**Оценка качества расшифровки структуры калий захватывающего белка А из Bacillus subtilis (PDBid = 2HMV)**

Подготовлено Рябых Григорием

**Введение**

Белок А, захватывающий калий из системы ktr – один из двух белков, образующих ионный канал ktrAB, который у прокариот и эукариот участвует в АТФ-зависимом транспорте К+. На сайте uniprot.org указаны ссылки на 10 различных pdb-структур, здесь будет рассмотрена структура 2HMV.

**Общая информация о структуре**

2HMV – структура димера (2 цепи по 144 аминокислотного остатка) белка ktrA из бактреии Bacillus subtilis в комплексе с 2 молекулами АДФ.

Структура была получена в 2006 году[1]. Они разрешили фазовую проблему путем молекулярного замещения, использовали в качестве первичной модели ранее известную структуру KtrAB (PDBid = 1LSU)[2].

В таблице 1 приведены некоторые параметры структуры, взятые с сайта PDB.

Таблица1. Общая информация о структуре 2HMV.

|  |  |
| --- | --- |
| **Параметр** | **Значение** |
| Разрешение | 2,2 Å |
| R-фактор | 0,228 |
| Свободный R-фактор (R-free) | 0,244 |
| Число рефлексов  | 20328 |
| Полнота данных | 97,6% |
| Число рефлексов для построения R-free | 2002 |
| Параметры ячейки | **a:** 127,46Å **b:** 127,46Å **c:** 51,40Å**α:** 90,00° **β:** 90,00° **γ:** 90,00° |
|  |

**Оценка качества расшифровки структуры**

Судить о качестве расшифровки структуры можно по нескольким показателям, в числе которых R-фактор (показатель близости экспериментальных данных к модели), свободный R-фактор (показатели степени оптимизации), а также число маргинальных аминокислотных остатков (то есть остатков с нехарактерными показателями углов и длин связей, RSR, нехарактерным окружением и так далее). В записи на сайте PDB есть краткая оценка данных параметров (рис. 1). Она строится на статистике по базе данных PDB, сравнивая качество данной модели с другими, и в качестве меры качества выдает перцентиль, соответствующий данной структуре из распределения этого показателя среди всех структур с примерно таким же разрешением или вообще всех структур.



Рисунок 1. Оценка значений параметров качества для структуры 2HMV, взятая с сайта PDB.

Из рисунка 1 видно, что почти все показатели имеют значения хуже, чем в среднем. Только значения Rfree и RSRZ outliers такое же или немного лучше. Особенно много наложений плотностей атомов (Clashscore) – намного хуже, чем в среднем.

Также из PDB (через интерфейс EMBL-EBI) можно получить некоторую информацию о маргинальных остатках (подробнее см ниже), она записана в таблице 2.

Таблица 2. Маргинальные остатки структуры 2HMV.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Параметр маргинальности**  | **Число остатков** | **Процент от суммарного числа остатков (%)** |
| Угол между связями | 0 | 0 |
| Длина связи | 0 | 0 |
| Вписанность в карту электронной плотности | 7 | 2,55 |
| Карта Рамачандрана | 2 | 0,74 |
| Ротамеры | 14 | 6,17 |

Также с сайта PDB можно получить полный отчет об уточнении структуры [3].

Более подробную информацию (частично дублирующую информацию из PDB) о качестве структуры выдаёт сервис MolProbity. В таблице 3 представлена информация, полученная для структуры 2HMV.

Таблица 3. Информация о качестве структуры, полученная из MolProbity.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **Параметр** | **Значение** | **Процент** | **Порог** |
| ProteinGeometry | Poor rotamers | 16 | 7.05% | Goal: <0.3% |
| Favored rotamers | 194 | 85.46% | Goal: >98% |
| Ramachandran outliers | 2 | 0.74% | Goal: <0.05% |
| Ramachandran favored | 257 | 95.19% | Goal: >98% |
| Cβ deviations >0.25Å | 0 | 0.00% | Goal: 0 |
| Bad bonds: | 7 / 2237 | 0.31% | Goal: 0% |
| Bad angles: | 0 / 3041 | 0.00% | Goal: <0.1% |
| Peptide Omegas | Cis Prolines: | 0 / 4 | 0.00% | Expected: ≤1 per chain, or ≤5% |

Таблица 4. Список маргинальных остатков [4].

