

Валидация структуры метилтрансферазы TFB1M

Автор: Болихова Анастасия 4 курс ФББ МГУ

Аннотация

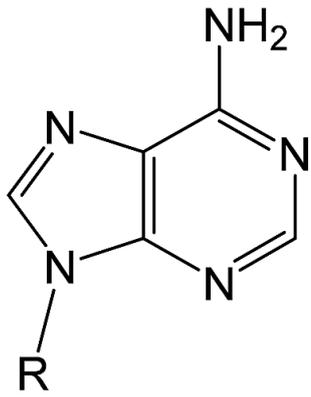
В данной работе рассматривалась структура метилтрансферазы TFB1M, имеющая в базе данных PDB ID 4GC9.[1] С помощью различных программ и сервисов был проведен анализ качества модели. Сначала рассматривались общие показатели, затем были более подробно изучены наиболее интересные маргинальные остатки. Целью анализа было понять являются ли отклонения в положении остатков результатом плохого качества модели или они могут быть объяснены биохимически. На финальном этапе сравнили данную модель и модель оптимизированную с помощью сервера PDB redo. В конечном итоге было выведено заключение о качестве модели.

Введение

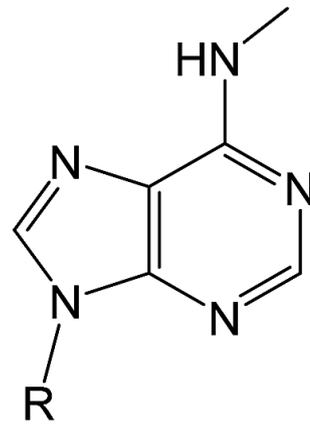
Анализируемая структура (рис.1), опубликованная в 2013 году, была получена с помощью рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.10 Å. Эта структура принадлежит метилтрансферазе TFB1M, осуществляющей реакцию диметилирования двух аденинов 936A и 937A (модифицированное основание на рис.2) в 12S рРНК в митохондриях, а также независимо от метилтрансферазной активности являющейся фактором транскрипции митохондриальной ДНК.[2]



Рис.1 Структура метилтрансферазы TFB1M (фиолетовая) в комплексе с донором метильной группы SAM (желтый) (PDB ID 4GC9).



Adenine (A)



N^6 -methyladenine (m^6A)

Рис.2 Аденин с и без модификации.

Результаты и обсуждения

Общие показатели:

Основные параметры для структуры 4GC9 указаны в таблице 1.

Таблица 1: общие показатели структуры 4GC9.

Параметр	Значение
Состав комплекса	Мышиная метилтрансфераза TFB1M в комплексе с SAM
Год публикации	2013
Авторы	Guja, K.E., Yakubovskaya, E., Shi, H., Mejia, E., Hambardjjeva, E., Venkataraman, K., Karzai, A.W., Garcia-Diaz, M
Метод решения фазовой проблемы	Метод молекулярного замещения
Число измеренных рефлексов	23216
Разрешение	2.10 Å
Диапазон разрешений структурных факторов	2.10- 40.00
Полнота набора структурных факторов	76.0%
Параметры кристаллографической ячейки	a: 47,700 Å b: 101,680 Å c: 211,710 Å α : 90,00° β : 90,00° γ : 90,00°
Кристаллографическая группа	I 2 2 2
Наличие некристаллографических симметрий в асимметрической ячейке	Нет

Структура 4GC9 полученная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.10 Å была опубликована в 2013 году. Параметры качества данной модели R-фактор = 0.205 и Rfree = 0.234, оба значения достаточно хорошие. Rfree немного больше, чем R-фактор, но не значительно, что говорит о том, что модель хорошо оптимизирована. Значительным недостатком данной структуры является малая полнота выбранного авторами набора структурных факторов (76%), таким образом указанное разрешение может не очень соответствовать реальному качеству структуры.

