

Практикум 9

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

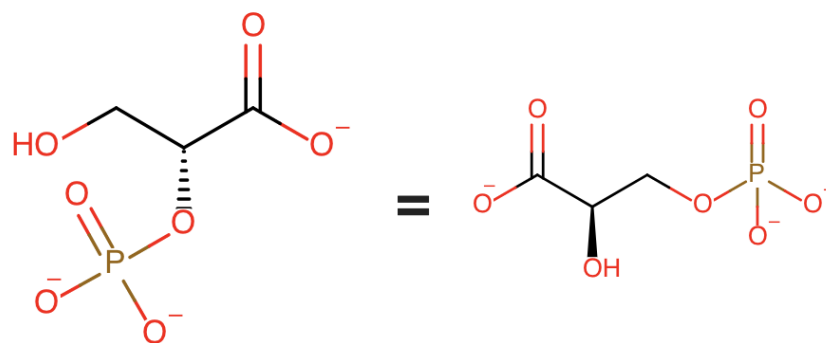
Задача: дать комментарий о вероятности негативного влияния этих мутаций на функцию белка.

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

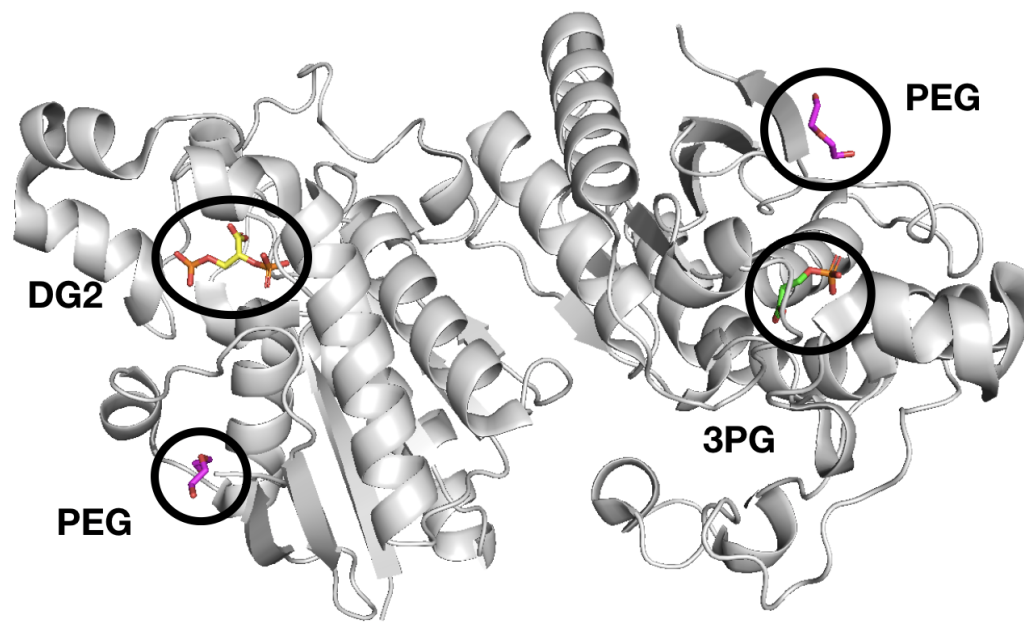
На сайте Uniprot данному идентификатору сопоставлена только предсказанная AlphaFold структура.

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

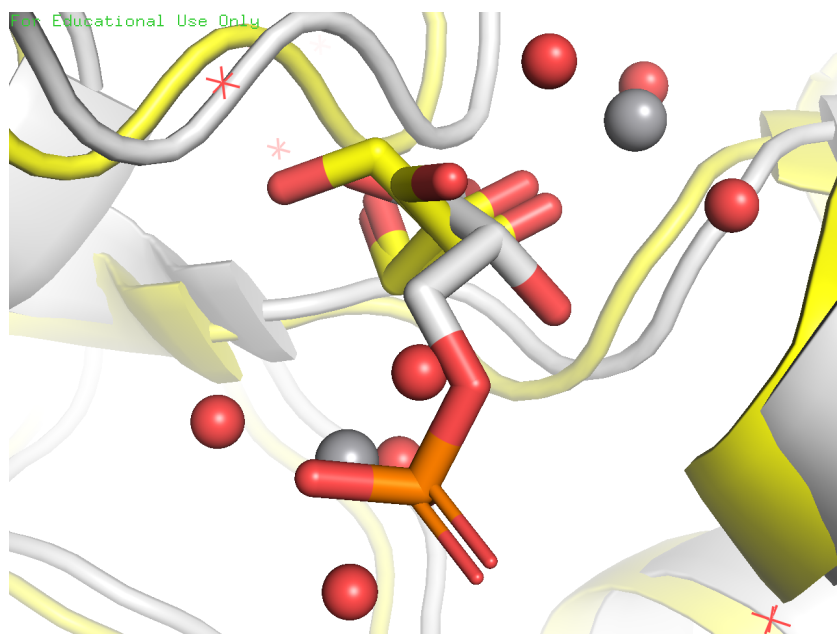
Воспользуемся сервисом [PDBeFold](#).

