

## Практикум 4

ссылки на сессии:

[https://kodomo.fbb.msu.ru/~kmd/term7/hw4\\_1.pse](https://kodomo.fbb.msu.ru/~kmd/term7/hw4_1.pse)

[https://kodomo.fbb.msu.ru/~kmd/term7/hw4\\_2.pse](https://kodomo.fbb.msu.ru/~kmd/term7/hw4_2.pse)

[https://kodomo.fbb.msu.ru/~kmd/term7/hw4\\_3.pse](https://kodomo.fbb.msu.ru/~kmd/term7/hw4_3.pse)

### Задание 1.

Для данного практикума была предоставлена структура 1ZEN. Это структура фруктозо-1,6-бисфосфат альдозазы класса 2 из *E. coli*. Данной структуре соответствуют следующие параметры. Разрешение – 2.50 Å, R-Value – 0.243, R-Value Free – 0.326. Из рисунка ниже видно, что не все остатки структуры полностью покрыты электронной плотностью. Например остатки с 230 по 235 покрыты электронной плотностью очень слабо, как и остатки с 308 по 310 и с 365 по 269. Помимо этого электронной плотностью не полностью покрыты и некоторые другие единичные аминокислотные остатки на периферии. Это можно объяснить тем, что остатки на периферии обладают большей подвижностью. Единичные же остатки аминокислот на поверхности вряд ли имеют большую функциональную нагрузку при работе белка.

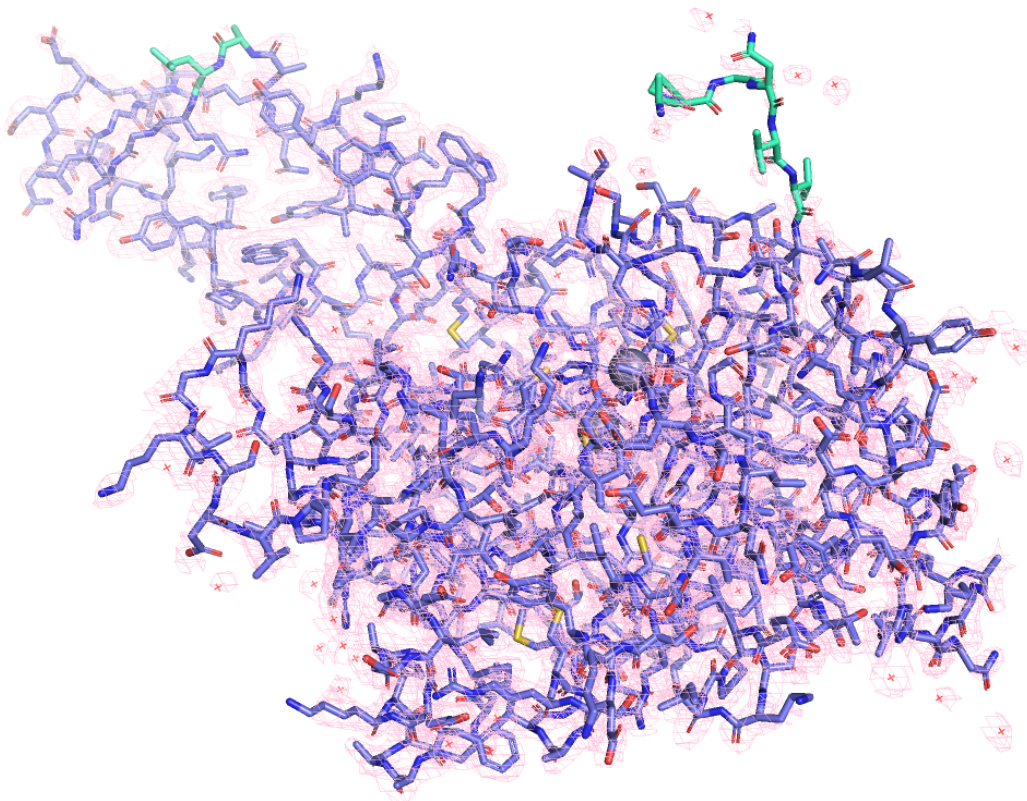


Рис. 1. Структура 1ZEN, покрытая электронной плотностью, голубым покрашены остатки хуже всего покрытые электронной плотностью.

