



Практикум 6. Водороды, рКа, рН-зависимость стабильности.

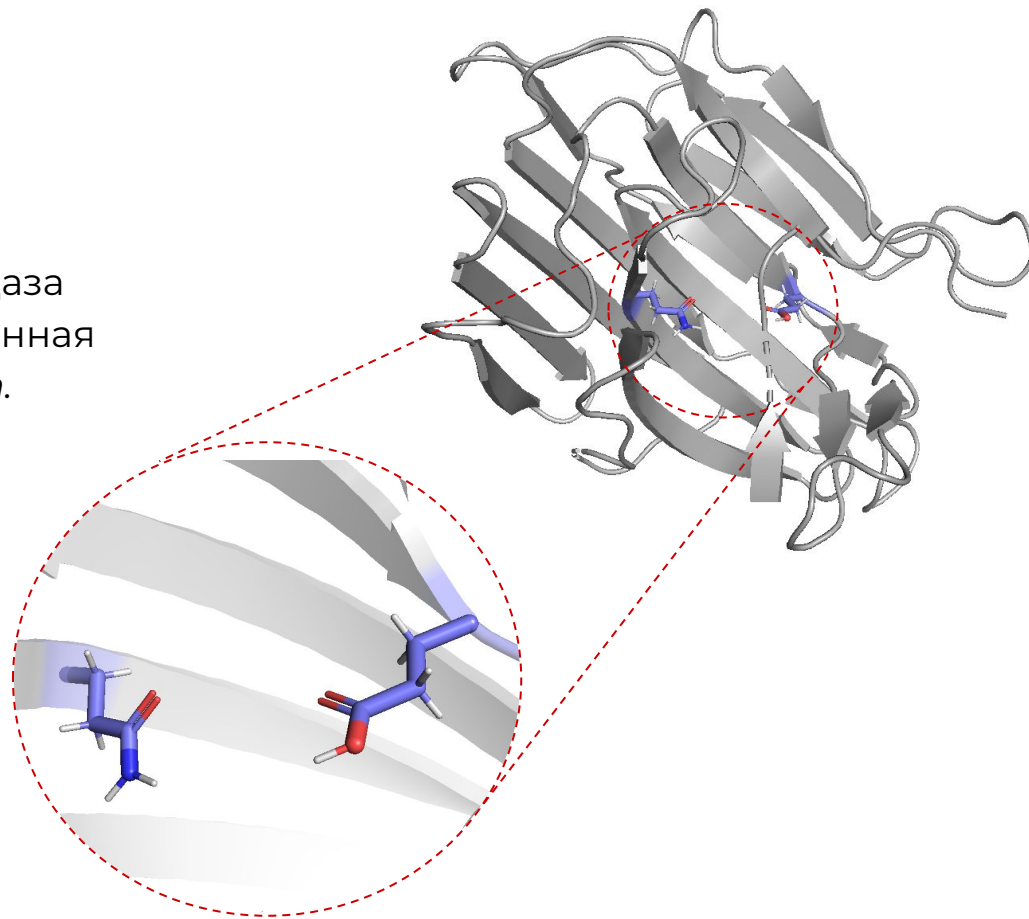
Гаркуль Лидия, 4 курс ФББ

Введение

Исследуемый фермент -
циталидоглутаминовая пептидаза
(PDB ID: **2IFR**), впервые выделенная
из гриба *Scytalidium lignicolum*.

Относится к семейству
глутаминовых пептидаз (G1).

Каталитическая диада Gln53 и
Glu136 [1].



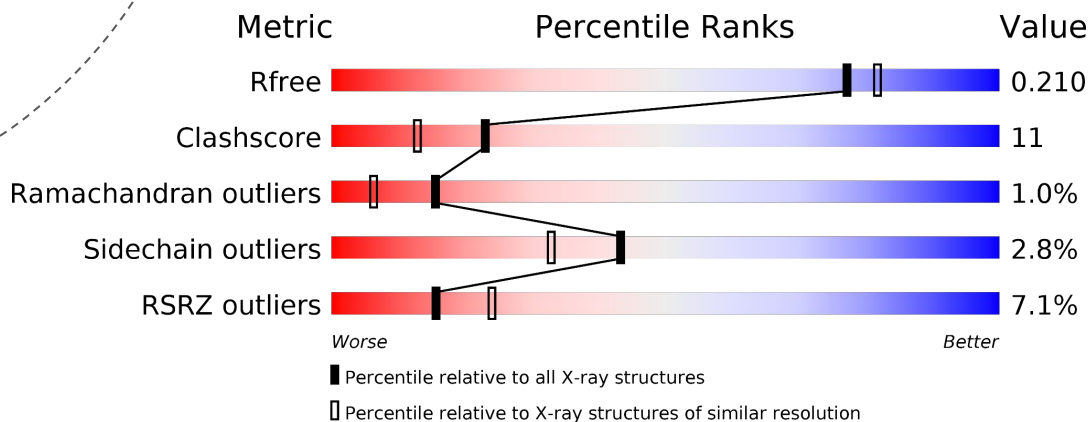
Структура 2IFR

Структура 2IFR была получена методом рентгеноструктурного анализа.

