

Практикум 6.

Задание 1.

Объект рассмотрения в первом задании – белок MS3494 из *Mycolicibacterium smegmatis* (PDB: 7REF, 7SON), он является гомологом белка Rv0455c *Mycobacterium tuberculosis* и участвует в секреции сидерофоров – хелатирующих агентов, которые связывают железо и способствуют его усвоению микроорганизмами [1]. В рамках данного задания я рассмотрю два варианта его структуры, один из которых получен методом рентгено-структурного анализа, а второй – методом ядерно-магнитного резонанса.

Таблица 1. Водородные связи. В скобках после номера аминокислотного остатка в PCA структуре указан его номер в ЯМР-структуре

Донор	Акцептор	Локализация	Расстояние в PCA, Å	Доля моделей ЯМР, %	Расстояние в ЯМР, min, Å	Расстояние в ЯМР, max, Å	Расстояние в ЯМР, median, Å
Met55(24), N	Ala51(20), O	Между атомами остова в альфа-спирали	2.8	100	2.6	2.7	2.6
Tyr69(38), OH	Trp122(91), O	Между атомами остова и бокового радикала внутри глобулы	2.6	100	2.6	2.8	2.75
Gln101(70), NE2	Asn105(74), OD1	Между боковыми радикалами на поверхности глобулы	3.1	10	3.6	7.8	7.35

Для сравнения двух моделей я рассмотрела водородные связи в их составе, имеющие разное положение относительно поверхности белковой глобулы. Если в структуре, полученной методом PCA, мы имеем чаще всего только один вариант конформации для каждой аминокислоты, то структура, полученная методом ЯМР, представляет собой набор моделей, которые являются низкоэнергетическими структурами, извлеченными из молекулярной динамики. В каждой из этих структур аминокислотные остатки могут занимать разное положение в зависимости от их подвижности в растворе, и водородные связи между ними могут сохраняться либо не сохраняться. Как показало исследование, для водородных связей, возникающих между атомами остова в элементах вторичной структуры или внутри глобулы, длина связи практически не отличается между PCA и ЯМР моделями и не варьирует среди набора структур ЯМР (таблица 1, рисунок 1-2). Во внутренних участках белка не происходит значительных смещений остатков друг относительно друга, структура достаточно устойчивая и жесткая, в динамике она не меняется.

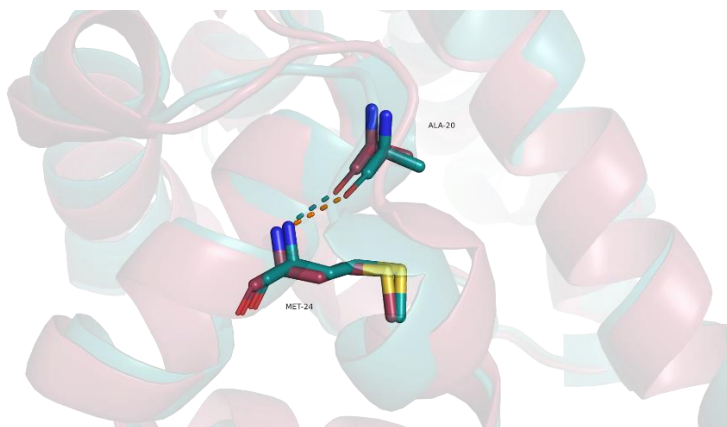


Рисунок 1. Водородная связь между аминокислотными остатками остова. Зеленым цветом показана ЯМР-структура, красным – PCA. Сессия по [ссылке](#)

