

Задание 1.

2ASK - кристаллографическая расшифровка артемина. Он способствует росту развивающихся периферических нейронов посредством передачи сигналов через многокомпонентный рецепторный комплекс, состоящий из трансмембранного рецептора тирозинкиназы и специфического гликозилфосфатидинозитол-связанного ко-рецептора. Целью расшифровки трёхмерной структуры белка была проверка возможного связывания артемина с протеогликаном гепарансульфата, участвующем в похожем сигнальном пути и ранее не считавшимся необходимым для сигнального пути артемина.

Отчёт о валидации с PDB

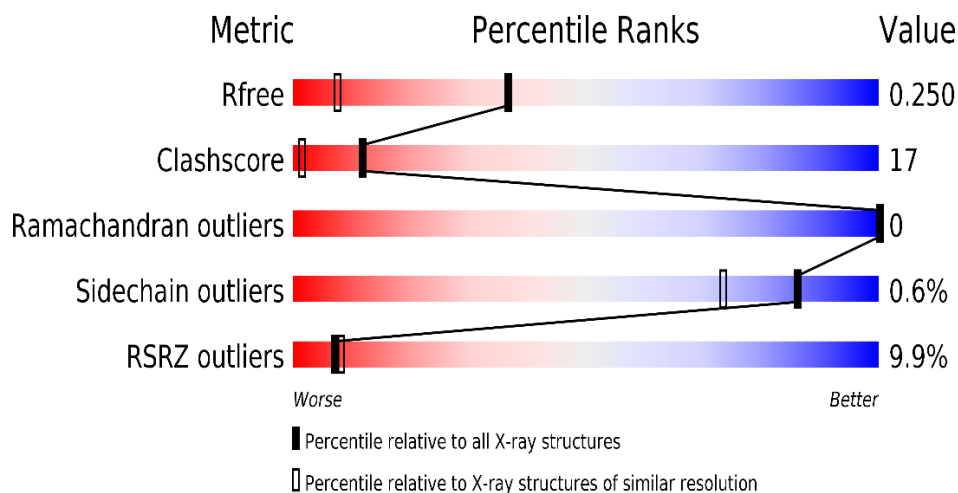


Рис.1. Данные о качестве структуры из отчета о валидации

Разрешение - 1.55 Å. R_{free} = 0.255, R_{фактор} на тестовом наборе рефлексов, не сильно отличается от рабочего R_{фактора} = 0.221. Clashscore = 17, относительно плохой (больше, чем у примерно 1% у моделей с похожим разрешением и чем у примерно 10% всех моделей в PDB). Согласно отчету, на 1770 атомов, исключая водороды, двух цепей приходится 49 перекрытий, 8 из них – без добавленных водородов. По количеству аутлайеров Рамачандрана (0 из 83), торсионным углам (1 из 83 - лейцин) структура неплоха, но по пространственным R-факторам (8 из 101) количество аутлаеров достаточно большое (меньше только у примерно 5% структур).

