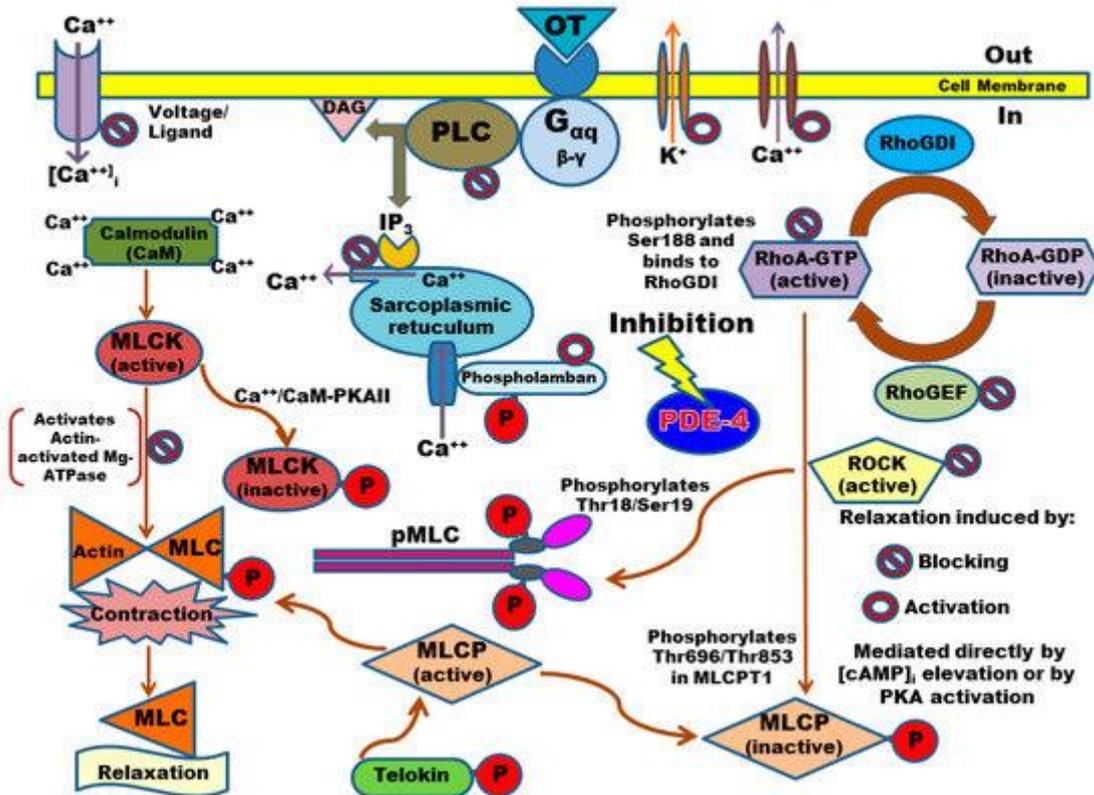


## Вступление:

Мутации в белках, в частности – ферментах, могут приводить к разным последствиям. Мера и качество этих последствий зависят от структурной локализации мутации. Вполне возможно, что мутация никак не повлияет на фермент – например, синонимичная замена остатка на поверхности глобулы. Возможно, мутация повлияет на функцию фермента – увеличит функциональность, ослабит функцию или вообще сделает ее невозможной. Последний случай очевидно негативный, такие мутации будут эффективно отсеиваться отбором. На функциональность влияют мутации в каталитическом центре и в воротах фермента. Кроме того, возможно влияние мутаций на стабильность структуры фермента, что может реализоваться в процессе фолдинга. Например, гидрофильная мутация в гидрофобном ядре дестабилизирует укладку белка. Таким образом, если стоит задача предсказать влияние одиночной мутации на фермент, в первую очередь нужно обратить внимание на расположение остатка.

Передо мной стоит задача предсказать влияние 3 мутаций (A17L, F32Y, D122N) на белок, заданный идентификатором Uniprot **G1T567**. Это белок **Ras homolog family member A (a.k.a. RhoA)** из кролика (*Oryctolagus cuniculus*). Uniprot сообщает, что у белка наблюдается ГТФазная активность. Миозин-связывающая активность вызвала у меня сомнения - RhoA действительно участвует в регуляции цитоскелета и механизмы этого исследованы достаточно хорошо, однако никаких данных о прямом влиянии на миозин я не нашла.

