

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА**

---

**ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ**

**Качество расшифровки структуры ферредоксина  
T.elongatus ВР-1, полученной методом РСА.**

**Отчет студентки 4-го курса  
Корзиной Анастасии Сергеевны**

**Москва 2017 г.**

## 1. АННОТАЦИЯ

В данной работе проводится анализ качества расшифровки структуры белка ферредоксина *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (PDB ID: 5AUI) с помощью веб-сервисов для оценки качества расшифровки, таких как MolProbity и EDS. Также используется отчет по валидации, предоставленный авторами структуры на сайте PDB.

## 2. ВВЕДЕНИЕ

Белок ферредоксин содержит железосерный кластер и является одноэлектронным переносчиком. Ферредоксин находится в мембране хлоропластов, где восстанавливается фотосистемой I и окисляется ферредоксин-НАДН<sup>+</sup>-редуктазой (ФНР). Взаимодействие ФНР и ферредоксина являлось предметом интереса авторов структуры ферредоксина. [1] Для получения данных по молекулярной динамике этих двух белков использовался ядерно-магнитный резонанс. В связи с тем, что железо мешает проведению анализа этим методом, оно было замещено на галлий. Данные, полученные с помощью рентгеноструктурного анализа на нативном ферредоксине (с железом), использовались для контроля ЯМР-данных.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

#### 3.1. Общая информация о модели

Структура ферредоксина *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (PDB ID: 5AUI) была опубликована в PDB 21 апреля 2015 авторами Kurisu, G., Shinmura, K. В том же году вышла статья «X-ray Structure and Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Interaction Sites of the Ga-Substituted Cyanobacterial Ferredoxin»[1], описывающая получение структуры ферредоксина и методом рентгеноструктурного анализа, и методом ядерно-магнитного резонанса. Авторы статьи Mutoh, R., Muraki, N., Shinmura, K., Kubota-Kawai, H., Lee, Y.H., Nowaczyk, M.M., Rogner, M., Hase, T., Ikegami, T., Kurisu, G.

Ферредоксин *T.elongatus* (PDB ID: 5AUI) – мономер. В структуре кроме белковой молекулы присутствуют гетероатомы: сульфид железа, бензамидин и вода.

Фазовая проблема была решена методом молекулярного замещения. В качестве стартовой модели использовалась структура ферредоксина *Leptolyngbya boguana* (PDB ID: 3B2G). Измерено 15400 рефлексов, в файле приведено 15121. Максимальное разрешение 1,50 Å, оно и является общим разрешением файла. Минимальное разрешение 32,25 Å. Полнота набора структурных факторов 98,2 %.

Параметры кристаллографической ячейки:

- длины направляющих векторов кристалла:  
 $a = 56,441 \text{ \AA}$ ,  $b = 53,314 \text{ \AA}$ ,  $c = 32,278 \text{ \AA}$
- углы между направляющими векторами кристалла:  
 $\alpha = 90,00^\circ$ ,  $\beta = 92,38^\circ$ ,  $\gamma = 90,00^\circ$

Кристаллографическая группа: C 1 2 1 (сокращенно C2; моноклинная базоцентрированная сингония). Некристаллографические симметрии в асимметрической ячейке отсутствуют.

### 3.2. Значения индикаторов качества модели в целом

Качество модели определяется параметром R-фактор, который для хорошей модели должен быть  $< 0,2$ . У данной модели ферредоксина R-фактор = 0,172, что говорит о том, что модель оптимизирована. При расчете R-фактора 5% всех рефлексов (в данном случае 751 рефлекс из 15121) не используются, чтобы впоследствии на них посчитать свободный R-фактор ( $R_{free}$ ), который служит контролем оптимизации и позволяет выявить переоптимизацию. У хорошей модели  $(R_{free} - R) < 0,1$ . Данная модель проходит по этому критерию с  $R_{free} = 0,193$  и  $(R_{free} - R) = 0,021$ .

