

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**имени М.В.ЛОМОНОСОВА**

---

***ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ***

# Отчет о качестве расшифровки результатов РСА белка AhpE

**Отчет студента 4-го курса**

**Зинкевича Арсения Олеговича**

**Москва, 2019**

# Содержание

<b>Аннотация</b>	<b>3</b>
<b>Введение</b>	<b>3</b>
Структура	4
<b>Результаты и обсуждение</b>	<b>4</b>
Общая информация о модели	4
Индикаторы качества модели	6
Анализ маргинальных остатков	9
PDB-redo	12
<b>Заключение</b>	<b>12</b>
<b>Ссылки</b>	<b>12</b>

# Abstract

В этой работе был проведен анализ качества расшифровки структуры белка AhpE, выделенного из *Mycobacterium tuberculosis*. В анализе были произведены описание основных показателей качества и их проверка, а также были рассмотрены некоторые маргинальные аминокислотные остатки.

## Введение

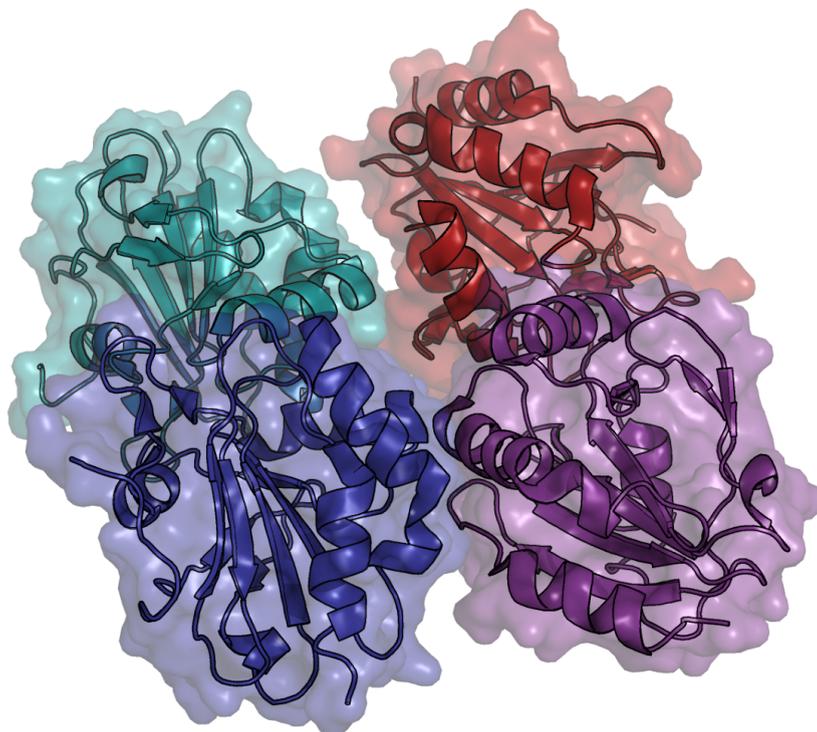
Пероксиредоксины являются одним из ключевых компонентов бактериальной системы защиты от окислительного стресса [1]. В туберкулезной палочке *Mycobacterium tuberculosis* семейство пероксиредоксинов представляет 1-цистеинпероксиредоксин, также известный как алкилгидропероксидредуктаза E (alkylhydroperoxide reductase E, **AhpE**). Этот белок также выделяют в качестве потенциальной мишени для лекарств [1].

AhpE - это тиолспецифичная пероксидаза, катализирующая восстановление перекиси водорода и органических гидропероксидов до воды или спирта, соответственно [1,2]. Фермент особенно эффективен против пероксинитрита, который формируется активированными макрофагами в процессе инфицирования [2].

