

Оценка качества расшифровки структуры Cu,Zn-супероксиддисмутазы человека SOD1 (1PU0).

Наталья Кашко

Аннотация

В работе был произведен анализ качества расшифровки структуры 1PU0, рассмотрены основные индикаторы качества модели, а также несколько маргинальных аминокислотных остатков.

Введение

Супероксиддисмутаза (СОД) - фермент из класса оксидоредуктаз, катализирующий распад супероксид-радикала на кислород и перекись водорода (**рисунок 1**). Это один из антиоксидантных ферментов, защищающих клетку от активных форм кислорода. Выделяют три основных вида супероксиддисмутаз в зависимости от типа иона в активном центре фермента: Cu, Mn или Fe¹. Наиболее распространенной формой является Cu,Zn-СОД, присутствующая в цитоплазме большинства клеток. В митохондриях распространена Mn-СОД, а большинство бактерий содержат форму фермента с ионом Fe (Fe-СОД) или, реже, с ионом Ni (Ni-СОД)².

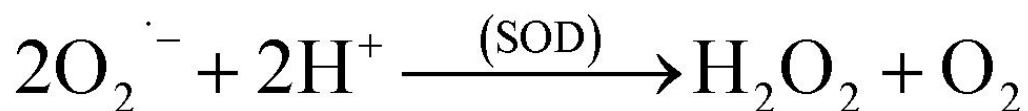


Рисунок 1. Реакция, катализируемая супероксиддисмутазой.

Структура 1PU0 была получена американскими учеными в работе 2003 года³. В своем исследовании они проанализировали структуры нормального (1PU0) и мутантного (1PTZ) вариантов Cu,Zn-СОД человека и обнаружили, что замена H43R (как, возможно, и множество других точечных замен) приводит к снижению стабильности белка и к облегчению формирования филаментов. Мутантные варианты Cu,Zn-СОД встречаются у людей с тяжелым нейродегенеративным заболеванием - семейным боковым амиотрофическим склерозом (familial amyotrophic lateral sclerosis, FALS). По результатам статьи, вероятно, именно склонность мутантных форм фермента к образованию филаментных структур приводит к развитию этого заболевания.

Активная форма Cu,Zn-СОД - гомодимер (**рисунок 2**). Каждая из субъединиц представляет собой αβ-бочонок, состоящий из 8 антипараллельных β-листов, уложенных по топологии "греческого ключа". Активный центр формируют две петли, соединяющиеся с β-бочонком через консервативный дисульфидный мостик. В состав активного сайта входят

ионы Cu и Zn, участвующие в каталитической реакции и стабилизации фермента³.

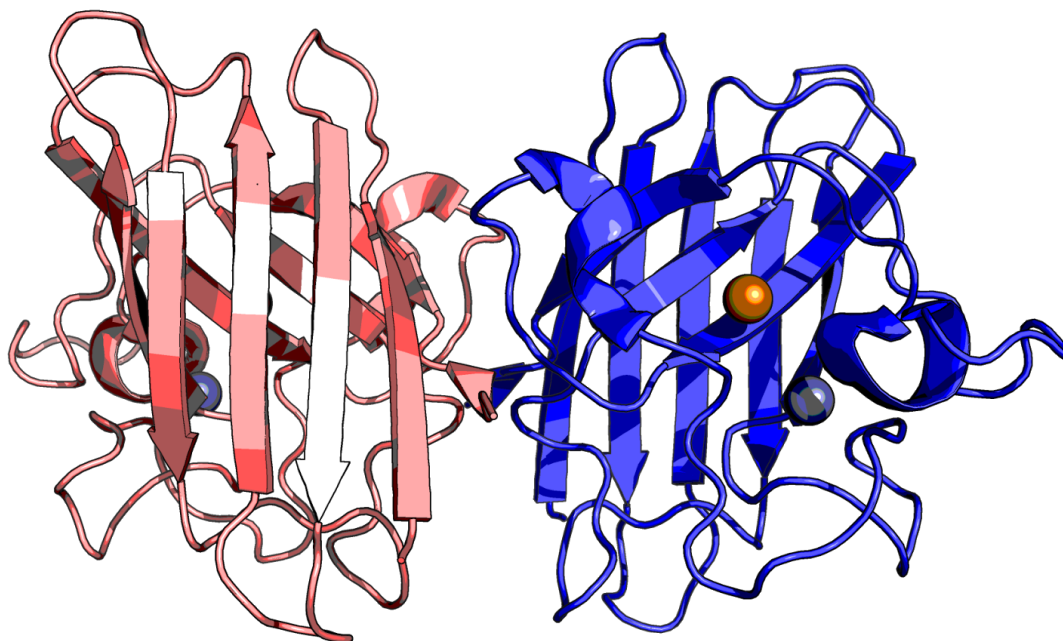


Рисунок 2. Димер Cu,Zn-СОД из структуры 1PU0. Два мономера обозначены розовым и синим. Сферами изображены ионы Cu (медный) и Zn (золотой).

Результаты

Общая информация о модели

Структура 1PU0 была выложена на сайт PDB в 2003 году группой ученых под руководством М. DiDonato из Исследовательского Института Скриппса, Калифорния, США. Структура была определена с разрешением 1,7 Å. В ходе эксперимента было получено 262329 структурных факторов. Для решения фазовой проблемы был использован метод молекулярного замещения программой AMoRe. В качестве структуры гомолога использовался димер HSOD-AS (1N18)³.

Асимметрическая единица включает в себя 10 идентичных субъединиц белка (или 5 гомодимеров). Одна субъединица состоит из 153 а.о. или 1114 атомов. Всего в асимметрической единице 1530 а.о. и 12222 атомов (с учетом молекул воды и других гетероатомов).

В **таблице 1** представлена краткая характеристика структуры с основной информацией об эксперименте и составе кристалла.

Таблица 1. Основные параметры структуры 1PU0.

Параметр	Значение
Состав комплекса	5 димеров в асимметрической единице, 80 асимметрических единиц в элементарной ячейке
Год	2003
Авторы	Michael DiDonato, Lisa Craig, Mary E. Huff, Maria M. Thayer, Rosa M. F. Cardoso, Carey J. Kassmann, Terence P. Lo, Cami K. Bruns, Evan T. Powers, Jeffery W. Kelly, Elizabeth D. Getzoff, John A. Tainer
Метод решения фазовой проблемы	Молекулярное замещение
Количество измеренных рефлексов	262329
Полнота набора структурных факторов	97,6%
Диапазон разрешений структурных факторов	27,61 Å - 1,70 Å
Разрешение	1,7 Å
Тип симметрии	C 2 2 2 ₁
Параметры кристаллографической ячейки	a = 203,58 Å; b = 165,68 Å; c = 144,15 Å ортогональная

Значения индикаторов качества модели в целом

В данном разделе рассмотрены основные индикаторы качества модели: R фактор, R-free, а также критерии, характеризующие геометрические параметры структуры (карта Рамачандрана, перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов, длины и углы связей, ротамеры). Значения индикаторов R и R-free, а также количество маргинальных остатков по некоторым критериям представлены в **таблице 2**.

Таблица 2. Значения основных индикаторов качества структуры 1PU0.

Параметр	Значение	
R фактор	0,211 (0,196 по DCC)	
R-free	0,243 (0,229 по DCC)	
Доля структурных факторов, отобранных для расчета R-free	10% ³ (5,35% по DCC)	
Доля маргинальных остатков по некоторым критериям		
Критерий	Количество маргиналов (по PDBreport)	Доля маргиналов (%)
Углы связей	21 из 15360	0,137
Длины связей	0 из 11400	0
RSR	119 из 1550	7,68
Карта Рамачандрана	3 из 1530 в запрещенной области (23 из 1530 в непередпочитаемой области)	0,2 (1,5)
Ротамеры	54 из 1200	4,5
Перекрывания	138 из 23012 (с учетом атомов водорода)	0,6

На **рисунке 3** представлена характеристика структуры 1PU0 по отношению ко всем структурам из PDB (полученных методом рентгеноструктурного анализа), а также по отношению к структурам близкого разрешения. В целом, 1PU0 расшифрована хуже, чем структуры такого же разрешения, и так же (или даже хуже по некоторым критериям), как и все структуры из PDB.

