

Введение

Гидрогеназы -- перспективный класс ферментов, осуществляющий гетеролитическое расщепление молекулы водорода на два протона и два электрона. Такое расщепление происходит при нейтральном pH, а сам каталитический сайт расположен глубоко в ферменте, вне доступа молекул растворителя. Реакция дополнительно осложняется тем, что группы, по которым должен переноситься протон после гетеролитического расщепления, должны быть расположены очень близко друг к другу. Также стоит отметить, что гидрогеназы, толерантные к кислороду, должны также эффективно переносить и электроны, чтобы не допустить их передачи на кислород, так как такой перенос может привести не только к синтезу молекул воды, но и большого количества свободных радикалов, которые могут повредить клетку.

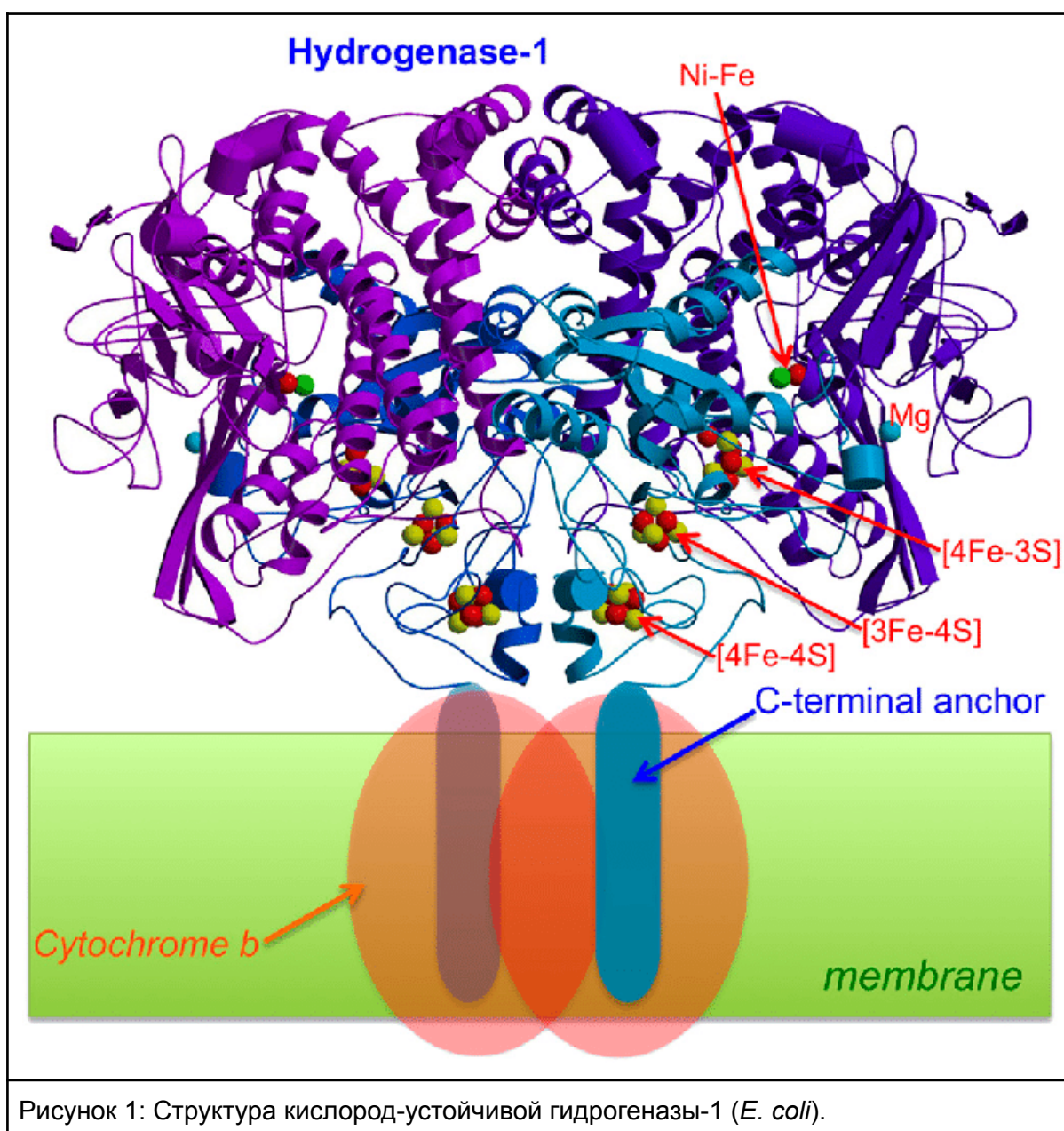


Рисунок 1: Структура кислород-устойчивой гидрогеназы-1 (*E. coli*).

Железо-никелевая гидрогеназа 1 -- это мембранный, кислород-толерантный фермент кишечной палочки, являющийся гетеродимером. Каталитический сайт расположен в "большой" субъединице димера и дополнительно содержит катионы железа и никеля, а также три последовательно расположенных железо-серных кластера, участвующие в процессе переноса протона (Evans et al. 2018).

Альтернативные положения

Рентгеноструктурный анализ производится с использованием не единичных молекул, а кристалла из них, однако получить практически идеальный кристалл невозможно. В неидеальном кристалле некоторые группы могут иметь различное положение в разных ячейках, причем часть из них может отражать два стабильных положения исследуемого участка (например, два положения для бокового радикала аминокислоты).

В рамках данной работы были исследованы альт-локи для аминокислот 13, 16, 45 и 46 малой субъединицы гидрогеназы-1. Данные аминокислотные остатки сближены между собой и, очевидно, их конформационная подвижность взаимосвязана. Так как все остатки, вовлеченные в данные взаимодействия, способны диссоциировать с высвобождением протона в водном растворе, для начала воспользуемся сервисом PROPKA для предсказания pK_a для данных остатков, чтобы в дальнейшем воспользоваться этой информацией для поиска стабильных комбинаций альт-локов.

| Аминокислотный остаток | Предсказанный pK_a | Теоретический pK_a | Разница |
|------------------------|----------------------|----------------------|---------|
| HIS13 | 7.87 | 6.5 | +1.37 |
| GLU16 | 4.02 | 4.5 | -0.48 |
| ASP45 | 3.54 | 3.8 | -0.26 |
| ASP46 | 3.94 | 3.8 | +0.14 |

В целом, результаты работы PROPKA совпадают с ожидаемыми: мы видим достаточно значительное повышение pK_a для остатка HIS13, который находится в окружении отрицательно-заряженных остатков. Повышение его pK_a вероятно приведет как к появлению электростатических взаимодействий при $pH = 7.0$, так и к появлению водородных связей, что может значительно стабилизировать структуру белка. При рассмотрении комбинаций альт-локов будет первую очередь использована протонированная форма гистидина.

