

Структура и функция

- Мне была выдана структура с UNIPROT ID A0A340XQ47 и следующими заменами в белке: Y145F, P248G, N350D.

Согласно Uniprot это нейротензин рецептор типа 1 китайского озёрного дельфина. Интересный факт - этот вид дельфинов, на данный момент, либо находится на грани исчезновения, либо в настоящее время уже исчез из дикой природы. Пока точно установить это не удастся, а попытки начать разведение животных в неволе не увенчались успехом. Мой белок из данного вида относится к суперсемейству рецепторов, которые связаны с G-белком. Одним из лигандов является нейротензин. Он функционирует и как нейротрансмиттер, и как гормон посредством активации рецептора нейротензина.

Для выданной мне последовательности структура еще неизвестна. Чтобы анализировать мутации, необходимо было поискать подходящий ортолог в другом организме. Всего при загрузке последовательности из Uniprot blastp выдал больше 100 структур (если не ставить ограничение на количество).

<input checked="" type="checkbox"/>	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	human Neurotensin Receptor 1 (hNTSR1) - G11 Protein Complex in canonical conformation (C state) [Homo sapiens]	Homo sapiens	658	658	94%	0.0	84.05%	435	6OS9_R
<input checked="" type="checkbox"/>	A complex structure of arrestin-2 bound to neurotensin receptor 1 [Homo sapiens]	Homo sapiens	655	655	88%	0.0	87.53%	370	6PWC_R
<input checked="" type="checkbox"/>	neurotensin receptor and arrestin2 complex [Homo sapiens]	Homo sapiens	603	603	79%	0.0	89.22%	334	6UP7_R
<input checked="" type="checkbox"/>	Structure of active-like neurotensin receptor [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	596	596	83%	0.0	84.42%	541	4XEE_A
<input checked="" type="checkbox"/>	Structure of active-like neurotensin receptor [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	593	593	83%	0.0	84.14%	541	4XES_A
<input checked="" type="checkbox"/>	Structure of Thermostable Agonist-bound Neurotensin Receptor 1 Mutant without Lysozyme Fusion [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	540	540	86%	0.0	78.12%	338	3ZEV_A
<input checked="" type="checkbox"/>	Chain C. Neurotensin receptor type 1 [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	540	540	86%	0.0	77.84%	336	7L0P_C
<input checked="" type="checkbox"/>	High Resolution Structure of Thermostable Agonist-bound Neurotensin Receptor 1 Mutant without Lysozyme Fusion [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	536	536	83%	0.0	79.54%	335	4BUO_A
<input checked="" type="checkbox"/>	Structure of Evolved Agonist-bound Neurotensin Receptor 1 Mutant without Lysozyme Fusion [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	517	517	86%	0.0	74.24%	338	4BWB_A
<input checked="" type="checkbox"/>	High Resolution Structure of Evolved Agonist-bound Neurotensin Receptor 1 Mutant without Lysozyme Fusion [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	508	508	86%	0.0	73.41%	338	4BV0_A

Для анализа 3D структуры я выбрала PDB ID 6OS9. Находка была выдана blastp как наилучшая по покрытию и одна из лучших по идентичности. Ее название: human Neurotensin Receptor 1 (hNTSR1) - G11 Protein Complex in canonical conformation (C state). Подходящая для анализа цепь называется A[auth R]. Согласно выравниванию blastp сдвиг произошел на 20 остатков. При анализе структур в PDBeFold я не нашла более подходящего белка. Всего сервер выдал 97 находок. По совокупности качеств, в которые вошли: разрешение, покрытие и идентичность, мой выбор пал на 6OS9. Это наиболее похожий по первичной аминокислотной последовательности белок для анализа внутренних изменений при точечных мутациях.

1) Замена Y145F

Ключевым моментом в рассмотрении такой мутации является тот факт, что тирозин взаимодействует в структуре с лигандом рецептора - нейротензином. Он образует с ним водородную связь, она изображена на рисунке ниже. Такая связь, я считаю, вносит важный вклад в протекание реакции. В таком случае, при замене тирозина 145 на фенилаланин мы, по сути, убираем важный в данном взаимодействии кислород и портим связывание. Надо сказать, что нейротензин стабилизирован в структуре рецептора и другими связями, однако, все же эту замену стоит считать негативной. Данная мутация не

повлияет на стабильность глобулы, так основная функция остатка – это связывание субстрата. Однако, такую замену совершать все-таки не рекомендуется.

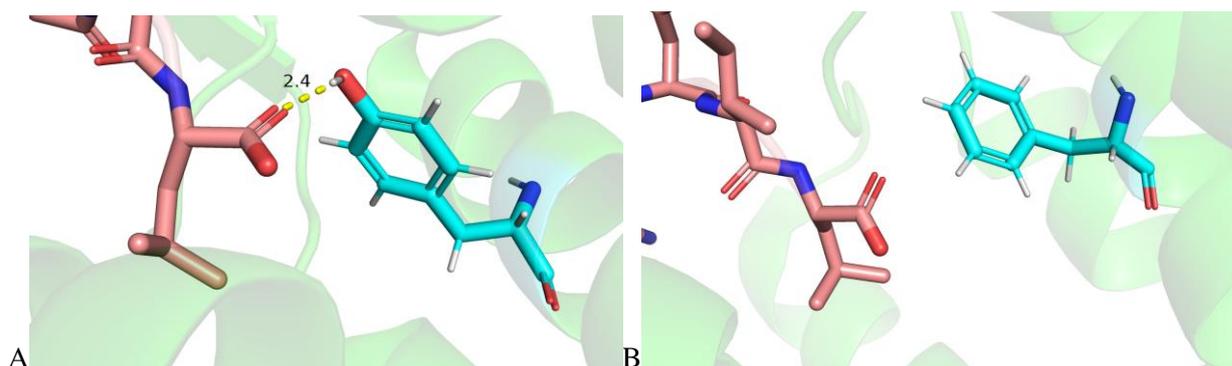


Рис 1. А - расположение и взаимодействие остатка тирозина 145 с лигандом в структуре белка bOS9; В – расположение теоретической мутации Phe'145 в структуре.

