

ГЕНЕТИКА / GENETICS

DOI: <https://doi.org/10.18454/jbg.2023.22.1>ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ *SDHB*: *p.M103V* НА СТРУКТУРУ И ДИНАМИКУ БЕЛКА

Научная статья

Калинин Д.В.¹, Аюпова А.Ф.², Елизарова Е.Т.³, Павлов В.С.⁴, Головюк А.Л.⁵, Снежкина А.В.^{6,*}, Кудрявцева А.В.⁷¹ORCID : 0000-0001-6247-9481;⁶ORCID : 0000-0002-4421-4364;^{1,5} Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского, Москва, Российская Федерация^{2,4,6,7} Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта, Москва, Российская Федерация³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Российская Федерация

* Корреспондирующий автор (leftger[at]rambler.ru)

Аннотация

Параганглиомы головы и шеи – это редкие нейроэндокринные опухоли, характеризующиеся высокой степенью наследуемости (около 40%) и часто ассоциированные с мутациями в генах *SDHx*. Вагальная параганглиома (ВПГ) развивается из параганглия, располагающегося вдоль блуждающего нерва, и встречается в 13% случаев параганглиом головы и шеи. Среди всех параганглиом/феохромоцитом, ВПГ является наиболее агрессивной опухолью и чаще всего метастазирует, при этом из-за редкости заболевания, генетика ВПГ мало изучена. Ранее мы идентифицировали миссенс вариант *p.M103V* в гене *SDHB* с неопределенной клинической значимостью в исследуемой выборке из 36 ВПГ. В данной работе выполнен анализ влияния выявленной мутации *SDHB*: *p.M103V* на структуру и динамику белка с использованием метода моделирования молекулярной динамики. Показано, что эта мутация вызывает серьезные структурные изменения и может привести к нарушению стабильности белка и его функции. Таким образом, негативный эффект варианта *p.M103V* на структуру/функцию субъединицы *SDHB*, а также ассоциация с параганглиомами/феохромоцитомами и другими опухолевыми синдромами, свидетельствуют о ее вероятной патогенности.

Ключевые слова: параганглиома головы и шеи, вагальная параганглиома, мутации, *SDHB*, сукцинатдегидрогеназа, моделирование молекулярной динамики.

EFFECT OF *SDHB*: *p.M103V* MUTATION ON PROTEIN STRUCTURE AND DYNAMICS

Research article

Kalinin D.V.¹, Ayupova A.F.², Elizarova E.T.³, Pavlov V.S.⁴, Golovyuk A.L.⁵, Snezhkina A.V.^{6,*}, Kudryavtseva A.V.⁷¹ORCID : 0000-0001-6247-9481;⁶ORCID : 0000-0002-4421-4364;^{1,5} National Medical Research Center of Surgery named after A.V. Vishnevsky, Moscow, Russian Federation^{2,4,6,7} Institute of Molecular Biology named after V.A. Engelhardt, Moscow, Russian Federation³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

* Corresponding author (leftger[at]rambler.ru)

Abstract

Head and neck paragangliomas are rare neuroendocrine tumours with a high inheritance rate (about 40%) and are often associated with mutations in *SDHx* genes. Vagal paraganglioma (VPG) develops from a paraganglion located along the vagus nerve and occurs in 13% of head and neck paragangliomas. Among all paragangliomas/pheochromocytomas, HPG is the most aggressive tumour and metastasizes most frequently, and due to the rarity of the disease, the genetics of HPG are understudied. Previously, we identified a missense variant *p.M103V* in the *SDHB* gene with uncertain clinical significance in a study sample of 36 IDPs. In this work, an analysis of the effect of the identified *SDHB*: *p.M103V* mutation on protein structure and dynamics was performed using molecular dynamics modelling. It is shown that this mutation causes severe structural changes and can lead to impairment of protein stability and function. Thus, the negative effect of the *p.M103V* variant on the structure/function of the *SDHB* subunit, as well as the association with paragangliomas/pheochromocytomas and other tumour syndromes, indicate its likely pathogenicity.

