

Структурные выравнивания. Структура/функция

Задание 1. PDBeFold.

В данном задании был дан PDB файл с приблизительными координатами какого-то белка. Нужно было определить, что это за белок и проанализировать его структуру и функцию и ответить на некоторые вопросы.

- Что это за белок? Как его уместнее всего назвать?

Проанализировав выдачу PDBeFold очевидно, что это фермент, выделенный из *E.coli* - биотин-карбоксилаза, так как первые 20 хитов, только с разными лигандами в комплексе.

- Какую функцию он скорее всего выполняет?

Этот белок является компонентом карбоксилазного комплекса ацетилкофермента А: сначала биотин-карбоксилаза катализирует карбоксилирование белка-мишени, а затем транскарбоксилаза переносит карбоксильную группу с образованием малонил-КоА. Ниже на рисунке 1 изображена реакция, катализируемая биотин-карбоксилазой. И согласно литературе, белок выполняет свою биологическую функцию только используя две субъединицы своего гомодимера сопряженно.

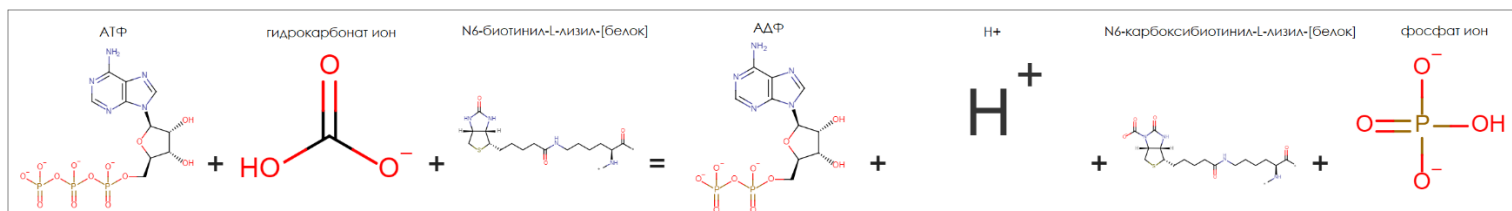


Рис.1. Реакция, катализируемая ферментом биотин-карбоксилазой.

- Какие кофакторы необходимы этому белку для функционирования? В каких местах они должны связываться?

Для функционирования, обе цепи фермента связывают ион Mg²⁺. Ниже, на рисунке 2 представлено изображение кофактора иона магния структуры 3G8C цепи В, связанного с аминокислотными остатками цепи А исследуемого белка.

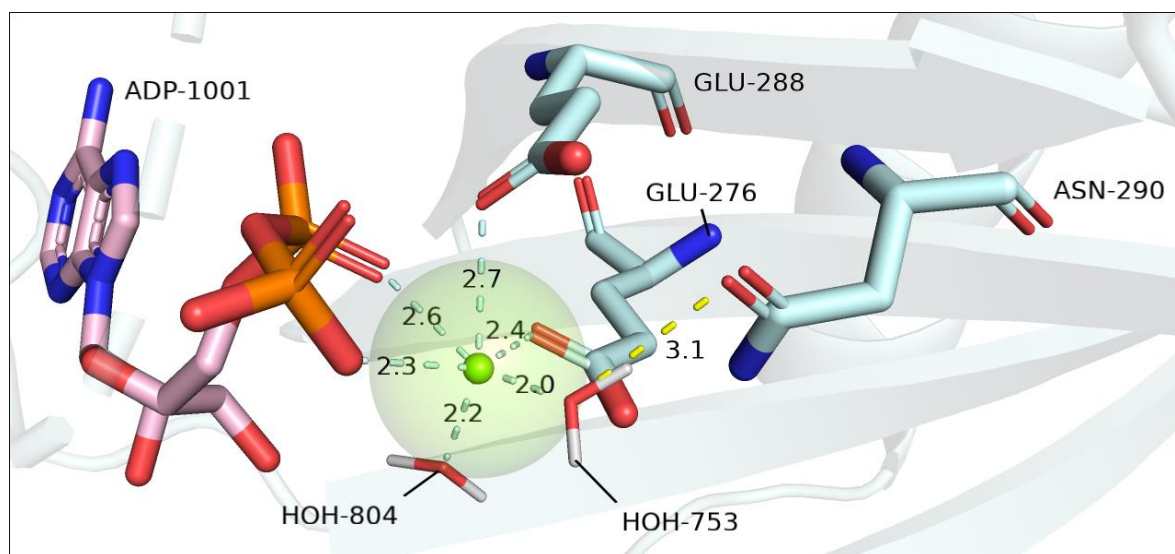


Рис.2. Структура 3G8C (содержит ион магния, молекулы воды, АДФ; показана розовым) наложенная на структуру исследуемого белка (показана голубым). Зеленым показан ион Mg²⁺; голубым показаны связи, координирующие ион магния, желтым показаны связи, стабилизирующие молекулы воды.