С помощью сервера MolProbity[3] была получена информация о положении аминокислотных остатков в структуре. В целом все параметры достаточно близки к идеальным. Количество недопустимых наложений атомов равно 0.426%, что лучше, чем у 99% аналогичных структур. Карта Рамачандрана приведена на Рис.2, видно, что углы поворота ψ и ϕ всех аминокислотных остатков укладываются в разрешенные области, это подтверждается и численными данными, процент маргиналов по карте Рамачандрана равен 0.00%. Более того процент остатков с оптимальными значениями углов ψ и ϕ 98.41%.

Число C β -атомов с неприемлемым отклонением от ожидаемого положения и число ковалентных связей, существенно отклоняющихся от теории, оба равны нулю, в свою очередь есть 1 из 3577 существенно отклоняющийся от теории валентный угол. Немного хуже дело обстоит с ротаметрами, число остатков с маргинальным положением боковых цепей равно 2.94% (при идеальном значении менее 0.3%), а процент ротаметров в оптимальной конформации 94.12%. На данном этапе можно предположить, что структура достаточно хорошего качества, особенно в отношении положения атомов остова.

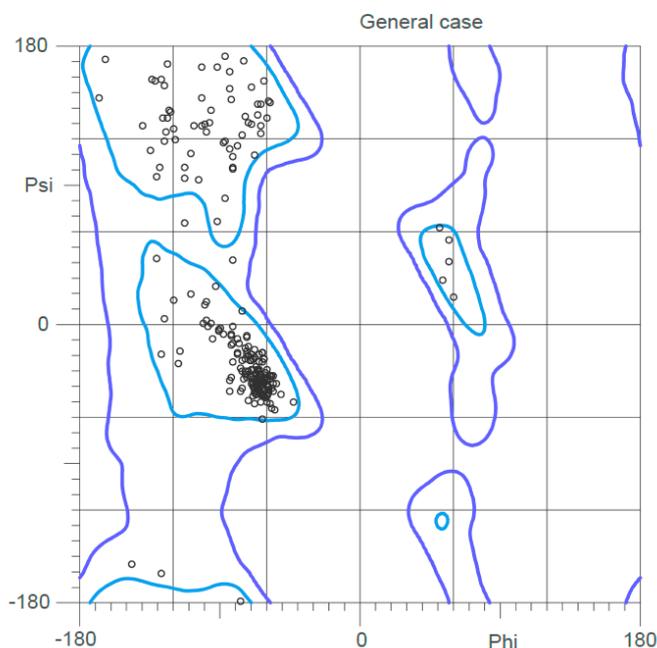


Рис.3 Карта Рамачандрана метилтрансферазы TFB1M (PDB ID 4GC9).

С помощью сервиса WHAT IF[4] были получены данные о комфортности окружения, остатков. Вместе с этим из Electron Density Server (EDS)[5] взяты значения RSR-Z, показывающие насколько электронная плотность модели соответствует экспериментальной электронной плотности в сравнении с другими остатками того же

типа. Комбинируя данную информацию с полученной ранее были выбраны маргинальные остатки, вызывающие наибольший интерес (таблица 2). Пять из них были рассмотрены более подробно.

Таблица 2: Список наиболее значимых маргинальных остатков в структуре 4GC9.

Остаток	Показатели «маргинальности»
ARG 11	Z-score для комфортности окружения = -8.547
GLN 35	Перекрытие атомов с SAM, RSR-Z = 2.797
ASN 36	Маргинальное положение ротамера (0.1%)
ASP 56	Рекомендован переворот на 180° плоскости пептида
PRO 122	Перекрытие атомов с ILE 125, RSR-Z = 3.123
ARG 126	Z-score для комфортности окружения = -5.11. Перекрытие атомов с TYR 167
ASN 135	Углы $\psi = -82.3$, $\phi = 42.2$ (разрешенные, но не оптимальные 0.73%).
LYS 220	Z-score для комфортности окружения не определяется, RSR-Z = 3.211
VAL 223	Маргинальное положение ротамера (0%)
LYS 239	Углы $\psi = -113.6$ и $\phi = 66.2$ (разрешенные, но не оптимальные 0.66%), Z-score для комфортности окружения -6.16