В активном центре находится консервативный остаток цистеина (Cys<sub>P</sub>), который производит нуклеофильную атаку на субстрат-пероксид. Пероксид окисляет Cys<sub>P</sub>-SH группу до цистеинсульфеновой кислоты Cys<sub>P</sub>-SOH, которая затем реагирует с еще одним остатком цистеина (Cys<sub>R</sub>), формируя тем самым дисульфидный мостик. После этого дисульфид восстанавливается соответствующим донором электронов для завершения каталитического цикла [2].

## Структура

Рассмотренная в этой работе структура с PDB ID 5ID2 была получена в работе [1] для подтверждения структуры того же белка, полученной с помощью ЯМР. Также было показано, что белок в нативной форме имеет структуру, состоящую из двух субъединиц [1] (Рисунок 1).



*Рисунок 1.* Изображение кристаллической единицы (двух биологических единиц) белка AhpE в структуре PDB ID 5ID2.

## Результаты и обсуждение

Был проанализирован файл PDB с идентификатором 5ID2, содержащий результаты рентгеноструктурного анализа белка AhpE.

### Общая информация о модели

В записи содержится информация о 4 цепях белка AhpE с идентичной аминокислотной последовательностью - А, В, С и D. Каждая цепь содержит 164 аминокислотных остатка. При этом

известно, что биологическая единица этого белка содержит только 2 цепи [1]. Можно заключить, что запись содержит комплекс из 2 биологических единиц белка.

Цепи белка A и D содержат модификацию остатка цистеина (Cys<sub>p</sub>-SOH).

Помимо белка комплекс содержит:

- Анионы уксусной кислоты,
- Молекулы глицерина.

Структура была загружена в RCSB PDB 23.02.2016 и опубликована 03.08.2016 авторами Kumar, A., Balakrishna, A.M., Gruber, G.

Запись относится к статье [1]: "Redox chemistry of Mycobacterium tuberculosis alkylhydroperoxide reductase E (AhpE): Structural and mechanistic insight into a mycoredoxin-1 independent reductive pathway of AhpE via mycothiol".

Для решения фазовой проблемы использовался метод молекулярного замещения с помощью программы PHASER; замещали из другой структуры того же белка AhpE (PDB ID 1XXU).

В эксперименте было измерено 26336 рефлексов.

Разрешение структуры - 2.43 Å.

- Диапазон разрешений структурных факторов: 29.94 Å - 2.43 Å.
- Полнота набора структурных факторов: 99.6%

Параметры кристаллографической ячейки:

- $a = b = 146.9 \text{ Å}$ ;  $c = 33.6 \text{ Å}$ ;
- $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ .

Кристаллическая ячейка содержит 4 молекулы белка (2 его биологические единицы).

Группа симметрии белка - C2 (димер, полученный поворотом субъединицы на 180°).

Группа симметрии кристалла -  $P4_2$ . Такую же группу симметрии имеют еще 114 структур.

## Индикаторы качества модели

Чтобы оценить, насколько хорошо был проведен анализ, были рассмотрены основные показатели качества модели (Рисунок 2) [4].

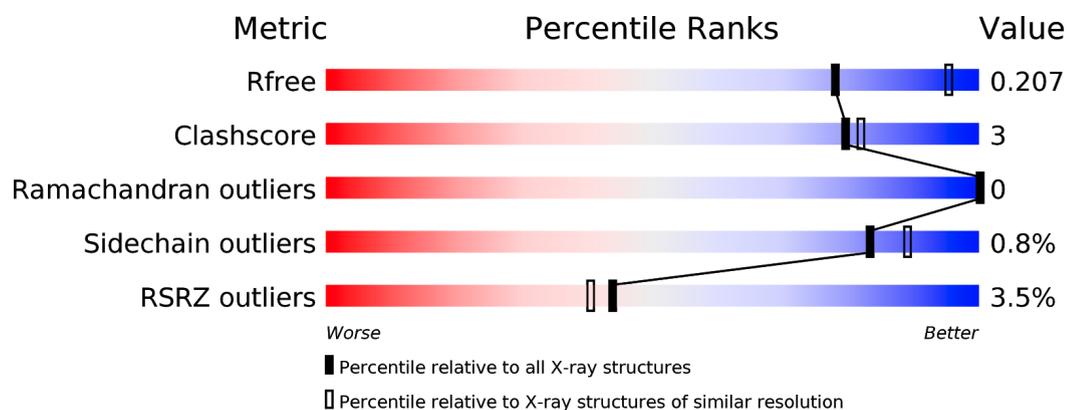


Рисунок 2. Основные показатели качества модели [3].