Рассмотрим все комбинации альт-локов и отберем из них самые стабильные. Одной из наиболее стабильных конформаций альт-локов является комбинация 13A16A45A46B с дважды протонированным гистидином.

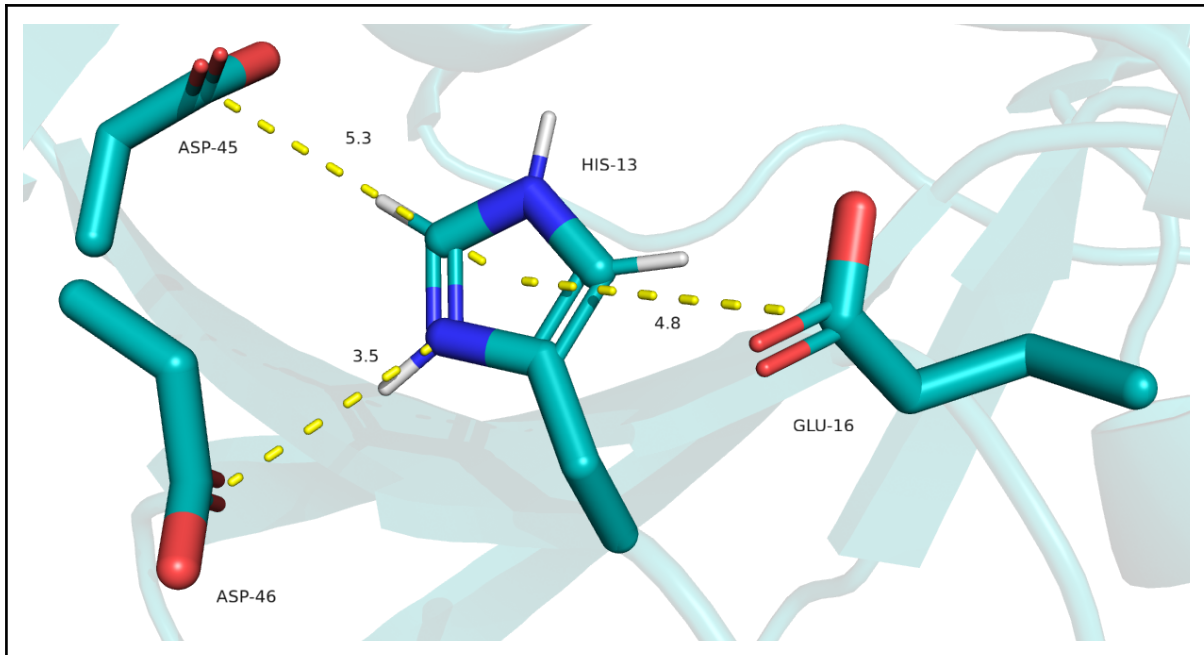


Рисунок 2. Взаимодействия аминокислотных остатков для следующих алыт-локов: 13A16A45A46B в случае дважды протонированного гистидина.

В данном наборе мы видим водородную связь между остатками ASP46 и HIS-13, все кислотные остатки взаимодействуют с положительно-заряженным гистидином электростатически. Однако если гистидин оказывается нейтрально-заряженным, такая эффективность взаимодействий пропадает. Как в таком случае может поддерживаться данная комбинация алыт-локов?

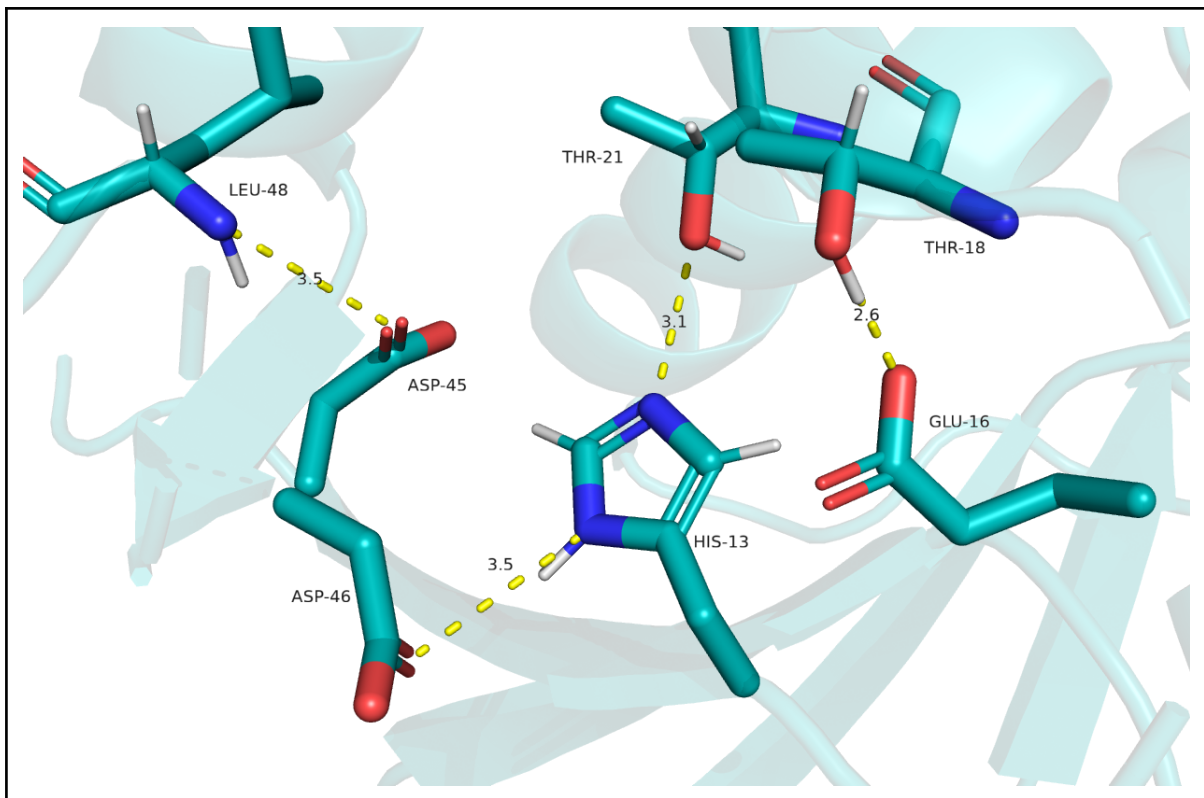


Рисунок 3. Взаимодействия аминокислотных остатков для следующих алыт-локов: 13A16A45A46B в случае нейтрально-заряженного гистидина.

