

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

---

*ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ*

## **Отчет по качеству расшифровки структуры БОКО**

**Выполнила студентка 4го курса Агаева Зарифа**

Москва  
2020

# Аннотация

В данном отчете проанализированы индикаторы качества модели 6OKO в целом, рассмотрены отдельно ее некоторые маргинальные остатки, и было проведено сравнение модели 6OKO из PDB и PDB\_redo.

## Введение

Серин-треониновая протеинкиназа RIPK3 (receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3) представляет из себя гомодимер, N-концевые домены которого обладают киназной активностью. RIPK3 играет ключевую роль в явлении некроптоза: в ходе этого процесса происходит сборка внутриклеточного комплекса, некрсомы, состоящего из взаимодействующих друг с другом киназ RIPK3 и RIPK1. Аутофосфорилированная по S227 (у Homo sapiens) или по T231 S232 (у Mus musculus) RIPK3 способна фосфорилировать активационную петлю псевдокиназы MLKL. Это способствует олигомеризации MLKL, его переносу на плазматическую мембрану и в дальнейшем гибели клетки [1,2].

Авторы в своей статье с помощью HTS-метода (high-throughput screen) определили ингибиторы, способные связываться с инактивированной формой RIPK3 и методом PCA получили структуру белка RIPK3, выделенного из Mus musculus, в комплексе с одним из определенных ими ингибитором [3].

## Результаты и обсуждение

### Общая информация о модели

Состав комплекса: кристаллическая структура mRIPK3 в комплексе с ингибитором (PDB ID: 1FN)

Год: 2019

Авторы: Amy C. Hart, Lynn Abell, Junqing Guo, Michael E. Mertzman, Ramesh Padmanabha, John E. Macor, Charu Chaudhry, Hao Lu, Kevin O'Malley, Patrick J. Shaw, Carolyn Weigelt, Matthew Pokross, Kevin Kish, Kyoung S. Kim, Lyndon Cornelius, Andrew E. Douglas, Deepa Calambur, Ping Zhang, Brian Carpenter, William J. Pitts

Статья: Identification of RIPK3 Type II Inhibitors Using High-Throughput Mechanistic Studies in Hit Triage

Метод решения фазовой проблемы: молекулярное замещение

Число измеренных рефлексов: 34396

Разрешение: 2.10 Å

Полнота набора структурных факторов: 98.6%

Диапазон разрешений структурных факторов: 2.1-39.26

Параметры кристаллографической ячейки:  $a=144.76 \text{ \AA}$        $\alpha=90.00^\circ$   
 $b=52.75 \text{ \AA}$        $\beta=130.82^\circ$   
 $c=103.75 \text{ \AA}$        $\gamma=90.00^\circ$

Кристаллографическая группа: C 1 2 1

Наличие некристаллографических симметрий в асимметрической ячейке: нет

## Значения индикаторов качества модели

- R-фактор: 0.1808
- R-free: 0.1984

Значение фактора R-free можно оценить как удовлетворяющее (~20%), а разница между R-free и R-фактором мала (<10%); таким образом, модель, в целом, соответствует экспериментальным данным и не переоптимизирована.

Следующие параметры были вычислены с помощью веб-сервиса MolProbity [4]:

- Кол-во маргинальных остатков, лежащих в недопустимой области на карте Рамачандрана (рис. 1): 5 (0.98%)
- Кол-во остатков с маргинальными по отклонению от ротамеров боковыми цепями: 12 (2.86%)
- Кол-во остатков с отклонением  $C_\beta > 0.25 \text{ \AA}$ : 1
- Плохие связи\*: 0 / 4089 (0%)
- Плохие углы\*\*: 11 / 5582 (0.20%)
- ClashScore: 2.01

\*Плохие связи – число ковалентных связей, существенно отклоняющихся от теории

\*\*Плохие углы – число валентных углов, существенно отклоняющихся от теории

Процент маргинальных по карте Рамачандрана остатков, а также процент остатков, маргинальных по отклонению от ротамеров боковыми цепями, значительно превысили рекомендуемые веб-сервисом MolProbity 0.05% и 0.3% соответственно. Число валентных углов, значительно отклоняющихся от своих типичных значений, также относительно велико – 0.20%, что больше рекомендуемого 0.1%. Такое отклонение параметров модели, связанных с углами, от типичных значений и, как следствие, напряжение в системе, возможно, ассоциировано со связыванием с ингибитором. Значения остальных индикаторов качества модели колеблются в пределах нормы. Однако надо помнить, что алгоритмы веб-сервиса MolProbity не учитывают разрешение модели при определении отсечек для допустимого/недопустимого количества остатков, маргинальных по тому или иному параметру.