ГТФазная функция RhoA необходима для функции регуляции цитоскелета. Известно, что регуляция реализуется через сигнальные каскады, и одним из посредников является белок ROCK, активируемый RhoA и осуществляющий кинирование легкой цепи миозина. RhoA может обратимо ингибироваться RhoGDIs (Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitors - ингибируют замену GDP на GTP) и активироваться RhoGEFs (Rho-guanine nucleotide exchange factors - стимулируют замену GDP на GTP). [1]



Согласно данным из статей, важными для осуществления гидролиза GTP остатками являются Gly14, Thr19, Phe30 и Gln63. Эти остатки консервативны у белков семейства Rho. [2]

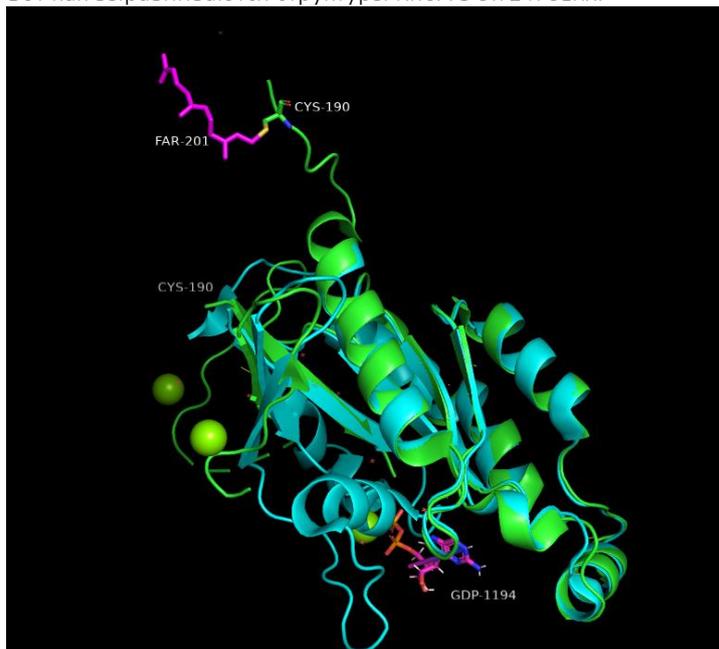
	Activation Dominant Negative (G-V) (T-N)		Fast Cycling (F-L)	Toxin B
	14	19	30	37
			Switch 1	
RhoA	MAAIRKKLVIVGD	GACGK	CLLIVFSKDQ	FPEVYVPTVFE
RhoB	MAAIRKKLVVVG	GACGK	CLLIVFSKDE	FPEVYVPTVFE
RhoC	MAAIRKKLVIVGD	GACGK	CLLIVFSKDQ	FPEVYVPTVFE
	C3 Transferase		Activation + CNF-1 (Q-L)	
	41	63	Switch 2	
RhoA	NYVADIEVDGKQVELALWDTAG	Q	EDYDRLRPLSYPD	TDVI
RhoB	NYVADIEVDGKQVELALWDTAG	Q	EDYDRLRPLSYPD	TDVI
RhoC	NYIADIEVDGKQVELALWDTAG	Q	EDYDRLRPLSYPD	TDVI

Из Uniprot вела прямая ссылка на список структур pdb, описывающих белок RhoA – их оказалось 48. Я обратила внимание на несколько структур.

**5fr1** – структура, содержащая лиганды GDP (субстрат, который не может покинуть место связывания) и Mg (ион металла, координирующий 2 терминальных фосфата GTP). Белок RhoA находится в комплексе с RhoGDI, то есть в ингибированном виде. Я не стала брать эту структуру, потому что мне хотелось найти активную форму, по возможности связанную с субстратом – GTP.

