

Структурная биоинформатика

Практикум 9. Структура и функция.

Поддьяков Иван

Введение	2
Замена 1	3
Замена 2	4
Замена 3	5
Приложение	8

Введение

В данном практикуме необходимо изучить, как конкретная мутация может повлиять на структуру и функцию белка. Мне предложено работать с последовательностью [A0A286XXM8](#). Это ген рецептора нейротензина 1 морской свинки. Данный рецептор взаимодействует с G-белком и в его функции входит, в том числе, сигнал о начале апоптоза. Белок является мембранным, с 7 трансмембранными спиральями.

Так как структуры белка с данной последовательностью получено не было, я попробовал найти структуры гомологичных последовательностей с помощью blastr против базы данных PDB. Находки с лучшей идентичностью представлены на Рисунке 1. Для работы я выбрал структуру [6OS9](#) (Крио-ЭМ, 3.00 Å) человеческого рецептора нейротензина 1, так как последовательности гена крысы имеют в интересующей позиции 333 фенилаланин, а не тирозин (выравнивание на Рисунке S1). Другие находки либо имеют мутации и довески для выделения методом PCA, либо имеют недостаточное разрешение.

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	neurotensin receptor and arrestin2 complex [Homo sapiens]	Homo sapiens	600	600	79%	0.0	90.42%	334	6UP7_R
✓	A complex structure of arrestin-2 bound to neurotensin receptor 1 [Homo sapiens]	Homo sapiens	664	664	88%	0.0	89.73%	370	6PWC_R
✓	human Neurotensin Receptor 1 (hNTR1) - Gi1 Protein Complex in canonical conformation (C state) [Homo sapiens]	Homo sapiens	682	682	94%	0.0	88.72%	435	6OS9_R
✓	STRUCTURE OF CONSTITUTIVELY ACTIVE NEUROTENSIN RECEPTOR [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	392	590	81%	5e-133	88.31%	513	5T04_A
✓	The crystal structure of the neurotensin receptor NTS1 in complex with neurotensin (8-13) [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	390	580	80%	3e-132	87.88%	510	4GRV_A
✓	Chain C, Neurotensin receptor type 1 [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	556	556	80%	0.0	85.50%	336	7L0P_C
✓	Structure of Thermostable Agonist-bound Neurotensin Receptor 1 Mutant without Lysozyme Fusion [Rattus norvegi...	Rattus norvegicus	553	553	81%	0.0	84.48%	338	3ZEV_A
✓	High Resolution Structure of Thermostable Agonist-bound Neurotensin Receptor 1 Mutant without Lysozyme Fusion...	Rattus norvegicus	553	553	81%	0.0	84.48%	335	4BUO_A
✓	Structure of active-like neurotensin receptor [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	603	603	84%	0.0	84.40%	541	4XEE_A
✓	Structure of active-like neurotensin receptor [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	601	601	84%	0.0	84.12%	541	4XES_A
✓	Structure of Evolved Agonist-bound Neurotensin Receptor 1 Mutant without Lysozyme Fusion [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	531	531	80%	0.0	80.66%	338	4BWB_A
✓	High Resolution Structure of Evolved Agonist-bound Neurotensin Receptor 1 Mutant without Lysozyme Fusion [Ratt...	Rattus norvegicus	523	523	80%	0.0	79.76%	338	4BVO_A
✓	Chain AAA, Neurotensin receptor type 1, DARPin HRV 3C protease recognition sequence, [synthetic construct]	synthetic construct	508	508	83%	8e-179	75.58%	482	6Z4S_AAA
✓	Chain AAA, Neurotensin receptor type 1, Neurotensin receptor type 1, DARPin crystallisation chaperone, [synthetic c...	synthetic construct	501	501	83%	4e-176	74.42%	482	6YVR_AAA
✓	Chain R, Soluble cytochrome b562 [Homo sapiens]	Homo sapiens	176	176	73%	2e-48	36.39%	661	7FY9_R

Рисунок 1. Protein blast [A0A286XXM8](#) против PDB.

