

Практикум 5.

Задание 1.

Объект рассмотрения в первом задании – С-концевой участок адгезина *Streptococcus gordonii*. Он представлен тремя доменами. Особенности его структуры являются наличие изопептидных связей – сшивок между лизином и аспарагином (номера соответствующих остатков: 927-1042, 1082-1232, 1259-1393), а также двух сайтов связывания кальция. Данная структура (PDB: 7L0O) была получена при pH=4. В рамках задачи нужно было осуществить протонирование рассматриваемого белка при pH кристаллизации с помощью алгоритма PROPKA и оценить его эффективность. Стоит отметить, что помимо добавления протонов, алгоритм включает оптимизацию геометрии структуры, что может повлечь за собой порой значительные смещения радикалов аминокислот от изначального положения. Я предположила, что наибольшее значение для функционирования белка должно иметь определенное протонирование участков его структуры, строение которых отличается от типичного. Такими участками для данного белка являются изопептидные связи. Также мне показалось важным рассмотреть сайты связывания кальция.

На рисунке 1 представлены две из трех изопептидных связей. На третьей я не акцентирую внимание, так как в изначальной структуре она была разорвана. Эти связи сшивают между собой два бета-листа, и их позиции консервативны среди гомологичных белков [1], что указывает на значимость их для поддержания структуры. Вероятно, разрыв одной из сшивок связан с экстремальными условиями кристаллизации. Как видно из рисунка, PROPKA распознает наличие такой связи как ошибку структуры, достраивает оба остатка и разворачивает их в пространстве. Это неестественное для данного белка состояние, вероятно, в реальности оно привело бы к нарушению его структурной организации, смещению бета-слоев от нативного положения. Также полярные аминокислотные остатки, которые оказываются развернуты в стороны, нарушают естественные взаимодействия между окружающими остатками, так как сами могут формировать нехарактерные для природного белка водородные и ионные связи.

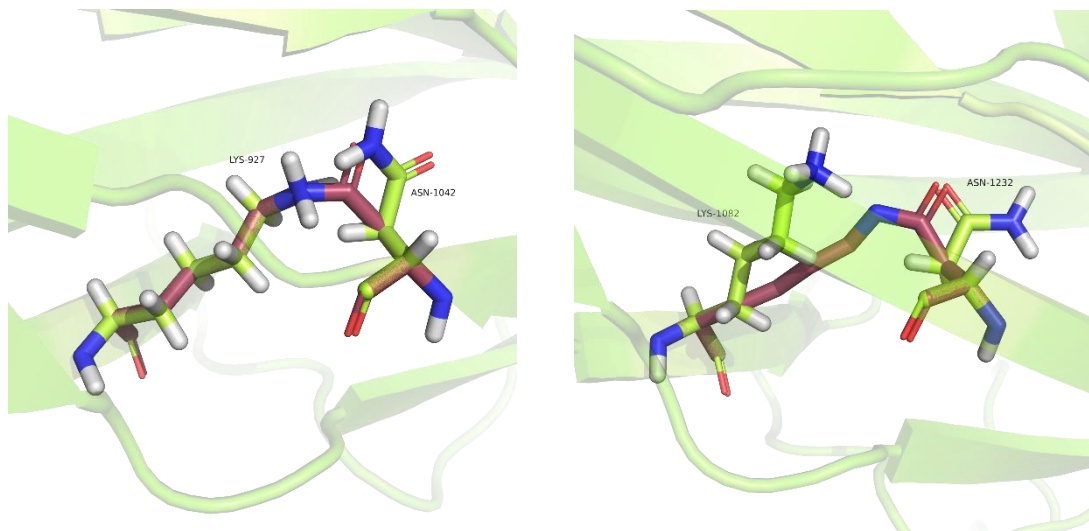


Рисунок 1. Изопептидные связи. Желтым цветом показана конечная протонированная структура, красным – исходная. Соответствующие сессии по [ссылке1](#) и [ссылке2](#)

Далее я рассмотрела окружение двух ионов кальция. Стоит отметить, что кристаллизация проводилась в довольно кислой среде, в таких условиях связывание металлов становится слабее, так как карбоксильные группы могут протонироваться и терять способность координировать металл. На рисунке 2 представлены аминокислотные остатки, координирующие их. Как можно видеть, координация осуществляется за счет координационных взаимодействий (фиолетовые

линии) и пи-катионного стекинга (бирюзовые линии). Темно-синим цветом показаны аминокислотные остатки исходной структуры, которые, согласно данным из UniProt, действительно участвуют в координации кальция. На рисунке 2В выделен 1311 глутамин, который должен также координировать ион кальция через карбонильный кислород боковой группы, но в данной структуре он оказался повернут к катиону кальция атомом азота, поэтому в координации не участвует.