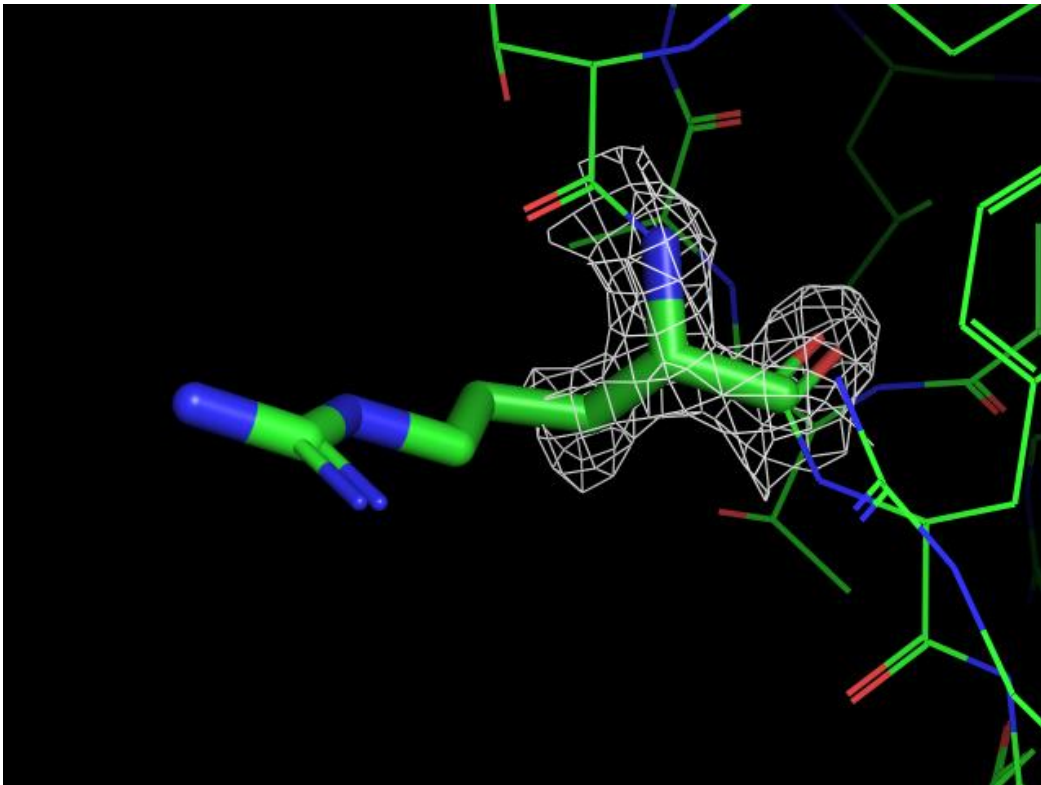


Рис.2. ARG-85, ЭП на уровне подрезки 1.5, carve = 1.5.

