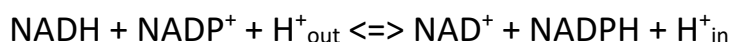


Структура и функция

В данном задании мне было необходимо изучить, используя знания структурной биологии, как мутации могут повлиять на функциональные свойства белка.

Мне достался белок с Uniprot ID W8I5LO - это субъединица альфа никотинамид нуклеотид трансгидрогеназы из бактерии *Ensifer adhaerens*. Этот белок локализован в цитоплазматической мембране и катализирует перенос восстановительных эквивалентов между NAD(H) и NADP(H) для перемещения протона:



Субъединица альфа отвечает за связывание NAD.

Для начала было необходимо найти известную структуру ортолога данного белка. Для этого был сделан запрос с помощью Protein BLAST, и в качестве выдачи рассматривались только белки с имеющимися данными о структуре в PDB. Было найдено 71 совпадение, у лучшего процент совпадения составил 85%, а у следующего за ним – 57.2, поэтому в качестве опорной была выбрана структура трансгидролазы из *Sinorhizobium meliloti* (PDB-id 4dio). Однако в данной структуре нет информации о взаимодействиях с лигандами, поэтому был произведен поиск похожих структур при помощи PDBeFold. Его выдача также во многом «совпала» с выдачей blast – лучшие совпадения были со структурами, соответствующими второй позиции из выдачи Blast. Я выбрал в качестве дополнительных структур для анализа взаимодействия с NAD 1l7d и 1l7e – это структуры связанной и несвязанной форм белка, описанные одними и теми же авторами в одной статье, так с их помощью, на мой взгляд, также можно будет принять во внимание изменение структуры белка в результате связывания. Для того, чтобы принять во внимание и другие лиганды, также рассматривалась структура 1xlt.

Мутация 1. D287N

Остаток D287 расположен внутри белка в конце одного из бета-тяжей, в взаимодействии с лигандами он не участвует, и при связывании с лигандом никуда не перемещается, поэтому будем опираться на выбранную изначально структуру, в ней остаток D287 соответствует Asp-316.

Прежде чем переходить к изучению взаимодействий остатка, посмотрим, какие есть отличия между рассматриваемой структурой и изучаемым белком вблизи этого остатка.

```

290      300      310      320      330      340      350
2D I V I T T A L I P G R P A P R L V T R E M L K A M K P G S I A V D L A V E R G G N V E G A E A G R V A D V E G V K V I G H L N A
2D I V I T T A L I P G R P A P R L V T R E M L D S M K P G S V V V D L A V E R G G N I E G A E A G K V T E V G G V R I V G H L N A
G D I A I T T A L I P G K P A P V L I T E E M V T K M K P G S V I I D L A V E A G G N C P L S E P G K I V V K H G V K I V G H T N A

```

Рисунок 1 Выравнивание, выделены остатки, расположенные в радиусе 5Å от того, в который вносится мутация.

В одной позиции произошла замена валина на изолейцин, в другой – наоборот, это схожие по своим свойствам аминокислоты, существенных замен не было. Рассмотрим в каких взаимодействиях участвует наш остаток.

