

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

**Отчет о качестве расшифровки структуры белка HUTP_BACSU
(PDB ID: 1WPV) методом рентгеноструктурного анализа**

Работу выполнила:

Мельничук А.В.,

402 группа

Москва, 2014 г.

Аннотация

Представленный отчет содержит информацию о качестве расшифровки структуры белка сенной палочки (*Bacillus subtilis*) HutP (PDB ID: 1WPV) методом рентгеноструктурного анализа. А основании полученной информации сделан вывод о качестве расшифровки структуры.

Введение

Белок HutP (hut operon positive regulatory protein) является позитивным регулятором hut оперона сенной палочки. Данный белок регулирует экспрессию структурных генов hut сенной палочки, препятствуя терминации транскрипции.

Структура белка HutP была расшифрована в 2004 году в Японии, учеными Kumarevel T., Mizuno H., Kumar P.K. [1] Модель 1WPV с разрешением 1.70 Å (изображена на рисунке 1) состоит в комплексе с остатками гистидина и ионами магния.

Модель 1WPV (изображена на рисунке 1) состоит из 3 цепей (A, B, C) длиной по 147 остатков, каждая из которых связана с остатком гистидина и ионом магния, а также молекулой воды.

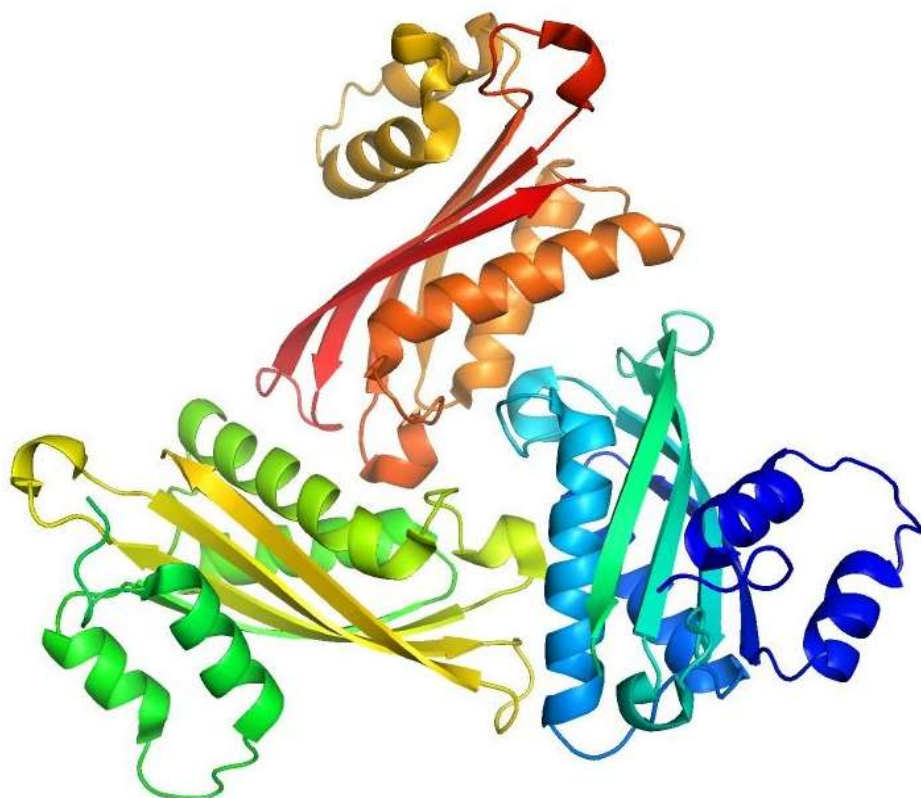


Рисунок 1. Структура белка HUTP_BACSU (PDB ID: 1WPV). Изображение сделано с помощью программы Rmол.

Авторы работы [1] решили заняться структурой белка HutP, потому что для данного белка не были известны близкие гомологи. Авторы попытались определить кристаллографические структуры активного анти-терминационного комплекса для HutP.

Основные биологические результаты статьи [1]:

- стал известен механизм образования активной формы HutP, регулирующей транскрипцию мРНК hut оперона сенной палочки (были предложены модели активации комплекса терминации транскрипции и связывания РНК);
- стали известны взаимодействия, важные для формирования механизма образования активной формы HutP (для взаимодействия HutP с консервативной последовательностью hut мРНК важно связывание гистидина и магния).

