

Практикум 8. Разбиение структуры на домены

Задание 1. Алгоритм ДОМАК

Эфриновые рецепторы – сложные молекулы белка, рецепторные тирозинкиназы, участвующие в передаче сигналов от клетки к клетке посредством связывания с белками эфринами, при котором рецептор изменяет свою конформацию и запускает различные ответные процессы в клетке. Эти рецепторы делят на два класса: А и В. Они различаются эфринами, которые связывают, однако рецептор EphA4, рассматриваемый мной в этом задании, может связывать как эфрин А, так и эфрин В [1].

Все эфриновые рецепторы включают в себя эфринсвязывающий консервативный домен, соединенный с мембраной клетки через линкерный фрагмент, включающий в себя повторы фибронектина III типа и EFG-подобный мотив. В некоторых литературных данных тут также выделяют Sushi-домен между эфринсвязывающего дома и богатым цистеинами EFG-like мотивом. Длина линкерного фрагмента варьируется между Eph рецепторами. Внутри клетки также находятся несколько доменов, среди них выделяют юкстамембранный домен, отвечающий за аутофосфорилирование, киназный домен, PDZ-связывающий мотив и SAM (спиральный альфа мотив), который участвует в димеризации (рис. 1) [2].

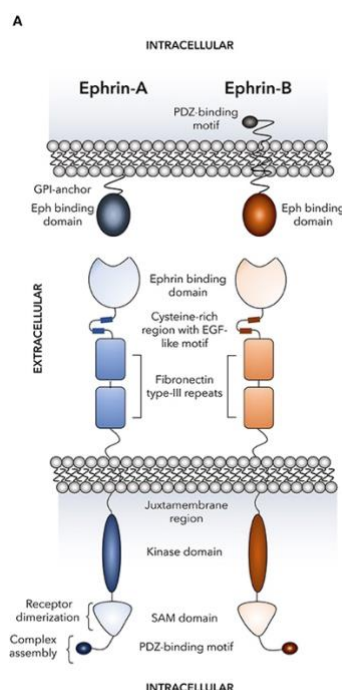


Рисунок 1 Доменная организация эфриновых рецепторов [2]

В общем, эфриновые рецепторы имеют очень сложную доменную организацию, определение которой действительно сильно влияет на функцию рецептора. В этой работе я попробую определить домены с помощью разных алгоритмов и баз данных.

С помощью алгоритма ДОМАК и функции SplitValue можно предсказать, какие аминокислоты располагаются на границе двух доменов на основе их межмолекулярных взаимодействий. Алгоритм выявил 8 доменов в цепи А эктодомена эфринового рецептора A4 (EphA4, PDB ID 4BK4), границы между которыми соответствуют пикам на графике (рис. 2). По выдаче ДОМАК домены разделены аминокислотами с номерами 200, 260, 274, 291,

309, 324, 437 и 534. Получилось 9 доменов, хотя пики, соответствующие остаткам с номерами 291 и 309 несколько меньше остальных и могут не соответствовать междоменным областям. На рис. 3 я попыталась показать границы между доменами. Можно сказать, что алгоритмом был верно определен эфринсвязывающий домен (красный), межмембранный фрагмент содержит в себе 1 крупный домен 4 мини-домена (возможно, пики 291 и 309 действительно ложные, так как доменов, на основе литературных данных, должно быть 3). Также были определены 3 домена после этого фрагмента. Предположенное мной разделение на домены привожу в табл. 1. Вообще Разобраться в доменах сложно и, кажется на участке 261-324 много лишнего определилось, что не удивительно – этот участок вытянут и аминокислоты не так плотно контактируют, поэтому ДОМАК тут тяжело. Зеленый кончик, вынесенный в отдельный домен, также определен ошибочно, так как он находится на периферии и мало с чем связан. Остальные домены, которые я описала выше, находятся в цепи В, которую я не рассматривала.