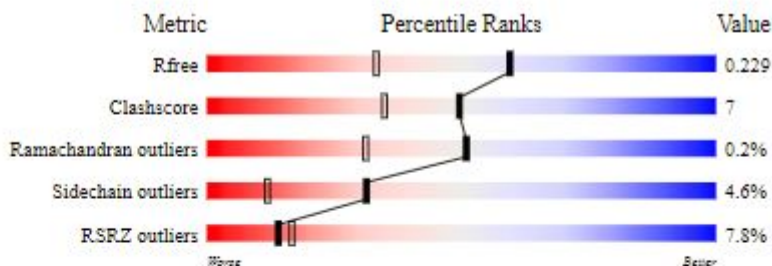


Рисунок 3. Характеристика расшифровки структуры 1PU0. Справа указаны значения основных индикаторов качества: R-free, критерий перекрытия Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов (Clashscore), доля маргиналов по карте Рамачандрана (Ramachandran outliers), по положению боковой цепи (Sidechain outliers) и по RSR (RSRZ outliers). Шкала отражает распределение значений этих параметров по сравнению со всеми структурами PDB (черные отметки) или со структурами схожего разрешения (белые отметки). Градиент цвета показывает, насколько параметры данной структуры лучше (синий) или хуже (красный) средних значений.

★ R фактор

Этот параметр описывает, насколько хорошо полученная модель соответствует экспериментальным данным. По результатам авторов структуры R фактор составляет 0,211 (при оптимизации DCC в PDB R фактор составил 0,196). Хорошими значениями для этого параметра считаются показатели R меньше 0,25, поэтому можно сказать, что данная структура достаточно хорошо соответствует экспериментальным данным.

★ R-free

R-free является внутренним контролем, позволяющим оценить, не была ли модель переоптимизирована. По результатам авторов R-free равен 0,243 (DCC - 0,229). Нормальными значениями считаются R-free меньше 0,2. Однако R-free для этой модели не сильно превышает порог, а разница между R и R-free меньше 10%, поэтому можно считать, что структура не была переоптимизирована и в целом имеет нормальное качество. При этом именно по значению R-free данная структура немного лучше других структур в PDB (рисунок 3).

★ Clashscore

Этот параметр отражает число стерических перекрытий (Ван-дер-Ваальсовы радиусы соседних атомов перекрываются более чем на 0,4 Å) в расчете на 1000 атомов. При анализе с помощью сервиса MolProbity⁴, который искусственно вносит в структуру атомы водорода, было получено значение clashscore 6,45. Это значение является 89-ым перцентилем (100-ый перцентиль соответствует наилучшему качеству по данному индикатору среди моделей с близким разрешением, 0-ой перцентиль - наихудшему). Таким

образом, хоть в структуре и присутствует некоторое количество перекрываний между атомами, в целом модель проявляет себя хорошо.

★ Ramachandran outliers

На **рисунке 4** представлена карта Рамачандрана для всего белка, построенная программой MolProbity. Такая карта позволяет оценить, насколько хорошо конформация основной цепи белка в структуре соответствует предпочитаемому положению, основываясь на значениях торсионных углов ϕ и ψ .

Можно заметить, что в запрещенной области оказались три остатка (Ser25 из цепей B и G, Glu132 из цепи G: на **рисунке 4** отмечены розовым). Еще 20 остатков находятся в разрешенной, но не предпочитаемой области. Таким образом, маргинальных остатков 23, однако по оценке MolProbity это хороший результат. Далее остатки из запрещенной области карты Рамачандрана будут рассмотрены более подробно.

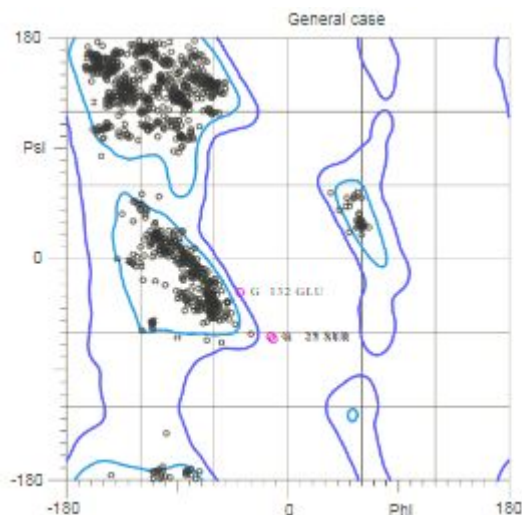


Рисунок 4. Карта Рамачандрана для целого белка Cu,Zn-COD (для асимметрической единицы из структуры 1PU0). Розовым отмечены аминокислотные остатки, находящиеся в запрещенной области.

Также были получены карты для отдельных остатков (Gly, Pro, Val и Ile), но все эти аминокислоты в данной структуре находятся в предпочитаемой области, поэтому карты для них не приведены в работе.

★ Sidechain outliers (ротамеры)

Если карта Рамачандрана позволяет оценить положение основной цепи белка, то данный параметр учитывает конформацию боковых цепей аминокислот. Ротамерами называются боковые цепи в предпочитаемых для данного остатка положениях, которые описываются наборами допустимых значений торсионных углов χ . По оценке MolProbity таких остатков должно

быть меньше 0,3%. В данной структуре их найдено 57, что составляет 4,5%. Таким образом, в модели 1PU0 многие остатки находятся в неpreferred для них конформации.

★ RSR outliers

Параметр RSR характеризует, насколько хорошо каждый аминокислотный остаток соответствует экспериментальным данным, то есть, насколько хорошо остаток в модели вписывается в электронную плотность. Этот индикатор рассчитывается для отдельных остатков. Обычно оценивается Z-score (RSRZ) - насколько RSR для остатка в данной модели отличается от среднего значения RSR по структурам из PDB близкого разрешения. Если Z-score больше 2, считается, что остаток маргинальный по RSR и не очень хорошо описывается экспериментальными данными. Этот параметр был включен в список индикаторов качества модели в целом, так как многие программы указывают долю маргинальных остатков по RSR: если таких остатков много, возможно, структура расшифрована не очень хорошо, или же исходные экспериментальные данные были недостаточно полными.

По данному индикатору структура 1PU0 имеет достаточно низкое качество - 7,7% маргинальных остатков. Из **рисунка 3** видно, что этот параметр для изучаемой модели в среднем ниже, чем у всех моделей из PDB. Далее некоторые остатки с плохими показателями RSR будут рассмотрены более подробно, а также будет предложено объяснение такого низкого качества данной структуры.

★ Bond angles or lengths

Эти параметры позволяют оценить, не нарушены ли в структуре длины химических связей или валентные углы. По данным PDBreport в модели 1PU0 все связи имеют длину в пределах допустимых значений, однако 21 (0,137%) из углов связей неоптимальны. По результатам MolProbity неоптимальных углов 83 (0,54%). К тому же, MolProbity отмечает 10 связей недопустимой длины. Все эти связи - дисульфидные мостики, по одному на каждую из субъединиц асимметрической ячейки. Скорее всего, длины этих связей в модели определены верно (во-первых, в PDBreport не встречаются подобные проблемы, во-вторых, авторы структуры уделили особое внимание определению координат атомов серы), а особенности структуры в данном случае будут рассмотрены далее.

Анализ маргинальных остатков

В **таблице 3** приведен список некоторых маргинальных остатков с указанием критериев, по которым остаток оказывается маргинальным. Далее эти остатки разобраны более подробно.

Таблица 3. Некоторые маргинальные остатки из структуры 1PU0.