Тем же авторам удалось обнаружить, что имидазольная группа и атомы остова наиболее важны для работы HutP [2, 3].

Результаты и обсуждение

1. Общая информация о модели

Решение фазовой проблемы использовался метод молекулярного замещения (MR, Molecular replacement) с использованием ранее разрешенной структуры 1VEA (HutP в комплексе с HBN) с разрешением 2,80 Å, для получения которой применялся метод многоволнового аномального рассеяния (MAD, Multi-wavelength anomalous dispersion). [2]

Число измеренных рефлексов, представленных в файле структурных факторов – 52035. [4]

Число рефлексов с силой сигнала, превышающей стандартное отклонение более чем в три раза, равно 39770 (76,4%).

Разрешение структуры – 1.70 Å (хорошее). Минимальное разрешение для использованных рефлексов – 1.68 Å, максимальное – 24,69 Å. [4]

Число использованных рефлексов – 50886.

Полнота набора рефлексов – 94.5%. [4]

2. Значения индикаторов качества модели в целом

- R-фактор: 0.235 (хороший) [4]
- R_free: 0.259 (хороший) [4]
- R_free – R = 0.024 < 0.1 (хорошо)

- средний RSR (real-space R factor): 11,4% [4]

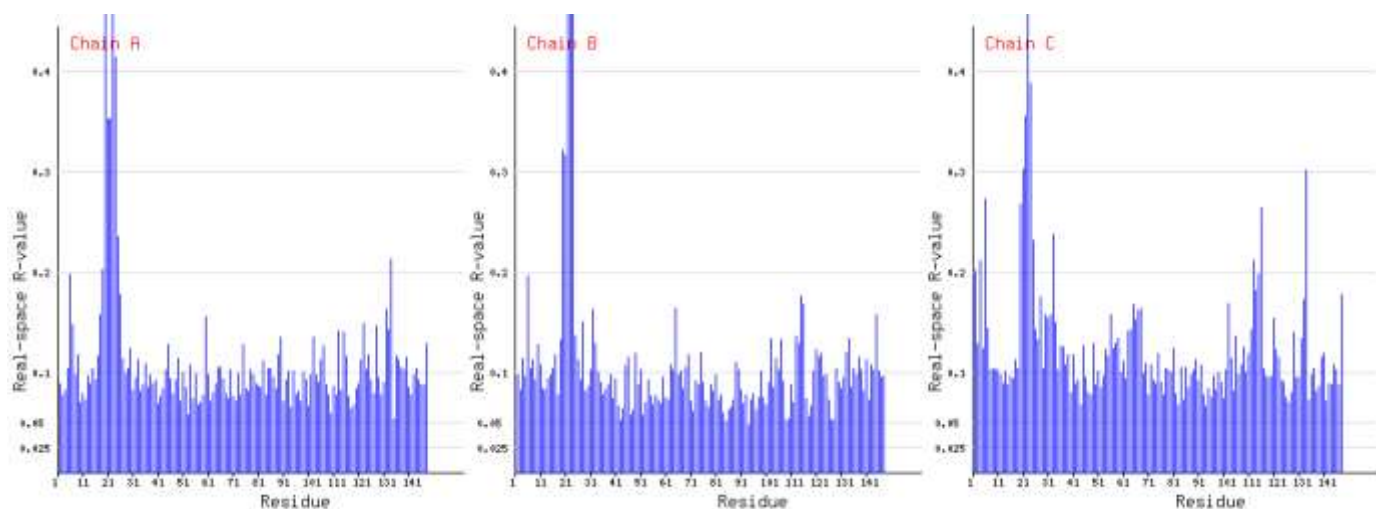


Рисунок 2. Графики пространственных R-факторов для остатков трех полипептидных цепей структуры 1WPV. [4]

Если рассматривать RSR как характеристику локального качества модели, то маргинальные остатки обычно имеют значения RSR более 20%. Отсюда можем сделать вывод, что для цепи А, например, маргинальными остатками являются 19-25 и 134 остатки. Скорее всего, упомянутые остатки плохо вписаны в электронную плотность.

