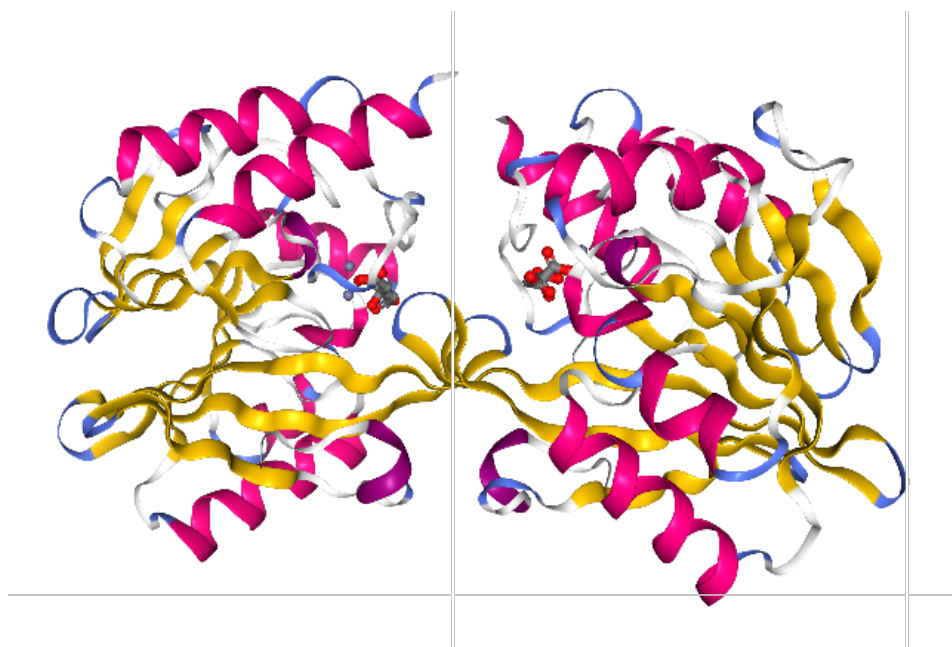


**Анализ качества структуры металло-бета-лактамазы VIM-4
PDB ID: 2WHG**



**Посицельская Екатерина
4 курс, 401 группа**

Аннотация.....	3
Введение	3
Результаты и обсуждение.....	3
Общая информация о структуре	3
Значения индикаторов качества модели в целом	4
Карта Рамачандрана	5
Маргинальные остатки	6
A 36 VAL	7
A 183 ASN	8
A 260 LYS.....	9
B 229 HIS	10
B 261 ASN	11
Сравнение модели из PDB с моделью из PDB_redo	12
Заключение.....	12
Список литературы.....	12

Аннотация

В данном отчете представлен анализ качества структуры Металло-бета-лактамазы VIM-4 из организма *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID: 2WHG), полученной методом рентгено-структурного анализа. Были рассмотрены характеристики модели в целом, а также нескольких маргинальных остатков.

Введение

Цинк-связывающая металло-бета-лактамаза VIM-4 относится к классу EC 3.5.2.6 ферментов, гидролизующих непептидную углерод-азотную связь в циклических амидах. Например, катализирует следующую реакцию:

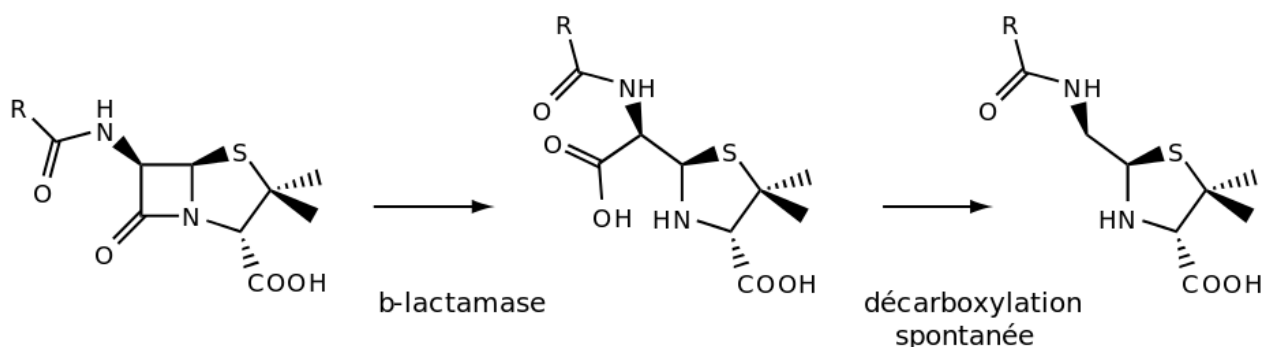


Рисунок 1. Схема разложения пенициллинов. Показано ядро пенициллина.

Бета-лактамазы относятся к ферментам ответственным за формирование устойчивости бактерий к таким антибиотикам, как пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы. Таким образом, изучение ферментов данной группы имеет практическое значение.