Keywords: head and neck paraganglioma, vagal paraganglioma, mutations, *SDHB*, succinate dehydrogenase, molecular dynamics modelling.

Введение

Параганглиомы и феохромоцитомы являются опухолями параганглиев – органов вегетативной нервной системы. Параганглии разделяют на хромоаффинные, относящиеся к адреналовой системе и способные к секреции, и нехромоаффинные, выполняющие функцию хеморецепторов. Феохромоцитомы развиваются из наиболее крупного симпатического параганглия – мозгового вещества надпочечников. Парасимпатические параганглиомы преимущественно формируются в области головы и шеи; в зависимости от места локализации выделяют каротидные, вагальные и параганглиомы среднего уха. Вагальные параганглиомы (ВПГ) являются наиболее редкими и мало изученными, эти опухоли составляют 13% от всех параганглиом головы и шеи [1]. ВПГ характеризуются самым высоким метастатическим потенциалом (16-19%) среди всех параганглиом/феохромоцитом [2]. Мультифокальные

формы ВПГ, которые часто образуются совместно с каротидными параганглиомами и располагаются с одной или с обеих сторон шеи, могут возникать в 30-40% случаев при семейных формах опухолей [3]. На протяжении многих десятилетий хирургическое удаление параганглиом головы и шеи является основным методом лечения, которое сопряжено с серьезными послеоперационными осложнениями [4]. В случае неоперабельных или метастазирующих опухолей также применяют лучевую и химиотерапию, однако эти методы имеют низкую эффективность [5]. На сегодняшний день крайне актуальными являются вопросы, касающиеся молекулярной основы развития параганглиом головы и шеи, поиска новых эффективных диагностических и прогностических биомаркеров и мишеней для терапии.

Важной особенностью параганглиом/феохромоцитом является их высокая степень наследуемости по сравнению с другими злокачественными новообразованиями человека. Около 40% этих опухолей ассоциированы с наследственными мутациями как минимум в одном из 15 известных генов предрасположенности [6]. Примерно в 30% случаев опухоли с такими мутациями возникают как проявление наследственных опухолевых синдромов. Параганглиомы головы и шеи чаще всего связаны с мутациями в генах *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC* и *SDHD*), кодирующих соответствующие субъединицы сукцинатдегидрогеназы (SDH) [7]. Наличие мутаций в этих генах может приводить к состоянию псевдогипоксии и гиперметилирования, а также связано с более агрессивным поведением опухоли (мультифокальный рост, рецидив и метастазирование) [8]. Выявление патогенных/вероятно патогенных мутаций в генах *SDHx* имеет высокую диагностическую и прогностическую значимость для ведения пациентов с параганглиомами/феохромоцитомами.

В данном исследовании, нами проведено моделирование молекулярной динамики варианта р.М103V в гене *SDHB*, идентифицированного у пациента с ВПГ. На сегодняшний день, клиническая значимость варианта *SDHB*: р.М103V является неопределенной. Результаты анализа влияния р.М103V на структуру и динамику субъединицы *SDHB* в комплексе сукцинатдегидрогеназы могут помочь в определении патогенности этой мутации.

Методы и принципы исследования

2.1. Создание гомологичной модели

Гомологичная модель субъединицы *SDHB* создана из известной аминокислотной последовательности белка с помощью пакета программ Modeller [9]. В качестве референса использовалась структура сукцинатдегидрогеназы свиньи PDB ID:1ZOY (разрешение 2,4 Å). Гомологичные структуры белка дикого типа и белка с исследуемой мутацией *SDHB*: NM_003000: с.А307G, р.М103V (chr1: 17355211, rs140178341) сконструированы на основе выравнивания двух аминокислотных последовательностей белков человека, а также PDB структуры референсной 3D модели.