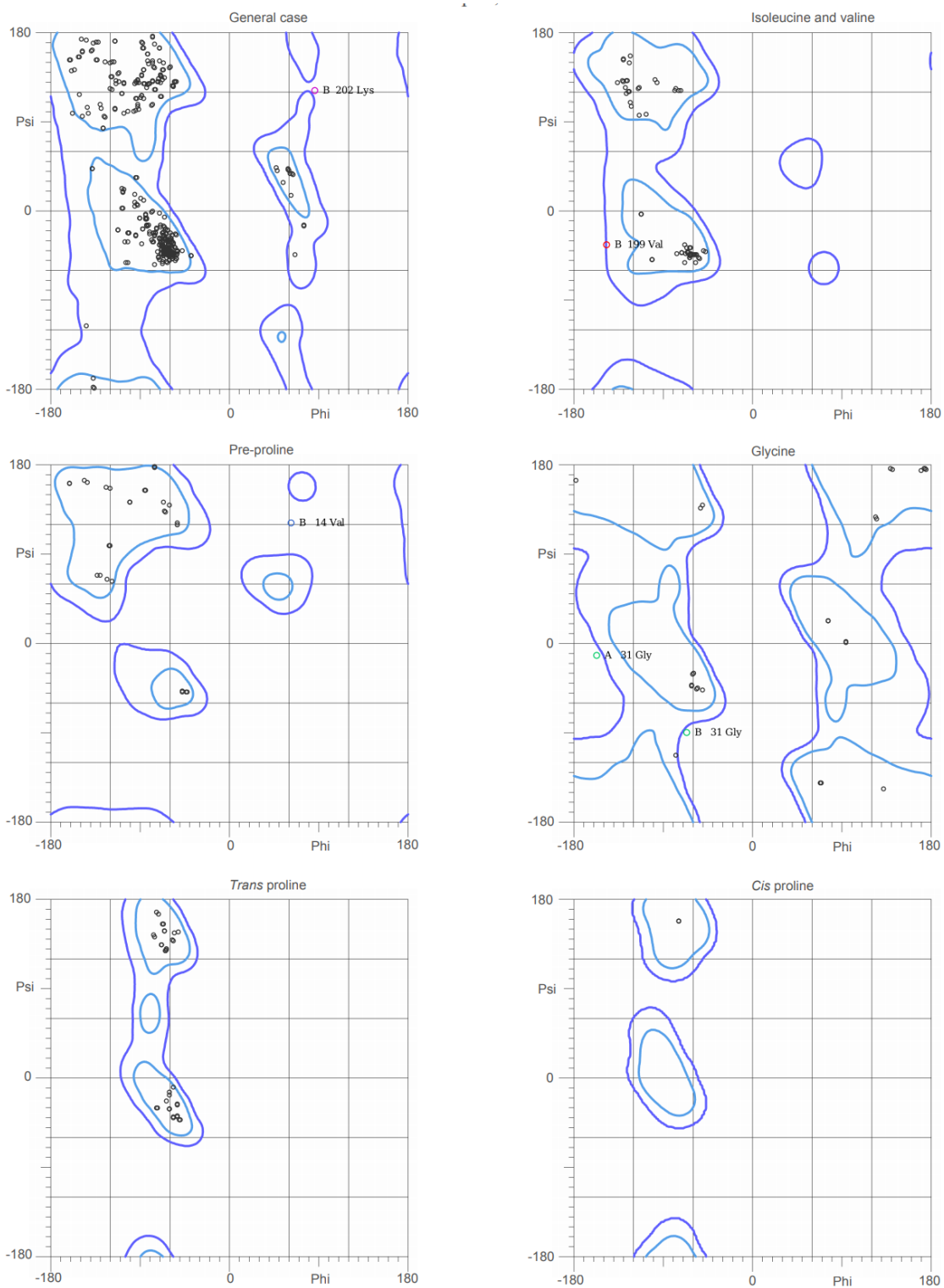


Рисунок 1. Карта Рамачандрана для остатков БОКО, полученная с помощью веб-сервиса MolProbity.

На основе полученных данных было отобрано несколько остатков, маргинальных по тому или иному параметру (табл. 1).

Таблица 1. Некоторые маргинальные по различным критериям остатки БОКО.

Аминокислотный остаток	Отклоняющийся от нормы параметр
B'LYS-202	Недопустимая область на карте Рамачандрана
A'LEU-118	Наложение ван-дер-ваальсовых радиусов

A'ARG-120	Наложение ван-дер-ваальсовых радиусов
A'LEU-121	Наложение ван-дер-ваальсовых радиусов
A'НОН-4240	Большое расстояние до атомов ближайшего остатка/воды
A'LEU-107	Затрудненная область на карте Рамачандрана
A'GLN-108	Сильное отклонение от ротамеров боковой цепи
A'GLU-110	Сильное отклонение валентных углов от теоретических значений
B'ASN-72	Возможная инверсия боковой цепи
B'PRO-251	Маргинал по параметр RSRZ

B'LYS-202 имеет значения углов  $\phi$  и  $\psi$  86.7 и 122.5 соответственно и является выбросом на карте Рамачандрана по всем типам аминокислот. При этом в самой структуре БОКО в цепи В все остатки с 194 по 202 включительно заменены на аланины, что является большой потерей данных. Они находятся на петле, выходящей на поверхность белка.

Для остатков A'LEU-118, A'ARG-120 и A'LEU-121 наблюдается сближенность (не критическая) с атомами остатков A'VAL-219, A'VAL-299 и A'LEU-103 соответственно на расстоянии 0.4-0.5 Å. Примечательно, что эти остатки находятся рядом друг с другом, поэтому, возможно, такое стерическое напряжение вполне оправдано.

A'LEU-107 имеет значения углов  $\phi$  и  $\psi$  равными -95.8 и 34.8 соответственно и лежит в затрудненной (но не недопустимой) области карты Рамачандрана по всем типам аминокислот. Для A'GLN-108 наблюдается сильное отклонение углов  $\chi$ : 240.8, 47.9 и 250.2. Значения валентных углов A'GLU-110 также существенно отклоняются от типичных значений (на 4.7  $\sigma$ ). Находятся эти остатки рядом друг с другом и на поверхности глобулы.

A'4240-НОН (рис. 2) находится на расстоянии 9-10 Å до ближайших атомов объекта БОКО, это расстоянием слишком велико для образования водородной связи, расстояние до атомов молекул соседних ячеек тоже слишком велико для образования водородных связей, поэтому присутствие этой молекулы воды подвергается сомнению.