Далее были рассмотрены альтернативные структуры, из которых была выбрана структура 1DOS, т. к. она обладала лучшим разрешением и не включала в состав несмоделированный участок, который находился во всех других структурах. Однако, для данной структуры не было карты электронной плотности, поэтому рассмотреть ее я не смогла. следующей я выбрала структуру с наименьшей длиной несмоделированного участка и также с лучшим разрешением (2.0 Å) – 1B57. После визуализации электронной плотности видно, что продолжительных непокрытых участков нет, но как и в 1ZEN некоторые периферические аминокислотные остатки не полностью покрыты. Таким образом, можно изменить структуру 1ZEN на альтернативную ей 1B57.

Затем я изучила активный центр фермента в статье, описывающей структуры 1ZEN.

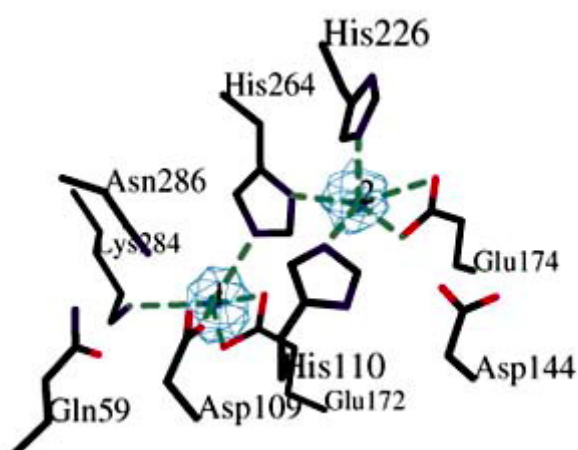


Рис. 2. Активный центр 1ZEN [1].

Ни один из этих остатков не входит в вышеописанные промежутки, не покрытые электронной плотностью. Следовательно “пробелы” в электронной плотности не несут серьезной функциональной значимости.

## Задание 2.

В задании было предложено посмотреть полный отчет валидации структуры, что я и сделала. Согласно этим данным в структуре присутствуют остатки не соответствующие критериям качества с геометрической точки зрения: 35% имеют отклонение по одному параметру, 6% по двум параметрам и 1% по трем параметрам. Также 6% изначально присутствующей в последовательности информации не присутствуют в модели структуры. А 11% аминокислотных остатков слабо покрыты электронной плотностью. Далее были рассмотрены отдельные критерии качества модели структуры. Длины связей соответствуют химически верным значениям. В 2 остатках наблюдается отклонение между углами связей – в 110 гистидине и 232 глицине. Нет нарушений структуры хиральных центров, а также нарушений планарности боковых радикалов. Наблюдается 116 перекрываний Ван дер Ваальсовых радиусов внутри ячейки кристаллической решетки, перекрываний между ячейками не найдено. Выявлено 19 невыгодных с точки зрения карты Рамачандрана торсионных углов основной цепи, а также 23 нарушения ротационной структуры боковой цепи. Однако существует 10 остатков, поворот которых мог бы способствовать

формированию более устойчивой структуры водородных связей и уменьшить перекрывание радиусов атомов.

Далее я использовала программу Molprobitу для предсказания аминокислотных остатков, находящихся в неоптимальной конформации. Сперва был выполнен анализ исходной структуры (без атомов водорода), затем были найдены возможные инверсии, а потом эти инверсии были применены к структуре, после чего снова проведен анализ. Судя по исходной сводной таблице по остаткам и той же таблице после добавления водородов как-то значительно улучшить показатели не удалось. Удалось только избавиться от одного напряженного ротамера.

Chain	Res#	Alt	Res ID	Orig	Flip	Flip-Orig	Code	Explanation
A	22		GLN	-0.88	-0.0044	0.8756	FLIP	Some evidence recommending flip.
A	62		ASN	-1.3	0.77	2.07	FLIP	Clear evidence for flip.
A	79		GLN	-2.1	0.77	2.87	FLIP	Clear evidence for flip.
A	94		HIS	-6.5	-4.6	1.9	CLS-FL	Both orientations clash but flip was preferred.
A	99		HIS	-0.42	0.087	0.507	FLIP	Some evidence recommending flip.
A	198		GLN	-0.82	0	0.82	FLIP	Some evidence recommending flip.
A	224		ASN	-5.8	-0.74	5.06	FLIP	Clear evidence for flip.
A	253		ASN	-1	-0.17	0.83	FLIP	Some evidence recommending flip.
A	264		HIS	-1.7	-0.7	1	FLIP	Some evidence recommending flip.
A	322		GLN	-2.5	-0.41	2.09	FLIP	Clear evidence for flip.