Замена 1

Предположим, как может отразиться на рецепторе замена лейцина-198 на аргинин. Данная аминокислота в структуре имеет тот же номер, что и в изначальной последовательности. Я провел такую замену в PyMol, отрелаксировал структуру с помощью инструмента sculpting. Лучшее положение аргинина представлено на Рисунке 2; strain 15.38, представленность ротамера 3.4 %, возможна водородная связь с остовом. Данная замена существенно не меняет положение соседних остатков, не нарушает структуру α -спирали. Однако существует другая причина, которая делает такую замену пагубной. Данная аминокислота обращена в сторону внешней среды, а в мембране она будет обращена в липидный бислой, который гидрофобен. Мне кажется, такая замена может легко нарушить процесс упаковки белка в мембрану, вывернуть этот участок в раствор, образовав водородные связи с водой, или вступить во взаимодействие с отрицательно заряженным фосфатом фосфолипида.

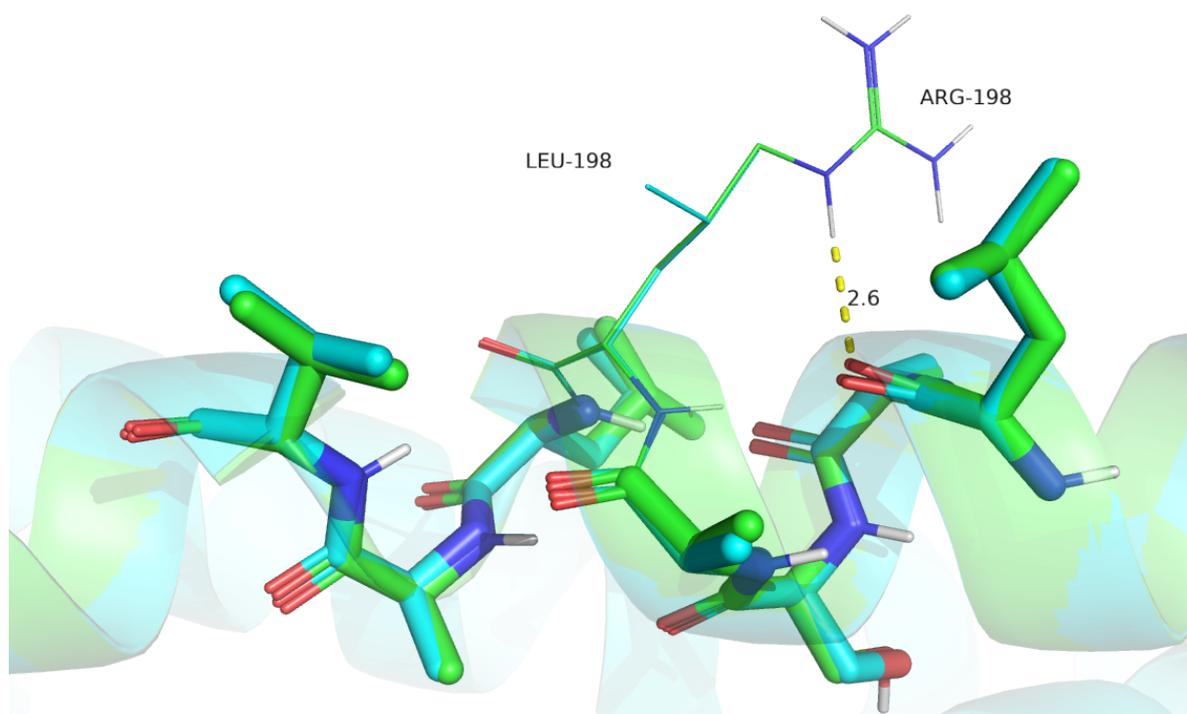


Рисунок 2. Замена L198R. Синим - изначальная структура, зеленым - измененная.

