

Практикум 5. Протонирование

Задание 1

Была рассмотрена структура с PDB ID 6I3L. Данная структура является билирубиноксидазой сапротрофного и патогенного аскомицета *Albimbria verrucaria*. Как и в метаболическом пути катаболизма гемоглобина человека данный белок окисляет билирубин до биливердина (рис. 1). Этот фермент участвует в метаболизме порфиринов и хлорофиллов. Он широко изучается как катализатор восстановления кислорода.

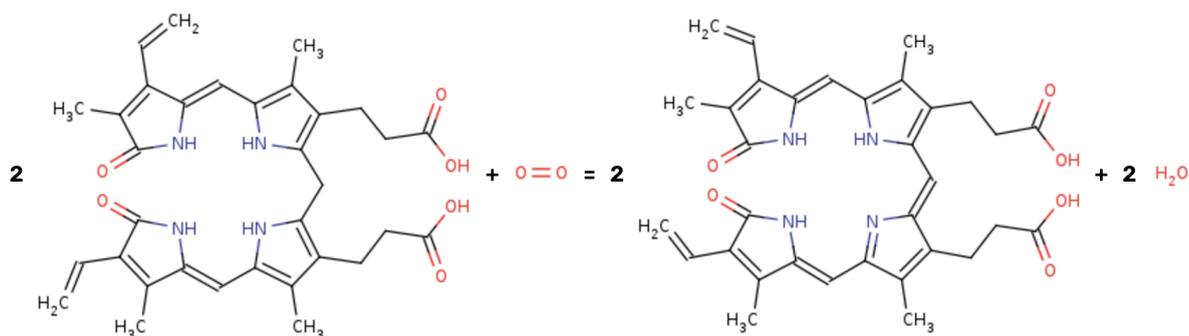


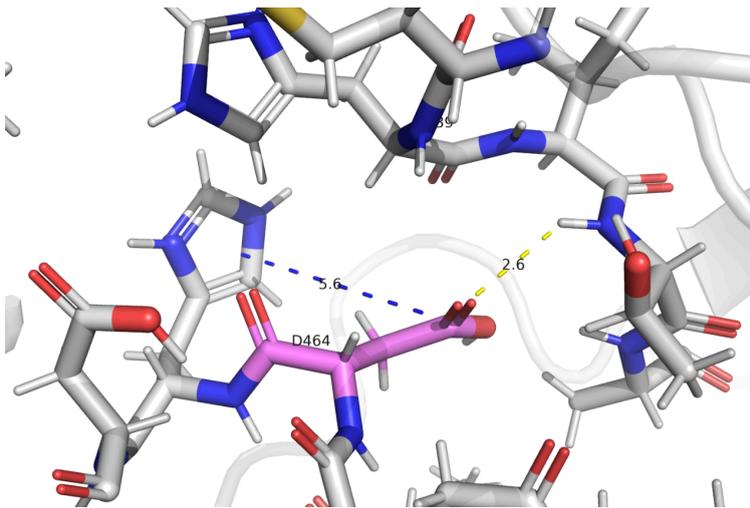
Рисунок 1. Схема билирубиноксидазной реакции.

Данная структура была получена методом рентгеноструктурного анализа кристаллогидрата белка в кислой среде (pH = 3,1). Она имеет разрешение 2,1Å и не содержит атомов водорода. В кристаллической ячейке имеется две цепи: мономеры белка.

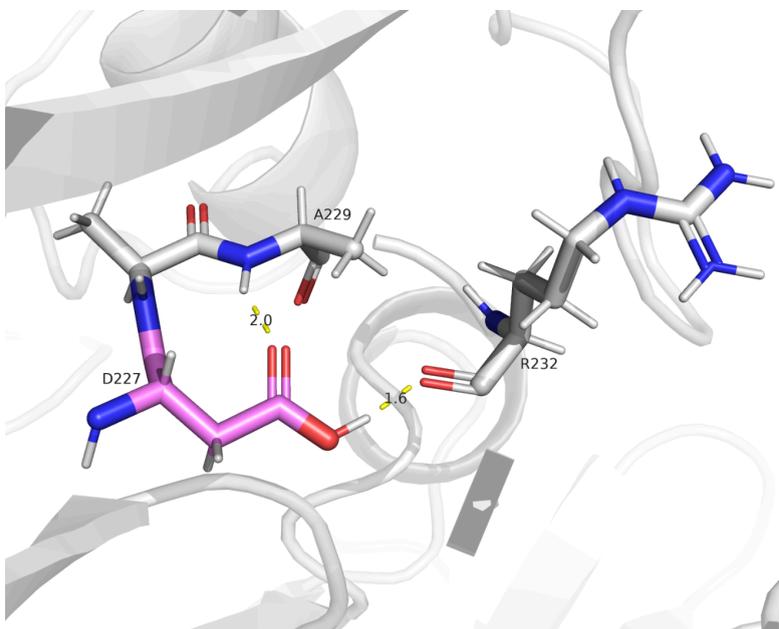
Исходя из данных о pH попытаемся предсказать протонирование аминокислотных остатков белка с помощью веб-сервиса PROPKA при параметрах по умолчанию, кроме значения pH. Результаты работы программы доступны по [ссылке](#).

