

Практикум 3.

Задание 1.

Объектом исследования данного практикума является третий PDZ-домен белка постсинаптического уплотнения PSD-95 (PDB ID: 6QJL), который присутствует в нейронах ЦНС. Кстати, с этими белками, вероятно, связан патогенез РАС и шизофрении [3]. PDZ-домены представляют собой межбелковые модули узнавания, который взаимодействуют с другими белками посредством коротких последовательностей на карбоксильном конце. Их структура характеризуется наличием консервативного ядра, состоящего из шести β -нитей и двух α -спиралей [1]. Было показано, что разные PDZ-домены имеют специализацию для обеспечения разных функций. В частности, третий PDZ-домен способен связываться с нейролигинами – белками клеточной адгезии, – а первый и второй домены – с NMDA2-рецепторами и белками калиевых каналов, обеспечивая кластеризацию последних. Для третьего PDZ-домена характерно связывание последовательности Thr/Ser-X-Val на COOH-конце нейролигинов. Как показали исследования, её наличие в белке строго необходимо, но недостаточно для связывания, что свидетельствует о сложной природе взаимодействий PDZ-домена с его мишенью [2].

В рамках первого задания (мне достался вариант В) предстояло исследовать взаимодействия, стабилизирующие каждую из двух возможных конформаций 395 глутамата. Результат представлен на рисунке 1 (А, В).

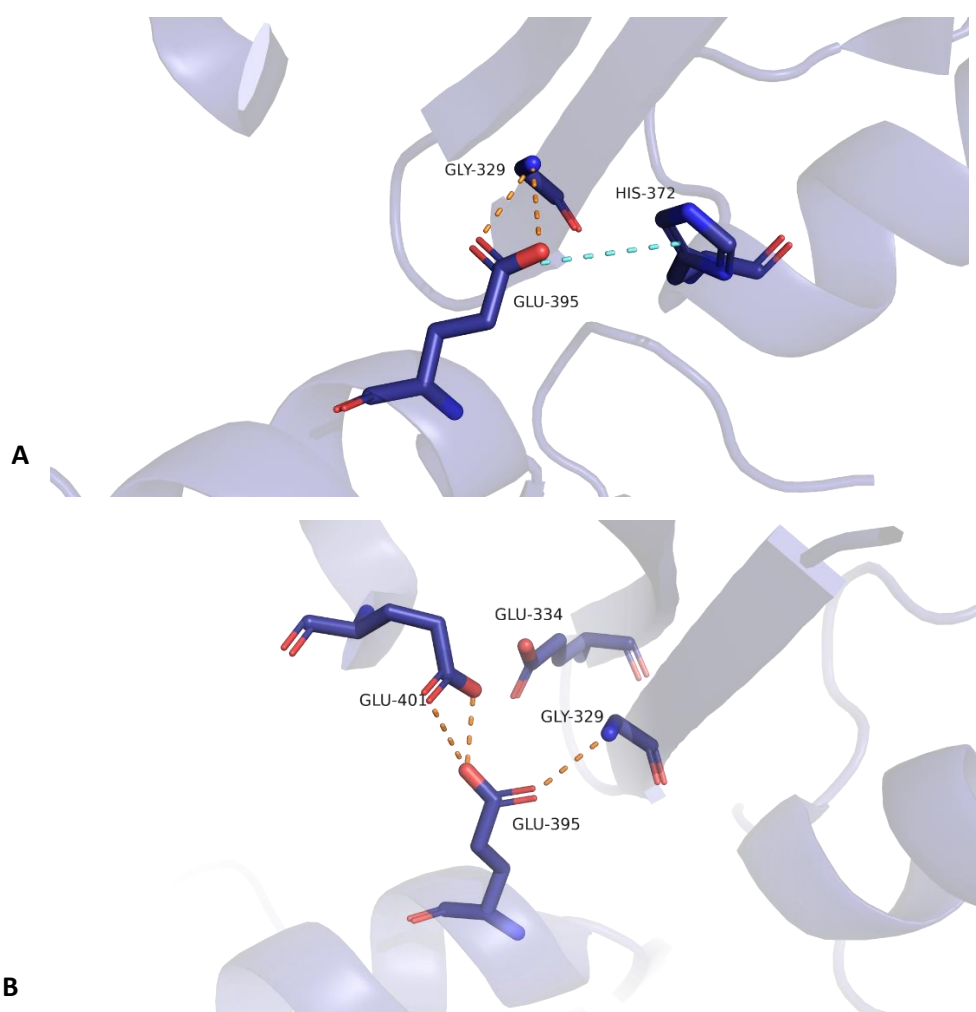


Рисунок 1. А - Взаимодействия, стабилизирующие альтернативную конформацию А, В - взаимодействия, стабилизирующие альтернативную конформацию В. Оранжевым цветом показаны водородные связи, бирюзовым - солевой мостик. Сессия находится по [ссылке](#)