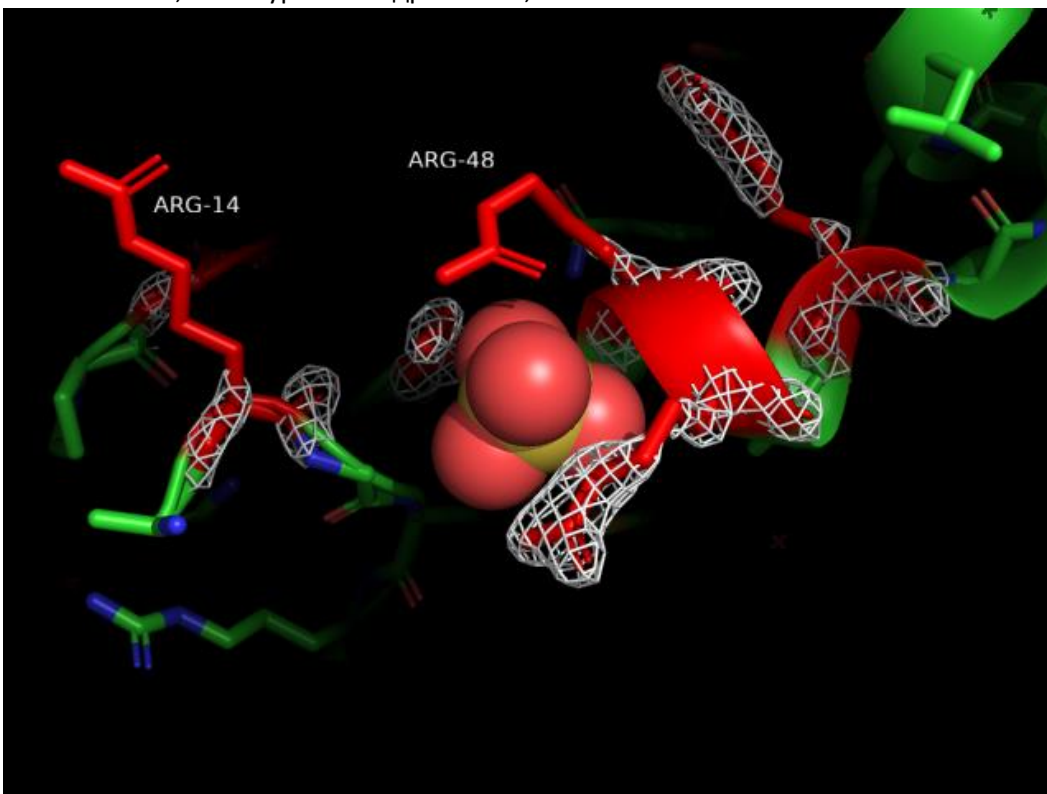


Рис.3. ARG-14 и ARG-48, ЭП на уровне подрезки 1.5, carve = 1.5

В структуре есть остатки, отдельные участки структуры которых не подтверждаются их ЭП. Например, изображенный на рисунке 2 ARG-85 или изображенные на рисунке 3 ARG-14 и ARG-48, взаимодействующие с сульфатом, оба изображения ЭП на уровне подрезки 1.5, carve = 1.5. Видно, что ЭП не очень подтверждает остаток. ARG-85 лежит на отрезке бета-листа, выходящем на поверхность. Подобные ему остатки (например, TRP-98) также лежат на поверхности, поэтому не

подтверждение их структур ЭП, скорее всего, не имеет биологического смысла, тем более, они расположены достаточно далеко от кармана активного сайта. Совсем иной случай - ARG-14 и ARG-48, они – одни из остатков, участвующих в связывании сульфатов протеогликанов.

Задание 2.

Теперь рассмотрим маргиналы. Длины связей измерены в ангстремах, углы – в градусах.

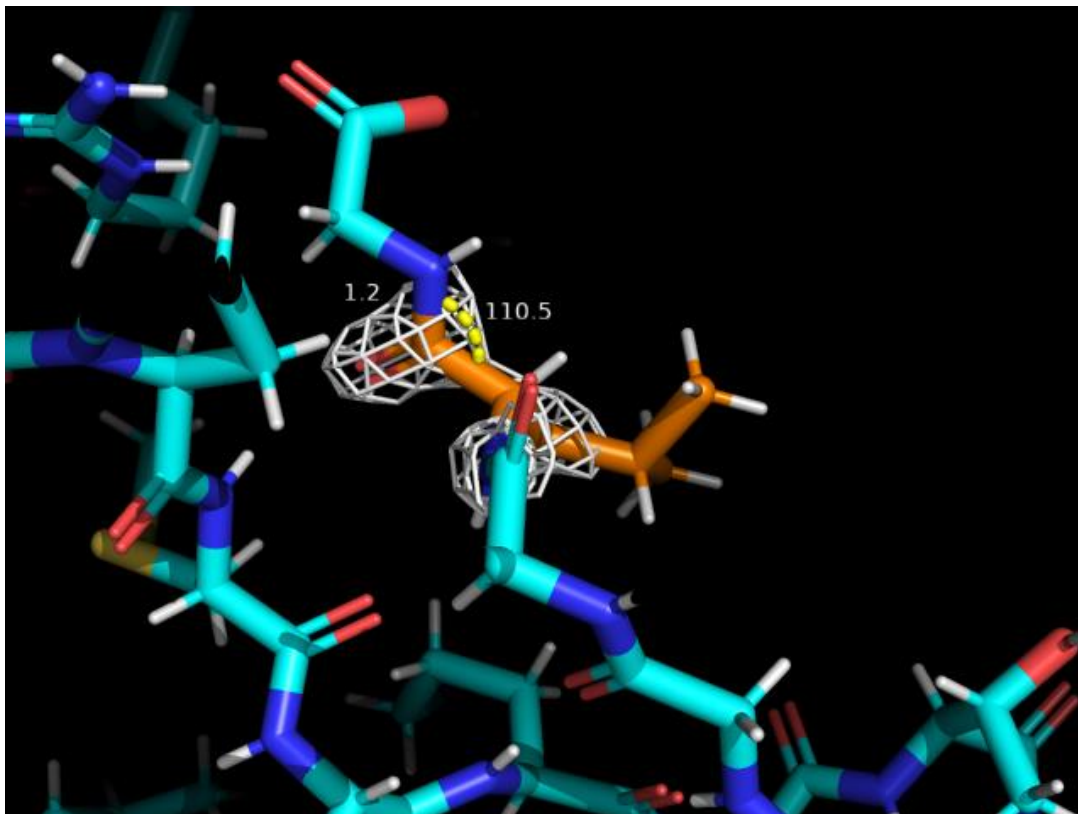


Рис.4. LEU-112 цепи В, ЭП на уровне подрезки 1.5, carve = 1.5. Показан угол C-N-CA и длина связи C-N.

