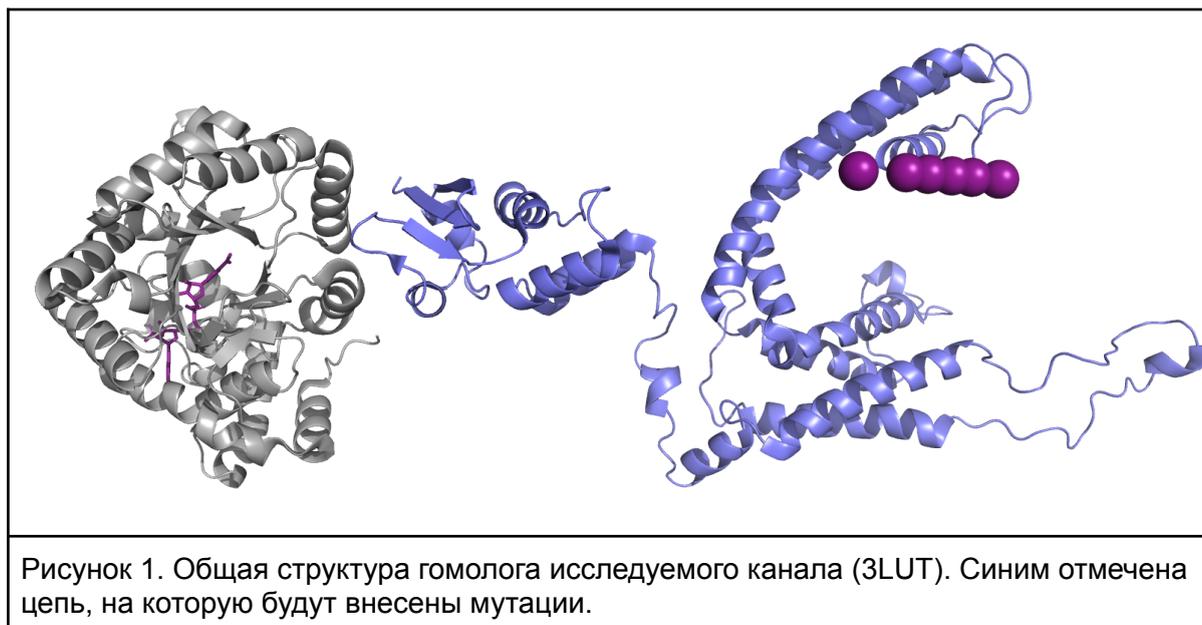


Введение

Ионные каналы играют огромную роль в жизнедеятельности прокариотических и эукариотических организмов. Огромную роль в клетке выполняют потенциал-зависимые каналы, которые участвуют в важных процессах передачи нервного импульса. Особенности строения и функционирования данных каналов были детально исследованы для прокариотических и эукариотических белков.

В рамках данной задачи работа будет проводиться на потенциал-зависимом калиевом канале Большого баклана, для которого необходимо будет оценить влияние нескольких аминокислотных замен на его физико-химические свойства и структурную организацию. Для данного канала структурная модель отсутствует, но мы можем найти максимально близкий к нему по аминокислотной последовательности белок, имеющий разрешенную структуру достаточно хорошего разрешения.

Наибольшее соответствие по аминокислотной последовательности наблюдается для канала, полученного из *Rattus norvegicus* (серая крыса). PDB-структура данного канала имеет разрешение 2.9Å (pdb-id: 2A79, структура получена методом рентгено-структурного анализа), что позволяет использовать ее для дальнейшей работы. Также структура получена вместе с двумя лигандами: непосредственно катионом калия и НАДФ (никотинамиддинуклеотидфосфат), что позволит оценить, повлияют ли введенные замены на эффективность связывания лигандов. Все замены будут “внесены” на субъединицу β . Стоит отметить, что в структуре цепи есть достаточно много неразрешенных участков, поэтому попробуем найти более качественную модель. Для *Rattus norvegicus* существует еще одна расшифровка структуры данного комплекса: 3LUT, имеющая такое же разрешение, несущая те же самые кофакторы, но с целой цепью β . Нумерация от нумерации UNIPROT не отличается, идентичность последовательностей – 97%.



Замена V381R

Данный аминокислотный остаток находится рядом с местом связывания катионов калия, поэтому некоторые мутации могут негативно повлиять на эффективность связывания катионов, тем самым либо нарушив, либо замедлив ионный транспорт.