Как видно из рисунка, для обеих альтернативных конформаций, которые представлены в кристалле белка, существуют стабилизирующие их взаимодействия с соседними аминокислотными остатками. Конформация А поддерживается водородными связями с 329 глицином и солевым мостиком с 372 гистидином, конформация В – водородными связями с 329 глицином и 401 глутаматом. По данным PDB-банка, населенность альтернативного положения А составляет 0.65, В – 0.35. Исходя из наблюдаемых взаимодействий, мне кажется более стабильной конформация В, так как она поддерживается большим числом водородных связей, но с другой стороны конформация А стабилизируется также положительно заряженным гистидином, а в случае конформации В рядом с рассматриваемым отрицательно заряженным радикалом присутствуют два также отрицательно заряженных глутамата, что может приводить к нестабильности.

Задание 2.

Далее я работала с визуализацией В-фактора для той же структуры. В-фактор показывает точность локализации каждого атома: чем он выше, тем больше неопределенность и тем шире область пространства, в которой рассматриваемый атом может находиться. Таким образом, данная характеристика показывает подвижность отдельных частей белка. Как можно заметить по рисунку 2 (А, В), имеется корреляция между В-фактором участка белка и его положением относительно всей глобулы. Чем ближе к поверхности и к концам молекулы, тем выше В-фактор, что и неудивительно, ведь концевые участки белка обычно не участвуют в реализации его функции и укладке структуры, поэтому их положение в пространстве может варьировать. В то же время расположенные внутри глобулы функционально значимые регионы характеризуются низкими В-факторами. Это видно при рассмотрении как исключительно остова, так и боковых радикалов – концевые атомы более подвижны, чем атомы остова.

