

Факультет биоинженерии и биоинформатики
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Отчёт по качеству RSA расшифровки структуры
белка 5HGI

Выполнил студент 4 курса

Дюгай Илья

Москва, 2017

Аннотация

Данный отчет представляет собой анализ качества расшифровки структуры белка IRE1 α человека, (5HGI), на основе определенных показателей, таких как параметры кристаллической решетки, R-фактор, R_free, карта Рамачандрана, и других, полученных с помощью различных сервисов и баз данных.

Введение

Общая информация об объекте

Накопление неправильно свернутых белков ЭПР приводит к стрессу, для предотвращения которого в клетке существует защитный механизм, называемый UPR (Unfolded Protein Response). Самой древней и наиболее консервативной частью этого механизма у млекопитающих является трансмембранный белок киназа/РНКаза IRE1 α . Этот мультидоменный белок состоит из N-концевого люменального домена, который является сенсором, соединенным с цитозольными киназным и РНКазным доменами через трансмембранный линкер. В присутствии неправильно свернутых белков в ЭПР, люменальный домен IRE1 α олигомеризуется, что приводит к активации путем транс-автофосфорилирования цитозольного киназного домена. Фосфорилирование IRE1 α приводит к появлению у димера РНКазной активности и вырезанию 26-нуклеотидного интрона из мРНК белка XBP1 – транскрипционного фактора, усиливающего экспрессию генов, помогающих ЭПР справиться со стрессом[1].

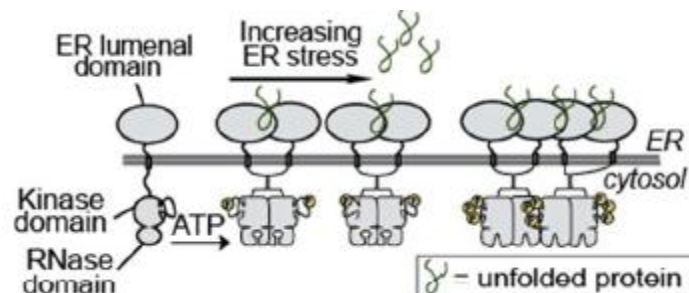


Рис. 1. Модель активации IRE1 α при стрессе ЭПР.

Определение кристаллической структуры апофермента IRE1 α дает много информации о том, какие белковые взаимодействия стабилизируют РНКазную активность в димере IRE1 α , а также показывают, какие конформационные изменения происходят в киназном домене при переходе от мономерного к димерному состоянию, обладающему РНКазной активностью[1].

Общая информация о структуре

Структура 5HGI была получена в августе 2016 года группой ученых из Университета Вашингтона и Университета Калифорнии Сан-Франциско. Некоторые характеристики структуры суммированы в Таблице 1[2,3].

Таблица 1. Основные характеристики структуры 5HGI

Параметр	Значение	
Метод решения фазовой проблемы	Метод молекулярного замещения	
Число измеренных рефлексов	19194	
Разрешение	2,58Å	
Диапазон разрешений	44.34 - 2.58Å	
Полнота данных	99.7%	
Кристаллографическая группа	C 2 2 21	
R-фактор	0,213	
Свободный R-фактор	0,248	
Параметры ячейки	Стороны(Å)	Углы(°)
	a=68,039	a=90
	b=169,196	β=90
	c=104,138	γ=90

Результаты и их обсуждения

Анализ структуры сервисами MolProbity и EDS

С помощью сервиса MolProbity к структуре были добавлены водороды, определены стерически- затрудненные боковые цепи Asn, Gln, His (их обнаружено не было). Clashscore структуры составил 9,92.

Для поиска маргинальных остатков были построены карты Рамачандрана (рис. 2). Данным сервисом определено, что 95,3% остатков находятся в предпочтительных областях, и 100% лежат в разрешённых областях, выбросов обнаружено не было. MolProbity также предоставляет некоторые характеристики качества структуры, указанные в Таблице 2.

Также к маргиналам были причислены несколько, исправленных на предыдущем этапе, остатков (**Таблица 3**, выделены желтым).

Были найден остаток с максимальным уровнем перекрывания – 0,8 Å (**Таблица 3**, выделен красным).