- Какой регион белка ответственен за предполагаемую функцию? Выделяются ли визуально в составе структуры отдельные домены?

Ниже, на рисунке 3 снизу показаны остатки, ответственные за каталитическую активность белка. Отлично видно, что в белке визуально выделяется три домена (обозначены разными цветами, рис. 3 сверху) и остатки активного центра располагаются в желобке между тремя доменами, где и выполняется каталитическая функция. Нужно отметить, что домен выделенный оранжевым является подвижным, и, при прохождении реакции, он закрывает желобок для превращения субстрата (как, собственно, показано на рисунке 3), а при завершении реакции, домен отодвигается и позволяет новому субстрату подойти.

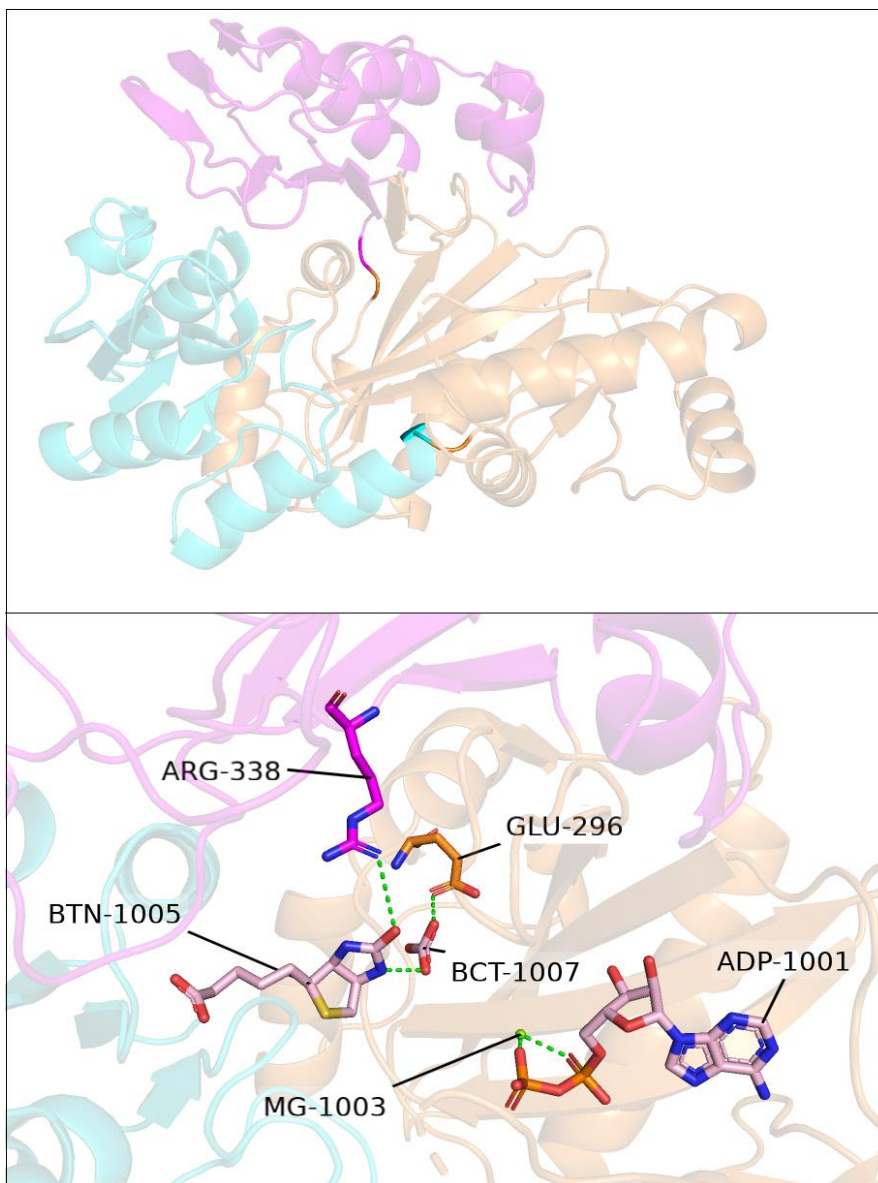


Рис.3. Структура 3G8C (показана светло-розовым) наложенная на структуру исследуемого белка (показана цветами доменов: оранжевым, голубым, малиновым). Зеленым показан ион Mg^{2+} . Сверху – три домена покрашены в разные цвета, ярким выделены переходы между доменами. Снизу – в желобке между доменами показаны каталитические остатки и субстрат каталитической реакции (подписаны на рисунке).