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

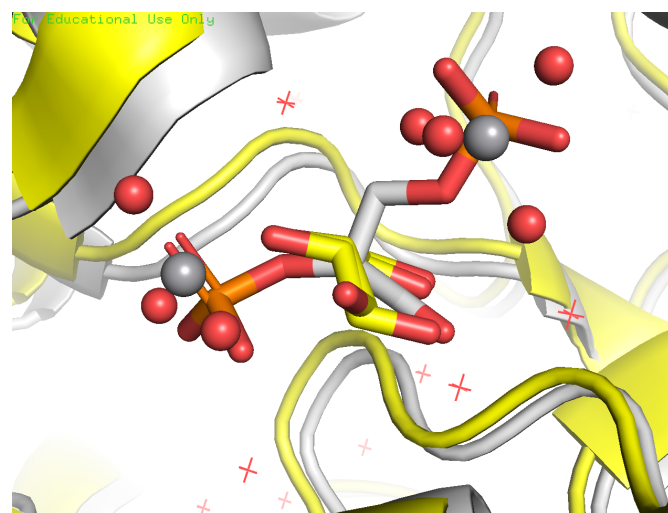
По наблюдением наиболее часто встречающийся вариант кроме рассматриваемого связывания с DG2 и 3PG - это связывание с ванадатом и глицеролом. Рассмотрим структуру 3GW8. В целом вторичные структуры довольно хорошо сопоставимы между собой. Также в 3GW8 записано 4 молекулы тетраэтиленгликоля (PG4). Позиция 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		MYKLVLI RHGESTWNKENRFTGWVDV DLTEQGNREARQAGQLLKEAGYTFDIA YTSVLKR			60
Sbjct 9		MYKLVLI RHGESTWNKENRFTGWVDV DLTEQGNREARQAGQLLKEAGYTFDIA YTSVLKR			68
Query 61		AIRTLWHVQDQMDLMYVPV VHSWRLNERHYGALSGLNKAETA AKYGDEQVLVWRRSYDTP			120
Sbjct 69		AIRTLWHVQDQDMLMYVPV VHSWRLNERHYGALSGLNKAETA AKYGDEQVLVWRRSYDTP			128
Query 121		PPALEPGDERAPYADPRYAKVPREQLPLTECLKDTVARV LPLWNESIAPAVKAGKQV LIA			180
Sbjct 129		PPALEPGDERAPYADPRYAKVPREQLPLTECLKDTVARV LPLWNESIAPAVKAGKQV LIA			188
Query 181		AHGNSLRALIKYLDGISDADIVGLNIPNGVPLVYELDES LTPIRHYLGDQEAIKAQAA			240
Sbjct 189		AHGNSLRALIKYLDGISDADIVGLNIPNGVPLVYELDES LTPIRHYLGDQEAIKAQAA			248
Query 241		VAQQGKSAA 249			
Sbjct 249		VAQQGKSAA 257			

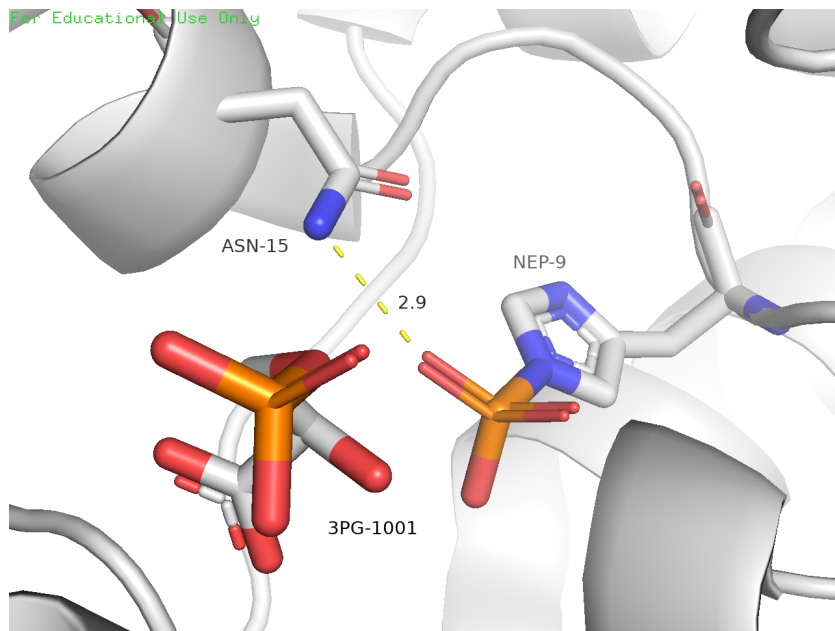
Выравнивание из protein blast.