Разрешение 1.95 Å. При этом качество структуры достаточно плохое.

pH, при котором происходила кристаллизация равен **4**.

Воспользуемся инструментом PROPKA, расположенным на веб-сервисе PDB2PQR для того чтобы добавить водороды в структуру и проанализировать особенности протонирования остатков из-за кислого pH, в котором была произведена кристаллизация.



Рассмотрим ближе Asp, Glu, His с самыми высокими предсказанным pKa, которые также выше, чем pH кристаллизации:

- ASP 57 pKa = 9.52
- GLU 132 pKa = 9.75
- GLU 136 pKa = 7.31

PROPKA ASP 57

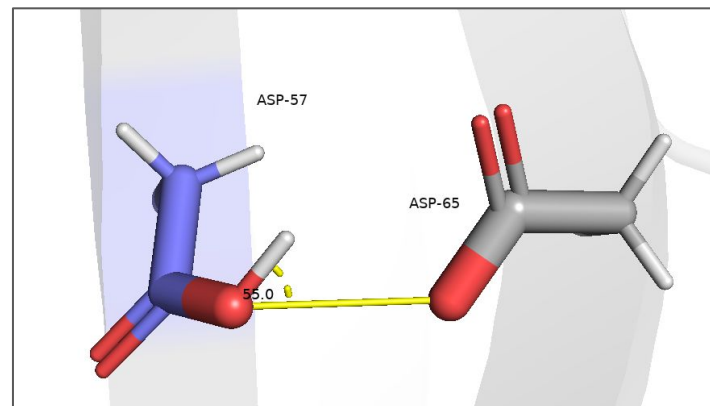
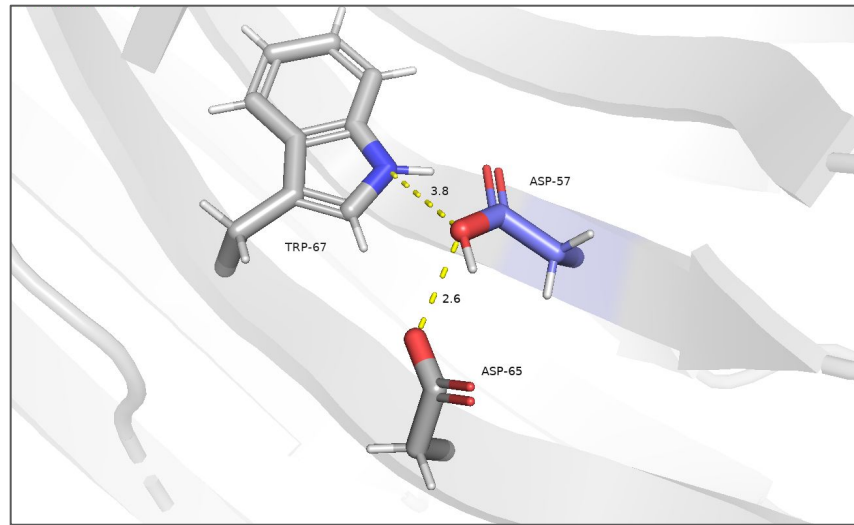
Во-первых, отмечу что в белке нет гистидинов, все глутамины и большинство аспарагиновых кислот по выдаче PROPKA оказались протонированы.

При более подробном рассмотрении ASP 57 и его окружения видим, что с помощью предсказанного протона образуется водородная связь с ASP 65. С местоположением и протона и длиной связи все нормально - угол $< 90^\circ$, расстояние 2.6 \AA .

Остатки ASP 57 и ASP 65 находятся на разных цепях β -структуры. Вероятно данное взаимодействие значимо для поддержания вторичной структуры.

Скорее всего, в данном случае предсказание протонирования верно.