Аргинин 11

Для данного аргинина было получено низкое значение комфортности окружения (-8.547), что указывает на его как маргинальный. Этот остаток находится на N-конце белка, в неструктурированной области. При рассмотрении одной белковой глобулы (рис.4 слева) радикал аргинина контактирует только с растворителем и положительный заряд на нем никак не скомпенсирован. Однако если добавить «соседей по кристаллу» (рис.4 справа) аспартат из другой белковой цепи может образовывать водородные связи и солевой мостик с аргинином. Таким образом окружение данного остатка внутри кристалла является комфортным, а его позиция объяснимой.

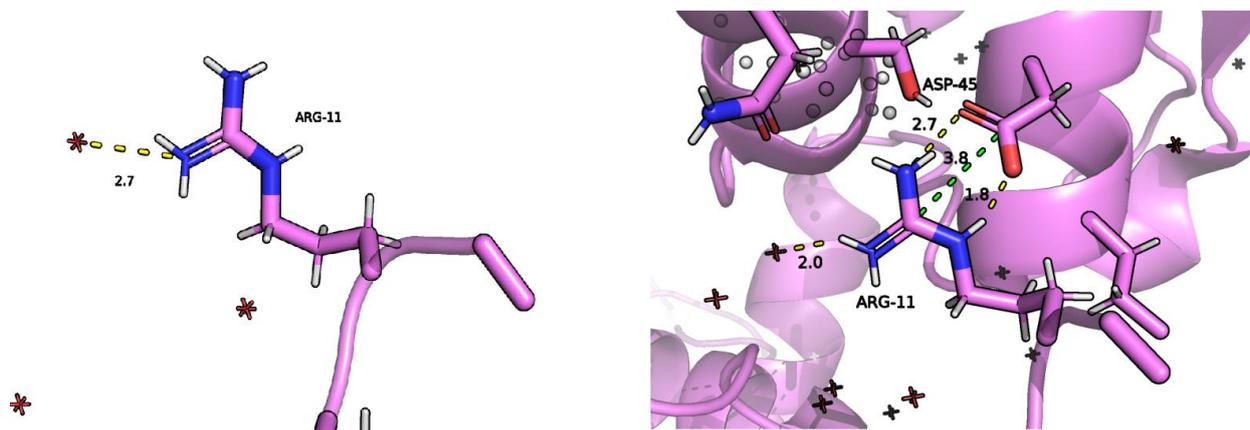


Рис.4 ARG 11 в структуре белка TFB1M (PDB ID 4GC9), слева — при рассмотрении одной белковой глобулы, справа — вместе с соседними молекулами белка. Водородные связи показаны желтым, солевой мостик — зеленым.

Пролин 122

Данный аминокислотный остаток имеет высокое значение $RSR-Z = 3.123$, то есть он не очень хорошо вписан в электронную плотность, также атом кислорода остова в нем перекрывается с атомом водорода изолейцина 125 (рис.5). Возможно отклонение обоих параметров объясняется одной причиной, тем, что кислород остова не очень правильно вписан в электронную плотность. При учете наличия в данной области α -спирали этому кислороду куда логичнее было бы повернуться на азот аргинина 126 и образовать с ним водородную связь (желтая линия на рис.5), водородная связь возможна и при таком взаимном расположении атомов, но геометрия ее образования не оптимальная. На рис.6 показана электронная плотность на уровнях подрезки 1 и 2 соответствующая данному пролину, надо сказать что на этих уровнях электронная плотность детектирована только для атомов остова. С повышением уровня подрезки становится отчетливо заметно, что электронная плотность, теоретически соответствующая кислороду, смещена в сторону азота изолейцина 125, вероятно здесь есть ошибка допущенная при вписывании модели в электронную плотность.