Рисунок 1 с оценкой качества модели показывает, что модель очень хорошая. Притом она хорошая и среди моделей с таким же разрешением.

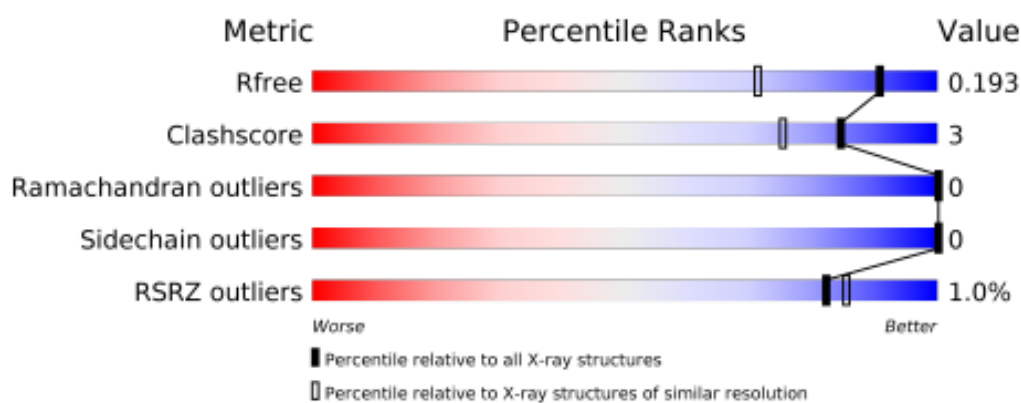


Рис.1. Оценка качества модели, представленная на странице модели в PDB[4]. Синее стороне соответствуют хорошие модели.

Далее анализ проводился с помощью веб-сервиса MolProbity[2]. В модель были добавлены водороды, для выявления недопустимых наложений атомов. Затем модель была проверена на наличие инверсий боковых цепей Asn, Gln, His; инверсии не были обнаружены. Следующим шагом были построены карты Рамачандрана, по которой определяются маргинальные остатки. Также было проверено наличие маргиналов по отклонению боковых цепей от ротамеров. Сводная таблица всех исследуемых характеристик представлена на рисунке 2.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	2.67	98 <sup>th</sup> percentile* (N=598, 1.50Å ± 0.25Å)	
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	0	0.00%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	84	98.82%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	91	98.91%	Goal: >98%
	MolProbity score <sup>^</sup>	1.05	99 <sup>th</sup> percentile* (N=4836, 1.50Å ± 0.25Å)	
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0
	Bad bonds:	2 / 776	0.26%	Goal: 0%
	Bad angles:	3 / 1055	0.28%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 4	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%

Рис.2. Результат анализа контактов и геометрии для структуры ферредоксина T.elongatus .

Модель практически идеально описывает экспериментальные данные. Clashscore такой, что у 98% моделей с таким же разрешением он ниже. MolProbity score такой, что у 99% моделей с таким же разрешением он ниже. Отсутствуют остатки, находящиеся в запрещенной области карт Рамачандрана (Рис.3). Неудовлетворительно описаны моделью только две плохих связи и три плохих угла. Маргинальные остатки представлены в таблице 1.

Табл.1. Перечень всех хоть сколько-то маргинальных остатков.

Номер цепь	Тип остатка	Признак маргинальности
A 30	GLU	Разрешенная зона для ротамеров
A 39	SER	Разрешенная зона карт Рамачандрана
A 86	A CSO	Угол между связями CB-SG-OD
A 86	B CSO	Длина связи SG--OD
A 101	FES	Угол между связями S1-FE2-S2 Длина связи S1--FE1
A 27, A41	ASP, ARG	Взаимное перекрывание OG, NH2
A 46, A 64	SER, PHE	Взаимное перекрывание HB3, SE1
A 54, A 87	GLU, LYS	Взаимное перекрывание HG2, HB3
A 62, A 76	GLN, LEU	Взаимное перекрывание HB2, HD12