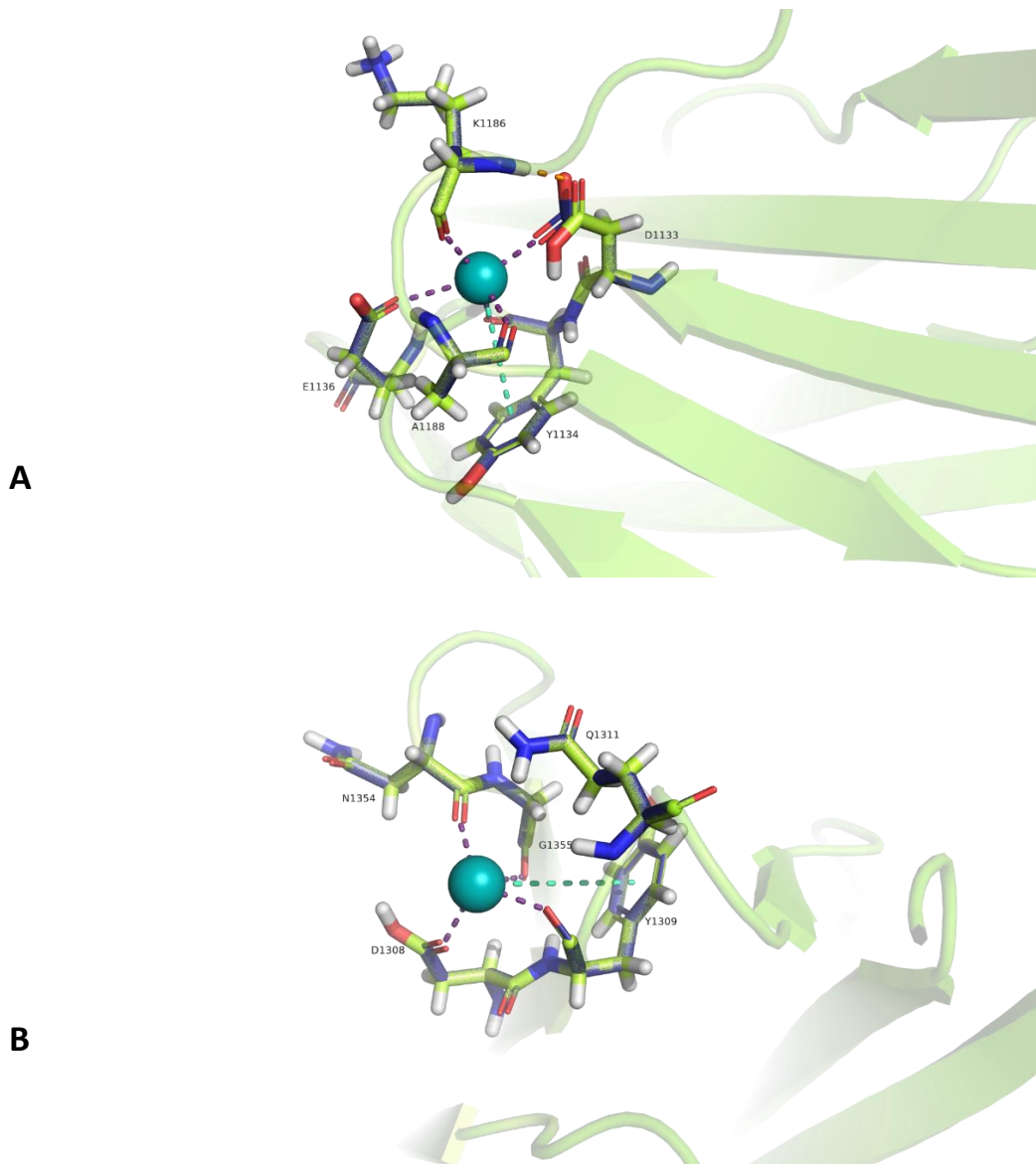


Рисунок 2. Координация катионов кальция. Темно-синим цветом показаны остатки исходной структуры, участвующие в координации кальция, желто-зеленым - протонированная структура. Фиолетовый – координационные взаимодействия, бирюзовый – пи-катионный стекинг, оранжевый – водородная связь, стабилизирующая протонированное состояние. [Сессия А](#), [сессия В](#)