Замена 2

Рассмотрим другую замену - пролина-248 на глицин. Данный участок также находится в α -спирали (вообще, пролин разрывает ход этой спирали, так как кислород серина-244 не может образовать водородную связь с азотом иминоксилоты). Я также провел замену на глицин, релаксировал структуру вокруг СА атома. Изменения в положении остатков незначительны. Однако теперь частично исчезает гидрофобный эффект (например с фенилаланином-312), удерживающий α -спирали вместе, а кислород серина-244 сможет образовать водородную связь с азотом глицина, что восстановит ход спирали на данном участке и сместит ее относительно соседей. Возможно, это изменит и положение цепей, находящихся в растворе. Мне кажется, такая замена нарушит структуру рецептора.

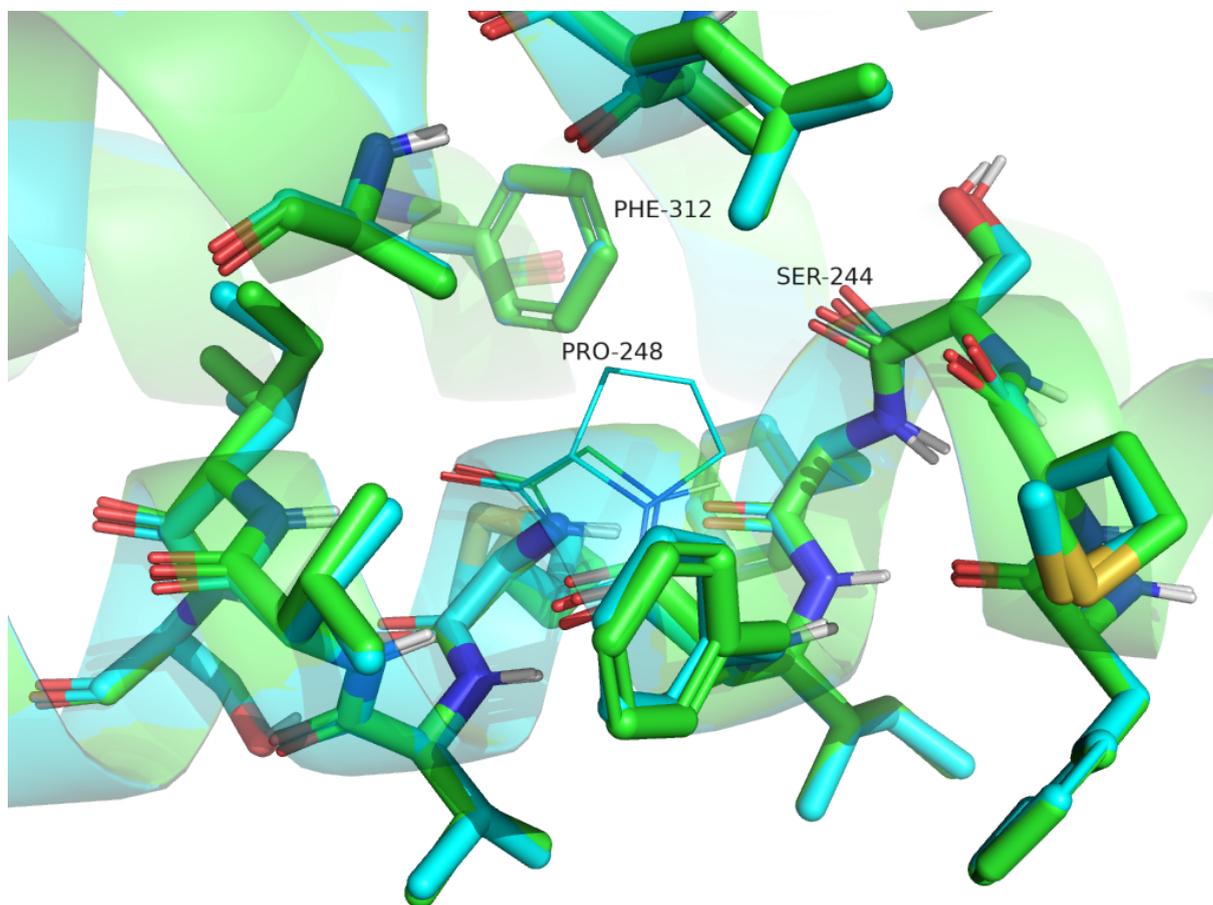


Рисунок 3. Замена P248G. Синим - изначальная структура, зеленым - измененная.

