

Практикум 5.

Задание 1. Протонирование

<https://server.poissonboltzmann.org/jobstatus?jobtype=pdb2pqr&jobid=uxj49za7xc&date=2023-11-19>

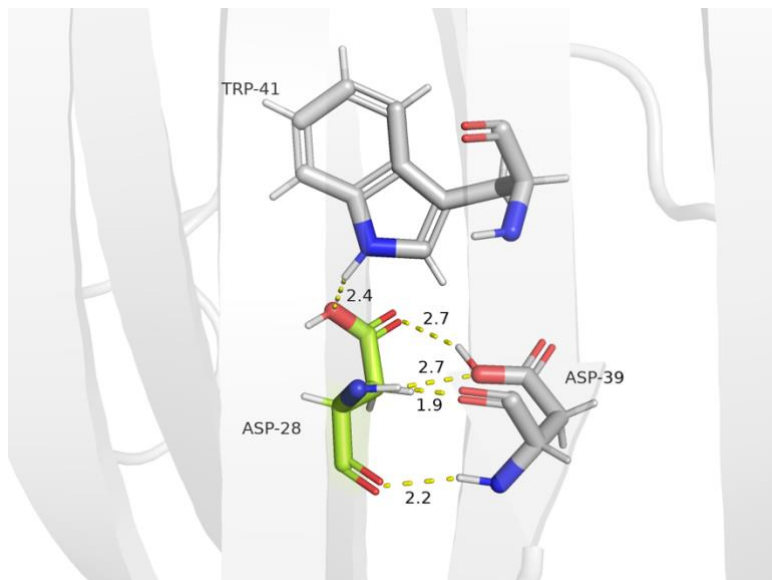
Аспергиллоглутаминовая пептидаза из плесневого гриба *Aspergillus niger* относится к семейству глутаминовых пептидаз, каталитическая активность которых осуществляется диадой из остатков глутамата и глутамина. Структура 1Y43 разрешена в кислом pH 2.1 – это оптимальные условия для активности фермента [1].

Рассмотрим, как протонируются некоторые аминокислотные остатки пептидазы при низких значениях pH. Скорее всего, в таких условиях аминокислотные остатки полностью протонируются. Восстановим значения pKa структуры с помощью сервиса PROPKA. Я выбрала несколько остатков, для которых pKa была значительно выше значения pH среды – они перечислены в табл. 1. Я также рассмотрела Glu110, так как этот остаток вовлечен в каталитическую диаду и его протонирование сильно влияет на функциональную способность белка [2].

Аминокислотный остаток	pKa модели	pKa PROPKA
Asp-28	3.80	7.81
Glu-106	4.50	10.42
His-90	6.50	5.42
Glu-110	4.50	7.58

Табл. 1 Выбранные аминокислотные остатки и их pKa в модели из PDB и в выдаче PROPKA

Аспарагиновая кислота.



По данным PROPKA, как и ожидалось, все остатки полностью протонированы, что обуславливает наличие водородной связи с Asp39 и Trp41 (рис. 1). Ситуация правдоподобна, остаток хорошо стабилизирован. При депротонировании никаких взаимодействий не возникло бы.

Рис. 1 Взаимодействия аспартата с окружением. Желтым пунктиром показаны водородные взаимодействия. *PyMol сессия:*

https://kodomo.fbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr5/asp_28_Burmistrova.pse

Глутаминовая кислота.

Тут в выдаче PROPKA глутамат также полностью протонирован, водородные взаимодействия с остовами Asp14 и Asn104 хорошо стабилизируют положение радикала (рис. 2). При депротонировании никаких взаимодействий не наблюдается. В целом глутамат тут окружают гидрофобные аминокислоты (рис. 3), возможно, они формируют