Остаток	Критерий маргинальности
Ser25G	Карта Рамачандрана, ротамер, RSRZ
Glu132G	Карта Рамачандрана, ротамер, RSRZ
Asp11A, Asn26A, Lys128A, Gln153A	Окружение (What_CHECK ⁵)
Ala1C, Asp109C, петли 23-28B и 128-135C	RSRZ
Arg69G/Glu78G, Cys57I/Cys146I	Перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов
Asn139G	Поворот боковой цепи
Arg79H	Валентные углы

Перед тем, как анализировать отдельные случаи, стоит отметить некоторую особенность данной структуры. Асимметричная единица в модели 1PU0 состоит из 10 одинаковых субъединиц белка, которые, по идее, должны иметь одинаковую структуру. Однако все субъединицы были расшифрованы с разной степенью точности. Например, лучше всего была расшифрована цепь А (меньше всего маргинальных остатков), а хуже всего - цепи С и G. Некоторые участки оказались расшифрованы практически одинаково плохо во всех субъединицах. В работе были проанализированы маргинальные остатки из разных цепей белка. Однако при использовании этой PDB-структуры для других целей (например, структурное выравнивание, молекулярный докинг, поиск новых сайтов связывания и т.д.) можно использовать только цепи с хорошим качеством расшифровки.

Далее будут рассмотрены примеры маргинальных остатков из **таблицы 3**.

1) Поворот - Asn131G

Остаток Asn131G, скорее всего, необходимо повернуть так, чтобы атомы N и O в боковой цепи поменялись местами. Такая замена была предложена MolProbity.

На **рисунке 5** представлен описываемый остаток, а также соседние аминокислотные остатки, с которыми Asn131G образует водородные связи. В исходном положении возможно образование одной водородной связи с Thr135G (на **рисунке 5** отмечена красным). При повороте Asn131G могут возникать 4 дополнительные водородные связи с Ser134G, Asn139G, Gly129G и Glu132 из другой субъединицы белка. Таким образом, такой поворот будет

энергетически выгоден и, скорее всего, этот остаток действительно стоит так изменить в исходной структуре.

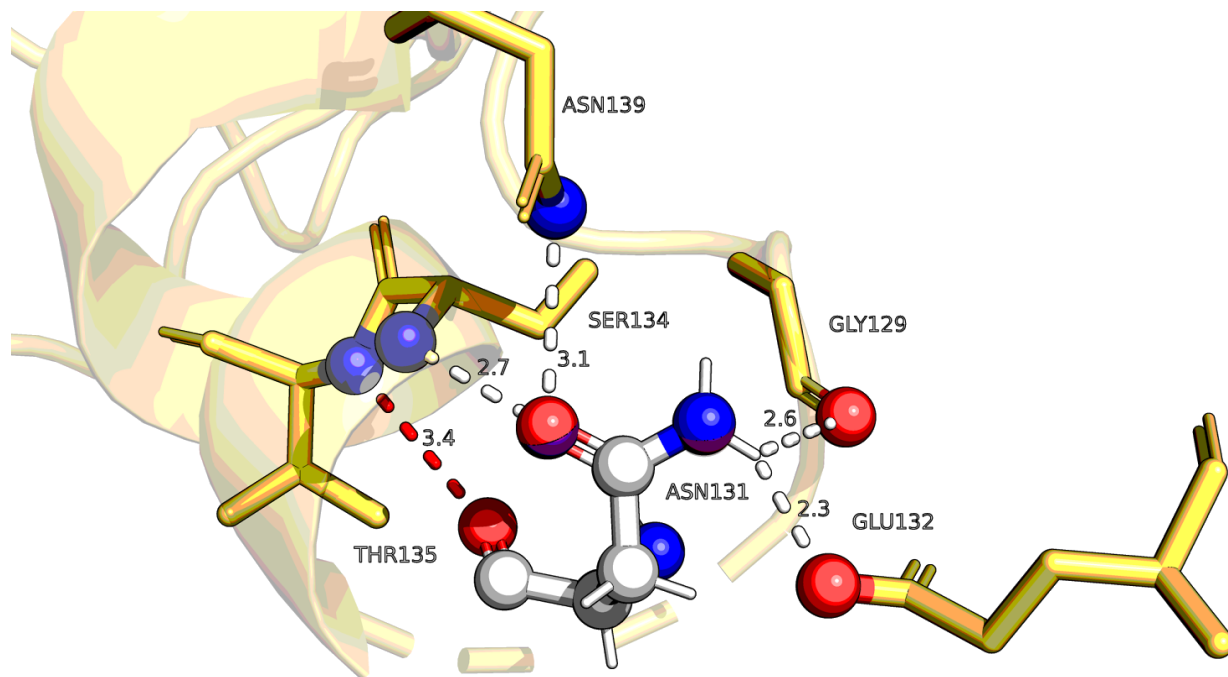


Рисунок 5. Водородные связи, образуемые остатком Asn131G (в центре, раскрашен по стандартной схеме PyMOL). Участвующие во взаимодействиях атомы соседних остатков также окрашены в соответствии со стандартными обозначениями (синий - N, красный - O). Водородная связь, присутствующая в исходной структуре 1PU0, отмечена красным, дополнительные связи, образующиеся при повороте Asn131G, - белым.

2) Валентные углы - Arg79H

Из 21 остатка, маргинальных по углам связей, только 5 не являются аргининами. Остаток Arg79H рассмотрен в качестве пример наиболее часто встречающейся проблемы с валентными углами: угол между атомами NE-CZ-NH1 или NE-CZ-NH2 не соответствует идеальному значению ($120,3^\circ$). Отклонения от идеального значения для всех маргинальных остатков обычно не превышает 5° .

На **рисунке 6** представлена конформация остатка Arg79H, отмечен проблемный валентный угол (в данном случае он составляет $115,2^\circ$), а также отображена электронная плотность вокруг остатка. По рисунку сложно сказать, насколько правильно был расшифрован этот участок. Так как эта проблема часто встречается в структуре 1PU0, а, судя по электронной плотности, особых сложностей с расшифровкой таких остатков быть не должно, возможно, эта ошибка связана с выбранной программой для оптимизации.

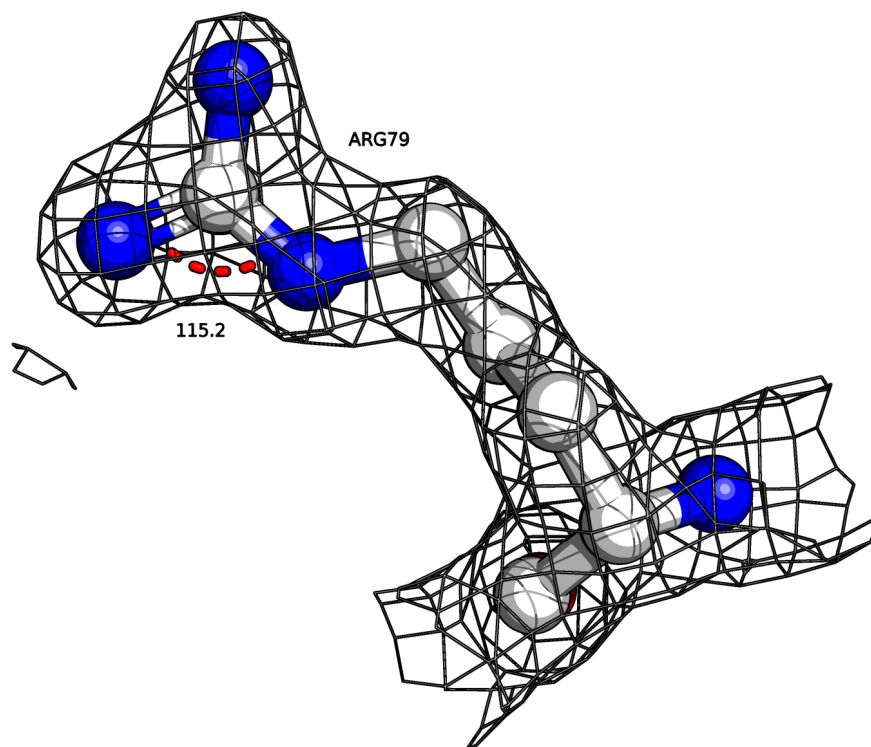


Рисунок 6. Arg79H из структуры 1PU0. Красным выделен неправильный валентный угол. Изображена электронная плотность вокруг этого остатка на уровне подрезки 1,5 σ .