Обратим внимание на карбоксильные группы. На рисунке 2А видим протонированную боковую группу 1133 аспарагиновой кислоты, на рисунке 2В – 1308 аспарагиновой кислоты. Значения рКа для данных остатков составляют 4.63 и 5.70 соответственно. В обоих случаях это выше pH кристаллизации, следовательно, в данных условиях они должны быть протонированы, что мы и наблюдаем. Координационные взаимодействия, которые осуществляют указанные аминокислотные остатки, в данных условиях реализованы не будут, но скорее всего это не повлияет на структуру, так как ион кальция будет удерживаться на месте за счет взаимодействий с

другими соседними остатками. На рисунке 2А можно видеть, что положение протона на 1133 аспарагиновой кислоте подтверждается наличием водородной связи с азотом 1186 лизина, в которую вступает не протонированный атом кислорода в качестве акцептора. В случае 2В связей, подтверждающих конкретное положение протона, не наблюдается, но боковой радикал направлен в раствор, следовательно, не участвует в водородных связях внутри белка и не нарушает их. Для нативной структуры, вероятнее всего, характерно отсутствие протонов на указанных остатках и их участие в связывании кальция.

Далее рассмотрим остатки аспартата и глутамата с самыми высокими рКа. На рисунке 3 представлено окружение 1307 аспарагиновой кислоты, её рКа составляет 7.64. Данный остаток может образовывать водородные связи в качестве акцептора (рисунок 3А) и в качестве донора (рисунок 3В). Во втором случае положение атома водорода в структуре не оптимально, для образования одной из двух возможных и показанных на рисунке 3В водородных связей водород должен быть расположен на линии потенциальной водородной связи (либо с 1393 аспарагином, либо с 1394 треонином). Но в этом случае была бы геометрически невозможна связь, показанная на рисунке 3А. Следовательно, можно сказать, что для данного остатка есть три варианта расположения протона, и они определяют возможные взаимодействия. Аспарагиновая кислота в данном случае не является частью функционально значимых локусов, поэтому на работу белка её состояние, скорее всего, не влияет.

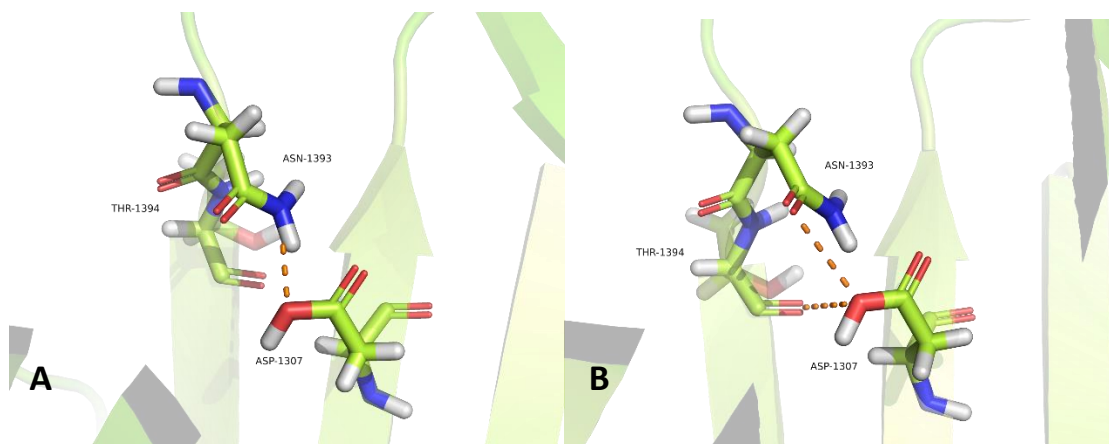


Рисунок 3. Аспарагиновая кислота 1307 и возможные водородные связи. Сессия по [ссылке](#)

Далее я рассмотрела остаток 1137 глутаминовой кислоты. Её рКа составляет 6.24, при pH=4 она тоже протонирована. В данном случае возможно образование водородной связи с собственной аминогруппой (кислород карбоксильной группы выступает в качестве акцептора) и с 1229 лизином через молекулу воды (кислород карбоксильной группы выступает в качестве донора). В обоих случаях положение карбоксильной группы не идеально соответствует требуемой геометрии, водороды не лежат на прямой линии, соединяющей акцепторные атомы, но, вероятно, такое положение является усредненным и позволяет реализовать в какой-то степени оба из возможных взаимодействий. Я полагаю, в данном случае депротонирование рассматриваемого остатка могло бы даже не повлиять на образование связей, так как молекула воды может выступать донором водородной связи как с лизином, так и с глутаматом, если будет повернута иначе.