Группа остатков была включена в таблицу из-за экстремальных значений RSR (>0.3), они выделены синим (значения получены при помощи EDS).

Также был найден остаток, являющийся плохим ротомером (**Таблица 3**, выделен зеленым).

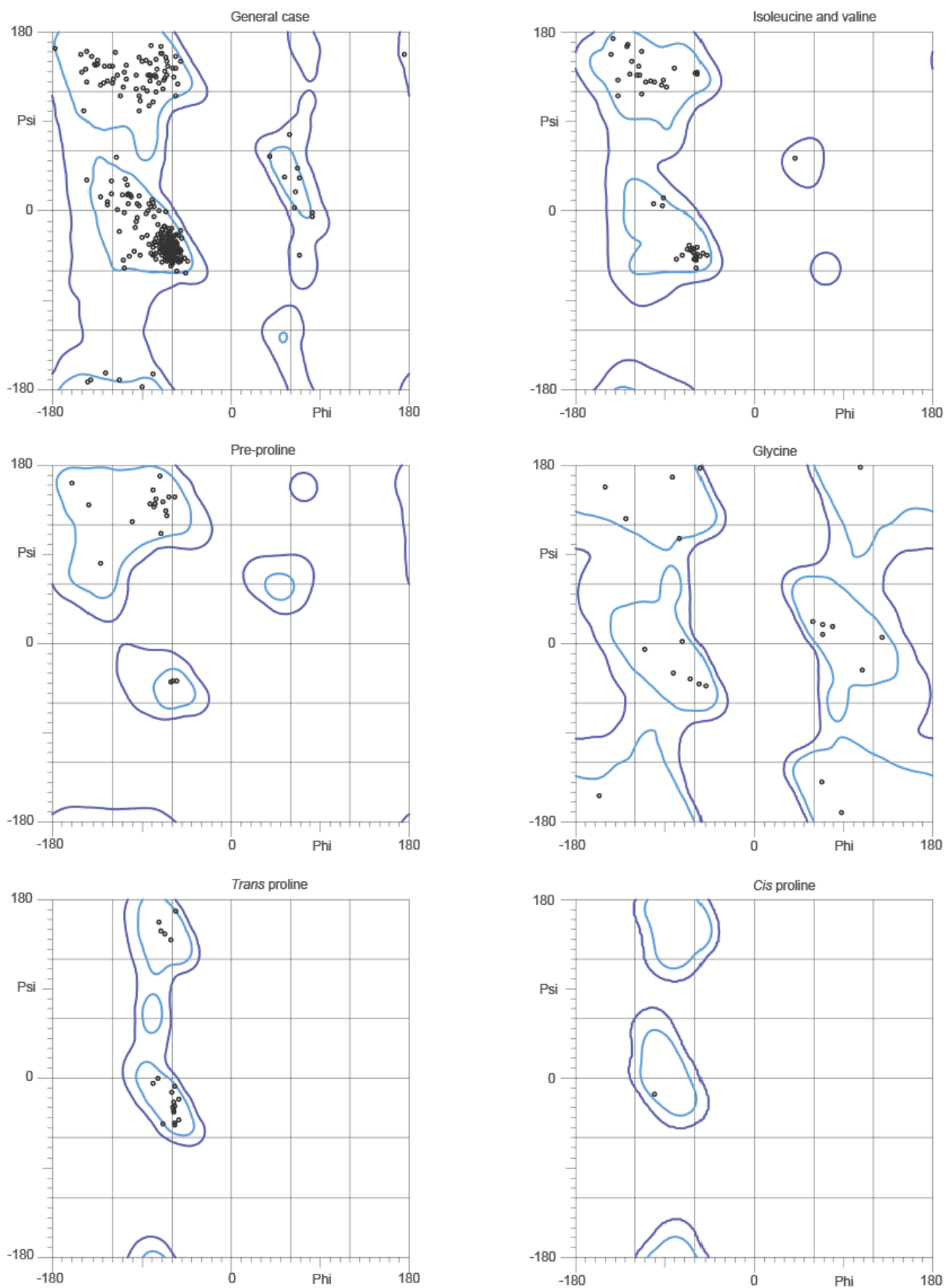


Рис. 2. Карты Рамачандрана структуры 1S4I, полученные MolProbity. Голубым выделены предпочтительные области значений углов ϕ и ψ , синим – разрешённые.