- в модели имеется 5,41% остатков, Z-score которых больше 2%. [4]
Следовательно, 5,41% остатков плохо вписаны в электронную плотность, а значит, являются маргиналами.
- Число остатков с маргинальными отклонениями боковых цепей от их нормальных ротамеров – 7 (2,13%) [5], что превышает предпочтительное значение – менее 1%. Скорее всего, этим ротамерам соответствуют большие значения температурных факторов (рис. 3).

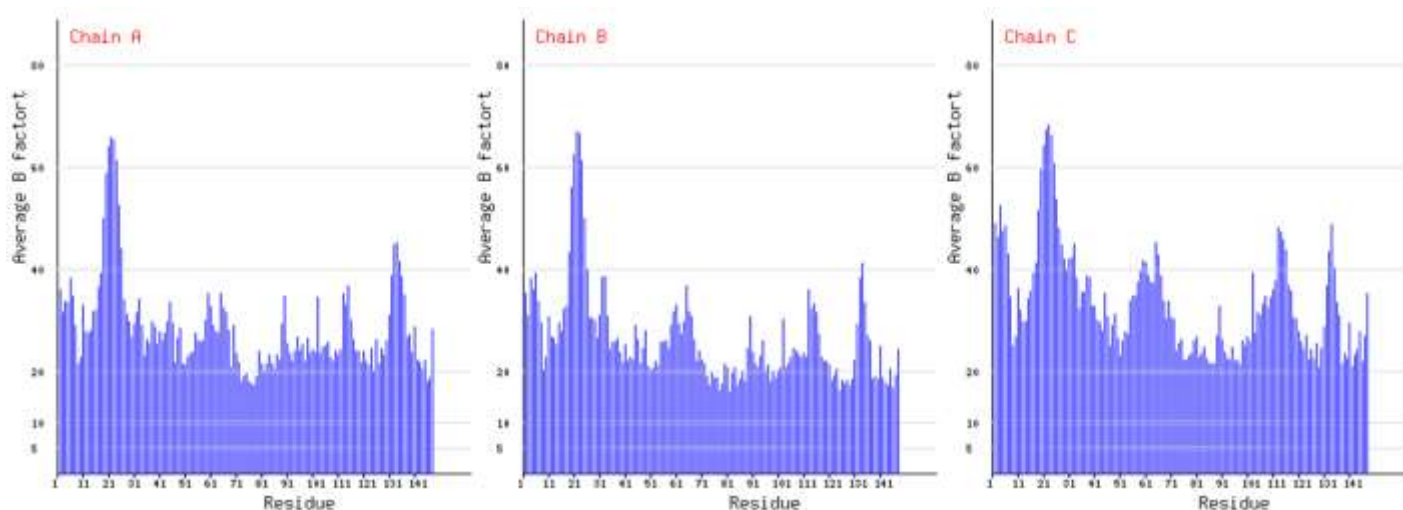


Рисунок 3. Графики температурных факторов всех остатков структуры 1WPV. [4]

- число маргинальных остатков по карте Рамачандрана: 1 [5]