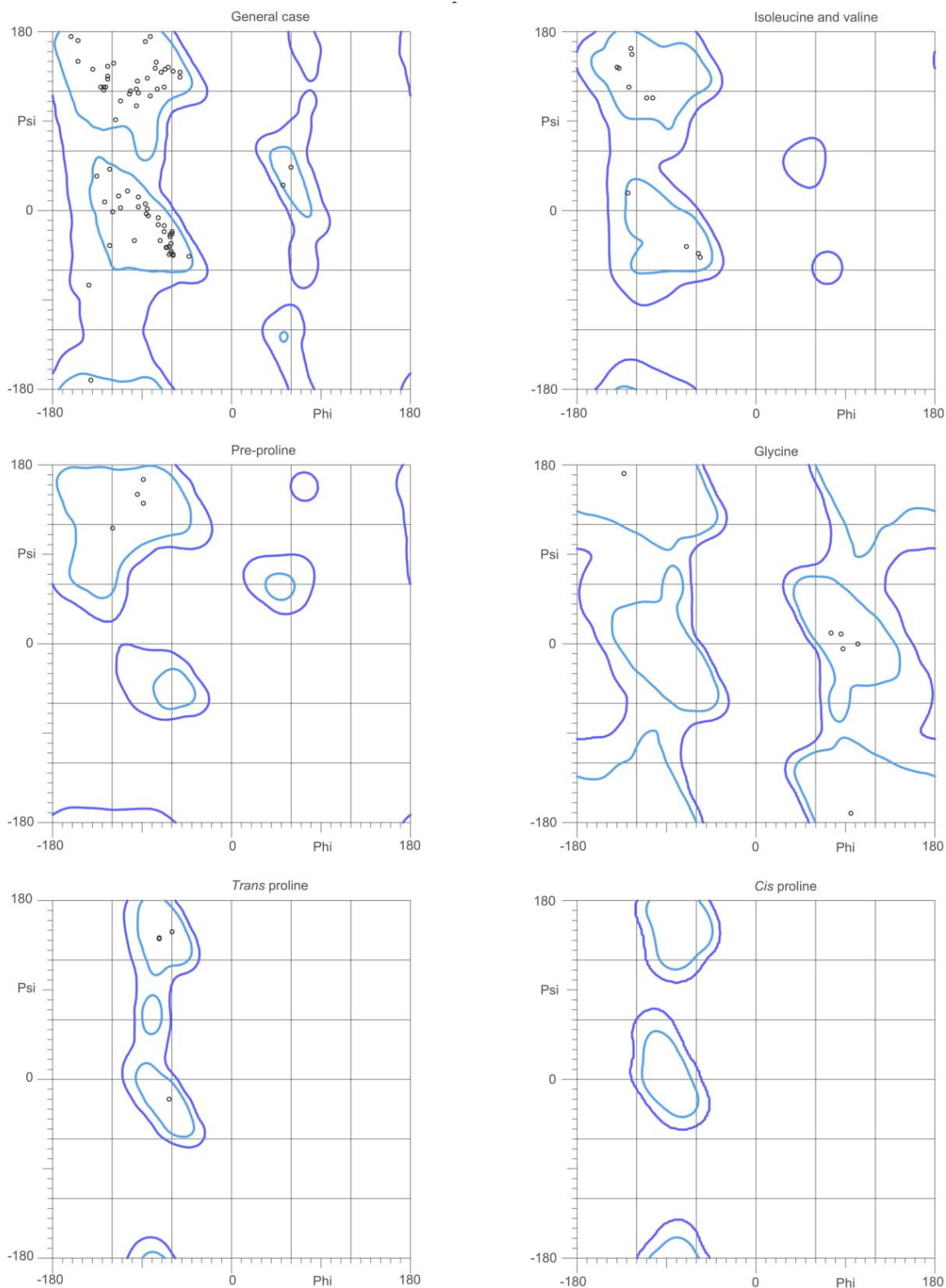


Рис.3. Карты Рамачандрана. 99.0% (96/97) остатков находятся в благоприятной зоне (98%) – отмечена голубым. 100.0% (97/97) остатков находятся в разрешенной зоне (>99.8%) – отмечена синим.