Замена 3

Рассмотрим замену тирозина-333 на аланин в участке узнавания нейротензина. В выбранной структуре это остаток имеет номер 339 из-за “вставки” в человеческом гене. Сначала я немного повернул тирозин относительно связи СА-СВ, чтобы продемонстрировать возможную водородную связь с остовом аспартата-55. На Рисунке 4 представлено положение тирозина-339 и его возможная водородная связь с аспаргатом, а также π -стекинг с азотом нейротензина (на самом деле в данной структуре приведен синтетический аналог). Далее я произвел замену на аланин и отрелаксировал соседние остатки.

Измененная модель представлена на Рисунке 5 и крупным планом на Рисунке 6. Аланин не имеет ротамеров боковой группы, так что его положение можно предположить однозначно. После релаксации положение соседних остатков изменилось незначительно. Разумеется, после такой замены невозможно удержание нейротензина указанным стекингом. Я думаю, такая мутация нарушит связывание этого лиганда рецептором.

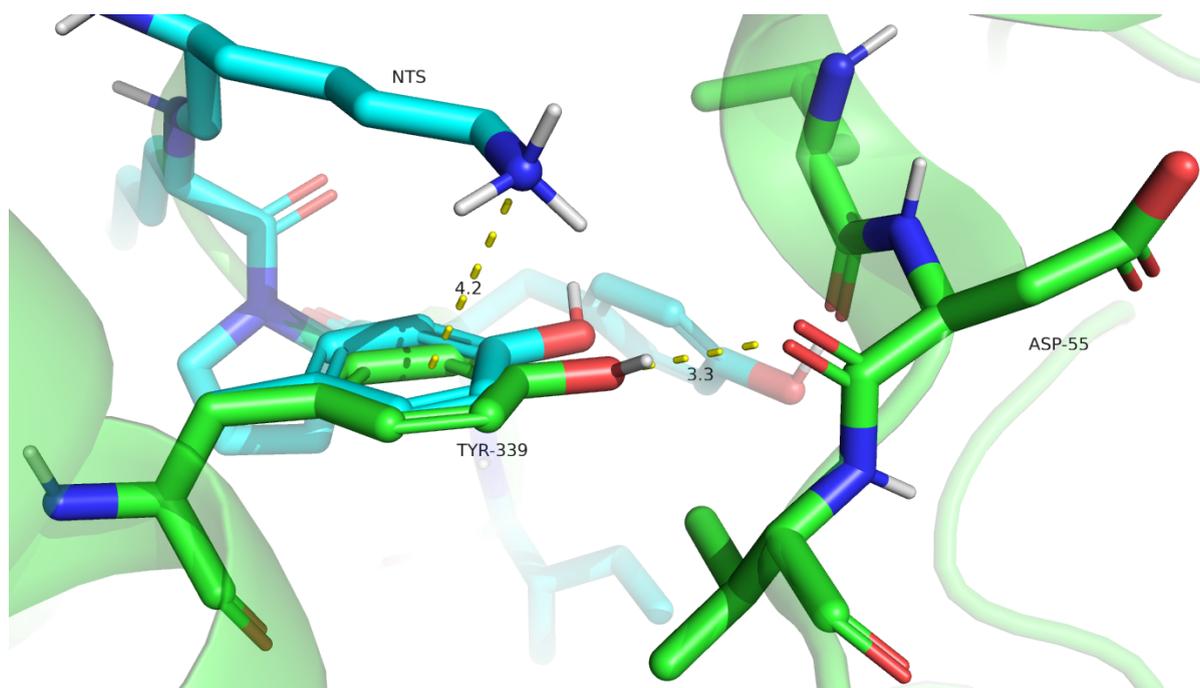


Рисунок 4. Положение Y339. Синим - изначальная структура, зеленым - измененная.