Интересно, что не совсем очевидно, какая стадия реакции изображена на рисунке выше. Можно заметить, что на картинке виден ион HCO_3^- , который образует связи с биотином и GLU-296, однако в то же время, вместо АТФ в структуре наблюдается АДФ. Если мы

посмотрим на стадии реакции, изображенные на рисунке 4 ниже, то заметим, что стадии, где одновременно есть гидрокарбонат ион и АДФ просто не может быть в связи с механизмом реакции. Таким образом, было обнаружено, что авторы специально добавили в структуру именно комплекс АДФ с ионом магния в реакцию: чтобы понять, как в действительности располагается АТФ при реакции (с моделировав дополнительный АМР биоинформатически), при этом не запустив ее (так как расстояние между бета-фосфатом и гидрокарбонат ионом сильно больше, чем должно быть между гамма-фосфатом и гидрокарбонат-ионом). Таким образом, в данной структуре наблюдается кокристаллизованный кофактор, кокристаллизованный субстрат и в каком-то смысле непротестируемый аналог субстрата, соответствующие стадии 1 на рисунке 4 ниже, однако с некоторыми описанными выше адаптациями.

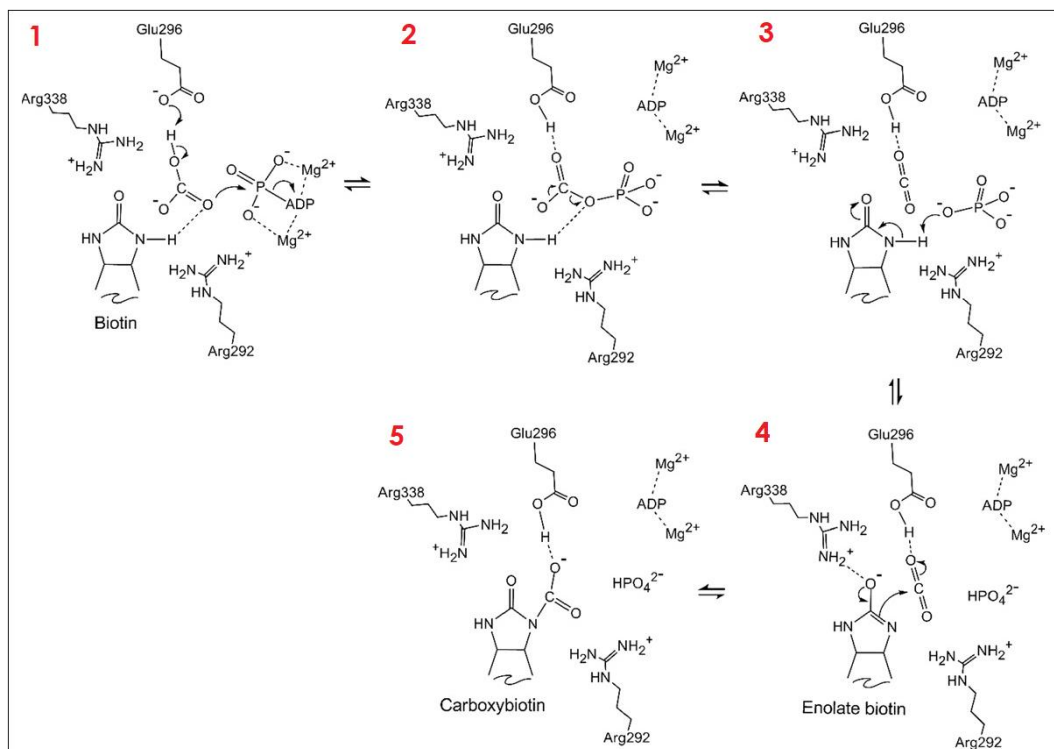


Рис.4. Механизм ферментативной реакции биотин-карбоксилазы, взят из [статьи](#) и адаптирован.

Из аналогичных примеров можно рассмотреть субстрат 2VR1 комплекса биотин-карбоксилазы *E.coli* с аналогом АТФ – АДФСФ₂Р (показан на рисунке 5 ниже). В данной статье авторы хотели показать каталитическую активность каждого из мономеров: АДФСФ₂Р показан связанным с одной субъединицей, тогда как другая субъединица не связана с лигандом. Субъединица с лигандом находилась в закрытой каталитической конформации, в то время как субъединица без лиганда находилась в открытой конформации, что и являлось свидетельством активности сайтов каждого мономера из гомодимерного комплекса по отдельности.

Можем заметить, что в данной ситуации непосредственно субстрат не присутствует в структуре, а вот модифицированный непротестируемый аналог субстрата АТФ показан розовым цветом на рисунке 5 ниже. Здесь мостиковый кислород между бета- и гамма-фосфатами в АТФ заменен на углерод с двумя атомами фтора. Отметим, что он занимает практически то же положение, что и АДФ, однако тут есть один дополнительный фосфат и расстояние между гидрокарбонат ионом и модифицированным АТФ уместно для проведения реакции, однако за счет замены мостикового кислорода на углерод, это невозможно.

