

Мне предлагалось рассмотреть роль нескольких мутаций в последовательности белка с uniprot id Q0AGT6. Это NAD(P) трансгидрогеназа из бактерии *Nitrosomonas eutropha*, она осуществляет транспорт протонов. К сожалению, её структура отсутствует в базе данных PDB. Тогда я воспользовался белковым кластом, чтобы найти гомологичную последовательность, для которой есть структура. В результате я нашел много гомологов этого белка (более 10 записей). Среди них я выбрал белок с id Q2RSB2 с последовательностью которого у изначального белка 99 % сходства. Это структурный и функциональный гомолог оригинального фермента, принадлежащий другому виду бактерий (*Rhodospirillum rubrum*). PDB id 1ptj. Структура имеет среднее разрешение 2.61 Å. В ней представлена не только аминокислотная последовательность, но и лиганды TNAD (THIONICOTINAMIDE-ADENINE-DINUCLEOTIDE) и NADP (NICOTINAMIDE-ADENINE-DINUCLEOTIDE PHOSPHATE). Для нашей задачи эта структура подходит.

При анализе влияния мутаций на структуру белка следует помнить, что последовательность гомолога не идеально совпадает с последовательностью оригинальной. У гомолога на 82 позиции присутствует 5 нуклеотидная вставка. Значит, чтобы получить номер аминокислотного остатка в гомологе нужно добавлять пять к номеру аминокислотного остатка в оригинальной последовательности, если этот номер больше 82.

D197N

Эта замена происходит в сайте связывания лиганда (Рисунок 1). Аспартат заменяется на аспаргин. Аминокислота может принять такое положение, что она не будет создавать новых стерических затруднений. При этой замене не меняется число водородных связей, которые остаток может образовать с лигандом. Однако как бы ни был бы ориентирован аспаргин при замене, остаток будет образовывать меньше водородных связей с атомами остова соседних аминокислот. Таким образом можно утверждать, что эффект замены будет негативным, так как она нарушит структуру центра связывания лиганда.

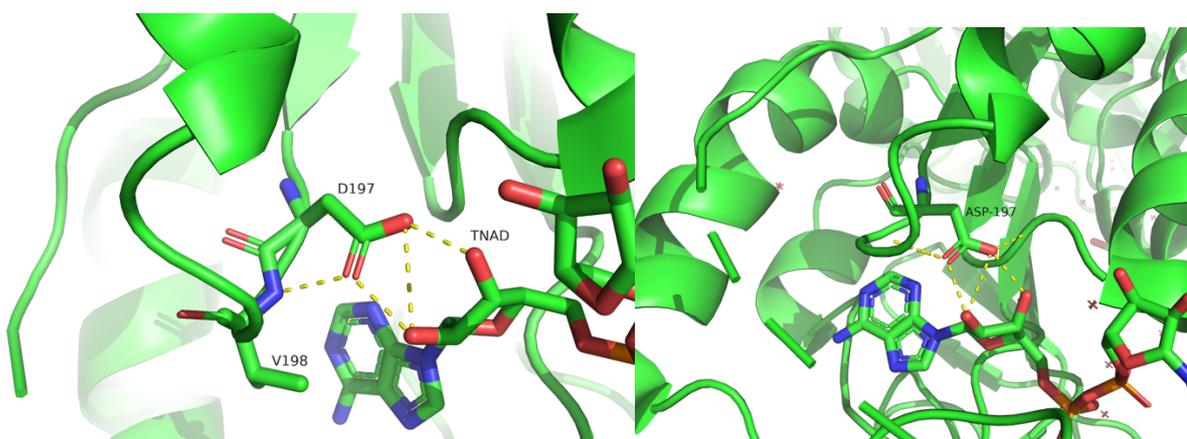


Рисунок 1. Аспартат 197 в центре связывания TNAD.

Здесь показаны водородные связи, которые D197 образует со своим окружением в структуре белка дикого типа. В мутированной форме аспаргин на этой позиции образует меньше водородных связей.