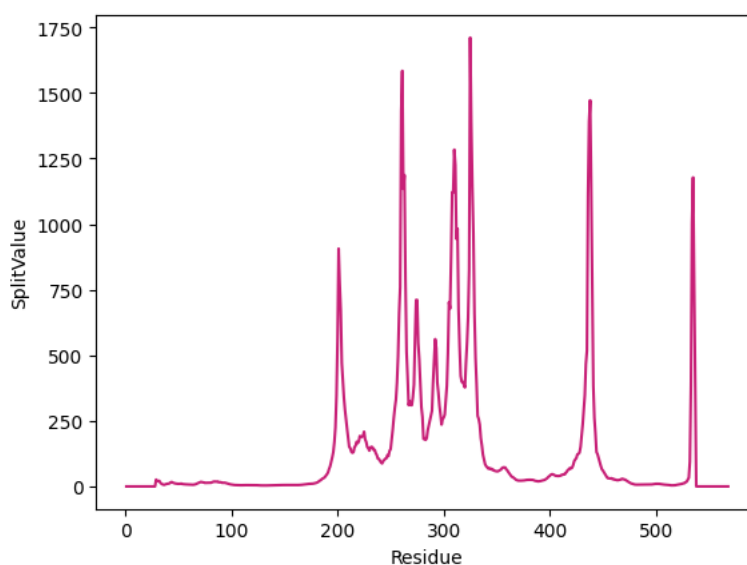


Рисунок 2 График SplitValue. Репрезентирует остатки на границах доменов

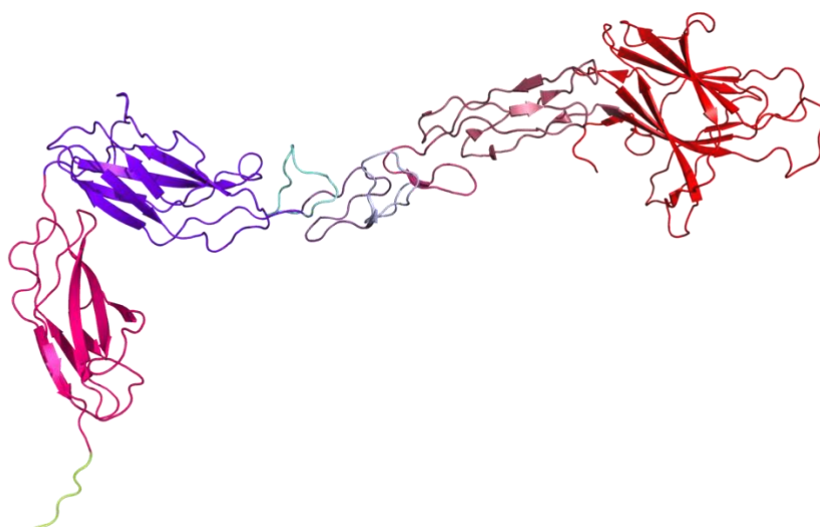


Рисунок 3 Доменная организация ЕрhA4 на основе выдачи ДОМАК

Фрагмент	Домен	Цвет
1-200	Эфринсвязывающий	Красный
201-260	Sushi	Raspberry
261-274	EFG cys-rich	Фиолетово-малиновый
275-291	EFG cys-rich	Голубой
292-309	EFG cys-rich	Пурпурный
310-324	EFG cys-rich	Циановый
325-437	Фибронектин III номер раз	Фиолетовый
438-534	Фибронектин III номер два	Малиновый
535-568	Кусочек фибронектина номер 2	Салатовый

Табл. 1 Разделение выдачи ДОМАК на домены

Задание 2. Базы данных SCOP и CATH

В базе данных структурных доменов SCOP нет информации о полной доменной организации EphA4 (есть только один домен из структуры 3GXU рецептора с эфрином, определенный как похожий на связывающий галактозу домен. Тут, по-видимому, частично определили эфринсвязывающий домен с 41 по 215 остатки.

В базе данных CATH содержится информация о 5 доменах цепи А рецептора. Среди них 39-214 galactose-binding domain-like (видимо, лигандсвязывающий домен), 215-271 ephrin a2 ectodomain (видимо, Sushi), 272-337 tumor necrosis factor receptor (вроде как это EFG домен) и 2 домена, определенные как иммуноглобулины. Два последних домена соответствуют позициям 338-451 и 452-552. Разделение на домены приведено на рисунке 4.

