

Структурные выравнивания. Структура/функция

Задание 1. Что это за белок?

Прежде всего, было интересно узнать, что за белок был предложен для выполнения последующих заданий. Для этого PDB структура была подана на вход онлайн-сервису PDBeFold.

Таблица 1. Выдача PDBeFold

##	Scoring			RMSD	N _{align}	N _d	%seq	Query				Target (PDB entry)				
	Q	P	Z					%sse	Match	%sse	N _{res}	*	Title			
1	0.97	62.2	23.8	0.51	294	0	100	88	4zo3:B	100	294	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE, IN COMPLEX WITH A PRODUCT N-HEXNOYL-L-HOMOSERINE			
2	0.96	60.2	23.4	0.59	294	0	100	96	4zo2:B	100	294	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE			
3	0.92	49.1	21.1	0.89	294	2	99	96	4zo2:B	100	294	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE			
4	0.93	48.3	21.0	0.85	294	2	99	88	4zo3:B	100	294	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE, IN COMPLEX WITH A PRODUCT N-HEXNOYL-L-HOMOSERINE			
5	0.96	63.9	24.1	0.55	293	1	99	100	4zo3:A	100	294	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE, IN COMPLEX WITH A PRODUCT N-HEXNOYL-L-HOMOSERINE			
6	0.94	58.9	23.1	0.66	292	1	99	96	4zo2:A	100	293	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE			
7	0.93	53.3	22.1	0.72	291	2	99	88	4zo3:B	100	294	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE, IN COMPLEX WITH A PRODUCT N-HEXNOYL-L-HOMOSERINE			
8	0.86	45.5	21.3	1.12	291	2	99	77	4zo3:B	87	294	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE, IN COMPLEX WITH A PRODUCT N-HEXNOYL-L-HOMOSERINE			
9	0.92	47.9	21.6	0.76	291	2	99	85	4zo2:B	88	294	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE			
10	0.92	47.9	21.6	0.76	291	2	99	85	4zo2:B	88	294	<input type="checkbox"/>	AIDC, A DIZINC QUORUM-QUENCHING LACTONASE			

Согласно выдаче (Таблица 1), рассматриваемый белок, по-видимому, является AidC, двухцинковой лактоназой, подавляющей бактериальный кворум, - она подавляет передачу сигналов, осуществляемых за счет ацилгомосериновых лактонов посредством их ферментативной деградации. Можно сказать, что данный белок является объектом интереса биотехнологов, так как он потенциально мог бы использоваться для решения проблемы бактериального обрастания, которое, например, может вызвать повреждение труб. Далее я буду рассматривать структуру из выдачи PDBeFold - 4ZO3. [1]

Для функционирования AidC необходимо иметь два катиона цинка. Посмотрим, каким образом может осуществляться его координирование в рассматриваемой структуре (рис. 1).

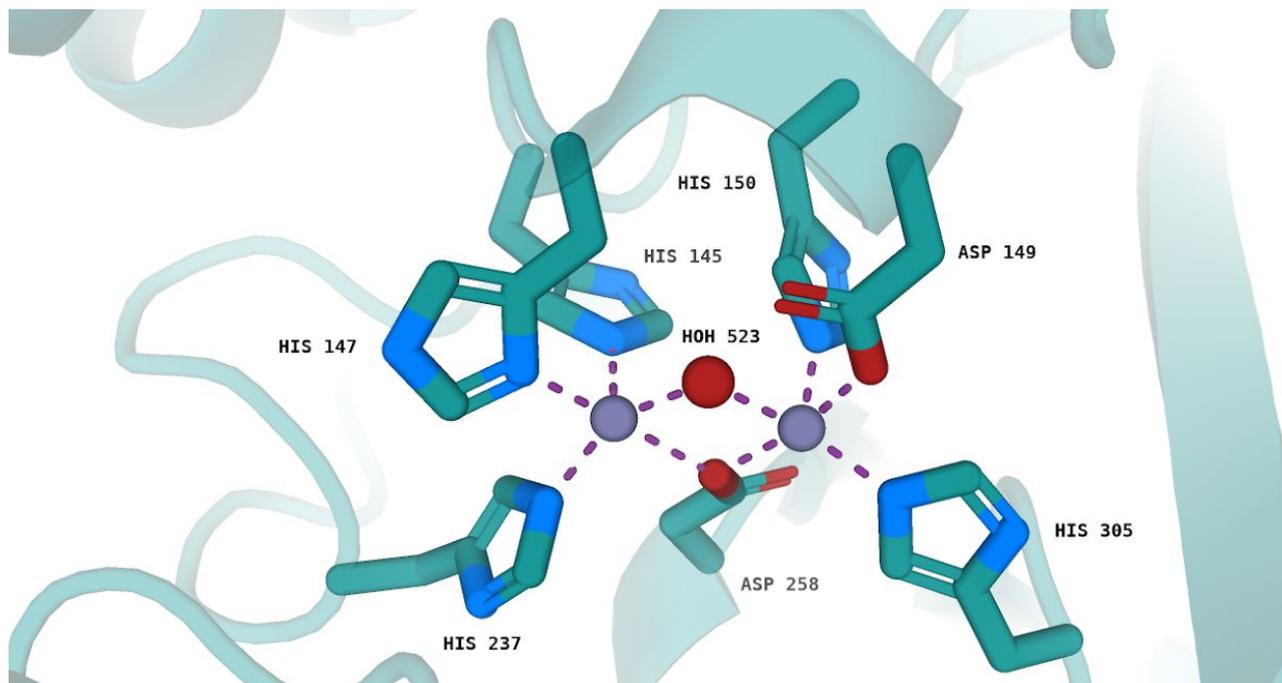


рис. 1. Координирование двух катионов цинка в структуре 4ZO3 (цепь A)

