

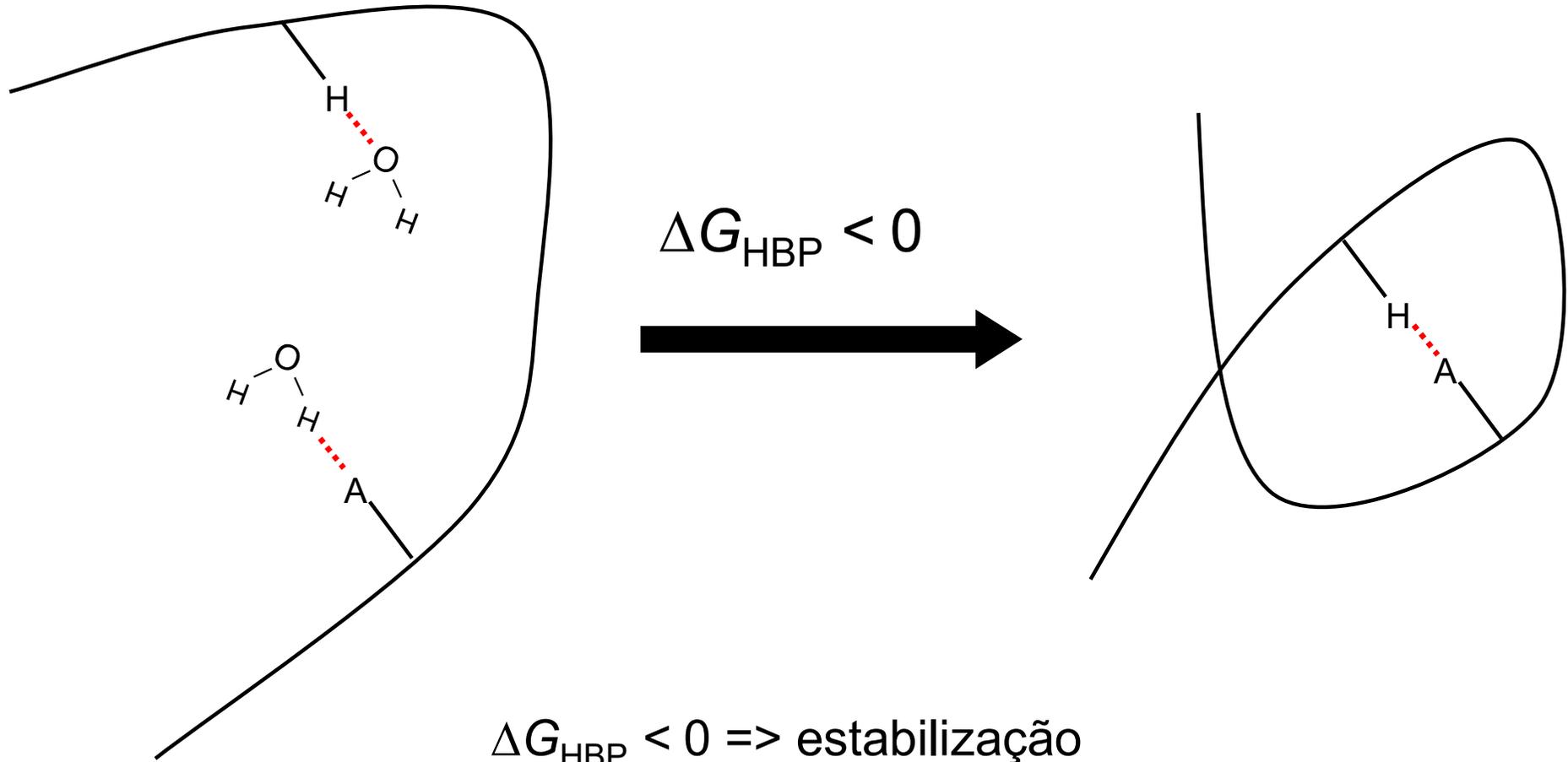
Do all polar groups in proteins form
hydrogen bonds ?

Autores:

P.J.Fleming & G.D.Rose

Protein Science 14:1911 (2005)

Qual o papel das ligações de hidrogénio na estabilização da estrutura ?