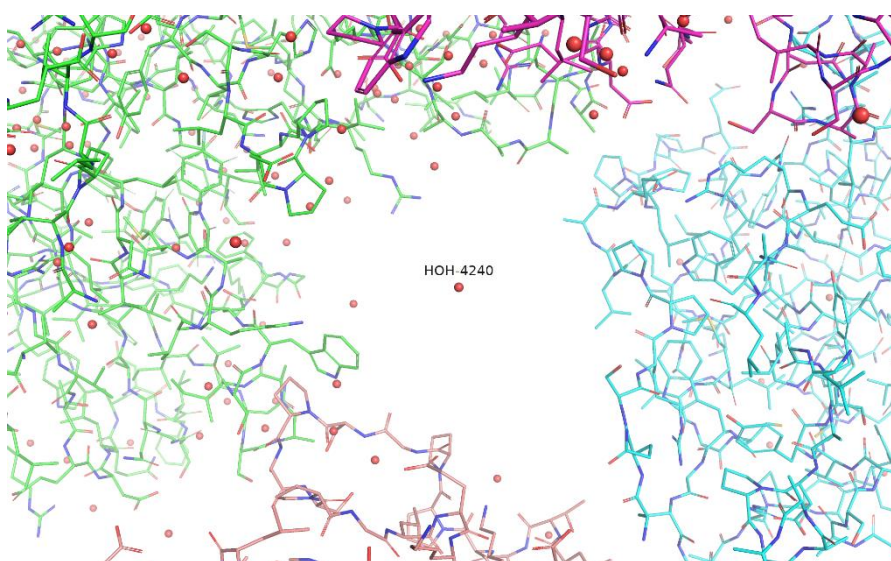


Рисунок 2. Визуализация молекулы НОН-4240 структуры БОКО (окрашено зеленым) и ее соседей в ближайших ячейках.

Возможна инверсия боковой цепи В'ASN-72. При ее исходной ориентации атом азота боковой цепи может образовать водняной мостик с (рис. 3А), а при инверсии – водородную связь с остовным кислородом остатка В'ALA-157 (рис. 3В).

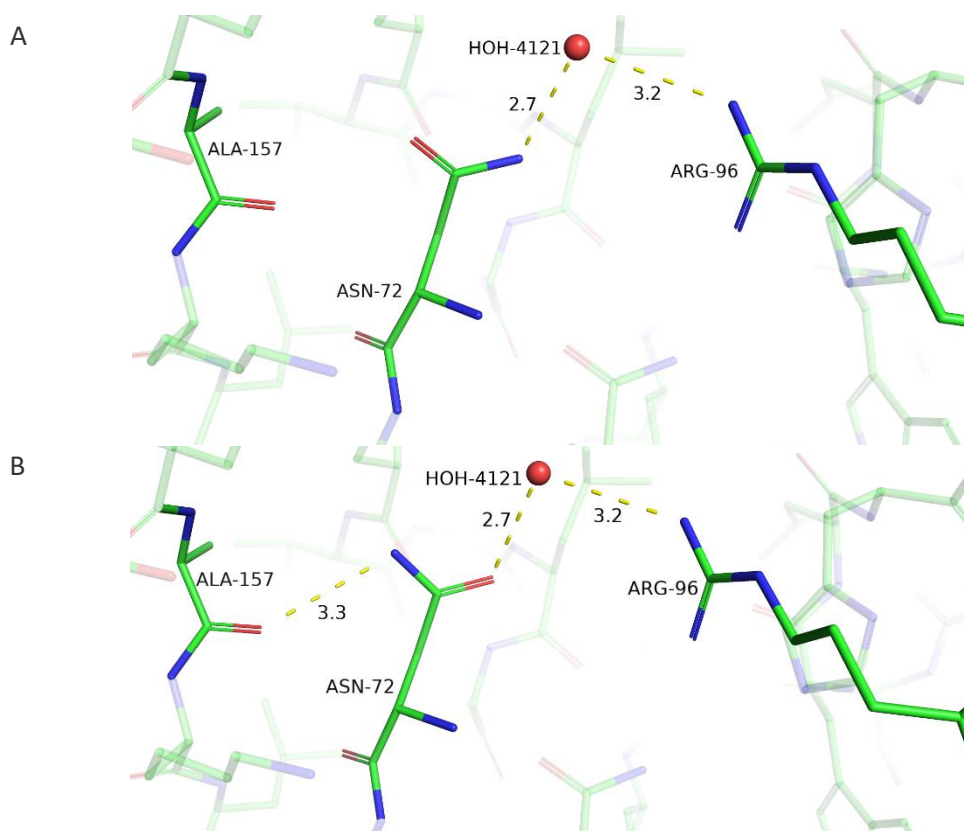
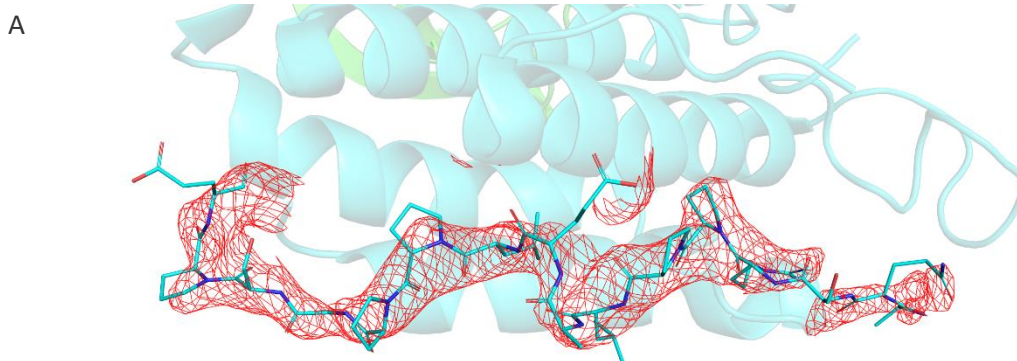


Рисунок 3. А: исходная ориентация В'ASN-72 и его окружение. В: инвертированная версия В'ASN-72 и его окружение.