Примечательно, что такой “мотив” связывания катионов цинка как тройка гистидинов встречается во многих металлопротеиназах. Стоит также отметить, что кристаллическая вода 523, по-видимому, является депротонированной (OH⁻). Приведу также рисунок из статьи, которая анализирует сайт связывания катионов цинка в нашей кворум-подавляющей лактоназе (рис. 2) [2]:

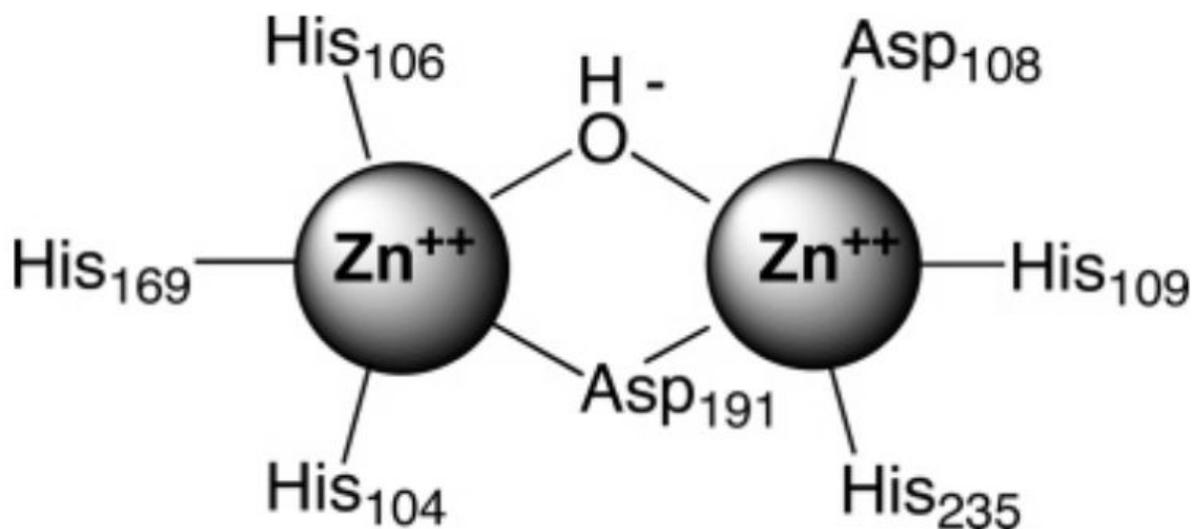


рис. 2. Предполагаемый сайт связывания двух катионов металла (цинка) [2]

Постараемся теперь дать ответ на следующий вопрос: “Какой регион белка ответственен за предполагаемую функцию”? Рассмотрим ту же структуру 4ZO3, так как она находится в комплексе с продуктом - С6L. Приведем рисунок,

иллюстрирующий возможные взаимодействия, способствующие связыванию продукта в активном центре (рис. 3):