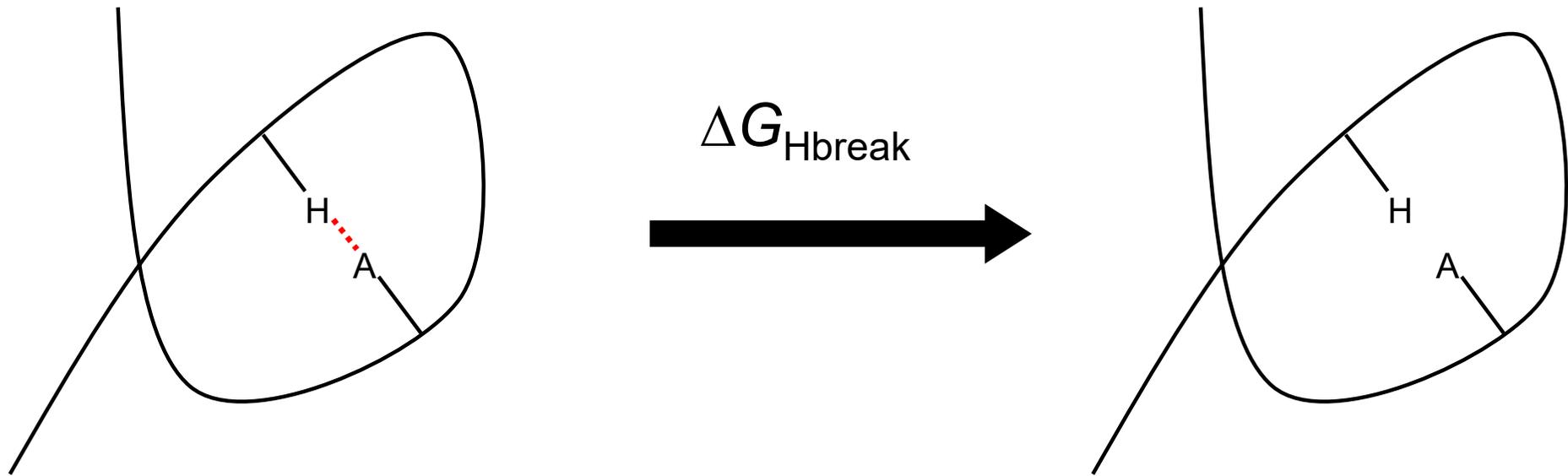


$\Delta G_{\text{HBP}} > 0 \Rightarrow$ desestabilização

Qual o papel das ligações de hidrogénio na estabilização da estrutura ?

- Controvérsia:
 - Pauling (1951): -8 kcal/mol
 - Schellman (1955): ~-1.5 kcal/mol
 - Klotz & Franzen (1962): ~0 em moléculas pequenas
 - Kauzmann: desestabilização ?
 - Scholz (1991): ~1 kcal/mol
 - Privalov(1993): L.H. ocultas -12 kcal/mol!
 - BenTal et al.(1997): desestabilização ?
 - Takano (1999): -1 a -2 kcal/mol
- Actualmente aceite:
 - Estabilização -1 a -2 kcal/mol
 - Desestabilização em moléculas pequenas (ainda por explicar)

Uma questão diferente: custo de uma ligação *não-satisfeita*



Quebra de uma ligação, sem qualquer compensação através da formação de outras ligações - logo o custo é muito mais elevado.

$$\Delta G_{\text{Hbreak}} \sim +5-6 \text{ kcal/mol}$$

Kresheck and Klotz (1969); Mitchell and Price (1990-91); Makhatadze and Privalov (1993); BenTal *et al.* (1997); Sheu *et al.* (2003).

Probabilidade de observar uma ligação de hidrogénio não-satisfeita

$$P_u = e^{\frac{-\Delta G_{Hbreak}}{RT}} \approx 0.02\%$$

Logo a probabilidade de observar uma ligação de hidrogénio não-satisfeita nas estruturas conhecidas é muito baixa!

Hipótese central

"We hypothesize that all potential hydrogen bond donors and acceptors in proteins are satisfied a significant fraction of the time, either by intramolecular hydrogen bonds or by hydrogen bonds to solvent water."

- O custo energético de um ligação de hidrogénio oculta não-satisfeita é tão alto que a população de grupos polares interiores não-ligados deve ser desprezável.
- "Satisfação" de uma ligação de hidrogénio é definido aqui como indicando que o dador ou aceitar estão envolvidos em pelo menos uma ligação de hidrogénio.