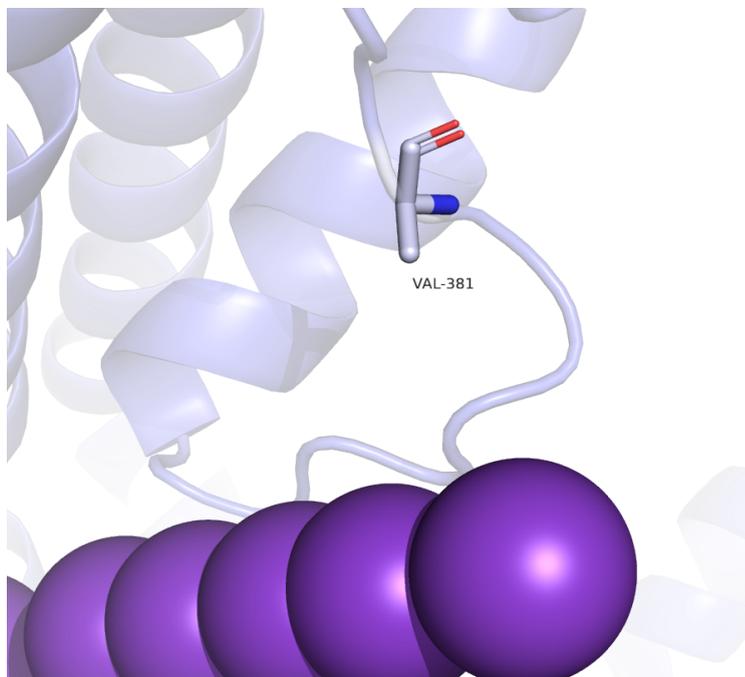


Рисунок 2. Положение нативной аминокислоты.

Боковой радикал исходной аминокислоты не принимает участие в формировании каких-то взаимодействий, а также имеет небольшой размер, что может быть необходимо для образования канала, размер которого будет соответствовать размеру катионов калия.

При замене данного остатка на аргинин, мы не видим серьезных перекрытий Ван-дер-Ваальсовых радиусов новой введенной группы с остатками окружения (как до, так и после скульптурирования данного остатка), поэтому можно предположить, что данная замена практически не повлияет на процесс фолдинга. Введенный положительный заряд также, вероятней всего, на этот процесс не повлияет: остаток располагается в петле, не участвует в формировании гидрофобного ядра; даже если этот эффект и будет, то скорее всего не очень значительным.

Однако данная замена может повлиять на эффективность связывания катионов калия: введение положительного заряда в относительной близости от места связывания катионов скорее всего будет иметь негативный эффект. Также стоит отметить, что введение крупного остатка аргинина может привести к стерическим трудностям связывания катионов, что также будет иметь негативные последствия.

