

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Факультет биоинженерии и биоинформатики

Отчет студентки 4 курса Зои Червонцевой

**Критический анализ модели белка марганец-зависимой
неорганической пирофосфатазы II рода,
представленной в банке PDB, код 1WPN**

27 декабря 2012 г.
Москва

Аннотация

В данной работе проведен анализ структуры 1WPN. Оценено общее качество структуры, обнаружены и проанализированы отдельные маргинальные остатки, сделаны выводы о качестве структуры, причинах возникновения маргинальных остатков и некоторых особенностях их расположения в структуре белка.

Введение

Марганец-зависимая неорганическая пирофосфатаза II рода из *B.subtilis* (EC 3.6.1.1) – фермент семейства гидролаз, катализирующий процесс гидролиза дифосфата. Формы этого белка с массой порядка 90 кДа встречаются в тонопластах растений и грибов, там, где происходит закачка протонов из цитозоли в вакуоль. [1]

Reaction catalyzed by inorganic diphosphatase (3.6.1.1)

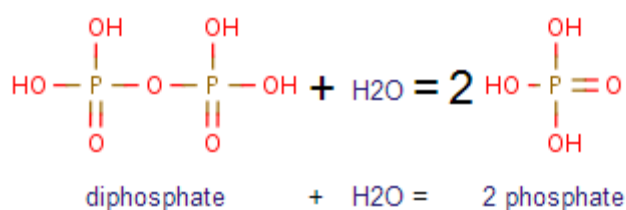


Рис.1. Реакция, катализируемая EC3.6.1.1.

В своей статье [2] *Goldman et al.* получили структуры 2-х ферментов из *Bacillus subtilis*: связанного с ионами Mn²⁺ SO₄²⁻ и несвязанного с ионами металла, а также 1-го фермента из *Streptococcus gordonii*, связанного с ионами Zn²⁺ и SO₄²⁻. На основе полученных данных был предложен механизм активации/ингибирования фермента связыванием с ионами металлов.

Результаты анализа статьи

1) Общая информация о структуре.

- a. Исследуемая структура 1WPN содержит структуру фермента с ионами Mn^{2+} и SO_4^{2-} ;
- b. Год публикации – 2004;
- c. Авторы - Igor P. Fabrichniy, Lari Lehtio, Anu Salminen, Anton V. Zyryanov, Alexander A. Baykov, Reijo Lahti, Adrian Goldman;
- d. При получении структуры применен метод решения фазовой проблемы – молекулярное замещение на основе структуры 1K20;
- e. Измерено 102851 рефлексов разрешением от 19.58 до 1.40 Å;
- f. Разрешение структуры – 1.40 Å, полнота данных – 99.3 %.

2) Самотестирование качества структуры авторами – R-free.

- a. R-фактор = 0.14025 и R-free фактор = 0.16648
- b. Значения R-value и R-free приемлемые, даже хорошие (<0.2). Отклонение R-free от R-value составляет 0.027 – совсем небольшое, значит, модель, вероятно, близка к истинной структуре.
- c. По результатам анализа PROCHECK, 91.2% а.о. попали в благоприятную область, а в запрещенной области вообще нет ни одного остатка, что является хорошим результатом.

