

Практикум 9

Ситуация: ко мне обратились коллеги по институту, которые занимаются изучением популяции определенных организмов и встретились с редкими мутациями в одном белке.

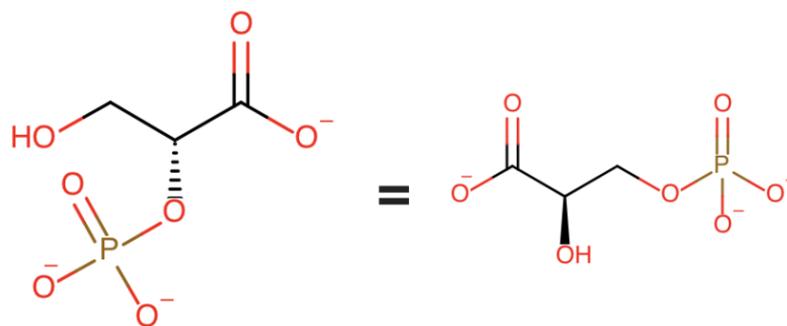
Задача: дать комментарий о вероятности негативного влияния этих мутаций на функцию белка.

UNIPROT ID: [A1UZX9](#)

Мутации: N15D, E150Q, Y90F

Обзор объекта

Дан белок грам-отрицательной бактерии *Burkholderia mallei* - 2,3-бисфосфолицерат-зависимая фосфолицератмутаза (сокращенно PGAM). Этот фермент катализирует взаимное превращение 2-фосфолицерата и 3-фосфолицерата. Причем это превращение зависимо от 2,3-бисфосфолицерата ([EC 5.4.2.11](#)). То есть, при поиске структуры нужно чтобы она содержала информацию о связывании субстрата и 2,3-бисфосфолицерата.



2-фосфолицерат = 3-фосфолицерат

Согласно записи Uniprot, у данного белка нет кофакторов.

Механизм реакции

PGAM превращает 3-фосфолицерат в 2-фосфолицерат по механизму пинг-понга, в котором фосфо-фермент переносит фосфатную группу с гистидина активного центра на 3-фосфолицерат с образованием промежуточного соединения 2,3-бисфосфолицерата, который впоследствии переносит фосфат из 3-положения обратно на гистидин с получением продукта 2-фосфолицерата и восстановленного фосфофермента.

Структура

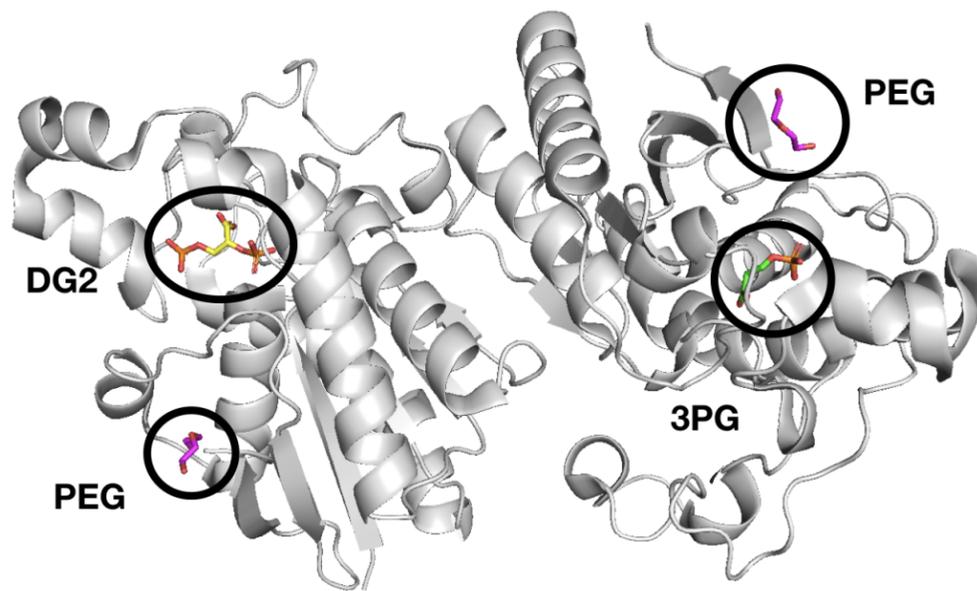
На сайте Uniprot данному идентификатору сопоставлена только предсказанная AlphaFold структура.