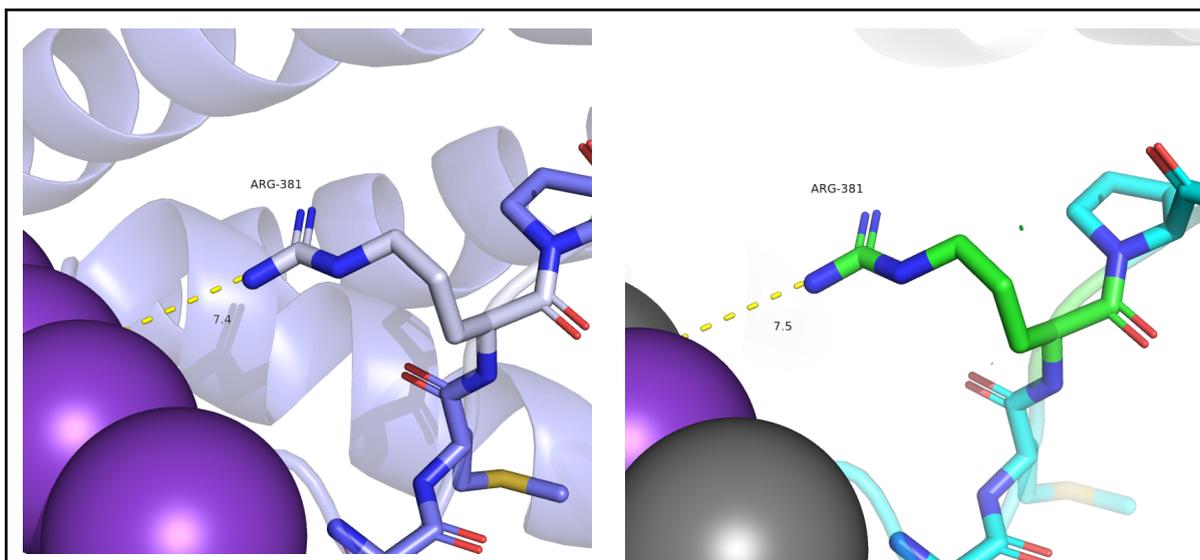


Рисунок 3. Гипотетическое положение введенной аминокислоты и расстояние от заряженного бокового радикала до катиона калия. Clash-перекрывания с соседними остатками.

Замена C394V

Данный аминокислотный остаток находится в зоне контакта трех α -спиралей рядом с участком связывания катиона калия, поэтому нарушения в организации этих спиралей друг относительно друга могут привести к невозможности связывания катиона. Нативный цистеин образует водородную связь с находящимся рядом остатком серина соседней спирали, серин же, в свою очередь, образует водородную связь с остовом внутри своей спирали.

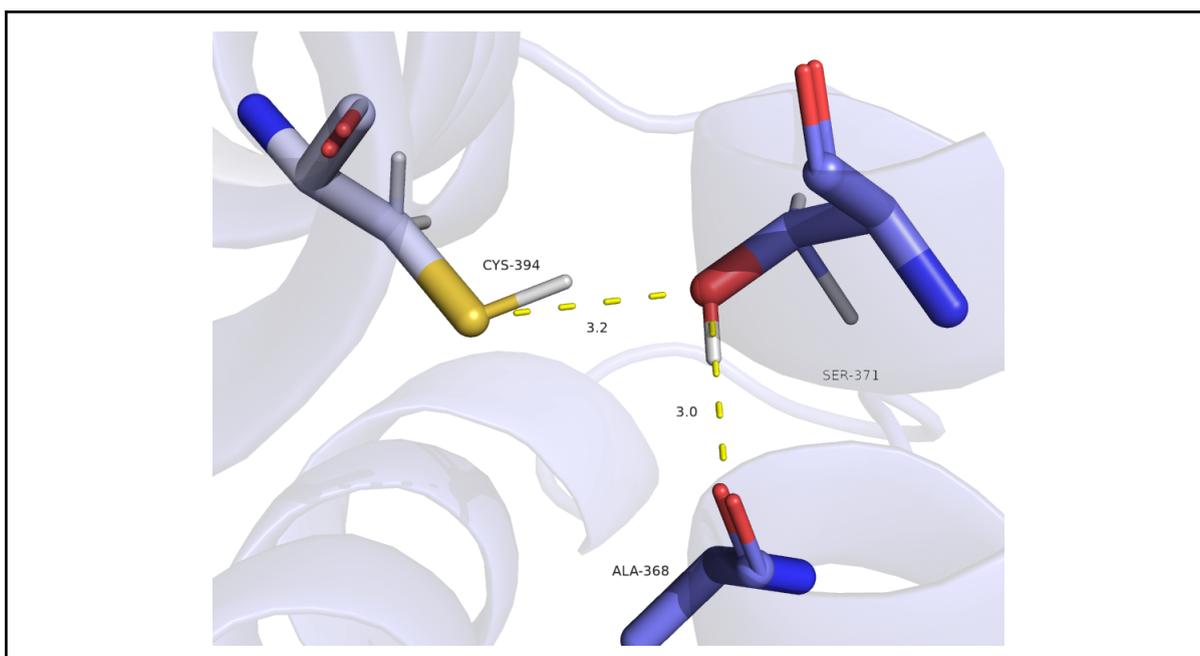


Рисунок 4. Положение водородных связей до внесения замены.

После внесения замены водородная связь, очевидно, пропадает, что может привести к нарушению взаимодействия между спиралями. Место взаимодействия обогащено гидрофобными остатками, поэтому спирали могут быть в первую очередь связаны с помощью гидрофобных взаимодействий, а данная водородная связь может играть второстепенную роль. Мы не наблюдаем перекрытия Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов, более крупный остаток помещается в полости, поэтому вероятность того, что данная мутация приводит к нарушению фолдинга, низка. В целом, стоит сказать, что данная мутация, скорее всего, будет нести нейтральный характер.