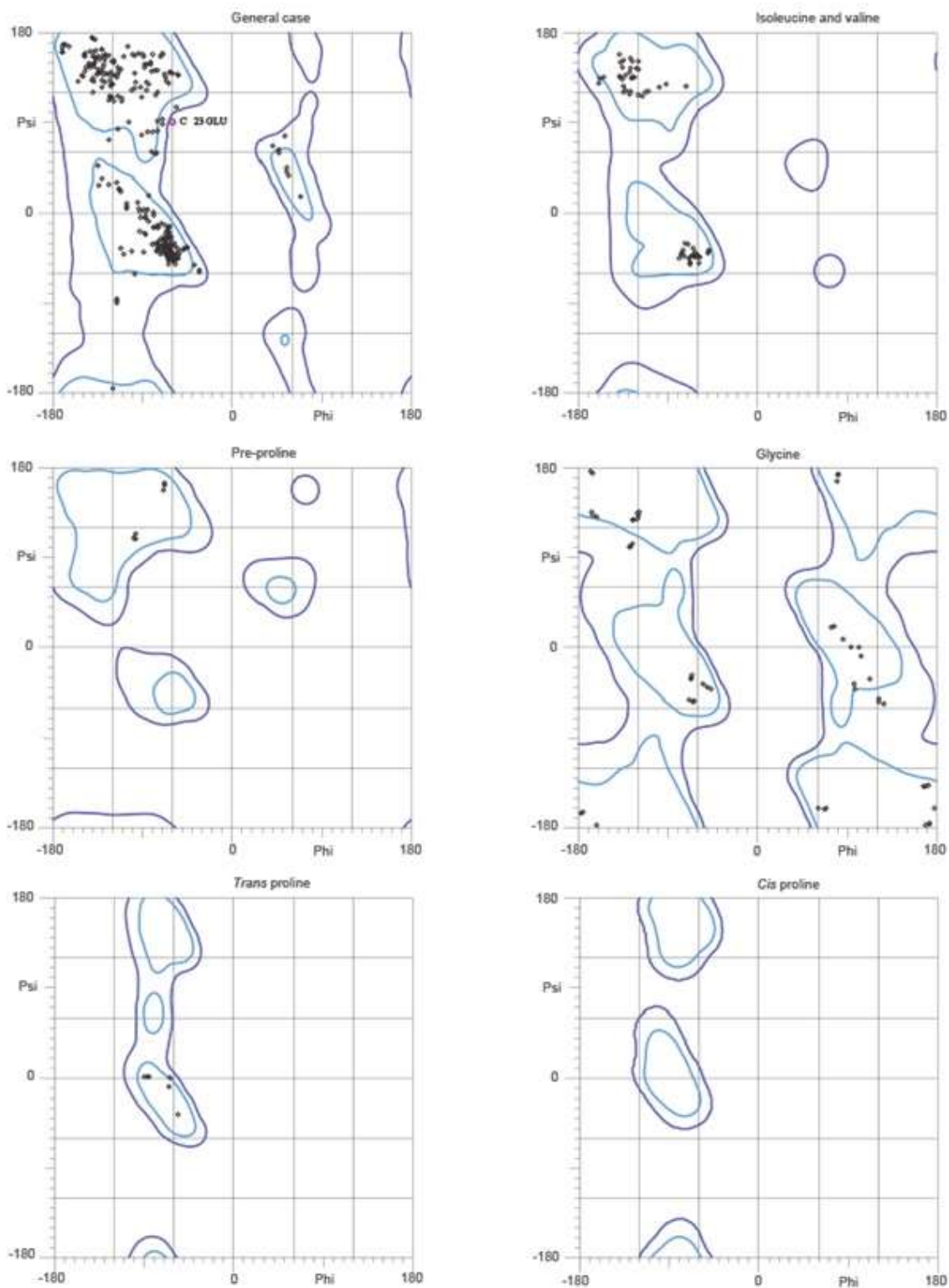


Рисунок 4. Карта Рамачандрана для структуры 1WPV: все остатки; изолейцин и валин; пре-пролин; глицин; транс-пролин; цис-пролин. Единственный маргинальный остаток Glu23 цепи C выделен фиолетовым кругом. [5]

Анализируя рисунок 2 видно, что практически все остатки попали в разрешенную область – 434 из 435 (99,8%), 94,7% остатков попали в

предпочтительную область (412 из 435). Таким образом, с точки зрения торсионных углов остова модель очень хорошая.

3. Маргинальные остатки

Glu23 цепи C

Выбран маргинальный остаток Glu23 цепи C из запрещенной области карты Рамачандрана, $(\phi, \psi) = (-60, 2, 92, 0)$ [5]; RSR = 0,597; Z-score = 6,732; B-фактор = 68,170; валентный угол отклоняется от теории: N-CA-C: 4.02 σ . [4]