В данном случае гистидин должен быть протонирован по δ -азоту, что позволяет ему образовывать водородную связь с остатком ASP46. Остаток ASP45 образует водородную связь с азотом остова остатка LEU48, остаток GLU16 – с OH-группой остатка THR18. OH-группа остатка THR21 также может служить в качестве донора водородной связи для кольца гистидина.

Данный комплекс положений оказывается стабильным и в отсутствие водородных связей между гистидином и остатками ASP45 и GLU16, т.к. они находятся на достаточно большом расстоянии от кольца, что позволяет избежать отталкивания этих групп. Однако эти расстояния все еще позволяют остаткам взаимодействовать электростатически, а дополнительная поддержка данных остатков другими группами (описано выше) также стабилизируют их положение.

В целом, стоит отметить, что все эти взаимодействия (кроме водородной связи HIS13 и THR21, которая может, напротив, инвертироваться) присутствуют и в случае протонированной формы гистидина), что делает эту комбинацию алыт-локов устойчивой. Данные наблюдения также согласуются с предсказаниями PROPKA.

Второй стабильной конформацией алыт-локов является комбинация 13B16B45B46A с дважды протонированным гистидином.

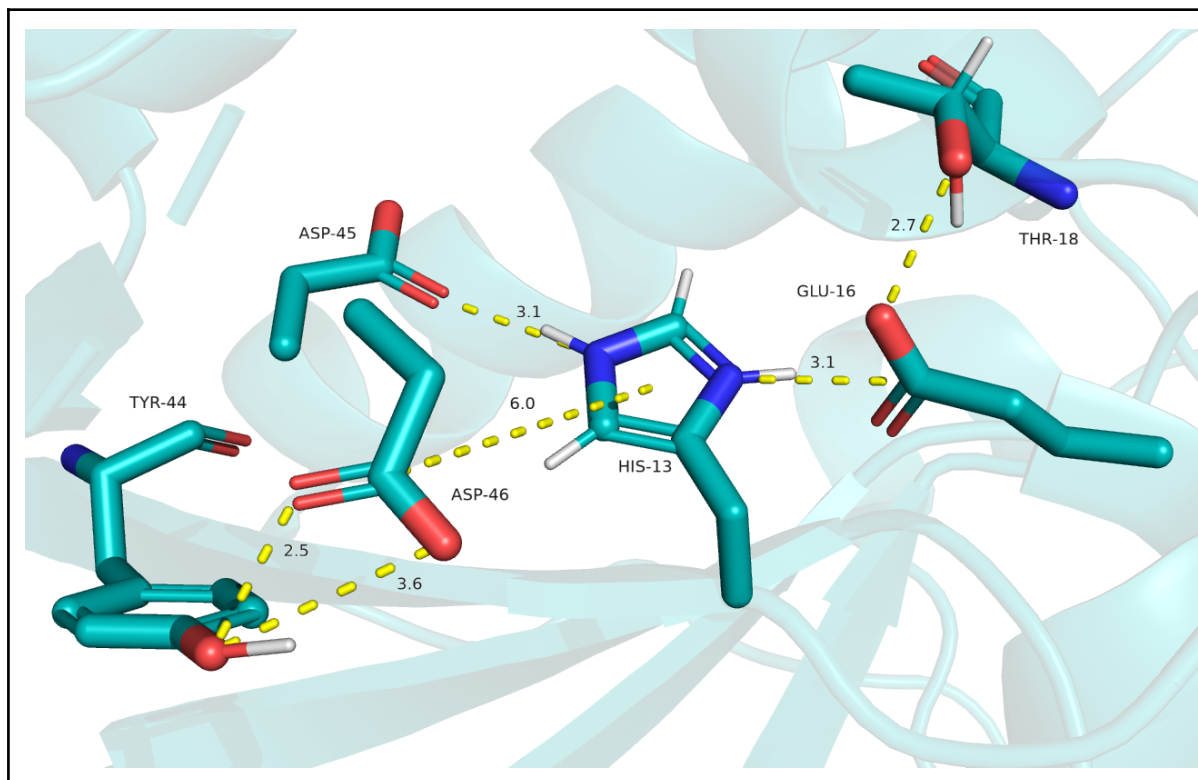


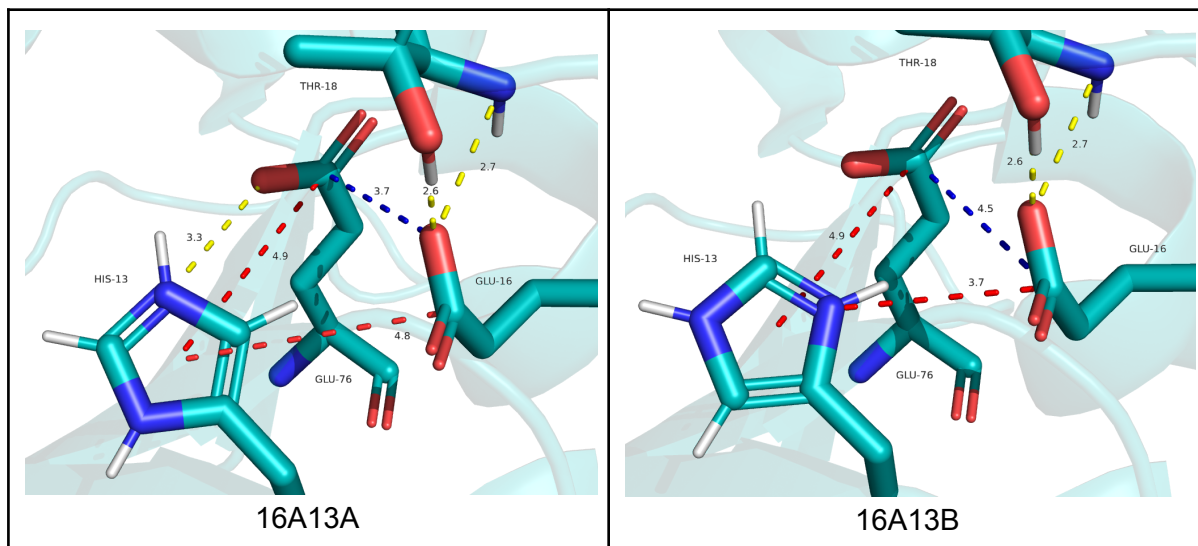
Рисунок 4. Взаимодействия аминокислот для следующих алыт-локов: 13B16B45B46A, гистидин дважды протонирован.

В данном случае ситуация достаточно сильно изменяется. Гистидин в данном случае должен быть протонирован по обоим атомам азота. Это позволяет ему образовать две водородные связи с остатками ASP45 и GLU16. С этими остатками гистидин также связан с помощью достаточно эффективных электростатических взаимодействий (расстояние около 3Å). Также такое взаимодействие возможно с остатком ASP46, однако оно менее эффективно (т.к. расстояние в два раза выше). Положение этого аспартата стабилизируется водородными связями с остатком TYR44. Положение остатка GLU16 также поддерживается водородной связью с остатком THR18, причем эта водородная связь является очень эффективной по длине и геометрии.