3) Перекрытие атомов - Cys57I, Cys146I, Arg69G, Glu78G

Многие недопустимые перекрытия атомов возникают после добавления в структуру атомов водорода программой MolProbity. Однако я решила рассмотреть только перекрытия между теми атомами, которые были в исходной структуре.

Большинство подобных ошибок связано с расшифровкой дисульфидной связи. По литературным данным длина ковалентной S-S связи должна быть около 2,05 Å⁶, что возможно только при перекрытии Ван-дер-Ваальсовых радиусов.

На самом деле, в PDB-структуре указаны две альтернативные конформации этого участка. В одной конформации длина S-S связи составляет 2,2 Å (состояние А), в другой - 2,7 Å (состояние В). Возможно, эти конформации соответствуют разным состояниям дисульфидной связи. При этом перекрытие радиусов, а также и проблемы с длинами связей относятся именно к S-S связям в состоянии В. То есть, состояние А рассматривается как обычная дисульфидная связь, а состояние В, по-видимому, представляет собой невзаимодействующие цистеины или переходное состояние при образовании дисульфидной связи. Коэффициенты заселенности для состояний А и В равны 0,4 и 0,6, соответственно.

На **рисунке 7** представлена дисульфидная связь в цепи I. Слева изображено перекрывание атомов серы в состоянии В (перекрываются на $0,779 \text{ \AA}$), справа - электронная плотность на данном участке. Опять же, электронная плотность описывает все достаточно хорошо и точно.

При работе со структурой 1PU0 можно учитывать только состояние А, в котором проблемы с перекрыванием атомов и длиной связи не возникают.

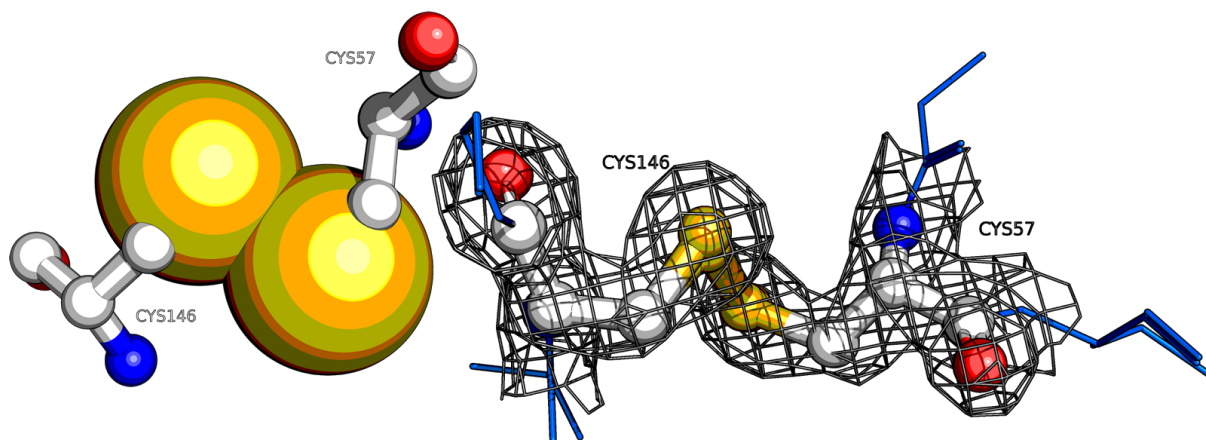


Рисунок 7. Дисульфидная связь: слева - перекрывание атомов серы остатков Cys57I и Cys146I, справа - электронная плотность вокруг дисульфидной связи на уровне подрезки $1,5\sigma$.

Еще один пример перекрывания атомов - атомы OE1 и NH2 из Glu78G и Arg69G. Между этими атомами должна образовываться водородная связь, но длина этой связи получается $2,5 \text{ \AA}$, что несколько меньше характерной для водородной связи длины. Из-за того, что атомы расположены так близко, наблюдается небольшое перекрывание их Ван-дер-Ваальсовых радиусов на $0,454 \text{ \AA}$ (плохими считаются значения больше $0,4 \text{ \AA}$). На **рисунке 8** изображены описываемые остатки, перекрывание между ними и электронная плотность вокруг них. К сожалению, остатки находятся в петлях, поэтому электронная плотность в этом участке относительно низкая, и сложно сказать, насколько хорошо расшифрованы остатки. Скорее всего, это небольшая ошибка расшифровки - можно подвинуть остатки так, чтобы расстояние между атомами немного увеличилось. К тому же, в других цепях структуры этот участок расшифрован нормально (и чаще всего эти остатки удалены друг от друга и не образуют водородную связь, так как петли достаточно подвижны).

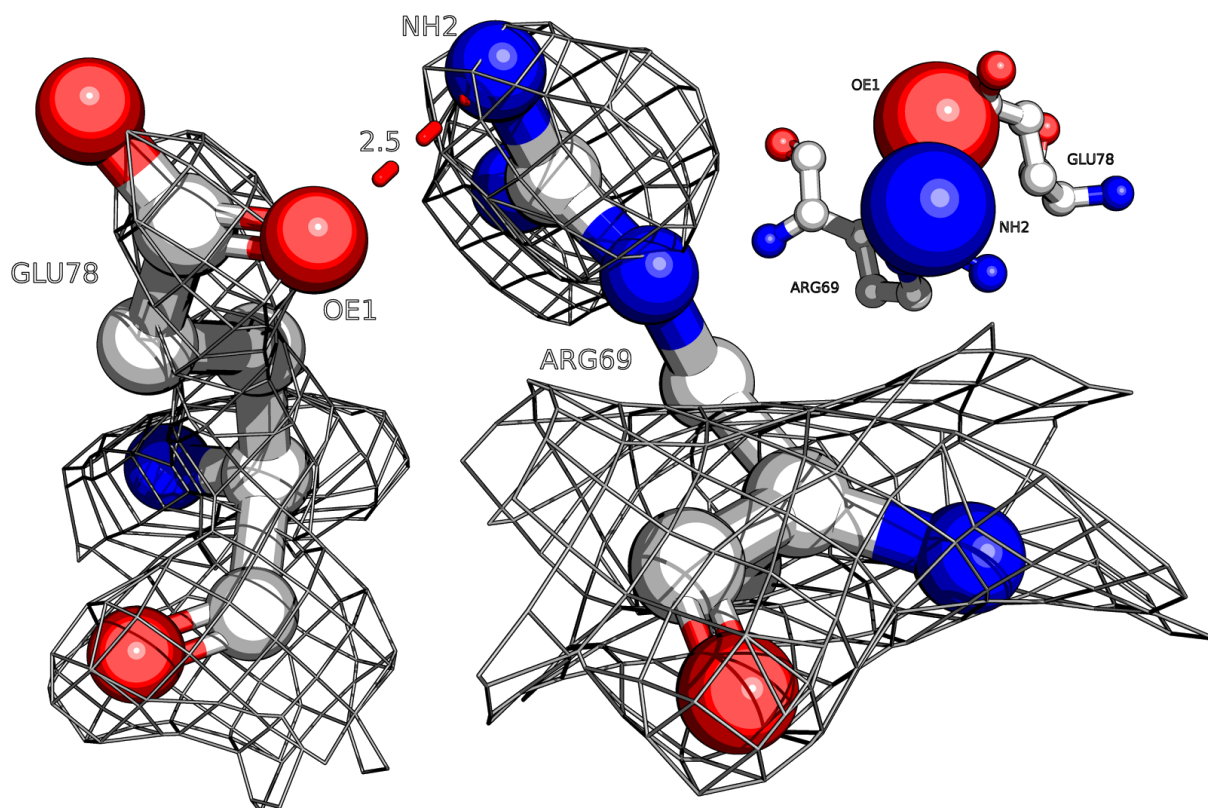


Рисунок 8. Взаимодействие между остатками Arg69G и Glu78G. Справа сверху - перекрытие между атомами OE1 и NH2. Между этими атомами образуется водородная связь (на изображении слева отмечена красным). Дополнительно изображена электронная плотность вокруг остатков на уровне подрезки $1,5\sigma$.