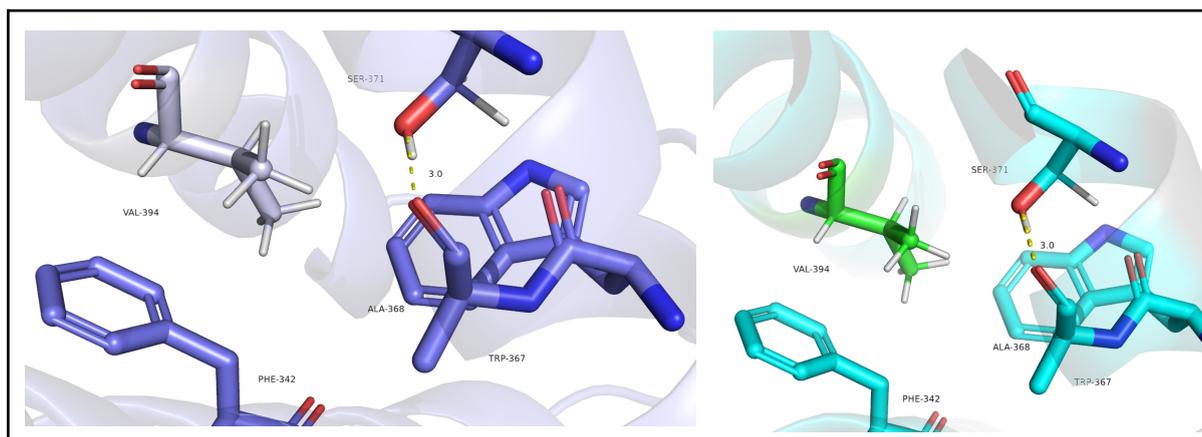


Рисунок 5. Гипотетическое положение введенной аминокислоты, ее окружение и сохранившаяся водородная связь. Clash-перекрытия с соседними остатками.

Замена S371C

В теории, данная мутация не должна значительно повлиять на фолдинг и свойства белка: цистеин сходным образом с серином образует водородные связи. Однако стоит отметить, что рядом с данным остатком находится остаток цистеина, с которым может образовываться дисульфидная связь.