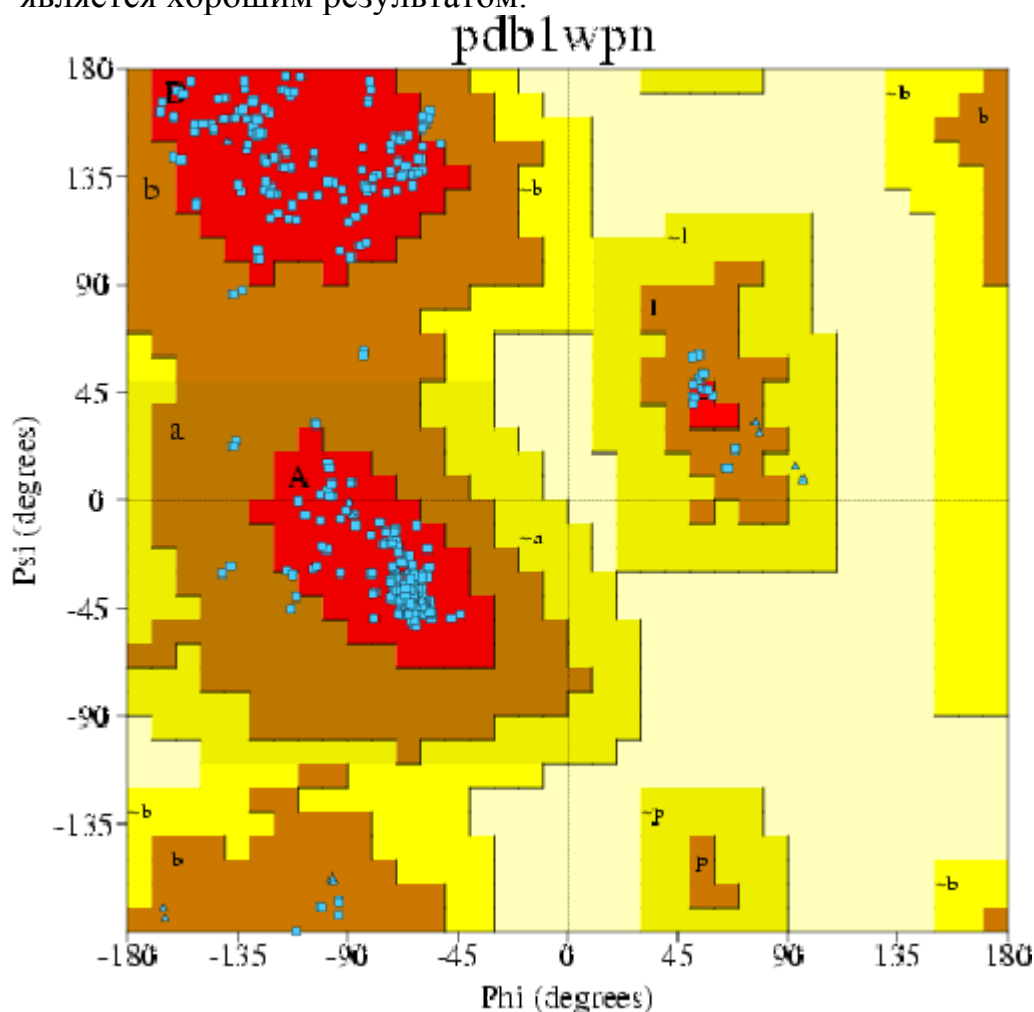
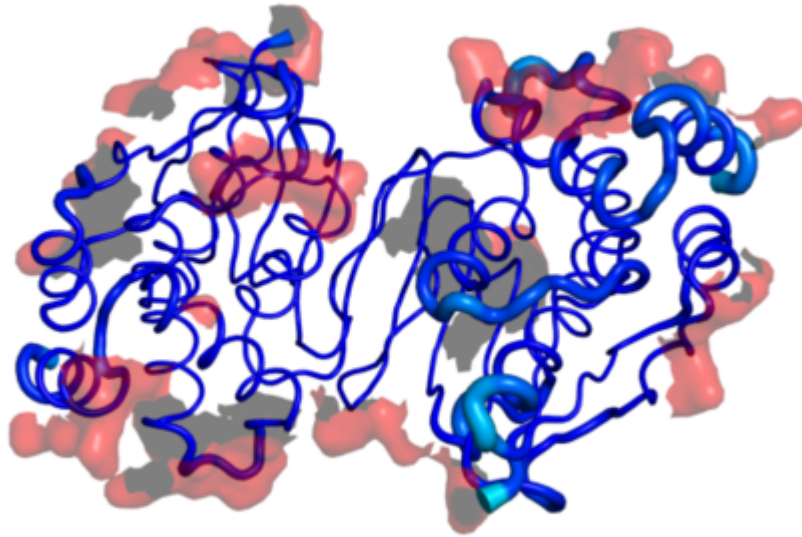


Рис.3. Карта Рамачандрана для 1WPN.