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

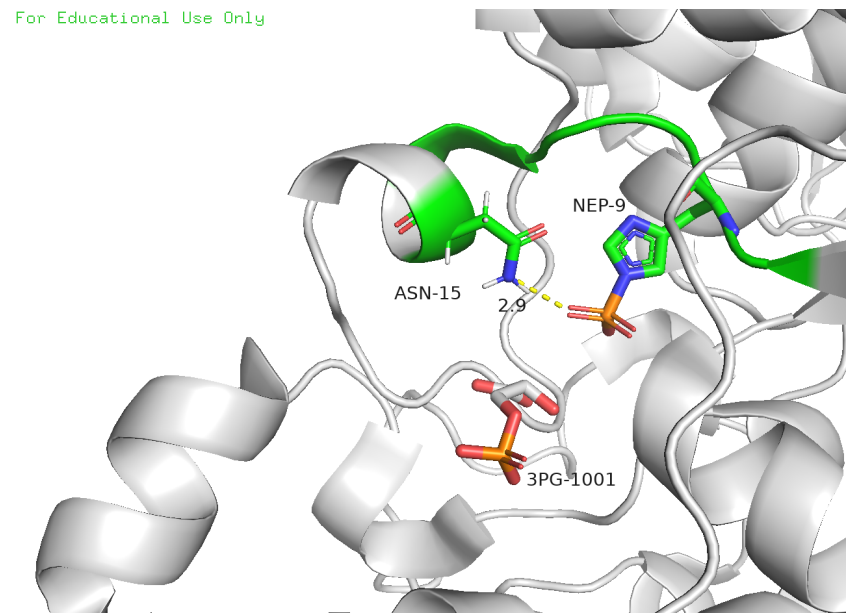
N15D

Аспарагин в 15 позиции заменяется на аспарат.

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

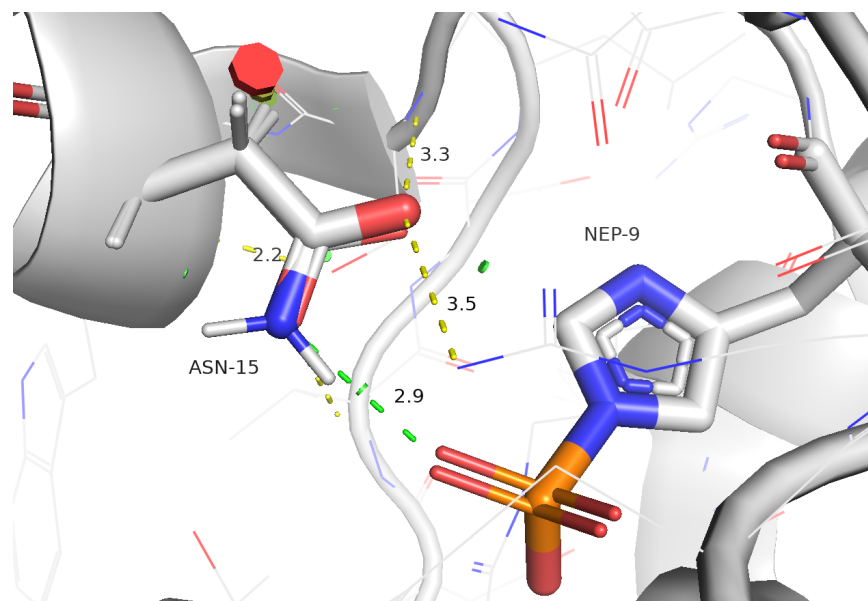


Водородная связь между 15Asn и 9NEP, 3PG находится на удалении.



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.



