

# Практикум № 9. Структура и функция

## 1 Введение

В данном задании нужно попытаться предсказать эффект от точечной замены на функционирование белка.

Му Uniprot ID : U3I0J4

and mutations: V399R Y417F S371C

Рассматриваемый белок - Калиевый канал из подсемейства А (Potassium voltage-gated channel subfamily A member 2) из утки кряквы (*Anas platyrhynchos platyrhynchos*)

Белок представляет из себя тетрамер и имеет межмембранный домен и внутриклеточный домен. В состав канала также практически всегда входит NAD-связывающий домен (цепь А), которая в данном практикуме не рассматривается (нижнее утолщение на картинке).

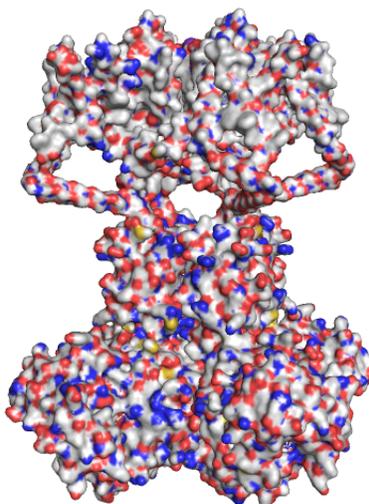


Рис. 1: Поверхность канала

На рисунке 1 видно, что посередине есть просвет - этот просвет есть с

четыре стороны и находится он непосредственно под мембраной. Судя по всему, именно так ионы калия и попадают изначально внутрь канала.

Канал пропускает калий из внутриклеточной среды наружу. При этом сначала происходит отбор на положительный ион, а потом есть фильтр, который распознает именно ионы калия. Внутри канала имитируется калиевая водная шуба, причем остатки остовов глицинов, входящих в альфа-спирали, формирующих пору расположены точно также как расположены молекулы воды, когда калий их координирует в растворе.

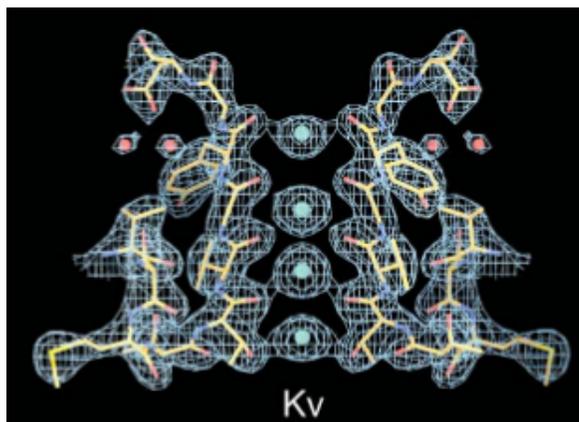


Рис. 2: Имитация водной шубы калия из Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., MacKinnon, R. (2007)

Так и происходит отбор именно ионов калия - гидратная шуба натрия больше, поэтому он в этот канал не пролезает (что может показаться странным, так как радиус калия больше, но тут важна именно гидратная шуба).

Интересно рассмотреть строение межмембранного домена - он состоит из нескольких спиралей, часть из которых образуют пору для калия (спирали S5 и S6), а остальные - сенсор напряжения, который меняет свою конформацию в зависимости от напряжения на мембране. Подробнее механизм закрытия канал рассмотрим ниже.



### 3 Мутации

#### 3.1 V399R

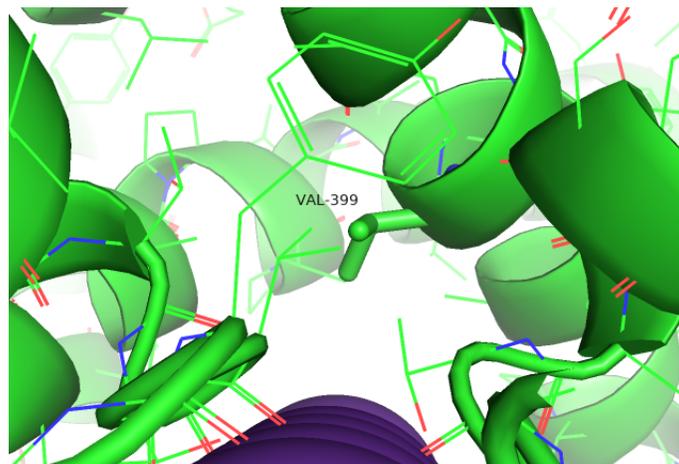
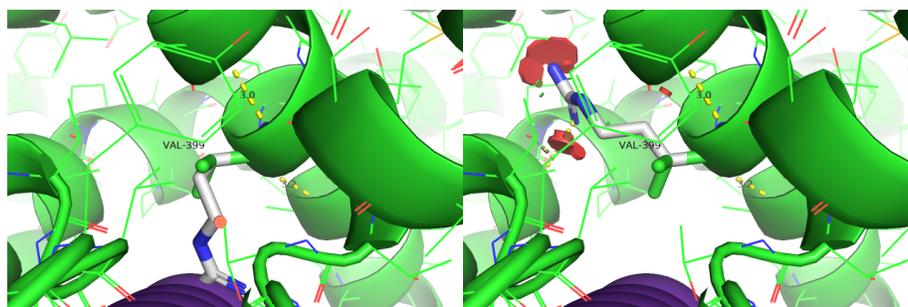