Результаты и обсуждение

Общая информация о структуре

Структура, выбранная для анализа, представляет собой гомодимер металло-бета-лактамазы VIM-4, содержащий цепи А и В, длина одной цепи 230 а/к (в записи PDB цепь начинается с 32 остатка, поэтому возможны номера больше 230). В данной структуре каждая цепь связана с двумя лигандами: Zn (ион цинка), FLC (цитрат-анион).

Структура была опубликована онлайн 13 декабря 2010 года коллективом авторов: Patricia Lassaux, Daouda A. K. Traore', Elodie Loisel, Adrien Favier, Jean-Denis Docquier, Jean Se'bastien Sohier, Cle'mentine Laurent, Carine Bebrone, Jean-Marie Fre're,1 Jean-Luc Ferrer, and Moreno Galleni. При расшифровке данной структуры фазовая проблема была решена методом молекулярного замещения с использованием структуры металло-бета-лактамазы VIM-2 (1KO3), отличающейся от исследуемого белка на 12 остатков. В таблице 1 представлены основные параметры структуры.

Таблица 1. Основные характеристики структуры 2WHG

Параметр	Значение
число измеренных рефлексов	52282
разрешение	1.9 Å
полнота набора структурных факторов	98.7%
диапазон разрешений структурных факторов	1.9 – 41.5
параметры кристаллографической ячейки	a = 141.39 Å, b = 46.22 Å, c = 105.99 Å alpha = 90.00, beta = 105.24, gamma = 90.00
наличие некристаллографических симметрий	отсутствуют

Значения индикаторов качества модели в целом

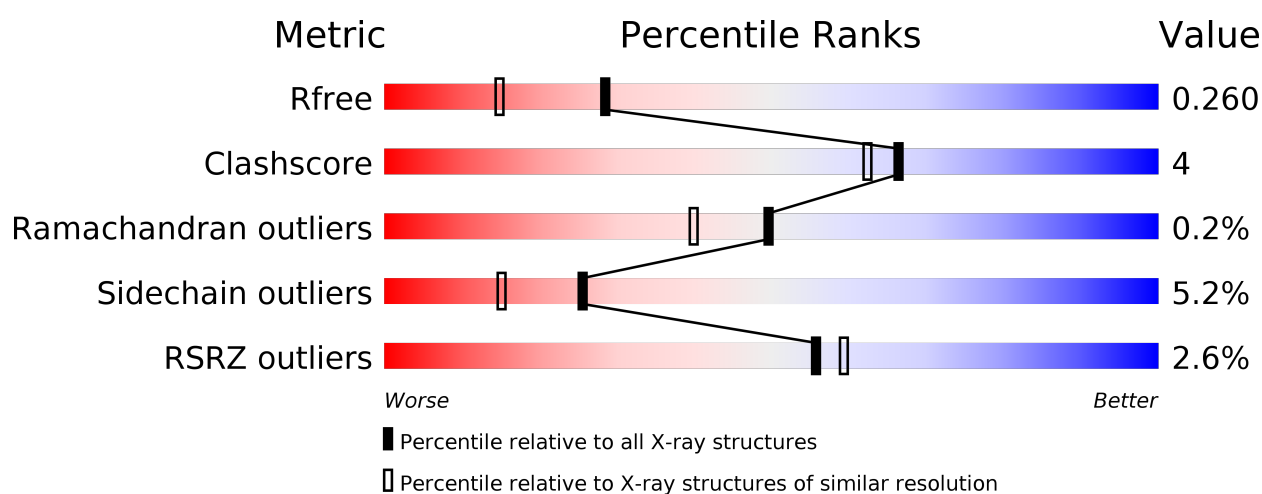


Рисунок 2. Основные показатели качества модели. Черным отмечены перцентили, относительно всех PCA моделей; белым – относительно PCA моделей близкого разрешения.

Значения основных параметров качества структуры:

- R-factor = 0.202
- R-free = 0.254
- 0.42% недопустимых наложений атомов
- 19 (5.2%) остатков с маргинальными по отклонению от ротаметров боковыми цепями
- 4 (0.95%) число Cβ-атомов с отклонением от ожидаемого положения >0.25Å
- 12 (2.6%) со слишком высоким RSRZ

Карта Рамачандрана

На карте (Рисунок 2) можно увидеть, что в области разрешенных конформаций не попал только один остаток из всей структуры (A 178 ALA). То есть 99.8% всех остатков находятся в разрешенной области, причем 96.8% в предпочитаемой области карты.