Поиск маргиналов был продолжен с помощью веб-сервиса EDS[3]. В нем можно получить RSR и Z-score. Real-Space Residue определяет сходство между картами электронной плотности, построенными по модели и по экспериментальным данным. Z-score показывает, насколько сходство карт электронной плотности хуже, чем среднее в структурах с таким же разрешением. Хороший Z-score должен быть  $< 2$ . Нашелся всего один маргинал по Z-score – концевой TYR 97. (Что неудивительно при такой хорошей модели).

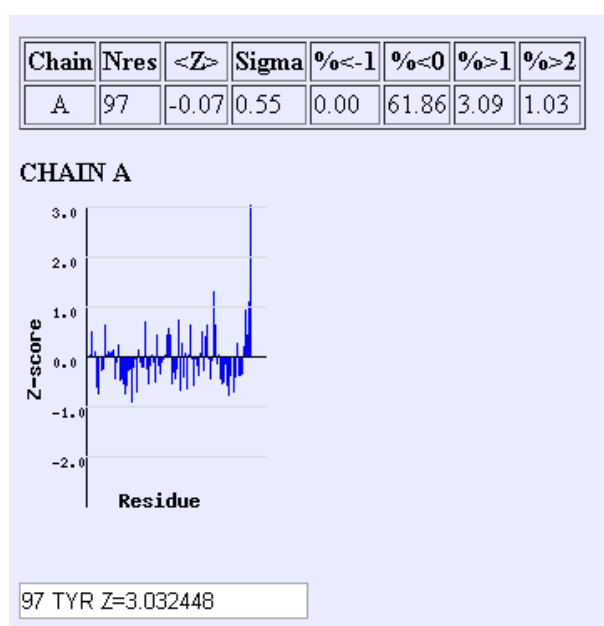
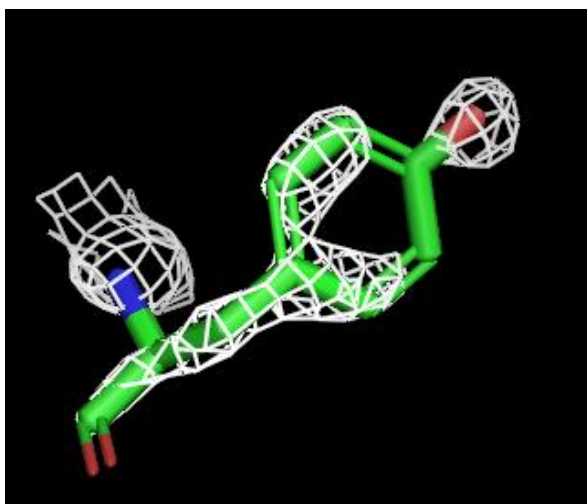


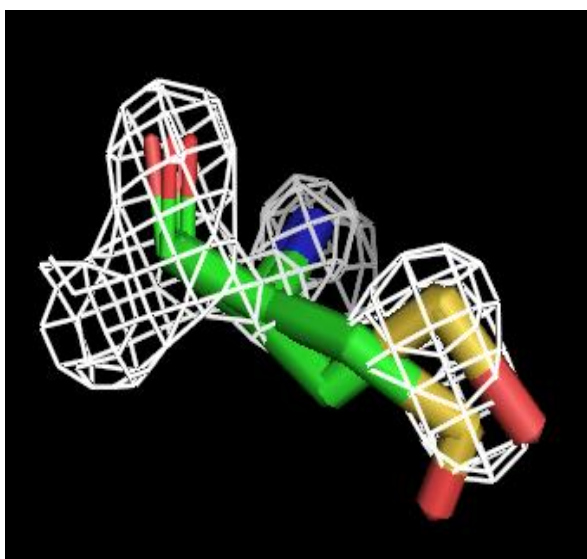
Рис.4. Распределение Z-score для каждого остатка ферредоксина.