Рис. 4

Валин 399 находится в спирали S6, которая вместе со спиралью S5 составляет оболочку поры, по которой проходит калий. В этом месте восемь спиралей (по две от каждого из элементов тетрамера) тесно расположены друг к другу. Валин смотрит немного в сторону от просвета самой поры и окружен гидрофобными остатками. Поэтому вполне можно ожидать, что мутация в этом валине может привести к достаточно заметным последствиям.



(a) Аргинин заврывает пору

(b) Внутри гидрофобной области

Рис. 5: Различные конформации мутированного аргинина

Действительно, Strain для каждого из конформеров оказался более 300, что показывает, что остатки в этом месте расположены густо, и уместить туда

аргинин, не сломав сильно вторичную структуру, невозможно. Даже если получится как-нибудь вписать в это место аргинин и не перегородить пору, то положительный заряд в стенке поры может отпугивать ион калия.

Более того, некоторые из ротамеров вообще перегородивают пору канала.

Итого, я думаю, что если ввести такую мутацию в белок, то пора канала не сможет образоваться в таком виде, чтобы правильно функционировать. Даже если альфа спирали и соберутся пространственно похоже на нативную структуру, то пора будет либо перегороджена, либо слишком широкой, либо положительно заряженной, чтобы пропускать через себя калий.

### 3.2 Y417F

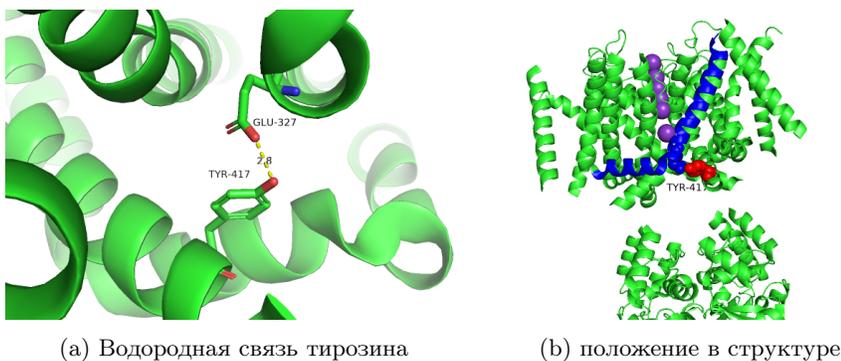


Рис. 6: Положение Y417 в структуре. Синим покрашены спирали S4 (длинная) и S4-S5 линкерная спираль (лежит на боку) близь места соединения которых расположен глутамат 327, тирозин показан красными сферами.

Тирозин находится на самом конце S6 спирали, и как мне кажется, взаимодействует с глутаматом. Замена тирозина на фенилаланин означает убиране водородной связи между этими двумя остатками.

Мне кажется, что отсутствие водородной связи в этом месте может быть критичным, потому что возможно повлияет на способность канала открываться и закрываться.

Хотя механизм открытия и закрытия канала до сих пор не слишком изучен, потому что не было получено закрытой структуры, кажется, что S4-S5 спираль служит своеобразным передатчиком от ионных сенсоров, и механически провоцирует закрывание и открывание канала.

Таким образом эта замена наверное отрицательно скажется на функции, однако провести такой мутагенез интересно с точки зрения изучения механизма открытия и закрытия канала.