Попробуем найти ортолог. Даем аминокислотную последовательность рассматриваемого белка на вход [protein blast](#). Поиск по PDB. Получили 59 хитов. Два первых хита с 100% идентичностью и еще один хит с 99% - фосфолицератмутаза бактерии *Burkholderia pseudomallei*. Это родственные патогенные бактерии, *B. mallei* вызывает мелиоидоз, а *B. pseudomallei* - сап.

Три хита соответствуют трем структурам. Хит с лучшим скором принадлежит структуре 3LNT, затем идут 3EZN и 3FDZ. Структуры 3LNT и 3EZN не связаны с интересующими нас лигандами. Мономеры в структуре 3FDZ устроены так: один из них связан с 2,3-бисфосфолицератом, второй - с 3-фосфолицератом. 2,3-бисфосфолицерат-зависимая фосфолицератмутаза *B. pseudomallei* соответствует UNIPROT ID [Q3JWH7](#).

Следующий хит составляет 66% идентичности и не содержит нужных лигандов, далее идентичность убывает еще сильнее.

В обеих моделях, записанных в 3FDZ, также есть лиганд PEG - полиэтиленгликоль. По расположению PEG можно сразу отклонить версию о том, что это субстрат или конкурентный ингибитор: PEG находится на периферии белка и явно не в кармане связывания.



Расположение лигандов: DG2 - 2,3-бисфосфоглицерат, 3PG - 3-фосфоглицерат, PEG - полиэтиленгликоль.

Обозначенные в структуре молекулы DG2 и 3PG соответствуют общепринятой структурной формуле и находятся не на поверхности структуры, а в карманах связывания, в связи с чем есть основания доверять рассматриваемой модели.

Структурный поиск

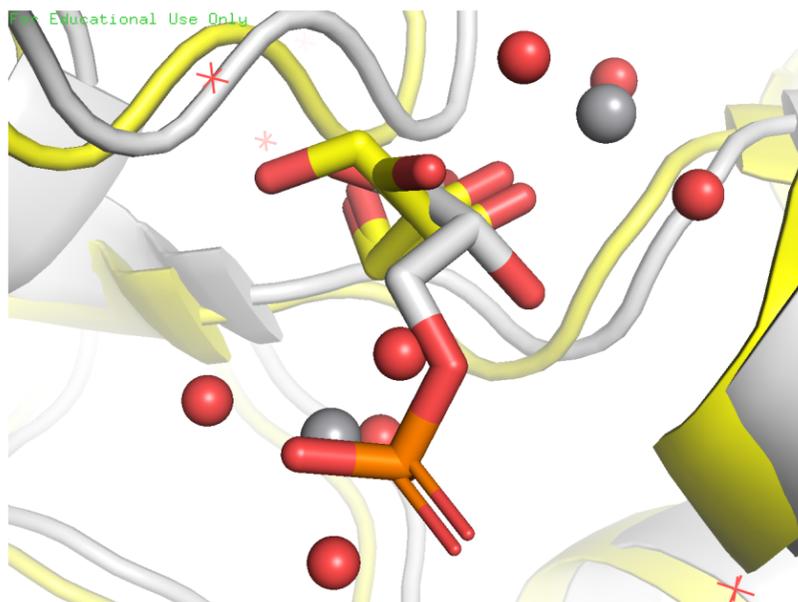
Воспользуемся сервисом [PDBeFold](#).