Остаток В'PRO-251 является аутлаером по RSRZ. На самом деле, аутлаерами по этому параметру являются и его соседние остатки, а именно остатки 241-243, 235-246, 248, 250-253, 255-256 включительно. Их электронная плотность продемонстрирована на рисунке 4А при параметре level=1 (при level=2 электронная плотность была видна совсем плохо, в виде редких маленьких облачков). Скорее всего, такая картина электронной плотности и, соответственно маргинальность по RSRZ, связана с высокой подвижностью данного участка цепи (рис. 4В).



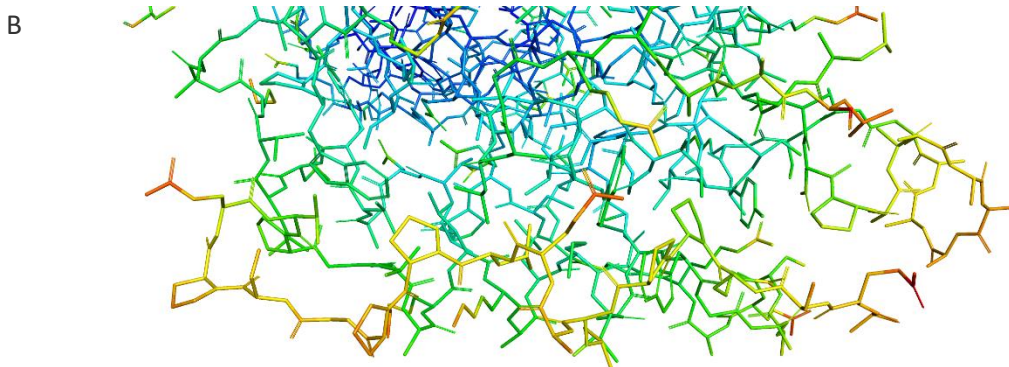


Рисунок 4. А: визуализация электронной плотности остатков 241-243, 235-246, 248, 250-253, 255-256 включительно (цепь В). В: покраска по В-фактору.

## Анализ 5 маргинальных остатков

### 33 Phe, цепь В

Данный остаток является аутлаером по следующим параметрам:

- 1) недопустимый угол между атомами C-N-CA (5.8  $\sigma$ )
- 2) цис-конформация
- 3) маргинал по RSRZ

Также, боковая цепь является разрешенным (но не предпочитаемым) ротамером ( $\chi$  углы: 331.2, 297.3). Маргинальность по RSRZ говорит о том, что этот остаток плохо вписывается в электронную плотность, остальные показатели индицируют о высокоэнергетической, невыгодной конформации остатка. Однако, возможных гидрофобных или стекинг-взаимодействий боковой цепи с окружением не было обнаружено. Расстояние до лиганда и боковых цепей аминокислот из окружения PHE-33 достаточно велико, чтобы данный остаток принял менее напряженную конформацию, однако этого не происходит. Помимо этого, боковая цепь PHE-33 плохо вписывается в электронную плотность. На рис. 5А изображена визуализация электронной плотности, и видно, что полигональная сетка электронной плотности, несмотря на довольно низкий уровень поверхности (level=0.5), представляет собой разрозненные, неправильной формы облачка, а не цельную структуру (такое низкое покрытие электронной плотностью можно объяснить тем, что данный фрагмент довольно подвижен (рис. 5В), и облако электронной плотности «размазалось»); также, чтобы ароматическое кольцо вписалось в эти облачка, необходимо, чтобы боковая цепь сильнее склонилась влево, а это привело бы к еще большему напряжению конформации. Таким образом, данная структура не вызывает доверия, скорее всего, это ошибка расшифровки.