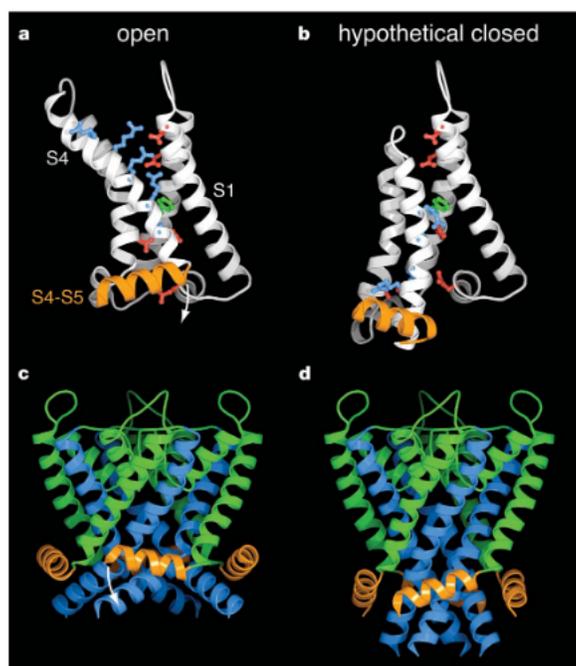


Рис. 7: Из: doi:10.1038/nature06265. а, Показаны сенсоры напряжения и S4–S5 линкерная спираль из кристаллической структуры 2g9g ионного канала в открытой конформации. Внеклеточная среда - сверху изображения. Важные остатки сенсора напряжения показаны шариками, красными - отрицательно заряженные, синими - положительно заряженные. б, Гипотеза о структуре в закрытом состоянии. Спиральи S1 и S2 сохраняют положение, в то время как линкер S3–S4 сдвинут внутрь. Положительные заряды на S4 теперь находятся ближе к внутреклеточной среде и стабилизируются отрицательно заряженными остатками. (а). Внутремембранное смещение S4 спирали толкает N-конец S4–S5 линкера и он наклоняется в сторону внутриклеточной среды, толкает S5 и S6 спираль и закрывает пору. с, Открытое состояние поры, S4–S5 линкер (показан оранжевым), взаимодействует с S6 спиралью (показана синим) вблизи внутриклеточной среды. d, Гипотетическая модель конформации канала в закрытом состоянии, основана на закрытом состоянии бактериального канала (KcsA, PDB accession number, 1K4C)

Я приведу тут картинку из [статьи](#), в которой предполагается, что именно данное взаимодействие влияет на закрытие и открытие канала.

UPD: оказалось, что такую мутацию [вводили](#), что привело к значительному снижению силы ионного тока по сравнению с диким типом. Что в целом соответствует гипотезе!

### 3.3 S371C

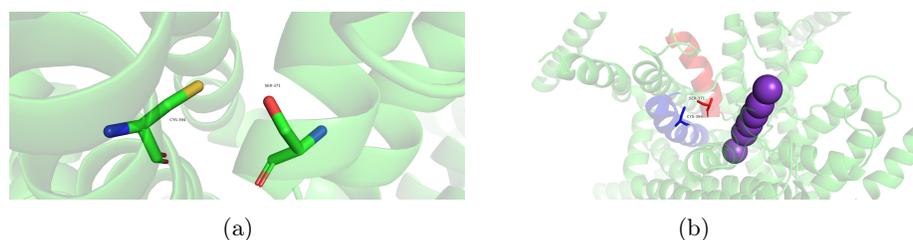


Рис. 8: Расположение S371 и C394

Как видно на рисунке 5, серин 371 находится рядом с цистеином 394. Так что можно предположить, что такая замена приведет к образованию в этом месте SS-мостика. Я не думаю, что это положительно скажется на структуре: во-первых это может повернуть спирали S5 (показана красным) и S6 (показана синим), жесткое позиционирование которых важно для правильного расположения калий-узнающей поры. Также, как уже обсуждалось ранее, эти петли могут быть задействованы в движениях, приводящих к открытию и закрытию канала, что конечно, не очень хорошо.

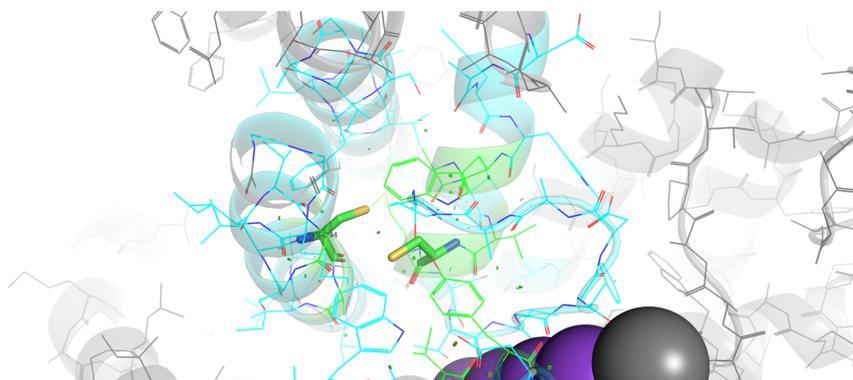


Рис. 9: Sculpture для серина.

Если же считать, что не произойдет образования SS мостика, то цистеин может вполне спокойно уместиться на месте серина. Даже для странного ротамера видно, что не сильно изменяется строение канала.

## 4 Благодарности

Хочу поблагодарить Иосифа Финкельберга, которому достался такой же белок, за обсуждение практикума, особенностей строения и функционирования белка в целом, а также замены Y417F.