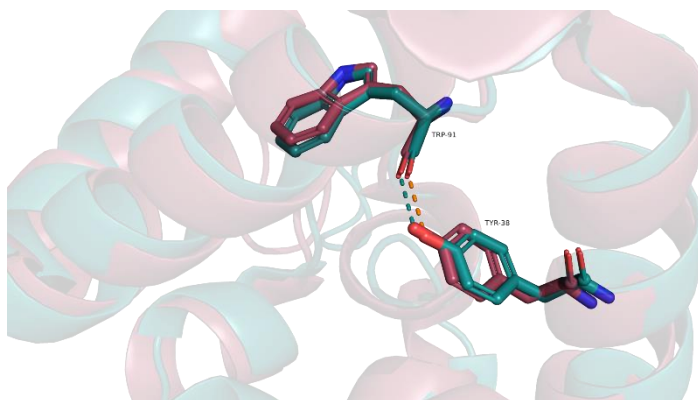


Рисунок 2. Водородная связь внутри глобулы белка. Зеленым показана ЯМР-структура, красным - PCA. Сессия по [ссылке](#)

В случае же водородных связей, которые возникают на поверхности глобулы, ситуация обстоит иначе. Аминокислотные остатки на поверхности глобулы не стабилизируются большим количеством взаимодействий, их положение не является критически важным для осуществления функции белка. Эти остатки в большинстве своем полярные либо заряженные, они могут взаимодействовать с раствором и менять положение вследствие этих взаимодействий. Наиболее оптимальное положение для таких аминокислотных остатков определить практически невозможно, поэтому в наборе ЯМР-структур их конформации довольно сильно варьируют, как варьирует и расстояние между атомами, которые в структуре, полученной методом PCA, образуют водородную связь. Например, в рассмотренном мной случае 101 глутамина и 105 аспарагина только в одной из 10 моделей атомы расположены друг относительно друга на расстоянии, допускающем образование водородной связи (рисунок 3).

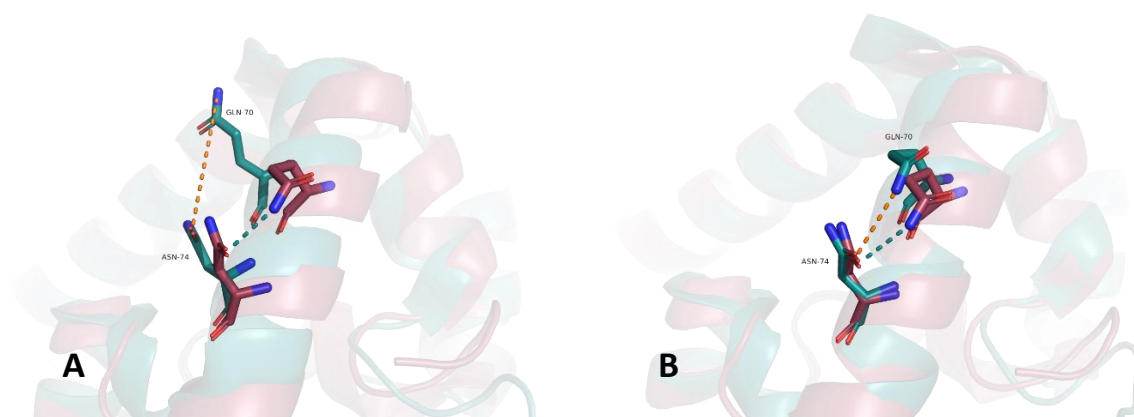


Рисунок 3. Водородная связь между боковыми радикалами на поверхности белка. Зеленым цветом показана ЯМР-структура, красным - PCA. А - отсутствие водородной связи в ЯМР-структуре (7.7 Å), В - водородная связь в ЯМР-структуре (3.6 Å). Сессия по [ссылке](#)

Задание 2.