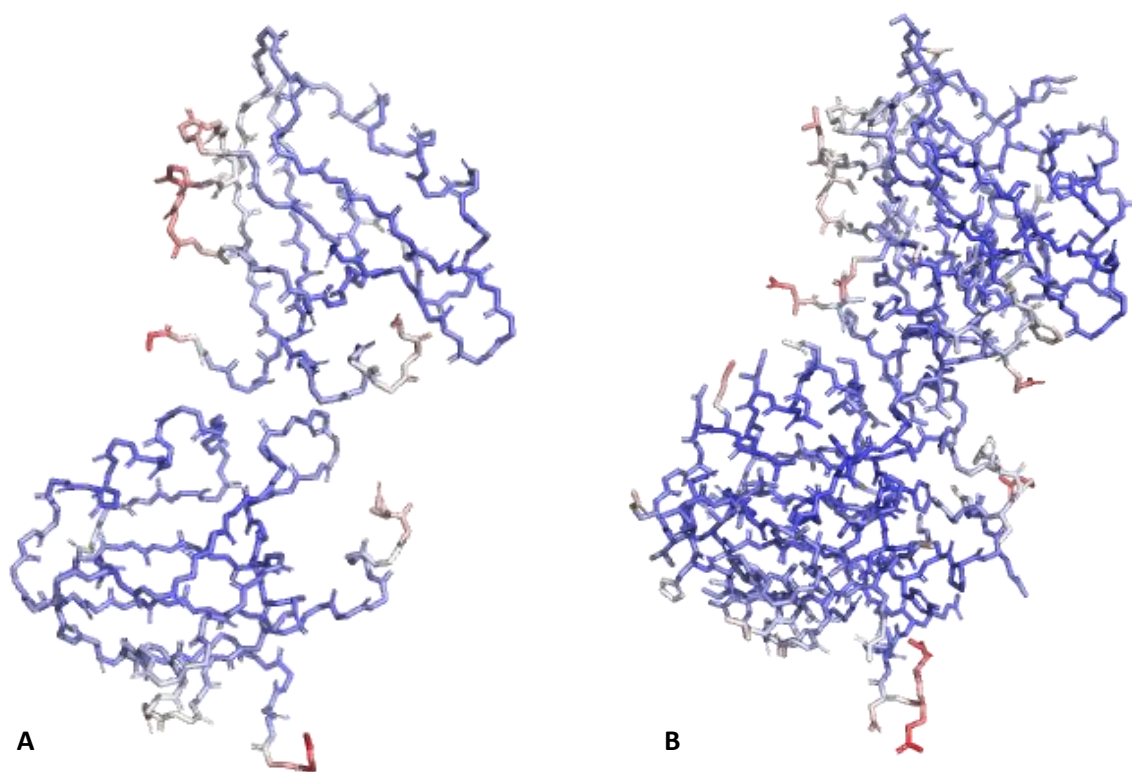


Рисунок 2. Визуализация В-фактора для структуры 6QJL. А - только атомы остова, В - все атомы белка. Переход от синего цвета к красному свидетельствует о более высокой подвижности атомов.

Более подробно различия В-факторов внутри отдельного остатка рассмотрены на рисунке 3 (А, В). Здесь представлен 399 аргинин, расположенный близко к С-концу белка. На высоких В-факторах сказывается как концевое положение аминокислоты, так и длинный радикал, крайние атомы которого слабее связаны с остальной структурой и вследствие этого могут относительно свободно менять положение в пространстве. Это подтверждается также формой электронной плотности. Низкое покрытие электронной плотностью указывает на более низкую вероятность нахождения атома в данной точке пространства, что возможно вследствие его постоянного смещения.

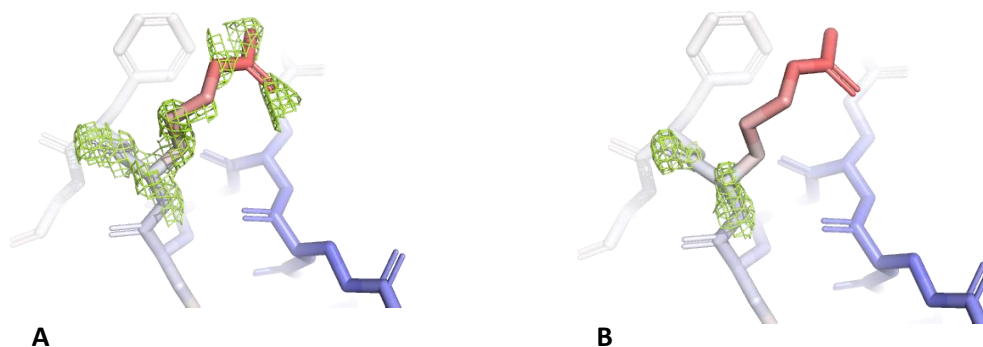


Рисунок 3. Визуализация В-фактора и электронной плотности для 399 аргинина. Переход от синего цвета к красному свидетельствует о более высокой подвижности атомов. Желтым цветом показана электронная плотность А - на уровне подрезки 1, В - на уровне подрезки 2. Сессия находится по [ссылке](#)

Задание 3.

Далее я рассматривала кристаллическую решетку белка и его ближайшее окружение. На этом этапе стоит отметить, что в PDB-файле содержалось две идентичные по структуре молекулы третьего PDZ-домена, которые отличаются только наличием двух аминокислот на N-конце. При этом данная структура не является отражением биологически значимого взаимодействия, так как в природе эти белки функционируют в виде мономеров, и их димеризация не была охарактеризована. Вероятно, две структуры были помещены в один файл, так как они отражают две возможные ориентации молекулы при кристаллизации. Как можно видеть на рисунке 4 (А, В) и рисунке 5, каждая молекула занимает одно из двух возможных положений и окружена 10 другими, с которыми, как будет показано ниже, могут формироваться взаимодействия. Для получения данного изображения были выбраны соседи исходной молекулы на уровне отсечки 12. Так как две молекулы в исходном файле идентичны, я рассматривала окружение и взаимодействия только одной из них.