Таблица 2. Характеристики модели, полученные с помощью MolProbity

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	9.92	98 th percentile* (N=225, 2.58Å ± 0.25Å)	
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	4	1.41%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	265	93.64%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	368	95.09%	Goal: >98%
	MolProbity score [^]	1.97	97 th percentile* (N=6195, 2.58Å ± 0.25Å)	
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 3057	0.00%	Goal: 0%
	Bad angles:	0 / 4135	0.00%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	1 / 20	5.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	4	1.06%	Goal: <1.0%
	CA Geometry outliers	0	0.00%	Goal: <0.5%

Таблица 3. Описание маргинальных остатков.

Позиция остатка	Остаток	Clash > 0,4Å	Rotamer	RSR
A 742	MET	0.80Å HE2 with A 755 VAL HG11	Allowed (1.5%) mmm chi angles: 296.5,282.3,234.6	0,23
A 712	PHE	0.68Å HD1 with A 715 CYS HG	Favored (91.9%) m- 80 chi angles: 299.4,270.1	0,242
A 577	LEU	0.68Å HD23 with A 588 ARG N	Favored (3.4%) mm chi angles: 273.9,293.1	0,515
A 567	GLY	0.63Å O with A 568 LYS HB2	-	0,27
A 637	PHE	-	-	0,385
A 656	LYS	-	-	0,405
A 729	SER	-	-	0,433
A 885	ASP	-	OUTLIER (0.3%) chi angles: 226.7,27.6	0,141

Анализ отдельных маргинальных остатков

Для детального анализа были выбраны остатки или группы остатков, перечисленные в **таблице 4**, в ней же перечислены маргинальные свойства, по которым проводился отбор.

Таблица 4. Остатки, отобранные для детального анализа; цветовой код такой же, как и в **таблице 3**.

Позиция остатка	Остаток	Clash > 0,4Å	Rotamer	RSR
A 742	MET	0.80Å HE2 with A 755 VAL HG11	Allowed (1.5%) mmm chi angles: 296.5,282.3,234.6	0,23
A 712	PHE	0.68Å HD1 with A 715 CYS HG	Favored (91.9%) m- 80 chi angles: 299.4,270.1	0,242
A 577	LEU	0.68Å HD23 with A 588 ARG N	Favored (3.4%) mm chi angles: 273.9,293.1	0,515
A 729	SER	-	-	0,433
A 885	ASP	-	OUTLIER (0.3%) chi angles: 226.7,27.6	0,141

1. Анализ перекрытия A742 MET и A755 VAL

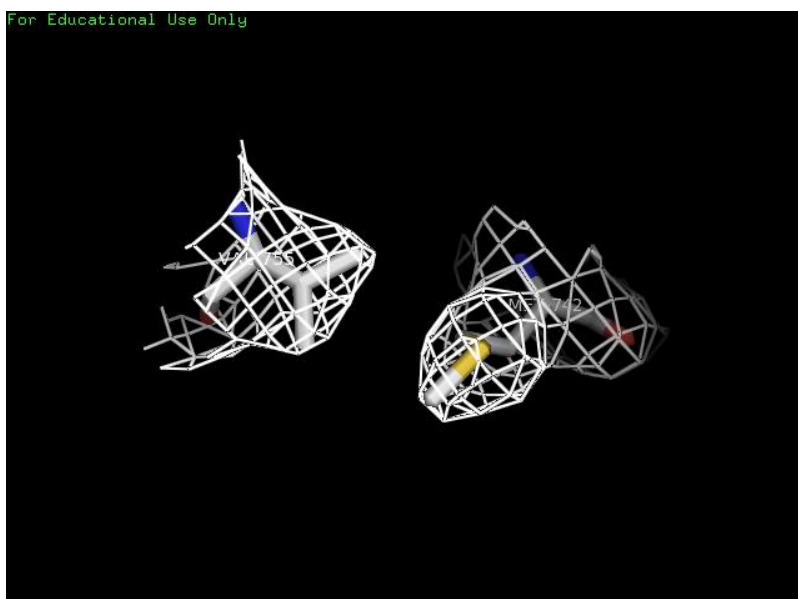


Рис. 3. Аминокислоты с высоким перекрытием боковых радикалов. Уровень подрезки 0,5

Видно, что радикалы валина и метионина сближены, но не перекрываются (**Рис. 3**). Видимо, дело в ошибке расшифровки.