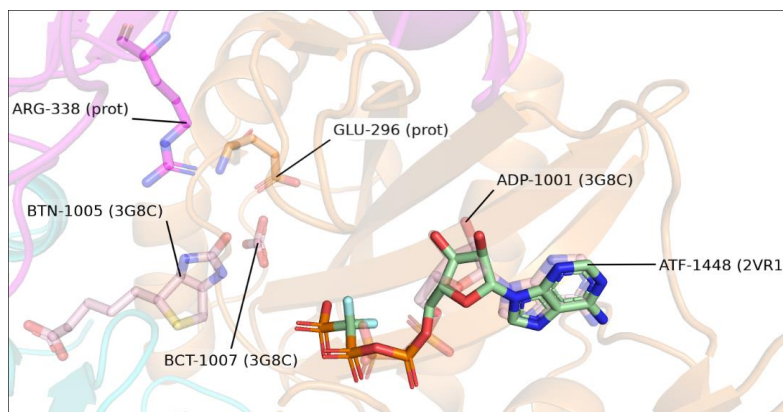


Рис.5. Наслоение структур 3G8C (показана розовым, прозрачная), 2VR1 (показана зеленым, яркая) и структуры исследуемого белка (покрашена по цветам доменов). Атомы фтора обозначены голубым.

Нужно отметить, что при поиске других информативных комплексов, в основном были найдены комплексы с ингибиторами, занимающими место комплекса АТФ с ионом магния, которые стабилизировались за счет колец, аналогичных пуриновому кольцу АТФ (то есть множество непротестированных аналогов субстрата). Комплексов с аналогом переходного состояния и с продуктами реакции обнаружено не было.

Ниже на рисунке 6 сверху приведен еще один пример непротестированного аналога субстрата АТФ, у которого мостиковый кислород между бета- и гамма-фосфатами в АТФ заменен на азот, за счет чего реакция не идет, так как невозможно отцепить фосфат, да и повернут хвост из фосфатов в сторону от субстрата. А на рисунке 6 снизу показан уже полноценный кокристаллизованный субстрат, однако в белок (структура 1DV2) внесена мутация E288K, и NZ атом лизина занимает место иона магния, без которого реакция невозможна. Структура 3G8C оказалась единственной, содержащей субстрат, в связи с чем, на всех изображениях приводится сравнение параллельно с ней для понимания расположения других молекул относительно субстрата.

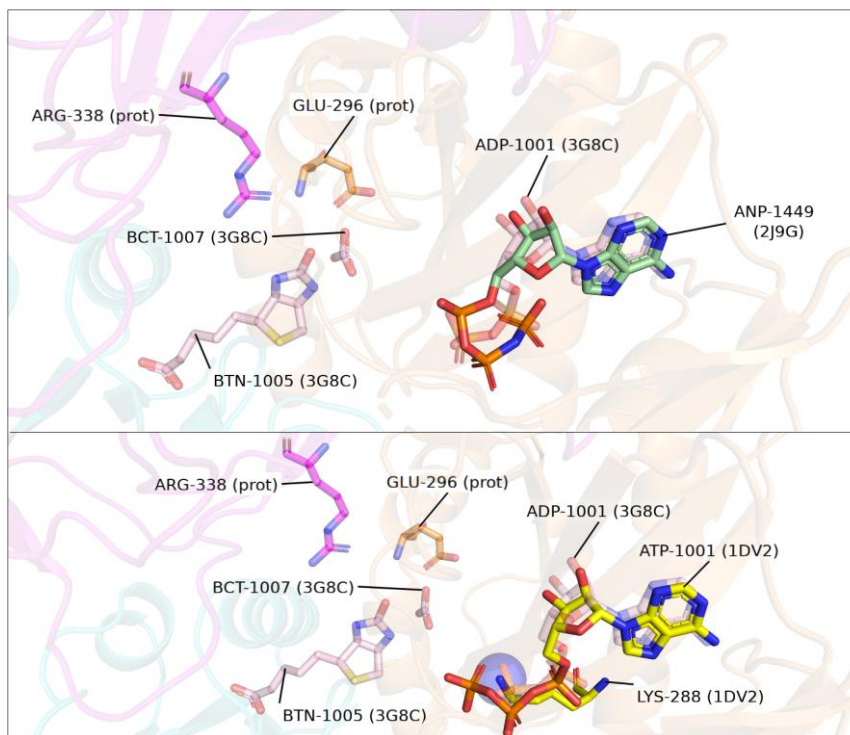


Рис.6. Сверху: наслоение структур 3G8C (показана розовым, прозрачная), 2J9G (показана зеленым, яркая) и структуры исследуемого белка (покрашена по цветам доменов). Снизу:

наслоение структур 3G8C (показана розовым, прозрачная), 1DV2 (показана желтым, яркая) и структуры исследуемого белка (покрашена по цветам доменов).