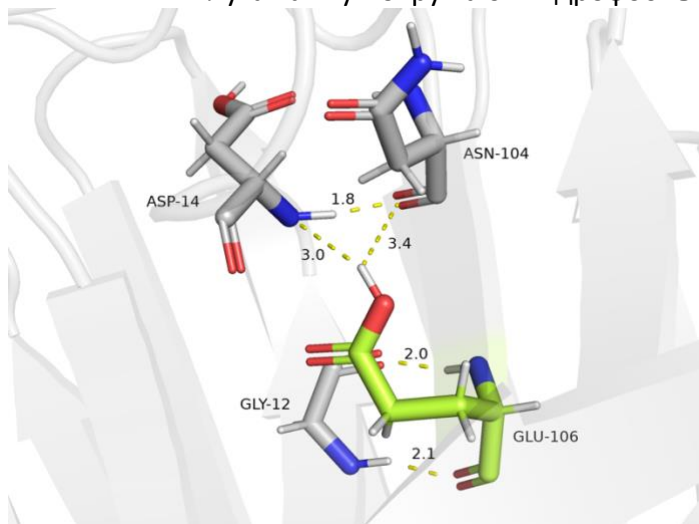


Рис. 2 Взаимодействия глутаминовой кислоты с окружением. Желтым пунктиром показаны водородные взаимодействия.

[PyMol сессия:](https://kodomofbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr5/glu_106_Burmistrova.pse)

https://kodomofbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr5/glu_106_Burmistrova.pse

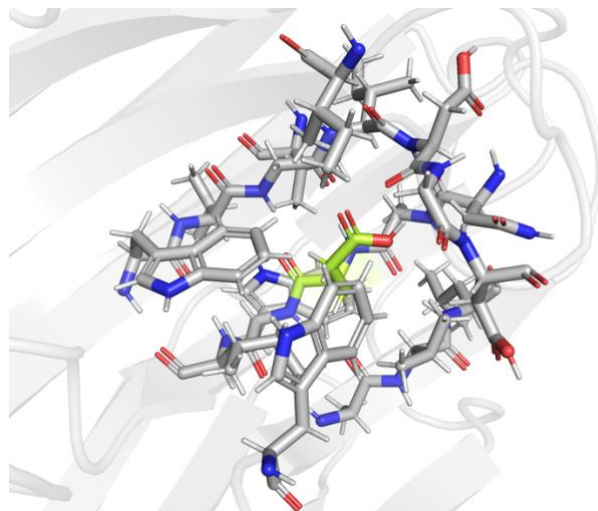


Рис. 3 Гидрофобное окружение Glu-106 (выделен салатным)

гидрофобный карман для связывания гидрофобного лиганда, но в литературе функциональная роль этих остатков не описана.

Гистидин.

При полном протонировании гистидина на выходе PROPKA помимо цепочки стекингов присутствуют водородные взаимодействия с тирозином и остовом фенилаланина (рис. 4). Направление водорода фенилаланина указывает на то, что он является акцептором водородной связи. В случае депротонирования структуры остается цепочка стекингов, однако, возможно, боковая цепь гистидина могла бы вращаться.

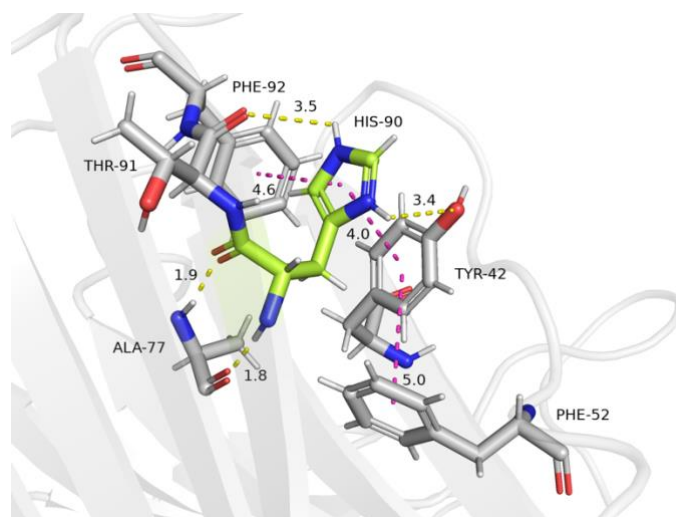


Рис. 4 Взаимодействия гистидина с окружением. Желтым пунктиром показаны водородные взаимодействия, малиновым – стекинг. [PyMol сессия:](https://kodomofbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr5/his_90_Burmistrova.pse)

https://kodomofbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr5/his_90_Burmistrova.pse

Глутаминовая кислота в активном центре фермента.