Таблица 1. Значения R-факторов и R-free для полученной структуры.

Фактор	Depositor	DCC
R-factor	0.187	0.191
R-free	0.205	0.207
R=free test set	1387 reflections (5.00%)	

Разница между R и R-free составляет ~9% от R, из чего нельзя отвергнуть предположение о том, что модель оказалась переоптимизирована.

Также в структуре было найдено 22 остатка с  $RSRZ \geq 2.0$ , что составило 3% от общего количества остатков в структуре [4]. По этому показателю качество структуры можно оценить как “ниже среднего”.

В дальнейшем анализе был использован сервис MolProbity [5].

После добавления атомов водорода рассчитанный clashscore (число недопустимых наложений атомов на 1000) оказался равен 3.43, что входит в 97-й перцентиль (97% структур обладают большим clashscore, чем эта). По данному критерию структура оказалась достаточно качественной.

Далее была произведена оценка белковой геометрии (Таблица 2).

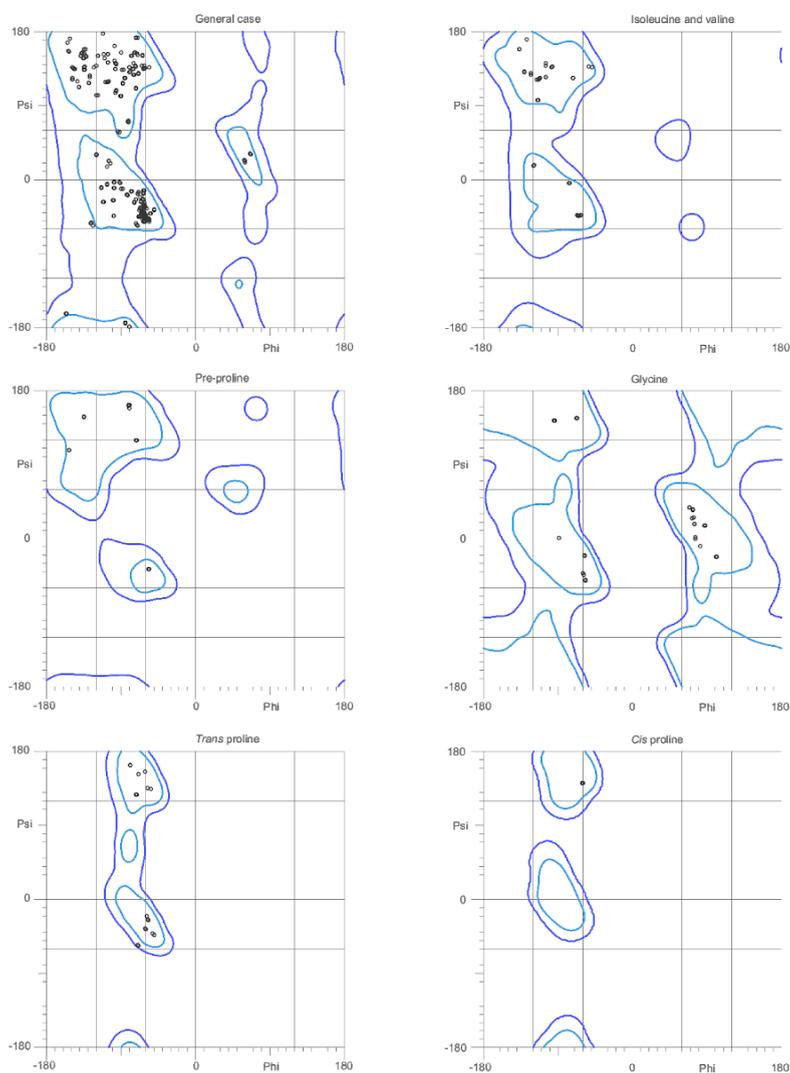
Таблица 2. Оценка белковой геометрии сервисом MolProbity [5].