4) Окружение - Asp11A, Asn26A, Lys128A, Gln153A

По результатам What_CHECK было найдено несколько остатков в неблагоприятном окружении. Их оказалось достаточно много (43 из 1530), поэтому были рассмотрены только маргинальные остатки в цепи A. В качестве критерия неблагоприятности окружения в What_CHECK используется Z-score. Остатки с плохими значениями этого параметра (Z-score меньше -5) в цепи A - Asp11A (-5,009), Asn26A (-5,134), Lys128A (-5,019) и Gln153A (-6,081).

На **рисунке 9** отмечены эти остатки, а также показано их окружение. По-моему, нет основания считать эти остатки маргинальными, так как это гидрофильные аминокислоты, расположенные на краю белковой глобулы и образующие водородные связи с окружающими молекулами воды или с соседними аминокислотами. Возможно, аминокислоты Asp11A и Gln153A были отнесены к маргиналам, так как их заряженные боковые цепи не образуют водородные связи и не компенсируются зарядами, однако для двух других остатков такого сказать нельзя.

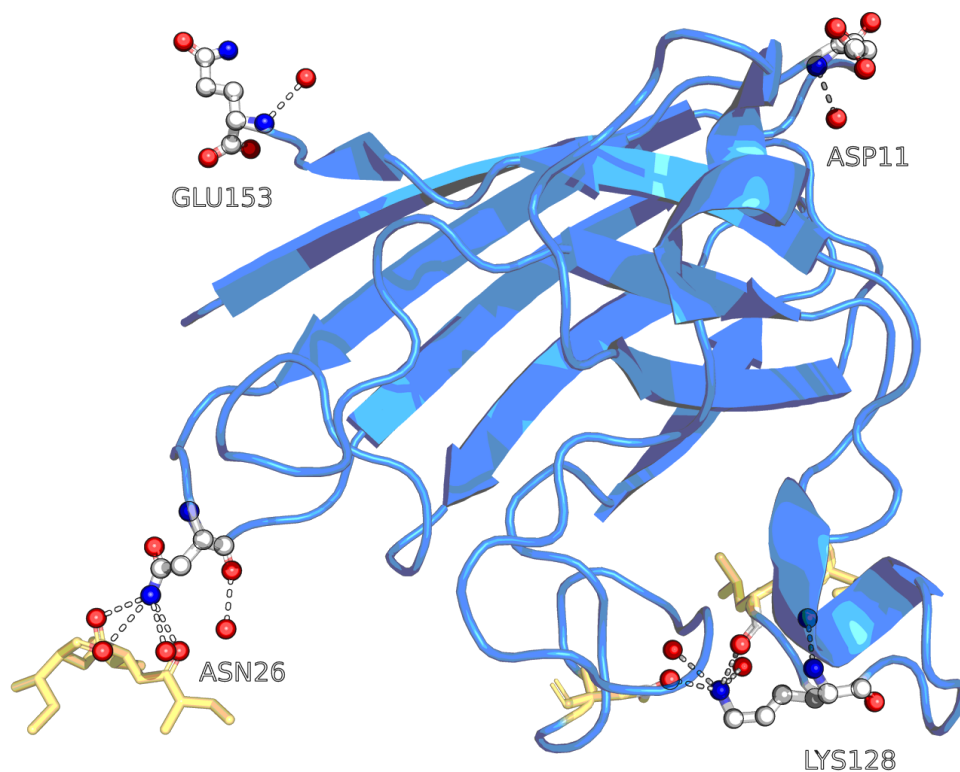


Рисунок 9. Остатки Asp11A, Asn26A, Lys128A, Gln153A в неблагоприятном окружении. Сферами отмечены молекулы воды, а также атомы соседних аминокислот, с которыми взаимодействуют данные остатки. Желтым выделены аминокислоты, с которыми могут образовываться водородные связи. Сами водородные связи отмечены белыми пунктирными линиями.

5) Ala1C, Asp109C

Эти остатки - примеры маргиналов по RSR. Z-score для Ala1C составляет 7,7, а для Asp109C - 5,5. Это значит, что описываемые аминокислотные остатки расшифрованы в целом хуже, чем остатки того же типа в структурах близкого разрешения. На **рисунках 10 и 11** показана электронная плотность вокруг этих остатков, а также электронная плотность на том же уровне подрезки, но для других остатков того же типа из той же структуры. Можно заметить, что остатки Ala1C и Asp109C действительно плохо вписываются в электронную плотность, но не из-за ошибки расшифровки, а из-за низкого качества карты электронной плотности в соответствующем участке. Ala1C - первый N-концевой остаток, достаточно подвижен и расположен на конце петли, Asp109C также расположен в петле. Заметно, что электронная плотность на выбранном уровне подрезки покрывает только остов пептидной цепи.

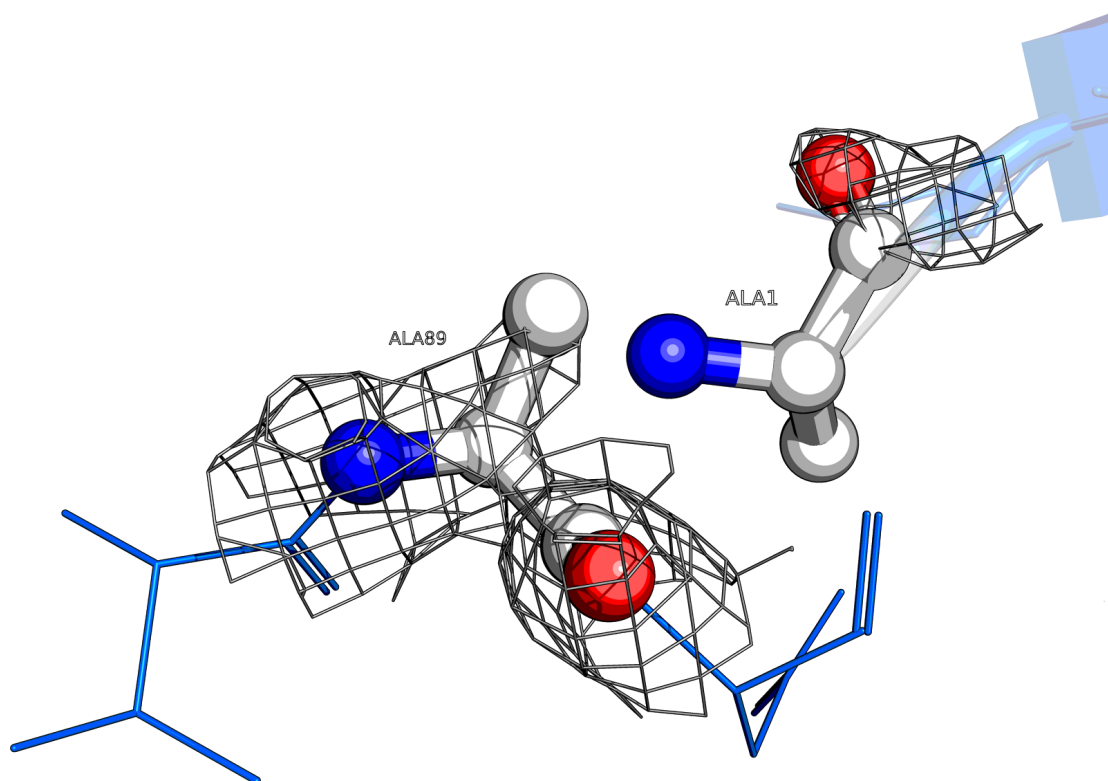


Рисунок 10. Электронная плотность вокруг маргинального остатка Ala1C (справа) и остатка с нормальным RSRZ Ala89C (слева) на уровне подрезки 1,5 σ .