2.2. Создание полноатомной системы

С помощью графического конструктора CHARMM-GUI создана полноатомная система, состоящая из участка мембраны и интегрированного мембрано-протеинового SDH комплекса, необходимая для проведения моделирования молекулярной динамики [10]. Исследуемая система создана в силовом поле CHARMM36. Система помещена в раствор, соответствующий физиологическому (0.15M NaCl, pH = 7), параметризован кофактор убихинон (UQ), а также железо-серные (2Fe-2S) кластеры (длины связей, константы жесткости связей, значения простых и двугранных углов и др.).

2.3. Моделирование молекулярной динамики

Запуск моделирования молекулярной динамики системы проведен с использованием пакета программ GROMACS [11]. Температура процесса моделирования составила $T = 303.15$ К. Термостатирование динамики проводилось с помощью расширенного ансамбля Nose-Hoover и временной постоянной равной 1 пс, определяющей период флуктуации температуры при равновесии. Баростатирование проводилось с помощью ансамбля Parrinello-Rahman и временной постоянной равной 5 пс. Система для молекулярной динамики была помещена в ячейку с размером 10,63x10,63x20,20 нм, заполнена молекулами воды (TIP3P) с добавлением ионов хлора и натрия до концентрации 0,15 M и нейтрального суммарного заряда системы. Временной шаг интегрирования составил 2 фс.

2.4. Анализ и визуализация данных

Обработка данных проводилась в Python с использованием программного пакета NumPy [12]. Построение графиков выполнено с помощью Matplotlib [13]. Для визуализации структур использовали программный пакет PyMol [14].

Результаты и обсуждение

В исследуемой выборке вагальных параганглиом у одного из 36 пациентов идентифицирована миссенс мутация NM_003000: с.А307G, р.М103V (chr1: 17355211, rs140178341) в гене *SDHB*. Эта мутация была ранее зарегистрирована в базах данных dbSNP и ClinVar и выявлена в результате клинического тестирования при таких заболеваниях как параганглиомы/феохромоцитомы, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, синдром Карни-Стратакиса, синдром Каудена, наследственный опухолевый синдром. Происхождение этой альтернативной аллели имело статус либо герминальный, либо неустановленный. На данный момент клиническая значимость варианта *SDHB*: р.М103V остается неопределенной.

В структуре белка вариант р.М103V приводит к замене метионина на валин в 103 кодоне. Данная мутация располагается в непосредственной близости от цистеина 101, который ковалентно связан с 2Fe-2S кластером (рис. 1). Согласно *insilico* алгоритмам (SIFT, Polyphen2, PROVEAN, MetaSVM, MetaLR, LRT, MutationTaster и др.), этот миссенс вариант оказывает патогенное влияние на структуру и функцию белка. Кроме того, мутация *SDHB*: р.М103V имеет низкую частоту аллели в популяции (0,0001%) и высокую консервативность последовательности (PhastCons [20 way mammalian rank score] = 0,8).

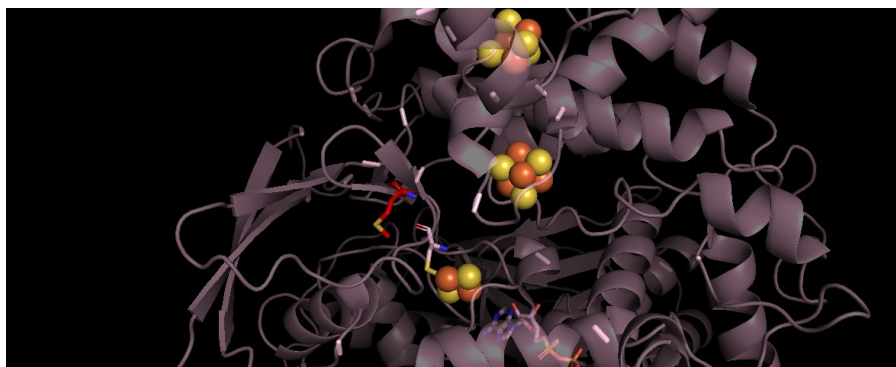


Рисунок 1 - Положение метионина 103 в субъединице SDHB
DOI: <https://doi.org/10.18454/jbg.2023.22.1.1>

Примечание: палочки, красный – Метионин 103; шарики, желто-оранжевый – 2Fe-2S кластеры

Результаты моделирования молекулярной динамики показали, что данная мутация приводит к изменениям β -листов в структуре белка (рис. 2).

