

Структура и функция

В этом практикуме я буду учиться предсказывать влияние мутаций на структуру и функцию белка.

Для выполнения задания мне был выдан белок в виде UNIPROT ID A0A340XQ47 и 3 мутации: L198R, R323H, Y339A

Этот белок является рецептором нейротензина типа 1 из организма *Lipotes vexillifer* (китайского речного дельфина, обитающего в бассейне реки Янцзы).

Рецептор нейротензина 1 (NTSR1) ассоциирован с G-белками. Он участвует в регуляции кровяного давления, температуры тела, веса и реакции на боль.

Сам лиганд - нейротензин представляет из себя пептид, длиной 6 А.К. С последовательность - RRPYIL (Рис. 1).

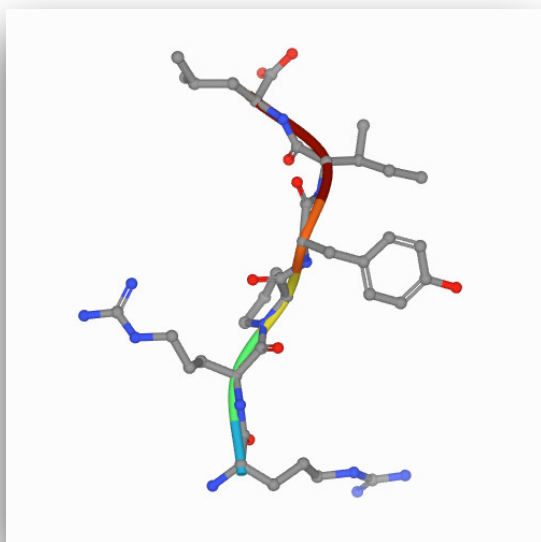


Рис.1 Лиганд -нейротензин

Структуры рецептора в pdb обнаружено не было. Поэтому с помощью protein blast и поиска по базе pdb были найдены структуры для ортологов из других организмов (Рис. 2).

Sequences producing significant alignments		Download	Select columns	Show	100			
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) - G1 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	7LOP_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	4BUQ_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	4BVO_A
<input checked="" type="checkbox"/> Chain AAA, Neurotensin receptor type 1, DARPin, HRV 3C protease recognition sequence [synthetic construct]	synthetic construct	488	488	76%	8e-171	77.12%	482	6Z4S_AAA

Рис. 2 Выдача Protein Blast

Первые две находки больше всего совпадают с последовательностью исходного белка и принадлежат белкам человека. Структура 6OS9_R находится в комплексе с аналогом лиганда - JMV449 (KKPYIL, отличается от истинного пептида 2-мя а.о., которые не участвуют в заякоривании), гетеротримерным белком G1 и белком scFv16, который стабилизирует комплекс [1]. Ее разрешение составляет 3 Å. В 6OS9_R внесена мутация A85L, чтобы улучшить экспрессию белка в Sf9 клетках насекомых. Эта мутация не влияет на структуру или функцию рецептора так как располагается на поверхности структуры вдали от кармана связывания.

Вторая структура рецептора - 6PWC_R образует комплекс с истинным лигандом и аррестином 2. Однако ее разрешение - всего 4 Å. Как следствие, положение атомов лиганда частично не определено. В связи с этим было решено все-таки использовать структуру 6OS9 с аналогом лиганда, но с хорошим разрешением.

Рассмотрим предложенные мутации в структуре 6OS9:

1) L198R

Лейцин расположен в петле (скорее всего в реальности в альфа-спирали) на поверхности рецептора. Он ни с чем не взаимодействует и находится вдали от кармана связывания (Рис. 3). Поэтому можно предположить, что замена окажется нейтральной.

Однако для рецептора, как для мембранного белка характерно гидрофобное окружение мембраны. Лейцин является гидрофобной аминокислотой, а аргинин это гидрофильная заряженная аминокислота. Следовательно на первый взгляд нейтральная замена может привести к ухудшению заякоривания рецептора в мембране.