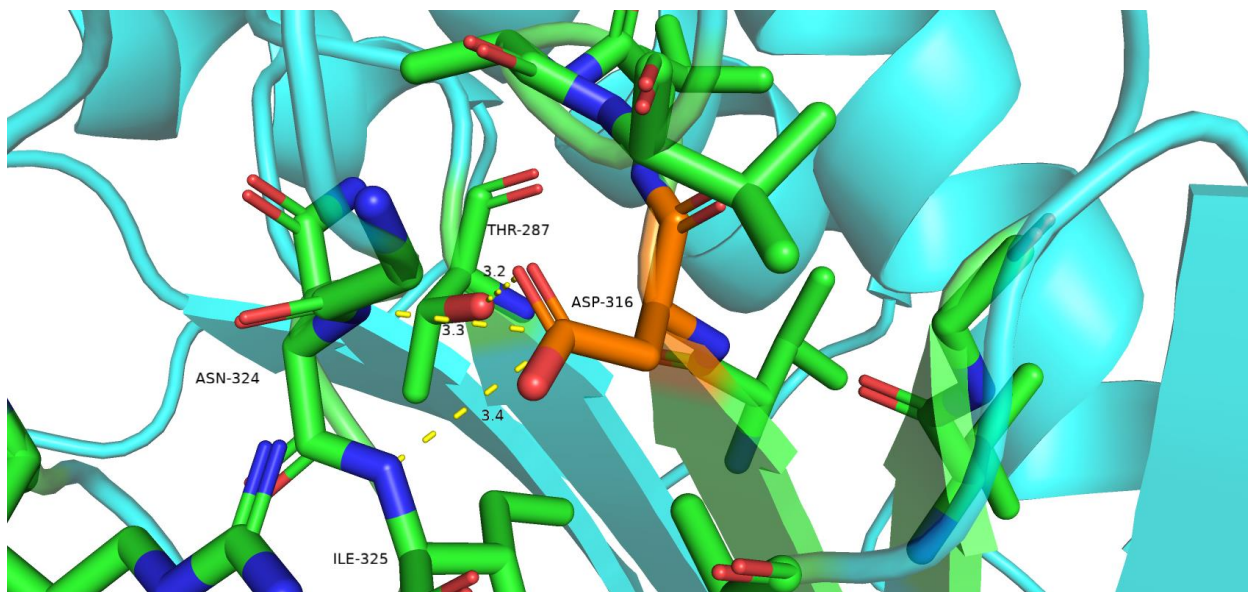


Рисунок 2. Взаимодействия Asp-316

Он принимает участие в 2 водородных связях с остовами ASN-324 и ILE-325, а также с боковым радикалом THR-287.

Так как изучаемая мутация – это замена аспарагиновой кислоты на аспарагин, можно ожидать что водородные связи после неё сохранятся, а в солевых мостках наш остаток участия не принимает.

Воспользуемся инструментом Mutagenesis PyMol. Strain получился 15.93, что очень хорошо, говорит о том что белок нормально отрелаксирует.

Представленность ротамера составила 29.4%, что так же довольно неплохо.

Посмотрим что произошло с водородными связями.