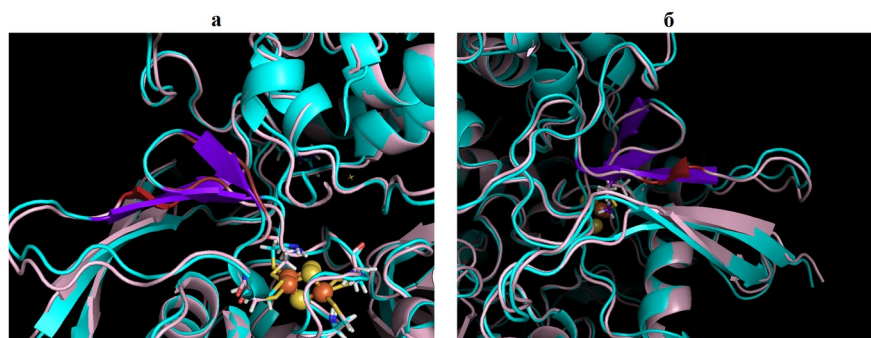


Рисунок 2 - Сравнение структуры нативной субъединицы SDHB и субъединицы с мутацией p.M103V
DOI: <https://doi.org/10.18454/jbg.2023.22.1.2>

Примечание: голубой – белок дикого типа; розовый – мутантный белок; фиолетовый – бета-листы в структуре нативного белка; красный – бета-листы в структуре мутантного белка; шарики, желто-оранжевый – 2Fe-2S кластеры; а и б – разный ракурс в пространстве

Выявлено отклонение в цитозольной части в мутантном белке по сравнению с белком дикого типа, при этом сильно изменялась конформация цистеинов, которые непосредственно связывают 2Fe-2S кластер (рис. 3). Таким образом, данная мутация приводит к значительным структурным изменениям в субъединице SDHB, которые могут привести к нарушению ее стабильности и потере функции.

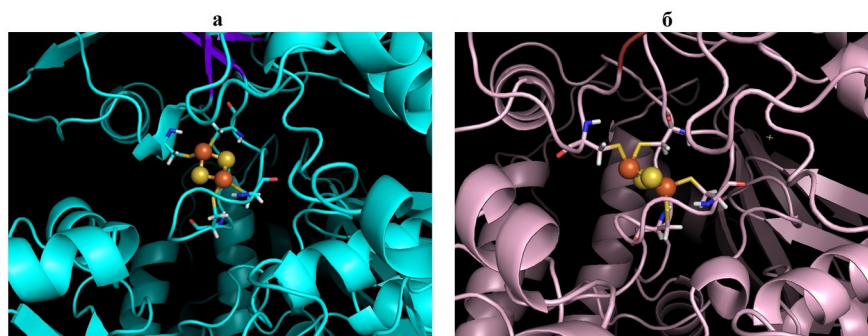


Рисунок 3 - Структура 2Fe-2S кластера нативной субъединицы SDHB (а) и субъединицы с мутацией p.M103V (б)
DOI: <https://doi.org/10.18454/jbg.2023.22.1.3>

Примечание: шарики, желто-оранжевый – 2Fe-2S кластеры

Выявление патогенных мутаций в гене *SDHB* имеет высокую клиническую значимость, поскольку является одним из основных генетических изменений, предрасполагающих к развитию метастазирующей опухоли, известных на сегодняшний день. Пациенты, с мутациями в гене *SDHB* имеют высокий риск метастазирования, который варьирует от 5,6% до 83% в зависимости от исследуемой популяции [8]. Тестирование на наличие мутаций в этом гене рекомендовано Клиническими рекомендациями Европейского общества эндокринологов [15].