2. Анализ перекрытия A712 PHE и A715 CYS

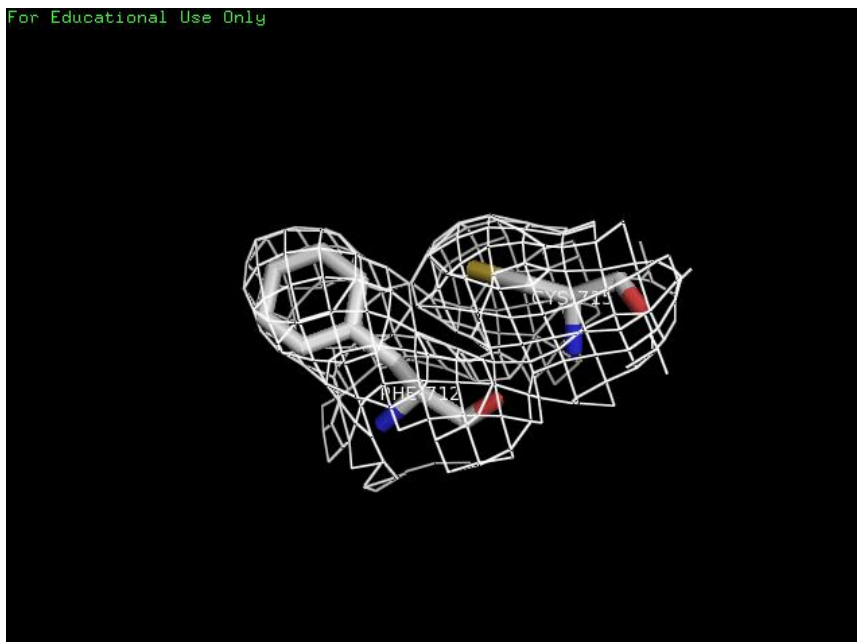


Рис. 4. Аминокислоты с высоким перекрытием боковых радикалов. Уровень подрезки 0,5

Видно, что здесь, как и в предыдущем случае аминокислотные остатки сближены, но не перекрываются.

3. Анализ перекрытия A577 LEU и A588 ARG

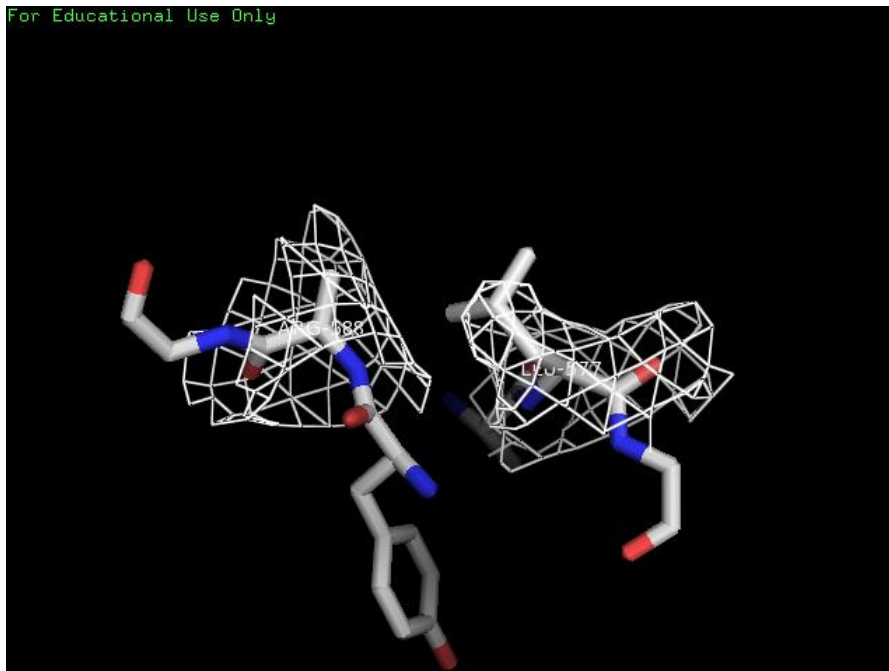


Рис. 5. Аминокислоты с высоким перекрытием боковых радикалов. Уровень подрезки 0,5