### 3.3. Анализ 5 маргиналов



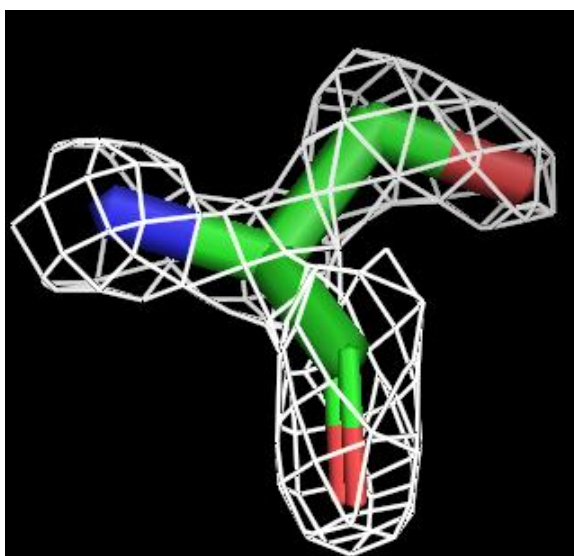
**TYR 97:** концевой тирозин. (Рис.5).  
Маргинал по Z-score. Ухудшение качества структуры под конец отмечено и самими исследователями в их отчете.

Рис.5. Электронная плотность TYR 94, подрезка 1,5  $\sigma$



**CSO 86:** гидроксисистеин (Рис.6).  
Интересно, что он в структуре встречается в двух версиях, и при этом ни одна из версий не удовлетворяет условиям для углов и длин связей одновременно. Электронная плотность расположена где-то между двумя моделями. Его маргинальность объясняется неканоничностью.

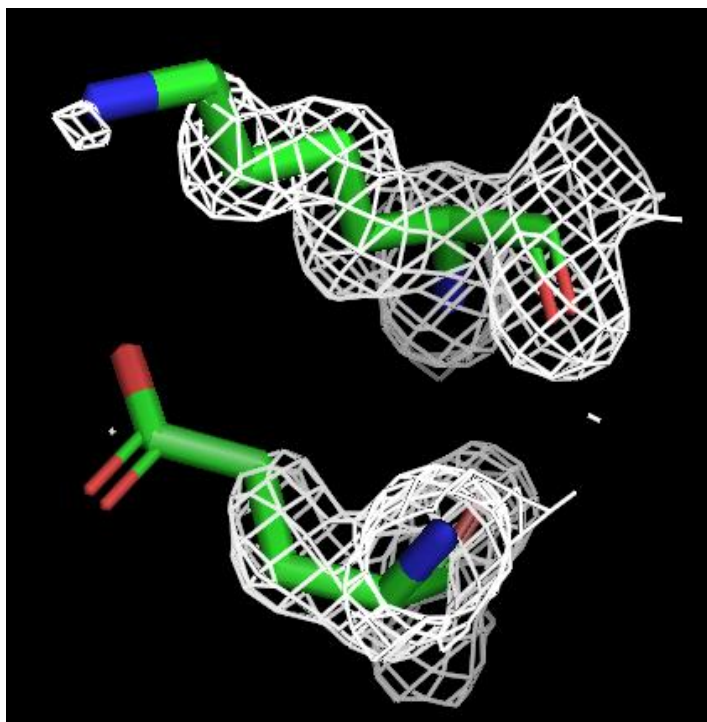
Рис.6. Электронная плотность CSO 86, подрезка 3  $\sigma$



**SER 39:** серин (Рис.7). Маргинальный, потому что расположен в разрешенной, а не в предпочтительной, зоне карты Рамачандрана. С углами  $-144,4, -75,9$ . Эти углы могут быть до 180. Карта электронной плотности не вызывает подозрений. Также этот остаток не отмечен в отчете экспериментаторов.