Показатель	Значение		Оценка качества (MolProbity)
Poor rotamers	1	0.39%	Goal: <0.3%
Favored rotamers	249	96.51%	Goal: >98%
Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
Ramachandran favored	297	97.70%	Goal: >98%
MolProbity score <sup>^</sup>	1.18		99th percentile* (N=27675, 0Å - 99Å)
C $\beta$ deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0
Bad bonds:	0 / 2569	0.00%	Goal: 0%
Bad angles:	0 / 3504	0.00%	Goal: <0.1%

В структуре присутствует 1 “плохой” ротамер; это мало говорит о ее качестве, а также не присутствует ни одного маргинального (по карте Рамачандрана) аминокислотного остатка, что может говорить как о высоком качестве, так и о переоптимизации структуры. Карты

Рамачандрана, полученные с помощью сервиса MolProbity приведены на Рисунке 3 [5].

В структуре также не было обнаружено значительных отклонений положений  $C_{\beta}$ , углов или длин связей от нормальных значений.



*Рисунок 3.* Карты Рамачандрана для различных типов аминокислотных остатков. Изображение получено с помощью сервиса MolProbity [5].

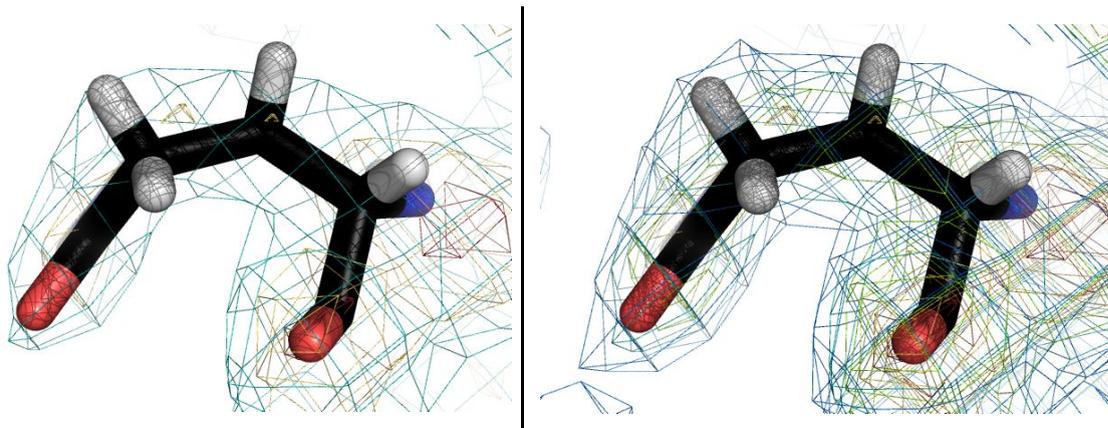
## Анализ маргинальных остатков

Ниже приводится несколько маргинальных остатков, определенных по различным критериям (Таблица 3).