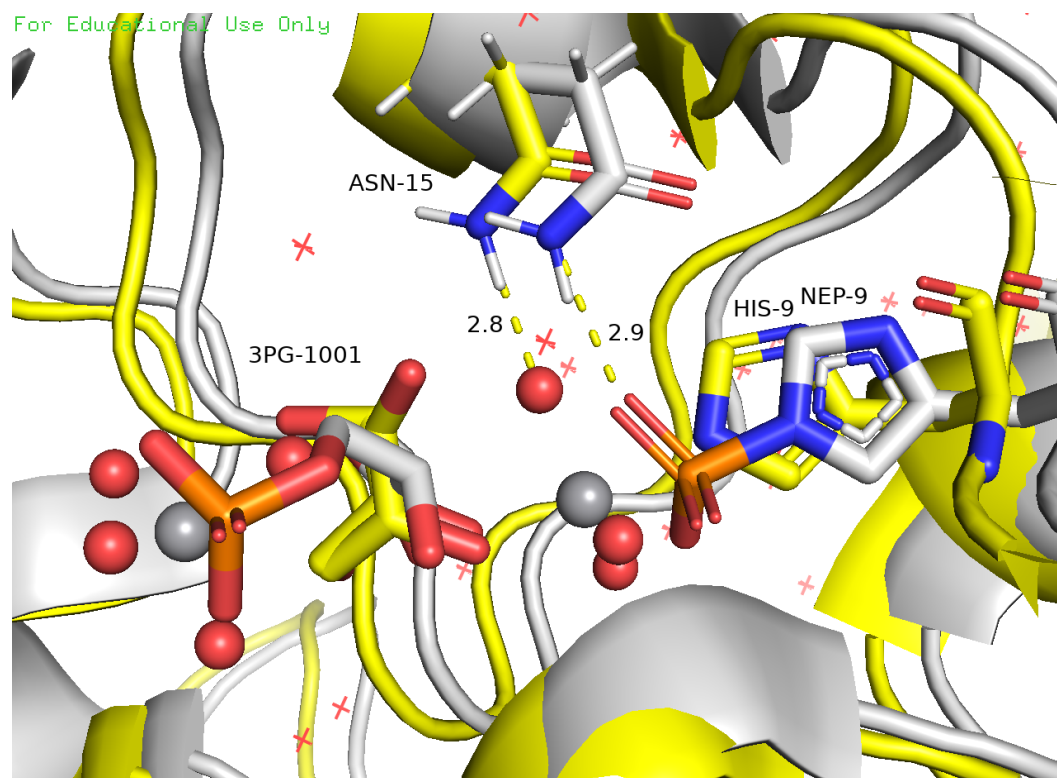
Мутация в аспарат, Рунол

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.

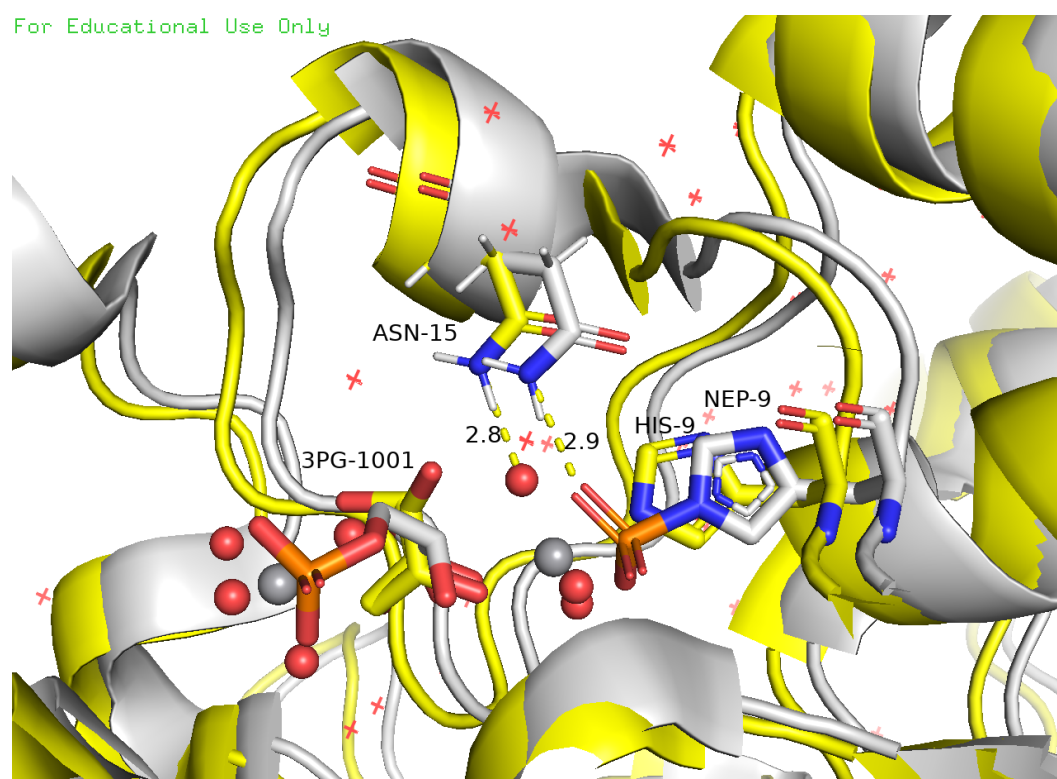
В структуре 3GW8, связанной с ванадатом и глицеролом, однако, 9й остаток не модифицирован и представлен гистидином. Там нет никакой водородной связи между 15 и 9 остатками, так как фосфатной группы нет, а формировать связь больше и не с чем.