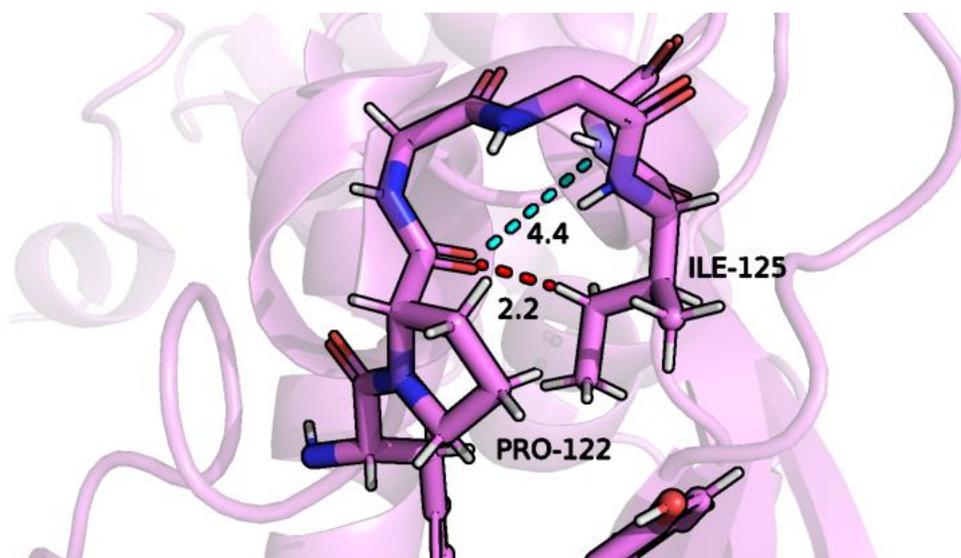


Рис.5 PRO 122 в структуре белка TFB1M (PDB ID 4GC9). Перекрывающиеся атомы соединены красным пунктиром, предполагаемая водородная связь показана голубым.

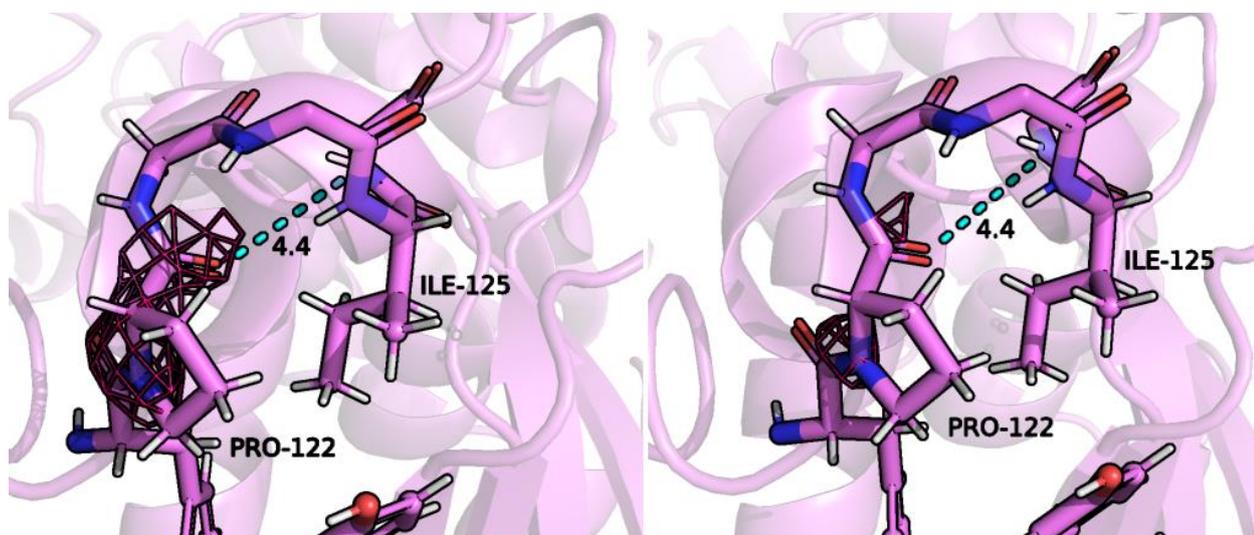


Рис.6 PRO 11 в структуре белка TFB1M (PDB ID 4GC9), слева — на уровне подрезки 1, справа — на уровне подрезки 2. Электронная плотность показана розовой сеткой, предполагаемая водородная связь показана голубым.