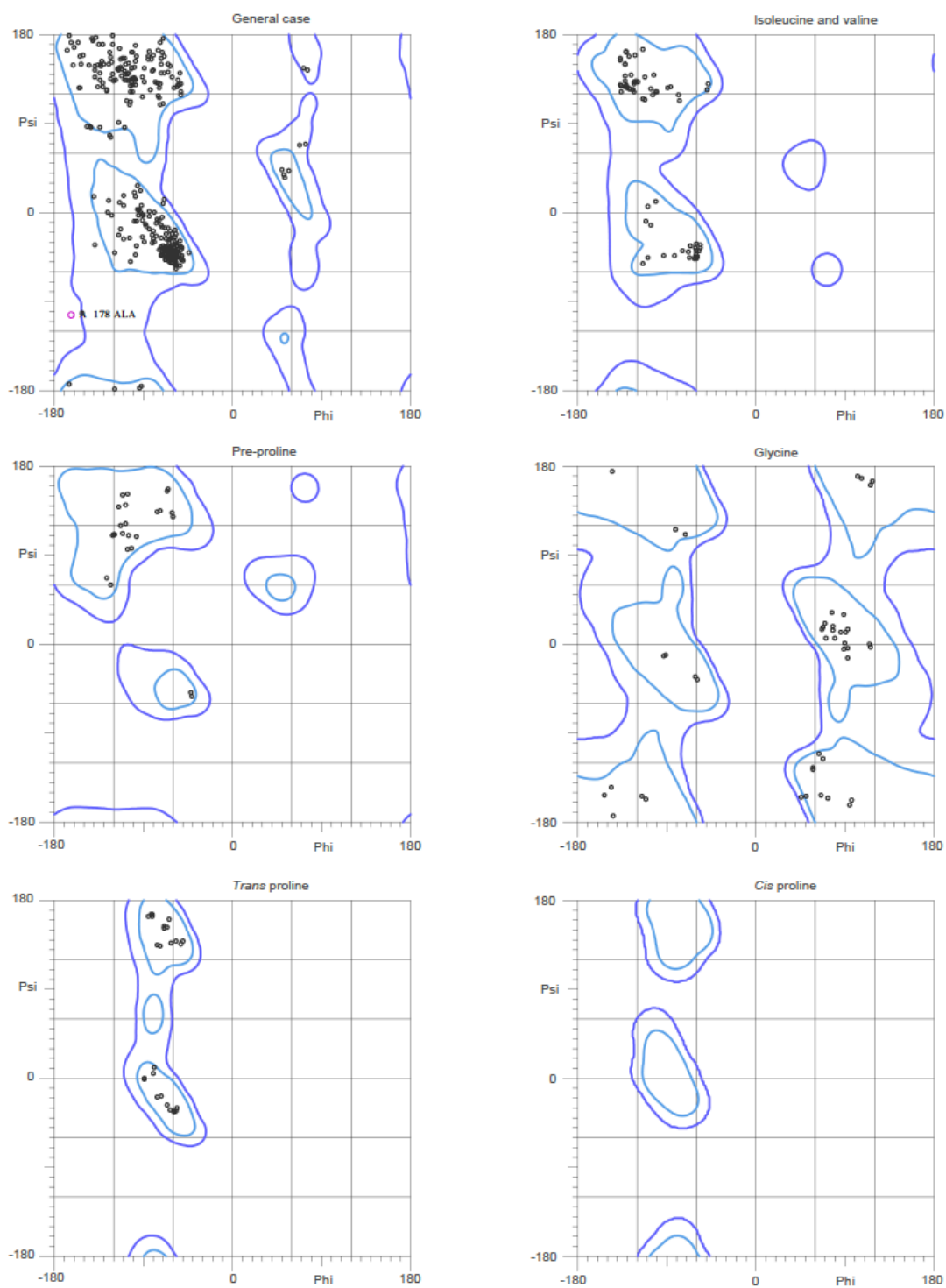


Рисунок 3. Карта Рамачандрана для аминокислотных остатков структуры 2WHG, полученная с помощью сервиса MolProbity

Маргинальные остатки

Анализ результатов рентгено-структурного эксперимента и построение модели структуры изучаемого белка не является полностью формализованным процессом, поэтому возможно возникновение различных неточностей и ошибок при расшифровке структуры. Одним из показателей качества структуры является наличие и доля маргинальных остатков – то есть имеющих те или иные характеристики, отличающиеся от стандартных для большинства белков. Однако маргинальные остатки могут также возникать в действительности, если это необходимо для выполнения специфической функции.

Маргинальные остатки для выбранной структуры были обнаружены с помощью сервиса MolProbity. В таблице приведены некоторые из них:

Таблица 2. Примеры маргинальных остатков

Остаток	Проблема
A 178 ALA	запрещенная область карты Рамачандрана
A, B 183 ASN	по отклонению от ротамеров боковыми цепями, отклонение Cbeta
A 36 VAL	
B 36 VAL (A, B)	по отклонению от ротамеров боковыми цепями
A 260 LYS	по отклонению от ротамеров боковыми цепями, недопустимое наложение атомов
B 229 HIS	недопустимые длина (ND1-CE1) и угол (CB-CG- CD2) связей; необходимость инверсии боковой цепи
A 254 ASN	подозрение на необходимость инверсии боковой цепи
A 192 ASN	
A 2279 HOH	недопустимое наложение атомов
A 57 ILE	
A 171 GLU	
A, B 41 VAL	завышенный RSR-factor,
B 32 GLU	
B 157 GLY	
B 261 ASN	завышенный RSR-factor, по отклонению от ротамеров боковыми цепями

Для более детального рассмотрения были выбраны 5 остатков, имеющих одну или две характеристики, отличающиеся от стандартных. В таблице приведены остатки и значения показателей, по которым они были признаны маргинальными.