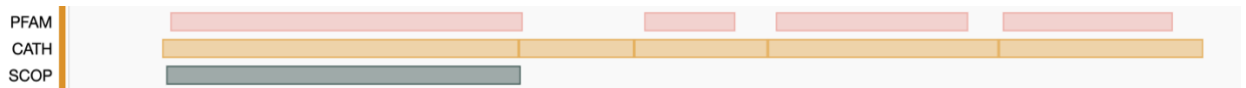


Рисунок 4 Разделение рецептора на домены в базах данных SCOP и CATH

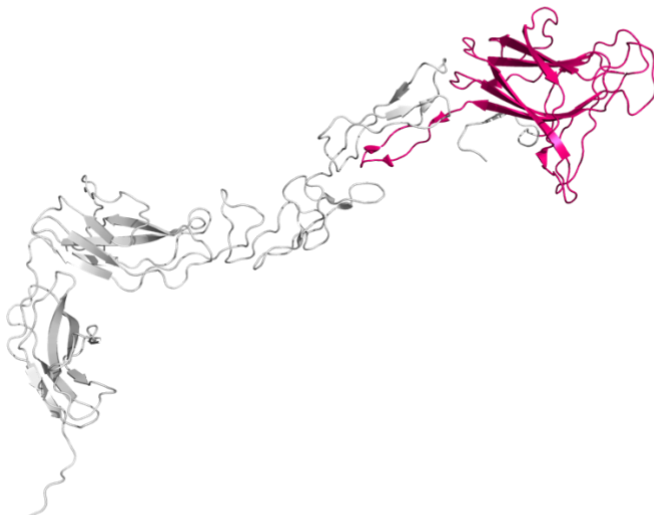


Рисунок 5 Разделение на домены SCOP

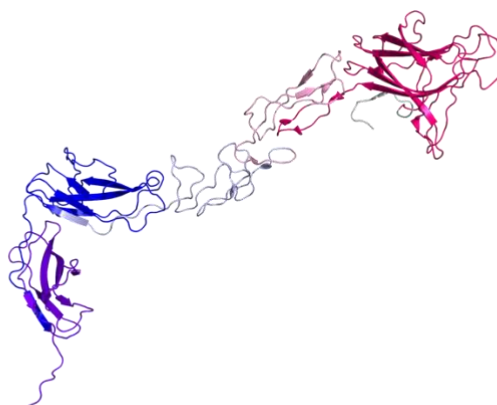


Рисунок 6 Разделение на домены CATH

Информация о доменной организации в обеих базах данных неполная, при этом сами домены определены криво: меня сильно смущает, что эфринсвязывающий домен в обоих случаях захватывает протяженную петлю в сторону конца белка, при этом фрагмент на N-конце в домен не входит. По причине сдвига этого домена, Sushi домен определен неоднозначно. Первый фибронектин в БД CATH тоже странный: часть одного из бета-листов включена в предыдущий домен, и фрагмент первого фибронектина из одного бета-листа также смещен во второй фибронектин. Это не логично.

Задание 3. Поиск доменов в InterPro

Для поиска эволюционных доменов в InterPro я подала цепь A рецептора (рис. 7). В итоге программа определила 4 домена: домен, связывающий лиганд (4-183), тирозинкиназный домен (243-280) и 2 фибронектина типа III (302-413, 414-511). Мне не совсем понятно, откуда посередине возник киназный домен, хотя во многих структурах в InterPro последовательность именно такая. В выдаче DOMAK и моей интерпретации этот фрагмент соответствует межмембранному участку Sushi+EGF. Тут уже эфринсвязывающий домен, в отличие от CATH и SCOP, почему-то не включает в себя один из бета-листов, хотя было бы логично считать его частью домена. Фибронектины тоже немного съехали.



Рисунок 7 Разбиение EphA4 на домены в выдаче InterPro

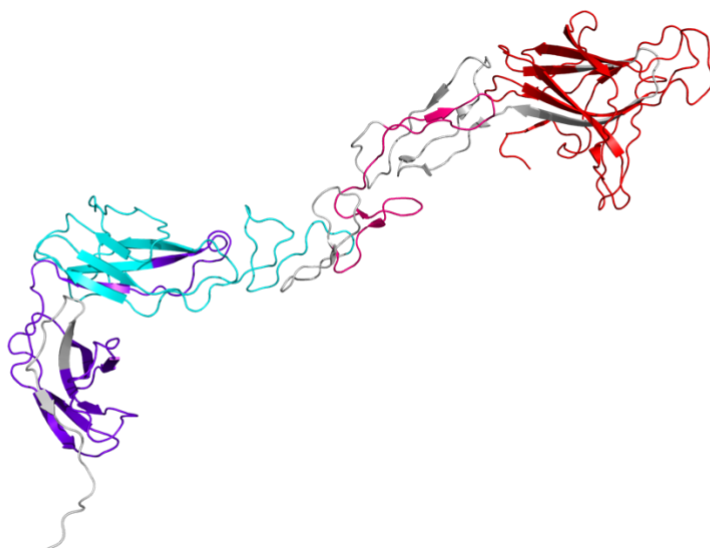


Рисунок 8 Разделение на домены на основе выдачи InterPro

Доменная организация в выдаче DOMAK выглядит наиболее полной и логичной. Странно, что в эволюционных базах данных домены немного сдвинуты. Возможно, это вызвано особенностями доменной организации EphA4.