Получили 164 хита для цепи А и 157 хитов для цепи В (первая и вторая молекулы соответственно). Найденные структуры принадлежат фосфоглицератмутазам

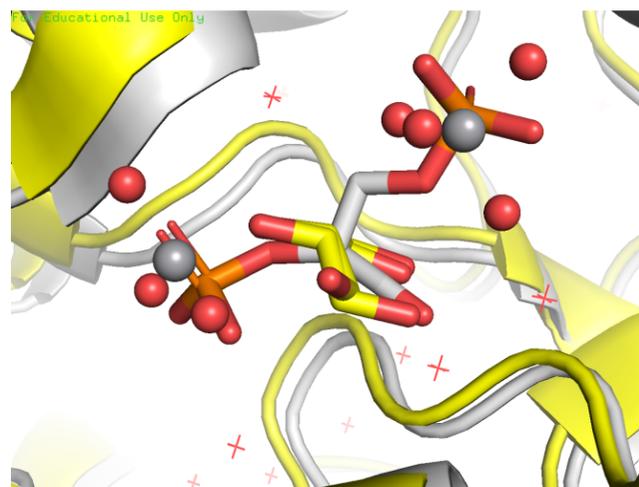
По наблюдением наиболее часто встречающийся вариант кроме рассматриваемого связывания с DG2 и 3PG - это связывание с ванадатом и глицеролом. Рассмотрим структуру 3GW8. В целом вторичные структуры довольно хорошо сопоставимы между собой. Также в 3GW8 записано 4 молекулы тетраэтиленгликоля (PG4). Позиция двух из них сопоставима с позициями PEG в структуре 3FDZ, две остальные молекулы находятся в районе между двумя моделями белка.

Ванадат является имитатором фосфата, который используется для изучения ферментативных механизмов ферментов переноса фосфориллов. Комплекс двух ионов ванадата и глицерола связывается в местах связывания DG2 и 3PG.

На изображениях ниже серым - углероды остова 3FDZ, желтым - углероды остова, тройки красных сфер с серой сферой в центре - ион ванадата.



Место связывания PG3



Место связывания DG2

Видно, что второй ион ванадата не сопоставляется фосфатной группе PG3, потому что одна у PG3 только одна. Сопоставимость DG2 и комплекса ванадат-глицерол вполне хорошая.

Эта структура может быть полезна в дальнейшем для интерпретации вариантов.

Локализация позиций

| Score | Expect | Method | Identities | Positives | Gaps |
|----------------|--------|---|--------------|--------------|-----------|
| 507 bits(1306) | 0.0 | Compositional matrix adjust. | 248/249(99%) | 248/249(99%) | 0/249(0%) |
| Query 1 | | MYKLVLIRHGESTWNKENRFTGWVDVLDLTEQGNREARQAGQLLKEAGYTFDIA YTSVLKR | | | 60 |
| Sbjct 9 | | MYKLVLIRHGESTWNKENRFTGWVDVLDLTEQGNREARQAGQLLKEAGYTFDIA YTSVLKR | | | 68 |
| Query 61 | | AIRTLWHVQDQMDLMYVPVHWSWRLNERHYGALSGLNKAETA AKYGDEQVLVWRRSYDTP | | | 120 |
| Sbjct 69 | | AIRTLWHVQDQDMLMYVPVHWSWRLNERHYGALSGLNKAETA AKYGDEQVLVWRRSYDTP | | | 128 |
| Query 121 | | PPALEPDERAPYADPRYAKVPREQLPLTECLKDTVARVLPWNES IAPAVKAGKQVLI A | | | 180 |
| Sbjct 129 | | PPALEPDERAPYADPRYAKVPREQLPLTECLKDTVARVLPWNES IAPAVKAGKQVLI A | | | 188 |
| Query 181 | | AHGNSLRALIKYLDGISDADIVGLNIPNGVPLVYELDES LTPIRHY YLGDQEA IAKAQAA | | | 240 |
| Sbjct 189 | | AHGNSLRALIKYLDGISDADIVGLNIPNGVPLVYELDES LTPIRHY YLGDQEA IAKAQAA | | | 248 |
| Query 241 | | VAQQGKSAA 249 | | | |
| Sbjct 249 | | VAQQGKSAA 257 | | | |