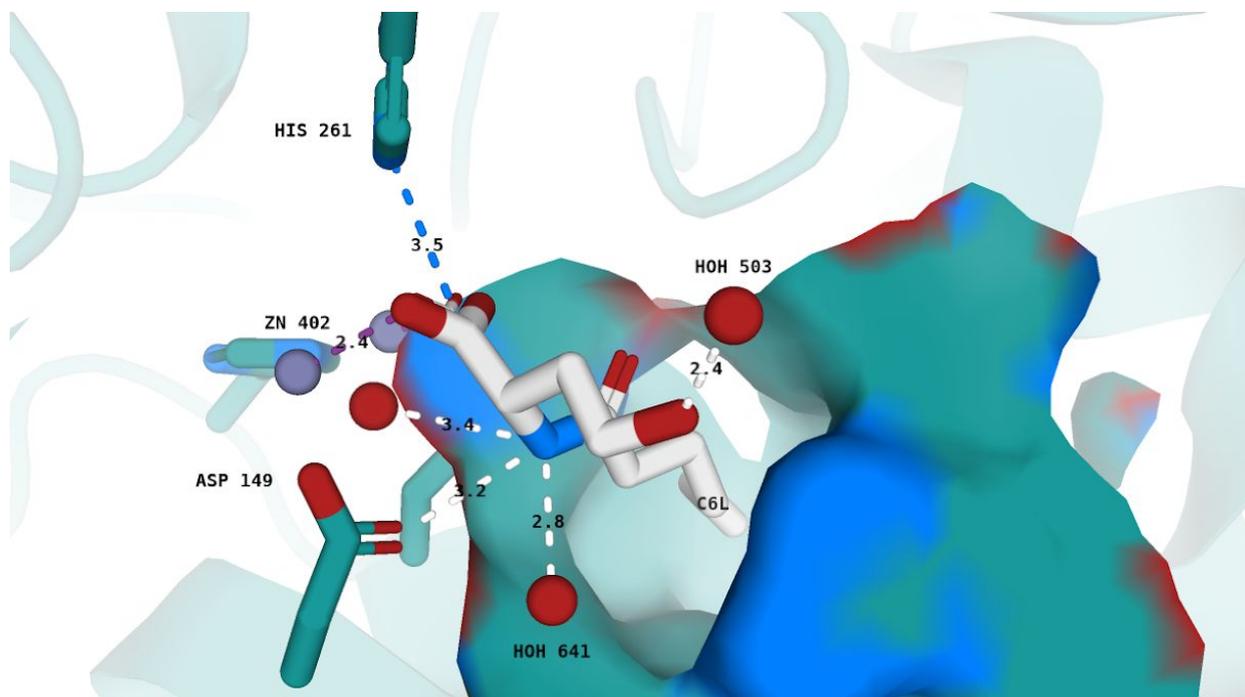


рис. 3. Взаимодействия с лигандом C6L (gray90) в структуре 4ZO3

На рисунке 3 “white” - водородные связи, “marine” - солевой мостик, “violetpurple” - координационные взаимодействия. Взаимодействия, координирующие катион цинка и отмеченные на рис. 1 не показаны, чтобы не загромождать картинку. Помимо отмеченных пунктиром взаимодействий, на рис. 3 мы видим, что гидрофобный хвост лиганда C6L (атомы C6 - C10) хорошо ложится в гидрофобный кармашек, сформированный аминокислотами белка.

Выделяются ли визуально в составе структуры отдельные домены? Я бы сказала, что нет. То-есть, в структуре 4ZO3 одна цепь соответствует одному домену. Найдем рассматриваемую структуру в CATH и посмотрим, какие домены предлагаются в выдаче. Сервис CATH выделяет в структуре 4ZO3 один мотив:

Class	Alpha Beta
Architecture	4-Layer Sandwich
Topology	Metallo-beta-lactamase; Chain A
Homologous Superfamily	RibonucleaseZ/ Hydroxyacylglutathione hydrolase-like

Приведем изображение мотива, предложенное в выдаче CATH, розовым показаны альфа-спирали, оранжевым - бета слои, серым - петлевые участки:

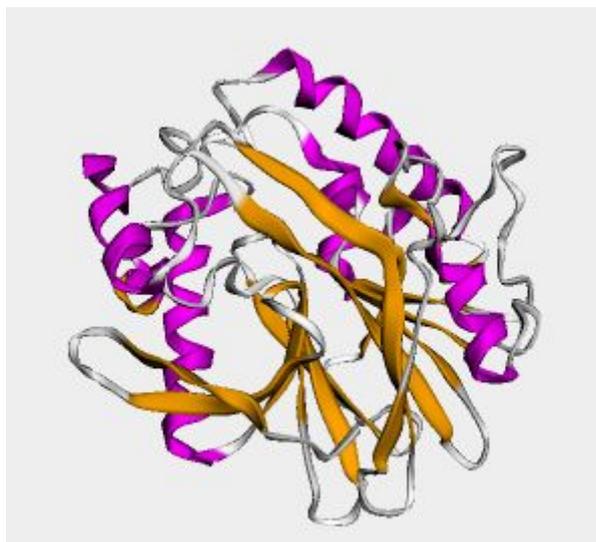


рис. 4. "Hydroxyacylglutathione hydrolase-like" домен, идентифицируемый CATH в структуре 4Z03

Теперь, когда мы более-менее познакомились со строением "кворум-подавляющей" лактамазы, сделали предположения о структурных элементах, входящих в состав сайта связывания, обратимся к литературным данным, чтобы найти информацию о реализации своей функции рассматриваемым нами белком, выясним, как она соотносится с выдвинутыми идеями.

Большинство лактоназ N-ацетил-L-гомосериновых лактонов катализируют раскрытие кольца лактона. [3] В одной из статей [4] был предложен механизм, по которому рассматриваемые нами двухсубстратные лактоназы реализуют свою функцию (рис. 5).

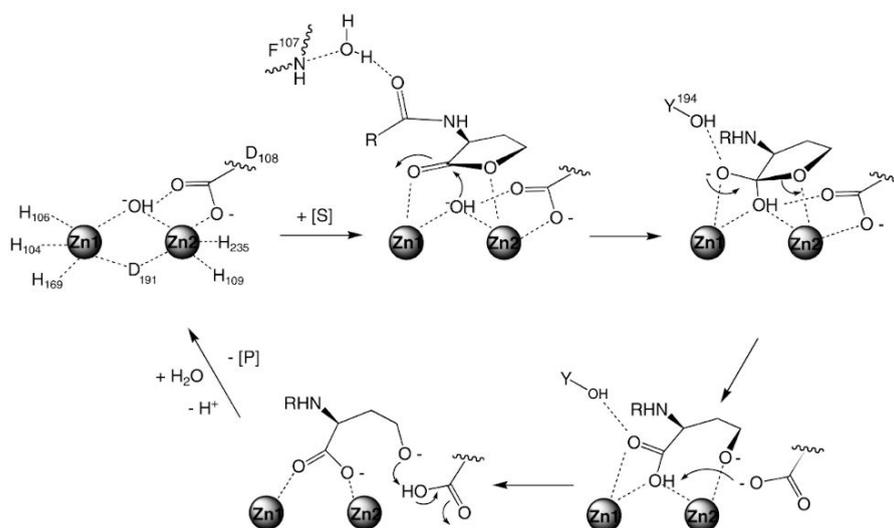


рис. 5. Предполагаемый механизм двухцинковой лактоназы [5]

Попробуем идентифицировать обозначенные взаимодействия начального этапа предложенного механизма в “новой” найденной на PDB структуре (6N9R) с аналогом субстрата в составе, а также сравнить взаимодействия конечного этапа с теми, что были идентифицированы нами ранее в структуре 4ZO3.