Далее обсудим, как реализуется функция исследуемого белка на структурном уровне. Для начала следует отметить, что, по-видимому, сборка исследуемого белка не соответствует биологической, так как свою функцию белок в норме выполняет в виде гомодимера. Выше уже обсуждался молекулярный механизм катализа биотин-карбоксилазой (показан на рисунке 4 выше). Теперь обсудим более глобальные структурные перестройки в ферменте, приводящие к ферментативной реакции. При исследовании [структуры](#) 1DV2, упомянутой выше, изображенной на рисунке 5, уже было показано, что биотин-карбоксилаза (или ВС домен фермента ацетил-КоА карбоксилазы) подвергается значительному перемещению для закрытия активного сайта при связывании АТФ, далее, при исследовании [структуры](#) 3G8C, было показано, что В домен, изображенный на рисунке 7А ниже, расположен еще ближе к активному центру, что соответствует примерно повороту на 7° по сравнению с таковым в комплексе АТФ. Тем не менее, даже с этим дополнительным движением, активный центр все равно подвергался действию растворителя (рисунок 7В). Было также обсуждено, что в реакции с природным субстратом ВССР-биотином (так обозначается белок, связанный с биотином через остаток лизина, см. рисунок 1), ВСР может помочь скрыть активный сайт, что может объяснить, почему ВСР-биотин является гораздо лучшим субстратом для биотин-карбоксилазы, чем просто биотин. Собственно, при движении В-домена, показанного на рисунке ниже (ранее на изображениях он был покрашен в оранжевый цвет: напомним, что именно в нем связывается комплекс АТФ с ионом магния в норме), гамма-фосфатная группа АТФ в комплексе с ионом магния сближается с бикарбонат ионом, а далее протекает реакция по механизму, изображенному на рисунке 4, начиная со стадии 1.

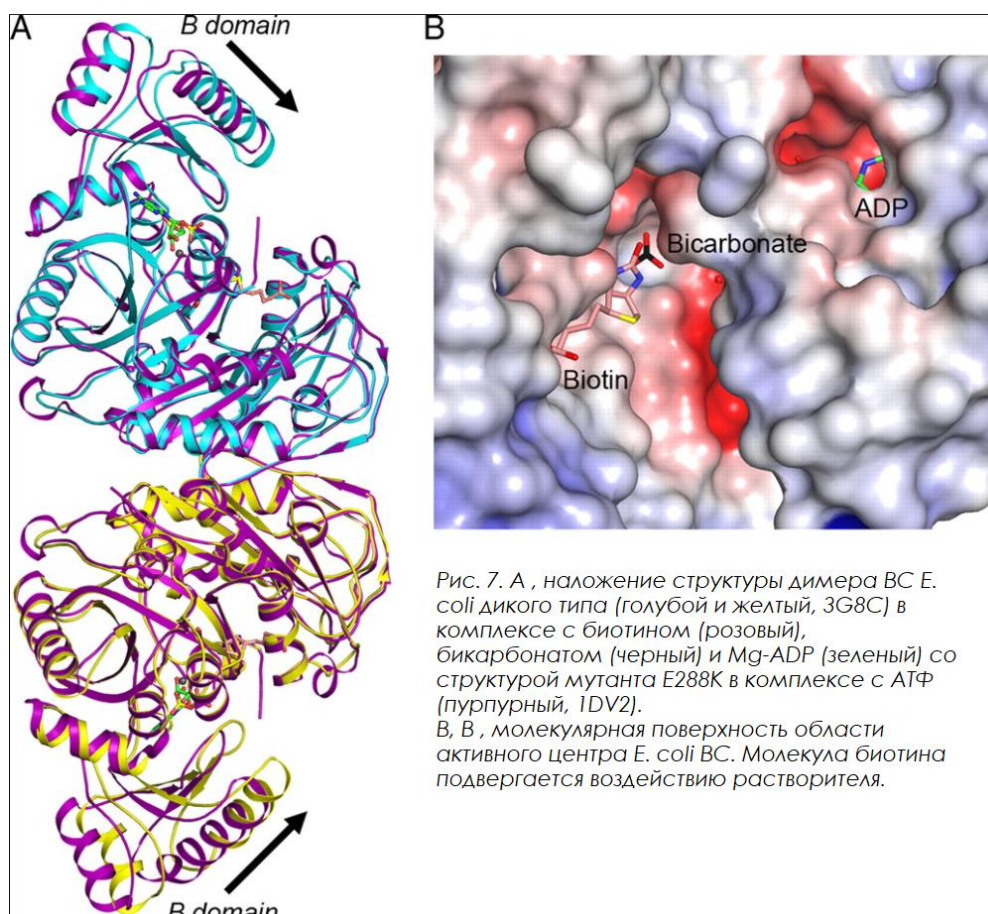


Рис. 7. А, наложение структуры димера ВС *E. coli* дикого типа (голубой и желтый, 3G8C) в комплексе с биотином (розовый), бикарбонатом (черный) и Mg-ADP (зеленый) со структурой мутанта E288K в комплексе с АТФ (пурпурный, 1DV2). В, В, молекулярная поверхность области активного центра *E. coli* ВС. Молекула биотина подвергается воздействию растворителя.