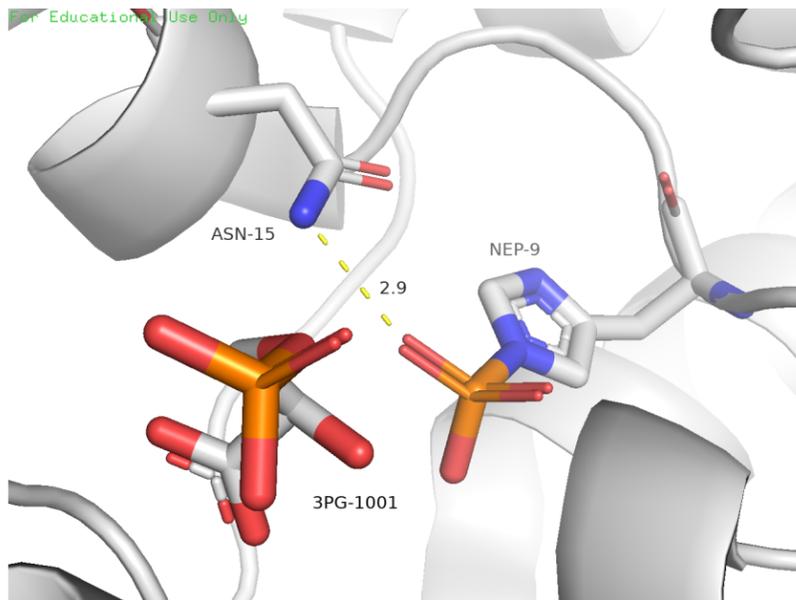
Выравнивание из protein blast.

Последовательности различаются наличием аминокислоты на 9 позиции (при нумерации с единицы). Также нумерация аминокислот в структуре PDB и в последовательности изучаемого белка UNIPROT различаются.

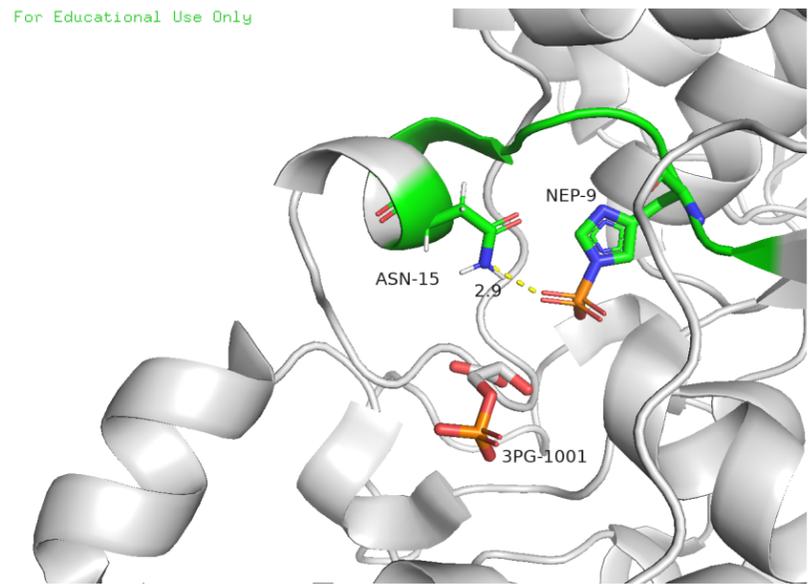
N15D

Аспарагин в 15 позиции заменяется на аспарат.

15Asn образует водородную связь с фосфатной группой 9NEP - это модифицированный His структуры рассматриваемой фосфоглицератмутаза. С самим субстратом связи не формируется, так как он находится достаточно далеко от рассматриваемого остатка.