В данном случае остаток ASP46 также находится на достаточно большом расстоянии от гистидинового кольца, что позволяет также этой конформации быть устойчивой. Более слабые электростатические взаимодействия с данным остатком компенсируются более эффективными взаимодействиями с остатками ASP45 и GLU16.

Необходимость нахождения гистидина в протонированном состоянии тут тоже достаточно структурно обоснована, что также подтверждает предсказания PROPKA.

Стоит отметить, что, на мой взгляд, обе конформации стабилизированы примерно одинаково эффективно, что отражается заселенностью каждого альтлока: для всех аминокислот, кроме GLU16, она равна 0.5; для последнего -- 0.4 и 0.6 для альт-локов А и В соответственно.



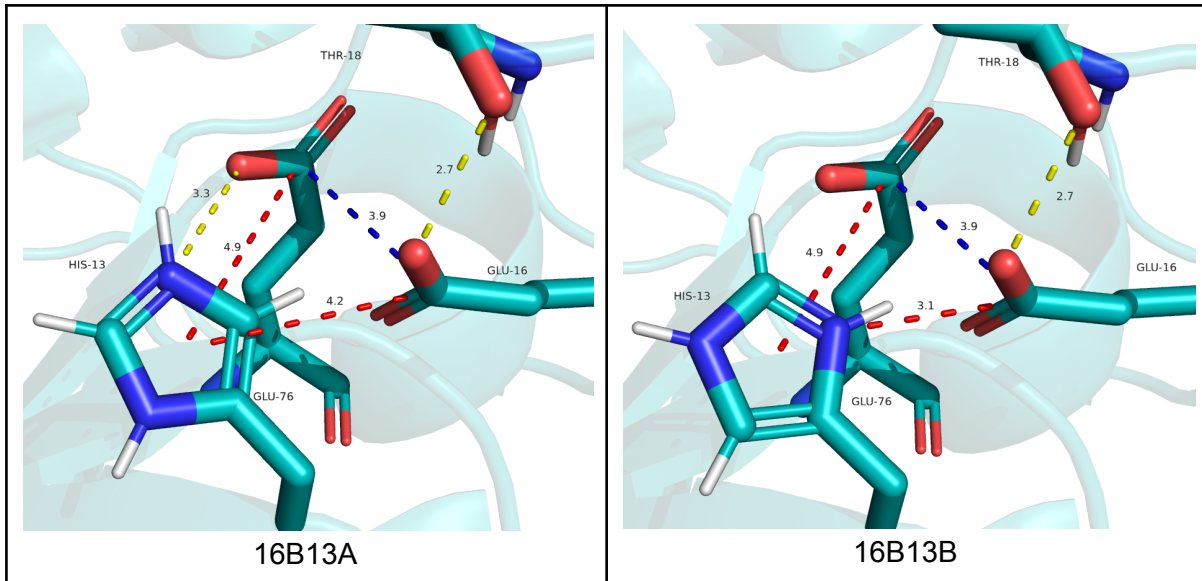


Рисунок 5. Стабилизация альфа-локов А и В для остатка GLU16. Красным показаны электростатические взаимодействия (иногда и водородные связи), синим – электростатическое отталкивание, желтым – водородные связи.

Если рассмотреть данные положения, то наиболее стабильными оказываются ранее рассмотренные сочетания 13B16B и 13A16A. Два других состояния являются чуть менее устойчивыми, причем комбинация 16B13A более стабильна, т.к. для остаток THR16 образует водородную связь с остатком HIS13, что позволяет стабилизировать отрицательный заряд на радикале и уменьшить отталкивание между двумя кислотными остатками GLU16 и GLU76.

Другие наборы конформаций показались мне менее стабильными.

В-фактор

Величина В-фактора отражает достоверность определения положения каждой конкретной группы в белковой структуре. Стабильность же, в свою очередь, может быть связана с тем, насколько жестко “закреплен” тот или иной элемент в белковой структуре. Логично предположить, что наименьшую достоверность определения положения могут иметь очень подвижные петли и концевые участки белковых молекул. Покрасим backbone белковой молекулы по В-фактору: красным обозначим наименее точные участки, а синим -- наиболее.

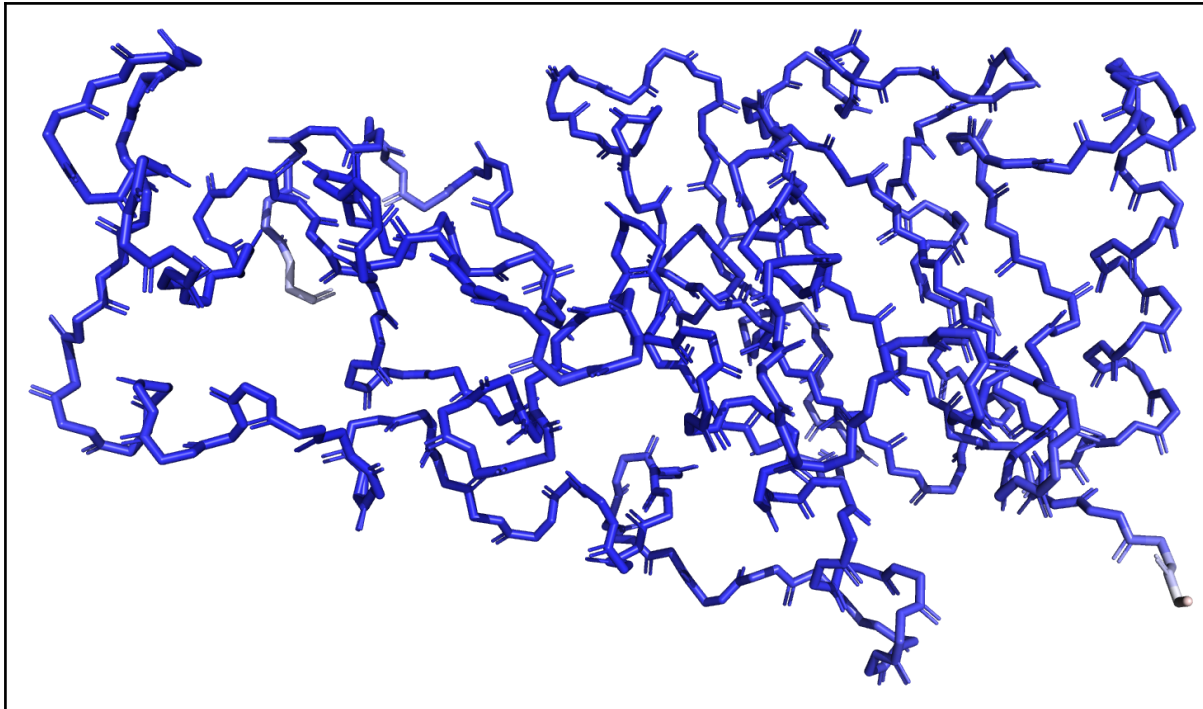


Рисунок 6. Остов белка, покрашенный по величине B-фактора.