- d. B-фактор, рассчитываемый для каждого атома, показывает насколько его электронная плотность шире, чем у идеальной модели. Для данной модели он порядка 11.1 в среднем, что находится в допустимых пределах.

1wpr

PDB



PDB

1wpr

Рис. 4. B-факторы показаны различной толщиной цепи (тонкие = низкие, толстые = высокие). Красные поверхности – места межмолекулярных контактов.

- e. RSR – 9.3%,
Real-space correlation coefficient – 97.2%.
Оба показателя находятся в пределах нормы.
- f. Обнаружено всего 3 маргинальных остатков по RSR: 1 в цепи А и 2 в цепи В. Все они действительно плохо вписаны в электронную плотность (для двух из них представлены картинки из PyMol).

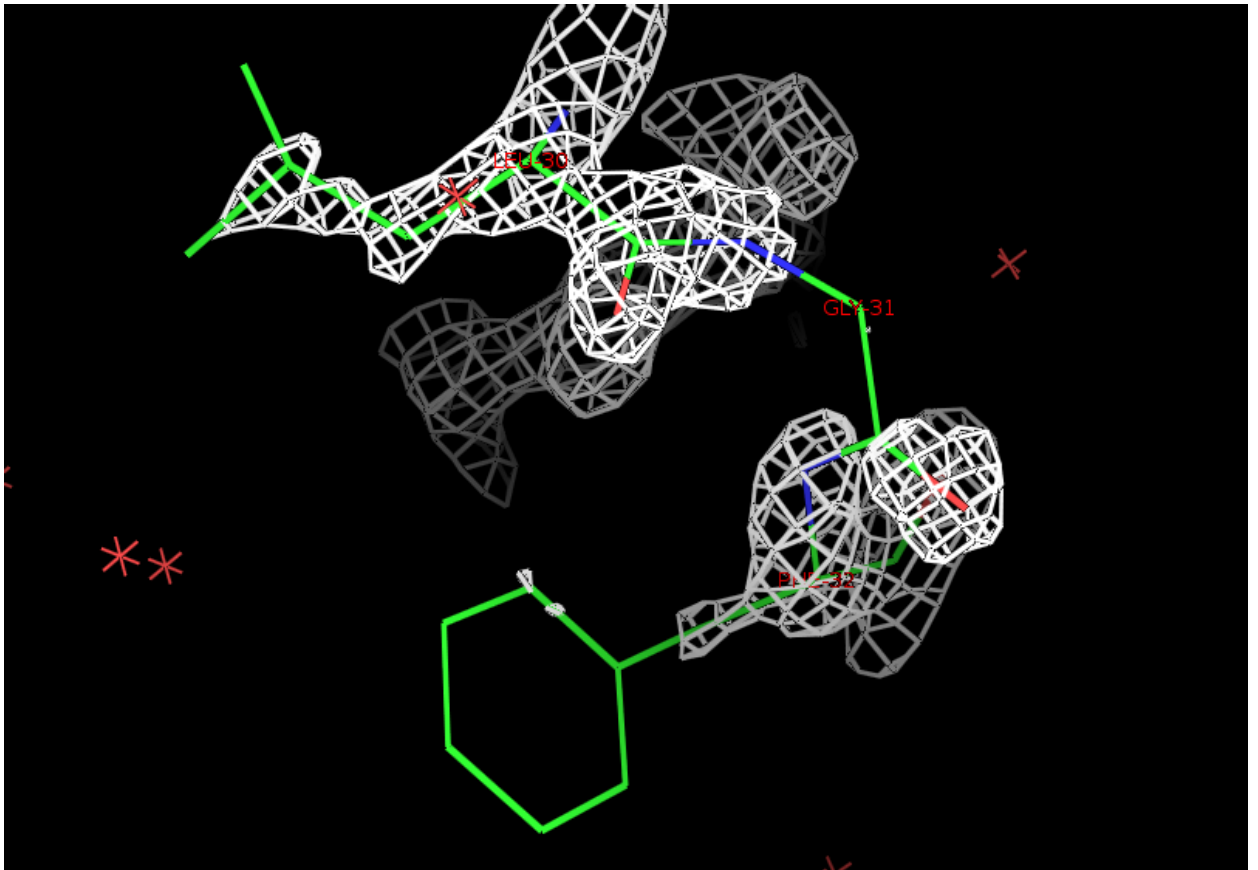


Рис.5. Маргинальный по RSR (0.178) остаток Gly31 ($Z = 2.28$), уровень подрезки 2.

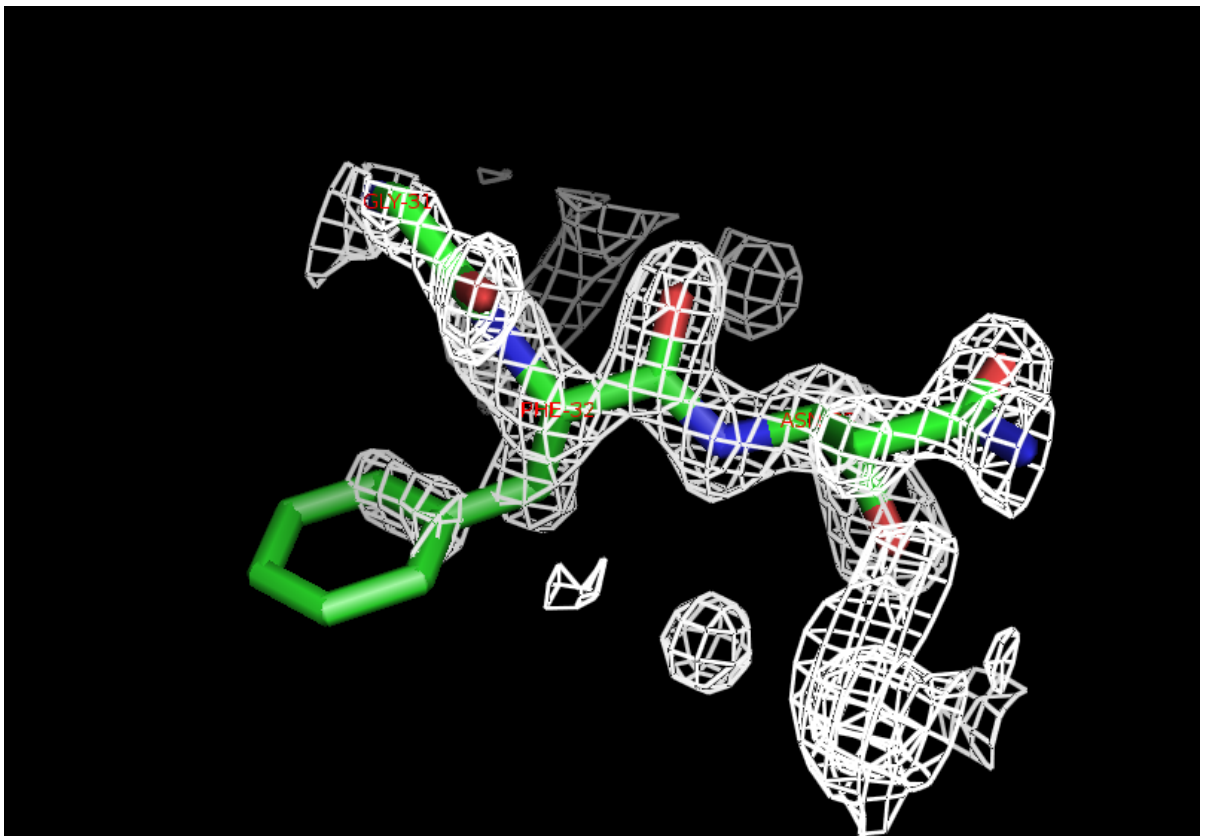


Рис.6. Маргинальный по RSR (0.135) остаток Phe32 ($Z = 2.05$), уровень подрезки 2.