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

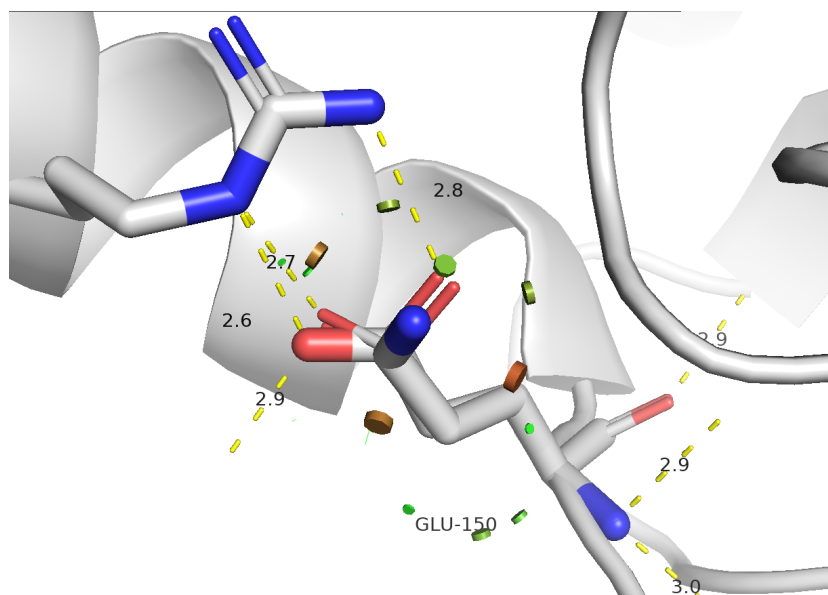
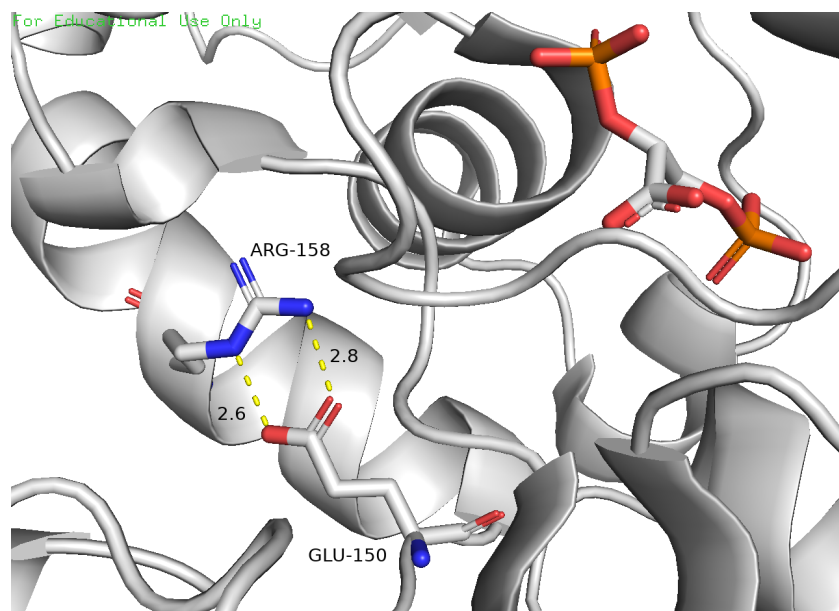
Вывод: замена негативная, повлияет на эффективность выполнения белком своей функции, так как теряется водородная связь, стабилизирующая интермедиат реакции.

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.



Мутация в глутамин, Pymol

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.