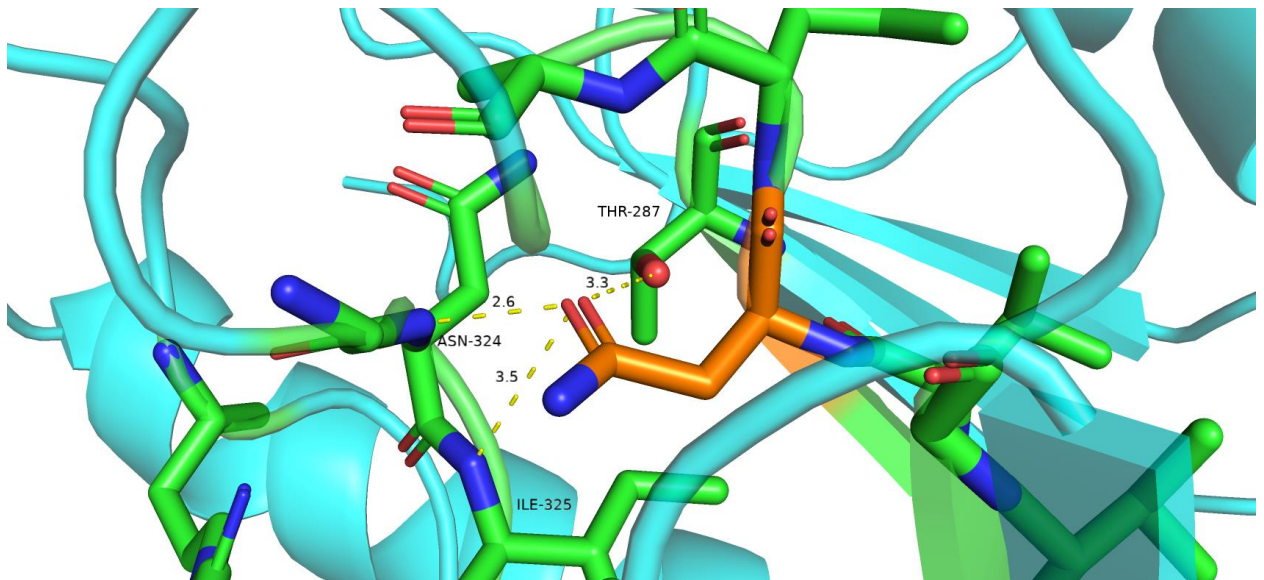


Рисунок 3. Взаимодействия Asn 316, замена произведена при помощи инструмента mutagenesis

Связь с изолейцином 325 выглядит сомнительной, большое расстояние и плохой угол, скорее всего она перестает существовать. Однако связь с соседним аспарагином 324 становится более прочной, вряд ли эти изменения повлекут за собой серьезное изменение в структуре белка. Связь с треонином сохраняется.

На мой взгляд, данная замена не повлияет на функциональные свойства белка, заменяемый остаток расположен вдали от сайтов связывания и его замена на остаток с во многом схожими свойствами не сильно скажется и на структуре белка.

Мутация 2. L245N

Остаток Leu 245 расположен в альфаспирале на окраине белка, судя по структурам 1xlt и 1l7e не участвует в взаимодействии с лигандами и практически не перемещается, поэтому будем рассматривать выбранную изначально структуру 4dio (в ней этому остатку соответствует Leu 274).

Отметим, что в последовательности, соответствующей структурам 1xlt и 1l7e, содержится много мутаций в альфаспирале этого остатка, в том числе сильно меняющих свойства аминокислот (чаще происходила замена гидрофобных аминокислот на гидрофильные) (в том числе заменен он сам), что может свидетельствовать о его невысокой функциональной значимости.

Рассмотрим какие изменения произошли в окружении этого остатка, сравним исходную последовательность и последовательность, соответствующую изучаемой структуре.

В аминокислотах, расположенных в радиусе 5 А от изучаемого остатка замен не было.

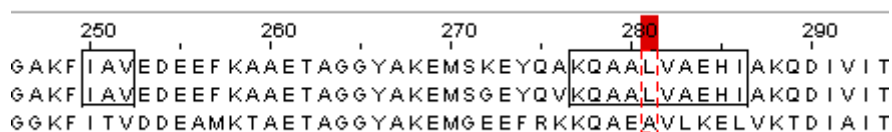


Рисунок 4. Выравнивание, выделены остатки, расположенные в радиусе 5А от того, в который вносится мутация.

Рассмотрим в каких взаимодействиях участвует L 274.