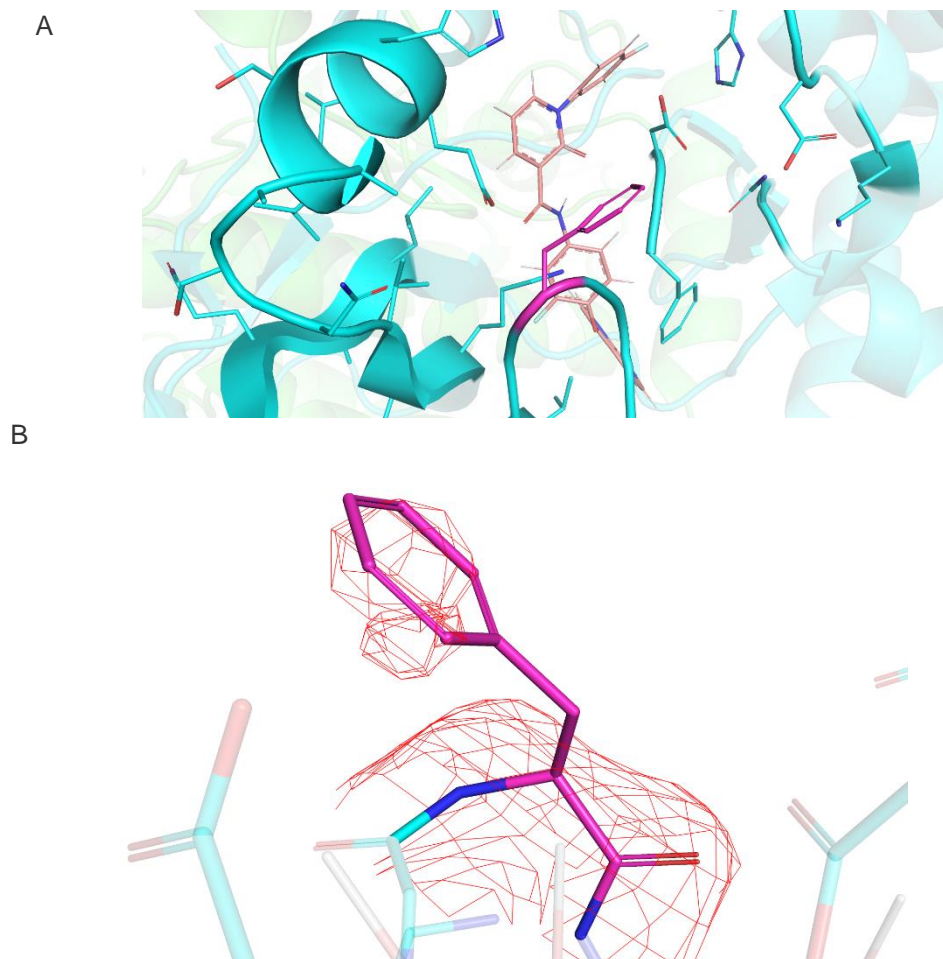


Рисунок 5. А: визуализация остатка В'PHE-33 (покрашено розовым) и его окружения (цепь В – голубая, ингибитор – оранжевый). В: визуализация электронной плотности остатка В'PHE-33 при level=0.5.

#### 14 Val, цепь В

Данный остаток является аутлаером по следующим параметрам:

- 1) недопустимый угол между атомами C-N-CA (5.1  $\sigma$ )
- 2) отклонение  $C_{\beta}$  на 0.31Å
- 3) нахождение в запрещенной зоне на карте Рамачандрана (pre-proline),  $\varphi=62.3$ ,  $\psi=122.7$

Непохоже, чтобы был какой-то фактор, строго фиксирующий положение VAL-14 с такими маргинальными значениями углов (рис. 6А), тем более что данный остаток находится в конце цепи и довольно подвижен по сравнению с окружающими его остатками (рис. 6В); казалось бы, строгих ограничений на положение остатка быть в таком случае не должно. Если говорить об электронной плотности (рис. 6С), то кажется, что если бы VAL-14 разместили ниже и правее, то он и в электронную плотность вписался бы лучше, и была бы возможность изменить значения углов на более типичные. Поэтому, скорее всего, речь идет об ошибке расшифровки.