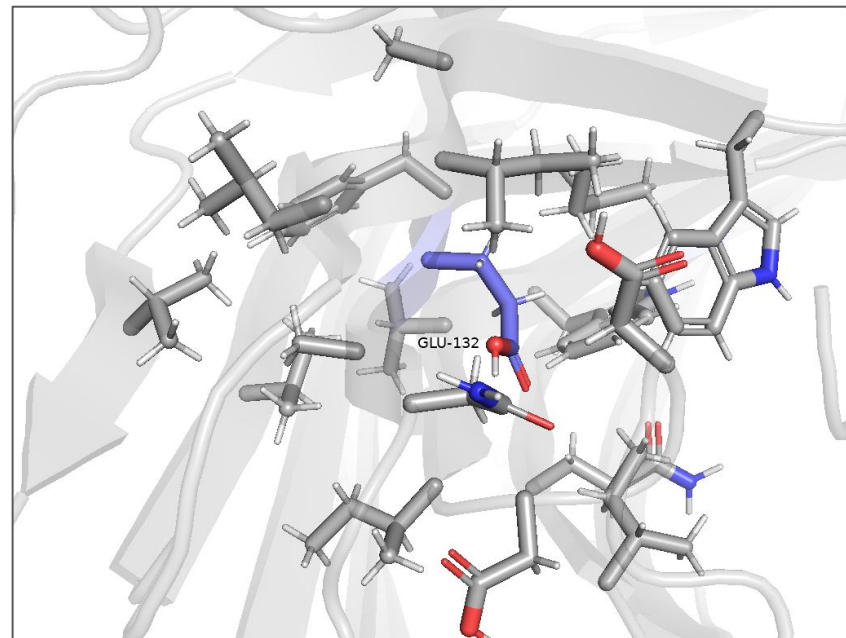
Помимо этого, на расстоянии 3.8 \AA находится азот триптофана, который мог образовывать водородную связь, но все-таки в данной структуре расстояние между донором и акцептором достаточно велико.



ПРОПКА GLU 132

В случае GLU 132 протонирование не образует никаких связей с соседними остатками.

Вероятно, предсказание в данном случае неверно.