2) Замена P248G

Пролин 248 расположен в альфа-спирали белка. Он не является донором водородных связей, а является только акцептором. При замене пролина на остаток глицина, вероятно, произойдут изменения в спирали, которые могут повлечь за собой изменения во всей структуре белка в целом. Остаток может вносить вклад в гидрофобный эффект, к примеру с Phe'312, что при замене на глицин скажется на взаимном расположении двух спиралей. Азот глицина 248, при такой мутации, становится донором водородной связи и может образовать связь с 244 остатком главной цепи. Из-за этого глицин уберет изгиб в спирали, и она сможет полностью выпрямиться. Это в том числе может негативно повлиять на положение соседних цепей и изменит структуру рецептора в целом. Такую мутацию делать не стоит.

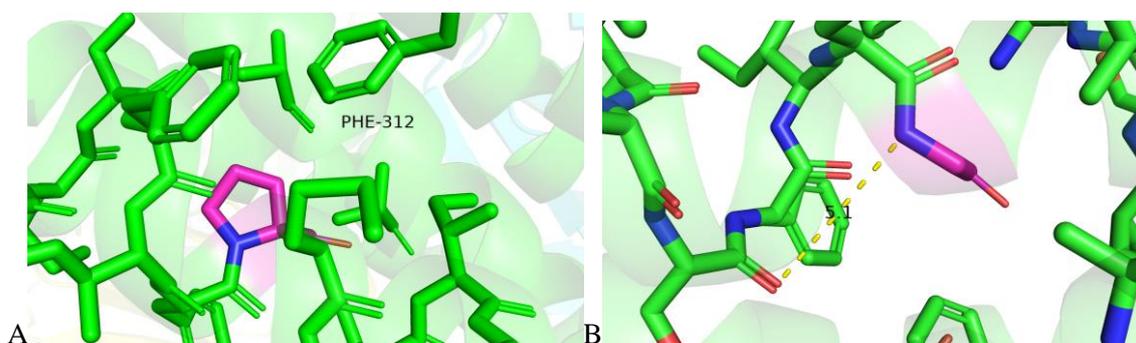


Рис 2. А – расположение в структуре остатка пролина 248, он окрашен в розовый цвет. Также на рисунке отмечен остаток фенилаланина 312; В – теоретическая мутация пролина на глицин, он окрашен розовым цветом. Показана возможная водородная связь с остатком серина 244.

3) Замена N350D

Аминокислотный остаток аспаргина в рецепторе может образовывать довольно большое количество водородных связей. Как можно увидеть на рисунке ниже, он образует водородные связи с глутаминовой кислотой 123, аргинином 148 и пи-водородную связь с тирозином 346. Первые два аминокислотных остатка принадлежат другим альфа-спиралям. При замене аспаргина на аспаргиновую аминокислоту мы получим довольно

напряженное состояние с глутаминовой аминокислотой. Вероятно, остаток аспаргиновой кислоты будет вынужден изменить конформацию, чтобы не сближаться с отрицательным зарядом. Возможно, водородная связь с аргинином сохранится. При такой замене также потеряется пи-водородная связь с тирозином. Такая большая потеря в структурированности части белка может существенно сказаться на его организации. Тем более остаток аспаргина расположен очень близко к месту связывания пептида. Получается такая мутация повлияет на водородную связь между альфа-спиралями, а также есть риск потери стабильности центра связывания нейротензина. Такая мутация негативна.

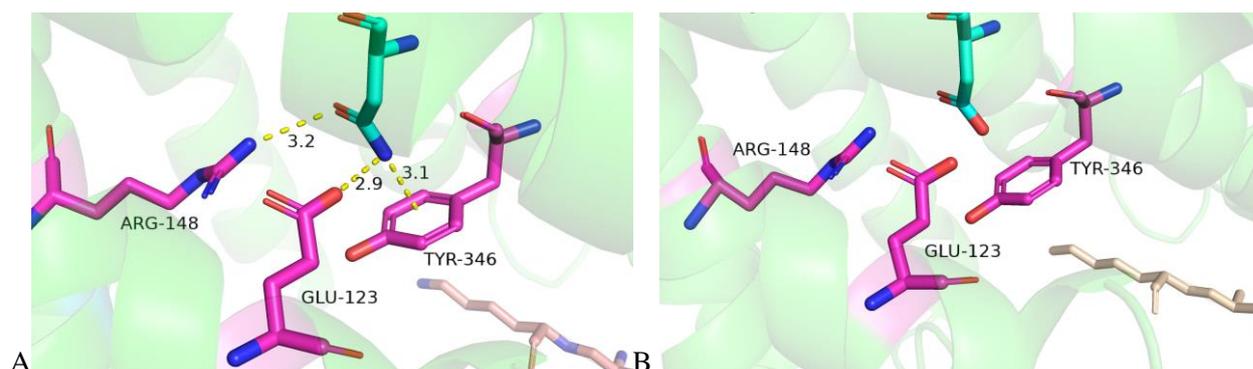


Рис 3. А – остаток аспаргина в рецепторе отмечен бирюзовым цветом, розовым отмечены остатки, с которыми у аспаргина есть водородная связь. Бледно-розовым на фоне отмечен пептид; В – теоретическая замена на аспаргиновую аминокислоту отмечена бирюзовым, важные остатки, которые образовывали на рисунке 3А водородные связи - розовые, бледно-розовый – пептид.