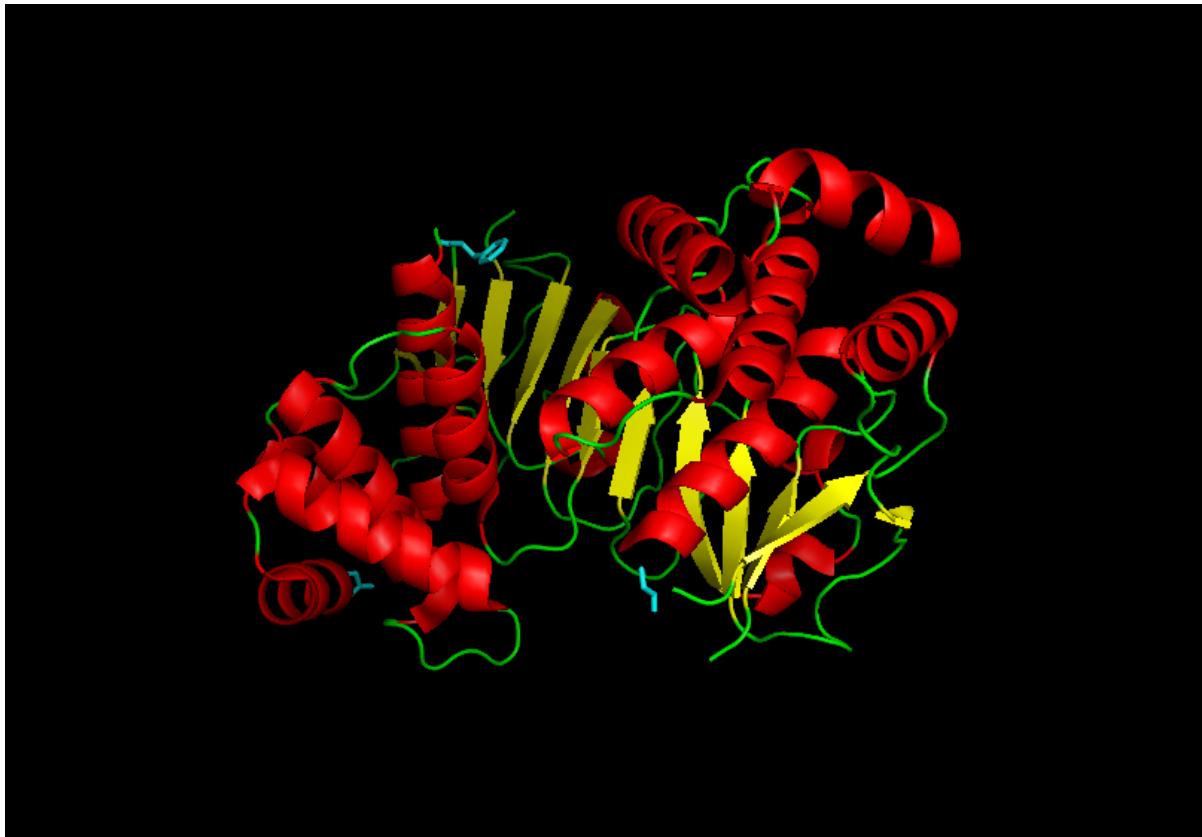


Рис.7. Все три маргинальных по RSR остатка (выделены голубым) на фоне глобулы.