А далее происходит процесс, показанный на рисунке 8 ниже. Собственно, по завершению реакции, В-домен раскрывается и ВСР (biotin carrier protein) перебрасывает свой карбоксилированный биотин на транскарбоксилазу с помощью гибкого шарнира между остатком лизина и биотином.

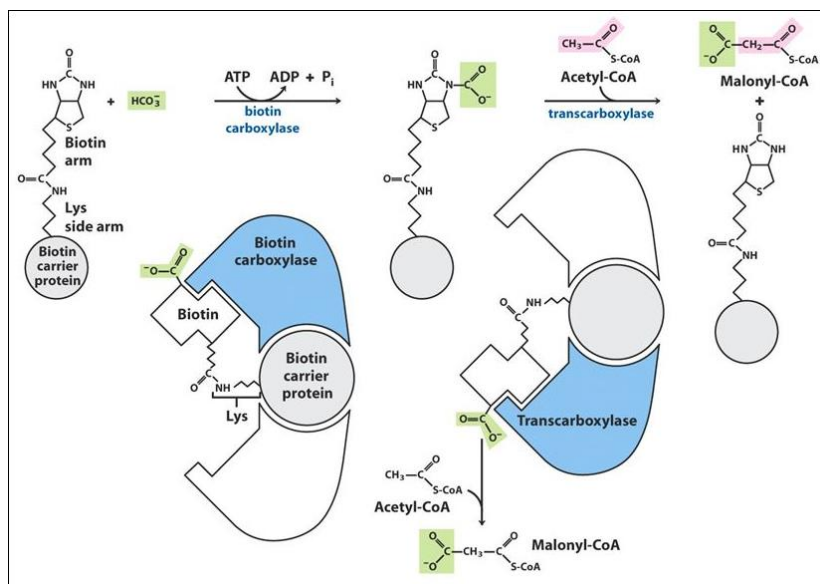


Рис.8. Механизм работы ацетил-КоА-карбоксилазного комплекса (картинка взята с просторов интернета).

Далее была произведена разметка на домены с помощью сервиса CATH для структуры, имеющей самое большое сходство с исследуемым белком 2VR1. CATH разделил каждый из мономеров гомодимера на 3 домена, как и было сделано ранее, однако визуально они совершенно не совпали (см. рисунок 9 ниже).

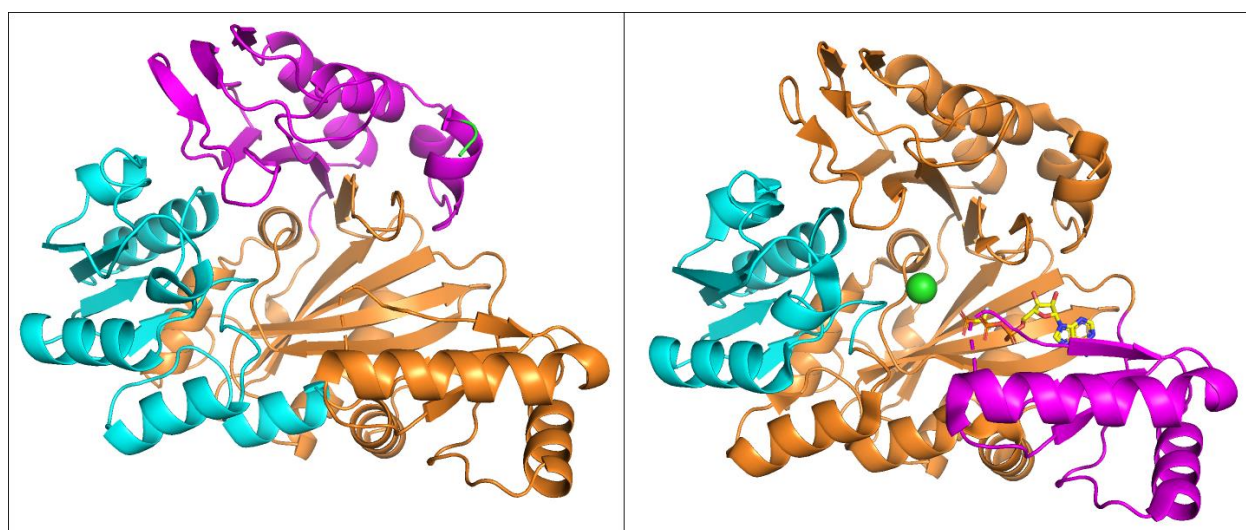


Рис.9. Слева показана структура исследуемого белка, размеченная визуально. Справа показана структура лучшей выдачи PDBFold, размеченная с помощью CATH (2VR1).