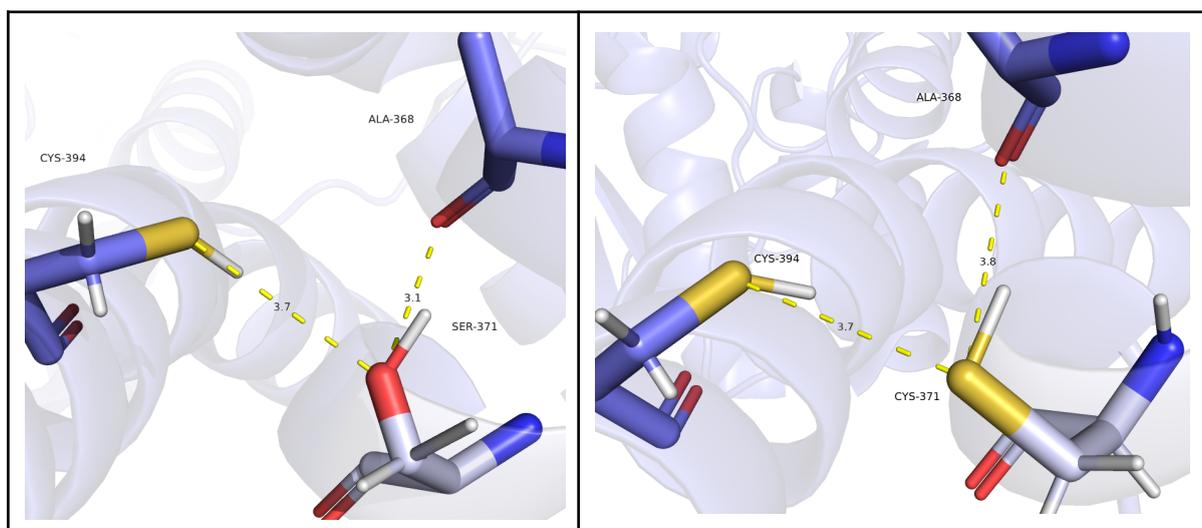
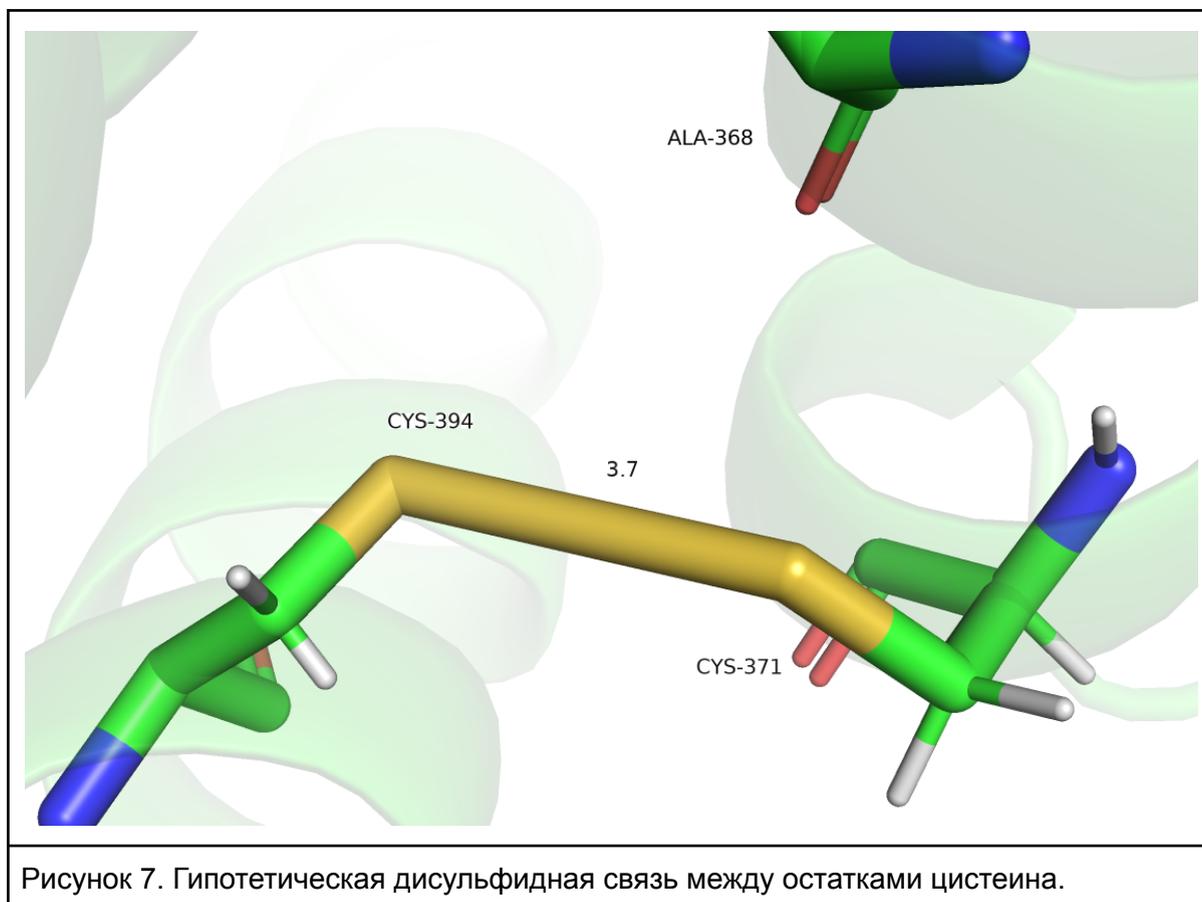


Рисунок 6. Расположение водородных связей до и после мутации.

Как и предполагалось, паттерн расположения водородных связей не изменяется; возможно, они становятся несколько более слабыми, однако все еще присутствуют в структуре. Между остатками цистеина теперь возможно образование дисульфидной связи.



Какие последствия может иметь формирование дисульфидного мостика? Можно предположить два варианта:

1. Если для нормальной ориентации катионов калия в данном домене необходима жесткая фиксация спиралей друг относительно друга, то такая ковалентная связь, очевидно, приведет к более эффективным и сильным взаимодействиям, тем самым немного улучшая ориентацию и, возможно, увеличивая скорость переноса
2. Если же данные петли при смене трансмембранного потенциала должны расходиться, то появление ковалентной связи может нарушить этот процесс, тем самым приводя к ингибированию процесса переноса катионов.