Найдем ситуацию, похожую на ту, что изображена на верхней картинке по центру (рис. 5) в структуре 6N9R (рис. 6). Можно сказать, что взаиморасположение катионов, молекул воды, аминокислот и “субстрата” соответствует стартовому состоянию, изображенному на рис. 5.

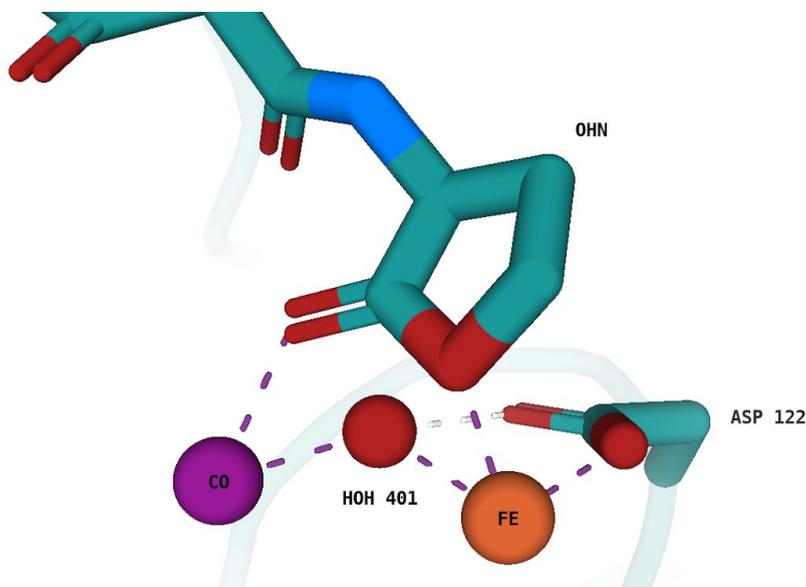


рис. 6. Взаиморасположение молекул, катионов друг относительно друга на стартовом этапе предполагаемого реакционного механизма (структура 6N9R, цепь X)

В 6N9R аналогами цинка являются катионы железа и кобальта (“deerpurple” “orange” соответственно). Координационные взаимодействия показаны “violetpurple”, водородная связь - “white”. Можно было бы предположить, что замена металлов как раз и позволила получить кристалл фермента в комплексе с субстратом (к примеру, в случае, если при замене важных для катализа катионов цинка на другие металлы способность фермента к катализу сильно снизилась или исчезла вовсе).

Ситуация, которая соответствует конечному этапу предложенного механизма (верхняя левая картинка на рис. 5), изображена на рисунках 1 и 3. нарисуем еще одну картинку для более удобного восприятия (рис. 7):

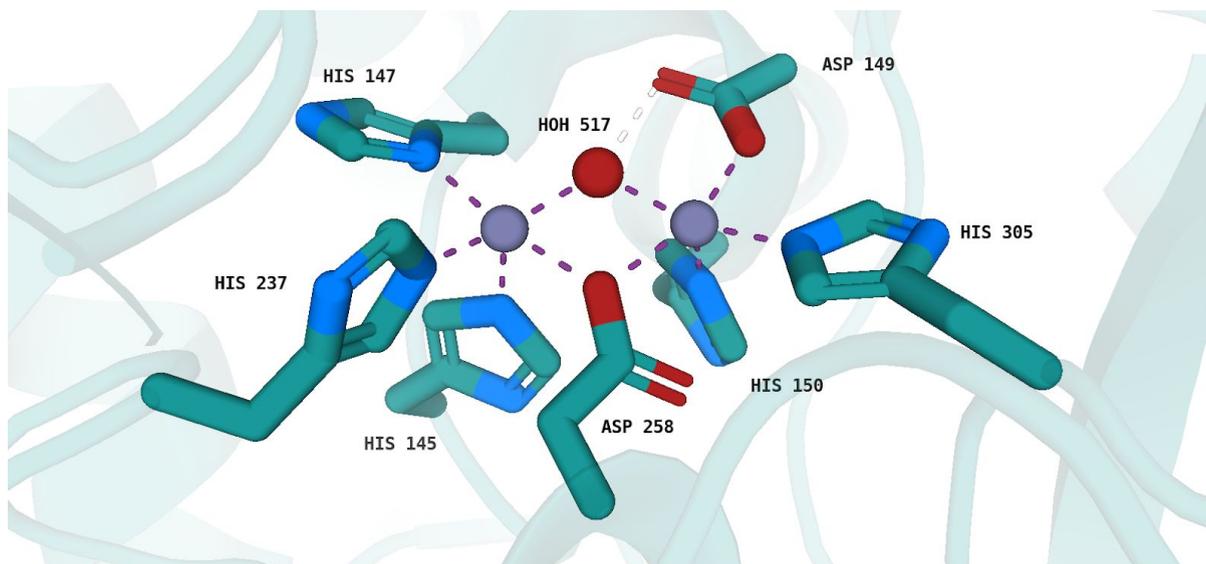


рис. 7. Взаиморасположение молекул, катионов друг относительно друга на конечном этапе предполагаемого реакционного механизма (структура 4Z03, цепь B)

Задание 2. Функциональный мотив

В этом задании нам было нужно найти белки, которые имеют не более 35% идентичности по последовательности с нашим запросом (query - 4Z03) и, по возможности, выполняют другую функцию. При работе в PDBeFold (Lowest acceptable match (%)) выставлялся на 60%).