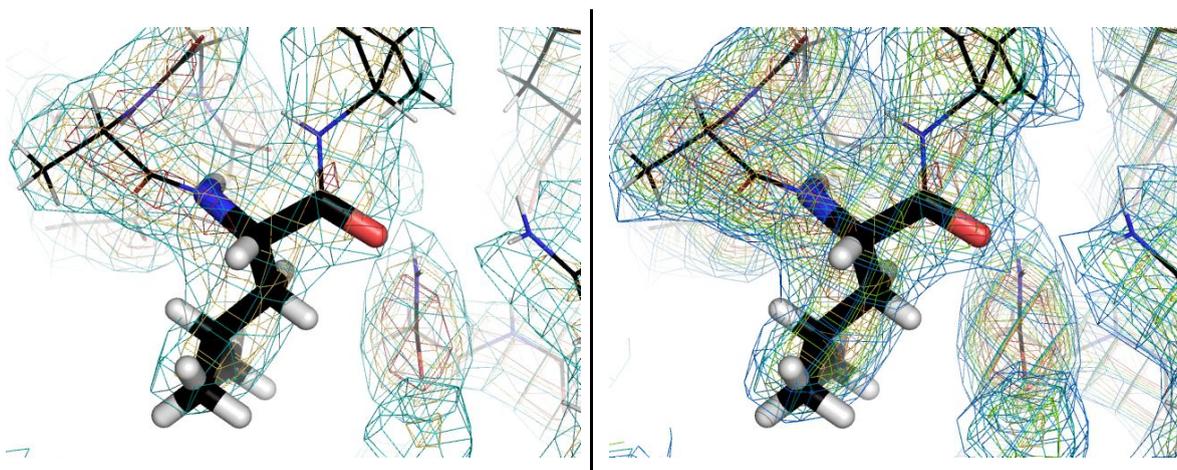
Таблица 3. Маргинальные остатки в структуре белка AhpE (PDB ID 5ID2).

Цепь	Остаток	Критерий
A	Gln 141	Плохой ротамет ( $\chi$ : 145.7,272.1,137.7)
A	Leu 151	CaBLAM disfavored (3.415%)
A	Glu 48	Высокий Clashscore (0.82Å; перекрытие атома O с атомом HG2 остатка BGln 51 цепи A)
A	Glu 137	Высокий Clashscore (0.68Å; перекрытие атома O с атомом NH2 остатка AArg 116 цепи A)
A	Ala 29	Ramachandran allowed (1.51%), CaBLAM disfavored (4.198%)
A	Arg 116	Высокий Clashscore (0.68Å; перекрытие атома NH2 с атомом O остатка Glu 137 цепи A); CaBLAM Disfavored

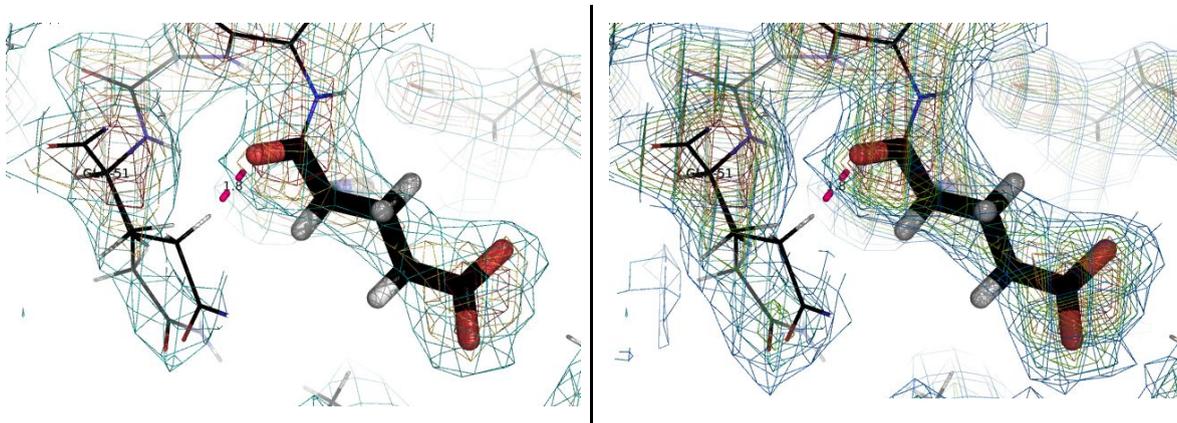
Эти аминокислотные остатки были рассмотрены более подробно. Электронная плотность для них была визуализирована на уровнях от  $1\sigma$  до  $3\sigma$  с шагом  $1\sigma$  и от  $0.5\sigma$  до  $3\sigma$  с шагом  $0.5\sigma$  (левые и правые изображения, соответственно).