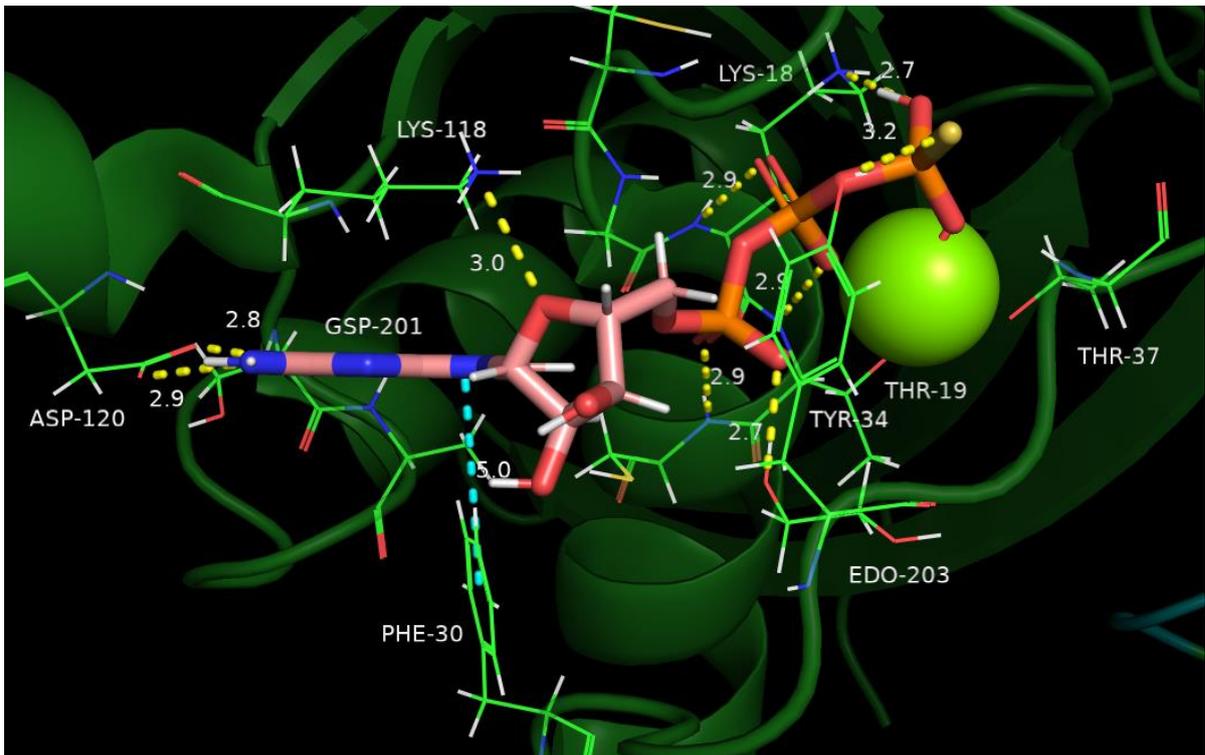
**5zhx** – структура не очень хорошего качества. RhoA находится в комплексе с SmgGDS, обладающим двумя функциями - RhoGEF и шаперон малых ГТФаз. В структуре многие фрагменты (в том числе Р-петля, связывающая GTP) разрешены очень плохо, использовать ее нельзя. Но мое внимание обратила модификация фарнезилирования – у RhoA была такая модификация по С-терминальному остатку цистеина. Оказалось, что пренилирование позволяет ГТФазе заякориться в мембране, что необходимо для регуляции ей клеточного роста и организации цитоскелета. [\[2\]](#)

Вот как выравниваются структуры RhoA в 5fr1 и 5zhx.



**6bcb** – содержит лигандом аналог ГТФ (то же, но в краевом фосфате один атом O заменен на S), RhoA находится в комплексе с p114RhoGEF. Структура хорошего качества, ее можно использовать для рассмотрения влияния единичных мутаций. Это структура RhoA человека, по сути не отличающаяся от рассматриваемой кроличьей.

Посмотрим на связи, координирующие аналог субстрата.



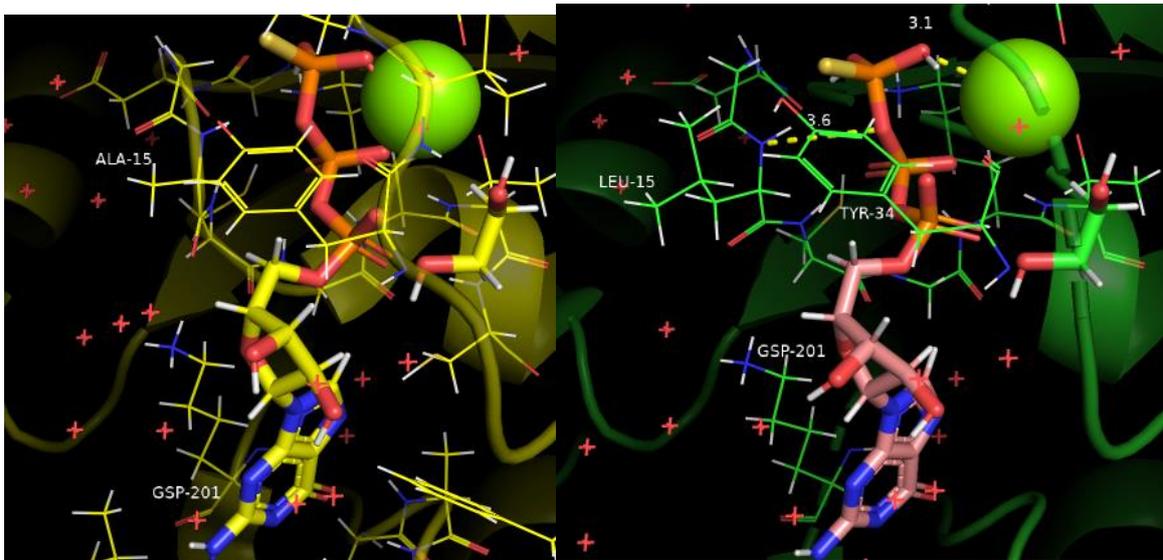
Т.о: нуклеотидную часть координируют Phe30 и Asp120. Гликозидную - Lys118. Фосфатную - Tyr34, Lys18 и куча остовных связей. Mg белка координируется двумя остатками Thr (19 и 37). Кроме того, к одному из фосфатов прилип этиленгликоль. В данном случае он налип, потому что является растворителем и было свободное место для налипания. Зачем это место нужно? – Очевидно, это пространство для воды, которая необходима для проведения гидролиза GTP.