Рис. 3. Аминокислотные остатки, требующие инверсии по данным Molprobitу.

Далее я рассмотрела как расположены два иона металлов в активном центре с помощью сервера Checkmymetal. В PDB указано, что оба иона являются ZN2+, однако, исходя из данных Checkmymetal 359 ион металла вполне может оказаться и K+ и ZN2+.

Затем было выбрано несколько маргинальных остатков для дальнейшего изучения. Первым был выбран остаток гистидина 110, который находится в активном центре и способствует удержанию иона металла. По данным отчета по валидации PDB данный остаток имеет нарушение в угле связи, это же отмечает Molprobitу. Также по данным Molprobitу данный остаток является неоптимальным ротамером, и его С-бета атом отклонен на 0.39 Å. Данный остаток довольно хорошо покрыт электронной плотностью, хотя в одном месте (С-бета атом) все-таки выдается за ее пределы. Он имеет связи с ионом металла а также водородную связь с аспартатом 144. Вероятнее всего изменение местоположения С-бета атома является особенностью данной структуры, т. к. это связано с координацией атома металла.

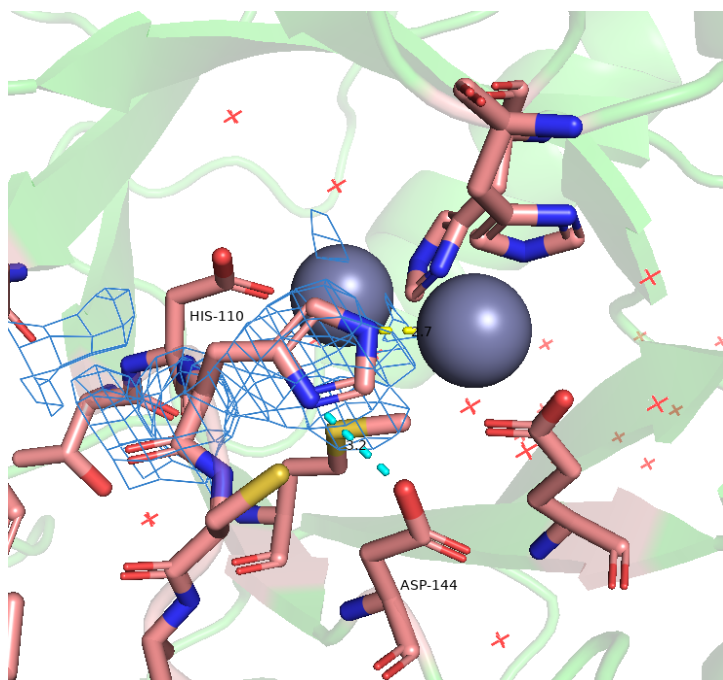


Рис. 4. Окружение гистидина 110 и его электронная плотность. Желтым цветом показана координационная связь с ионом металла, голубым – водородная связь с аспаратом 144.

Следующим остатком был выбран глицин 232, который по данным PDB и Molprobitу является маргинальным по углам поворота остова и по непосредственно углу связи (N-Calpha-C). Данный остаток очень плохо покрыт электронной плотностью, т. к. принадлежит неструктурированному участку белковой цепи, которая обладает большой подвижностью. Конформацию данного остатка не поддерживают никакие связи. Поэтому, вероятно, эта неточность является ошибкой расшифровки.