Если верно второе предположение, то мы ожидаем увидеть на поверхности взаимодействия спиралей какие-либо заряженные аминокислотные остатки, за счет которых может производиться “чувствование” мембранного заряда.

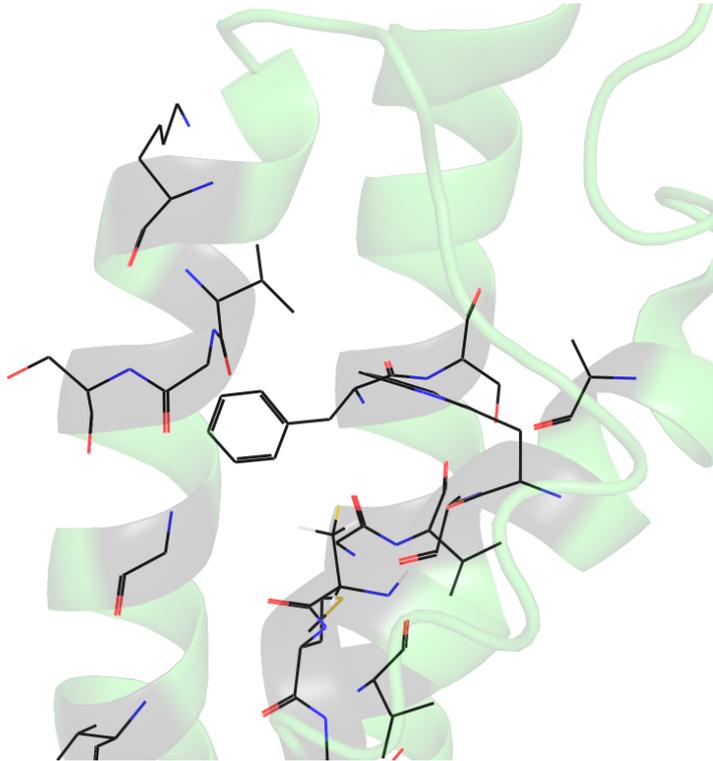


Рисунок 8. Остатки, лежащие в области взаимодействия спиралей.

В области взаимодействия в большом количестве располагаются гидрофобные остатки, что позволяет предположить, что данный домен не служит сенсором трансмембранного потенциала, а спирали в случае открытия канала не будут расходиться.

Это говорит в пользу гипотезы 1, так что такая аминокислотная замена может увеличить стабильность комплекса.

Дополнение: АТФ-синтаза, АДФ-ингибирование и остаток β Q259L

АТФ-синтаза F-типа состоит из двух комплексов: гидрофильного комплекса F_1 (около 350 кДа), который катализирует синтез или гидролиз АТФ, и гидрофобного мембранного комплекса F_0 (около 150 кДа), обеспечивающего перенос протонов через мембрану. Наиболее простое строение имеет бактериальная АТФ-синтаза.

Субъединичный состав АТФ-синтаз F-типа очень схож среди большинства групп бактерий. Комплекс F_1 состоит из пяти типов субъединиц в стехиометрии $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$.

Комплекс F_0 состоит из трех типов субъединиц в стехиометрии ab_2c_n , где n зависит от вида бактерии, и, например, для *E. coli* равно 10. $\alpha_3\beta_3$ -гексамер состоит из перемежающихся между собой субъединиц α и β и достигает 100 Å в диаметре.

Гексамер имеет форму тора, в полости внутри которого располагается субъединица γ .

Достаточно большая ее часть находится вне гексамера (выступает на 30 Å), тем самым эта субъединица является своеобразной “ножкой” внутри комплекса F_1 .

Выступающая часть субъединицы γ взаимодействует с комплексом F_0 , а также

субъединицей ϵ . Субъединицы γ и ϵ контактируют с с-кольцом, сопрягая процессы синтеза и переноса протона]. В сопряжении процессов синтеза/гидролиза АТФ и

переноса протонов также участвуют и субъединицы периферического стебля — димер из субъединиц b (в простейшем случае) и субъединица δ /OSCP. Субъединица δ располагается с другой стороны гексамера и взаимодействует с b_2 -димером.

$\alpha_3\beta_3$ -гексамер образует шесть сайтов связывания нуклеотидов, расположенных на поверхностях соприкосновения субъединиц α и β . С-концевой домен субъединицы ϵ некоторых бактерий также способен связывать АТФ.