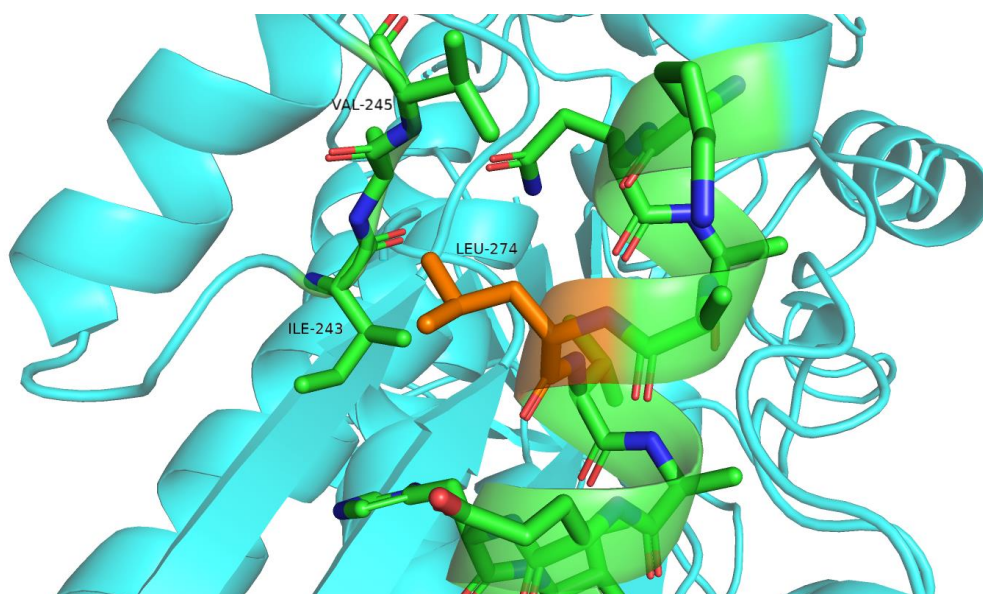


Рисунок 5. Окружение Leu-274

Соседние с ним по спирали остатки образованы полярными аминокислотами, с ними нет взаимодействий, однако в остатках рядом проходящей петли расположены ILE-243 и Val-245, и гидрофобные взаимодействия с ними могут «стягивать» петлю и альфаспираль, удерживая их вместе. В целом, на мой взгляд, расположение в данном месте лейцина не очень комфортно для белка: он расположен на поверхности и может контактировать с водой, много окружающих аминокислот полярные.