Здесь видно, что аминокислотный остаток A588 не является аргинином, а остаток A577 плохо вписывается в свою электронную плотность. Помимо перекрытия боковых радикалов, в качестве критерия для выбора A577 LEU в качестве

маргинального остатка было выбрано максимальное значение RSR для данной структуры (Рис. 6)

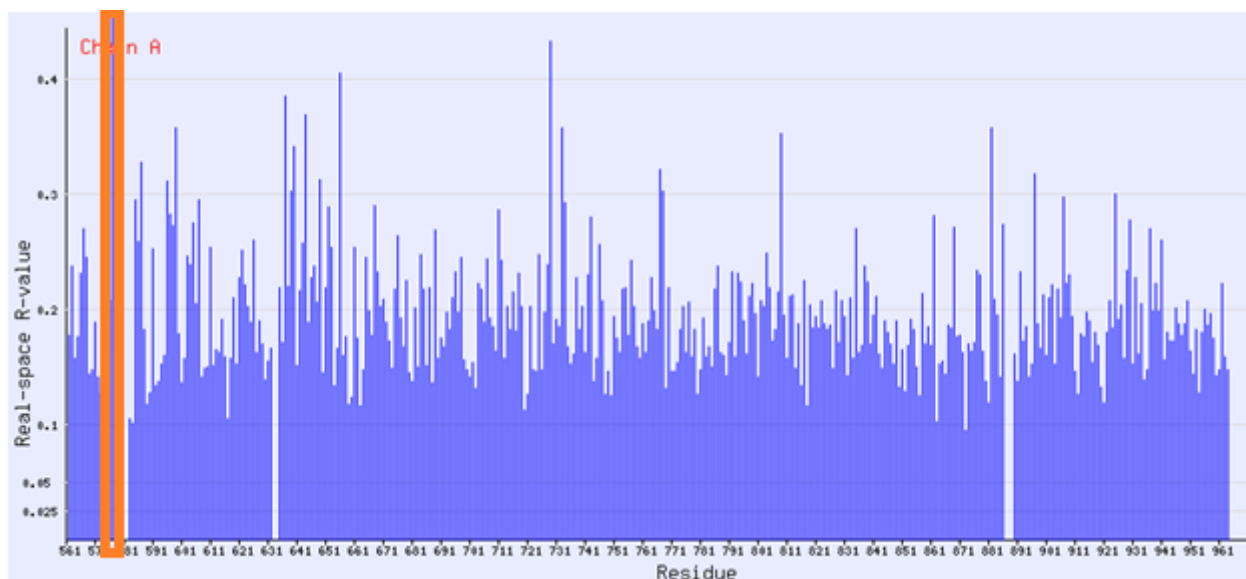


Рис. 4. Распределение RSR по остаткам цепи А. Оранжевым прямоугольником выделен остаток A577 LEU с экстремальным значением RSR.

Видимо, этот участок плохо разрешает детали структуры, отсюда и высокий показатель RSR.