В моей структуре получилось 244 остатков ASP (n = 118), GLU (n = 106), HIS (n = 20), для которых pKa выше pH кристаллизации, рассмотрим несколько остатков с наибольшим pKa:

- ASP 227 A, 9.59
- ASP 464 A, 8.37
- HIS 262 A, 7.22
- GLU 78 A, 8.61
- GLU 275 A, 6.28

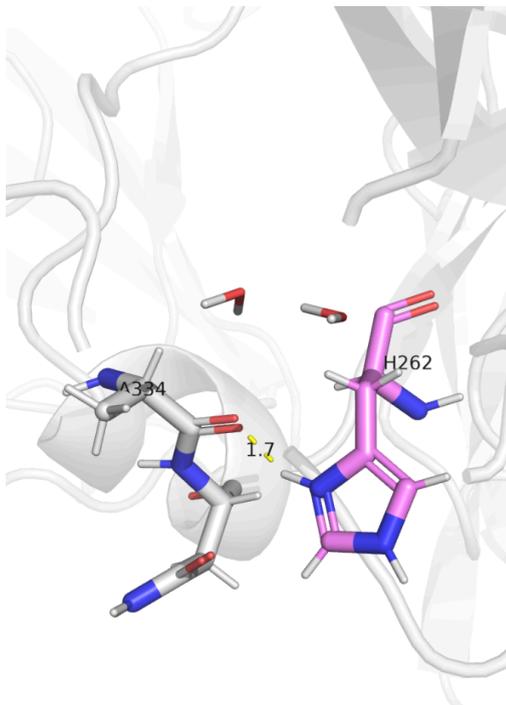


ASP 464 (розовый): Остаток локализован в петле на краю глобулы, есть доступ молекул растворителя, однако взаимодействия с молекулами воды не наблюдается. Аспарат в заряженном состоянии мог бы образовать солевой мостик с одним из соседних гистидинов. Также в его окрестности есть ещё два протонированных кислотных остатка. Одновременное протонирование всех кислотных остатков энергетически выгодно, но в заряженном состоянии они могли бы связать катион какого-нибудь металла из раствора. В целом, в реальной сольватированной системе аспарат был бы скорее депротонирован. Но положение протона скорее удачное, так как с другой стороны меньше свободного пространства.

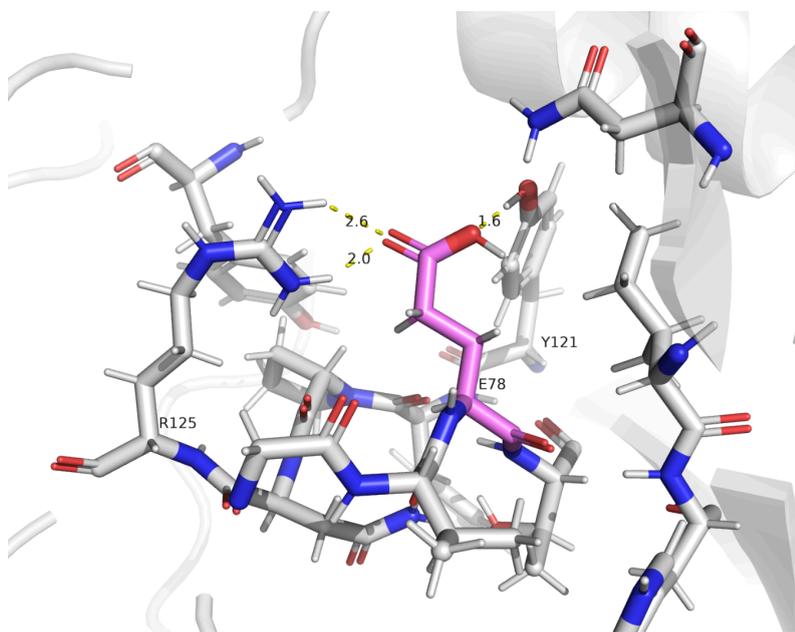


ASP 227: Остаток локализован в центре глобулы, на бета-петле. Хотя атомы кислорода карбоксильной группы бокового радикала не образуют максимального числа водородных связей, протонирование в данной позиции позволяет образовать одну из них. В центре глобулы разумно ожидать протонирования данного остатка. При потере

протонирования потеряется возможность образовать одну из водородных связей, однако это почти невозможно в нейтральной среде, особенно учитывая $pK_a = 9,59$.

