

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-33

ЭФФЕКТ ЗАМЕН ОСТАТКОВ ЦИСТЕИНА НА АЛАНИН В БОЛЬШОМ ВНЕКЛЕТОЧНОМ ДОМЕНЕ ТРАНСПОРТЕРА NAPI2B НА ЕГО ПРОСТРАНСТВЕННУЮ СТРУКТУРУ

THE EFFECT OF REPLACING CYSTEINE RESIDUES WITH ALANINE IN THE LARGE EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE NAPI2B TRANSPORTER ON ITS SPATIAL STRUCTURE

А. Р. Шайдуллина, Н. И. Акберова

Институт фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета

A. R. Shaidullina, N. I. Akberova

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University

✉ seuta21@gmail.com

Аннотация

В работе изучено влияние замен остатков цистеина на аланин в большом внеклеточном домене NaPi2b методами молекулярной динамики. Показано, что мутации изменяют конформационную подвижность, площадь поверхности и компактность домена, что связано с перестройкой дисульфидных связей и может влиять на доступность терапевтического эпитопа.

Abstract

The effect of cysteine-to-alanine substitutions in the large extracellular domain of NaPi2b was studied using molecular dynamics. The mutations altered conformational mobility, surface area, and domain compactness due to rearrangement of disulfide bonds, potentially affecting the accessibility of the therapeutic epitope.

Натрий-зависимый фосфатный транспортер NaPi2b (SLC34A2) сверхэкспрессируется в ряде злокачественных новообразований и рассматривается как перспективная мишень для таргетной терапии. Во внеклеточном домене (ВКД) белка локализован иммуногенный эпитоп, распознаваемый моноклональными антителами. В положениях 303, 322, 328 и 350 ВКД присутствуют остатки цистеина, предположительно участвующие в образовании дисульфидных связей, которые влияют на пространственную организацию домена и доступность эпитопа.

Цель работы — оценить влияние замен остатков цистеина в ВКД NaPi2b на конформацию ВКД NaPi2b методами молекулярной динамики (МД).

В качестве исходной модели использовали структуру NaPi2b, предсказанную AlphaFold (AF-O95436-F1). Мутации вносили в Swiss-PdbViewer, получили четыре системы с одиночными заменами (C303A, C322A, C328A, C350A) и три с двойными (C303A-C322A, C303A-C328A, C322A-C328A). Модели встраивали в бислой POPC с добавлением Na^+/Cl^- (CHARMM-GUI), окружали водой и ионами Na и Cl. Симуляции равновесной молекулярной динамики (30 нс для каждой системы) выполняли в NAMD с использованием силового поля CHARMM36. Анализ МД-траекторий (VMD, bio3d R) включал сравнение значений среднеквадратичного отклонения (RMSD), флуктуации (RMSF), площади поверхности, доступной для растворителя (SASA), радиуса гиляции (Rg), анализ главных компонент (PCA) и расстояний между атомами серы в остатках цистеина.

Все замены, кроме C322A, изменили RMSD ВКД ($p < 1,2 \times 10^{-7}$); наибольшее увеличение наблюдалось при C350A ($p < 2 \times 10^{-16}$). В эпитопе изменения RMSD фиксировали во всех системах, кроме C328A ($p < 1,9 \times 10^{-5}$). RMSF ВКД в целом изменялся слабо, исключение — эпитоп, где все мутации, кроме C328A, вызывали значимые флуктуации ($p < 5,7 \times 10^{-4}$). SASA ВКД снижался во всех вариантах ($p < 2 \times 10^{-16}$), кроме C328A и C350A, где в эпитопе регистрировалось увеличение SASA. Компактность ВКД (Rg) сохранялась при C322A, C303A-C322A и C322A-C328A; в остальных случаях наблюдались значимые изменения ($p < 2 \times 10^{-16}$). В эпитопе Rg изменялся во всех системах, кроме C303A и C328A. PCA показал наибольшую подвижность ВКД и N-/C-концевых доменов, с характерными движениями в районе эпитопа. Анализ расстояний между атомами серы подтвердил возможность образования связей C303-C350, C322-C328 и C303-C328; при замене C350A образование дисульфидных связей маловероятно.

Результаты подтверждают критическую роль дисульфидных связей в стабилизации ВКД NaPi2b и сохранении его иммуногенных свойств. Полученные данные могут быть использованы для оценки конформационной доступности эпитопа MX35 и разработки терапевтических антител.