Можно заметить, что все 3 маргинальных остатка находятся на поверхности глобулы, на границах с альфа-спиралями. Скорее всего, это просто ошибки, а не особенности белка, потому как электронную плотность в этих местах перетягивать некому.

g. Анализ с помощью What_Check выявил большое количество недочетов структуры. Например, у 3-х остатков гистидина неправильные углы в кольце (см. рис.).

75	HIS	(76-)	A	CG	ND1	CE1	110.31	4.7
195	HIS	(9-)	B	CG	ND1	CE1	109.64	4.0
283	HIS	(97-)	B	CG	ND1	CE1	109.62	4.0

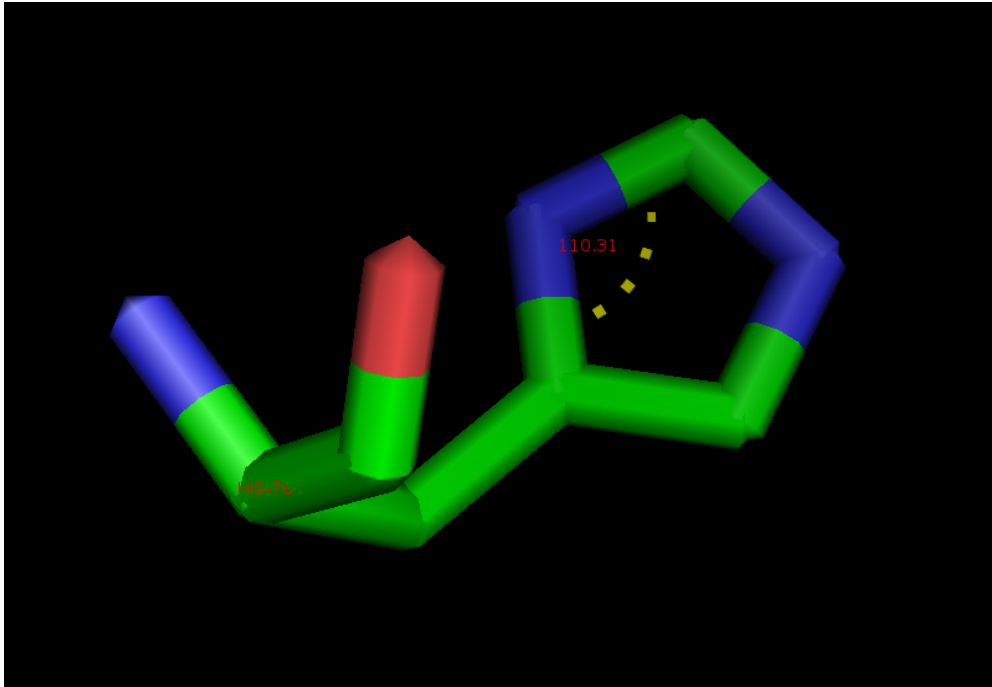


Рис. 8. Нехарактерные углы гистидина.

Однако вполне может быть, что это несоответствие объясняется функциональной важностью этих гистидинов. Они расположены примерно в одном месте в глубине глобулы (см. рис.) и, возможно, участвуют в катализе.



Рис. 9. Расположение маргинальных гистидинов в глобуле белка.

А еще несколько аминокислотных остатков представлены в двух возможных конформациях. У 27-го лизина при этом в одной из конформаций концевой азот оказывается слишком близко к молекуле воды (см. рис.). Из этого можно сделать вывод, что либо вода расположена неправильно, либо реализуется лишь та конформация, которая не конфликтует с таким положением молекулы воды.