Голубой домен имеет позицию 3.40.50.20 на уровне 'Homologous superfamily' в классификации CATH и не имеет названия, принадлежит топологии 'Rossmann fold'. Оранжевый домен имеет позицию 3.30.470.20 на уровне 'Homologous superfamily' и называется 'ATP-grasp fold, B domain'. Розовый домен имеет позицию 3.30.1490.20 на уровне 'Homologous superfamily' и называется 'ATP-grasp fold, A domain'. Теперь абсолютно логичным выглядит сближение АТФ с гидрокарбонат ионом при ферментативной реакции, так как А- и В-домены работают по принципу немного похожему на прищепку, что также подкреплено и обсуждалось данными из литературы выше.

Задание 2. Функциональный мотив.

В данном задании с помощью выставления определенных параметров PDBdFold нужно было найти два белка, разделяющих с Query (2VR1) не более 35% идентичности по последовательности и выполняющих другую функцию. Было обнаружено два белка:

- N5-карбоксиаминоимидазорибонуклеотид-синтетаза (4DLK, 3V4S). Она имела 20% схожести по последовательности с Query. В отличие от биотин-карбоксилазы, которая принадлежит классу лигаз, этот фермент принадлежит классу лиаз. В качестве субстрата этот фермент также использует комплекс АТФ с ионами магния и также использует гидрокарбонат ион для карбоксилирования, однако переносится он не на биотин, а на аминоксидазорибонуклеотид (АИР) по достаточно схожему механизму. Этот фермент также функционирует в форме гомодимера и каждый из мономеров делится сервисом CATH на 3 абсолютно тех же домена, что и биотин-карбоксилаза: первый домен имеет позицию 3.40.50.20 на уровне 'Homologous superfamily' в классификации CATH и не имеет названия, принадлежит топологии 'Rossmann fold'; второй домен имеет позицию 3.30.470.20 на уровне 'Homologous superfamily' и называется 'ATP-grasp fold, B domain'; третий домен имеет позицию 3.30.1490.20 на уровне 'Homologous superfamily' и называется 'ATP-grasp fold, A domain'.
- PufT-кодируемая глицинамидрибонуклеотид-трансформилаза (1KJ8). Она имела 18% схожести по последовательности с Query. Этот фермент принадлежит классу трансфераз. В качестве субстрата этот фермент также использует комплекс АТФ с ионами, однако для карбоксилирования используется HCO_2^- ион и переносится он на глицинамидрибонуклеотид (ГАР) с немного отличающимся механизмом за счет различия в гидрокарбонат ионе и HCO_2^- . Фермент представлен в виде гомодимера и каждый из мономеров делится CATH на ровно те же самые три домена, как и в первом случае.

Итак, был выделен функциональный мотив, присутствующий у всех белков и несколько специфических для каждого белка (см. рисунок 10 ниже). Общим для всех белков оказался мотив с B-loop (показан фиолетовым). Функция этой петли заключается в том, что при присутствии субстрата (АТФ), она захлопывается и не дает ему выйти, попутно стабилизируя водородными связями. Можем заметить, что одинаковым стабилизирующим компонентом у всех структур является остаток глицина (в случае 1KJ8 также стабилизируется аргинином и серином). В основном петля представлена повторами глицинов или серинов. Также из общих был визуально интуитивно выделен мотив P-loop, однако показать его участие в стабилизации субстрата не удалось: возможно, он играет какую-то другую роль в прохождении ферментативной реакции.

Что касается специфических мотивов для каждого из белков, хотелось бы особенно выделить Q-loop у 1KJ8 (покрашена в желтый), остатки которой по сравнению с также специфической ABC-loop у 3G8C (покрашена в оранжевый) гораздо сильнее и специфичнее стабилизируют субстрат (остатки белка так геометрически расположены, что субстрат туда идеально входит). Согласно [литературе](#), ABC-loop является достаточно подвижной и специфичность ее связывания не такая сильная. Из интересного также можно отметить J-loop (у 3G8C и 3V4S, покрашена голубым), стабилизирующая гидрокарбонат ион. Нужно отметить, что для это цепи характерно наличие аргинина. Заметим, что у биотин-карбоксилазы гидрокарбонат ион стабилизируется гораздо большим количеством взаимодействий. Как уже говорилось выше, PufT-кодируемая глицинамидрибонуклеотид-трансформилаза связывает не гидрокарбонат ион, а ион HCO_2^- , который, по-видимому, стабилизируется совершенно иначе, в связи с чем в ее структуре нечто похожее на J-loop выделить не удалось. Стоит также отметить A-loop, которая стабилизирует субстраты в структурах 3G8C и 1KJ8: в случае 3V4S, A-loop не была выявлена по причине отсутствия основного карбоксилируемого субстрата АИР, про который говорилось выше.