4. Анализ остатка A729 SER

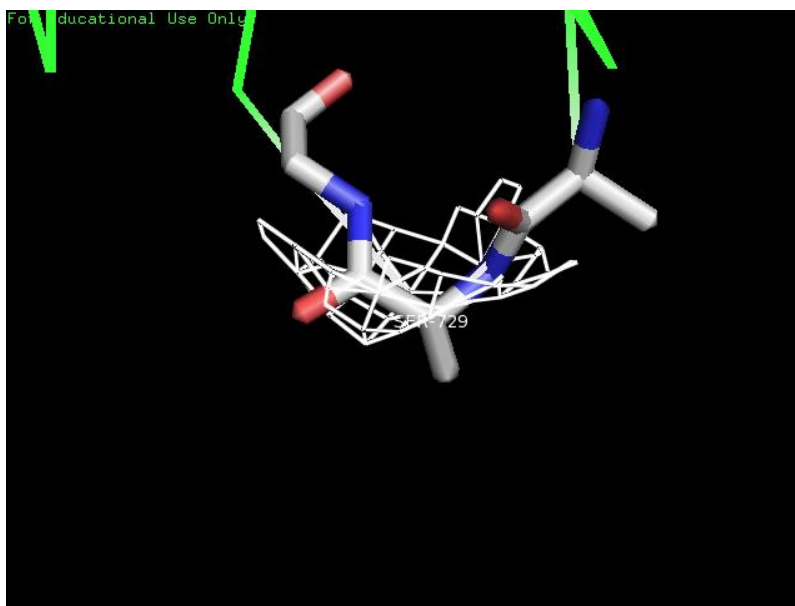


Рис. 7. Участок цепи А с 728 по 730 остатки. Уровень подрезки 0,5.

Остаток A729 SER также характеризуется высоким значением RSR. Видно, что электронная плотность плохо описывает структуру бокового радикала. Также видно, что здесь радикал этой аминокислоты не является серином. При уровне подрезки 0,3 видна электронная плотность, которая может теоретически соответствовать недостоящему кислороду (Рис. 8).

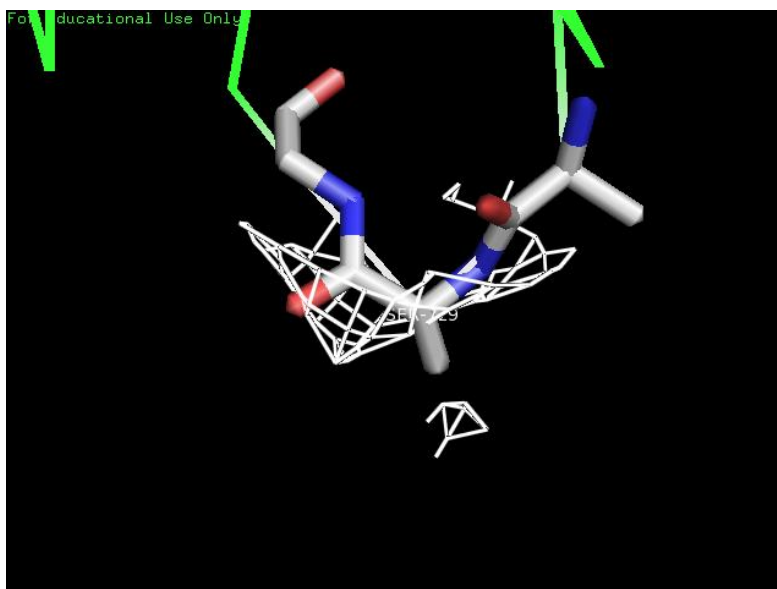


Рис. 8. Участок цепи А с 728 по 730 остатки. Уровень подрезки 0,3.