G176N

Эта замена тоже происходит в центре связывания TNAD. Здесь глицин заменяется на аспаргин. Глицин не образует в этой структуре никаких водородных связей, зато он создает никаких стерических затруднений. Замена глицина на полярную аминокислоту потенциально создает возможность для возникновения большого количества водородных связей с лигандом (Рисунок 2 а), однако анализ, который мы провели с помощью симулированного мутагенеза в rutoI, показал, что аспаргин нельзя разместить на этой позиции таким образом, чтобы она не ослабляла другие взаимодействия белка с лигандом. Интересно, что такая небольшая замена приводит к движению многих элементов вторичной структуры белка (Рисунок 2 б). Однозначно, эта замена будет нести отрицательную роль, так как она уменьшает размер кармана в котором связывается лиганд, ослабляет взаимодействия белка с лигандом.

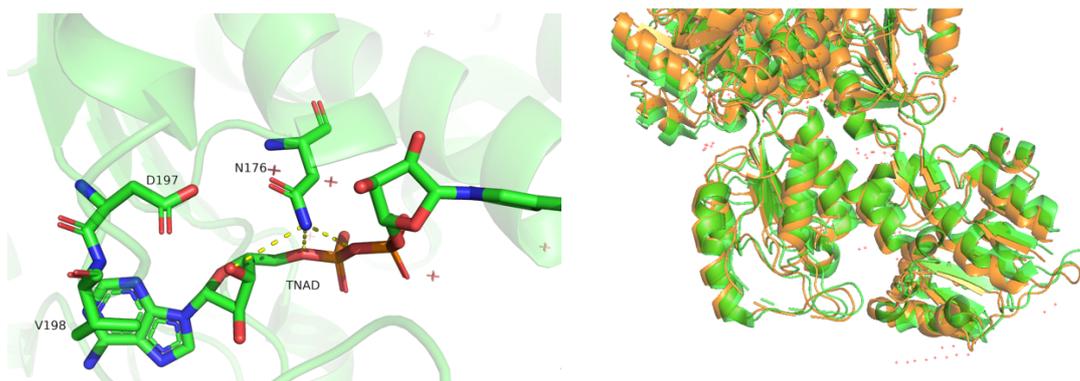


Рисунок 2. Аспаргин 176 в центре связывания TNAD в мутированной форме белка.

а) Здесь показано возможное расположение аспаргина 176 в мутированной форме белка. Отмечены водородные связи, которые образует аспаргин с лигандом. В мутированной форме исчезает взаимодействие между аспаратом 197 и лигандом; б) Конформационные изменения в структуре мутированного белка. Оранжевым цветом показана оригинальная структура. Зеленым мутированная.

R199M

Эта замена также происходит в кармане связывания TNAD. Здесь вместо аргинина появляется метионин. Аргинин в оригинальной структуре способен образовывать пять водородных связей. В мутированной структуре на той же самой позиции метионин образует только одну водородную связь. В этом положении метионин не создает стерических затруднений. Эффект этой замены негативный, так как он ослабляет аффинность связывания с лигандом.

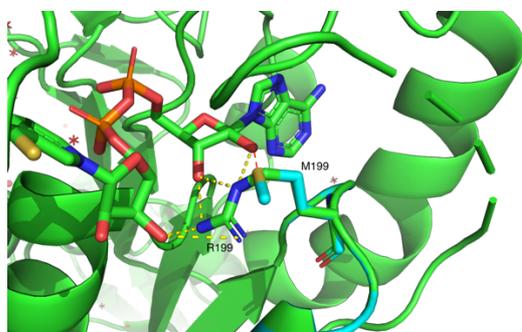


Рисунок 3. Аргинин 199 в центре связывания TNAD в мутированной форме белка.

Зеленым цветом показана оригинальная форма белка, голубым мутированная. Желтым отмечены водородные связи, которые образует аргинин, красным метионин.