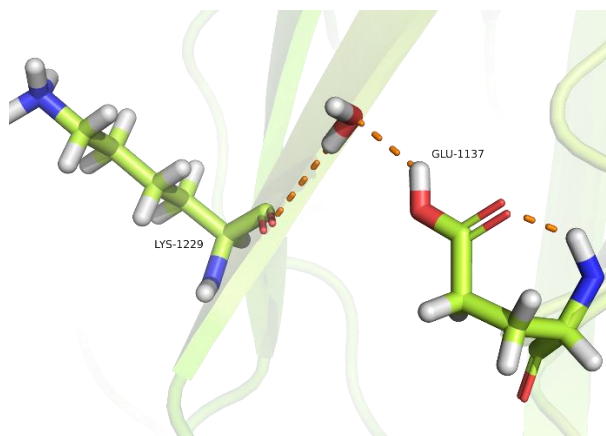


Рисунок 4. Глутаминовая кислота 1137 и её окружение. Сессия по [ссылке](#)

Довольно странный случай с 1215 аспарагиновой кислотой (рисунок 5), её рКа составляет 7.68. Протонирование 1190 глутамина сопровождалось изменением его геометрии, которое привело к тому, что остаток сильно смещен от изначального положения (показано фиолетовым), и имеет место перекрывание Ван дер Ваальсовых радиусов с 1192 фенилаланином. Если не обращать внимания на это столкновение, там могла бы быть водородная связь с карбонильным кислородом глутамина, но для её реализации также требуется развернуть протон на аспарагиновой кислоте в другом направлении. Если бы рассматриваемый остаток был депротонирован, он образовывал бы водородную связь с аминогруппой глутамина, выступая в качестве акцептора. Как видно из рисунка, расположение атомов глутамина в исходной структуре способствует такому раскладу.

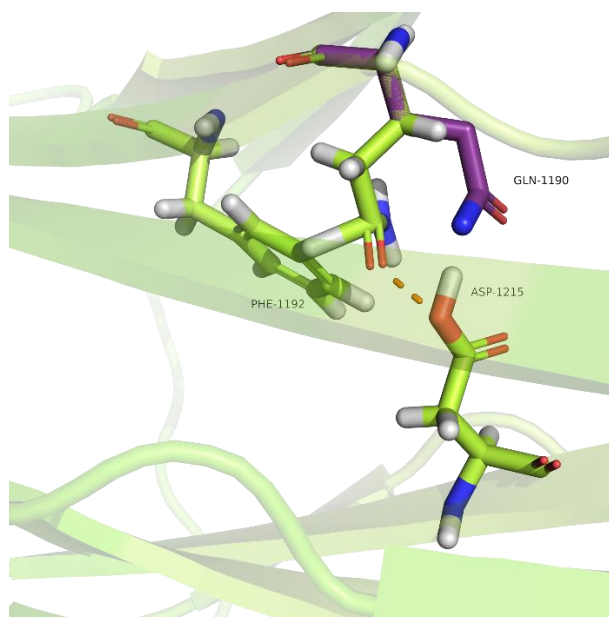


Рисунок 5. Окружение 1215 аспарагиновой кислоты. Сессия по [ссылке](#)

Также я рассмотрела 1110 аспарагиновую кислоту с рКа 6.81 и её потенциальные взаимодействия, их можно видеть на рисунке 6. Здесь, кажется, всё красиво, три водородные связи с аспартатом, аспарагином и лизином, везде геометрия связей оптимальна. Если депротонировать остаток, станет невозможна его роль в качестве донора водородной связи для 1076 аспаргина, но при условии сохранения протонирования аспарагиновой кислоты 1112, вероятна водородная связь с её карбоксильной группой, причем карбоксильная группа 1112 аспарагиновой кислоты может образовать водородную связь в качестве донора как с 1110 аспартатом, так и с 1076 аспарагином.