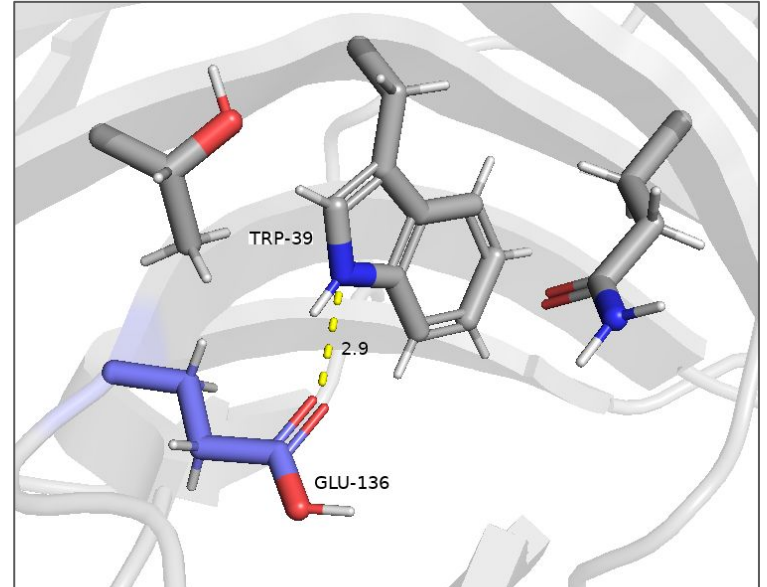


ПРОПКА GLU 136

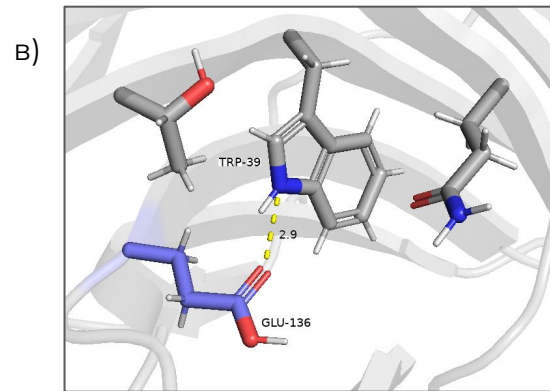
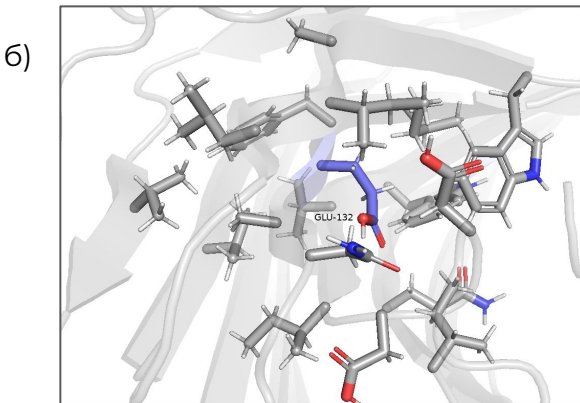
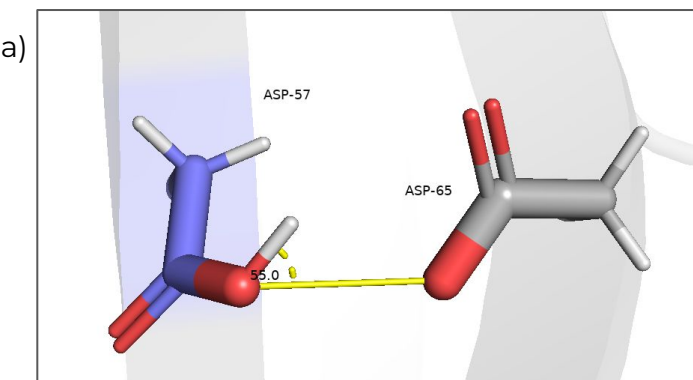
В случае GLU 136 протонирование опять не дало никаких взаимодействий с пространственно близкими остатками.

Стоит отметить, что GLU 136 образует водородную связь с TRP 39 в качестве донора.

GLU 132 и GLU 136 входят в состав неструктурированных петель (т.е. не поддерживают никакую вторичную структуру).



Что будет, если предсказанные протоны убрать?



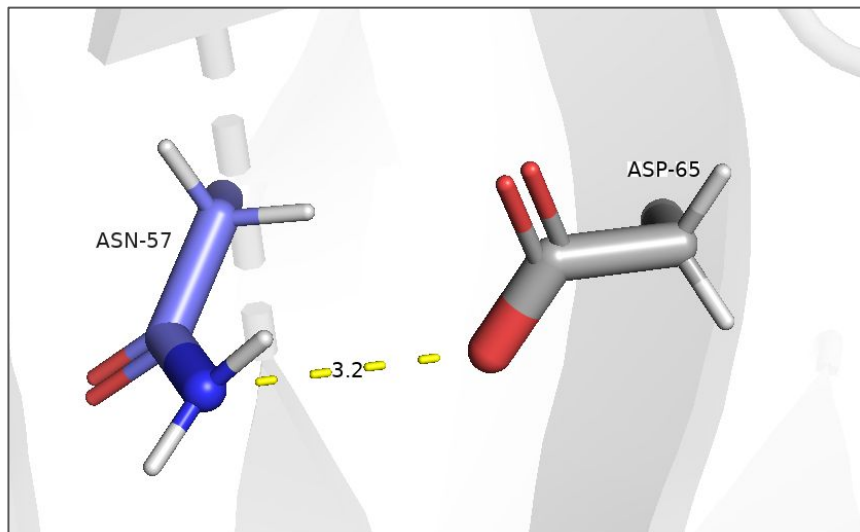
Протонирование а) ASP 57, б) GLU 132, в) GLU 136.

Предсказанный протон у ASP 57 видимо имеет достаточно важную роль тк образует водородную связь внутри β -структуры. Потеря протонирования остатка в данном случае может привести к дестабилизации вторичной структуры.

Для предсказанных протонов у GLU 132 и GLU 136 никаких связей, задействующих протон, не было обнаружено. Думаю, что отсутствие протонов у данных остатков глутаминовых кислот, сильно на структуру белка не повлияет.

PyMol mutagenesis

Попробуем заменить ASP 57 на остаток, у которого наличие протона не зависит от pH - ASN. Для этого воспользуемся PyMol mutagenesis.



При замене на ASN длина водородной связи стала 3.2 Å. Такое расстояние слишком большое для образования водородной связи. Видно, что PyMol нарисовал “пробел” в β -структуре из-за того что водородное взаимодействие пропадает.

Хотя в реальном белке с такой мутацией возможно остатки достаточно сближены для сохранения водородной связи.

Литература и ссылки

- B. Pillai, Maia M. Cherney, Crystal Structure of Scytalidoglutamic Peptidase with its First Potent Inhibitor Provides Insights into Substrate Specificity and Catalysis, Journal of Molecular Biology, Volume 365, Issue 2, 2007, Pages 343-361, ISSN 0022-2836, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.058>.
- Ссылка на PyMol сессию: [2IFR.pse](#)