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Цепь** | **Номер остатка**  | **Остаток** | **Критерий маргинальности** |
| A | 143 | Asn | Карта Рамачандрана |
| В | 138 | Asp | Карта Рамачандрана |
| А | 16 | Arg | Ротамер  |
| А | 21 | Ile | Ротамер |
| А | 33 | Leu | Ротамер |
| А | 96 | Asp | Ротамер |
| В | 21 | Ile | Ротамер |
| В | 33 | Leu | Ротамер |
| В | 86 | Thr | Ротамер |
| В | 89 | Thr | Ротамер |
| В | 96 | Asp | Ротамер |
| В | 100 | Ile | Ротамер |
| В | 120 | Arg | Ротамер |
| В | 125 | Glu | Ротамер |
| В | 139 | Glu | Ротамер |
| В | 140 | Asn | Ротамер |
| B | 141 | Val | Вписанность в карту электронной плотности |
| B | 140 | Asn | Вписанность в карту электронной плотности |
| A | 6 | Asn | Вписанность в карту электронной плотности |
| B | 139 | Glu | Вписанность в карту электронной плотности |
| A | 142 | Leu | Вписанность в карту электронной плотности |
| A | 141 | Val | Вписанность в карту электронной плотности |
| A | 144 | Tyr | Вписанность в карту электронной плотности |

Любопытно, что на PDB указано 14 остатков с неподходящими ротамерами, а MolProbity выдает 16. Судя по данным PDB, маргинальных остатков всего 23, 14 из них плохими ротамерами, то есть с нестандартной конформацией боковой цепи. 23 маргинальных остатка на весь белок – по моему мнению, многовато. Стоит отметить, что довольно распространенный тип маргинальности - нахождение торсионных углов основных цепей в запрещенных областях карты Рамачандрана – всего 2 по данным MolProbity и PDB (рис. 2).

Кроме того, в структуре присутствует 7 остатков, которые плохо вписываются в электронную плотность (4 в цепи А и 3 в цепи B). У этих остатков Z-скор по RSR больше 2. На рисунке 3 показан пример таких остатков (структура и электронная плотность визуализированы через PyMOL). Видно, что в электронную плотность частично не вписываются боковые группы остатков.



Рисунок 2. Распределение торсионных углов в структуре 2HMV по карте Рамачандрана. 2 маргинальных остатка выделены на левой верхней карте.



Рисунок 3. Остаток Leu142 цепи А, вокруг которого визуализирована электронная плотность с уровнем подрезки 1.

Для изучаемой структуры была построена модель PDB\_REDO[5]. Её параметры были оценены, как и для исходной структуры, с помощью сервиса MolProbity. Результат показан в таблице 5.

Таблица 5. Информация о качестве структуры PDB\_REDO, полученная из MolProbity.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| All-AtomContacts | Clashscore, all atoms: | 2.96 | 100th percentile\* (N=456, 2.20Å ± 0.25Å) |
| Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms. |
| ProteinGeometry | Poor rotamers | 6 | 2.63% | Goal: <0.3% |
| Favored rotamers | 209 | 91.67% | Goal: >98% |
| Ramachandran outliers | 0 | 0.00% | Goal: <0.05% |
| Ramachandran favored | 264 | 97.78% | Goal: >98% |
| MolProbity score^ | 1.46 | 99th percentile\* (N=10167, 2.20Å ± 0.25Å) |
| Cβ deviations >0.25Å | 1 | 0.39% | Goal: 0 |
| Bad bonds: | 0 / 2240 | 0.00% | Goal: 0% |
| Bad angles: | 0 / 3045 | 0.00% | Goal: <0.1% |
| Peptide Omegas | Cis Prolines: | 0 / 4 | 0.00% | Expected: ≤1 per chain, or ≤5% |

Если сравнить таблицу 5 с таблицей 2, видно, что структура PDB\_REDO явно лучше. В ней отсутствуют маргинальные остатки по углам и длинам связей. А также увеличилось количество хороших ротамеров (Favored rotamers) и остатков в преимущественных областях на карте Рамачандрана (Ramachandran favored).

**Вывод**

2HMV – пример структуры среднего качества. При данном разрешении и полноте данных расшифровка могла бы иметь лучшие показатели, что наблюдается в структуре с сайта PDB\_REDO.

**Ссылки**

[1] Albright RA, Ibar JL, Kim CU, Gruner SM, Morais-Cabral JH. The RCK domain of the KtrAB K+ transporter: multiple conformations of an octameric ring. Cell. 2006 Sep 22;126(6):1147-59.

[2] Roosild TP, Miller S, Booth IR, Choe S. A mechanism of regulating transmembrane potassium flux through a ligand-mediated conformational switch. Cell. 2002 Jun 14;109(6):781-91.

[3] <http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/2hmv/experiment>

[4] <http://ftp.wwpdb.org/pub/pdb/validation_reports/hm/2hmv/2hmv_full_validation.pdf>

[5] <http://www.cmbi.ru.nl/pdb_redo/hm/2hmv/index.html>