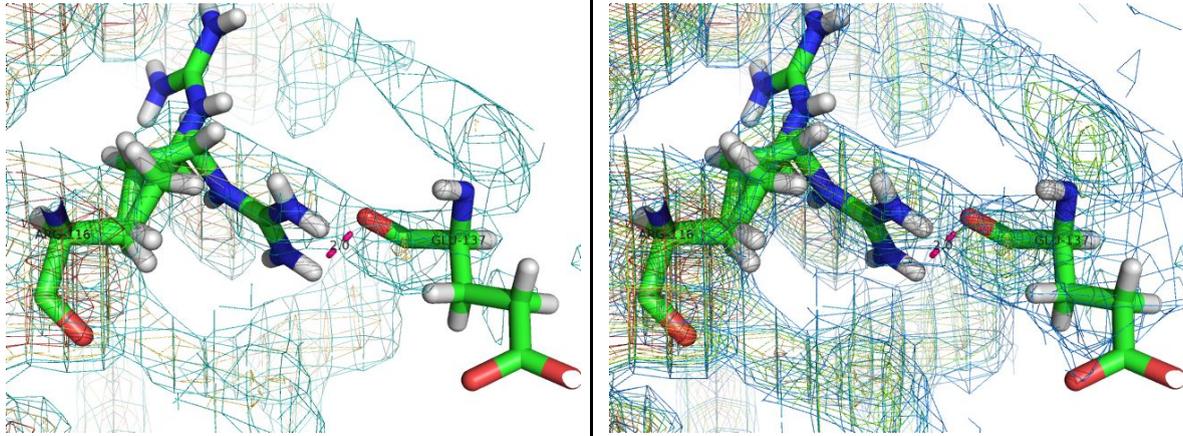
**Рисунок 4.** Иллюстрация остатка Glu 141. Видно, что пики электронной плотности (подрезка  $2\sigma$ ) не соответствуют положениям атомов.



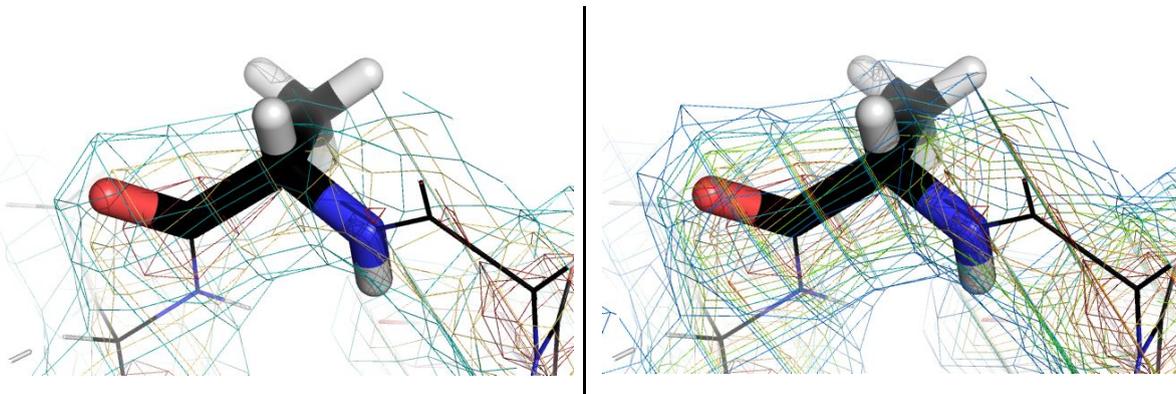
**Рисунок 5.** Иллюстрация остатка Leu 151. Заметно необычное положение остова, которое, тем не менее, хорошо согласуется с электронной плотностью. Скорее всего, этот остаток является особенностью структуры.