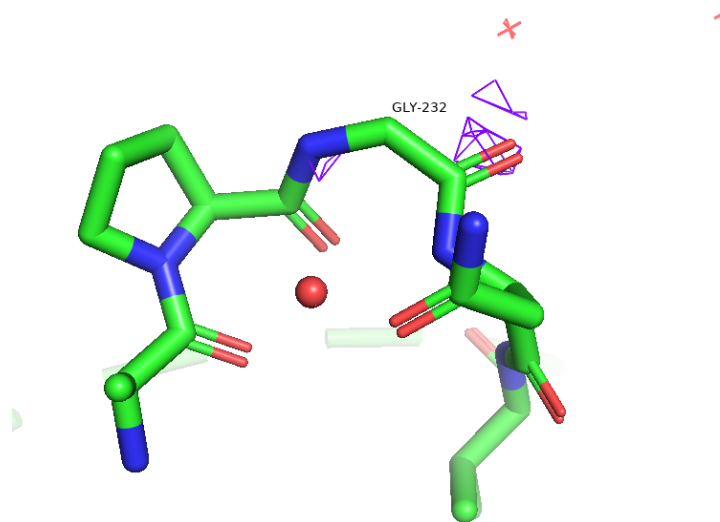


Рис. 5. Окружение глицина 232 и его электронная плотность.

Далее был выбран остаток, для которого характерно нарушение ротамерной структуры боковой цепи и угол между связями остова, валин 56. В электронной плотности данного остатка заметны пробелы, особенно в области углеродов бокового радикала. Данный остаток является гидрофобным, как и его окружение, это и поддерживает его конформацию. Мне кажется, что в данном случае нарушения в геометрии данного остатка являются ошибками расшифровки электронной плотности.

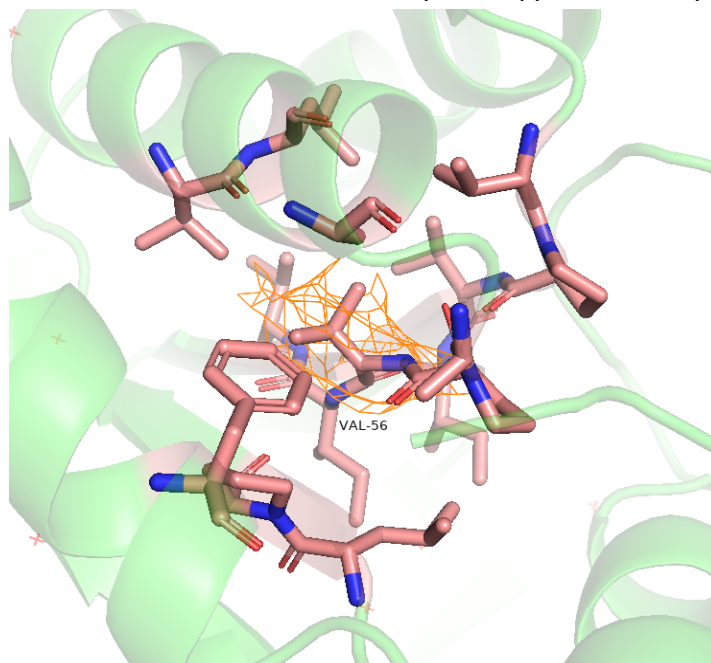


Рис. 6. Окружение и электронная плотность валина 56.

Следующие два остатка являются маргинальными, т. к. у них нарушена структура ротамерной боковой цепи по данным Molprobity. Первый из них – тирозин 196. Данный остаток очень плохо покрыт электронной плотностью, т. к. расположен на неструктурированном участке белка и обладает большой подвижностью. Он не связан никакими взаимодействиями ни с другими остатками, ни с водой. Из-за низкого покрытия электронной плотностью, вероятно, здесь неточность расшифровки.

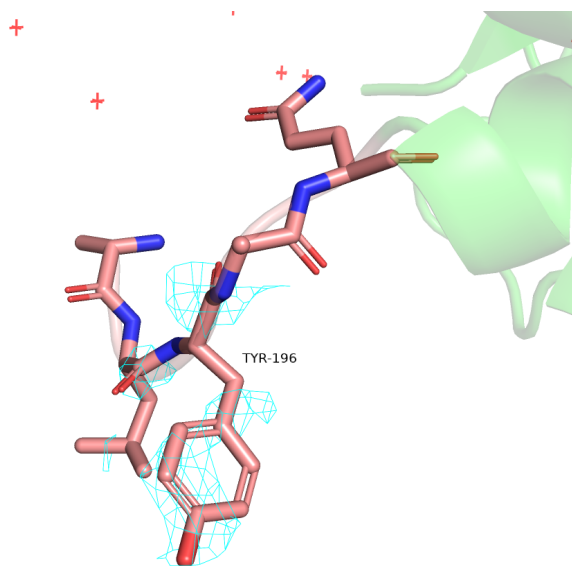


Рис. 7. Окружение и электронная плотность тирозина 196.