C-N-CA – угол равен 110.08 градусам, в отличие от 122.30 в идеальном случае ($Z = -5.82$) – маргинал по углу связи. Маргинал по длине связи C-N - 1.21, в отличие от 1.33 в идеальном случае ($Z = -6.34$).

Также конец боковой цепи не вписан в ЭП.

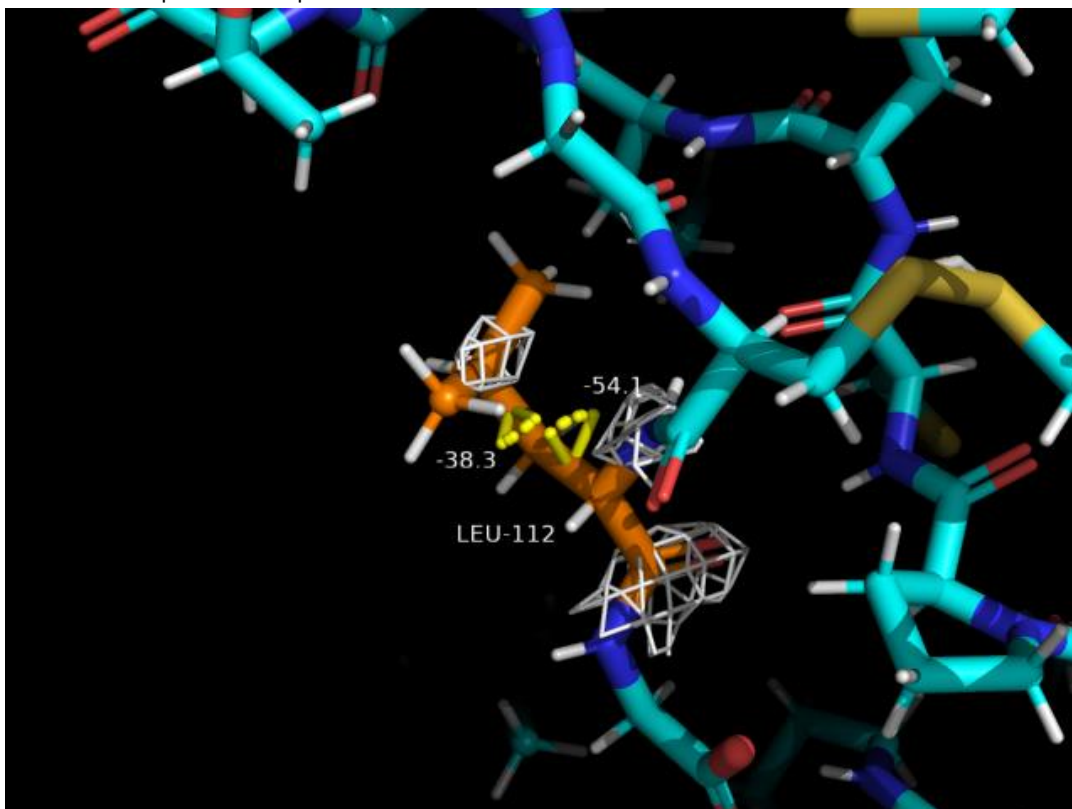


Рис.5. LEU-112 цепи A, ЭП на уровне подрезки 1.5, carve = 1.5. Показаны χ углы остатка. Остаток – маргинал по торсионным углам в боковой цепи остатка.