Полученные результаты моделирования молекулярной динамики мутации *SDHB*: p.M103V свидетельствует о ее патогенном эффекте на структуру белка, что также подтверждается многими другими предсказательными алгоритмами. Белок *SDHB* – это гидрофильная субъединица, содержащая три железо-серных кластера, которая образует границу раздела между каталитическим и мембранным якорным доменами в структуре сукцинатдегидрогеназы [16]. *In silico* моделирование тетрамерного SDH комплекса показало широкий спектр биохимических последствий мутаций в гене *SDHB* [17]. Ким с коллегами выявили несколько ключевых последствий *SDHB* мутаций:

- 1) полная потеря белка в результате нонсенс-зависимого распада и/или ускоренной деградации мРНК, а также нарушение стабильности и деградация самого белка;
- 2) нарушение импорта белка в митохондрии;
- 3) нарушение сборки SDH комплекса;
- 4) изменение функциональной активности сукцинатдегидрогеназы из-за изменений в активных центрах фермента [18].

В более ранних работах была продемонстрирована важность железо-серных кластеров импорте субъединицы *SDHB* в митохондрии и сборке зрелого SDH комплекса [19], [20]. Таким образом, мы предполагаем, что исследуемая мутация *SDHB*: p.M103V может приводить к нарушению биогенеза и стабильности белка (нарушение включения 2Fe-2S кластеров в структуру белка), а также сборки SDH комплекса, что как следствие вызывает снижение активности сукцинатдегидрогеназы и способствует развитию заболевания.

Заключение

Моделирование молекулярной динамики показало, что мутация NM_003000: c.A307G, p.M103V (chr1: 17355211, rs140178341) вызывает серьезные структурные изменения в субъединице *SDHB* сукцинатдегидрогеназы, которые могут привести к нарушению ее стабильности и потере функции. Согласно результатам моделирования, данная мутация является вероятно патогенной. Кроме того, идентификация этой мутации у нашего пациента с ВПГ, а также других больных параганглиомами/феохромочитомами (по данным ClinVar) при низкой популяционной частоте, также указывает на ее патогенный эффект и вовлеченность в развитие заболевания. Полученные результаты расширяют спектр патогенных/вероятно патогенных вариантов, связанных с параганглиомами головы и шеи.

Финансирование

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда, номер гранта 19-15-00419.

Конфликт интересов

Не указан.

Рецензия

Все статьи проходят рецензирование. Но рецензент или автор статьи предпочли не публиковать рецензию к этой статье в открытом доступе. Рецензия может быть предоставлена компетентным органам по запросу.

Funding

The research was supported by the Russian Science Foundation, grant number 19-15-00419.

Conflict of Interest

None declared.

Review

All articles are peer-reviewed. But the reviewer or the author of the article chose not to publish a review of this article in the public domain. The review can be provided to the competent authorities upon request.

Список литературы на английском языке / References in English

1. El-Naggar A.K. WHO Classification of Head and Neck Tumours / A.K. El-Naggar, J.K.C. Chan, J.R. Grandis [et al.] // International Agency for Research on Cancer. — 2017. — Vol. 9. — P. 347.
2. Lee J.H. National Cancer Data Base Report on Malignant Paragangliomas of the Head and Neck / J.H. Lee, F. Barich, L.H. Karnell [et al.] // Cancer. — 2002. — Vol. 94. — № 3. — P. 730-737.
3. Zanoletti E. Vagal Paraganglioma / E. Zanoletti, A. Mazzoni // Skull Base. — 2006. — Vol. 16. — № 3. — P. 161-167.
4. Golovyuk A. Predictors of Complications in Neck Paraganglioma Surgery / A. Golovyuk, Z. Adyrkhaev, A. Pokrovsky // European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. — 2019. — Vol. 58. — № 6. — Suppl. 3. — P. E818-E819.
5. Lin E.P. Head and Neck Paragangliomas: An Update on the Molecular Classification, State-of-the-Art Imaging, and Management Recommendations / E.P. Lin, B.B. Chin, L. Fishbein [et al.] // Radiol Imaging Cancer. — 2022. — Vol. 4. — № 3.
6. Fishbein L. Pheochromocytoma and Paraganglioma Susceptibility Genes: Estimating the Associated Risk of Disease / L. Fishbein, K.L. Nathanson // JAMA Oncology. — 2017. — Vol. 3. — № 9. — P. 1212-1213.