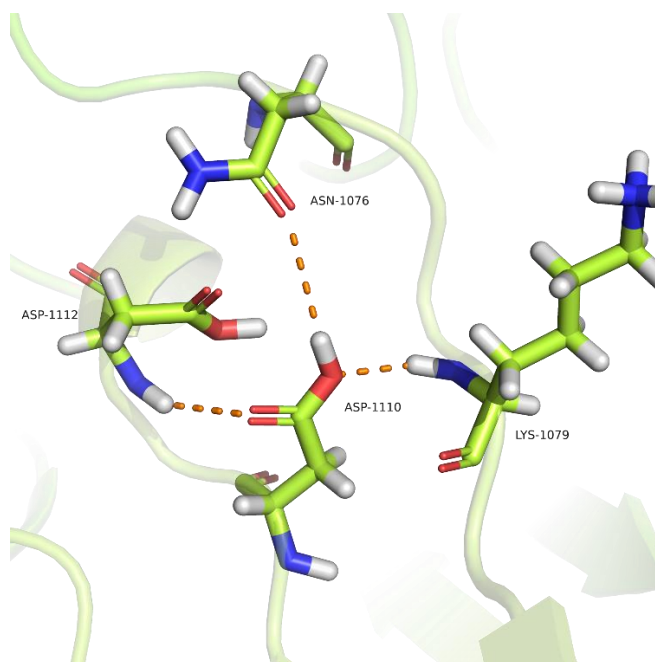


Рисунок 6. Аспарагиновая кислота 1110 и окружение. Сессия по [ссылке](#)

Задание 2.

Белок, который я рассматривала в рамках следующего задания – флагеллин жгутика археи *Aeropyrum pernix*. Данная структура (PDB: 7TXI) была получена методом криоэлектронной микроскопии. Биологическая сборка (рисунок 6) включает 20 одинаковых цепей. В качестве асимметричной единицы для этой структуры в базе данных представлена только одна цепь, полную структуру я получила, скачав файл .cif со страницы Structure. Вероятно, для полной сборки нет описания вторичной структуры, поэтому она отображается в PyMol так, как показано на рисунке 7В.

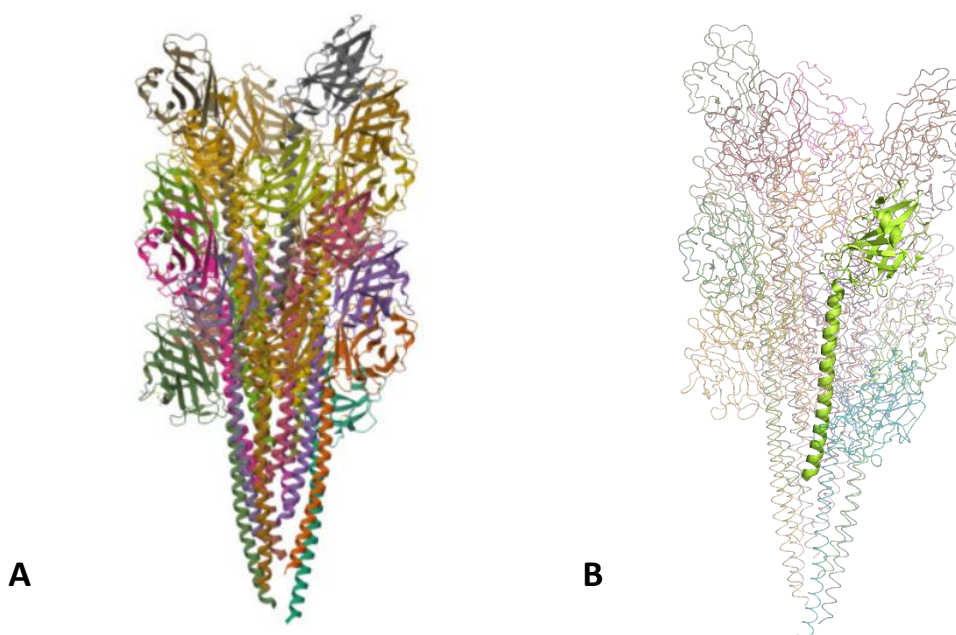


Рисунок 7. Биологическая сборка архейного флагеллина. А - изображение из базы данных PDB, В - полученное с помощью PyMol (ссылка на [сессию](#)). Ярко-желтым цветом выделена цепь, относительно которой далее рассмотрены контакты

В таблице ниже представлены типы контактов, которые формируются между цепью А, которая была выбрана в качестве основной (ярко-желтая на рисунке 7В), и остальными цепями. Как можно видеть, большая часть контактов являются проксимальными, на втором месте по встречаемости – гидрофобные. Наибольшее число контактов реализовано с цепями А14(154), А4(73) и А8(47).