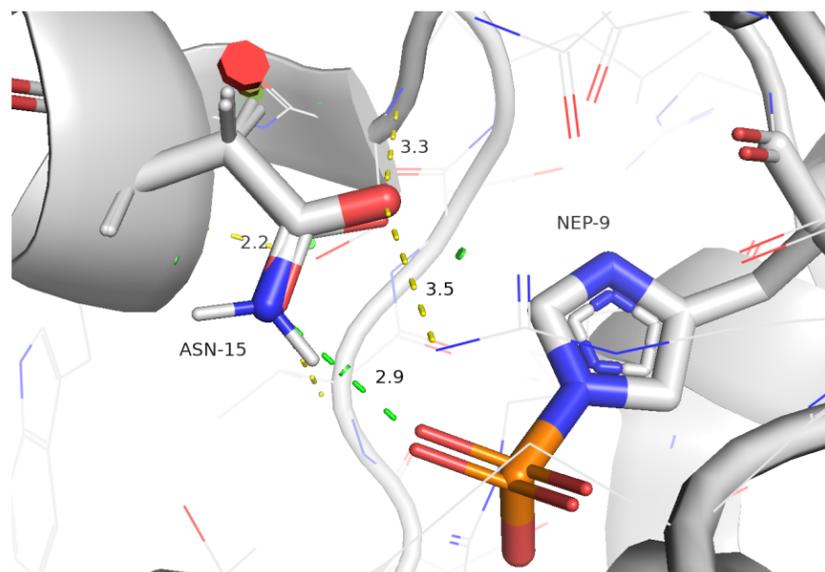


Водородная связь между 15Asn и 9NEP, 3PG находится на удалении.



Более общая картина, зеленым выделен участок последовательности, на котором находятся 15Asn и 9NEP

На непосредственное связывание с субстратом рассматриваемый остаток влияет мало, однако его водородная связь с 9NEP предположительно поддерживает структуру кармана связывания.



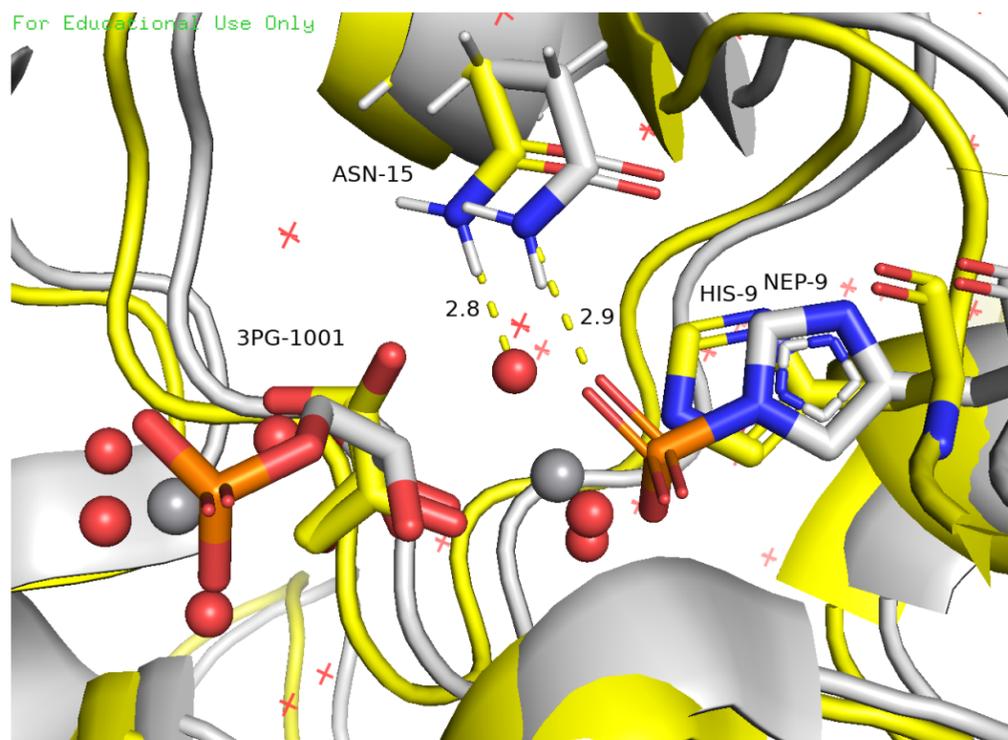
Мутация в аспарат, Рунол

С помощью Рунол представим, что было бы, если бы мутация произошла. Водородная связь с 9NEP была бы потеряна. Возможно, сформировалась бы водородная связь с азотом остова 12Ser, которая бы стабилизировала участок поворота структуры, наблюдаемого нами выше.