Воспользуется инструментом Mutagenesis

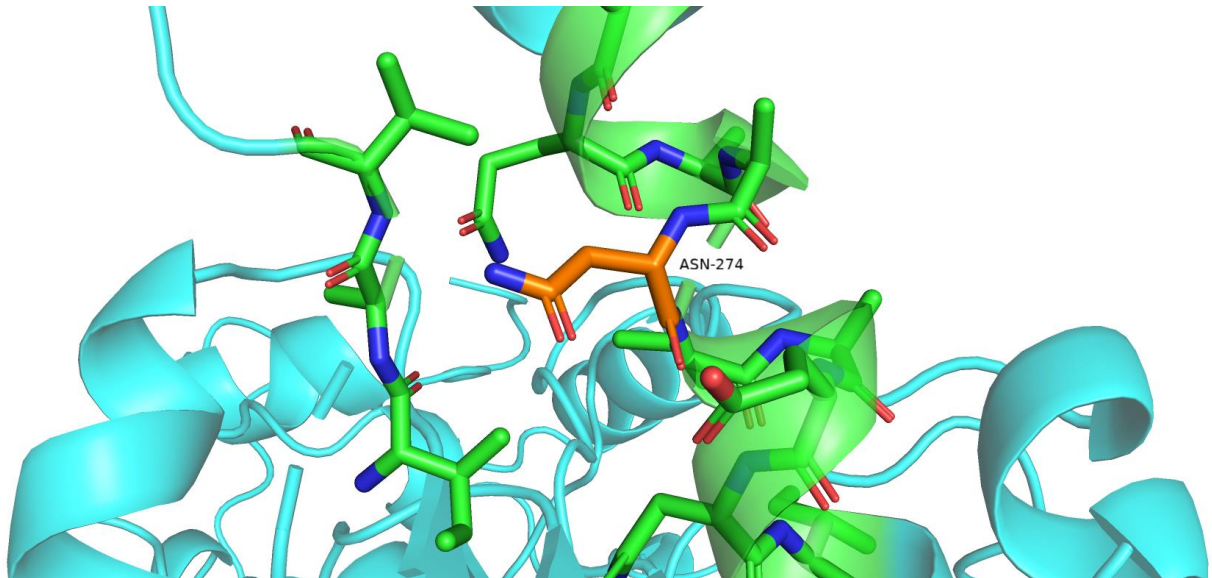


Рисунок 6. Замена Leu274 на Asn274

Strain составил 20.13, что в рамках допустимого, белок скорее всего сможет спокойно отрелаксировать такую замену. Новых связей в результате замены не образовалось, однако на мой взгляд структура альфа-спирали может стать более стабильной, так как теперь для данного остатка будет более комфортным нахождение в полярном окружении. Однако гидрофобные взаимодействия, скреплявшие альфа-спираль и рядом находящуюся петлю были нарушены, что может привести к изменениям в третичной структуре.

В целом на мой взгляд эта мутация скорее нейтральная и не повлияет на функциональные свойства белка, однако возможны негативные последствия вследствие возможных изменений в третичной структуре (но маловероятны так же вследствие далекого расположения данного участка от сайтов связывания лигандов).

Мутация 3. G176N

Данный остаток расположен в сайте связывания субстрата и также в начале одной из альфаспиралей. Поэтому прежде чем изучать его окружение, при помощи структур 1l7d и 1l7e посмотрим, как меняется его положение в результате связывания субстрата. В структуре 4dio данному остатку соответствует Gly 205, в структурах 1l7d и 1l7e – Gly 981 (такое большое значение объясняется тем, что для этих структур была рассмотрена цепь C – она лучше выровнялась с структурой из 4dio), в структуре 1xlt – 181.

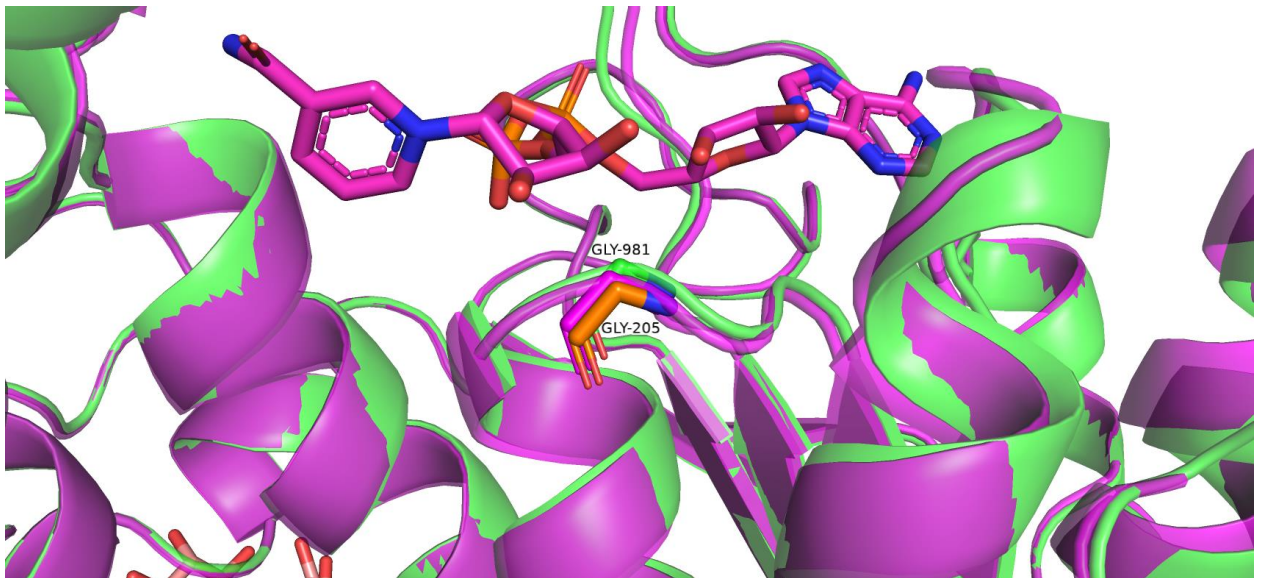


Рисунок 7. Изменение положения изучаемого остатка при связывании с субстратом, оранжевым изображен остаток из структуры 4dio, фиолетовым - из 1l7e (связанная форма), зеленым - из 1l7d (свободная форма)

Как мы видим, остаток мало меняет свое положение, поэтому возможно для его изучения стоит использовать структуру, в которой белок связан с лигандом. Однако сперва оценим, насколько её последовательность в окружении изучаемого остатка отличается от последовательности нашего белка.