5. Анализ плохого ротомера A885 ASP

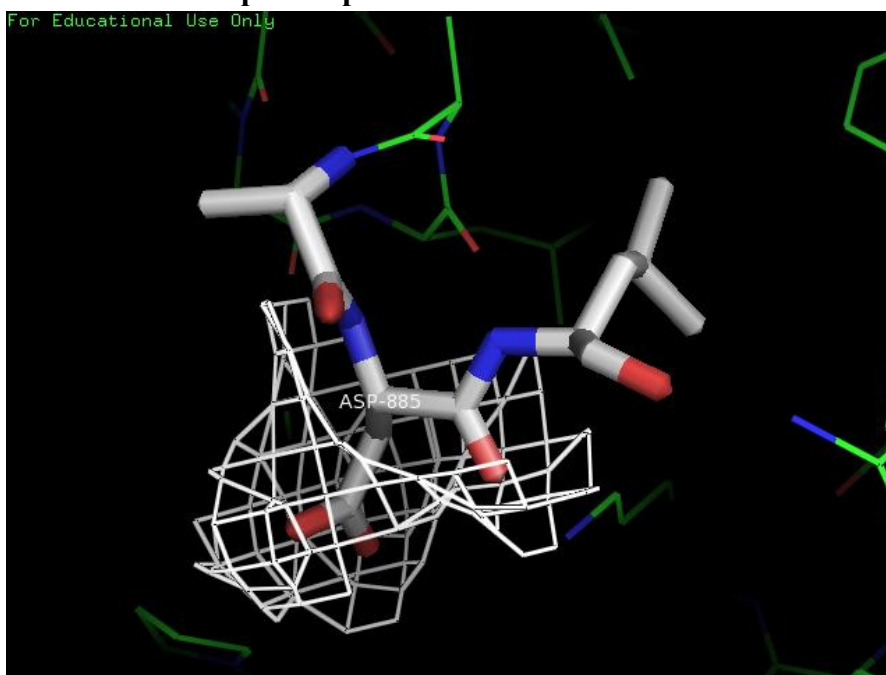


Рис. 9. Аспарагиновая кислота A885. Уровень подрезки 0,5.

Видно, что боковой радикал A885 хорошо вписывается в электронную плотность и везде имеет правильную конформацию. Были выделены соседние с ним остатки на расстоянии 4\AA , среди них нет остатков, которые могли бы изменить конформацию радикала A885 за счет электростатических взаимодействий (Рис. 10).

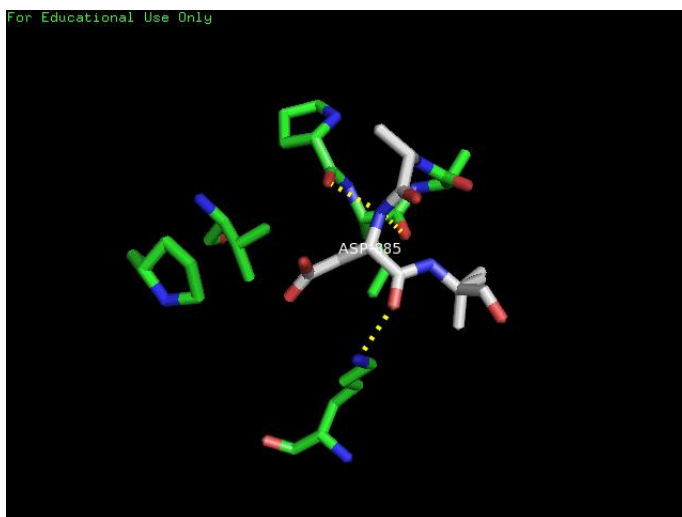


Рис. 10. Аспарагиновая кислота A885 и ее окружение. Уровень подрезки 0,5.

Выводы

Позиция остатка	Остаток	Clash > 0,4Å	Rotamer	RSR	Вывод
A 742	MET	0.80Å HE2 with A 755 VAL HG11	Allowed (1.5%) mmm chi angles: 296.5,282.3,234.6	0,23	Ошибка расшифровки
A 712	PHE	0.68Å HD1 with A 715 CYS HG	Favored (91.9%) m- 80 chi angles: 299.4,270.1	0,242	Ошибка расшифровки
A 577	LEU	0.68Å HD23 with A 588 ARG N	Favored (3.4%) mm chi angles: 273.9,293.1	0,515	Плохо разрешенный участок
A 729	SER	-	-	0,433	Плохо разрешенный участок
A 885	ASP	-	OUTLIER (0.3%) chi angles: 226.7,27.6	0,141	Ошибка расшифровки

В трех случаях, на мой взгляд, были допущены неточности при расшифровке. Оставшиеся же два случая отличаются плохим разрешением, сложно сказать с чем это связано.

В целом структура 5HGI имеет хорошее разрешение 2,58Å и в модели присутствует мало маргинальных остатков.

Список литературы

1. Feldman, H. C., Tong, M., Wang, L., Meza-Acevedo, R., Gobillot, T. A., Lebedev, I., ... Maly, D. J. (2016). Structural and Functional Analysis of the Allosteric Inhibition of IRE1 with ATP-Competitive Ligands. *ACS Chemical Biology*, 11(8), 2195–2205. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00940>
2. “RCSB PDB for 5HGI.” [Online]. Available: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=5HGI>
3. “Full wwPDB X-ray Structure Validation Report.” [Online]. Available: http://ftp.wwpdb.org/pub/pdb/validation_reports/hg/5hgi/5hgi_full_validation.pdf