Субъединица c в простейшем случае состоит из двух сильно гидрофобных α -спиралей, соединенных гидрофильной петлей, имеет молекулярную массу ~8 кДа и образует

гомоолигомер из 8-17 субъединиц. Гидрофильная часть субъединицы ϵ (петля Arg-(Gln/Asn)-Pro) участвует в присоединении комплекса FO к комплексу F1. Субъединица a , состоящая из шести гидрофобных α -спиралей, располагается в толще мембраны и прилегает к с-кольцу и образует два протонных полуканала. Субъединица b представляет собой вытянутую α -спираль, которая N-концевым участком закреплена в мембране и взаимодействует с субъединицей a , а C-концевым доменом — с субъединицей δ .

Во время синтеза или гидролиза часть субъединиц (ротор) вращается относительно комплекса из остальных субъединиц (статор). В состав ротора входят субъединицы γ , ϵ и с-кольцо, в состав статора — $\alpha_3\beta_3$ -гексамер, субъединица a и субъединицы периферического стебля (b_2 и δ). В процессе синтеза субъединицы ротора передают энергию механического вращения с-кольца на субъединицу γ , что приводит к ее вращению внутри $\alpha_3\beta_3$ -гексамера, изменениям конформации каталитических сайтов и образованию АТФ. В процессе гидролиза последовательность событий обратная, и конформационные изменения каталитических сайтов приводят к вращению ротора. Неподвижность $\alpha_3\beta_3$ -гексамера относительно субъединицы a обеспечивается периферическим стеблем

Гидролитическая активность АТФазы подвержена разнообразным вариантам регуляции. В условиях стресса работа цепей-генераторов pmf может нарушаться, что приводит к активации гидролитической активности АТФ-синтазы и может привести к растрате остатков внутриклеточного АТФ. АДФ-ингибирование является наиболее общим механизмом регуляции гидролитической активности всех роторных АТФ-синтаз. В условиях, когда АДФ связан в каталитическом сайте в отсутствие фосфата, сайт может принять неактивную конформацию, тем самым приводя к остановке процессов гидролиза. При этом переход фермента в АДФ-ингибированное состояние требует присутствия ионов магния. Исследования АДФ-ингибирования на единичных молекулах фермента из термофильной бактерии *Bacillus sp.* PS3 показали, что поворот субъединицы γ в полости $\alpha_3\beta_3$ -гексамера при переходе в АДФ-заингибированное состояние отличается от поворота в ходе обычного процесса гидролиза. Субъединица “застывает” в положении поворота на 80° — в состоянии “каталитической паузы”, соответствующей ожиданию присоединения АТФ к пустому каталитическому сайту. В ряде недавних работ было исследовано влияние полуконсервативных остатков субъединицы β на степень выраженности АДФ ингибирования у бактериальных АТФ-синтаз. Наиболее существенное влияние оказывает остаток β L249 (*E. coli*). При замене β L249Q АТФазная активность комплекса F_1 и комплекса F_0F_1 , встроенного в липосомы, резко снижалась, а LDAO и сульфит в значительной степени активировали мутантный фермент по сравнению с ферментом дикого типа. В ферменте *B. subtilis* обратная замена (β Q259L), напротив, приводила к активации фермента (введение составлено из материалов литературного обзора к курсовой Зубаревой В.М. за 2021 год).

Мутация β Q259L была выбрана лабораторией для анализа не случайно: данный аминокислотный остаток оказался полуконсервативным: у части организмов (среди которых находилась и *E. coli*, для которой было показано слабое АДФ-ингибирование) в данной позиции оказался лейцин, в то время как у всех остальных — глутамин (в том