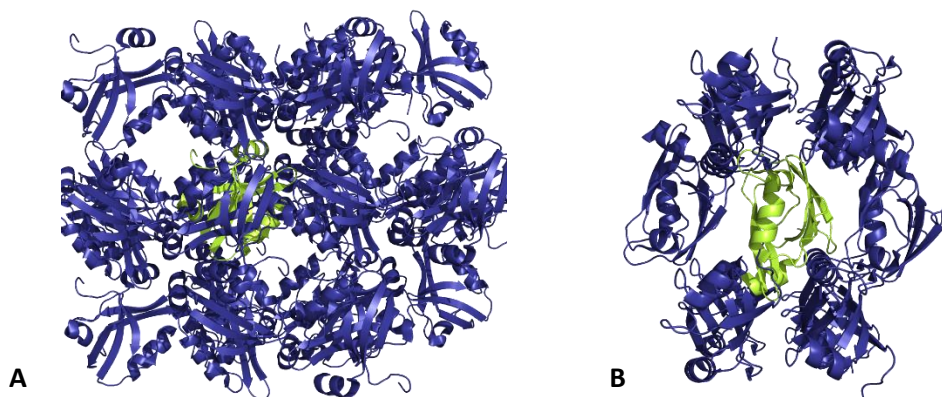


Рисунок 4. Организация кристалла белка. А - общий вид, В - ближайшее окружение исходной молекулы (показана желтым цветом)

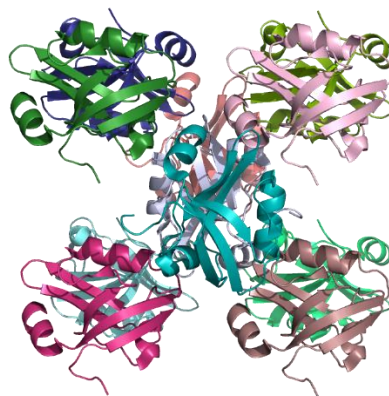


Рисунок 5. Ближайшее окружение исходной молекулы (показана белым цветом). Сессия находится по [ссылке](#)

Задание 4.

~~А дальше все плохо.~~ Далее будут показаны возможные взаимодействия рассматриваемого белка с соседями по кристаллической решетке. Как можно было видеть на рисунке 5 выше, всего каждую молекулу белка окружает 10 других, соответственно, так как белки в кристалле расположены не в одинаковом положении, придется рассмотреть 5 уникальных зон контакта. Ниже на рисунках 7-9 представлены 5 групп, в которых формируются одинаковые зоны контакта, и найденные мной взаимодействия в каждой зоне. На всех рисунках водородные связи показаны желтым пунктиром, солевые мостики – бирюзовым.

