto de dados representam o SEM *K*_{eq}. Os valores foram determinados com a equação de Cheng-Prusoff⁵⁰ no GraphPad Prism.

Resumo Relato de Ciências da Vida. Mais informações sobre projeto experimental está disponível no Resumo Ciências da Vida Reporting.

disponibilidade de dados. Coordenadas e factores de estrutura para as estruturas SERT foram depositados no Banco de Dados de Proteínas nos códigos de adesão APO 6AWN (Ts2- paroxetina), APO 6AWP (TS3-fluvoxamina), APO 6AWO (TS3-sertralina), e APO 6AWQ (TS3-sertralina anômalo).

referências

44. Goehring, A. et al. O rastreo e a expressão em larga escala de proteínas de membrana em células de mamífero para os estudos estruturais. *Nat. PROTOC.* **9**, 2574-2585 (2014).
45. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125-132 (2010).
46. Bunkóczi, G. et al. Phaser.MRage: automatizado substituição molecular. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **69**, 2276-2286 (2013).
47. Afonine, PV et al. No sentido automatizado refinamento da estrutura cristalográfica com phenix.refine. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **68**, 352-367 (2012).
48. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, WG & Cowtan, Características e desenvolvimento de Coot K.. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 486-501 (2010).
49. Breve, M. & Javitch, JA Controlo da função de proteínas transportadoras de membrana em forma detergente-solubilizado. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **104**, 3603-3608 (2007).
50. Cheng, Y. & Prusoff, WH relação entre a constante de inibição (K₁) e a concentração de inibidor que faz com que 50 por cento de inibição (I₅₀) de uma reacção enzimática. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108 (1973).

Resumo Relato de Ciências da Vida

Natureza, Investigação, pretende melhorar a reprodutibilidade do trabalho que publicamos. Este formulário destina-se a publicação com todos os papéis de ciências da vida aceites e fornece a estrutura para a consistência e transparência nos relatórios. Cada apresentação ciências da vida irá utilizar este formulário; alguns itens da lista pode não se aplicar a um manuscrito individual, mas todos os campos devem ser preenchidos para maior clareza. Para mais informações sobre os pontos incluídos neste formulário, consulte [Relatórios Sciences Research Vida](#). Para mais informações sobre políticas Nature pesquisa, incluindo o nosso [política de disponibilidade de dados](#), Veja [Autores & Árbitros](#) e a [Checklist Política Editorial](#).

Design experimental

tamanho 1. Amostra

Descrever a forma como o tamanho da amostra foi determinada.

Os tamanhos das amostras não foram calculados, este não é aplicável ao presente estudo.

2. exclusões de dados

Descreva todas as exclusões de dados.

Nenhum dado foi excluído da análise.

3. Replication

Descreva se os resultados experimentais foram confiável reproduzida.

Cada expericia foi realizada tr vezes em triplicado, com os mesmos resultados.

4. A randomização

Descrever como amostras / organismos / participantes foram divididos em grupos experimentais.

As amostras não foram randomizados.

5. Blinding

Descrever se os investigadores eram cegos para atribuição de grupo durante a recolha e / ou a análise de dados.

Os investigadores não tinham conhecimento, este não é o caso para a presente análise do estudo.

Nota: todos os estudos que envolvem animais e / ou participantes da pesquisa humanos devem revelar se ofuscante e randomização foram utilizados.

6. parâmetros estatísticos

Para todas as figuras e tabelas que usam métodos estatísticos, confirme se os seguintes itens estão presentes em legendas das figuras relevantes (ou na secção de Métodos se o espaço adicional é necessária). n / a Confirmado

- ☐ ☒ O tamanho da amostra exacta (n) para cada grupo experimental / condição, dadas como um número discreto e a unidade de medição (animais, animais de ninhadas, culturas, etc.) Uma descrição de como as amostras foram recolhidas, observando se as medidas foram tomadas a partir de amostras distintas ou se a mesma amostra foi medida repetidamente
- ☐ ☒ Uma declaração indicando quantas vezes cada experimento foi replicado
- ☐ ☒ O teste (s) estatística usado e se eles são de um ou dos dois lados (nota: apenas os testes comuns devem ser descritos unicamente pelo nome; técnicas mais complexos devem ser descritos na secção de Métodos)
- ☐ ☐ Uma descrição de quaisquer suposições ou correcções, como um ajuste para múltiplas comparações Os resultados dos ensaios (por exemplo, P valores) dadas como valores exactos sempre que possível
- ☐ ☒ e com intervalos de confiança de notar Uma descrição clara de estatísticas, incluindo tendência central (por exemplo, mediana, média) e variação (por exemplo, desvio padrão, gama interquartil) barras
- ☐ ☒ de erro claramente definidos
- ☐ ☒

Veja a coleção na web em [estatísticas para biólogos](#) para obter mais recursos e orientação.

Programas

informações sobre a política [disponibilidade de código de computador](#)

7. Software

Descrever o software utilizado para analisar os dados deste estudo.

Graphpad Prism, Phenix e XDS.

Para manuscritos que utilizam algoritmos personalizados ou software que são centrais para o papel, mas ainda não descrito na literatura publicada, o software deve ser disponibilizado aos editores e revisores, mediante solicitação. Nós encorajamos fortemente a deposição de código em um repositório da comunidade (por exemplo GitHub). *Métodos Natureza* [orientação para a prestação de algoritmos e software para publicação](#) fornece mais informações sobre este tópico.

Materiais e reagentes

informações sobre a política [disponibilidade de materiais](#)

disponibilidade 8. Materiais

Indique se existem restrições à disponibilidade de materiais exclusivos ou se esses materiais estão disponíveis somente para distribuição por uma empresa com fins lucrativos.

Sem restrições.

9. Anticorpos

Descrever os anticorpos utilizados e como eles foram validados para utilização no sistema em estudo (ou seja, ensaio e espécies).

Anticorpo utilizado para a cristalização foi validado anteriormente: <https://www.nature.com/nature/journal/v532/n7599/full/nature17629.html>

10. linhas celulares eucarióticas

uma. Indicar a fonte de cada linha de célula eucariótica utilizada.

HEK293T GnTi-

b. Descrevem o método de autenticação linha celular utilizada.

N / D

c. Relatar se as linhas de células foram testadas quanto à contaminação por micoplasma.

N / D

d. Se qualquer das linhas celulares utilizadas são listadas na base de dados de linhas celulares vulgarmente misidentified mantidos pela [ICLAC](#), Fornecem uma fundamentação científica para o seu uso.

N / D

Animais e participantes da pesquisa humanos

informações sobre a política [estudos que envolvem os animais](#); ao relatar pesquisas com animais, siga o [CHEGAR diretrizes](#)

11. Descrição de animais de pesquisa

Fornecer detalhes sobre os animais e / ou materiais derivados de animais utilizados no estudo.

N / D

informações sobre a política [estudos envolvendo participantes da pesquisa humanos](#)

12. Descrição dos participantes da pesquisa humanos

Descrever as características da população covariáveis relevantes dos participantes da pesquisa humanos.

N / D