Reconciliar a hipótese com as análises estruturais

- **Problema:**

0.02% de probabilidade corresponde a encontrar uma ligação não-satisfeita por cada 5000 grupos e não 1 em 10 como em anteriores análises (McDonald & Thornton, 1994)

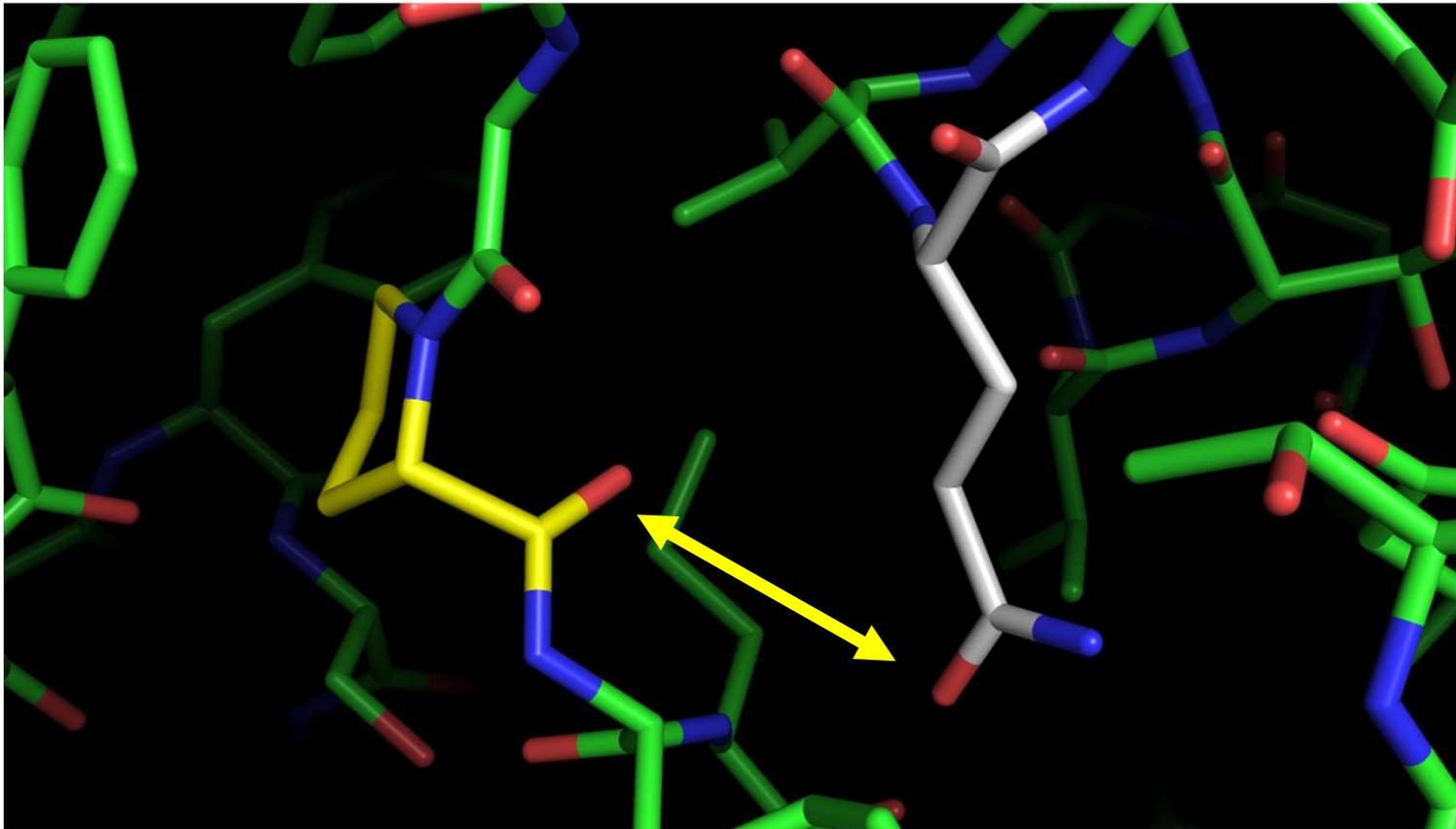
- **Solução:**

A inspecção visual das estruturas de raios X pode conduzir facilmente a erros na detecção de ligações de hidrogénio (Escolha do rotâmero errado, flutuações na conformação, densidade electrónica mal-definida). Numa análise mais cuidadosa verifica-se que muitas das ligações dadas com não satisfeitas estão de facto preenchidas