Рис.7. Электронная плотность SER 39, подрезка 3  $\sigma$





**LYS 87:** лизин (Рис.8).

Маргинальный по двум параметрам: перекрытие с **GLU 54** и у него в результатах MolProbity две записи, хотя в файле PDB одна. Скорее всего это связано с тем, что перед ним неканоничный гидроксисистеин **CSO 86**. Так же качество данных оставляет желать лучшего – на уровне подрезки 1,5 электронная плотность неправильно распределена.

Рис.5. Электронная плотность LYS 87 и GLU 54, подрезка 1,5  $\sigma$

**GLU 54:** глутамин (Рис.5). Маргинальный по перекрытию с **LYS 87**. Так как перекрытие происходит между водородами, достроенными MolProbity, то его попадание в модель не сильно ухудшает ее качество. Экспериментаторы в своем отчете не считают этот остаток маргинальным.

### 3.4. Сравнение моделей из PDB и PDB\_REDO

Данная модель была настолько хорошей, что «улучшенная» получилась хуже исходной (Рис.12). R-фактор новой модели улучшился до 0,13959, R\_free до 0,17164. При этом старые маргиналы поменялись между собой (или со своими соседями) параметрами, по которым они маргинальны, и появилось два новых маргинала LEU 89 и GLU 94.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	2.67		98 <sup>th</sup> percentile* (N=598, 1.50 Å ± 0.25 Å)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	1	1.18%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	82	96.47%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	91	98.91%	Goal: >98%
	MolProbity score <sup>^</sup>	1.11		99 <sup>th</sup> percentile* (N=4836, 1.50 Å ± 0.25 Å)
	Cβ deviations >0.25 Å	0	0.00%	Goal: 0
	Bad bonds:	2 / 776	0.26%	Goal: 0%
Bad angles:	5 / 1055	0.47%	Goal: <0.1%	
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 4	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%

Рис.2. Результат анализа контактов и геометрии для структуры PDB\_REDO для ферредоксина *T.elongatus* .

#### 4. ВЫВОД

В данной работе проводился анализ качества расшифровки структуры белка ферредоксина *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (PDB ID: 5AUI). Качество расшифровки отличное. Модель хорошо соответствует экспериментальным данным по электронной плотности. Это объясняется не только добросовестностью экспериментаторов, но и хорошей базой знаний уже известных о структуре ферредоксина. Как и было заявлено в статье[1], интерес в изучении ферредоксина теперь лежит в области молекулярной динамики и взаимодействия с другими белками.

## 5. СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Mutoh, R., Muraki, N., Shinmura, K., Kubota-Kawai, H., Lee, Y.H., Nowaczyk, M.M., Rogner, M., Hase, T., Ikegami, T., Kurisu, G. X-ray "Structure and Nuclear Magnetic Resonance Analysis of the Interaction Sites of the Ga-Substituted Cyanobacterial Ferredoxin", 2015, *Biochemistry* 54: 6052-6061
2. [веб-сервис] Davis IW, Murray LW, Richardson JS, Richardson DC. "MOLPROBITY: structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes", 2004 Jul 1, *Nucleic Acids Research*, 32(Web Server issue):W615-9.
3. [веб-сервис] GJ Kleywegt, MR Harris, JY Zou, TC Taylor, A Wählby & TA Jones, "The Uppsala Electron-Density Server", 2004, *Acta Cryst. D*60, 2240-2249
4. [веб-сервис] H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne, The Protein Data Bank, 2000, *Nucleic Acids Research*, 28: 235-242.