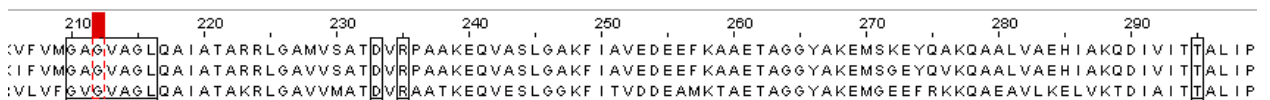


Рисунок 8. Выравнивание, выделены остатки, расположенные в радиусе 5Å от того, в который вносится мутация.

Как мы видим, все остатки, лежащие вблизи изучаемого, не изменяются. Я рассматриваю две связанные с субстратом структуры: 1xlt и 1l7e, для изучения я решил взять 1xlt, так как на мой взгляд он лучше отображает взаимодействия с субстратом в изучаемой области (в 1l7e например наблюдается клэш между субстратом и Arg 1004).

Так как нас будет интересовать влияние на связывание НАД, проверим, не изменились ли другие остатки, участвующие в его связывании (лежащие дальше 5Å от нашего лиганда:

```

      |           |           |           |
      160       170       175       180
MELMPRIITRAQSMQVLSSQ
MELMPRIITRAQSMQVLSSQ
MELMPRISRQSMQILSSQ

```

Рисунок 9. Выравнивание. Выделены остатки, не рассмотренные ранее, которые играют важную роль в связывании NAD