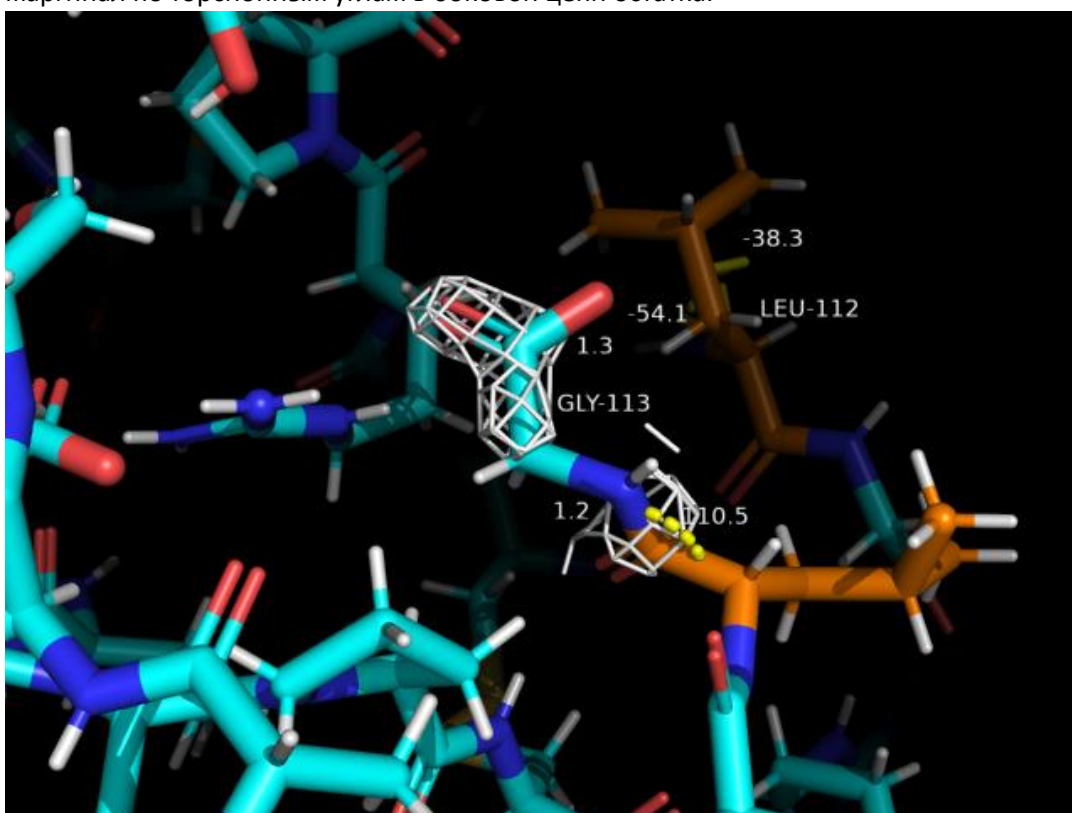


Рис.6. GLY-113 цепи B, ЭП на уровне подрезки 1.5, carve = 1.5. Показана длина связи C-OXT.

Длина C-OXT - 1.34, в отличие от 122.30 в идеальном случае ($Z = -5.82$). Также кислород остатка не вписан в ЭП.