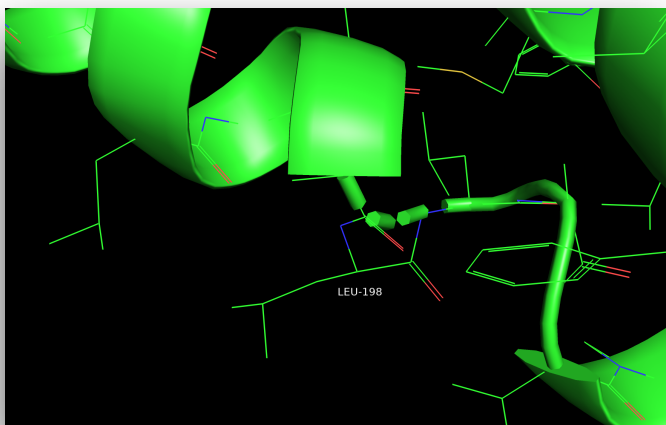


Рис. 3 Лейцин 198 в структуре 6OS9_R

2) R323H

Аргинин в позиции 323 расположен недалеко от лиганда, однако напрямую с ним не взаимодействует. Он образует водородную связь с аспарагином (Рис. 4).

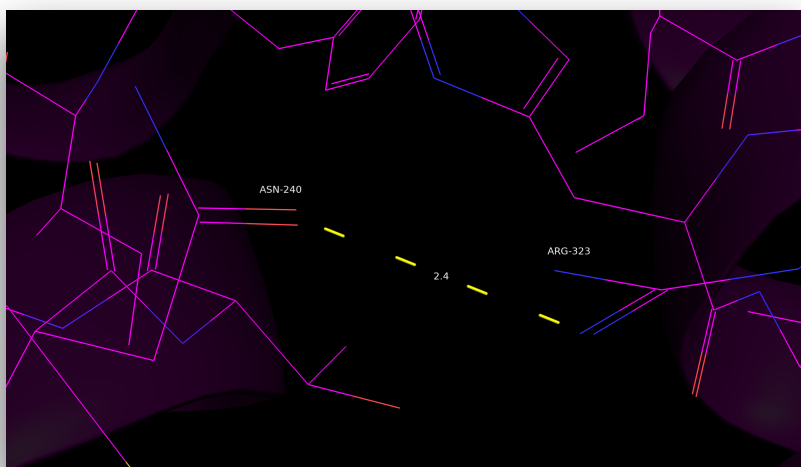


Рис. 4 Аргинин 323 в структуре 6OS9_R образует водородную связь с ASN-240.

Заменим теперь аргинин на гистидин. Из восьми предложенных ротамеров я выбрала тот, для которого strain был наименьшим - 23. Даже для лучшего ротамера клэшей было достаточно много. Поэтому далее с помощью wizard - sculpting, я проверила, может ли структура так измениться, чтобы пропали клэши. Перестройка оказалась действительно возможной. Гистидин в позиции 323 можно вписать в структуру вместо аргинина.

Посмотрим, какие взаимодействия характерны для гистадина (Рис. 5). Он образует слабый солевой мостик с лейцином лиганда, за счет того, что С-конец пептида заряжен отрицательно.