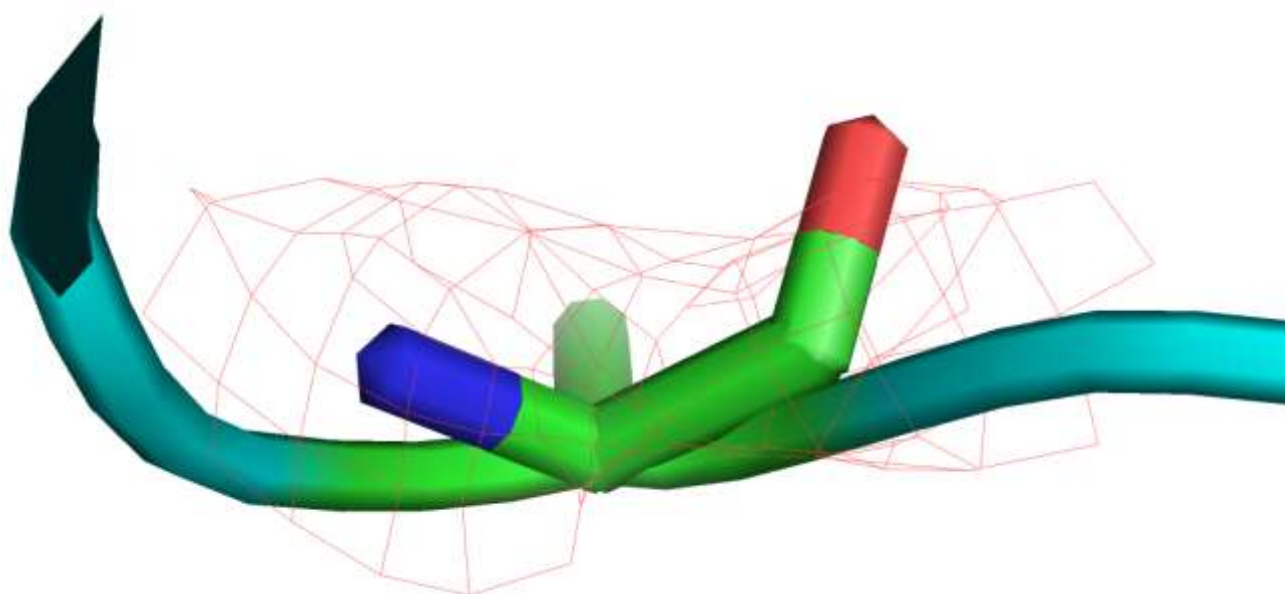


Рисунок 5. Маргинальный остаток Glu23 цепи C, красным изображена поверхность электронной плотности с уровнем подрезки 1,0.

Glu23 цепи C характеризуется отклонением в значении валентного угла от теории в 1 из 8 случаев в модели. Принимая во внимание все, вышеперечисленные факты, можно считать, что не только остаток Glu23 является маргинальным, но и окружающие его остатки.

Данная структура имеет и другие маргинальные остатки, не попавшие в запрещенную область карты Рамачандрана, но они, по мнению авторов статьи [1], не формируют контактов с лигандами белка, следовательно, не столь важны при изучении его функции. Однако, рассмотрим еще несколько примеров.

Lys134 цепи C

RSR = 0,301; B-фактор = 55,27 [4].