Можно заметить, что предположение подтвердилось: меньшую величину имеют именно концевые участки молекулы, что может быть обусловлено их более высокой подвижностью. В структуре субъединицы есть достаточно большое количество петель, но, видимо, они являются стабильными, т.к. могут связывать простетические группы, что, видимо, и объясняет их стабильность.

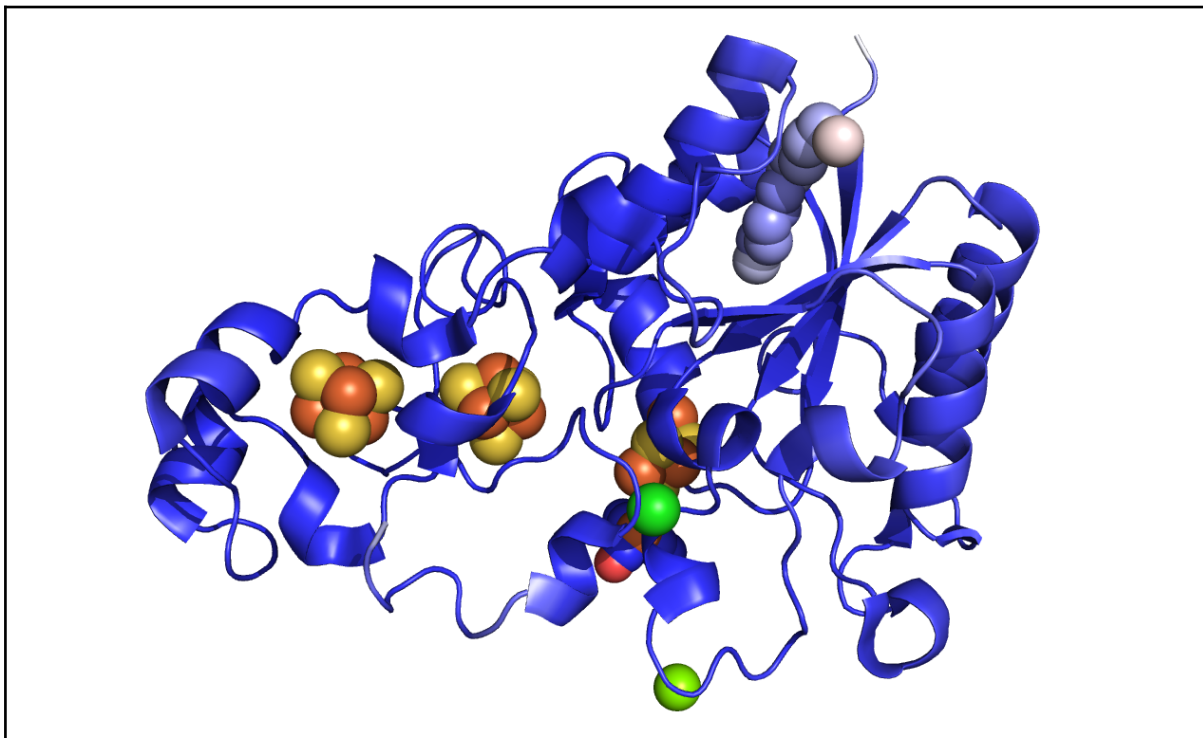


Рисунок 7. Связанные простетические группы.

Логично предположить, что положения боковых радикалов как минимум некоторых аминокислот определяется хуже, чем положение остова, из-за большей подвижности. Проверим эту гипотезу.

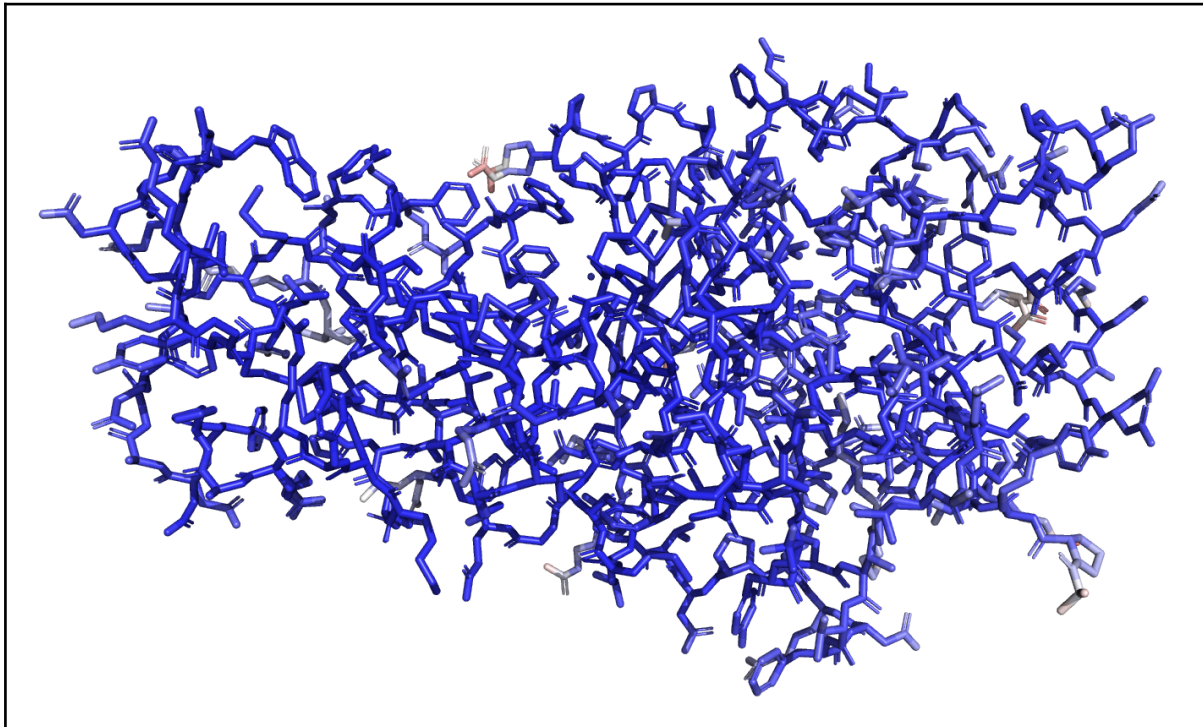


Рисунок 8. Белок, покрашенный по величине В-фактора.