Table 1. *Reconciling apparent main-chain donor/acceptor lack of satisfaction from the database*

PDB code ^a	Donor/acceptor	Rationalization ^b
lake	PRO9A O	Occluding side chain (ILE116) has poor density ^c
	GLN28A N	Potential MET21 SD bond ^d
	LYS157A N	Occluding side chain (LYS157) has poor density ^c
lcob	ASP81A O	Potential ARG77 NH1/NH2 bond ^d
	ASN137A N	Potential THR135 OG1 bond ^d
lsnc	LEU108 O	Potential THR41 OG1 bond ^e
lubq	ILE36 N	Potential ILE30 O bond (4.26 Å) ^e
2aza	CYS3A N	Occluding side chain (GLN2) has poor density ^c
	GLU4A N	Occluding side chain (GLN2) has poor density ^c
2cyp	TYR71 O	Occluding side chain (PHE77) has poor density ^c
	GLN86 N	Occluding side chain (GLN86) has poor density ^c
	PHE91 O	Occluding side chain (LYS29) has poor density ^c
	PRO122 O	Potential GLN117 OE1/NE2 bond ^d
	LEU161 O	Potential ASN272 OD1/ND2 bond ^d
	GLU188 N	Potential GLN222 OE1/NE2 bond ^d
	LEU238 O	Potential LEU245 N bond ^e
	2hmz	VAL21A N
	HIS43A N	Potential ASN40 OD1/ND2 bond ^d
2scp	ASN85A N	Potential MET82 O bond (4.06 Å) ^e
4bp2	ASN71 O	Potential GLN4 OE1/NE2 bond ^d
5cyt	VAL20R O	Potential HOH22 bond
6xia	TRP15 N	Potential ASN56 OD1/OD2 bond ^d
	GLY21 N	Potential TRP19 ring bond, potential HOH6 bond
	PHE93 N	Potential ASN91 OD1/ND2 bond ^d
	GLY138 O	Potential ARG187 N bond (4.05 Å) ^e
	LYS148 N	Potential GLY145 O bond (4.01 Å) ^e
	ARG187 N	Potential GLY138 O bond (see above)
	ASN214 O	Potential GLU180 OE1/OE2 bond ^d

Re-avaliação estrutural: 2cyp (exemplo)