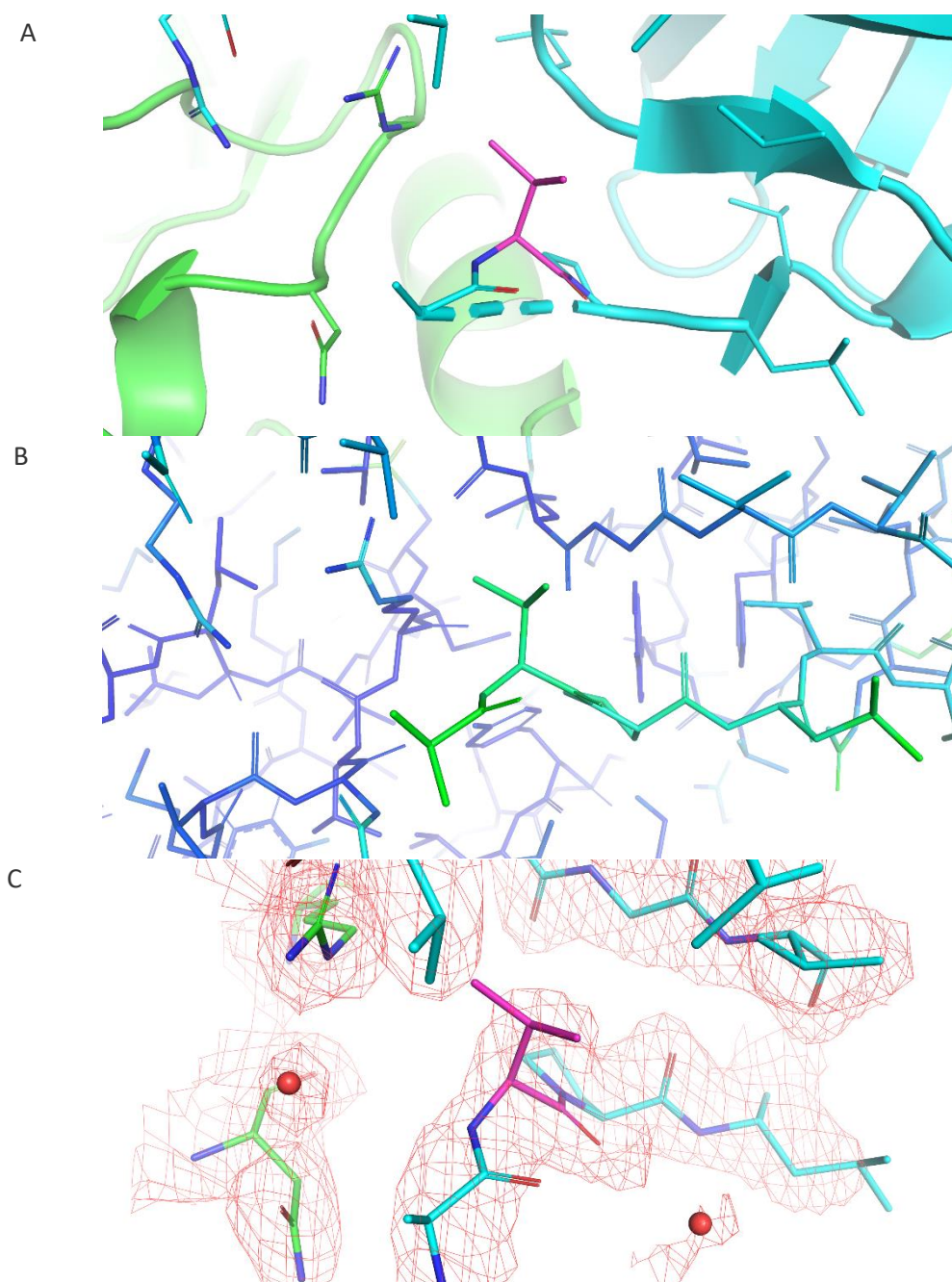


Рисунок 6. А: визуализация остатка В'VAL-14 (покращено розовим) и его окружения. В: покраска по В-фактору В'VAL-14 и его окружения. С: визуализация электронной плотности В'VAL-14 и его окружения при level=1.

### Asp-152, цепь А

- 1) недопустимый угол между атомами CA-CB-CG (5.8  $\sigma$ )
- 2) запрещенный ротамер ( $\chi$  углы: 95.5, 340.9)

Также, данный остаток находится в разрешенной (но не предпочитаемой) области карты Рамачандрана ( $\varphi = -76.9$ ,  $\psi = 179.3$ ). Если рассмотреть окружение ASP-152, то окажется что боковая цепь данного остатка ориентирована в сторону остова остатков 154-156. Скорее всего, остовные атомы азота данных остатков образуют водородные связи с кислородом

боковой цепи ASP-152 (рис. 7A). Эти связи слабые из-за неудобных углов, однако их три, поэтому они могут удерживать ASP-152 в текущем положении. Другой атом кислорода боковой цепи ASP-152 может образовывать водородную связь с молекулой воды. Также, этот остаток хорошо вписывается в электронную плотность (рис. 7B). Суммируя вышесказанное, можно утверждать, что маргинальность остатка ASP-152 по некоторым признакам не является ошибкой расшифровки.

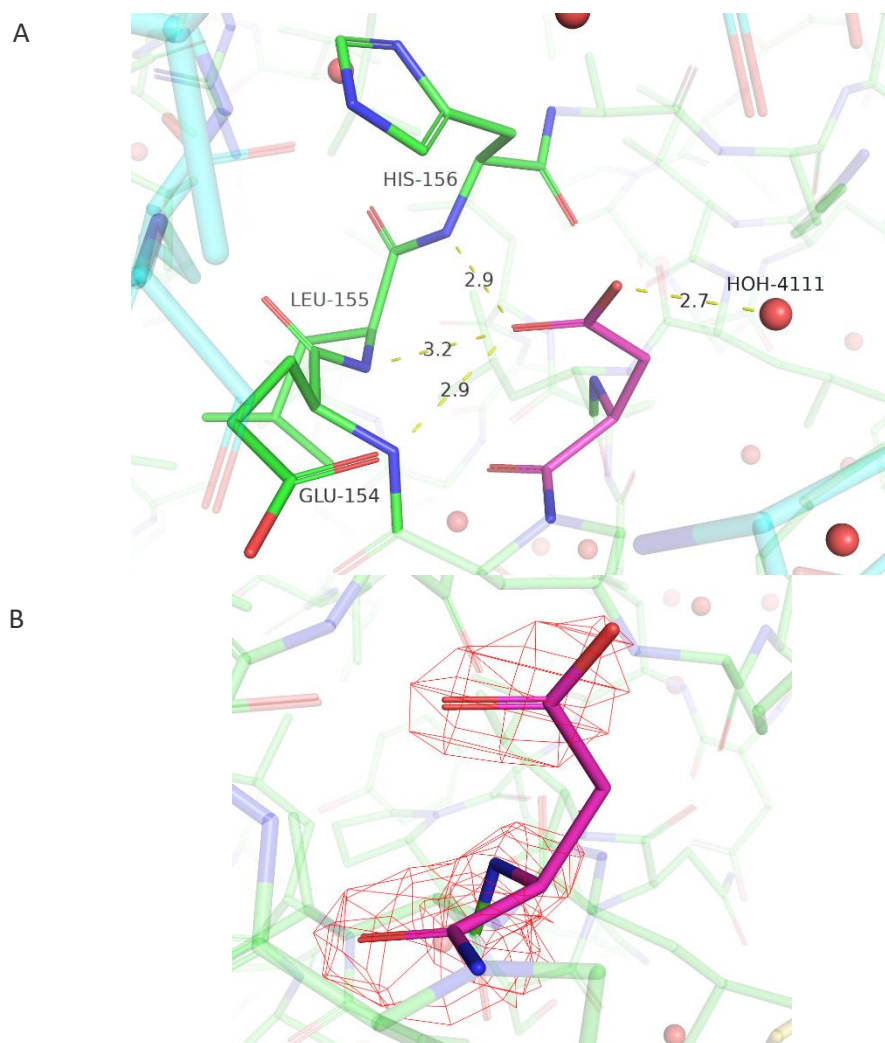


Рисунок 7. А: визуализация остатка А' ASP-152 (покрашено розовым) и его окружения; желтым пунктиром обозначена водородная связь. В: визуализация электронной плотности А' ASP-152 при level=3.