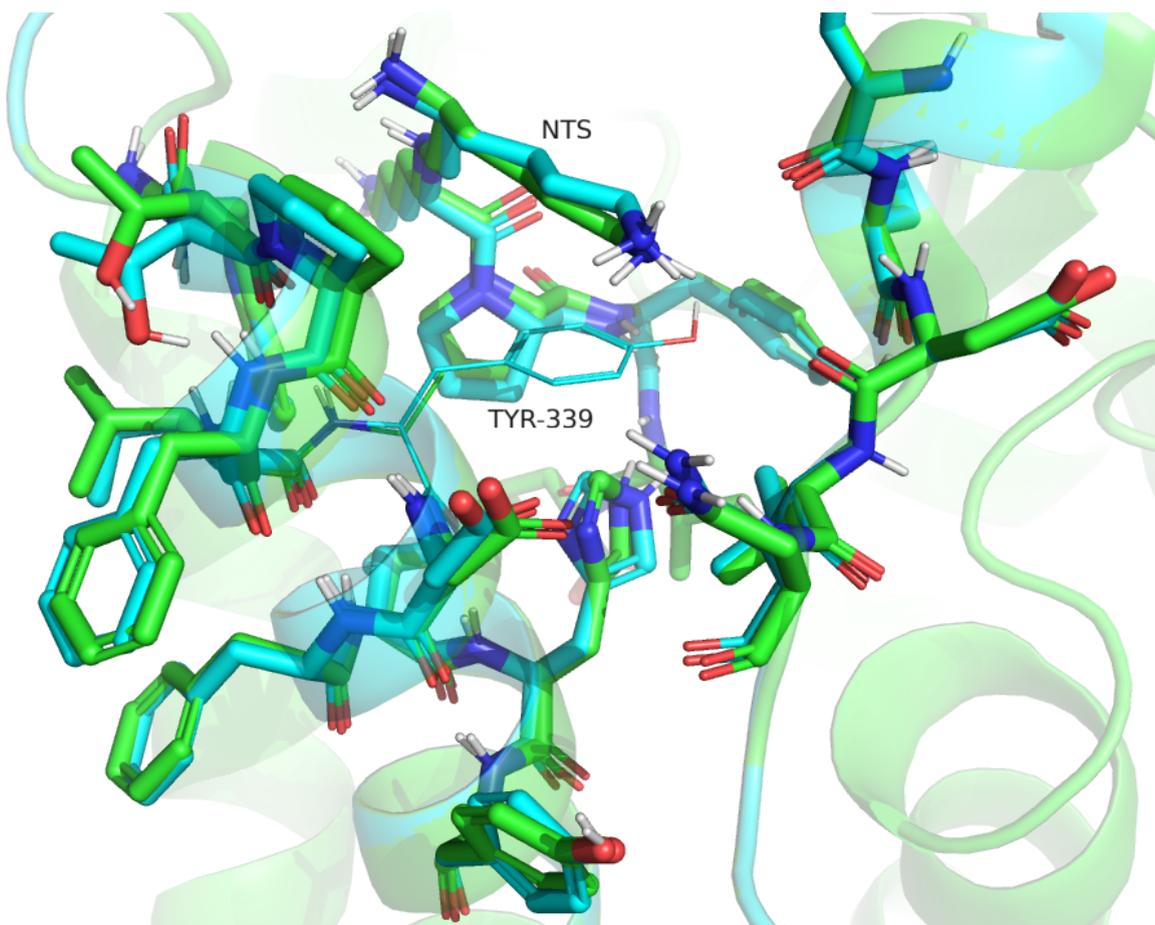


Рисунок 5. Замена Y339A. Синим - изначальная структура, зеленым - измененная.