7. Snezhkina A.V. Mutation Frequency in Main Susceptibility Genes Among Patients With Head and Neck Paragangliomas / A.V. Snezhkina, M.S. Fedorova, V.S. Pavlov [et al.] // *Frontiers in Genetics*. — 2020. — Vol. 11. — P. 614908.
8. Snezhkina A. Potential Biomarkers of Metastasizing Paragangliomas and Pheochromocytomas / A. Snezhkina, V. Pavlov, A. Dmitriev [et al.] // *Life (Basel)*. — 2021. — Vol. 11. — № 11. — P. 1179.
9. Fiser A. Modeling of Loops in Protein Structures / A. Fiser, R.K. Do, A. Sali // *Protein Science*. — 2000. — Vol. 9. — № 9. — P. 1753-1773.
10. Jo S. CHARMM-GUI 10 Years for Biomolecular Modeling and Simulation / S. Jo, X. Cheng, J. Lee [et al.] // *Journal of Computational Chemistry*. — 2017. — Vol. 38. — № 15. — P. 1114-1124.
11. Spoel D.V.D. GROMACS: Fast, Flexible, and Free / D.V.D. Spoel, E. Lindahl, B. Hess [et al.] // *Journal of Computational Chemistry*. — 2005. — Vol. 26. — № 16. — P. 1701-1718.
12. Oliphant T.E. Python for Scientific Computing. Computing in Science & Engineering / T.E. Oliphant // *Computing in Science & Engineering*. — 2007. — Vol. 9. — № 3. — P. 10-20.
13. Hunter J.D. A 2D Graphics Environment. Computing in Science & Engineering / J.D. Hunter // *Computing in Science & Engineering*. — 2007. — Vol. 9. — № 3. — P. 90-95.
14. PyMol. — URL: <http://www.pymol.org> (accessed: 07.08.2023).
15. Plouin P.F. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline for Long-Term Follow-Up of Patients Operated on For a Pheochromocytoma or a Paraganglioma / P.F. Plouin, L. Amar, O.M. Dekkers [et al.] // *European Journal of Endocrinology*. — 2016. — Vol. 174. — № 5. — P. G1-G10.
16. Rutter J. Succinate Dehydrogenase — Assembly, Regulation and Role in Human Disease / J. Rutter, D.R. Winge, J.D. Schiffman // *Mitochondrion*. — 2010. — Vol. 10. — № 4 — P. 393-401.
17. Sun F. Crystal Structure of Mitochondrial Respiratory Membrane Protein Complex II / F. Sun, X. Huo, Y. Zhai [et al.] // *Cell*. — 2005. — Vol. 121. — № 7 — P. 1043-1057.
18. Kim E. Structural and Functional Consequences of Succinate Dehydrogenase Subunit B Mutations / E. Kim, E.M. Rath, V.H.M. Tsang [et al.] // *Endocrine-Related Cancer*. — 2015. — Vol. 22. — № 3 — P. 387-397.
19. Lane D.J.R. The Lure of a LYR: The Logistics of Iron Sulfur Cluster Delivery / D.J.R. Lane, A.M. Merlot, D.R. Richardson // *Cell Metabolism*. — 2014. — Vol. 19. — № 3. — P. 348-350.
20. Maio N. Cochaperone Binding to LYR Motifs Confers Specificity of Iron Sulfur Cluster Delivery / N. Maio, A. Singh, H. Uhrigshardt [et al.] // *Cell Metabolism*. — 2014. — Vol. 19. — № 3. — P. 445-457.