Были выбраны следующие структуры:

- 1) метил-паратрион гидролаза (1P9E) - 26% Seq
Домен, определенный CATH совпадает с таковым у нашего белка (4Z03) (совпадение топологии, архитектуры и группы гомологии).
Субстрат фермента, метил-паратрион, изображен на рис. 8
- 2) 4-пиридоксолактоназа (4KEP) - 19% Seq
Домен, определенный CATH совпадает с таковым у нашего белка (4Z03) (совпадение топологии, архитектуры и группы гомологии)
Субстрат фермента, 4-пиридоксолактон, изображен на рис. 9.

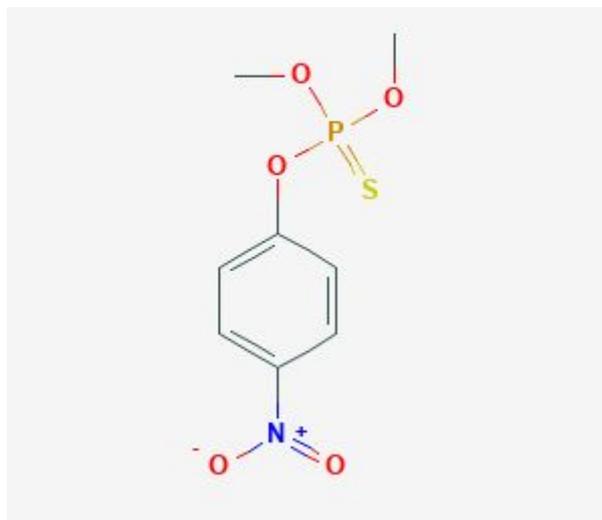


рис. 8. Метил-паратион



рис. 9. 4-пиридоксолактон

Приведем в пример один из механизмов действия метил-паратион гидролаз, рассматриваются на примере гидролиза параоксона (a,b) и 4-нитрофенилбутирата (c) (рис. 10) [5]. Можно предположить, что схемы, предложенные под пунктами (a) и (b) не вполне верные, так как в пункте (a) расположение воды (депротонированной) не вполне характерное для того, что мы наблюдаем в кристаллах. В пункте (b) мы видим на схеме целых две депротонированных воды, что также не вполне соответствует тому механизму, который можно было бы предположить, исходя из наблюдаемого расположения вод в кристаллах.

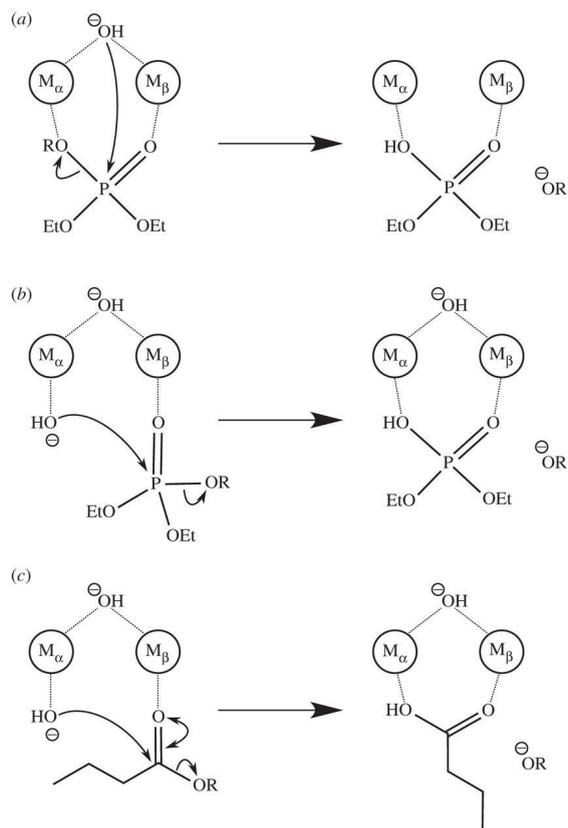


рис. 10. Сравнение предполагаемых механизмов гидролиза (a, b) параоксона и (c) 4-нитрофенилбутирата, катализируемого МРН

Теперь представим механизм работы 4-пиридоксолактоназ (рис. 11): [6]