Лизин 220

Этот остаток показался мне интересным так как ему соответствует достаточно высокое значение $RSR-Z = 3.211$, при этом это один из нескольких остатков для которых не определяется комфортность окружения. Однако объяснение оказалось достаточно тривиальным: для радикала лизина 220 плохо разрешена электронная плотность (длинный радикал экспонирован в растворитель и видимо не занимает четкого положения в кристалле). На рис.7 показана электронная плотность на уровнях подрезки 0 (слева) и 1

(справа), видно, что в модели присутствует только та часть радикала, для которой есть хоть какой-то сигнал.

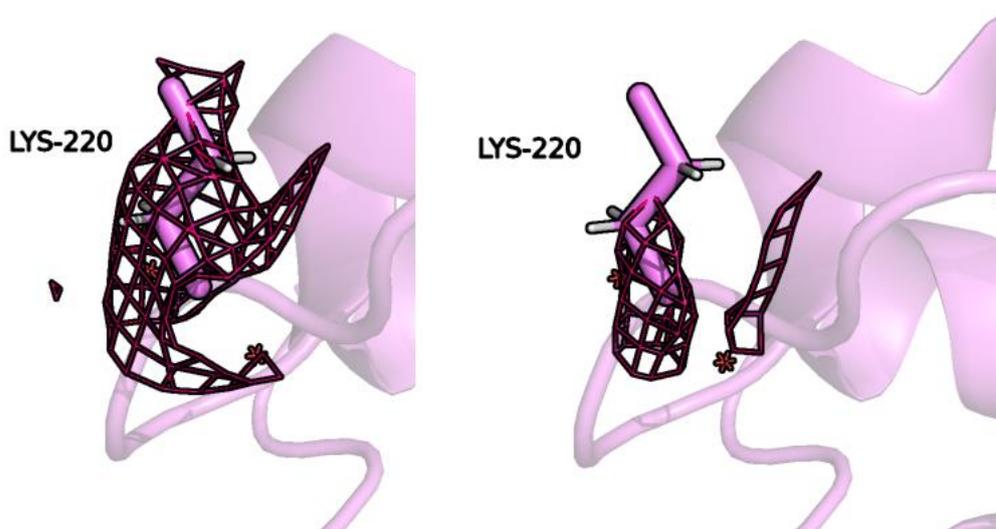


Рис.7 LYS 220 в структуре белка TFB1M (PDB ID 4GC9), слева — соответствующая остатку электронная плотность на уровне подрезки 0, справа — на уровне подрезки 1. Электронная плотность показана розовой стеккой.

Валин 223

Этот остаток было решено рассмотреть так как его радикал имеет маргинальную конформацию с очень низким процентом (0% в выдаче программы MolProbity). На рис.8 показаны остатки окружающие данный валин и соответствующая ему электронная плотность (на уровнях подрезки 0 и 1). Видно, что такое положение ротамера обосновано, оно одновременно отвечает положению соответствующих гидрофобных групп, не создавая перекрываний с ними, и не противоречит полученной в эксперименте электронной плотности. Более того, наиболее распространенный ротамер валина не сильно отличается по углу χ , поэтому замена (рис.9) не приводит к появлению значительной стерической напряженности, однако ухудшается соответствие электронной плотности. В целом положение радикала валина в данном случае можно считать обоснованным.