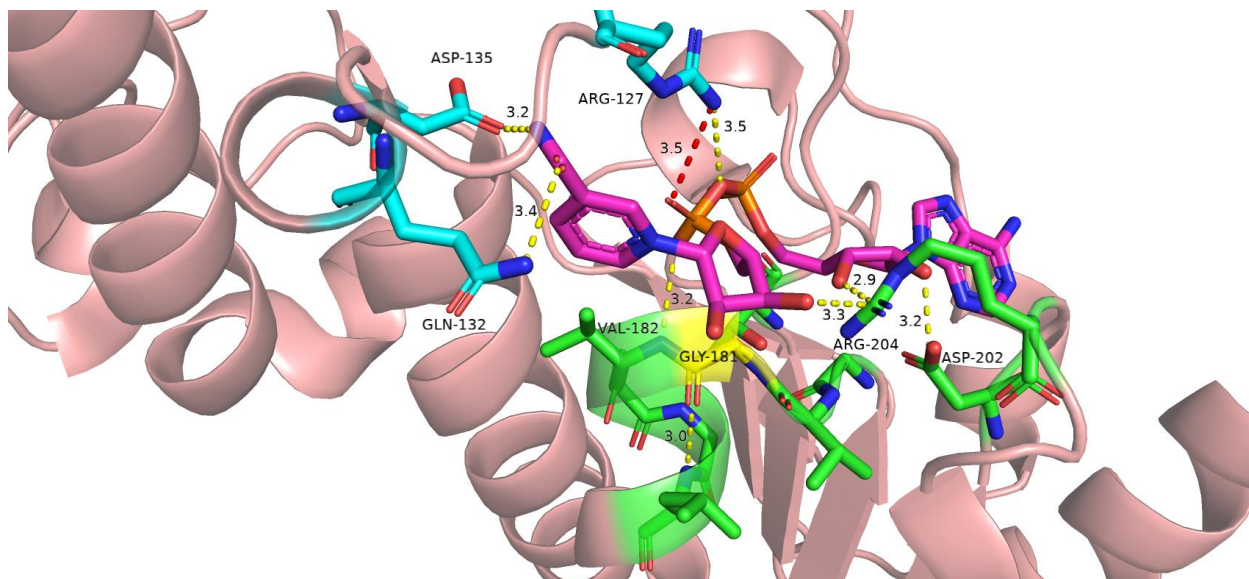


Рисунок 10. Взаимодействия, связывающие NAD. Зеленым отображены остатки в радиусе 5 Å от изучаемого, желтым – остаток в который вносится мутация, цианом – другие остатки, играющие роль в связывании NAD. Желтым отображены водородные связи, красным – солевой мостик

Исследуемый остаток образует 1 водородную связь с лейцином 185, начиная альфа-спираль, с NAD он не взаимодействует.

Воспользуемся инструментом Mutagenesis.

Изначально strain вышел равным 30.59, что выше допустимых значений.

Далее я воспользовался инструментом Sculpting, а затем снова mutagenesis, чтобы подобрать наилучший ротамер, на этот раз Strain составил 18.96, что говорит о том, что ротамер достаточно хорошо вписывается в структуру.