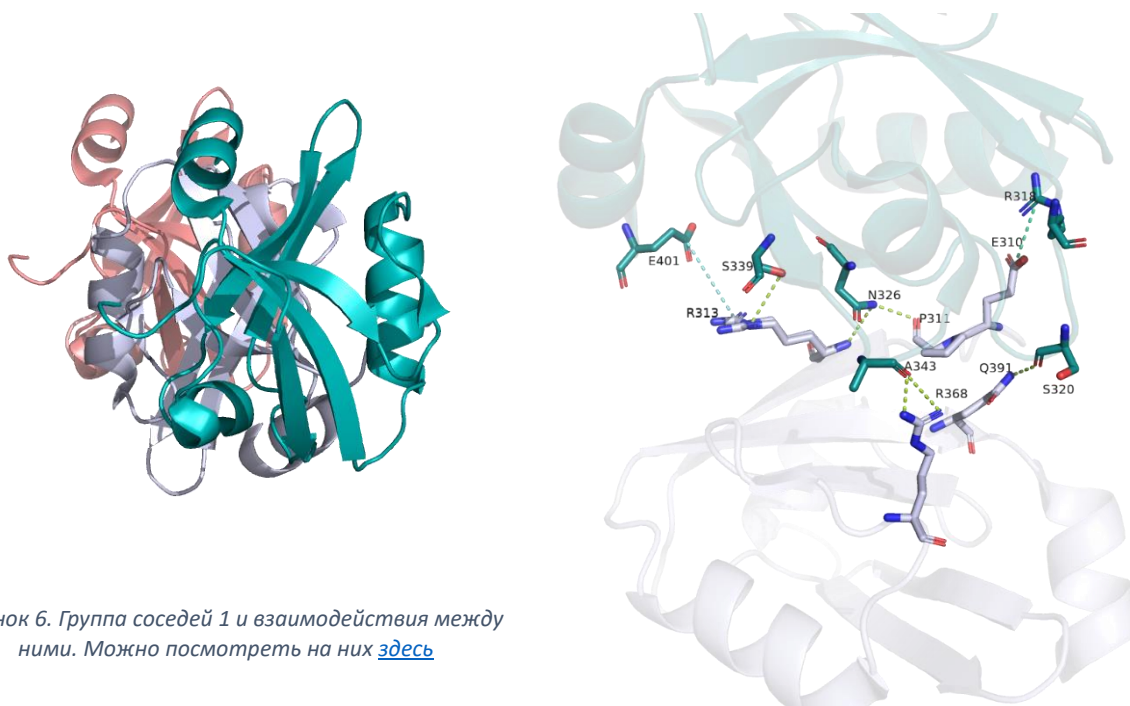


Рисунок 6. Группа соседей 1 и взаимодействия между ними. Можно посмотреть на них [здесь](#)

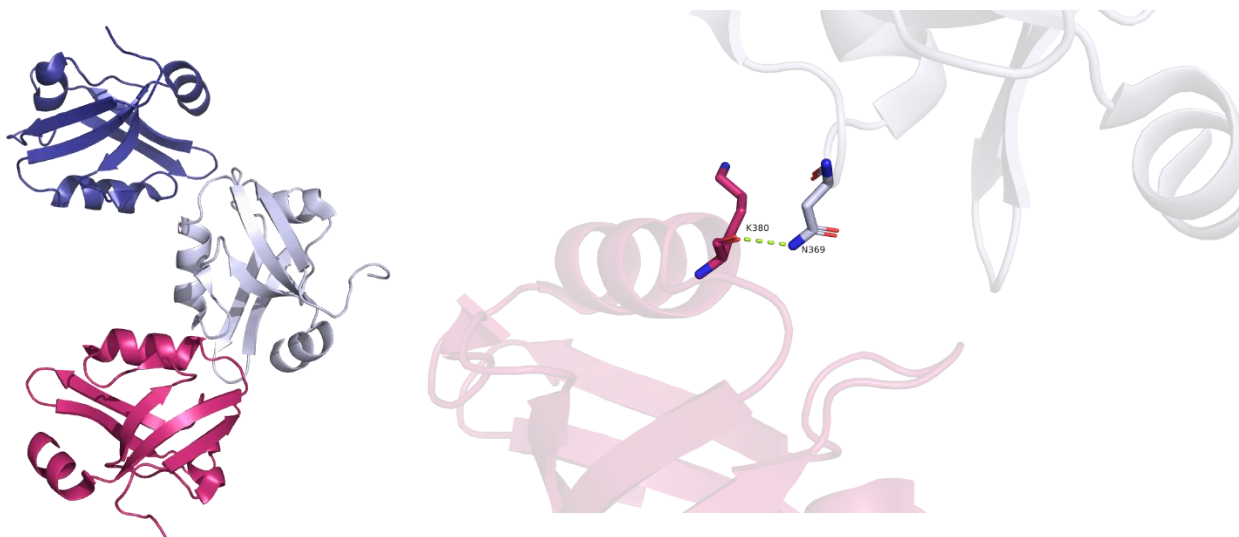


Рисунок 8. Группа соседей 2 и взаимодействия между ними. Можно посмотреть [поближе](#)