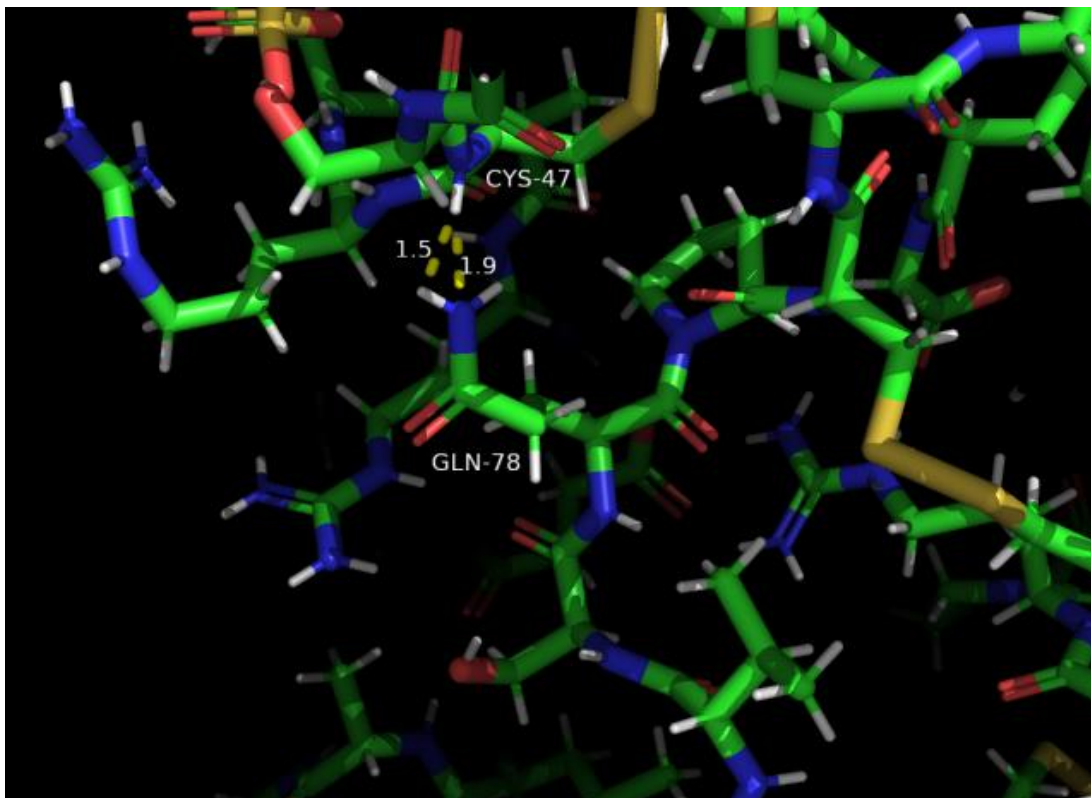


Рис.7. GLN-78 цепи В. Показаны клэши с CYS-47 цепи В. NE2 GLN-78 и H CYS-47 – 1.85 с перекрытием 0.73; HE22 GLN-78 и H CYS-47 – 1.52 с перекрытием 0.55.

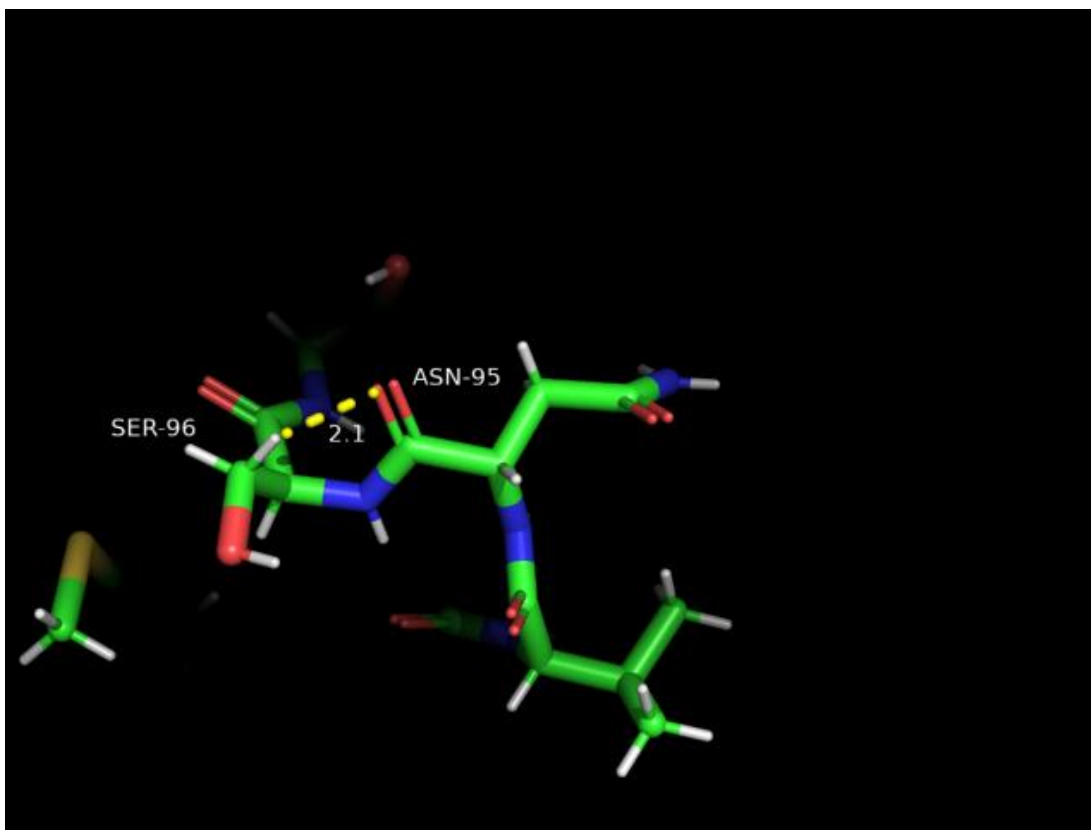


Рис.8. ASN-96 цепи А. Показан клэш с SER-96 цепи А. O ASN-96 и HB2 SER-96 - 2.12 с перекрытием 0.48.