И действительно, как минимум для некоторых аминокислотных остатков положение определено хуже, чем для атомов остова (для некоторых -- совсем не точно; розово-красная окраска). Рассмотрим такой аминокислотный остаток и посмотрим, наблюдается ли “хорошая” электронная плотность на данных участках.

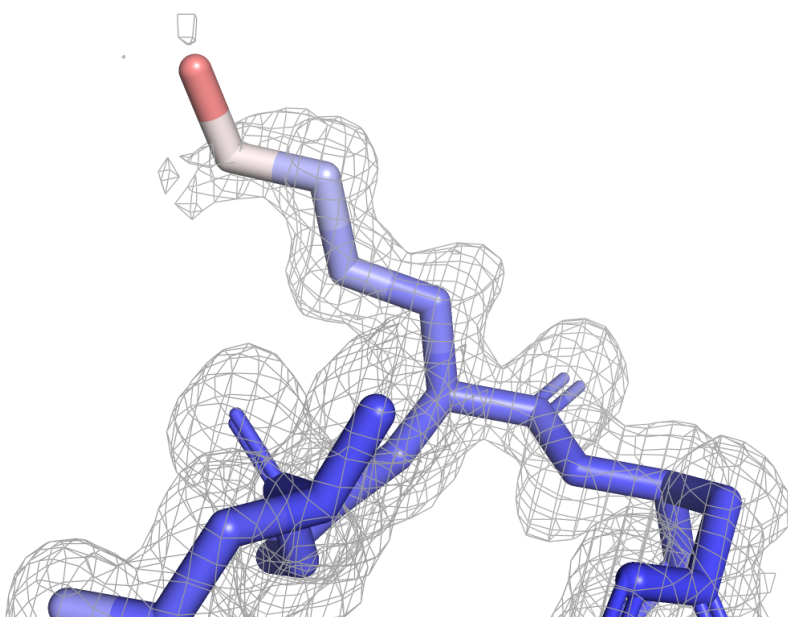
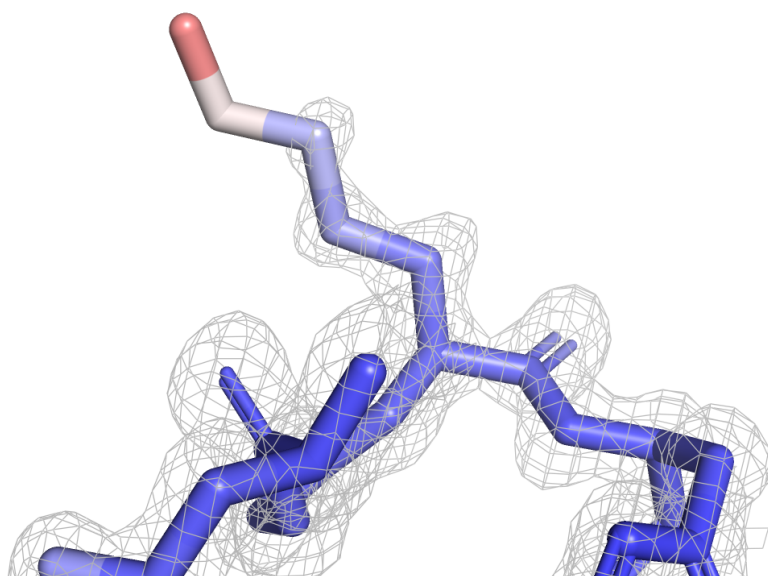
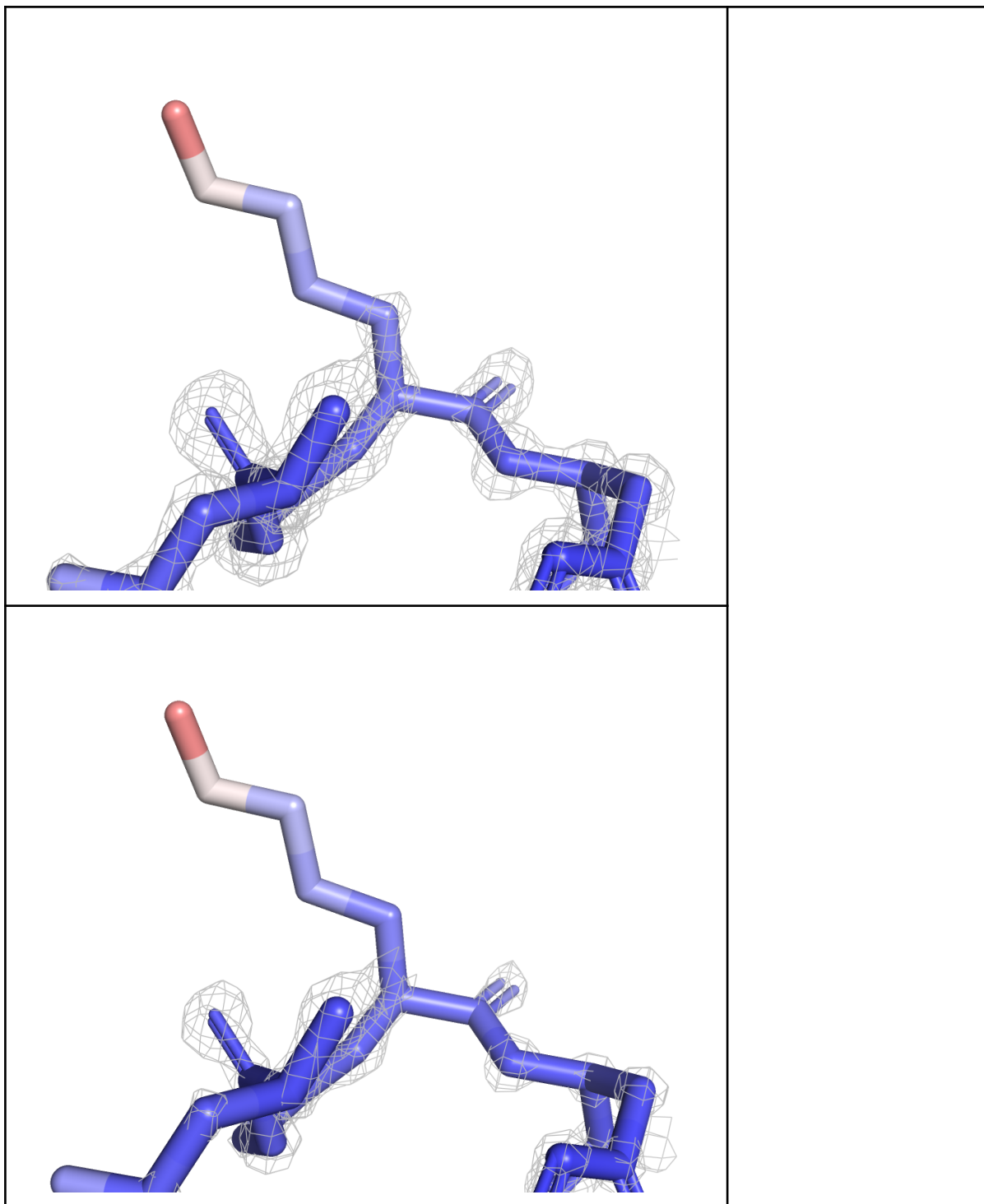


Рисунок 9.
Электронная
плотность на остатке
лизина на уровнях
подрезки 0.5, 1, 2 и 3
соответственно.