### Leu-227, цепь В

- 1) запрещенный ротамер ( $\chi$  углы: 195.5, 105.3)
- 2) маргинал по RSRZ

Непохоже, чтобы боковая цепь данного остатка вступала в какие-либо взаимодействия со своим окружением, которые строго закрепляли бы ее в положении запрещенного ротамера (рис. 8A). В свою электронную плотность (рис. 8B) он, в целом, вписывается (хотя лучше бы вписался, располагаясь остаток чуть дальше от глобулы), но она была детектирована на достаточно низком уровне (level=0.5). Данный остаток находится в конце цепи на поверхности белка и весьма подвижен (рис. 8C), что объясняет трудность

детекции электронной плотности в этой области, а также не предполагает строгой фиксации LEU-227 в виде запрещенного ротамера. Кажется, что в данном случае речь идет об ошибке расшифровки.

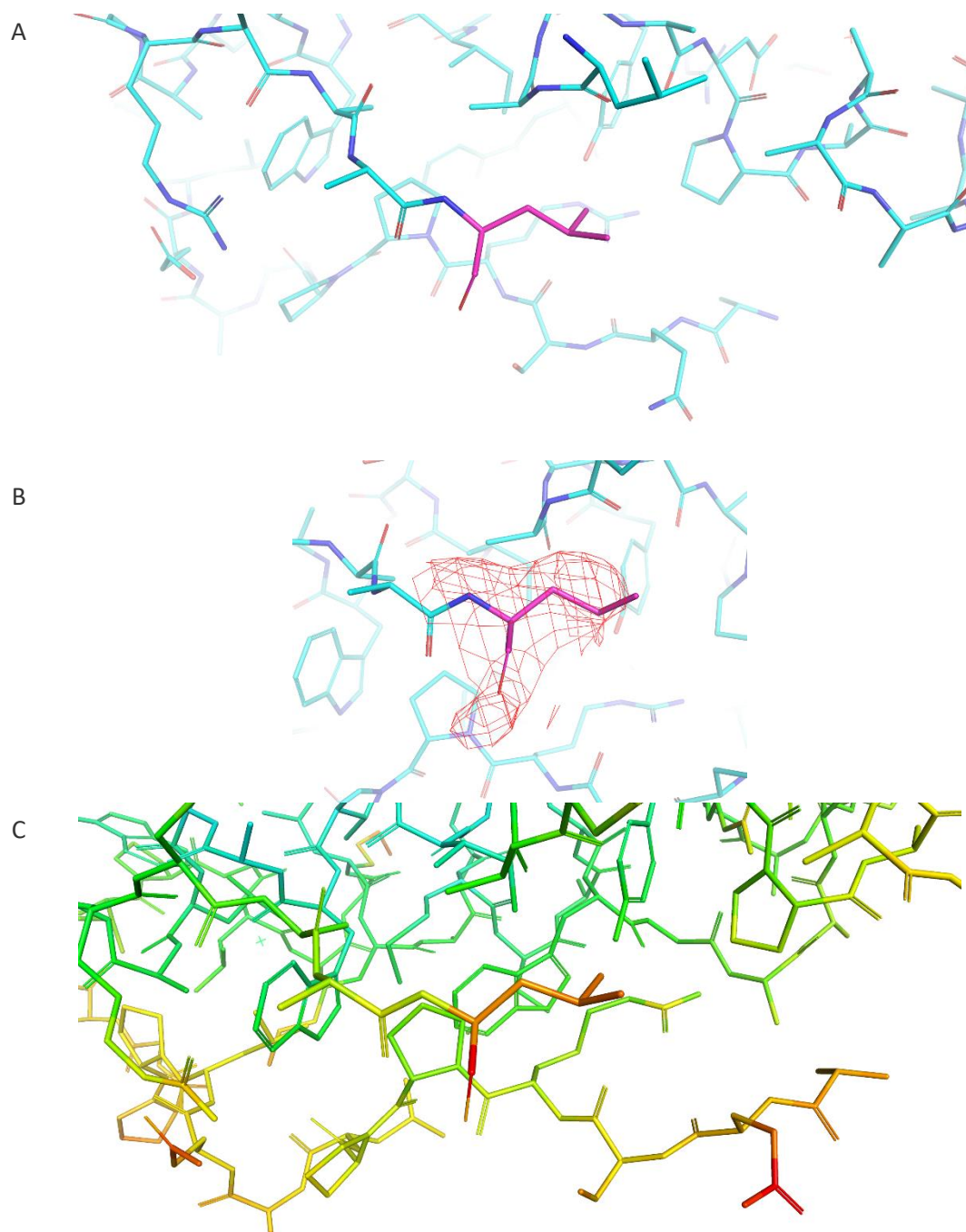


Рисунок 8. А: визуализация остатка В'LEU-227 (покрашено розовым) и его окружения. В: визуализация электронной плотности В'LEU-227 при level=0.5. С: покраска по В-фактору В'LEU-227 и его окружения.

### Glu-71, цепь В

- 1) запрещенный ротамер ( $\chi$  углы: 197.9, 226.1, 292)

Данный остаток, судя по всему, образует солевой мостик с ARG-96 и взаимодействует через водяной мостик с ASN-72 (рис. 9); аулаером по RSRZ данный остаток не является, то

есть в свою электронную плотность нормально вписывается. Поэтому маргинальность ротамера оправдана, это не ошибка расшифровки.