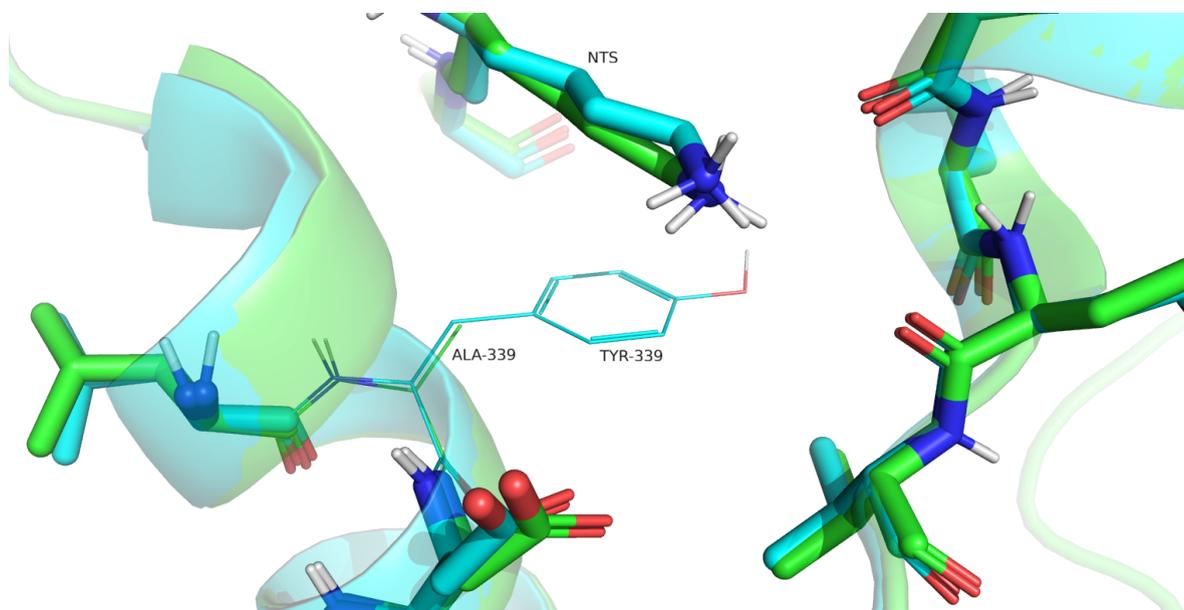


Рисунок 6. Замена Y339A. Синим - изначальная структура, зеленым - измененная.

Также я счел необходимым продемонстрировать взаимодействие на данном участке с натуральным нейротензином. Структура с таким лигандом среди лучших хитов blastp нашлась только для гена (выравнивание на Рисунке S2) серой крысы - [4XES](#) (РСА, 2.60 Å). Тирозин в данном гене заменен на фенилаланин. Последовательность медиаторного участка нейротензина (NTS) [крысы](#) совпадает с таковой у [человека](#), вместо лизинов в аналоге NTS из 6OS9 - аргинины. На Рисунке 7 приведено взаимодействие фенилаланина-344 с аргинином NTS за счет π -стекинга. Если рассматривать замену этого остатка на аланин, то взаимодействие также пропадет. Это подтверждает мой вывод касательно взаимодействия с аналогом NTS.