Таблица 3. Пять остатков, выбранных для подробного рассмотрения

Остаток	Показатели маргинальности	Значения
A 36 VAL	Cbeta deviation	0.26A
	Chi angles	13.2 (0%)
A 183 ASN	Cbeta deviation	0.30A
	Chi angles	49.9;206 (0.1%)
A 260 LYS	Clash	0.62A (HD2 with A 216 LEU HB3)
	Chi angles	259.8,101.4,83.5,63.9 (0%)
B 229 HIS	Bond lengths	ND1 - CE1: 5.4 σ ;
	Bond angles	CB - CG - CD2: 6.5 σ
	Inversion	Orig -2; Flip 0.44
B 261 ASN	RSR	0.302 (Z = 3.17)
	Chi angles	36.3, 244.5 (0.1%)

A 36 VAL

Расположен близи N-конца цепи, у границы петли и небольшого (5 остатков) предсказанного участка альфа-спирали. В цепи B данный остаток имеет две записи, что лишний раз подтверждает вариативность расположения этого остатка.

Таблица 4. Записи об остатке B 36 VAL в выдаче MolProbity.

B 36	A	VAL	39.14	-	Favored (37.09%) Ile or Val / -56.1,-33.8	OUTLIER (0%) chi angles: 27.7	0.16Å	-	-
B 36	B	VAL	39.14	-	Favored (44.85%) Ile or Val / -56.1,-36.4	OUTLIER (0%) chi angles: 27.7	0.16Å	-	-

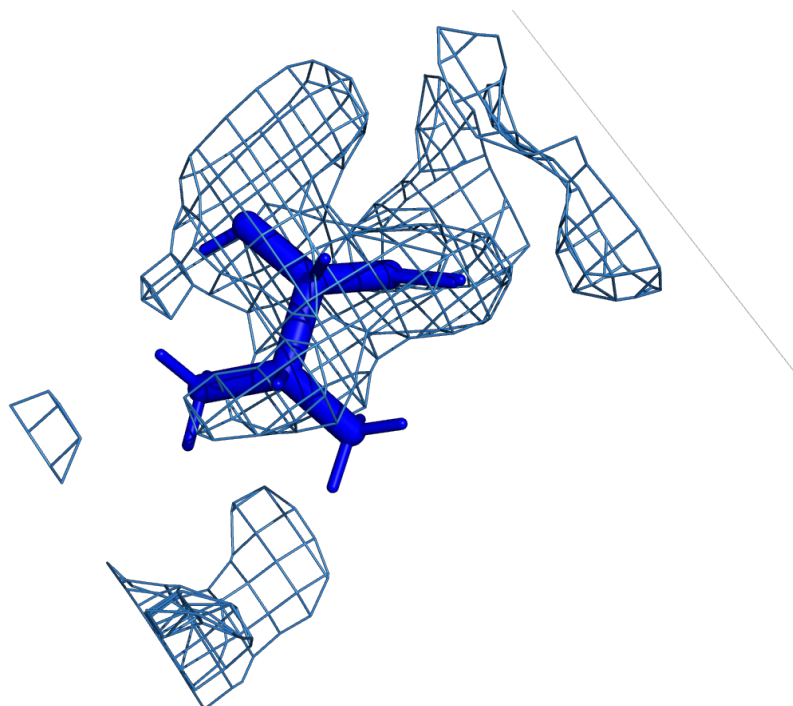


Рисунок 4. Остаток A 36 VAL, уровень обрезки электронной плотности 1.5 сигм;

A 183 ASN

Расположен на петле, данный элемент вторичной структуры имеет наименее жесткую структуру и обычно характеризуется большой вариативностью положения цепи. Таким образом, вероятнее всего ошибка расшифровки связана с вариативностью данной области в ячейках кристалла.