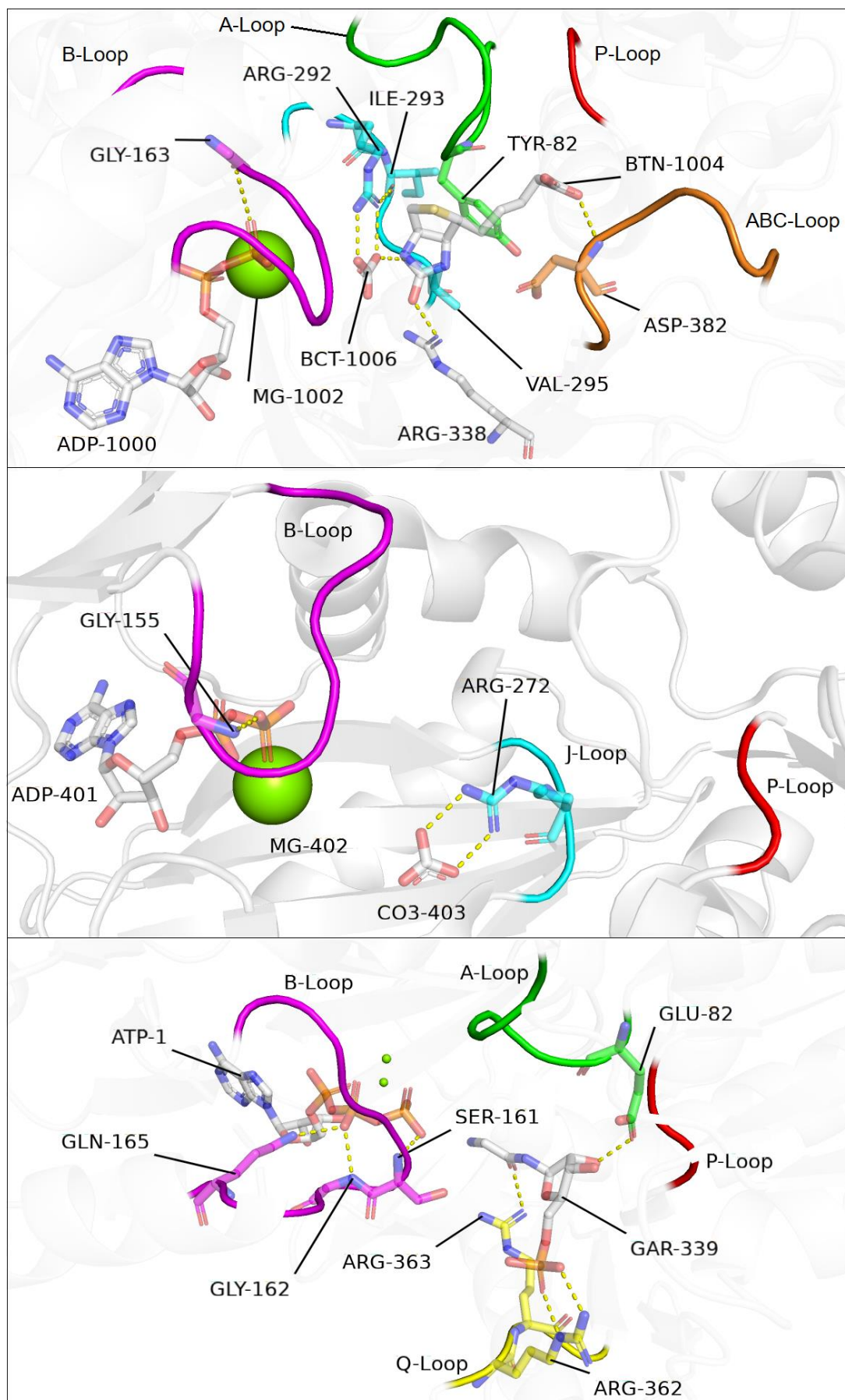


Рис.10. Сверху – 3G8C (биотин-карбоксилаза), посередине - 3V4S (N5-карбоксиаминоимидазолрибонуклеотид-синтетаза), снизу – 1KJ8 (PutT-кодируемая глицинамидрибонуклеотид-трансформилаза). Одинаковые петли помечены одинаковыми цветами.