Глутамат 110 связан со вторым остатком, включенным в каталитическую диаду через водородные взаимодействия с молекулой воды (рис. 5, слева). Все расстояния связей в структуре подтверждают эти взаимодействия и в целом молекула воды стабильна (ни один остаток структуры не содержит альтернативных конформаций – все молекулы в кристалле идентичны). К сожалению, PROPKA не указывает расположение воды в структуре, поэтому выводы об этом важном взаимодействии из выдачи программы сделать нельзя. На мой взгляд, программа верно определила положение водорода глутамата и если бы между участниками диады была бы молекула воды, я была бы на 100% уверена в правильности структуры.

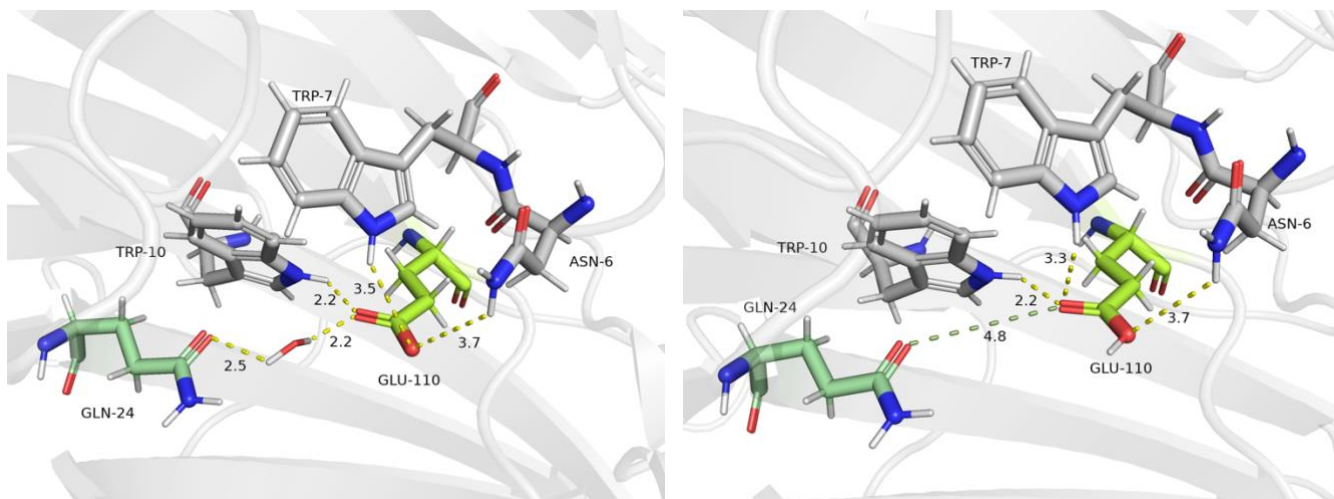


Рис. 5 Взаимодействия глутамата с окружением. Слева – структура 1Y43 в PyMol ([сессия: https://kodo.fbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr5/active_site_Burmistrova.pse](https://kodo.fbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr5/active_site_Burmistrova.pse)). Справа – выдача PROPKA. Желтым пунктиром показаны водородные взаимодействия, зеленым указано расстояние между атомами, связанными через молекулу воды (отсутствует в выдаче PROPKA) [PyMol сессия: https://kodo.fbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr5/glu_110_Burmistrova.pse](https://kodo.fbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr5/glu_110_Burmistrova.pse)

Литература:

- 1) Sriranganadane D, Reichard U, Salamin K, Fratti M, Jousson O, Waridel P, Quadroni M, Neuhaus JM, Monod M. Secreted glutamic protease rescues aspartic protease Pep deficiency in *Aspergillus fumigatus* during growth in acidic protein medium. *Microbiology (Reading)*. 2011 May;157(Pt 5):1541-1550. doi: 10.1099/mic.0.048603-0. Epub 2011 Feb 24. PMID: 21349972.
- 2) Sasaki H, Nakagawa A, Muramatsu T, Suganuma M, Sawano Y, Kojima M, Kubota K, Takahashi K, Tanokura M. The three-dimensional structure of aspergilloglutamic peptidase from *Aspergillus niger*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2004 Sep;80(9):435–8. Epub 2004 Sep 1. PMID: PMC8147669.