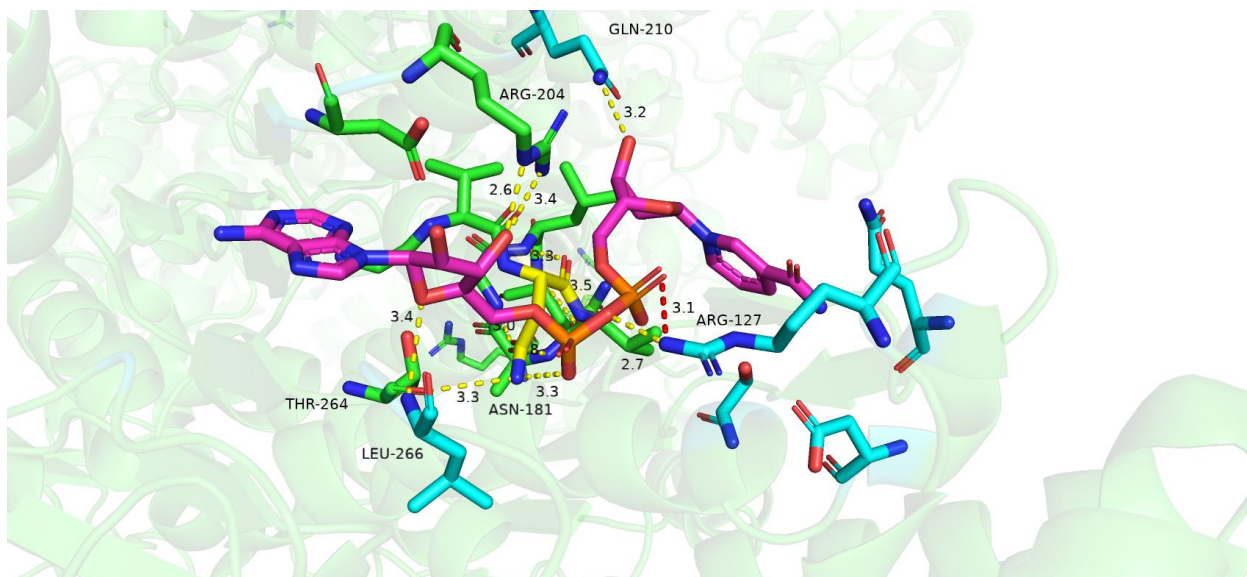


Рисунок 11. Взаимодействия, связывающие NAD после внесения мутации

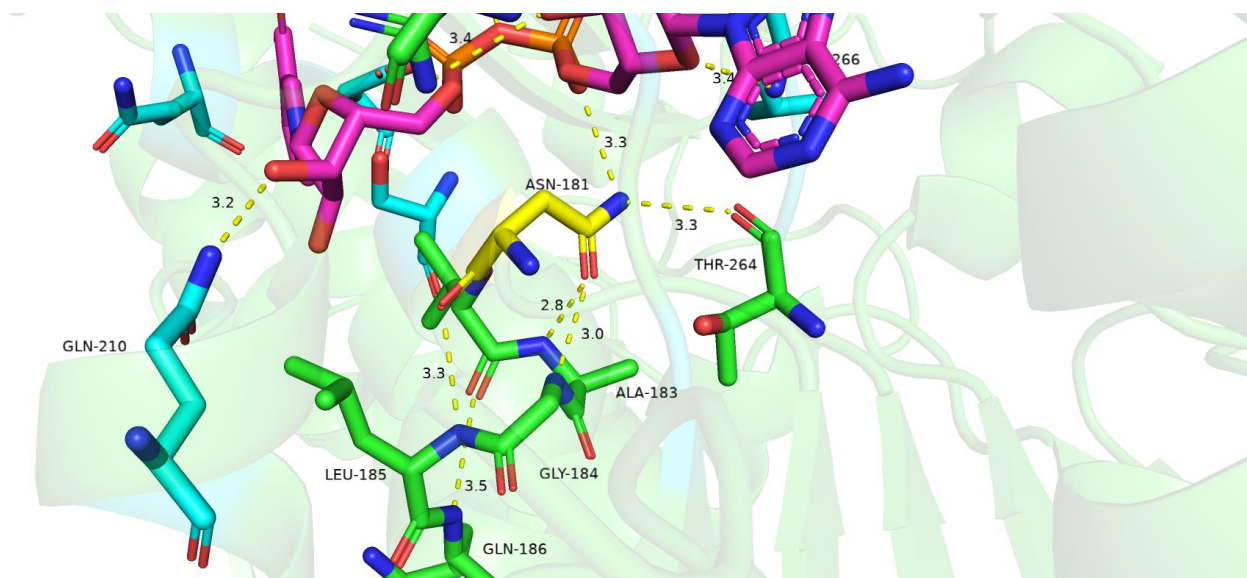


Рисунок 12. Взаимодействия, стабилизирующие измененный остаток после внесения мутации.

Получившийся ASN-181 образует 5 водородных связей, что будет стабилизировать новообразованную структуру. Одной связью его остов участвует в образовании альфа-спирали, хотя на мой взгляд эта связь стает слабее – угол становится менее комфортным и увеличивается её длина, в целом конец этой альфаспиральи станет более напряженным. Также боковая цепь мутировавшего остатка будет иметь 2 связи с остовом спирали – с глутамином 186 и лейцином 185, одну связь с треонином 264 из другой цепи и одну связь с NAD. В целом получившаяся структура выглядит стабильной.

Рассмотрим как изменились взаимодействия, связывающие NAD (рисунок 11).

Взаимодействие с аргинином 127 стало более прочным, уменьшились длины связей.

Изменились остатки, которые связывают ОН-группы рибозы, однако они на мой взгляд по-прежнему остались достаточно хорошо связаны.

Также изменились связи с фосфатами, усилились связи аргинина 127, распалась водородная связь с валином 182, но образовалась с аспарагином 181. На мой взгляд, качество связывания NAD сильно не поменяется.

Однако произошли изменения в положении кольца никотинамида – его развернуло, и в итоге распались фиксирующие его положение водородные связи, что плохо для фермента, так как именно кольцо никотинамида участвует в реакции.

В результате этой мутации, на мой взгляд, фермент сохранит стабильную структуру, однако у него сильно вырастет непродуктивное связывание, NAD будет вступать в взаимодействие с белком, однако это реже будет приводить к прохождению реакции, таким образом это на мой взгляд скорее негативная мутация.