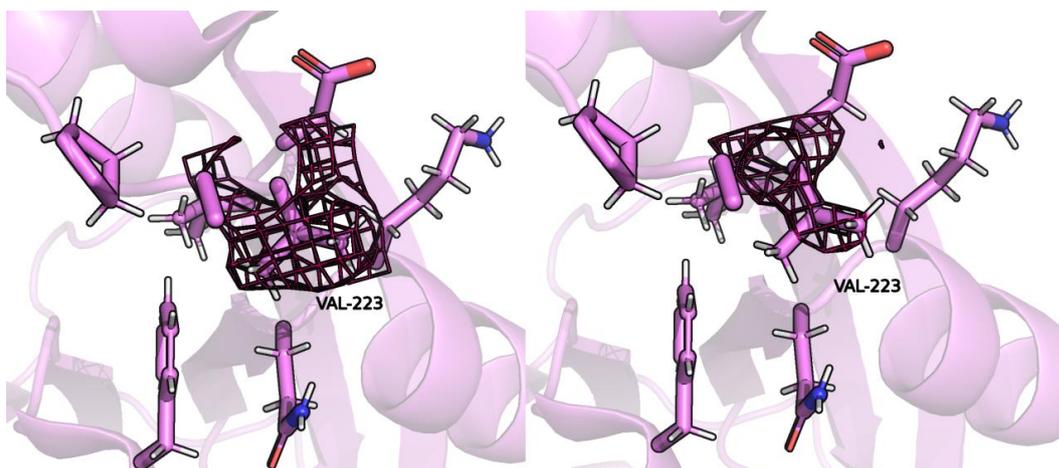


Рис.8 VAL 223 в структуре белка TFB1M (PDB ID 4GC9), слева — соответствующая остатку электронная плотность на уровне подрезки 0, справа — на уровне подрезки 1. Электронная плотность показана розовой сеткой.

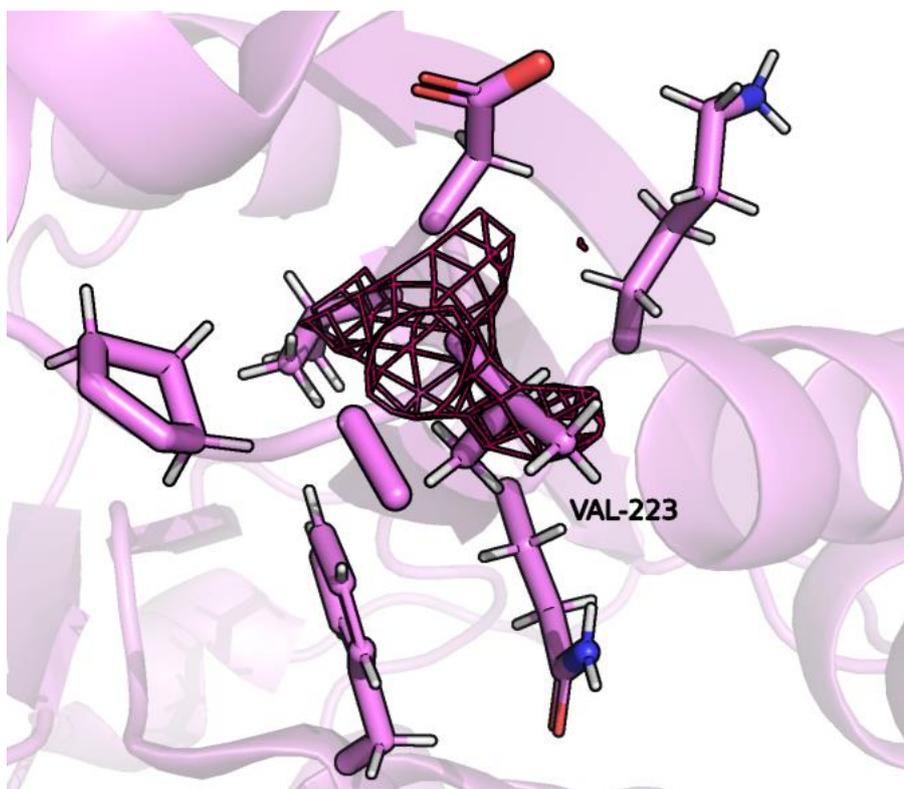


Рис.9 VAL 223 с более распространенной конформацией радикала в структуре белка TFB1M (PDB ID 4GC9). Электронная плотность показана розовой сеткой.