Наибольшее число контактов обеспечивают 28 фенилаланин (14), 42 лизин (10), 155 лизин(10), 21 изолейцин (8), 8 валин (8), 31 лейцин(8), 35 лейцин(8), 121 серин(8), 143 аспарагин(8). Можно отметить, что среди перечисленных остатков преобладают гидрофобные, что нетрудно связать с большим количеством гидрофобных контактов. Локализация этих остатков показана на рисунке 8.

Таблица 1. Типы контактов между мономерами

Тип взаимодействий	Среднее расстояние, Å	Участвующие цепи	Общее число
Проксимальные	4.52	A14, A8, A4, A18, A1, A10, A7, A15, A12	337
Гидрофобные	4.09	A4, A14, A8, A18, A7, A1, A10	40
Ионные	3.84	A14	1
Слабополярные	3.27	A14	1
Ван дер Ваальсовы	3.395	A14, A4,	4
Перекрывания Ван дер Ваальсовых радиусов	2.71	A14, A4, A18	5

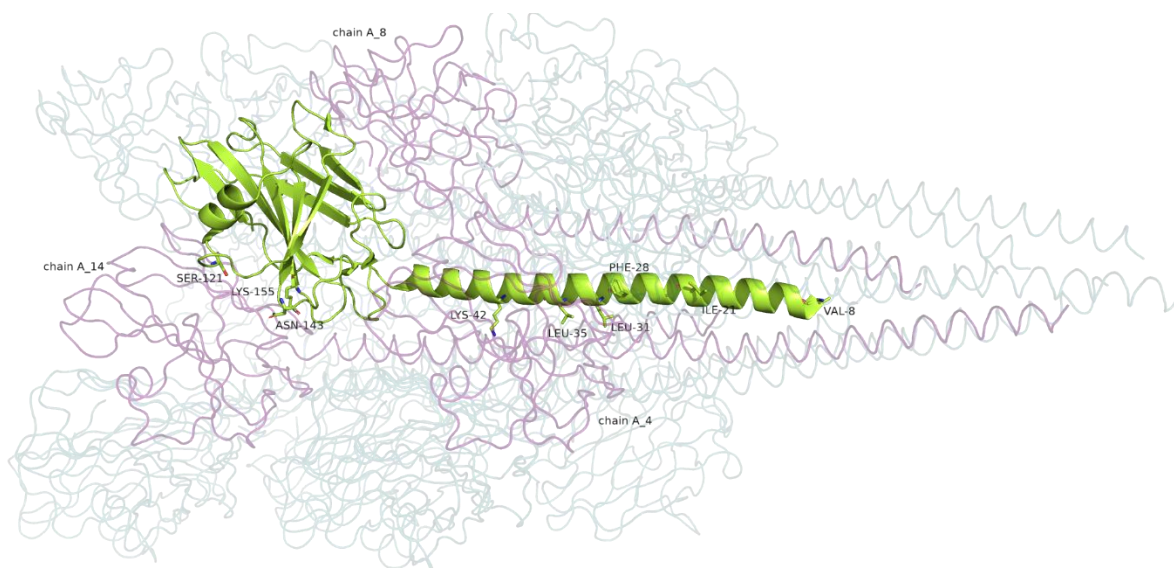


Рисунок 8. Расположение остатков, образующих наибольшее количество контактов. Ярко-желтым показана цепь, относительно которой рассматривались взаимодействия, фиолетовым - три цепи с наибольшим количеством взаимодействий. Стиками показаны остатки, формирующие наибольшее число взаимодействий. Сессия по [ссылке](#)

Список литературы

1. Larson, Matthew R., et al. "Crystal Structure of the C-terminal Region of Streptococcus mutans Antigen I/II and Characterization of Salivary Agglutinin Adherence Domains." Journal of Biological Chemistry 286.24 (2011): 21657-21666.