Для проверки этой гипотезы я решила предсказать в InterPro доменную организацию эктодомена рецептора EphB6, который состоит из лиганд-связывающего домена, домена, богатого цистеинами и фибронектина [3]. В результате предсказались 4 домена (рис. 9). В этом случае снова обнаружился тирозин-киназный домен посередине, но он частично входит в суперсемейство EGF. Интересно, что для этого белка крупные домены предсказались полностью, без смещения бета-листов (рис. 10).

В случае эфринового рецептора A4 лучшим алгоритмом для определения доменной организации оказался DOMAK. Недостатки остальных алгоритмов связаны с особенностями EphA4 и его эволюционными отличиями от остальных рецепторов семейства.

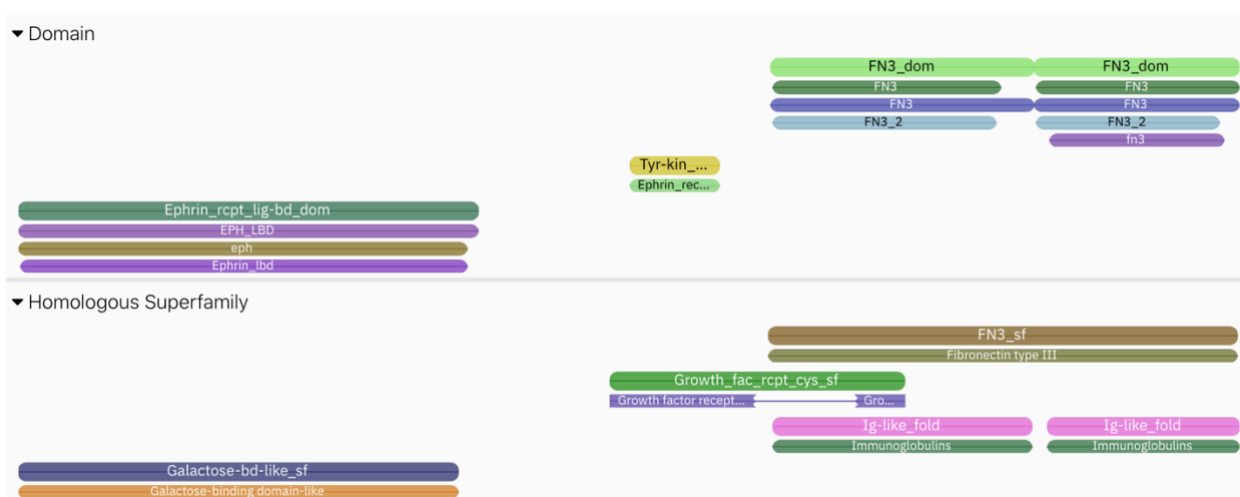


Рисунок 9 Разбиение EphB6 на домены в выдаче InterPro

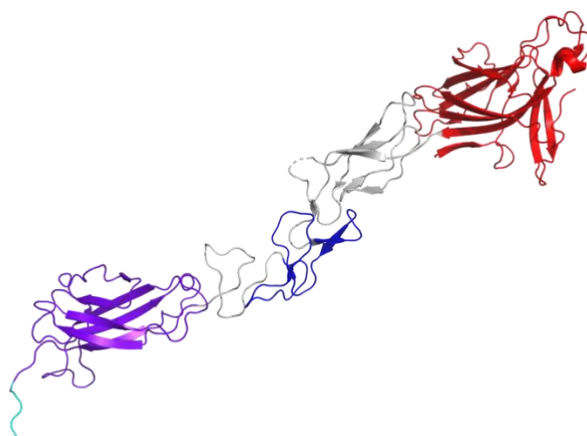


Рисунок 10 Доменная организация EphB6 на основе выдачи InterPro

Литература:

- 1) Lisabeth EM, Falivelli G, Pasquale EB. Eph receptor signaling and ephrins. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013 Sep 1;5(9):a009159. doi: 10.1101/cshperspect.a009159. PMID: 24003208; PMCID: PMC3753714.
- 2) Darling TK, Lamb TJ. Emerging Roles for Eph Receptors and Ephrin Ligands in Immunity. Front Immunol. 2019 Jul 4;10:1473. doi: 10.3389/fimmu.2019.01473. PMID: 31333644; PMCID: PMC6620610.
- 3) Mason EO, Goldgur Y, Robev D, Freywald A, Nikolov DB, Himanen JP. Structure of the EphB6 receptor ectodomain. PLoS One. 2021 Mar 26;16(3):e0247335. doi: 10.1371/journal.pone.0247335. PMID: 33770085; PMCID: PMC7997048.

[PyMol сессия для первого белка:](#)

https://kodomo.fbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr8/4bk4_Burmistrova.pse

[PyMol сессия для второго белка:](#)

https://kodomo.fbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr8/ephB4_Burmistrova.pse