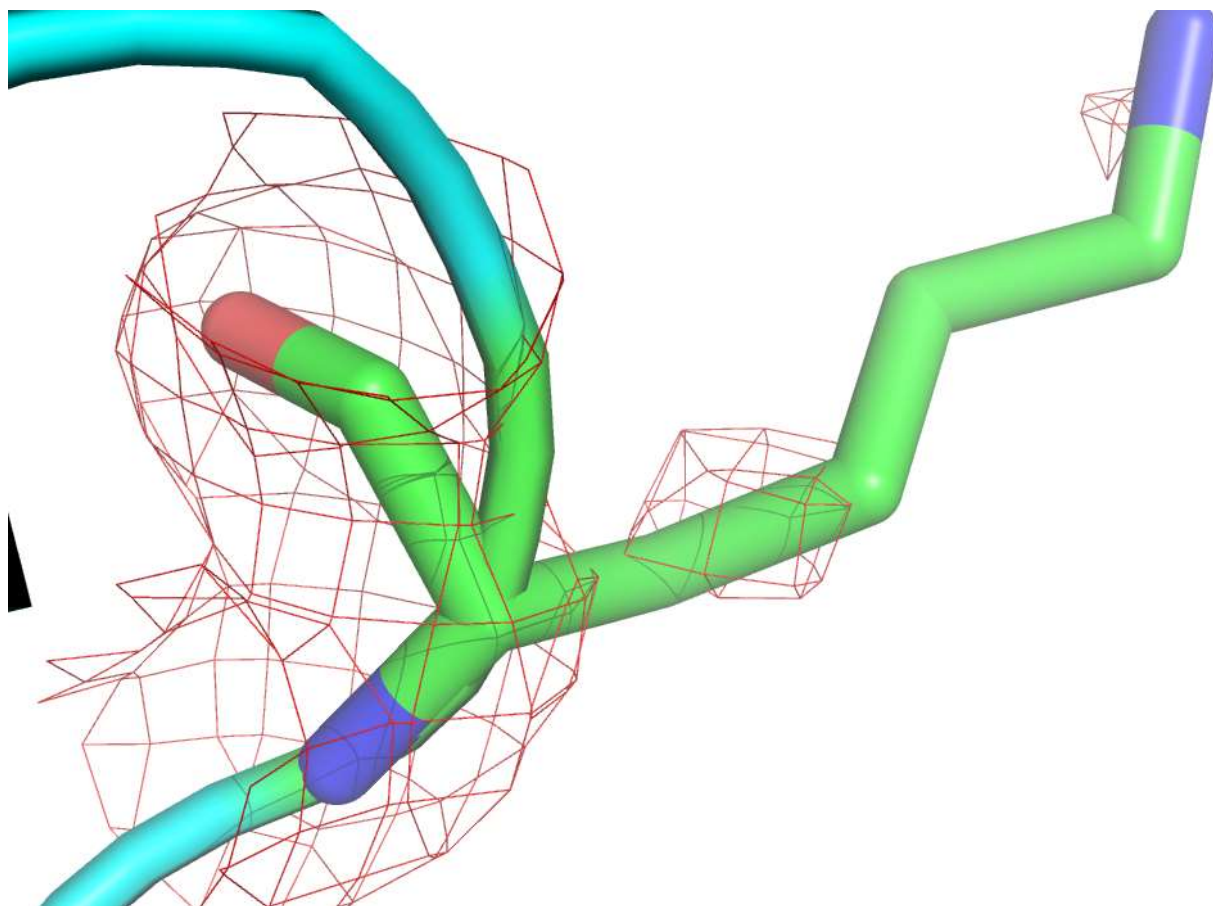


Рисунок 6. Маргинальный остаток Lys134 цепи C, красным изображена поверхность электронной плотности с уровнем подрезки 1,0.

Lys134 белка характеризуются температурным фактором больше 40, значением RSR более 20%. При этом Z-score RSR менее двух, получается, что по сравнению со структурами с таким же разрешением данные остатки хорошо вписаны в электронную плотность. А посмотрев на рисунок 6, видно, что плотность Lys134 практически не определена. Скорее всего, такое часто случается с подвижными поверхностными остатками лизина в структурах.

Arg103 цепи B

Остаток имеет высокий B-фактор = 41,57, его боковая цепь характеризуется отклонением от нормального ротамера (0,1%, χ_1 : 185,1, 152,6, 126,6, 59,2) [4]; валентный угол отклоняется от теории - N-CA-C: 4,319 σ . [5]