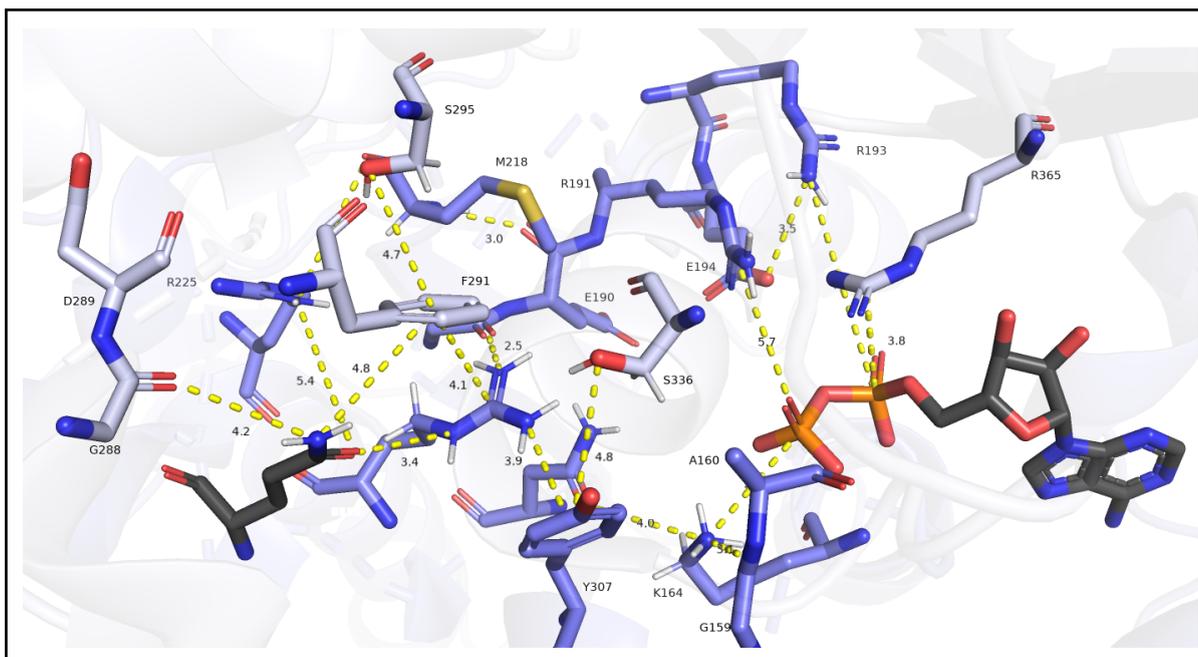


Рисунок 10. Сетка взаимодействий аминокислотных остатков рядом с сайтом, содержащим связанный АДФ. Бело-синим показаны аминокислотные остатки субъединицы α , синим – субъединицы β . Темно-серым выделен изучаемый остаток.

Промутируем и слегка отрелаксируем структуру с введенной заменой. Видно, что мы потеряли большое количество водородных связей, в которых боковой радикал глутамина был донором или акцептором связи. Остаток очень хорошо встает в полость, где ранее располагался глутамин, вероятно, из-за высокой структурной схожести.

К чему могла привести такая потеря взаимодействий?

Рядом с остатком 259 находится две ароматические аминокислоты: тирозин и фенилаланин, связанные между собой π -катионными взаимодействиями через остаток аргинина-256. Остаток глутамин-259 мог принимать участие в поддержке положения этого аргинина через образование водородной связи с незаряженным азотом боковой цепи аминокислоты. Утрата такого взаимодействия, в теории, могла бы привести к “отъезжанию” аргинина в сторону сайта связывания АДФ, а две ароматические аминокислоты, совместно с лейцином, могли бы образовать небольшое гидрофобное ядро, что привело бы к незначительному изменению паттерна расположения взаимодействий.

Выдвижение аргинина вперед, в сторону АДФ, могло бы привести к некоторой дестабилизации комплекса фермент-АДФ: рядом с сайтом связывания фосфатов АДФ/АТФ могло бы оказаться много положительно-заряженных аминокислот, которые, с одной стороны, неплохо экранируют заряд АДФ/АТФ, но с другой, в большом количестве сосредоточены в одном месте и отталкиваются друг от друга. Это могло бы повысить вероятность выхода АДФ из каталитического сайта, тем самым снизив степень выраженности АДФ-ингибирования.

Анализ структуры кишечной палочки, вероятно, подтверждает выдвинутую гипотезу: мы действительно видим концентрирование ароматики рядом с рассматриваемым остатком, а остаток аргинина действительно выдвинут вперед, что, вероятно, и дестабилизирует связывание АДФ в отсутствие фосфата, что и приводит к ослаблению АДФ-ингибирования.

Организм	Структура	Остаток (в структуре)	Тип ингибирования
<i>E. coli</i>	6oqw	261	слабое
<i>Bacillus sp.</i> PS3	6n2y	259	сильное