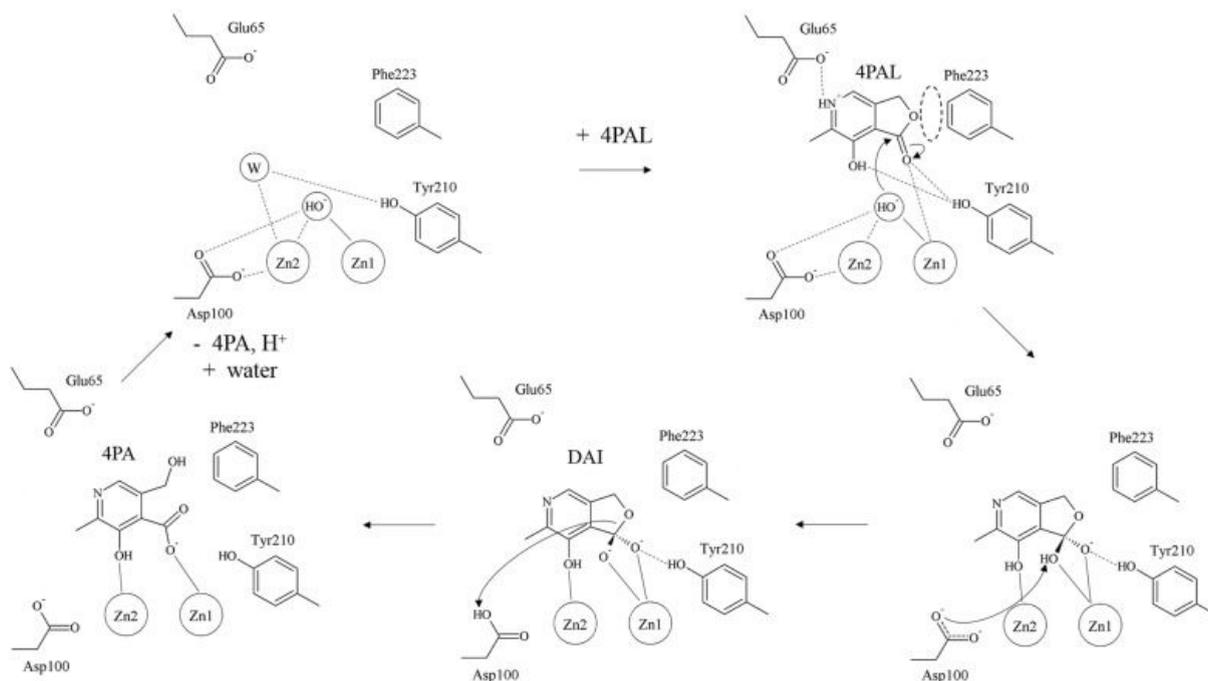


рис. 11. Предлагаемый механизм катализа 4-пиридоксолактоназы

Посмотрим на наличие аминокислотных остатков, важных для координирования катионов цинка в структурах 1P9E и 4KEP, при их присутствии посмотрим на сопоставление всех трех молекулярных систем (рис. 12).

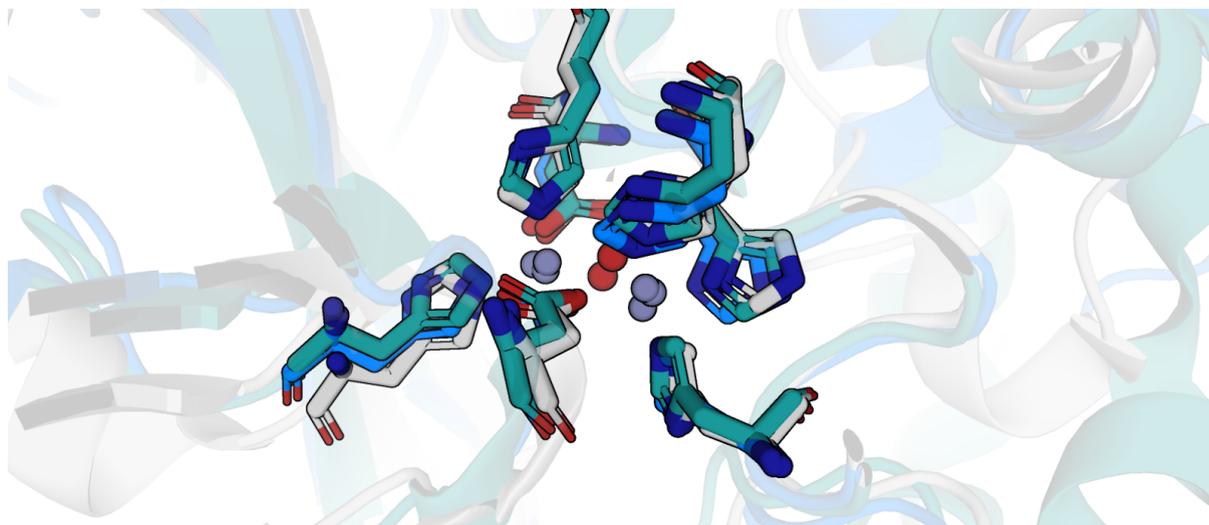


рис. 12. Сопоставление структур “кворум-нарушающей” лактоназы (“*deepteal*”, 4ZO3), метил-паратион гидролазы (“*marine*”, 1P9E) и 4-пиридоксолактоназы (“*gray80*”, 4KEP)

Мы видим, что во всех трех структурах присутствуют три остатка гистидина, координирующих “левый” катион цинка (см. рис. 12), два остатка гистидина, координирующих “правый” цинк, “ближний к читателю” остаток аспартата, участвующий в координации обоих катионов. Интересно, правда, что в одной из структур (4KEP) отсутствует кристаллическая вода, которая также участвует во взаимодействиях с катионами металла и “дальним от читателя” аспартатом.