Лизин 239

Этот остаток был выделен сразу по двум параметрам, углы поворота остова в нем не оптимальны (хотя находятся в разрешенной зоне), а Z-score для комфортности окружения достаточно низкий.

Рядом с этим лизином нет подходящих близко белковых глобул, поэтому кристаллизацией его положение объяснить нельзя. Но можно находящимся рядом глутаматом. Этот остаток имеет две альтернативные конформации (А с встречаемостью 0.57 и В с встречаемостью 0.43). Обе конформации могут образовывать ионное взаимодействие с лизином, а конформация В также может образовать еще водородную связь. Таким образом, возможно, отклонение лизина в сторону (которое также может приводить к изменению углов остова) вызвано его взаимодействием с глутаматом.

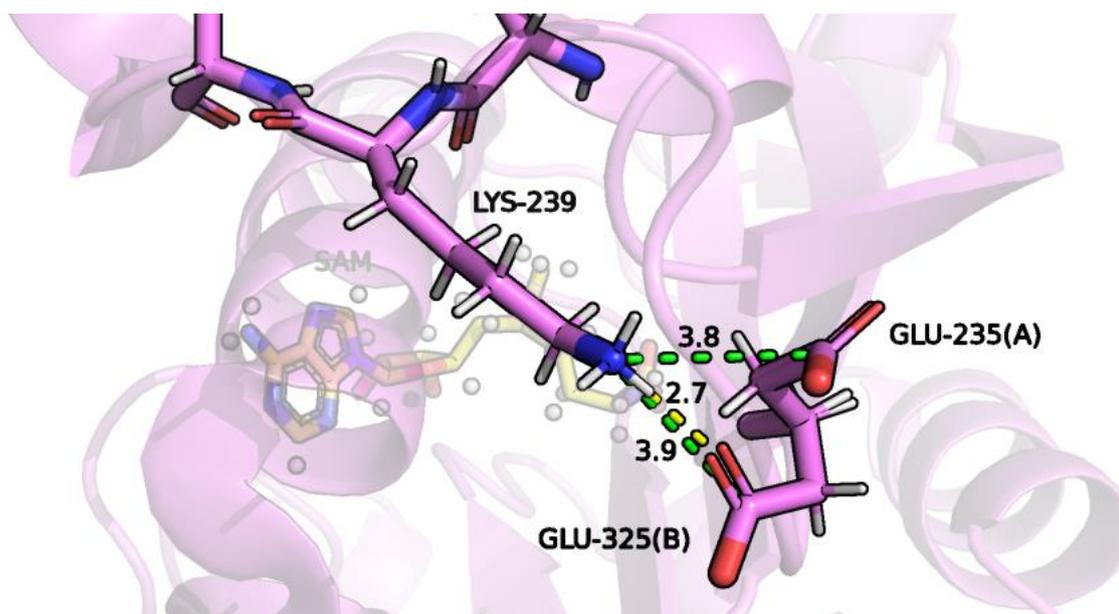


Рис.10 LYS 223 в структуре белка TFB1M (PDB ID 4GC9). Водородные связи показаны желтым, солевой мостик — зеленым.

Оптимизация модели с помощью PDB redo

С помощью сервера PDB redo[6] была получена оптимизированная модель белка TFB1M. У оптимизированной структуры немного ниже R-фактор (0,2026 против 0,2281) и R-free (0,2474 против 0,2314), хотя изменение нельзя назвать значительным. После оптимизации немного изменились углы поворота остова (рис.11). Изменения также нельзя назвать очень заметными, три остатка сместились из разрешенной области в оптимальную.