Рассматриваемый нами сейчас сайт представляет собой модель начального состояния превращения 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат: гистидин фосфорилирован, в сайте связывания связан еще не превращенный 3-фосфоглицерат.

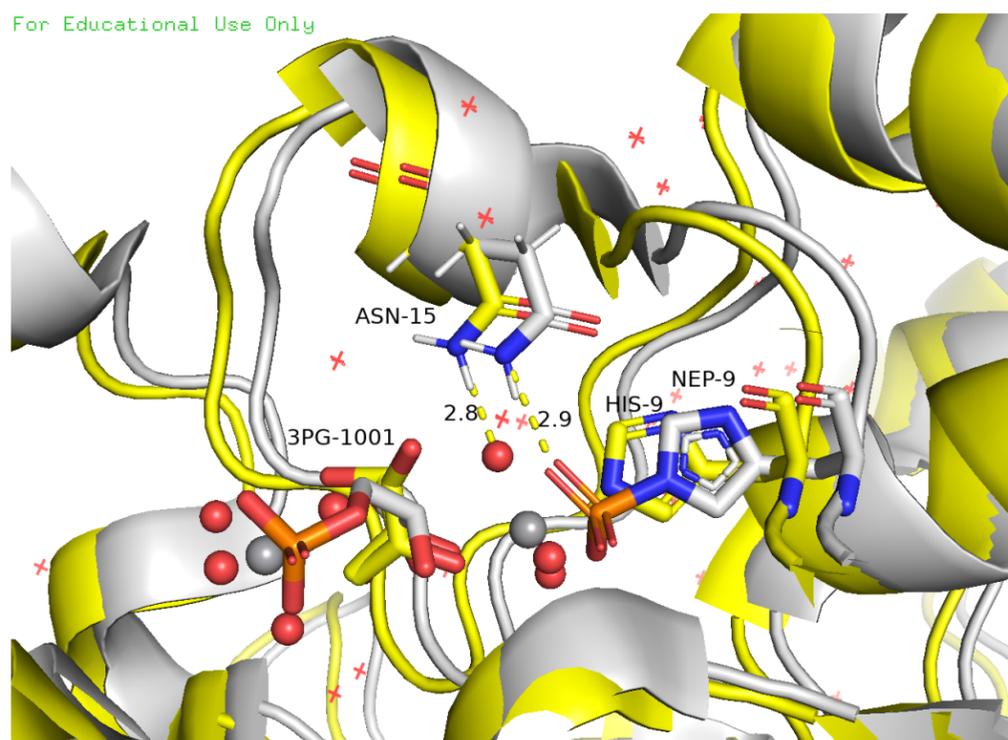
В структуре 3GW8, связанной с ванадатом и глицеролом, однако, 9й остаток не модифицирован и представлен гистидином. Там нет никакой водородной связи между 15 и 9 остатками, так как фосфатной группы нет, а формировать связь больше и не с чем.

Комплекс ионов ванадата и глицерола имитирует переходное состояние - 2,3-бисфосфоглицерат. Аспарагин может участвовать в стабилизации переходного состояния, формируя водородную связь с его фосфатом. Поэтому мутация, нарушающая формирование такой связи, окажет негативное влияние на функционирование фермента.



Желтым - атомы углерода структуры 3GW8

Гипотеза о роли водородной связи между 15Asn и 9NEP в стабилизации кармана связывания. Мы видим смещение структуры между начальным и "промежуточным" состоянием. Однако, подобное смещение видно по всей структуре. Гипотетически такой эффект может быть и отсутствие этой связи в промежуточном состоянии реакции, которое как правило длится недолго, не дает достаточных оснований для того чтобы ее отклонить.