При помощи MolProbity был произведен анализ структуры белка. Результат совпал с отчетом валидации PDB.

Protein Geometry	Poor rotamers	2	1.20%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	159	95.78%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	197	99.49%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-0.26 ± 0.50		Goal: abs(Z score) < 2
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0
	Bad bonds:	2 / 1582	0.13%	Goal: 0%
	Bad angles:	1 / 2142	0.05%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 16	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0/230		

Рис.9. Отчет MolProbity до добавления водородов и поворота остатков, его требующих.

Flip?	Chain	Res#	Alt	Res ID	Orig	Flip	Flip-Orig	Code	Explanation
✓	A	32		HIS	-2.5	1.2	3.7	FLIP	Clear evidence for flip.
✓	B	78		GLN	-4	1.1	5.1	FLIP	Clear evidence for flip.
✓	B	95		ASN	-0.6	0.35	0.95	FLIP	Some evidence recommending flip.

Рис.10. Остатки, которые требуют поворота.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	16.31	25 th percentile* (N=730, 1.55Å ± 0.25Å)	
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	2	1.20%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	159	95.78%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	197	99.49%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-0.26 ± 0.50		Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	1.78		67 th percentile* (N=6779, 1.55Å ± 0.25Å)
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0
	Bad bonds:	8 / 1582	0.51%	Goal: 0%
Bad angles:	3 / 2142	0.14%	Goal: <0.1%	
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 16	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0/230		
	Waters with clashes	4/212	1.89%	See UnDowser table for details

Рис.11. Отчет MolProbity после добавления водородов и поворота вышеупомянутых остатков. Количество плохих связей увеличилось с 2 до 8, а углов – с 1 до 3, но уменьшилось количество клэшей с водой по сравнению с отчетом PDB – с 8 до 4. Также и Clashscore в отчете PDB – 17, что больше, чем в отчете MolProbity.

Задание 3.

В целом, полученная структура среднего качества. Она имеет хорошее разрешение, маргиналов в ней практически нет, но она имеет слишком плохой clashscore и достаточно большое количество аутлаеров по RSRZ. Эта структура была создана, чтобы проверить, возможно ли связывание артемина с протеогликаном гепарансульфата. И она не очень подходит для данной задачи. Выводы о функциональных особенностях по данной модели делать можно, так как количество маргиналов в ней достаточно мало и большинство из них находятся далеко от функционально значимых участков, то есть они функционально не нагружены, но ARG-14 и ARG-48, участки структуры которых не подтверждаются ЭП и которые играют важную роль в связывании протеогликана гепарансульфата, не позволяют с точностью судить о подобном связывании.

Задание 4.

Validation metrics from PDB-REDO		
	PDB	PDB-REDO
Crystallographic refinement		
<i>R</i>	0,2149	0,1726
<i>R-free</i>	0,2428	0,2066
<i>Bond length RMS Z-score</i>	0,634	0,820
<i>Bond angle RMS Z-score</i>	0,711	0,957
Model quality (raw scores percentiles)		
<i>Ramachandran plot appearance</i>	52	84
<i>Rotamer normality</i>	41	38
<i>Coarse packing</i>	N/A	N/A
<i>Fine packing</i>	1	2
<i>Bump severity</i>	29	99
<i>Hydrogen bond satisfaction</i>	58	37
Significant model changes		
Description	Count	
<i>Rotamers changed</i>	5	
<i>Side chains flipped</i>	9	
<i>Waters removed</i>	29	
<i>Peptides flipped</i>	0	
<i>Chiralities fixed</i>	0	
<i>Residues fitting density better</i>	68	
<i>Residues fitting density worse</i>	0	

Рис.12. Отчет PDB-REDO.