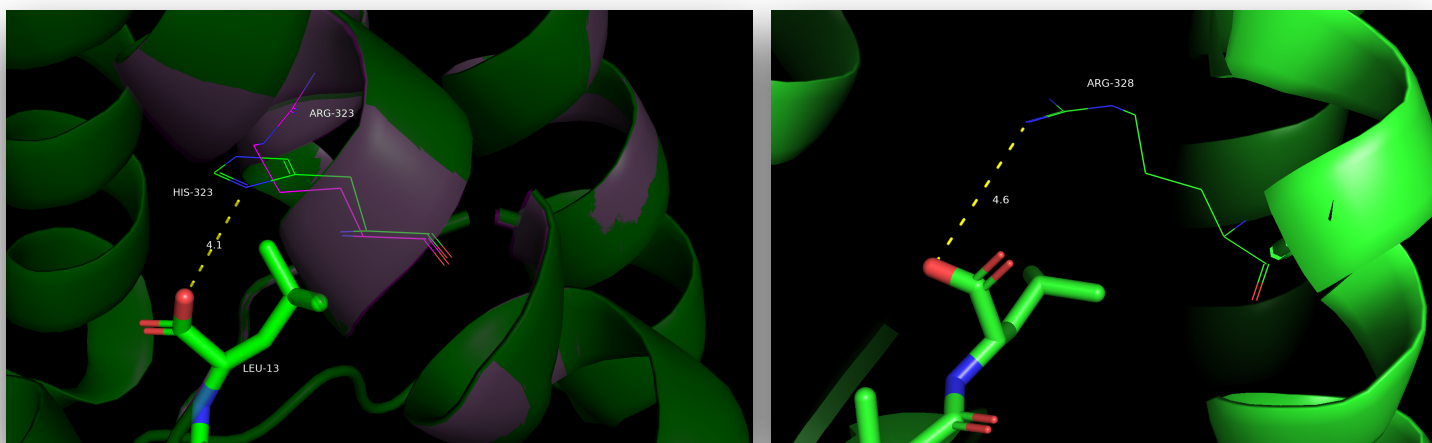


Рис. 5 **Слева:** Гистидин 323 (покрашен в зеленый) в структуре 6OS9_R образует солевой мостик с лейцином лиганда. **Справа:** Аргинин 328 в структуре 4XES образует солевой мостик с лейцином лиганда.

Однако вывод о том, что данная мутация приведет к улучшению связывания лиганда поспешна. Если обратиться к структуре 4XES из выдачи (Рис. 2) с разрешением 2.6 Å, то можно убедиться в том, что аргинин также способен образовывать солевой мостик при изменении конформации. Несмотря на то, что взаимодействия с аргинином слабее, это компенсируется бОльшей склонностью этой аминокислоты иметь заряд.

Кроме того, на место радикала аргинина придет вода так как там образуется полость. При этом снизится энтропия и немного ухудшится связывание. Поэтому в целом можно говорить о слабом отрицательном эффекте данной мутации.

3)Y339A

Тирозин 339 выстилает карман связывания, но с лигандом не взаимодействует. Он образует слабую пи-катионную связь с гистидином (Рис. 6). Если произвести замену на аланин, связь, конечно, пропадет. Это приведет к снижению жесткости кармана связывания.

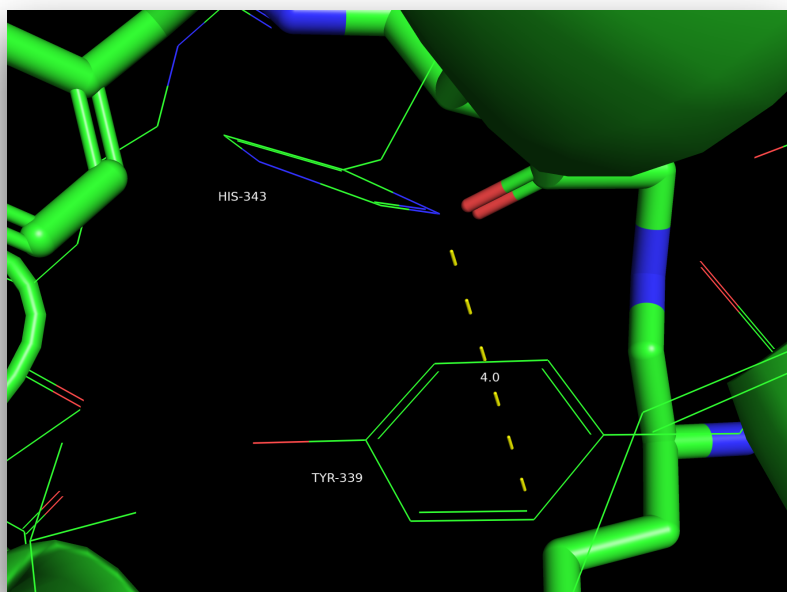


Рис. 6 Тирозин 339 в структуре 6OS9_R образует слабое пи-катионное взаимодействие с гистидином 343.

[1] Hideaki e. Kato, Conformational transitions of a neurotensin receptor 1–G_{i1} complex