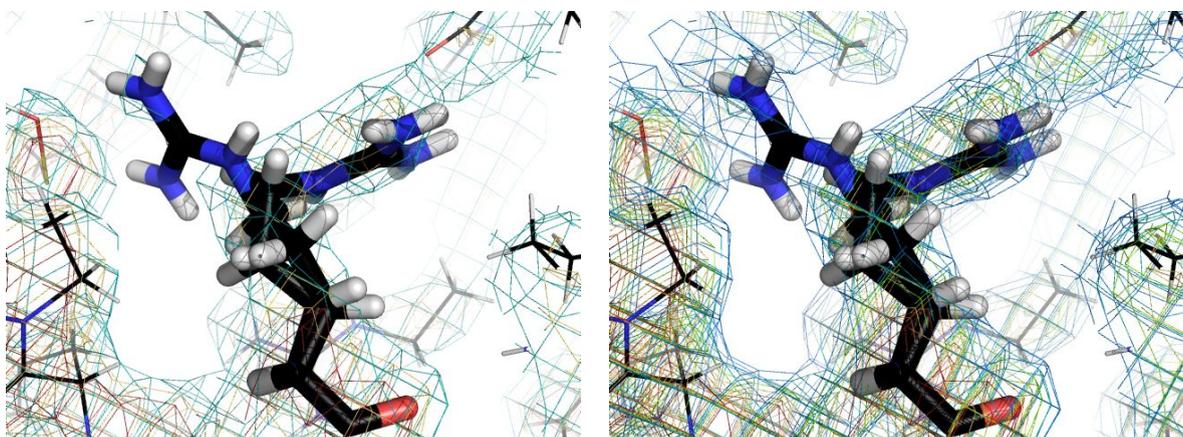
**Рисунок 6.** Иллюстрация остатка Glu 48. Высокий Clashscore обусловлен некорректной альтернативной конформацией остатка Glu 51.



*Рисунок 7.* Иллюстрация остатка Glu 137. Боковая цепь остатка практически не поддерживается электронной плотностью, чем может быть обусловлен высокий Clashscore.



*Рисунок 8.* Иллюстрация остатка Ala 29. Нехарактерная конформация остова согласуется с электронной плотностью, однако атом  $C_{\beta}$  практически не покрыт ей.



*Рисунок 9.* Иллюстрация остатка Arg 116. Одна из конформаций остатка плохо поддерживается электронной плотностью; другая пересекается с Glu 137 и тоже не очень качественно ложится в электронную плотность.

## PDB-redo

К несчастью, сервис на данный момент не работает.

## Заключение

Можно сказать, что структура смоделирована достаточно хорошо. По большей части показателей она входит в top 25% структур в PDB. Несмотря на это, в структуре присутствует достаточно большое количество аминокислотных остатков с  $RSRZ \geq 2.0$  (3%). Это может указывать на то, что исследователи при составлении структуры давали бóльшее предпочтение конформационным характеристикам, чем непосредственному соответствию электронной плотности.

Несмотря на наличие ряда недостатков, структура, в особенности с учетом цели ее получения (для подтверждения результатов ЯМР-анализа) имеет весьма хорошее разрешение и качество обработки.

## Ссылки

- [1] <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.07.007>
- [2] <https://doi.org/10.1021/bi901221s>
- [3] <http://www.rcsb.org/structure/5ID2>
- [4] [http://files.rcsb.org/pub/pdb/validation\\_reports/id/5id2/5id2\\_full\\_validation.pdf](http://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/id/5id2/5id2_full_validation.pdf)
- [5] <http://molprobity.biochem.duke.edu/>