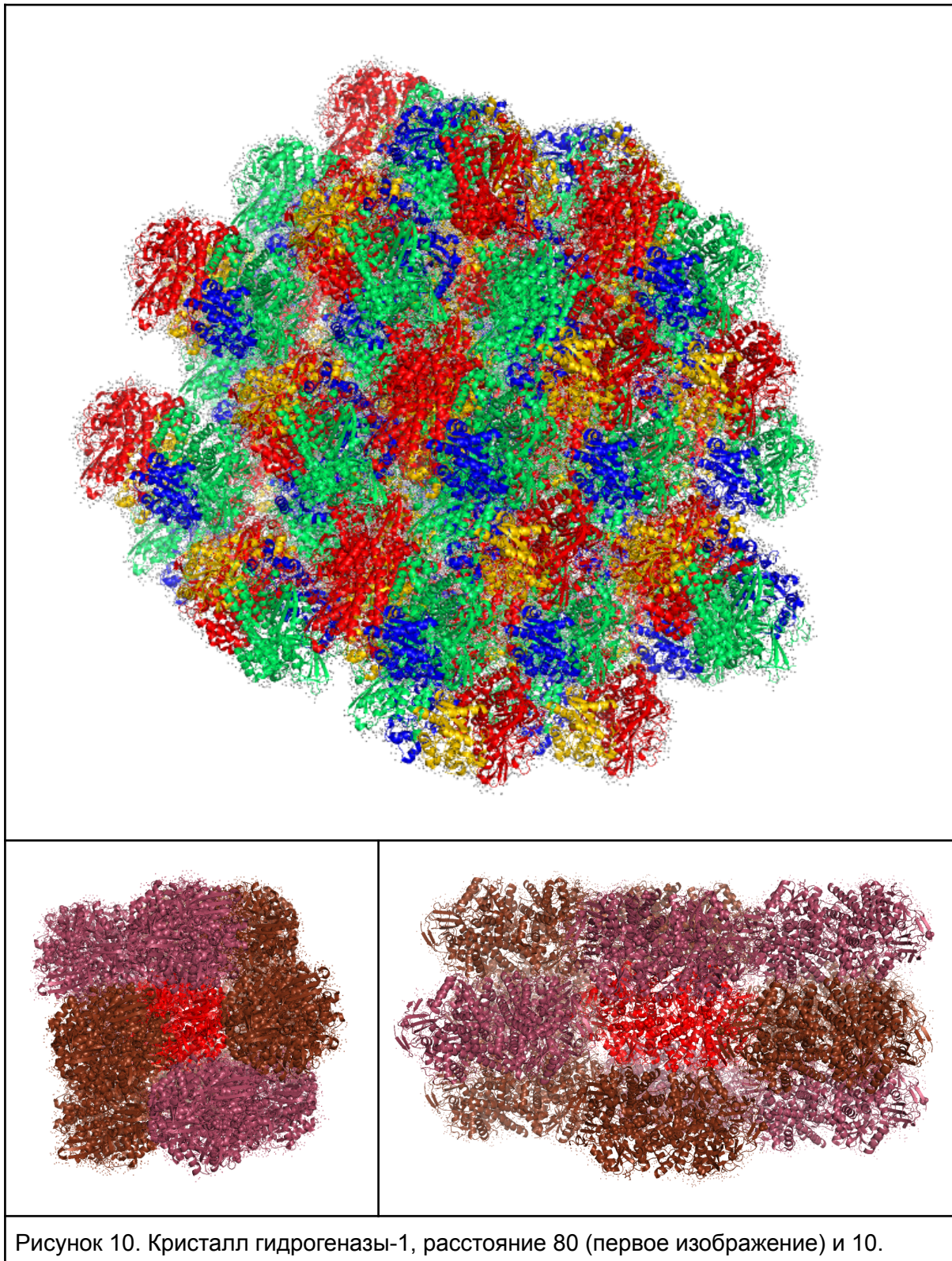


Видно, что качество электронной плотности связано с величиной В-фактора: чем хуже электронная плотность для группы, тем меньше наша степень уверенности в том, что эта группа располагается именно в данном месте.

Кристалл

РСА основан на рентгенографии кристаллов, но в итоговом pdb-файле мы наблюдаем одну молекулу (иногда димеры и прочие олигомеры), но не видим кристаллическую

структуру, однако ее можно восстановить, т.к. в pdb-файле указан тип кристалла для каждого белка.



Со сколькими комплексами контактирует комплекс в кристалле? Комплекс контактирует с двенадцатью соседями: боковыми (4) и верхними/нижними (8). С

каждым боковым соседом установлено по 4 контакта (контактом считалась дистанция до 5 ангстрем).