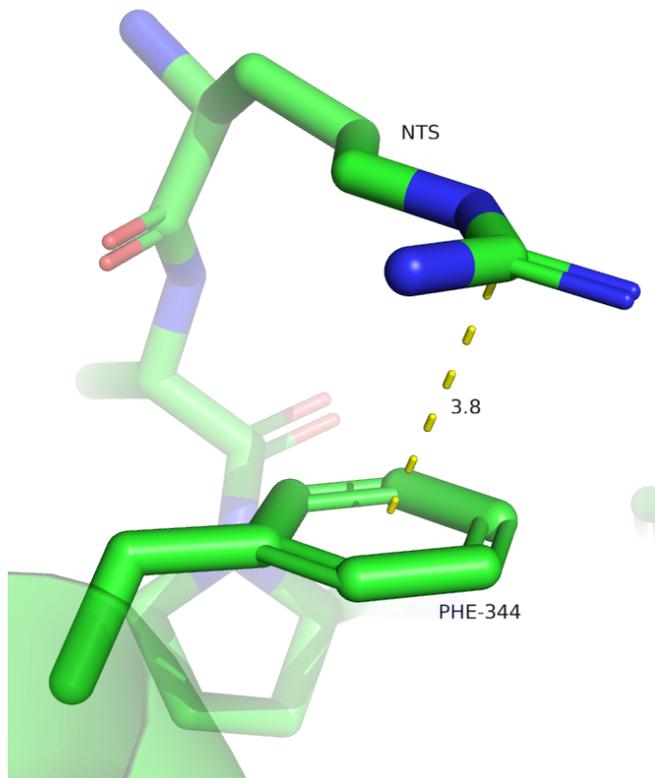


Рисунок 7. Стекинг фенилаланина и гуанидиновой группы аргинина в нейротензине.

Приложение

human Neurotensin Receptor 1 (hNTSR1) - G11 Protein Complex in non-canonical conformation (NC state) [Homo sapiens]

Sequence ID: [60SA_R](#)

Range 1: 43 to 428 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
682 bits(1761)	0.0	Compositional matrix adjust.	346/390(89%)	359/390(92%)	4/390(1%)
Query 23		QAGLEAALLAQGFANGSGNASEPILEAPSSSELDVNTDIYSKVLVTAVYLALFVVGVMVGN			82
Sbjct 43		QAGLE ALLA GF N SGNASE +L APSSSELDVNTDIYSKVLVTAVYLALFVVG VGN+			102
Query 83		QAGLEEALLAPGFGNASGNASERVLAAPSSSELDVNTDIYSKVLVTAVYLALFVVGTVGNT			
Sbjct 103		VTFTLARKKSLQSLQSTVHYHLGSLALSDDLILLAMPVELYNFIWVHPWAFGDAVCR			142
Query 143		VT FTLARKKSLQSLQSTVHYHLGSLALSDDL LLLAMPVELYNFIWVHPWAFGDA CR			
Sbjct 163		VTLFTLARKKSLQSLQSTVHYHLGSLALSDDL TLLAMPVELYNFIWVHPWAFGDAGCR			162
Query 203		GYFFLRDACTYATALNVASLSVERYLAICHPFKAKTLMRSRRTKKFISAIWLASGLLAVP			202
Sbjct 223		GYFFLRDACTYATALNVASLSVERYLAICHPFKAKTLMRSRRTKKFISAIWLAS LLAVP			222
Query 263		GYFFLRDACTYATALNVASLSVERYLAICHPFKAKTLMRSRRTKKFISAIWLASALLAVP			
Sbjct 283		MLFTMGQQNRSADGQHPGGLVCTPTVDTATVKVVIQVNTFTSFVFPMMVISVLTNTVIANK			262
Query 323		MLFTMG+QNRSDAGQH GGLVCTPT+ TATVKVVIQVNTF SF+FPMVVISVLTNT+IANK			
Sbjct 339		MLFTMGQNRSDAGQHAGGLVCTPTIHTATVKVVIQVNTFMSFIFPMVVISVLTNTIANK			282
Query 383		LTIMVRQAAEQGTQPFTGFSMSIEPGRIQALRHGVHVLRAVVAFVVCWLPYHVRRLMFCY			322
Sbjct 399		LT+MVRQAAEQG Q T PGR+QALRHGV VLRAVV+AFVVCWLPYHVRRLMFCY			
Query 412		LTVMVRQAAEQG-QVCTVG---GPRVQALRHGVRLRAVVIAFVVCWLPYHVRRLMFCY			338
Query 428		ISTEQWTPFLYDFYHYFYMLTNTLFYVSSTINPILYNLVSANFRQIFLSTLACLCPVWRR			382
Sbjct 428		IS EQWTPFLYDFYHYFYM+TN LFYVSSTINPILYNLVSANFR IFL+TLACLCPVWRR			
Query 428		ISDEQWTPFLYDFYHYFYMTNALFYVSSTINPILYNLVSANFRHIFLATLACLCPVWRR			398
Query 428		RRKRPFGRKTSVSSNHGFSSTATRETLY			412
Sbjct 428		RRKRPFGRKTSVSSNHGFSSTATRETLY			412
Query 428		RRKRPFGRKTSVSSNHGFSSTATRETLY			412
Sbjct 428		RRKRPFGRKTSVSSNHGFSSTATRETLY			412