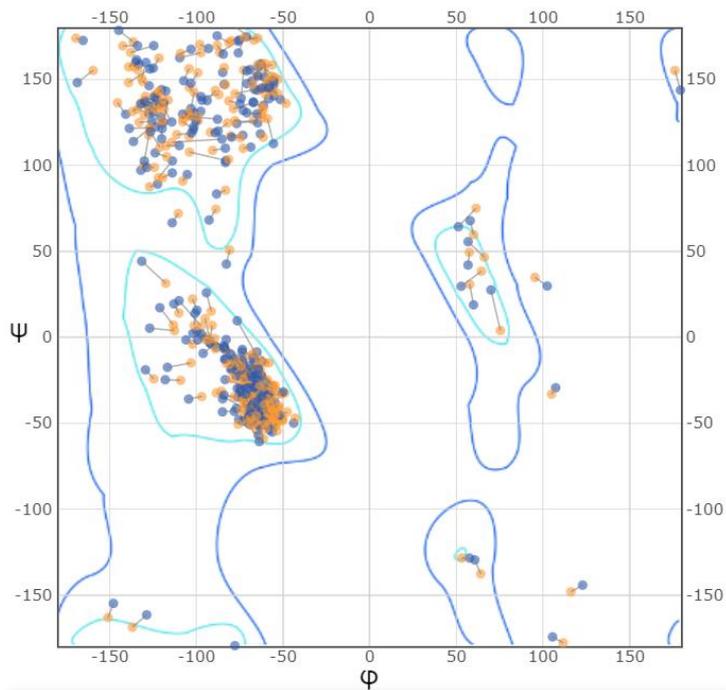


Рис.11 Карта Рамачандрана метилтрансферазы TFB1M (PDB ID 4GC9) для изначальной структуры (синие точки) и оптимизированной в PDB redo (рыжие точки).

Более ощутимые изменения касаются положения боковых цепей. В оптимизированной модели полностью заменены три ротамера и 19 боковых цепей перевернуты. Из подробно рассмотренных остяков ни для одного не показано значимое улучшение в повторно оптимизированной структуре.

Заключение

Структура метилтрансферазы TFB1M, имеющая в базе данных PDB ID 4GC9 не идеальна, она не совсем соответствует в реальности заявленному разрешению в 2.1 ангстрем и положение некоторых подвижных атомов не определено вовсе. Однако в целом модель хорошо оптимизирована и по крайней мере часть маргинальных остатков можно объяснить биологически.

Список литературы

1. Guja KE, Venkataraman K, Yakubovskaya E, Shi H, Mejia E, Hambardjjeva E, Karzai AW, Garcia-Diaz M. Structural basis for S-adenosylmethionine binding and methyltransferase activity by mitochondrial transcription factor B1. *Nucleic Acids Res.* 2013 Sep;41(16):7947-59.
2. Liu X, Shen S, Wu P, Li F, Liu X, Wang C, Gong Q, Wu J, Yao X, Zhang H, Shi Y. Structural insights into dimethylation of 12S rRNA by TFB1M: indispensable role in translation of mitochondrial genes and mitochondrial function. *Nucleic Acids Res.* 2019 Aug 22;47(14):7648-7665.
3. Christopher J. Williams, Jeffrey J. Headd, Nigel W. Moriarty, Michael G. Prisant, Lizbeth L. Videau, Lindsay N. Deis, Vishal Verma, Daniel A. Keedy, Bradley J. Hintze, Vincent B. Chen, Swati Jain, Steven M. Lewis, Bryan W. Arendall 3rd, Jack Snoeyink, Paul D. Adams, Simon C. Lovell, Jane S. Richardson, and David C. Richardson (2018) MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science* 27: 293-315.
4. <https://swift.cmbi.umcn.nl/servers/html/>
5. Kleywegt GJ, Harris MR, Zou JY, Taylor TC, Wählby A, Jones TA. The Uppsala Electron-Density Server. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004 Dec;60(Pt 12 Pt 1):2240-9.
6. Joosten RP, Long F, Murshudov GN, Perrakis A. The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrJ.* 2014 May 30;1(Pt 4):213-20.