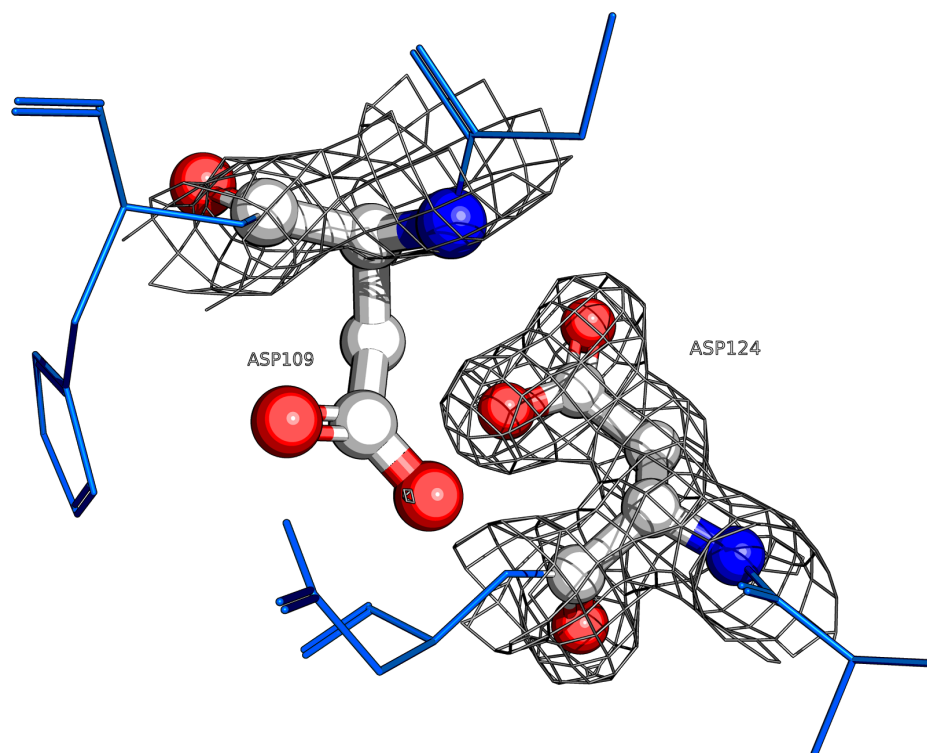


Рисунок 11. Электронная плотность вокруг маргинального остатка Asp109C (справа) и остатка с нормальным RSRZ Asp124B (слева) на уровне подрезки 1,5 σ .

Стоит отметить, что во всей структуре 1PU0 электронная плотность очень плохо описывает петли, а петель в этом белке достаточно много (**рисунок 2**). По-видимому, это связано с тем, что петли плохо кристаллизуются, поэтому не удастся получить кристалл с одинаковым положением петель во всех асимметрических ячейках. Обычно в петлях электронная плотность нормально покрывает только остов цепи. Примеры таких петель представлены на **рисунке 12**, а положение петель в структуре белка - на **рисунке 13**.

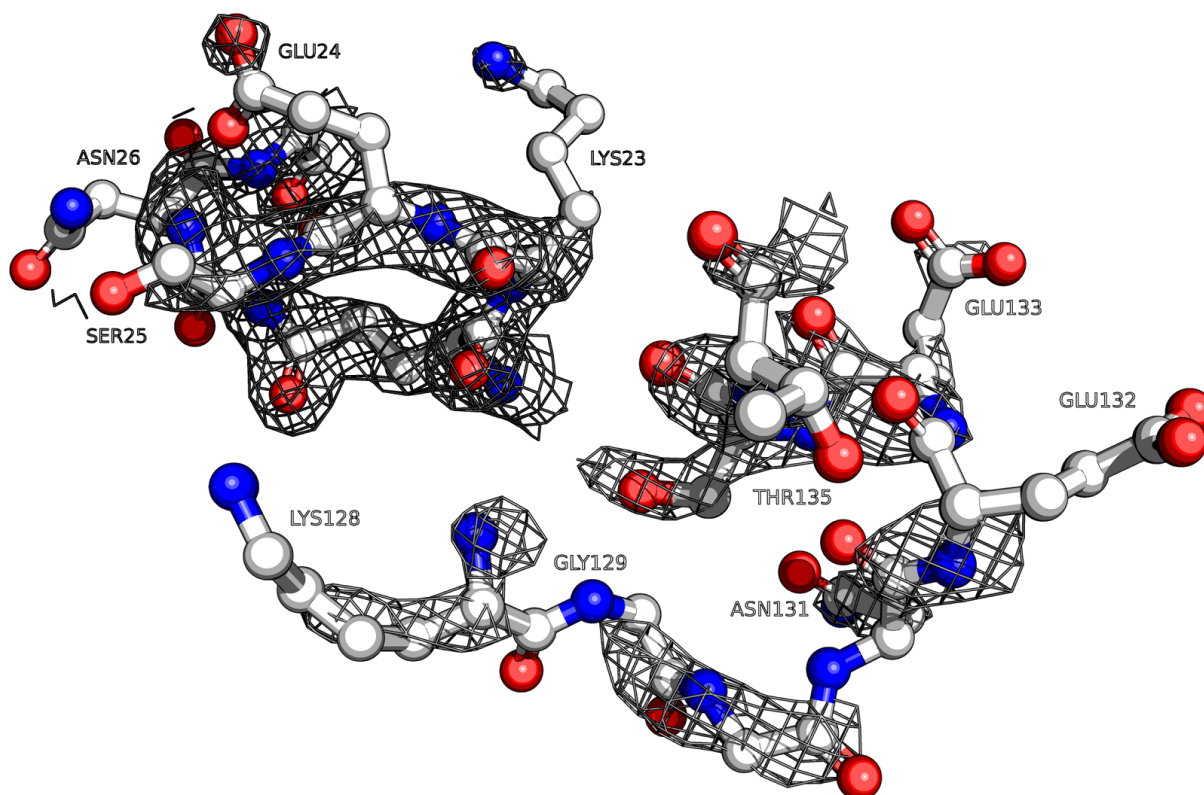


Рисунок 12. Электронная плотность на уровне подрезки $1,5\sigma$ вокруг некоторых петель из структуры белка: остатки 23-28 из цепи В (слева) и 128-135 из цепи С (справа).

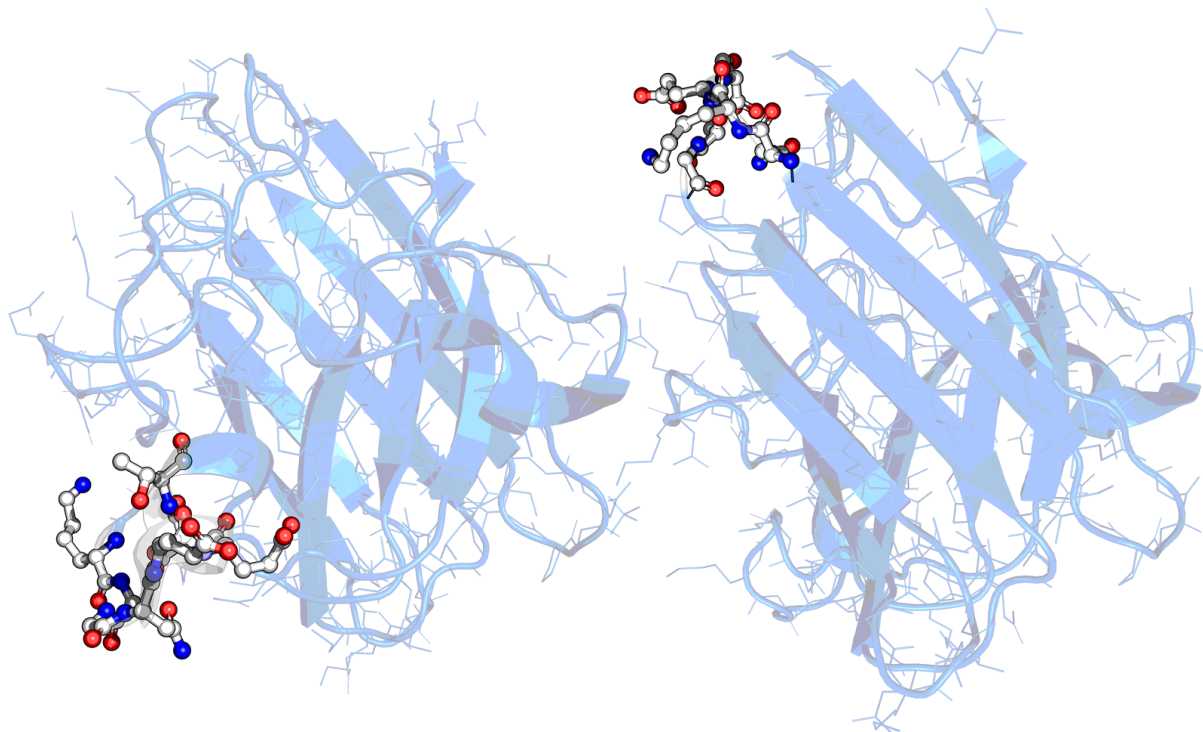


Рисунок 13. Положение описанных петель в структуре: в цепи В (справа) или С (слева).