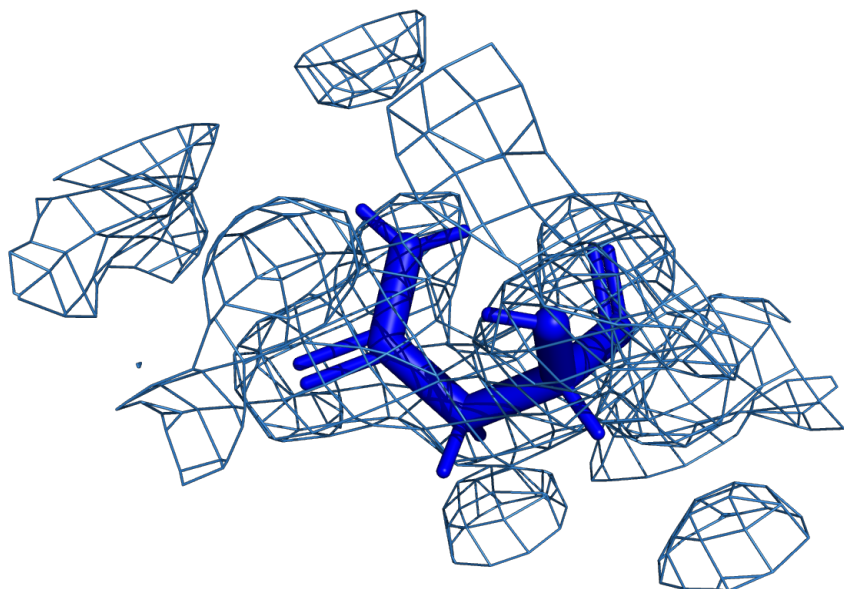


Рисунок 5. Остаток A 183 ASN, уровень обрезки электронной плотности 1.5 сигм

A 260 LYS

Судя по степени соответствия модели данного остатка электронной плотности - сгущение обнаруживается на уровне обрезки 1 сигма – он был расположен по-разному в различных ячейках кристалла.

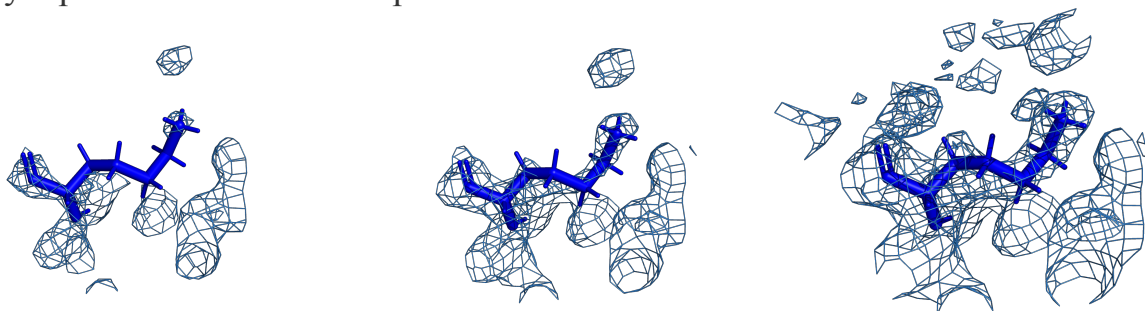


Рисунок 6. Остаток A 260 LYS, уровень обрезки электронной плотности слева направо: 1.5 сигма; 1 сигма; 0.5 сигма

Это подтверждается также тем, что данный лизин расположен на поверхности глобулы, а также на С-конце цепи, он достаточно гибкий, значит в данном окружении может не иметь однозначной расшифровки.