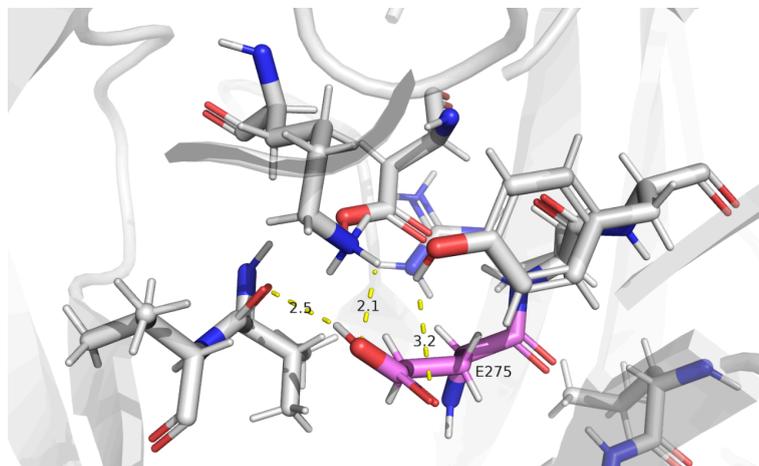


HIS 262: Остаток расположен в поверхностной петле белковой глобулы, и его положительный заряд не компенсируется. При данном pH ожидается протонирование гистидина и его взаимодействие с водой, чего, однако, не наблюдается в кристаллической структуре. При нейтральном pH (pK_a 7.22) остаток, вероятно, депротонируется, что может сместить петлю к центру глобулы. Скорее всего, при повышении pH остаток гистидина будет терять протон главным образом с азота, не вовлеченного в водородную связь с Ala334, и направленного в раствор. Однако, учитывая удаленность остатка от активного центра, это вряд ли повлияет на ферментативную активность.



GLU 78: Остаток находится в скрытой от растворителя петле белковой структуры. Протонирование выбранного кислородного атома в этом положении представляется логичным, поскольку это не препятствует образованию водородной связи с Tyr-121 и согласуется с конформацией петли. Кроме того, другой кислородный атом карбоксильной группы уже участвует в образовании двух водородных связей с Arg-125, и его протонирование было бы нецелесообразно. Депротонирование при нейтральном pH ($pK_a = 8,61$) маловероятно, но могло бы привести к смещению петли к поверхности глобулы, что, учитывая расположение активного центра (остатки 225-228 [1]), вряд ли

повлияло бы на его активность. В таком случае он всё ещё может акцептировать обе водородные связи, но также способен образовывать солевой мостик с протонированным Arg125. И Glu78, и Arg125 погружены в белок, поэтому солевой мостик будет значительно понижать свободную энергию системы.



GLU 275: Остаток расположен в центре глобулы, доступ растворителя отсутствует, в связи с чем можно ожидать, что он будет протонирован. Глутамат образует водородную связь своим протонированным кислородом с соседним остатком валина. Хотя по значениям $pK_a = 6.28$ и можно ожидать депротонирования остатка при нейтральном pH (но вряд ли в центре глобулы), там потенциально возможно образование солевого мостика с остатком лизина. Учитывая близость к активному центру, это могло бы повлиять на работу фермента.

Итого:

- при депротонировании ASP 464 возникло бы электростатическое взаимодействие с гистидино, звучит неплохо;
- при депротонировании ASP 227 произошла бы потеря одной водородной связи, это могло бы несколько дестабилизировать систему, так как остаток близок к активному центру;
- при депротонировании HIS 262 скорее всего ничего бы не произошло остаток торчит в раствор :) ;
- при депротонировании GLU 78 потенциально мог бы образоваться солевой мостик и потенциально понизилась бы энергия, но вряд ли это сильно повлияло бы на работу фермента;
- при депротонировании GLU275 происходит потеря водородной связи с остатком валина, но потенциальное образование солевого мостика с лизином

[ссылка на сессию PyMol](#)

Литература

1. Kovař, T., Švecová, L., Østergaard, L.H. *et al.* Trp–His covalent adduct in bilirubin oxidase is crucial for effective bilirubin binding but has a minor role in electron transfer. *Sci Rep* 9, 13700 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50105-3>