Второй остаток – серин 146. Данный остаток хорошо покрыт электронной плотностью. Он образует водородную связь кислородом радикала с азотом глицина 176.

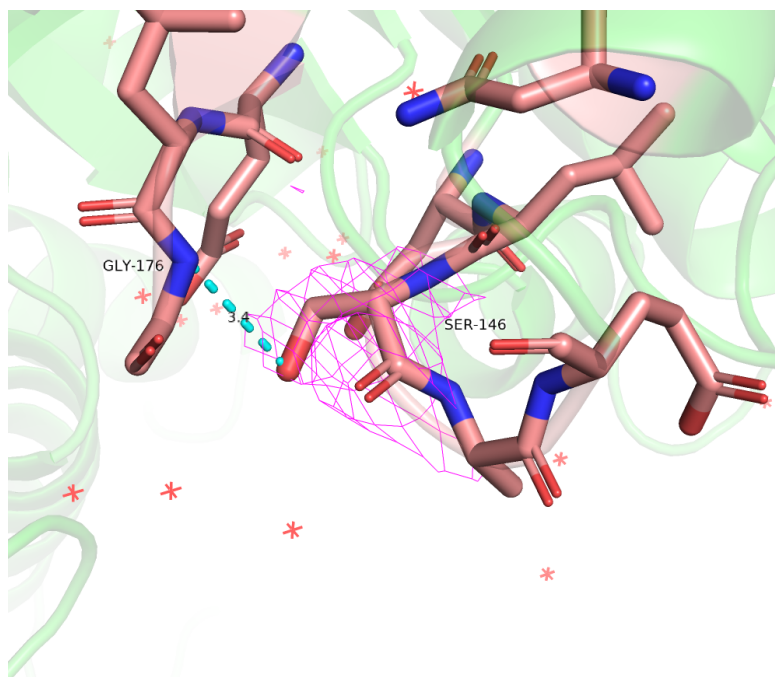
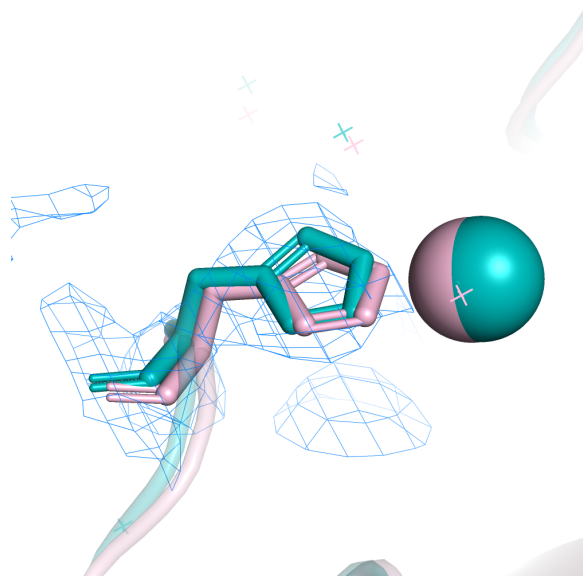


Рис. 8. Окружение и электронная плотность серина 146.