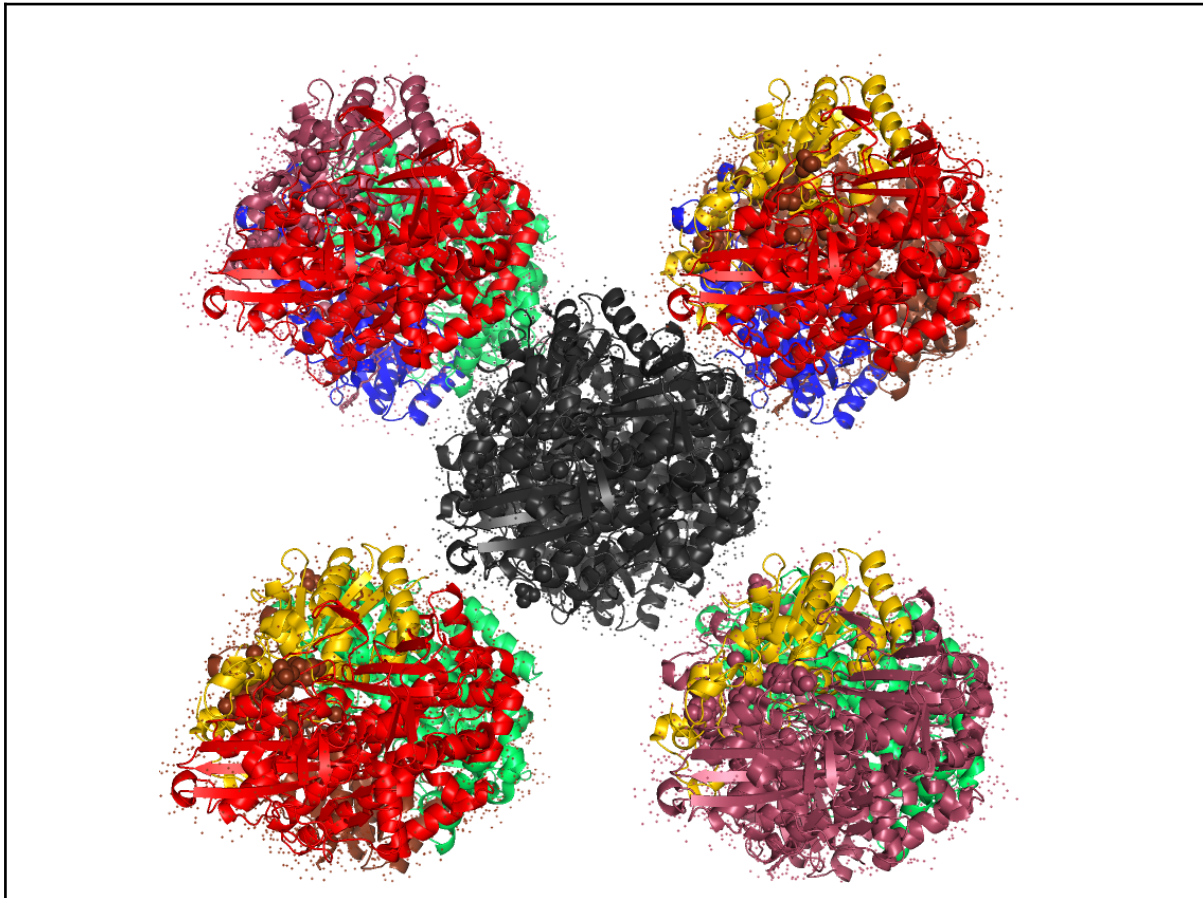
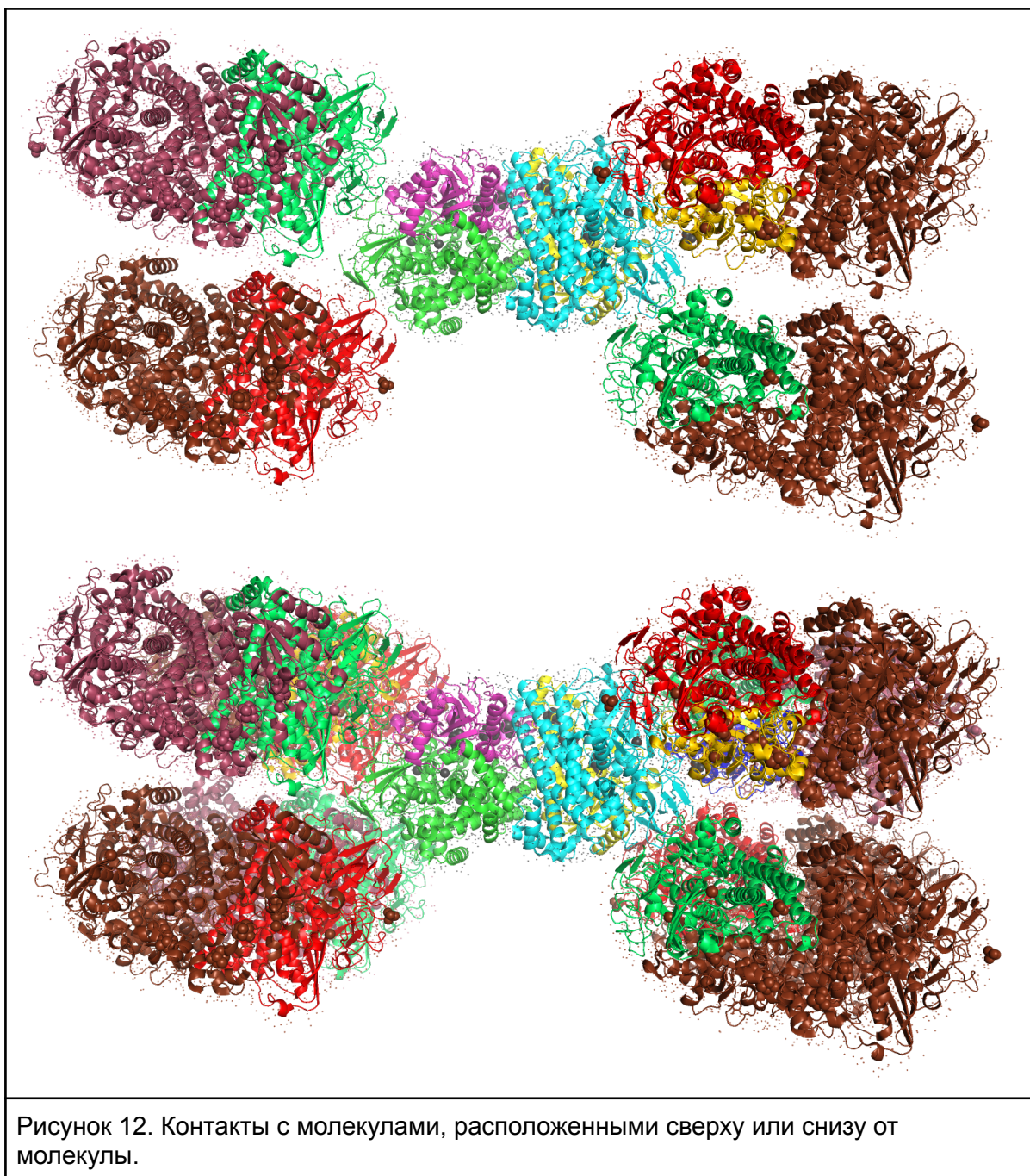


Рисунок 11. Контакты с “боковыми” соседями.

С каждым соседом сверху или снизу может устанавливаться разное количество контактов: либо 2, либо 1, причем чаще всего два соседних комплекса образуют по 1 и 2 контакта соответственно. Т.е. в среднем, суммарное число цепей, приближенных на 5 ангстрем и более составляет 24.



Evans, Rhiannon M., Philip A. Ash, Stephen E. Beaton, Emily J. Brooke, Kylie A. Vincent, Stephen B. Carr, and Fraser A. Armstrong. 2018. "Mechanistic Exploitation of a Self-Repairing, Blocked Proton Transfer Pathway in an O-Tolerant [NiFe]-Hydrogenase." *Journal of the American Chemical Society* 140 (32): 10208–20.