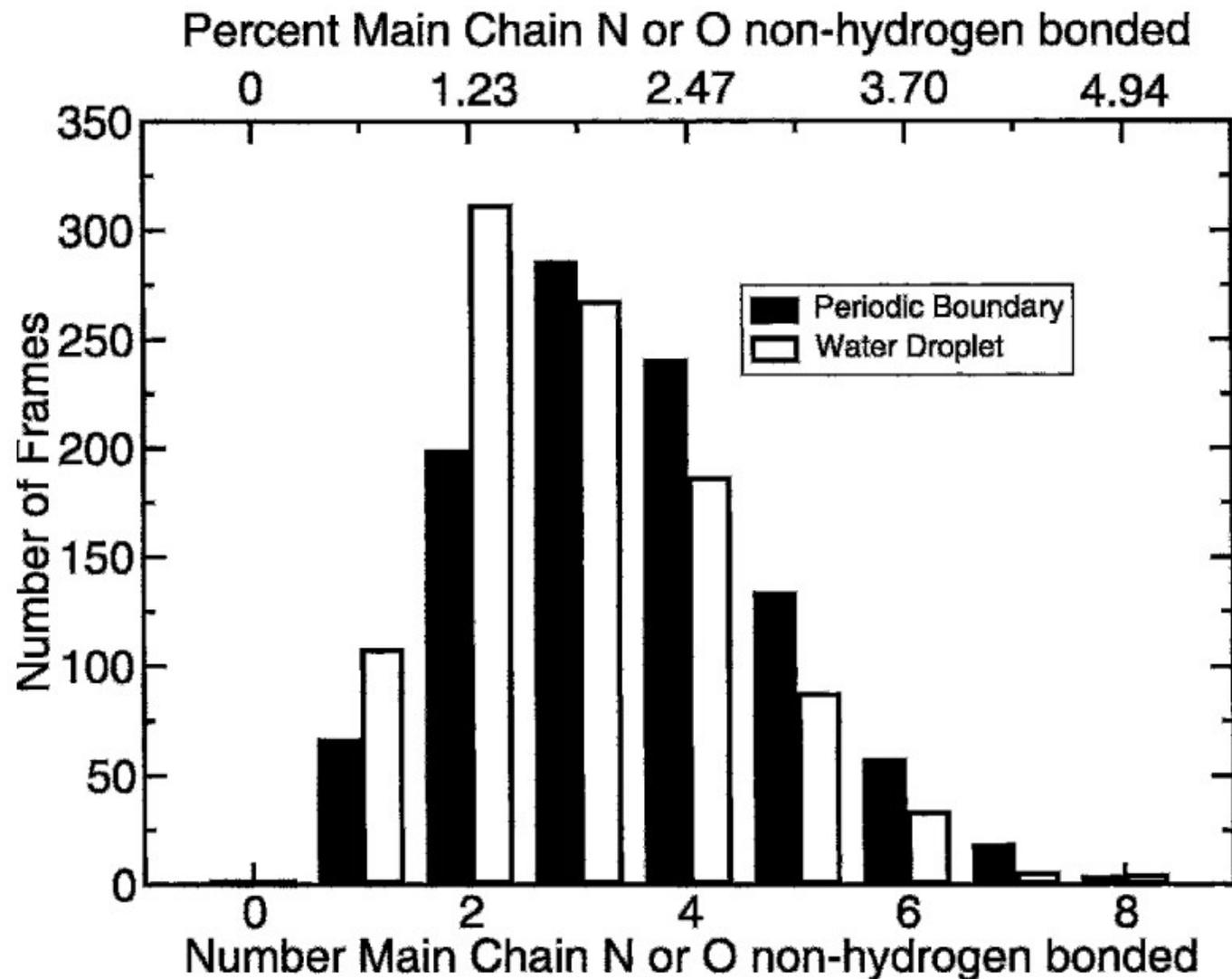
Possível ligação de hidrogénio entre a PRO122 e GLN117.

Simulações de dinâmica molecular

- Simulação da dinâmica molecular de proteínas usando os *softwares* CHARMM e NAMD
- 100 ps de simulação, conformações amostradas cada 0.1 ps
- Satisfação das ligações de hidrogénio calculada com o programa HBPLUS

- Resultados:
 - Para uma proteína de 82 resíduos, 90% das conformações apresentam duas ou mais ligações insatisfeitas, enquanto as estruturas de raios X apenas apresenta uma
 - Os campos de forças usados (CHARM22 e CHARM27) parecem ser inadequados à descrição das ligações de hidrogénio, apesar das cargas parciais usadas produzirem uma interacção de cerca de -5 kcal/mol

Distribuição do número de ligações insatisfeitas na simulação de MD



Satisfação das ligações e o estado desnaturado das proteínas

- Foi gerada uma população de conformações para o péptido penta-alanina, pelo método de Monte Carlo
- 51727 conformações permitidas em 10^7 passos
- Conformações analisadas para detectar satisfação de ligações de hidrogénio por um critério rigoroso envolvendo uma molécula de água de "prova"
- 28558 conformações rejeitadas, correspondendo a 45% da população total
- O frequência de rejeição varia com o comprimento da cadeia
- A satisfação das ligações de H. poderá ser um critério eficaz para a detecção de estruturas erróneas nas determinações por NMR e cristalografia de raios X

Sumário

- As ligações de hidrogénio estabilizam a estrutura nativa das proteínas por cerca de -1 a -3 kcal/mol embora desestabilizem as moléculas pequenas
- As ligações de hidrogénio não-satisfeitas são tão desfavoráveis energeticamente que praticamente não ocorrem (5 kcal/mol)
- A percentagem de não-aceitação esperada é de ~0.02% (quase 0%)
- Os 10% de não-aceitação obtidos em anteriores análises do PDB resultam de uma análise errónea das conformações
- A hipótese original de Pauling sobre a importância das ligações de hidrogénio parece correcta
- A diferença entre 90% ou 100% de aceitação é a diferença entre uma *tendência* e uma *regra*.
- Uma regra de 100% de aceitação poderá servir para testar a validade de estruturas experimentais e simuladas