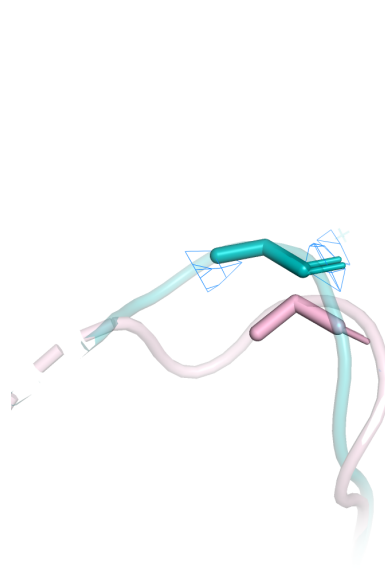
### Задание 3

Далее была рассмотрена обновленная структура этих маргинальных остатков из базы данных PDB Redo. Во всех случаях структура изменена довольно значительно. Для тирозина 110 изменено положение С-бета атома так, что оно лучше укладывается в электронную плотность. Положение глицина 232 полностью изменено и никак не коррелирует с электронной плотностью. Для валина 56 изменен угол поворота радикала, но понять лучше или хуже это отображает имеющуюся электронную плотность затруднительно. Для тирозина 196 изменено положение С-бета атома, вследствие чего развернуто бензольное кольцо, т. к. покрытие электронной плотностью очень слабое все равно остается неясным насколько точно такое расположение отражает электронную плотность. Также изменено положение кислорода радикала серина 146, что вероятно лучше отображает геометрию этого аминокислотного остатка, а также его электронную плотность. Таким образом, похоже, что все маргинальные остатки появились вследствие неточности расшифровки электронной плотности, однако, непонятно в некоторых случаях насколько “улучшенная” структура правильнее.

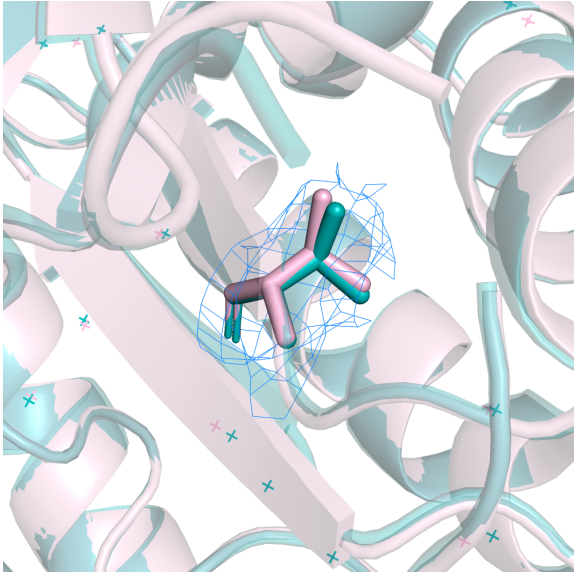
A



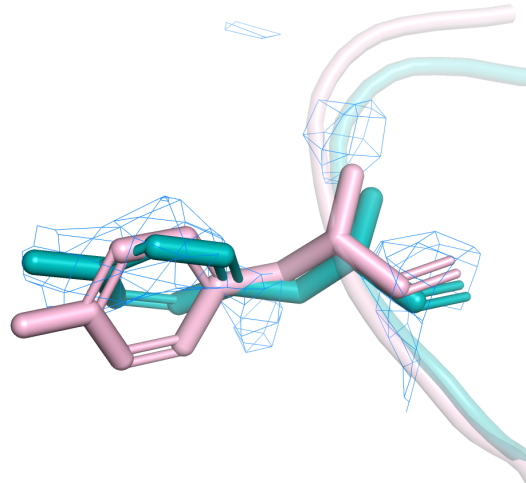
B



C



D



E

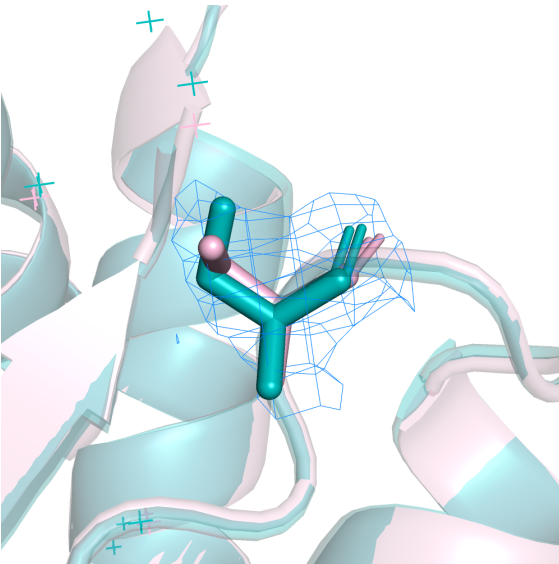


Рис. 9. А His110, В Gly232, С Val56, D Tyr 196, E Ser146. Для всех рисунков розовым показана “улучшенная” структура, а голубым – исходная структура.

#### Список литературы:

1. Cooper, S.J., Leonard, G.A., McSweeney, S.M., Thompson, A.W., Naismith, J.H., Qamar, S., Plater, A., Berry, A., Hunter, W.N., The crystal structure of a class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase shows a novel binuclear metal-binding active site embedded in a familiar fold, 1996, Structure 4: 1303-1315.