При просмотре возможных мутаций была обнаружена ошибка: нумерация остатков данного идентификатора UniProt смещена на 2 вперед. Нумерация же между данным ID и структурой b6cb совпадает. Таким образом, рассматриваем остатки на 2 раньше, чем предложено.

## Мутации

### 1. A15L

Остаток аланина взаимодействует с GSP атомом остова. Радикал же просто заполняет пустоту. Я провела мутагенез и скалпинг – структура почти не поменялась. Замена аланина на лейцин не влияет почти ни на что. Гидрофобный радикал лейцина может немного смещаться, но на координирование лиганда остатками это никак не влияет. Т.о.: отсутствие влияния на функциональную способность как ГТФазы, отсутствие влияния на стабильность.

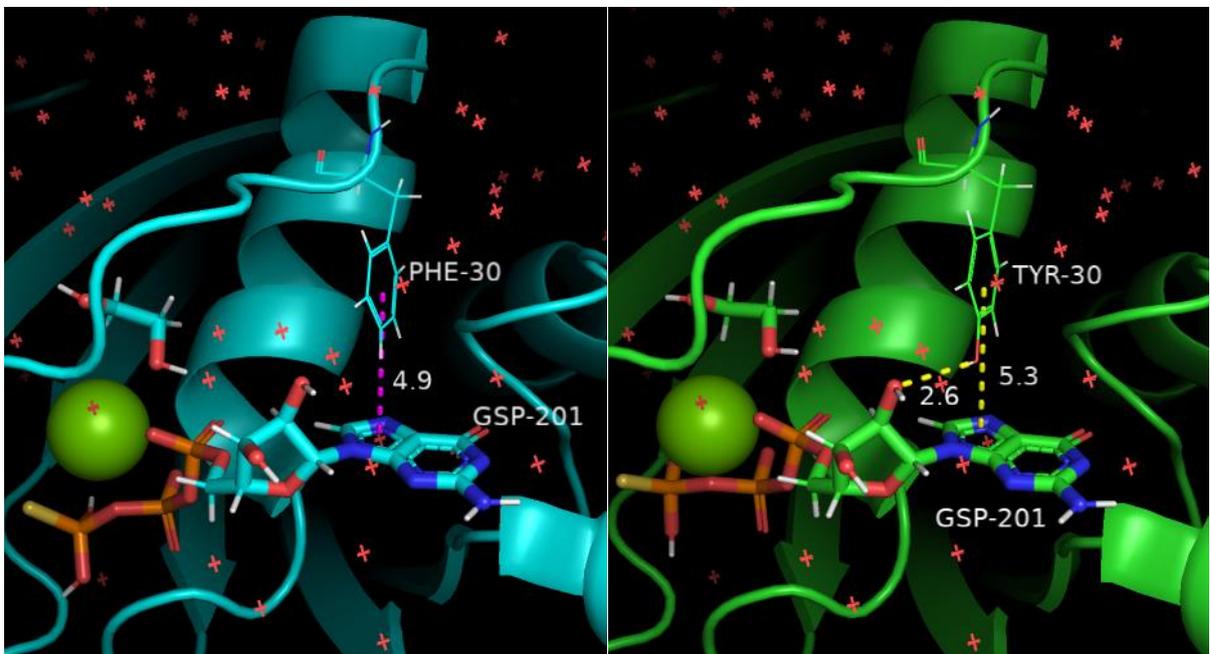


## 2. F30Y

Про то, что этот остаток каталитический и очень консервативный, было сказано раньше. Остаток стабилизирует GTP посредством т-стекинга. Видимо, мутация фатальна для функции.