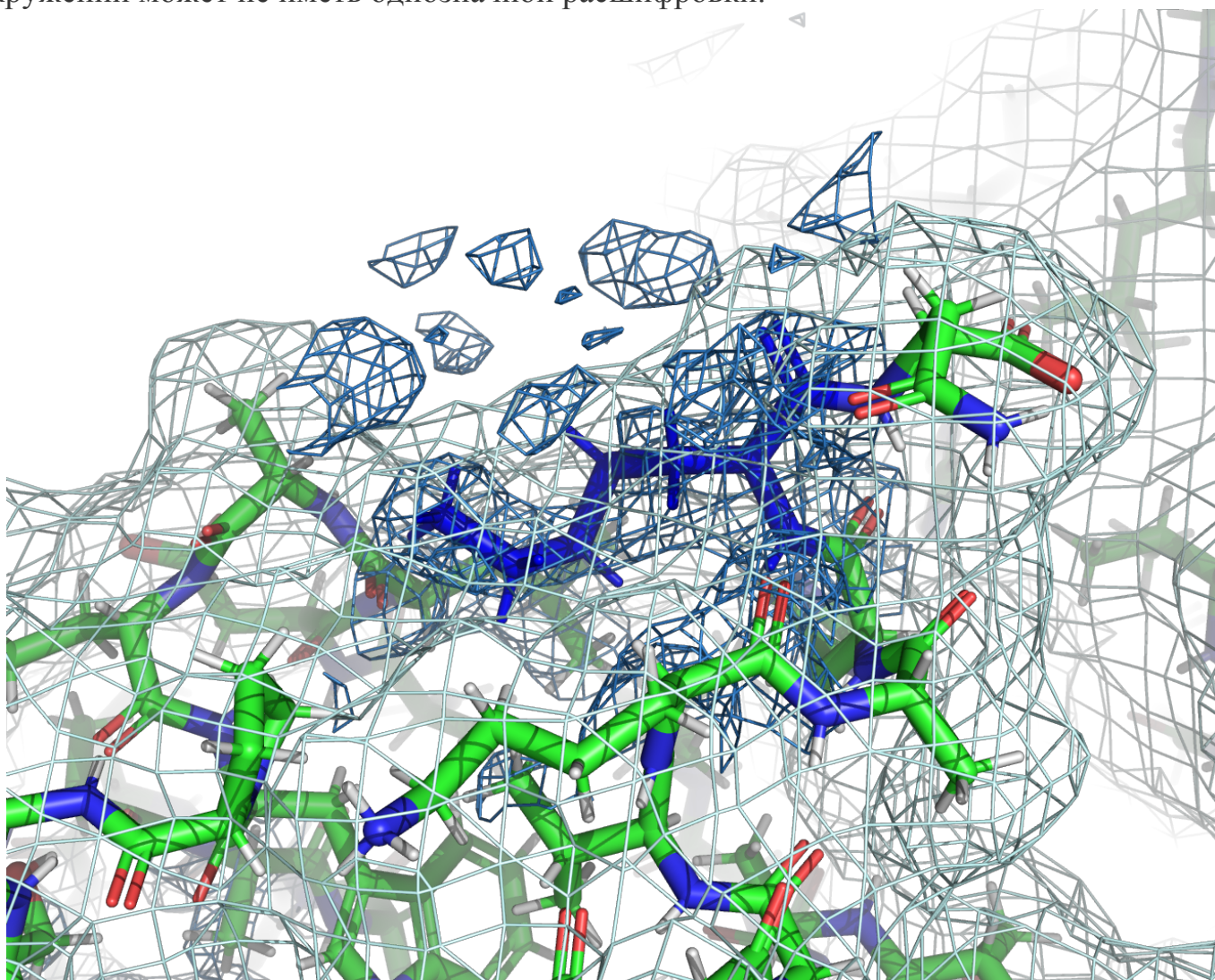


Рисунок 7. Расположение A 260 LYS на поверхности белковой глобулы.

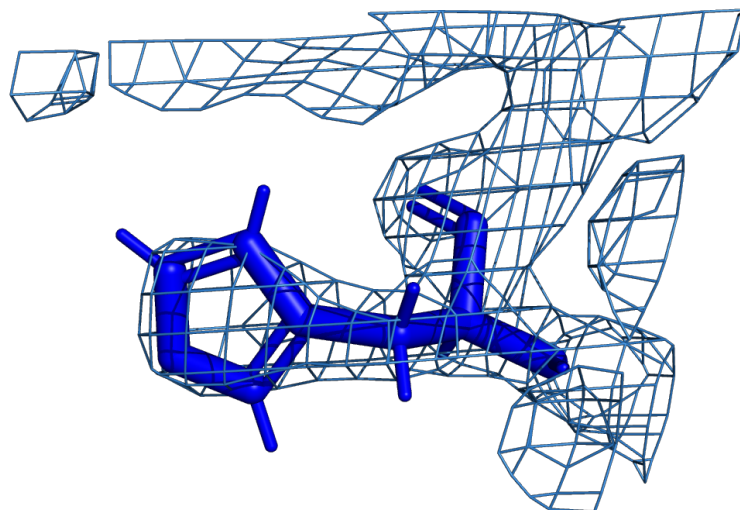


Рисунок 8. Остаток В 229 HIS, уровень обрезки электронной плотности 1.5 сигм

Данный гистидин хорошо вписывается в свою электронную плотность, однако расположен на поверхности белка, что способствует вариативности положения.