6) Ser25G

Этот остаток маргинальный сразу по трем критериям: расположен в запрещенной области карты Рамачандрана (торсионные углы ϕ и ψ составляют $-14,2^\circ$ и $-63,8^\circ$, соответственно), не соответствует ни одному из ротамеров серина (угол χ_1 равен $1,8^\circ$), а также плохо описывается электронной плотностью ($Z = 3,9$). На **рисунке 14** изображен этот остаток и его торсионные углы (справа), а также электронная плотность вокруг этого остатка (слева).

Из рисунка видно, что остов цепи на этом участке не идеально вписывается в электронную плотность. Возможно, это неточность расшифровки, и можно было бы немного изменить торсионные углы ϕ и ψ так, чтобы Ser25G лучше описывался электронной плотностью, и при этом не был маргиналом по карте Рамачандрана. Угол χ_1 также можно скорректировать, так как в этом месте электронная плотность практически отсутствует.

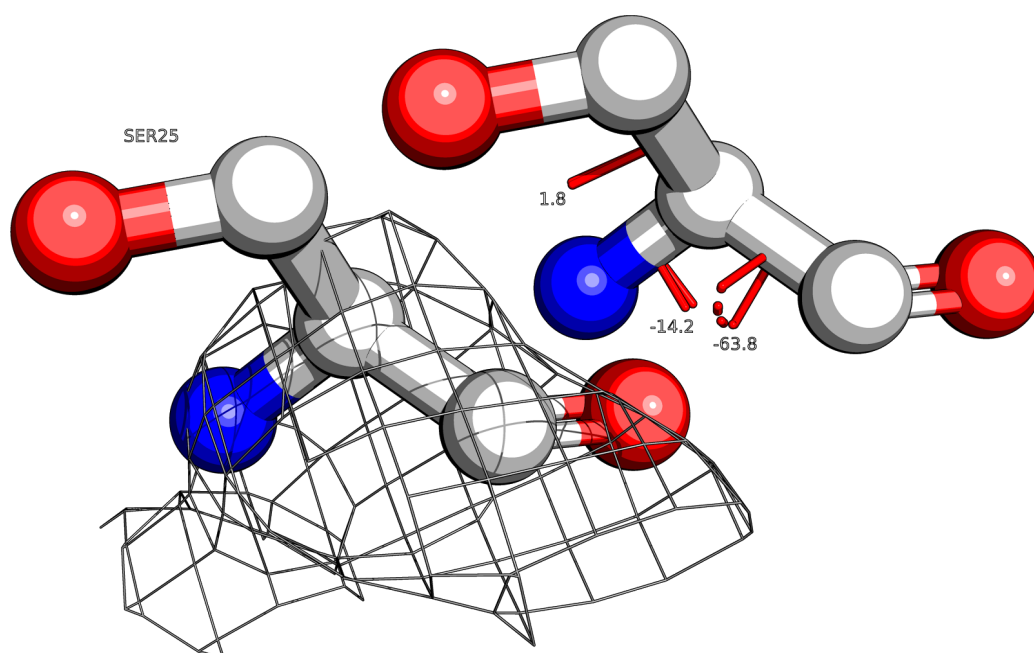


Рисунок 14. Остаток Ser25G: торсионные углы $\varphi = -14,2^\circ$, $\psi = -63,8^\circ$ и $\chi_1 = 1,8^\circ$ (справа, отмечены красным) и электронная плотность вокруг остатка на уровне подрезки $1,5\sigma$ (слева).

7) Glu132G

Этот остаток также маргинальный по нескольким параметрам: он расположен в запрещенной области карты Рамачандрана (торсионные углы φ и ψ составляют -39° и $-27,3^\circ$, соответственно), его боковая цепь также не соответствует ни одной из допустимых конформаций (углы χ_1 , χ_2 и χ_3 равны $163,5^\circ$, $-104,8^\circ$ и $48,2^\circ$, соответственно), а $RSRZ = 5,1$. На **рисунке 15** изображен этот остаток и его торсионные углы (слева вверху), а также электронная плотность вокруг этого остатка.

По рисунку видно, что можно изменить торсионные углы в остатке Glu132G так, чтобы он лучше вписывался в электронную плотность. Следовательно, это ошибка расшифровки.

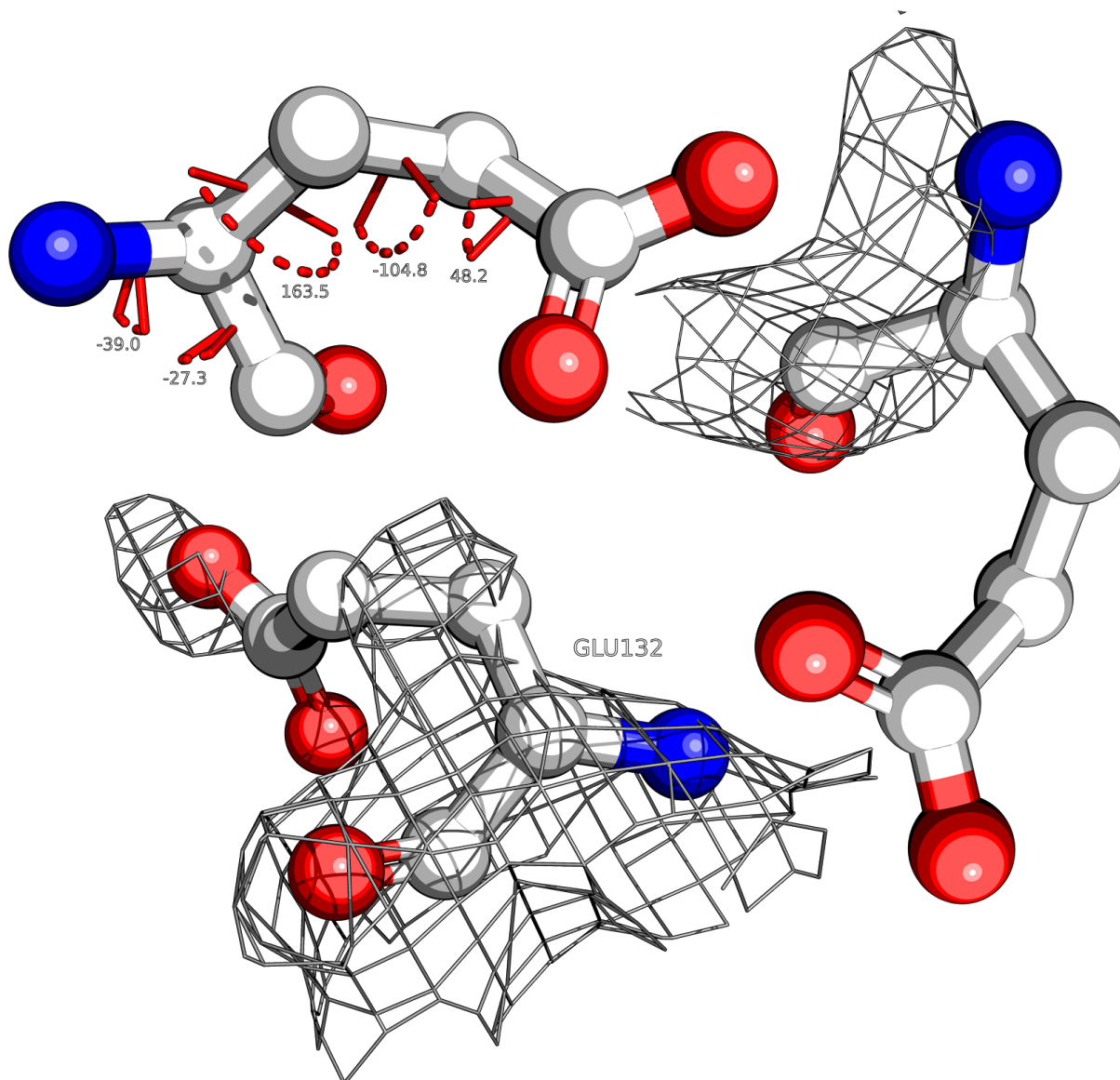


Рисунок 15. Остаток Glu132G: торсионные углы $\varphi = -39^\circ$, $\psi = -27,3^\circ$, $\chi_1 = 163,5^\circ$, $\chi_2 = -104,8^\circ$ и $\chi_3 = 48,2^\circ$ (слева вверху, отмечены красным) и электронная плотность вокруг остатка на уровне подрезки $1,5\sigma$ (справа) и $0,8\sigma$.