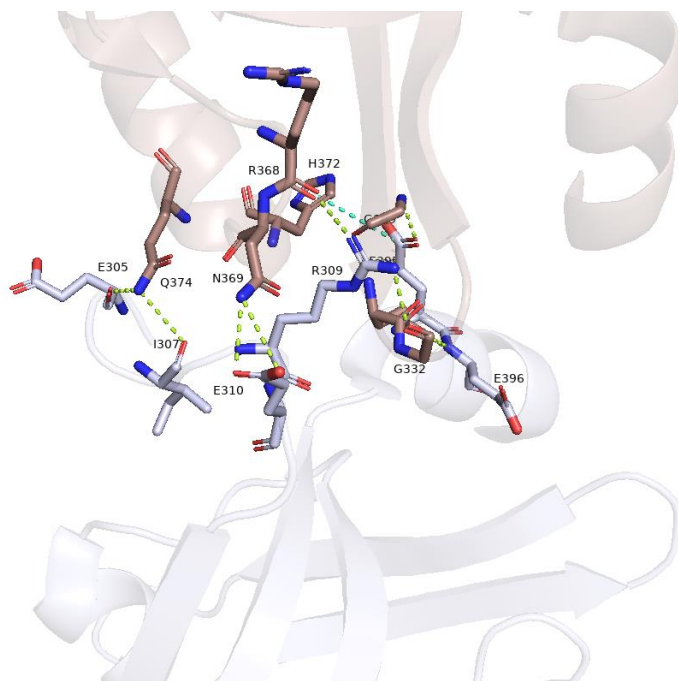
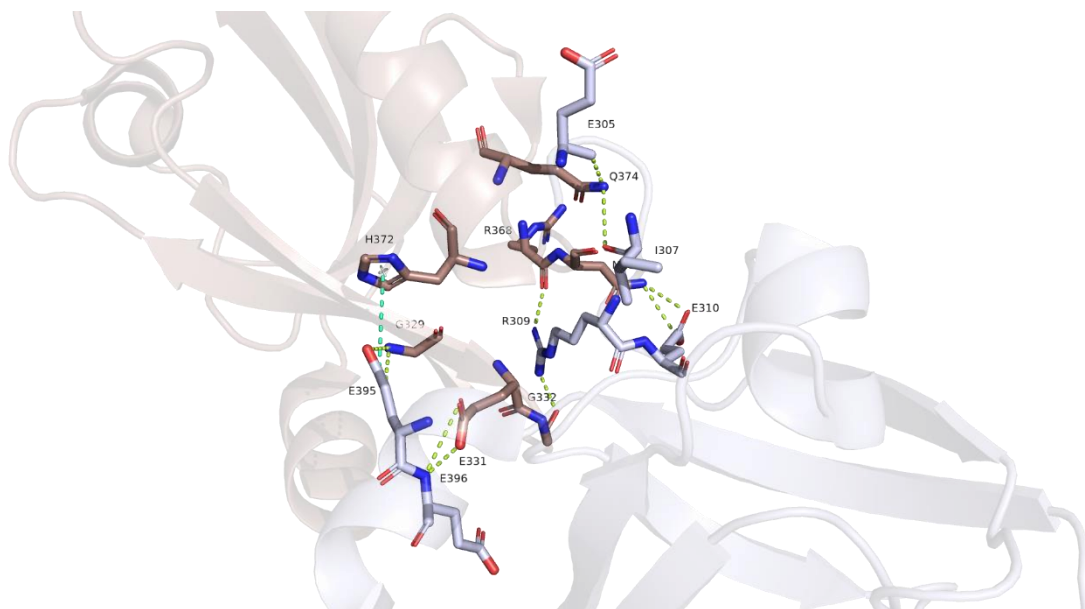


Рисунок 7. Группа соседей 3 и взаимодействия между ними. Лучше их видно по [ссылке](#)



