

В.А. Усик
СТРУКТУРНАЯ НЕУСТОЙЧИВОСТЬ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ
ЛИГАНДОВ НА IDH1 ЧЕЛОВЕКА

Научный руководитель: д-р биол. наук. В.В. Хрусталёв
Кафедра общей химии
Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

V.A. Usik*
STRUCTURAL INSTABILITY OF LIGAND BINDING SITES
ON HUMAN IDH1 Tutor: PhD V.V. Khrustalev
Department of General Chemistry
Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. Рассмотрены сайты связывания 96 цепей фермента изоцитратдегидрогеназы-1 на наличие в них структурной неустойчивости.

Ключевые слова: изоцитратдегидрогеназа-1, сайты связывания, структурная неустойчивость.

Resume. The binding sites of 96 chains of the enzyme isocitrate dehydrogenase-1 were examined for the presence of structural instability in them.

Keywords: isocitrate dehydrogenase-1, binding sites, structural instability.

Актуальность. Изоцитратдегидрогеназа 1 (IDH1) представляет собой димерный фермент, ответственный за пополнение запасов никотинамидадениндинуклеотидфосфата (NADPH) в клетке посредством дегидрирования изоцитрата (ICT) и восстановления NADP+[1]. Фермент обладает разными сайтами связывания, способными переходить в неустойчивое состояние. Структурная неустойчивость бывает двух типов. Первый, когда происходит переход одной конформации в другую. И второй, когда структура перестает быть заметной при рентгенологическом методе исследования вследствие способности формировать множество энергетически близких конформаций.

Цель: определить структурную устойчивость сайтов связывания IDH1.

Задачи:

1. Рассмотреть сайты связывания IDH1 на предмет наличия в них структурно-неустойчивых фрагментов путём сравнения 96 трёхмерных структур.
2. Определить склонность сайтов связывания IDH1 к переходу в абсолютно неструктурированное состояние с помощью алгоритма PentUnFOLD.

Материалы и методы. Для анализа использовались 96 3D цепей фермента изоцитратдегидрогеназы-1. Данные по белкам были взяты с сайта Protein Data Bank (<https://www.wwpdb.org/>). С помощью алгоритма PentUnFOLD 2D (<https://chemres.bsmu.by/PentUnFOLD.htm>) были проанализированы структуры белков на предмет наличия в них структурно неустойчивых фрагментов. С помощью алгоритма USSA определена вторичная структура белков. Обзор сайтов связывания проводился на основе данных с сайта UniProt (<https://www.uniprot.org/>).

Результаты и их обсуждение. Белок IDH1 имеет в своем составе 414 аминокислотных остатков. Он имеет сайты связывания с изоцитратом, НАДФ,

ионами металлов.

Сайты связывания фермента с НАДФ включают аминокислотные остатки в положениях T75-T77, R82, K260, G310-H315, N328.

Согласно PentUnFOLD 2D фрагмент R82 склонен к переходу из альфа-спирали в неустойчивую структуру на 94,8% цепей. Исходя из результатов сравнения вторичных структур было выявлено, что переход в неструктурированное состояние действительно произошёл у 2,1% цепей (Табл. 1).

Табл. 1. Структурный анализ фрагмента R82

Фрагмент	Вторичная структура белка, %				Предсказание беспорядочной цепи согласно PentUnFold 2D, %
	Альфа-спираль	Бета-цепь	Петля	Не распознается	
R82	97,92	0	0	2,08	94,79

Фрагмент K260 находится в конформации альфа-спирали на 84,375% цепей, в конформации петли – на 10,4167%. А на 5,2083% цепей структура белка вообще не распознается при рентгенологическом методе исследования. Согласно PentUnFOLD 2D переход данного фрагмента в неустойчивое состояние характерен для 50% цепей (Табл. 2).

Табл. 2. Структурный анализ фрагмента K260

Фрагмент	Вторичная структура белка, %				Предсказание беспорядочной цепи согласно PentUnFold 2D, %
	Альфа-спираль	Бета-цепь	Петля	Не распознается	
K260	84,375	0	10,4167	5,2083	50

Ион металла (Mn^{2+} или Mg^{2+}) и аллостерические ингибиторы связываются на противоположных сторонах активного сайта N271–G286 ($\alpha 10$). В этом фрагменте к переходу в неструктурированное состояние способны участки N271-Y272 и Q277-S280. Альфа-спираль ($\alpha 10$) является подверженной к переходам в состояние петли согласно PentUnFOLD 2D.

Действительно, в открытой, неактивной форме IDH1 регуляторный сегмент принимает петлевую конформацию и выпячивается в сайт связывания изоцитрата. Боковая цепь Asp279 занимает сайт связывания изоцитрата и образует водородные связи с Ser94. Изоцитрат разрывает водородные связи между этими остатками и позволяет Asp279 хелатировать ион металла в конфигурации активного фермента с образованием альфа-спирали [1].