PDB_redo

Чтобы проверить, можно ли улучшить структуру 1PU0, была проанализирована запись в PDB_redo⁷, соответствующая исследуемой модели. Структура, скачанная из этой базы данных, имеет гораздо лучшее качество, чем исходная PDB-структура. Практически все показатели, которые оцениваются непосредственно в PDB_redo, за исключением длин связей, в оптимизированной модели лучше.

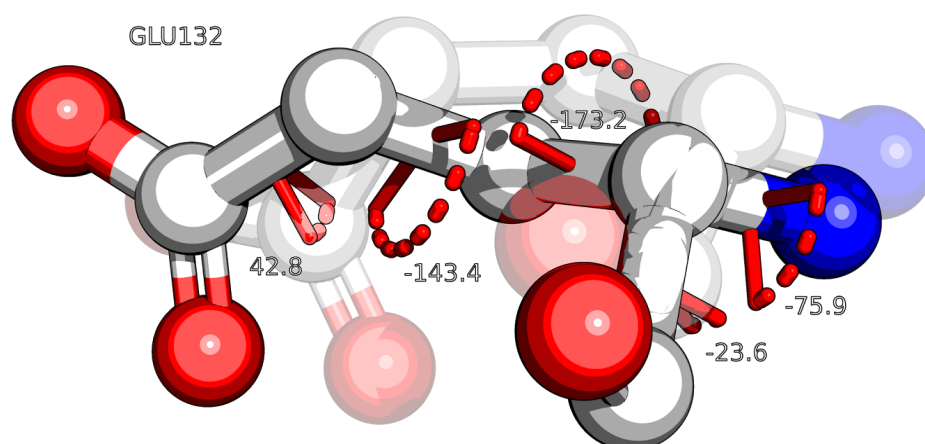
Также новая структура была проанализирована с помощью MolProbity. В **таблице 4** представлено сравнение исходной модели 1PU0 и модели из PDB_redo по результатам MolProbity.

Таблица 4. Сравнение основных индикаторов качества и количества маргинальных остатков (по результатам MolProbity) для исходной PDB-структуры 1PU0 и для аналогичной структуры из PDB_redo.

Критерий	1PU0 (PDB)	1PU0 (PDB_redo)
R фактор	0,196	0,143
R-free	0,229	0,174
Валентные углы	83	15
Длины связей	10	31
Карта Рамачандрана	3	1
Ротамеры	57	9
Clashscore	6,45 (89-ый перцентиль)	1,36 (99-ый перцентиль)
MolProbity Score	1,87 (67-ой перцентиль)	0,87 (100-ый перцентиль)

Из **таблицы 4** видно, что структура заметно улучшилась. Единственный параметр, который стал несколько хуже - количество неоптимальных длин связей. Однако улучшение по всем другим критериям гораздо более значительные.

Например, торсионные углы в рассмотренных маргинальных остатках Ser25G и Glu132G в структуре из PDB_redo больше соответствуют предпочитаемым значениям. Угол χ_1 для Ser25G в новой модели равен $20,8^\circ$, и остаток оказывается близок к *p*-ротамеру серина. Углы χ_1 , χ_2 и χ_3 для Glu132G в новой структуре составляют $-173,2^\circ$, $-143,4^\circ$ и $42,8^\circ$, соответственно, остаток конформационно близок к *tt0*-ротамеру глутамата. На **рисунке 16** представлено сравнение этих аминокислот в двух структурах.



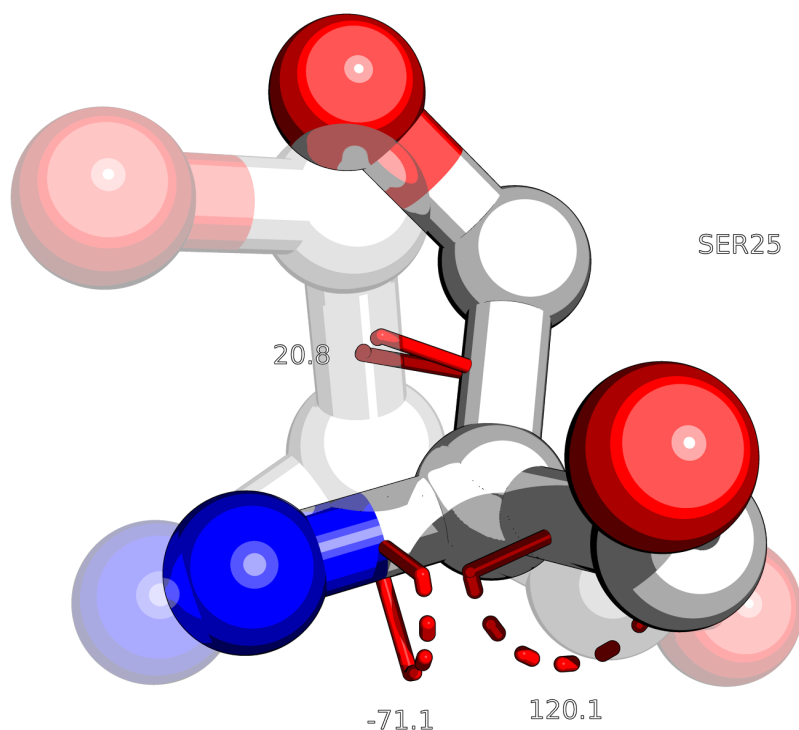


Рисунок 16. Сравнение конформации остатков Glu132G (сверху) и Ser25G (снизу) из структуры 1PU0, выложенной в PDB (показано полупрозрачными линиями) или в PDB_redo. Красным отмечены торсионные углы в структуре из PDB_redo.

Заключение

В целом, структура 1PU0 расшифрована не очень хорошо, несмотря на высокое разрешение 1,7 Å. Большинство индикаторов качества имеют более низкие значения, чем характерные для PDB-структур с близким разрешением (**рисунок 3**). По данным из PDB_redo можно заключить, что структура могла быть оптимизирована гораздо лучше.

Многие проблемы при расшифровке структуры вызваны наличием альтернативных конформаций петель, которые плохо описываются электронной плотностью. Несмотря на все указанные недостатки, достигнутое разрешение оказалось лучше, чем для уже имевшихся на тот момент в PDB структур Cu,Zn-СОД. Наконец, полученная структура позволила авторам решить поставленный ими биологический вопрос о влиянии точечной аминокислотной замены на стабильность фермента и проявление нейродегенеративного заболевания FALS.

Ссылки

1. Sheng Y. et al. **Superoxide dismutases and superoxide reductases**. Chem Rev., 2014, 114(7):3854-918. doi: 10.1021/cr4005296.
2. <http://pdb101.rcsb.org/motm/94>
3. DiDonato M. et al. **ALS mutants of human superoxide dismutase form fibrous aggregates via framework destabilization**. J Mol Biol., 2003, 332(3):601-15. doi: 10.1016/S0022-2836(03)00889-1
4. <http://molprobitry.biochem.duke.edu/index.php>
5. <http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>
6. https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Chemical_Bonding/_Di_sulfide_bonds