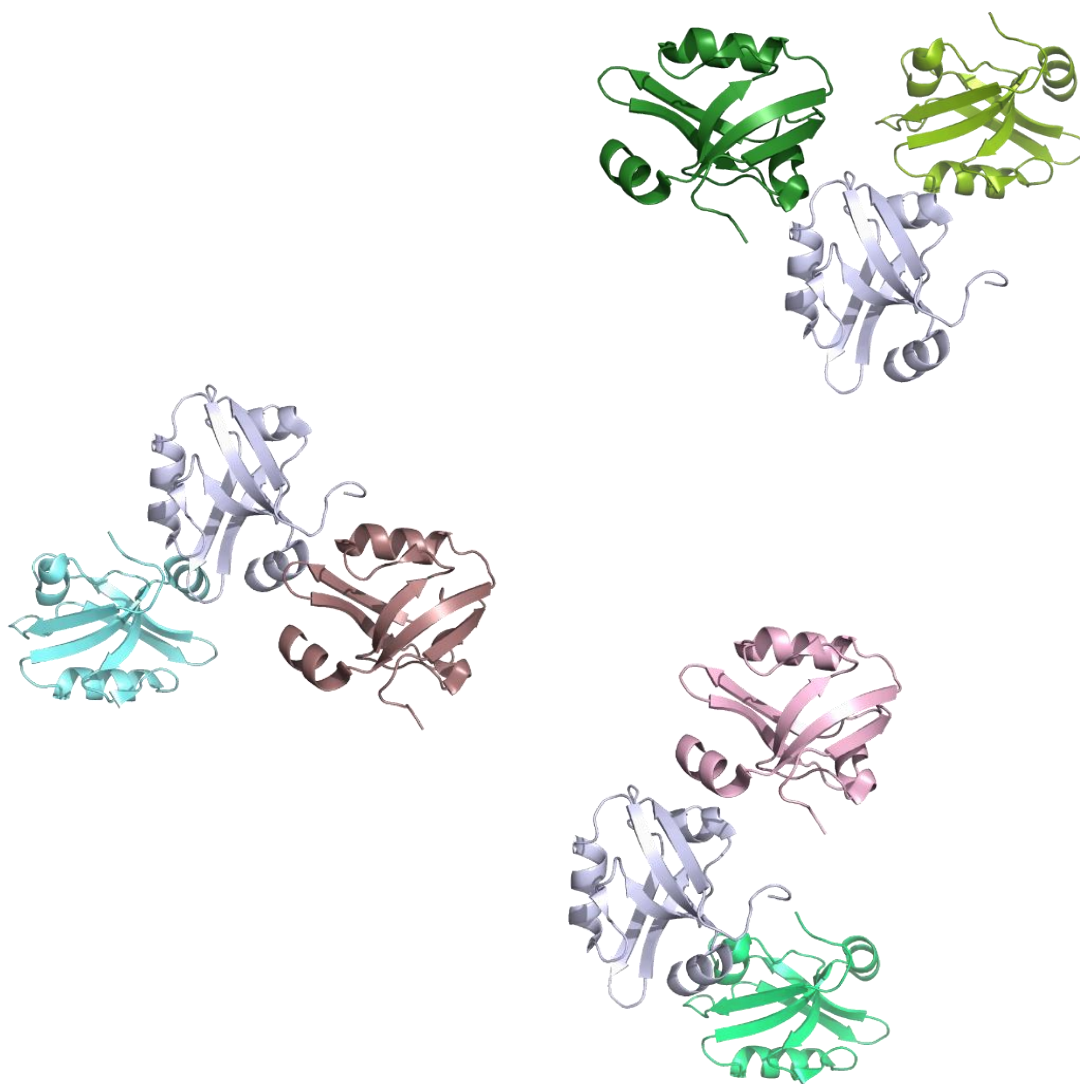


Рисунок 9. Группы соседей 4 и 5. Взаимодействия на расстоянии в пределах 6 ангстрем не найдены

Исходя из результатов рассмотрения всех наблюдаемых зон контактов, можно сказать, что кристалл не очень стабилен, так как хотя между молекулами в нем и могут формироваться зоны с довольно большим количеством контактов (рисунки 6, 8), в то же время существуют пары соседей, между которыми вообще не было обнаружено возможных взаимодействий. Контакты в кристалле не отражают природные взаимодействия этих белков при ди- и олигомеризации, потому как кристаллизация белка происходит не в нативных условиях. Также можно еще раз отметить, что образование функционально значимых димеров или олигомеров для рассматриваемого белка в принципе не было показано. Тем не менее, большое количество водородных связей в зонах контакта, показанных на рисунках 6 и 8, может свидетельствовать о том, что подобного рода комплексы могут образоваться и в физиологических условиях при определенном pH, который обеспечит нужную степень протонирования аминокислотных остатков для образования водородных связей, и высокой концентрации белка.

Список литературы

1. Camara-Artigas, A., Murciano-Calles, J. & Martínez, J. C. (2019). Conformational changes in the third PDZ domain of the neuronal postsynaptic density protein 95. *Acta Cryst. D75*, 381–391.
2. M. Irie et al. ,Binding of Neuroligins to PSD-95.*Science*277,1511-1515(1997).DOI:10.1126/science.277.5331.1511
3. Fujita-Jimbo, E., Tanabe, Y., Yu, Z. et al. The association of GPR85 with PSD-95-neuroligin complex and autism spectrum disorder: a molecular analysis. *Molecular Autism* 6, 17 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13229-015-0012-5>