После завершения катализа и высвобождения продукта α -кетоглутарата и НАДФН+ фермент может либо перезагрузить НАДФ и изоцитрат для продолжения каталитической реакции, либо снова изменить свою конформацию на открытую, неактивную форму [1].

Переход закрытой формы в открытую мог происходить двумя путями: 1) регуляторный сегмент сам инициирует действие раскручивания для изменения

конформации α -спирали в конформацию петли, которая запускает общее конформационное изменение; 2) взаимодействия между остатками в задней щели вызывают конформационные изменения больших и малых доменов одной и той же субъединицы и закрытие задней щели [1].

Сайт связывания фермента с субстратом включает T77, S94-R100, R109, R132, K212, из которых только T77 не склонен к переходу в неструктурированное состояние.

Фрагмент, S94-R100 представляет собой альфа-спираль, подверженную переходу как в конформацию петли, так и в неструктурированное состояние. Согласно PentUnFOLD 2D во фрагменте S94-R100 первые два остатка переходят в нестабильное состояние на более чем 95% цепей, а третий и четвёртый – на 5,2% (Табл. 3).

Табл. 3. Структурный анализ фрагмента S94-R100

Фрагмент	Вторичная структура белка, %				Предсказание беспорядочной цепи согласно PentUnFold 2D, %
	Альфа-спираль	Бета-цепь	Петля	Не распознается	
S94	0	0	98,96	1,04	97,92
P95	97,92	0	1,04	1,04	98,96
N96	98,96	0	0	1,04	6,25
G97	100	0	0	0	5,21
T98	100	0	0	0	0
I99	100	0	0	0	0
R100	98,96	0	1,04	0	0

Фрагмент R109 перешёл из конформации бета-цепи в конформацию петли на 1,04% цепей. PentUnFOLD 2D говорит о том, что нестабильным данный фрагмент должен быть на 100% цепей (Табл. 4).

Табл. 4. Структурный анализ фрагмента R109

Фрагмент	Вторичная структура белка, %				Предсказание беспорядочной цепи согласно PentUnFold 2D, %
	Альфа-спираль	Бета-цепь	Петля	Не распознается	
R109	0	98,96	1,04	0	100

Фрагменты R132 и K212 переходят из бета-цепи в петлю на 3,125% и 9,375% цепей, соответственно. Нестабильность согласно PentUnFOLD 2D характерна для 88,5417% и 97,9167% цепей, соответственно (Табл. 5).

Табл. 5. Структурный анализ фрагмента R132 и K212

Фрагмент	Вторичная структура белка, %				Предсказание беспорядочной цепи согласно PentUnFold 2D, %
	Альфа-спираль	Бета-цепь	Петля	Не распознается	
R132	0	96,875	3,125	0	88,54
K212	0	90,625	9,375	0	97,92

Особый интерес представляет положение Arg132, миссенс-мутация на His в котором приводит к новой форме каталитической активности IDH1: фермент превращает α -KG в онкометаболит 2-гидроксиглутарат, который способствует развитию глиобластом [1].

Шарнирная точка представляет собой область остатков A134–A141, которая образует петлю (58,33% – 90,625%), соединяющую малый домен и домен застежки [1]. Данная область имеет области в конформации альфа-спирали (у 1,0417% цепей), бета-структуры (для R140 и A141 на 2,083% цепей; для A134 на 41,67% цепей), а также область, перешедшую в неструктурированное состояние (от 9,375% до 41,67% цепей – в зависимости от положения остатка) (Табл. 6).

Табл. 6. Структурный анализ фрагмента A134-A141

Фрагмент	Вторичная структура белка, %				Предсказание беспорядочной цепи согласно PentUnFold 2D, %
	Альфа-спираль	Бета-цепь	Петля	Не распознается	
A134	0	41,67	58,33	0	0
Y135	0	0	90,625	9,375	0
G136	0	0	60,42	39,58	0
D137	0	0	58,33	41,67	0
Q138	1,04	0	62,5	36,46	7,29
Y139	1,04	0	65,625	33,33	9,375
R140	1,04	2,08	65,625	31,25	2,08
A141	1,04	2,08	65,625	11,46	17,71

Выводы:

1. Аминокислотные остатки A134–A141 и N271–G286 обладают высокой степенью структурной неустойчивости.
2. Остатки R82 и K260 склонны к переходу в неструктурированное состояние.
3. Только сайт T77 связывания фермента с субстратом не склонен к переходу в неструктурированное состояние.
4. Миссенс-мутация в Arg132 положении на His приводит к новой каталитической функции и синтезу онкометаболита.

Литература

1. Novel Insights for Inhibiting Mutant Heterodimer IDH1wt-R132H in Cancer: An In-Silico Approach / E. I. Juritz, J. P. Bascur, D. E. Almonacid et al. // Mol Diagn Ther., 2018. - Jun.22 (3). – P. 369 – 380.