Интересно было бы посмотреть, как формируются взаимодействия с различными аналогами субстратов/продуктов в трех молекулярных комплексах. Так как мы уже рассматривали взаимодействия, которые формируются с аналогами субстрата и продукта в структуре “кворум-нарушающей” лактоназы, посмотрим на взаимодействия в двух оставшихся системах. Начнем с метил-паратион гидролазы и в качестве примера возьмем структуру 3CAK, в состав которой входит аналог продукта реакции (рис. 13).

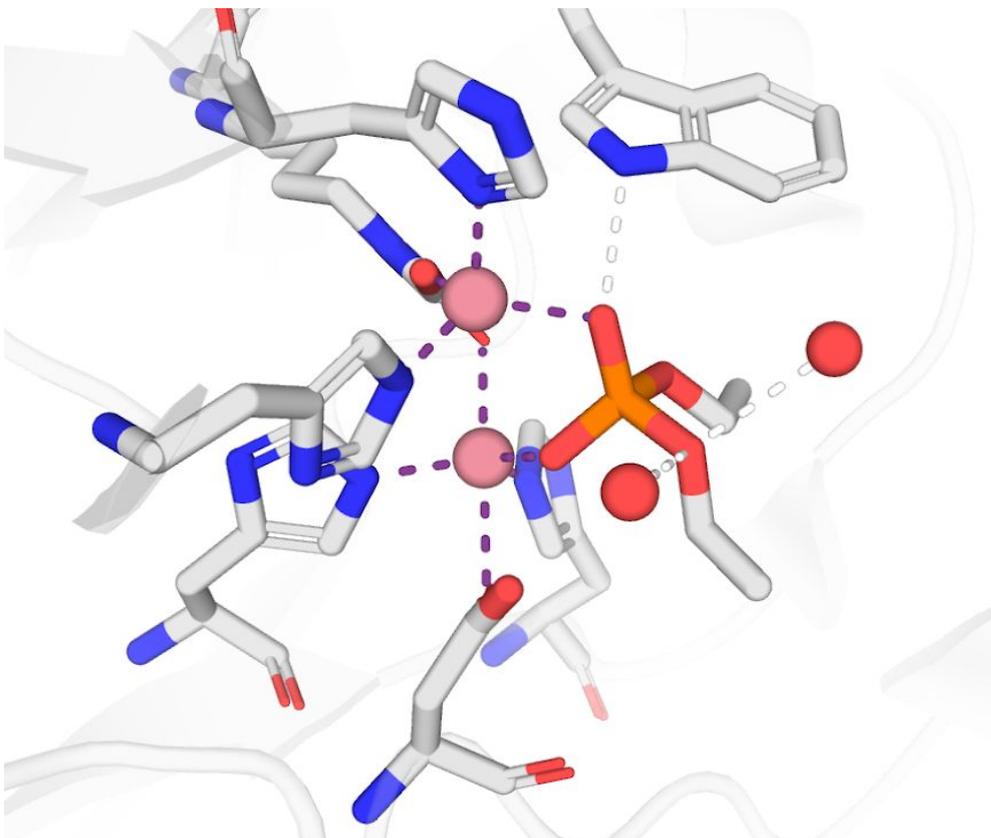


рис. 13. Взаимодействие аналога продукта ферментативной реакции в структуре паратион гидролазы (ЗСАК). Водородные связи показаны "white", координационные взаимодействия - "deppurple"

Мы видим, что лиганд формирует относительно большое количество водородных связей - с кристаллической водой (НОН 1012 цепь А и НОН 1127 цепь А), с Trp 131 А. Отметим также, что в этой структуре вместо цинка - кобальт. Вероятно, здесь можно предположить ситуацию, что замена катионов металлов позволяет удерживать аналог продукта в области активного центра фермента. То-есть, замену металлов произвели специально, чтобы была возможность, например, пронаблюдать связывание продукта.

Теперь хотелось бы посмотреть на 4-пиридоксолактоназу в комплексе с аналогом субстрата или продукта. В PDB лежит структура 4KEQ в составе которой присутствует лиганд, на первый взгляд напоминающий аналог субстрата - 5PN (рис. 14):

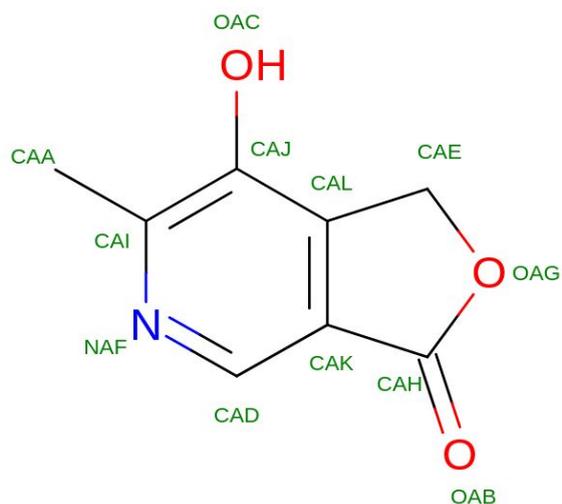


рис. 14. Лиганд 5PN в структуре 4KEQ



рис. 15. Воспоминания о структуре 4-пиридоксолактона

На деле мы видим, что кислород кетогруппы находится у другого углеродного атома, фактически, он симметрично отражен относительно горизонтальной линии. Можно сказать, что, вероятно, такое соединение не будет выполнять функцию субстрата в рассматриваемом нами ферменте. Также, вероятно, геометрия связывания 5PN не будет отвечать взаиморасположению молекул, оптимальному для выполнения каталитической функции ферментом.