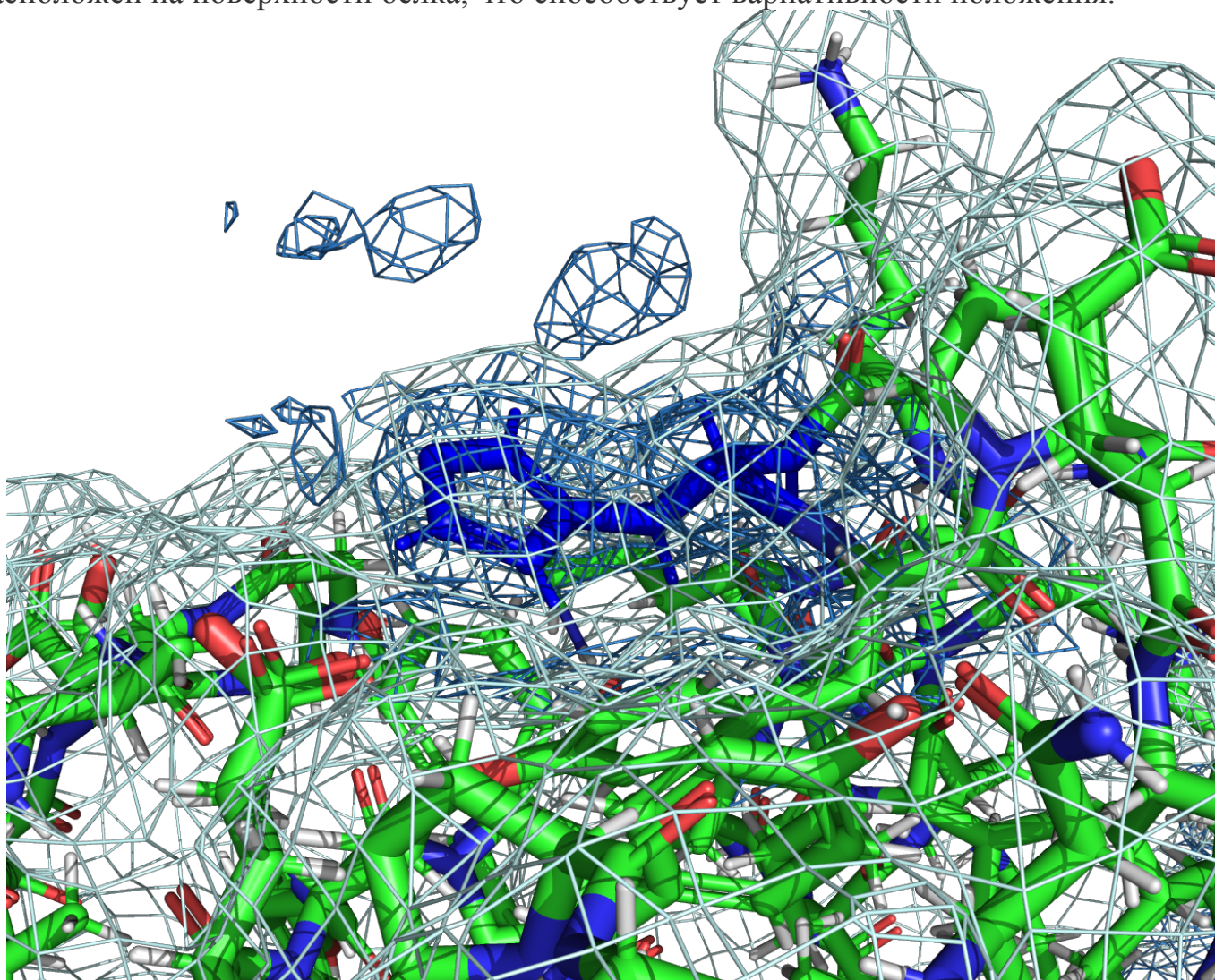


Рисунок 9. Расположение В 229 HIS на поверхности белковой глобулы.

В 261 ASN

Как видно из рисунка 10, модель данного остатка имеет слабое совпадение с экспериментальной электронной плотностью. Только на уровне обрезки 1 - 0.5 обнаруживается сгущение электронной плотности вокруг модели остатка.

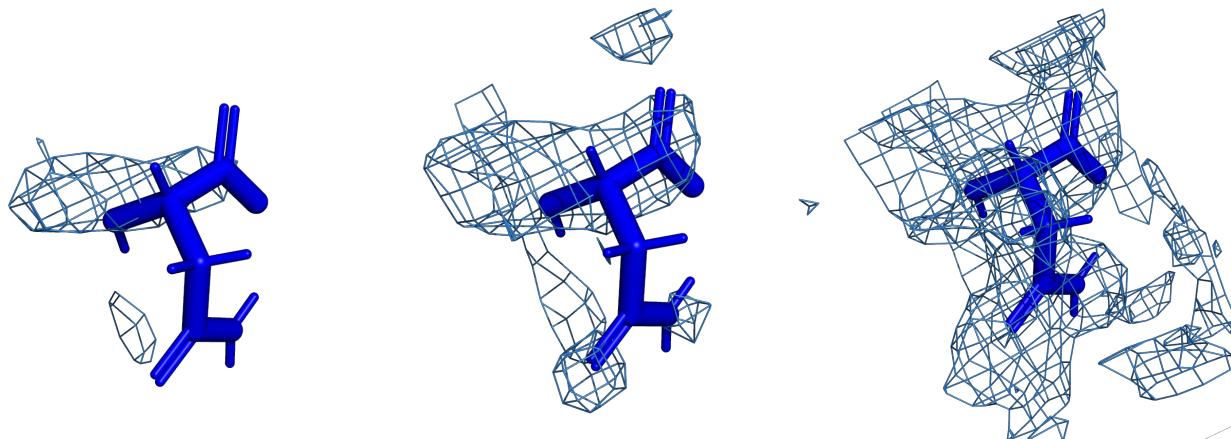


Рисунок 10. Остаток В 261 ASN, уровень обрезки электронной плотности слева направо: 1.5 сигм, 1 сигмы, 0.5 сигм

Вероятнее всего, данный остаток оказался маргинальным в связи с тем, что расположен на поверхности белка (Рисунок 11), а также близко к С-концу белковой цепи и достаточно подвижен.