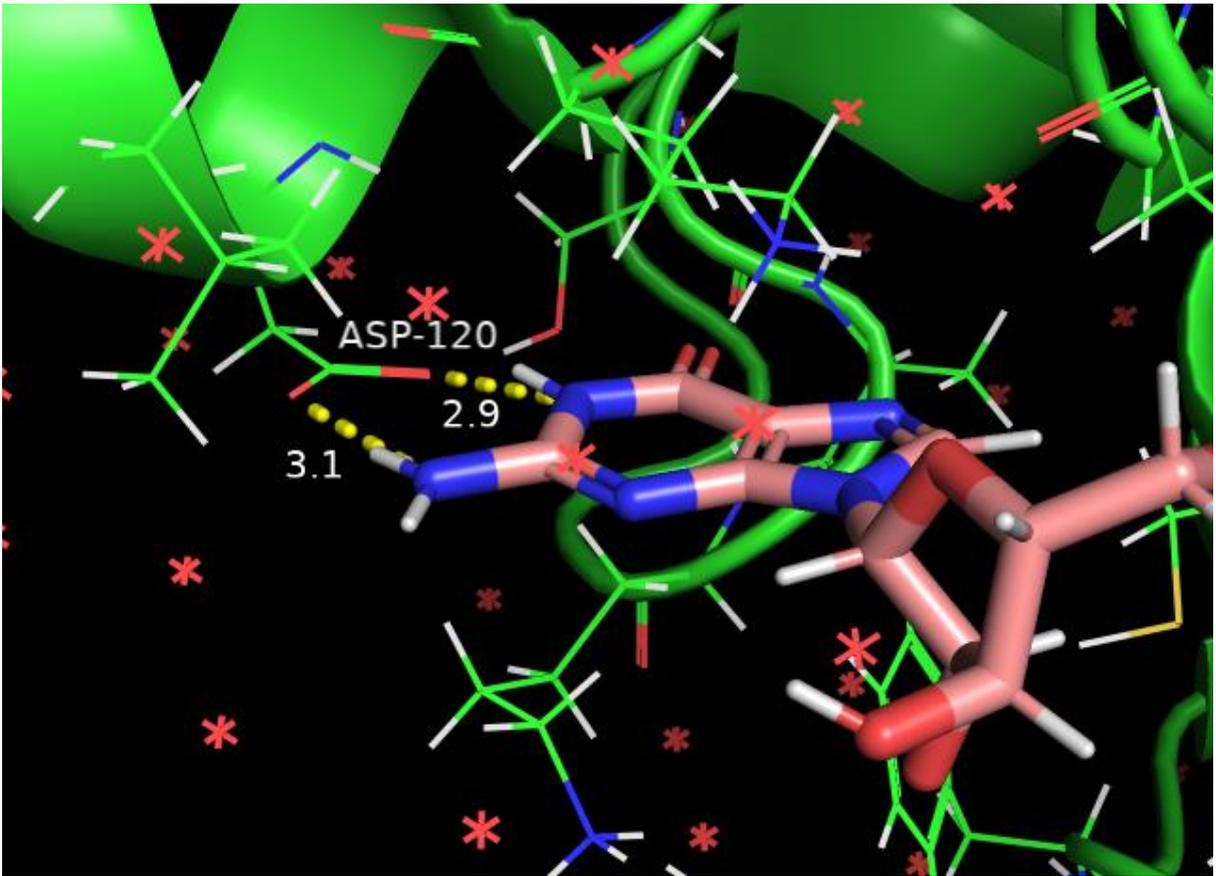
Действительно, при замене фенилаланина на тирозин кислород оттягивает на себя электронную плотность кольца и тем самым делает т-стекинговое взаимодействие невозможным. Таким образом, не работает ключевое взаимодействие, координирующее гуаниновое основание. Кроме того, тирозин может образовать водородную связь с атомом кислорода сахара, оттягивая его на себя и смещая положение лиганда, что тоже негативно может влиять на функцию.

Т.о., замена негативная, убивает функцию, не влияя на структуру.



## 3. D120N

Остаток аспартата находится в каталитическом сайте, он стабилизирует гуаниновое основание двумя водородными связями.



Замена аспартата на аспарагин приведет к тому, что на одной из 2 линий водородных связей возникнет напряжение – там появится еще один водород, что вызывает clash. Это сильно дестабилизирует положение GTP в кармане связывания и, как следствие, нарушает ГТФазную функцию.