Посмотрим на взаиморасположение компонентов структуры 4KEQ друг относительно друга (рис. 16).

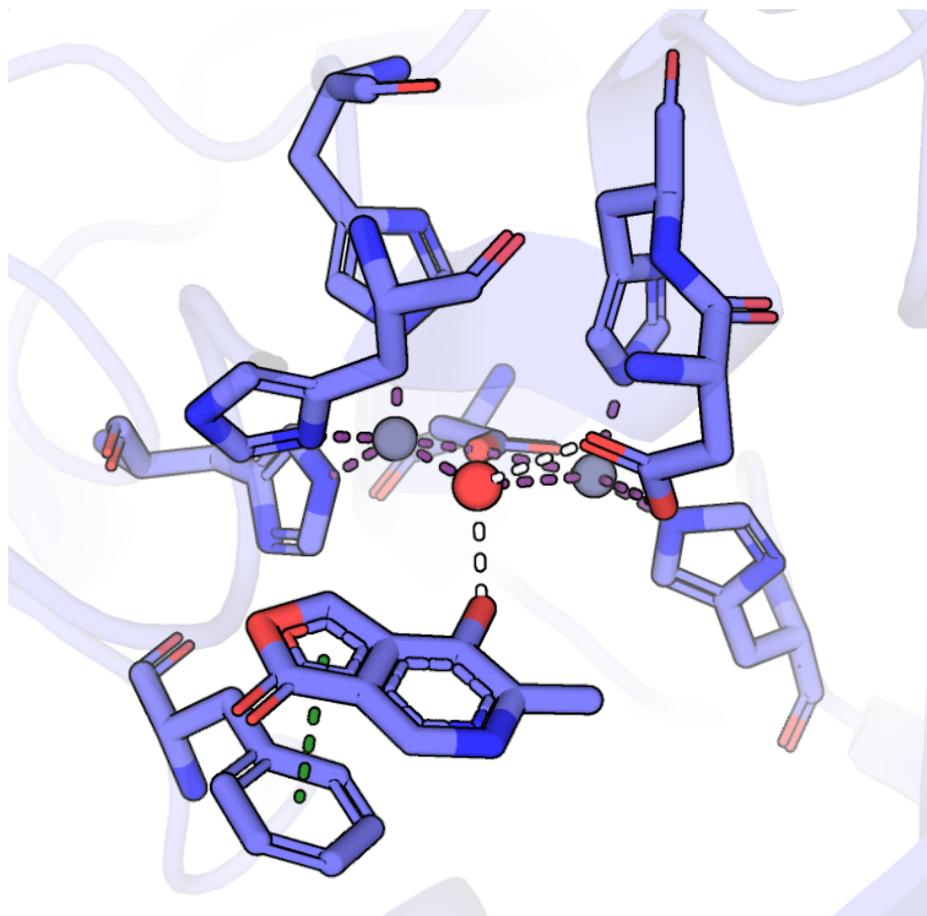


рис. 16. Взаимодействия аналога субстрата (5PN) в структуре 4-пиридоксолактоназы (4KEQ)

Мы видим, что в данной структуре присутствуют три гистидина, координирующих один из катионов цинка, аспартат, участвующих в координации обоих металлов, аспартат, реализующий взаимодействие с водой и вторым катионом, который, в свою очередь, координируется двумя остатками гистидина. Также можно заметить, что 5PN и остаток Phe 223 A находятся в стэкинге. Можно сказать, что за исключением пи-стэкинга, который способствует фермент-субстратному взаимодействию, структура активного сайта, функциональный мотив вполне совпадает с тем, что обсуждался нами ранее.

В целом, можно сказать, что отмеченные нами на рисунке 8 аминокислоты остаются неизменными в трех структурах, а остатки, способствующие более специфической координации субстрата, могут несколько видоизменяться, "чтобы обеспечить" формирование дополнительных водородных связей или пи-стэкинга. **В состав функционального домена также входят катионы цинка.**

Список литературы

1. Mascarenhas R. et al. Structural and biochemical characterization of AidC, a quorum-quenching lactonase with atypical selectivity //Biochemistry. – 2015. – Т. 54. – №. 28. – С. 4342-4353.
2. Thomas P. W. et al. The quorum-quenching lactonase from *Bacillus thuringiensis* is a metalloprotein //Biochemistry. – 2005. – Т. 44. – №. 20. – С. 7559-7569.
3. Liu D. et al. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-bound structures //Biochemistry. – 2008. – Т. 47. – №. 29. – С. 7706-7714.
4. Liu D. et al. Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 1. Product-bound structures //Biochemistry. – 2008. – Т. 47. – №. 29. – С. 7706-7714.
5. Purg M. et al. Probing the mechanisms for the selectivity and promiscuity of methyl parathion hydrolase //Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. – 2016. – Т. 374. – №. 2080. – С. 20160150.
6. Kobayashi J. et al. Structure of 4-pyridoxolactonase from *Mesorhizobium loti* //Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications. – 2014. – Т. 70. – №. 4. – С. 424-432.