Рисунок S1. Выравнивание [A0A286XXM8](#) с последовательностью из 60S9.

Structure of active-like neurotensin receptor [Rattus norvegicus]

Sequence ID: [4XES_A](#) Length: 541 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 364 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
601 bits(1549)	0.0	Compositional matrix adjust.	302/359(84%)	320/359(89%)	10/359(2%)
Query 37		NGSGNASEPILEAPSSSELDVNTDIYSKVLVTAVYLALFVVGVMVGN SVTFTLARKKSLQ			96
Sbjct 6		+ + + SE P+S+LDVNTDIYSKVLVTA+YLALFVVG VGNSVT FTLARKKSLQ			65
Query 97		DDATSTSESDTAGPNSDLDVNTDIYSKVLVTAIYLALFVVGTVGNSVTLFTLARKKSLQ			
Sbjct 66		LQSTVHYHLGSLALSDDLILLAMPVELYNFIWVHPWAFGDAVCRGYYFLRDACTYATA			156
Query 157		LQSTVHYHLGSLALSDDLILLAMPVELYNFIWVHPWAFGDA CRGYYFLRDACTYATA			
Sbjct 126		LQSTVHYHLGSLALSDDLILLAMPVELYNFIWVHPWAFGDAGCRGYYFLRDACTYATA			125
Query 217		LNVASLSVERYLAICHPFKAKTLMRSRRTKKFISAIWLASGLLAVPMLFTMGQQNRSADG			216
Sbjct 186		LNVASLSV RYLAICHPFKAKTLMRSRRTKKFISAIWLAS LLA+PMLFTMG QNRSADG			185
Query 276		LNVASLSVARYLAICHPFKAKTLMRSRRTKKFISAIWLASALLAIPMLFTMGLQNRSDG			
Sbjct 306		QHPGGLVCTPTVDTATVKVVIQVNTFTSFVFPMMVISVLTNTVIANKLTIMVRQAAEQGT-			275
Query 327		HPGGLVCTP VDTATVKVVIQVNTF SF+FPM+VIS+LNTVIANKLT+MV QAAEQ			
Sbjct 364		THPGGLVCTPIVDTATVKVVIQVNTFMSFIFPMLVISILNTVIANKLTMVHQAAEQGRV			245
Query 385		-----QPFTGFSMSIEPGRIQALRHGVHVLRAVVAFVVCWLPYHVRRLMFCYISTE			326
Sbjct 364		+ TF+M+IEPGR+QALRHGV VLRAVV+AFVVCWLPYHVRRLMFCYIS E			
Query 385		CTVGTHNGLEHSTFNMTIEPGRVQALRHGV LRAVVIAFVVCWLPYHVRRLMFCYISDE			305
Query 385		QWTPFLYDFYHYFYMLTNTLFYVSSTINPILYNLVSANFRQIFLSTLACLCPVWRRRRR			385
Sbjct 364		QWT FL+DFYHYFYMLTN LFY SS INPILYNLVSANFRQ+FLSTLACLCP WR RRK			
Query 385		QWTTFLDFYHYFYMLTNTLFYVSSTINPILYNLVSANFRQVFLSTLACLCPGWRHRRR			364

Рисунок S2. Выравнивание [A0A286XXM8](#) с последовательностью из 4XES.