Общий вид сравнения двух структур

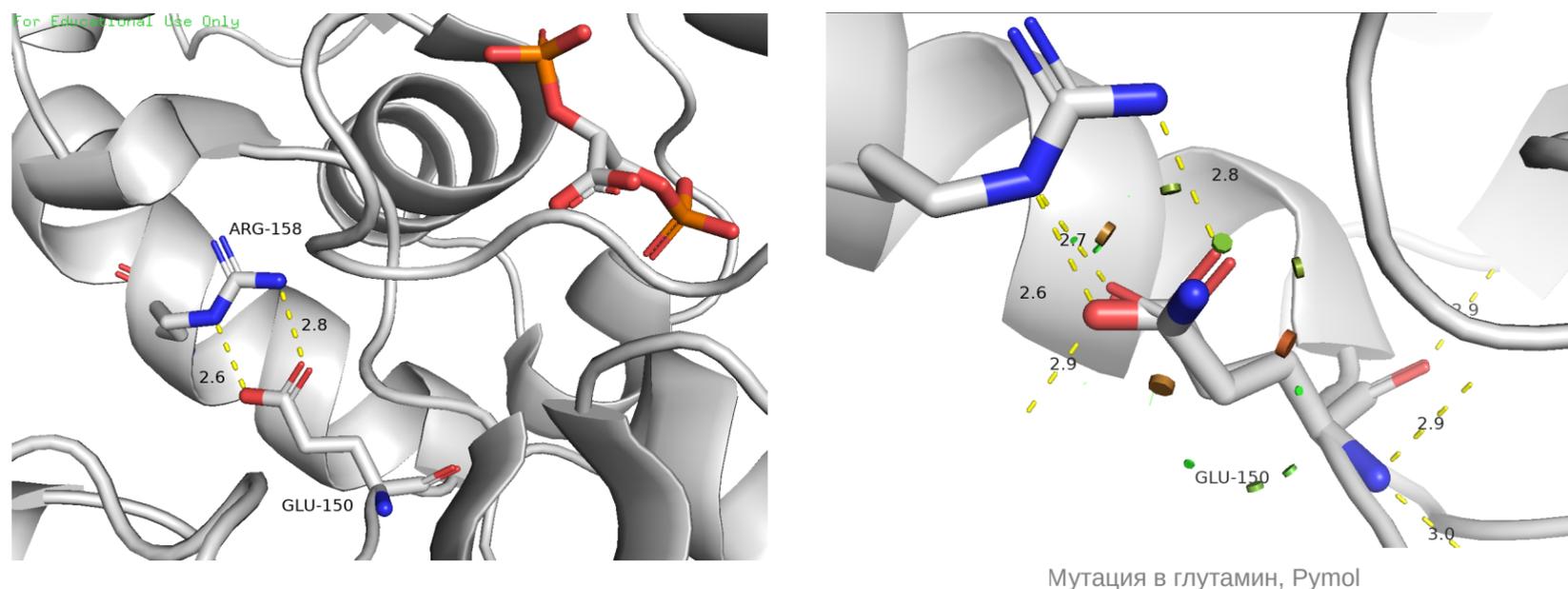
Вывод: замена негативная, повлияет на эффективность выполнения белком своей функции, так как теряется водородная связь, стабилизирующая интермедиат реакции.

E150Q

Глутамат 150 в глутамин

Остаток находится довольно далеко от места связывания субстрата. Расстояние от него до соседнего аргинина довольно мало, что может нам с уверенностью говорить о формировании водородных связей.

Сам остаток 150Glu не входит в альфа-спираль, она начинается после него, и взаимодействие с 158Arg относится к формированию альфа-спирали приводит только если косвенно. Однако, спирали предшествует поворот в структуре, который, видимо, стабилизируется рассматриваемым взаимодействием. Расстояния в структуре 3GW8 те же, взаимодействие не относится к активному центру белка, а направлено на поддержание его структуры в целом.



Как итог - теряем одну водородную связь, потому что азоту 150Glu становится не с кем связаться. Скорее всего мутация будет нейтральной, не можем сказать точно.

Вывод: потенциально негативная замена, так как ослабляет взаимодействия, скрепляющие третичную структуру белка.

Y90F

Тирозин 90 в фенилаланин

Тирозин образует водородную связь с остатком 88Arg и фосфатной группой PG3. Мутация Y90F приведёт к значительному снижению активности фермента из-за потери водородной связи с субстратом.