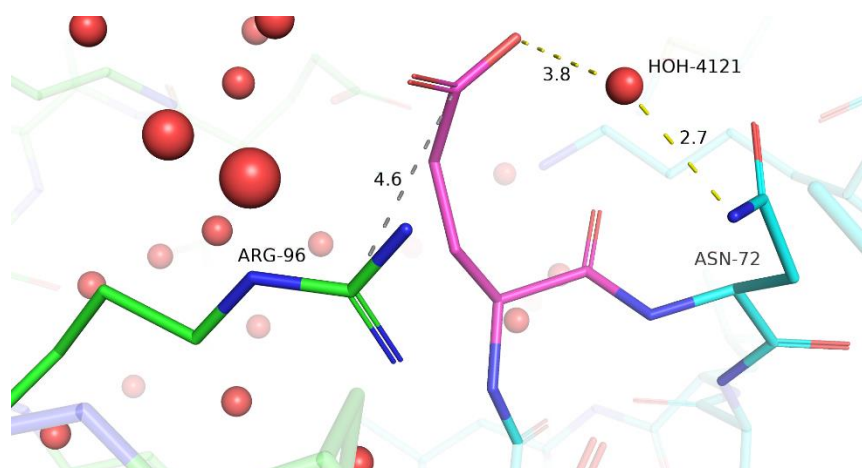


Рисунок 9. Визуализация остатка B'GLU-71 (покрашено розовым) и его окружения; желтым пунктиром обозначена водородная связь, серым – солевой мостик.

## Сравнение модели из PDB с моделью из PDB\_redo

Значение R-фактора для оптимизированной модели PDB\_redo [5] немного улучшилось (0.1743), значение R-free и торсионных углов почти не изменилось, а качество ротамеров немного улучшилось (рис. 10). Получается, что в целом разница между рассматриваемой моделью БОКО и оптимизированной не так существенна. 32 остатка в оптимизированной модели были вписаны в электронную плотность лучше, 4 – хуже. Так, например, ни для одного из пяти маргинальных остатков, анализированных выше, вписанность в электронную плотность не претерпела серьезных изменений.

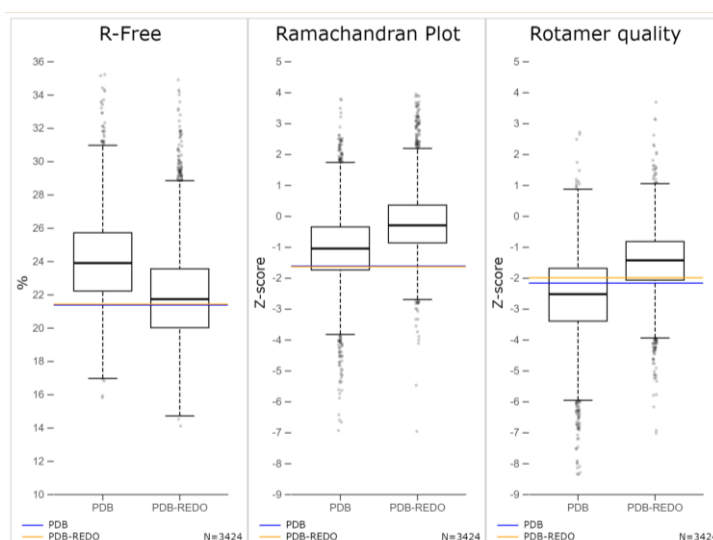


Рисунок 10. Сравнение критериев качества модели из PDB и PDB\_redo.

# Заключение

В целом видно, что разница между моделями из PDB и PDB\_redo незначительная. Относительно высокое количество RSRZ аутлаеров в БОКО может объясняться высокой подвижностью этих остатков (среднее значение b-фактора БОКО довольно большое и составляет 61.87, тогда как, согласно документации веб-сервиса WHAT\_CHECK [6], обычно для белков это значение составляет 10-20), так как это смазывает картину электронной плотности. Значение R-фактора хорошее. Хотя и есть остатки, находящиеся в запрещенной зоне карты Рамачандрана, более 90% остатков находятся в предпочитаемой зоне, что хорошо. Есть потеря данных в виде замены остатков 194-202 цепи В на аланины, есть плохие необъясненные ротамеры. Модель оцениваю на 4.

## Ссылки на литературу

1. Chen, W., Zhou, Z., Li, S., Zhong, C. Q., Zheng, X., Wu, X., Zhang, Y., Ma, H., Huang, D., Li, W., Xia, Z., and Han, J. (2013) Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling. *J. Biol. Chem.* 288, 16247–16261.
2. Yang, Y., Jiang, G., Zhang, P., and Fan, J. (2015) Programmed cell death and its role in inflammation. *Mil. Med. Res.* 2, 1–12.
3. Hart, A. C., Abell, L., Guo, J., Mertzman, M. E., Padmanabha, R., Macor, J. E., Chaudhry, C., Lu, H., O'Malley, K., Shaw, P. J., Weigelt, C., Pokross, M., Kish, K., Kim, K. S., Cornelius, L., Douglas, A. E., Calambur, D., Zhang, P., Carpenter, B., and Pitts, W. J. (2020) Identification of RIPK3 Type II Inhibitors Using High-Throughput Mechanistic Studies in Hit Triage. *ACS Med. Chem. Lett.* 11, 266–271.
4. Williams, C. J., Headd, J. J., Moriarty, N. W., Prisant, M. G., Videau, L. L., Deis, L. N., Verma, V., Keedy, D. A., Hintze, B. J., Chen, V. B., Jain, S., Lewis, S. M., Arendall, W. B., Snoeyink, J., Adams, P. D., Lovell, S. C., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2018) MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Sci.* 27, 293–315.
5. Joosten, R. P., Joosten, K., Murshudov, G. N., and Perrakis, A. (2012) PDB-REDO: Constructive validation, more than just looking for errors. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 68, 484–496.
6. Hooft RW, Vriend G, Sander C, and Abola EE. (1996) Errors in Protein structures. *Nature* 381, 272.