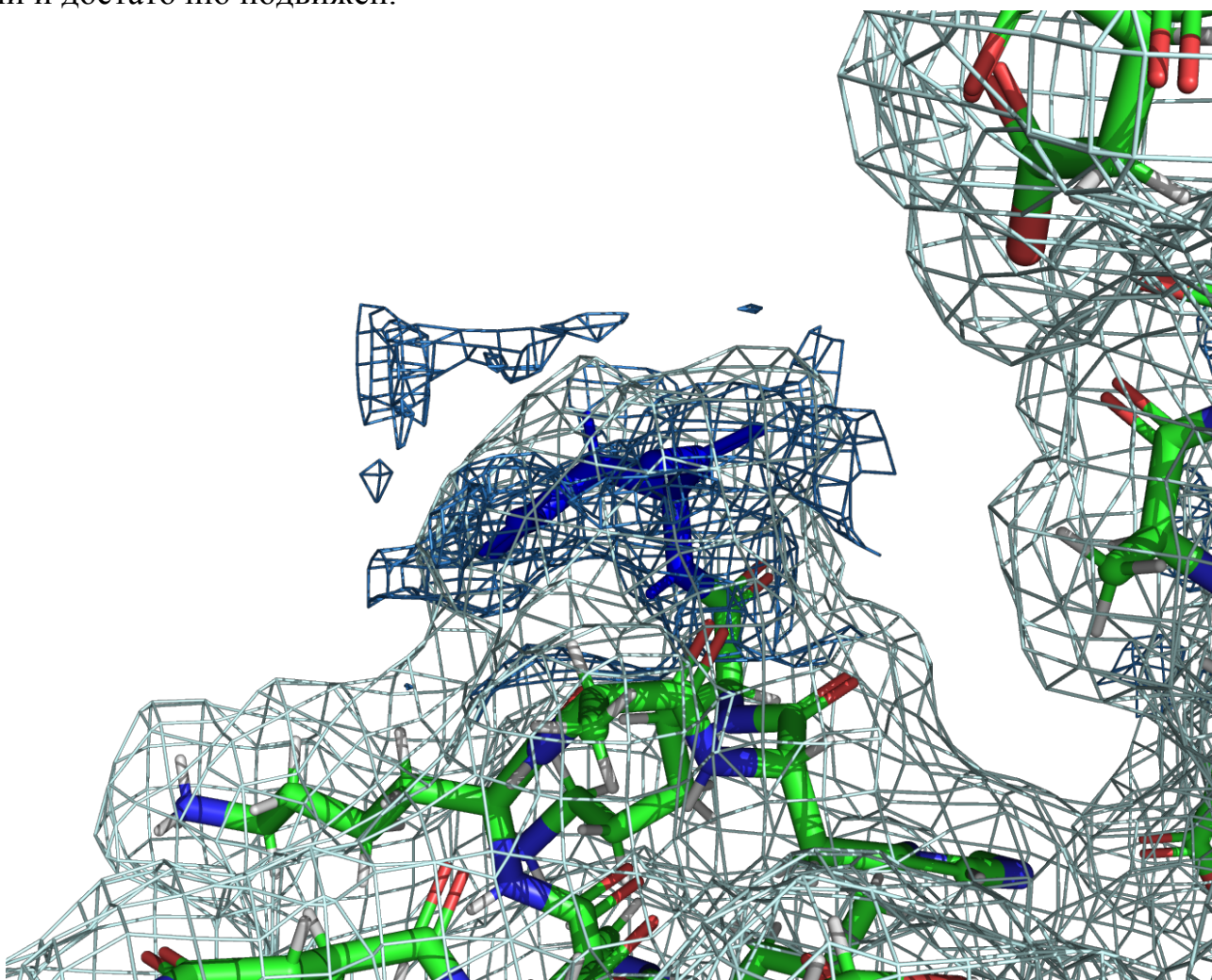


Рисунок 11. Расположение В 261 ASN на поверхности белковой глобулы.

Сравнение модели из PDB с моделью из PDB_redo

База данных PDB_redo содержит усовершенствованные версии структур, размещенных в PDB. В улучшенной модели данной структуры PDB_redo изменено положение отдельных остатков, увеличено их соответствие электронной плотности и областям карты Рамачандрана. Например, положение VAL 36 в обеих цепях.

Всего произведены следующие изменения: замена 5 ротамеров, исключение 30 молекул воды, улучшение соответствия электронной плотности для 15 остатков и ухудшение 1 остатка. Интегральные показатели также улучшились: напрямую связанные с изменениями (уменьшение числа маргинальных остатков по карте Рамачандрана и соответствию электронной плотности), а также *R-free*.

Заключение

В целом качество структуры можно оценить как хорошее, о чем говорят интегральные показатели, а также тот факт, что изученные маргинальные остатки, по всей видимости, не являются принципиальными ошибками расшифровки и не несут особой функции, а находятся в гибких областях белковой глобулы, расположение белка в которых может различаться от ячейки к ячейке кристалла.

Список литературы

1. <https://www.rcsb.org/structure/2WHG>
2. Lassaux, P. *et al.* Biochemical and Structural Characterization of the Subclass B1 Metallo- β -Lactamase VIM-4. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1248–1255 (2011).
3. <http://eds.bmc.uu.se/>
4. <http://molprobit.biochem.duke.edu/>