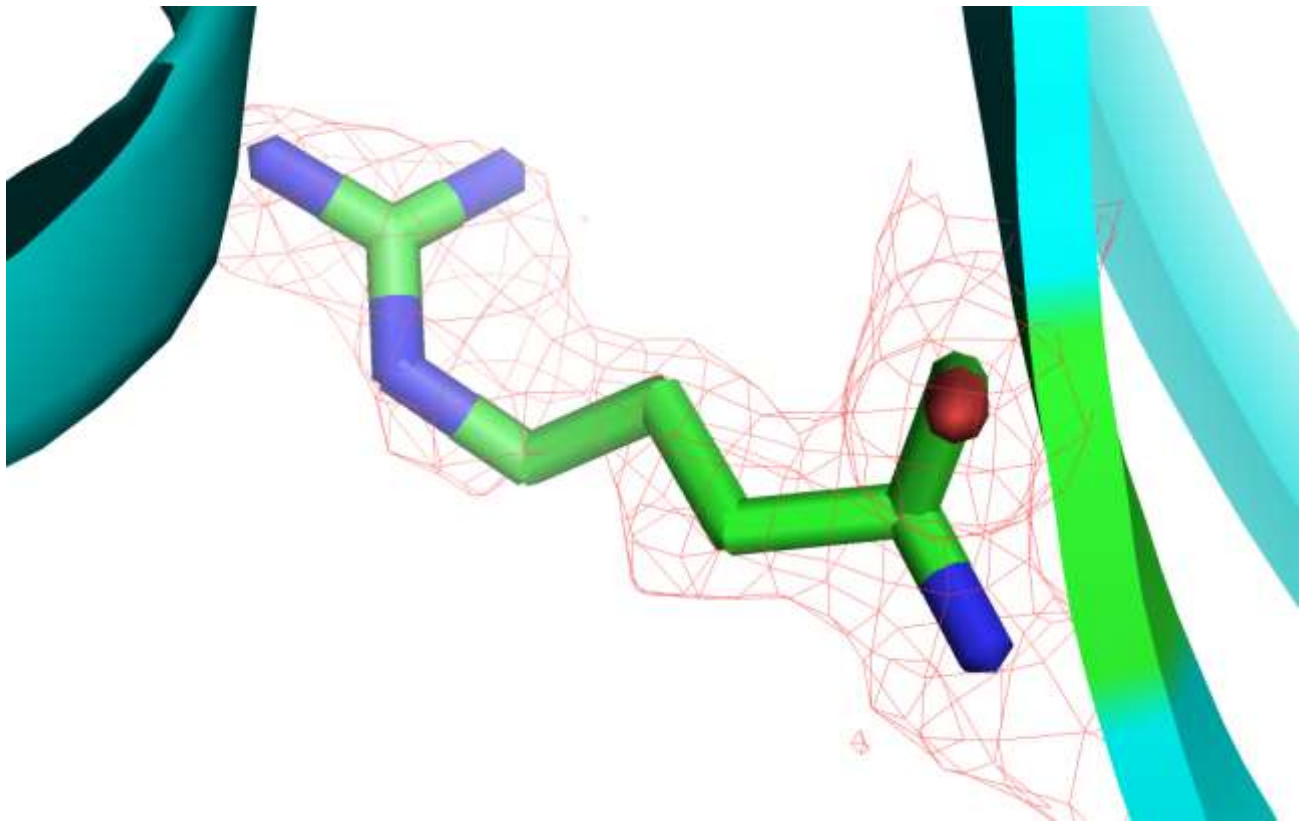


Рисунок 7. Маргинальный остаток Arg103 цепи В, красным изображена поверхность электронной плотности с уровнем подрезки 1,0.

В гуанидиновой группе NH₂ атом образует связи с молекулами воды, однако NH₂ атом не формирует таковых и соседствует с гидрофобным радикалом Leu39, следовательно, это тоже можно отнести к признакам маргинальности остатка. Однако по некоторым индикаторам остаток не подходит: Arg104 трех цепей имеют хорошие значения RSR и Z-score, и, как и в случае рассматриваемого выше Lys134, Arg103 цепей находится в предпочтительной области карты Рамачандрана [5].

Заключение

Согласно карте Рамачандрана, практически все атомы находятся в предпочтительной или разрешенной областях. Электронная плотность большинства атомов белка хорошо описана, в частности отлично разрешена плотность остатков, участвующих в связывании лигандов. Многие параметры оценки качества модели имеют значения не хуже, чем у других структур схожего разрешения из чего можно сделать вывод, что качество структуры 1WPV довольно высокое.

Список литературы

1. Kumarevel T, Mizuno H, Kumar PK. "Structural basis of HutP-mediated anti-termination and roles of the Mg²⁺ ion and l-histidine ligand", *Nature*, 2005
2. Kumarevel, T. S. et al. "Crystal structure of activated HutP: an RNA binding protein that regulates hut operon in *Bacillus subtilis*", *Structure* 12, 2004
3. Kumarevel, T. S., Mizuno, H. & Kumar, P. K. R. "Allosteric activation of HutP protein, that regulates transcription of hut operon in *Bacillus subtilis*, mediated by various analogs of histidine", *Nucleic Acids Res. Suppl.* 3, 2003
4. EDS – Electron Density Server (<http://eds.bmc.uu.se/eds/>)
5. MolProbity (<http://molprobity.biochem.duke.edu/>)