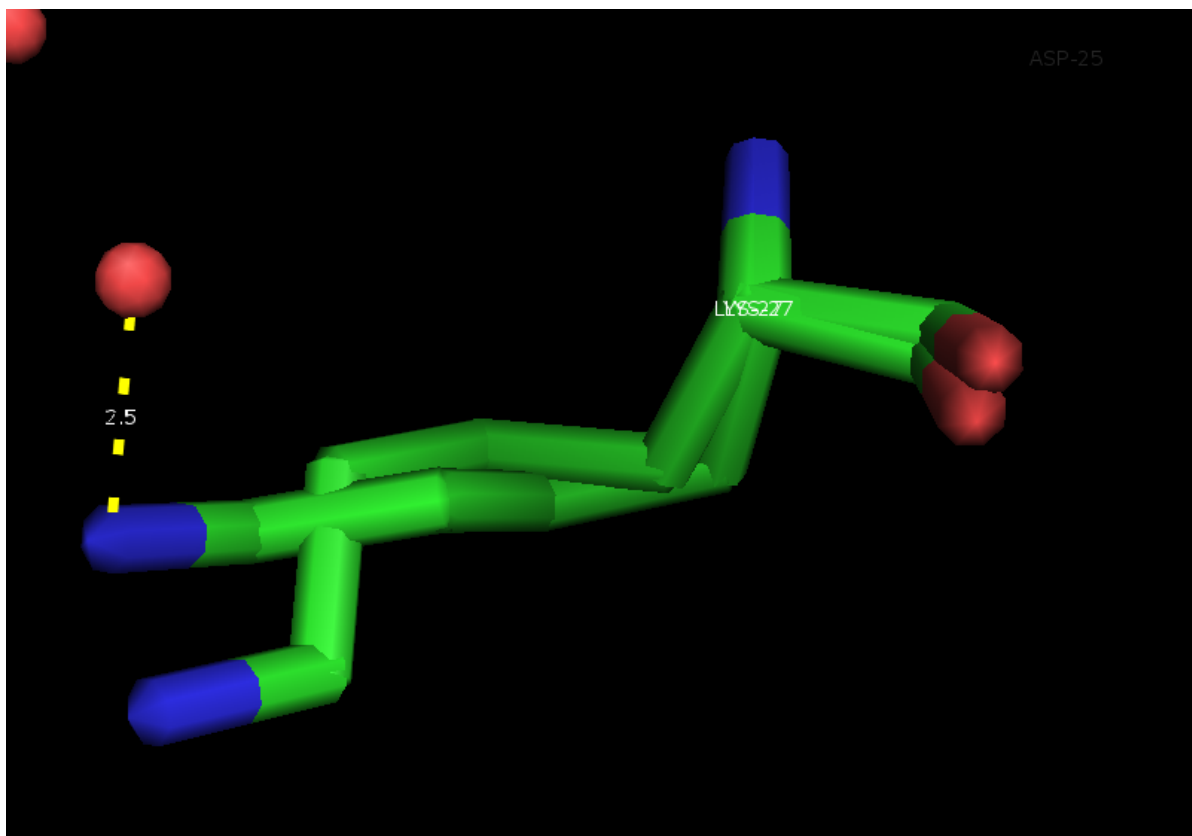


Рис. 10. Маргинальный остаток лизина, расстояние до молекулы воды слишком маленькое.

Заключение

В результате анализа общего качества структуры, маргинальных остатков и протокола WHAT_CHECK выяснилось следующее:

- 1) Общее качество структуры хорошее;
- 2) Точность расположения некоторых боковых групп оставляет желать лучшего;
- 3) Среди маргинальных остатков встречаются как действительно ошибочные, так и те, чья нестандартность обусловлена их расположением.

Литература

1. Brenda database (http://www.brenda-enzymes.org/php/result_flat.php4?ecno=3.6.1.1)
2. I.P.FABRICHNIY, L.LEHTIO, A.SALMINEN, A.B.ZYRYANOV, A.A.BAYKOV, R.LAHTI, A.GOLDMAN “STRUCTURAL STUDIES OF METAL IONS IN FAMILY II PYROPHOSPHATASES: THE REQUIREMENT FOR A JANUS ION” BIOCHEMISTRY V. 43 14403 2004