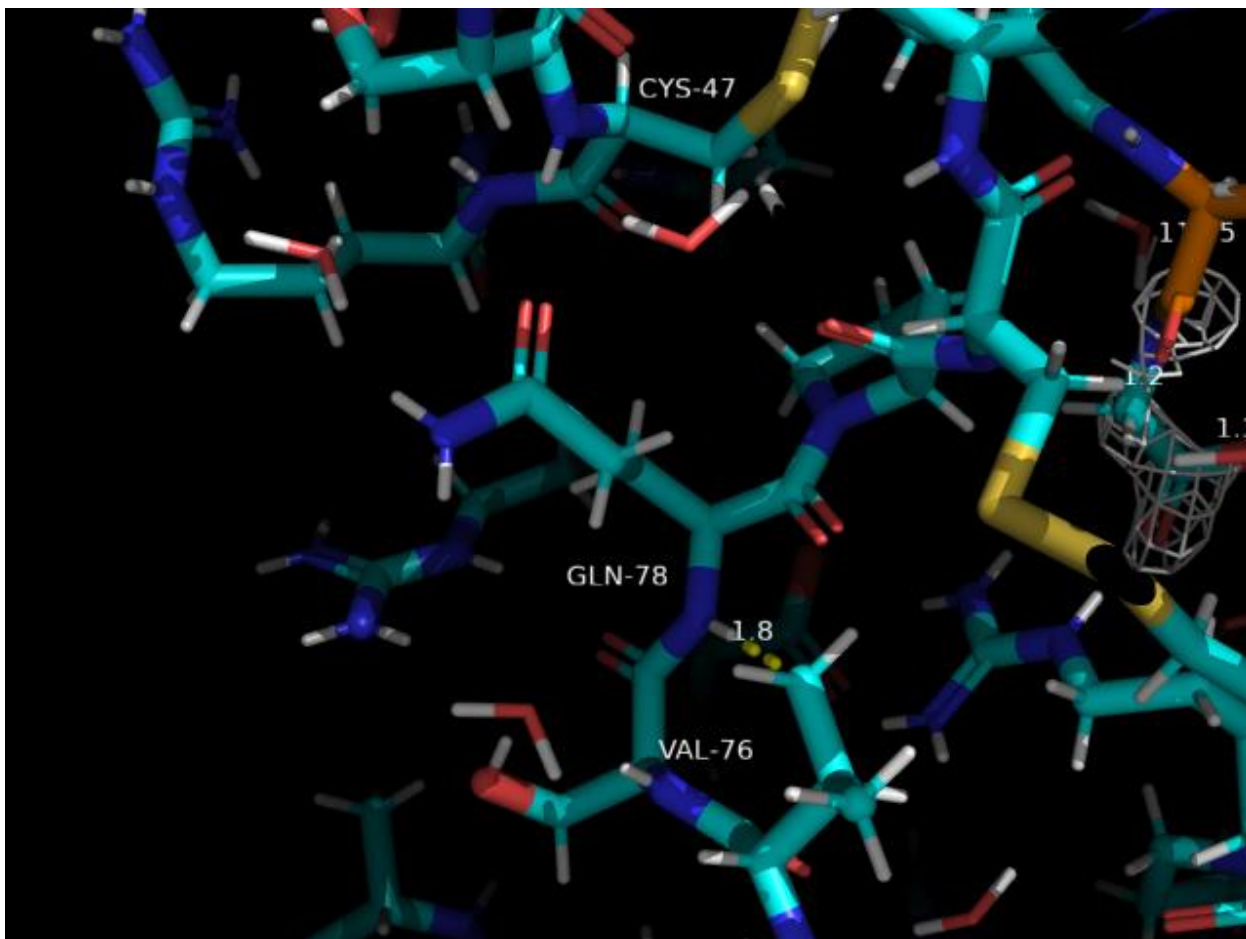


Рис.13. GLN-78 цепи В после поворота, который позволил избавиться от клэшей с CYS-47 (рис.7.).

В целом, по результатам отчета видно, что сервисы REDO улучшают соответствия позиций атомов их ЭП и предпочтительным конформациям и пакинг, а также уменьшают количества клэшей (пример избавления от клэша – поворот GLN-78 цепи В на рис. 13). По основным показателям модель улучшилась, так что по ней делать какие-то выводы об особенностях белка можно.