В следующем задании предстояло проверить, насколько соотносится подвижность отдельных частей молекулы, о которой свидетельствуют данные ЯМР, с величинами В-факторов, полученными для аналогичной структуры методом рентгеноструктурного анализа. С помощью пакета программ ProDy я получила средние значения RMSF по всем ЯМР-моделям для каждого остатка, а также средние значения В-факторов для каждого остатка из модели PCA. Соответствующий notebook доступен по [ссылке](#). Стоит отметить, что PCA модель содержала две

цепи, и для сравнения была взята только цепь А. При этом С-концевые 5 остатков цепи А не имеют соответствующих в модели ЯМР, поэтому они также были исключены из рассмотрения. Полученный в результате работы график, отражающий зависимость между RMSF и В-факторами, представлен на рисунке 4.

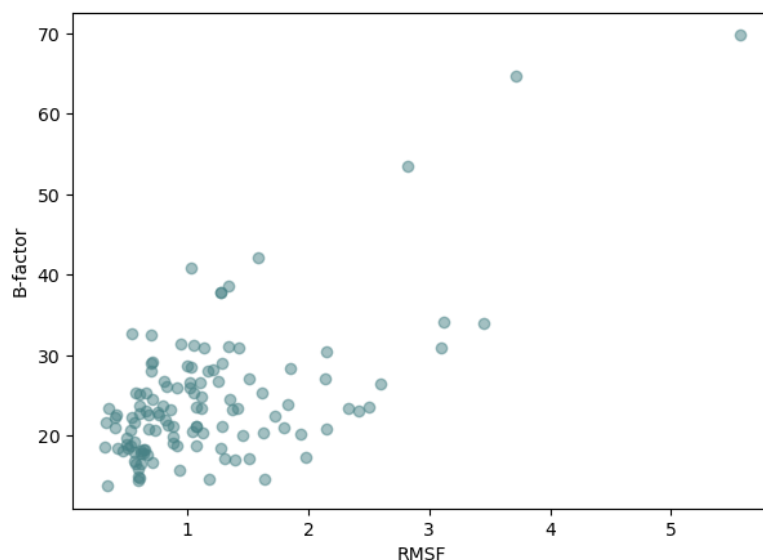


Рисунок 4. График зависимости В-факторов от RMSF

Из графика видно, что в целом имеет место положительная корреляция, и с ростом RMSF увеличиваются и значения В-факторов, но это происходит не всегда. Часто показания моделей расходятся, и для аминокислотных остатков с более высокими средними RMSF предсказываются более низкие средние В-факторы или же наоборот. Это может быть связано с тем, что в данном случае у нас достаточно мало моделей из ЯМР эксперимента, этот набор может охватывать не все значимые конформации и не в полной мере характеризовать подвижность структуры. Тем не менее, коэффициент корреляции Пирсона для рассматриваемых моделей составляет 0.64 ($p\text{-value}=2.7 \cdot 10^{-15}$), что позволяет утверждать, что корреляция имеет место.

Задание 3.

Результат, полученный в задании 2, показался мне неубедительным, поэтому я решила попробовать более точный расчет. Согласно литературным данным, между RMSF и В-фактором для каждого атома существует следующая зависимость: $RMSF^2 = \frac{3 \cdot B\text{-factor}}{8 \cdot \pi^2}$ [2]. Используя те же модели, что и в предыдущем задании, я рассчитала RMSF и В-факторы для каждого атома и применила к полученным значениям соответствующие математические преобразования. По [ссылке](#) можно найти notebook с кодом. Для того чтобы атомы двух моделей точно соответствовали друг другу, из PCA-модели я убрала цепь В и 5 аминокислот с С-конца, для которых нет соответствия в ЯМР-модели, а из ЯМР-модели я убрала водороды и атом кислорода ОХТ с С-конца. Так как С-конец белка в PCA-модели будет обрезан, на нем не будет полноценной -СООН-группы, следовательно, в ЯМР-модели появляется лишний атом. В результате отбора нужных значений и применения к ним математических преобразований я получила график, представленный на рисунке 5. Коэффициент корреляции Пирсона в данном случае составил 0.53 ($p\text{-value}=2.18 \cdot 10^{-73}$), что еще ниже, чем в предыдущем «более простом» случае.

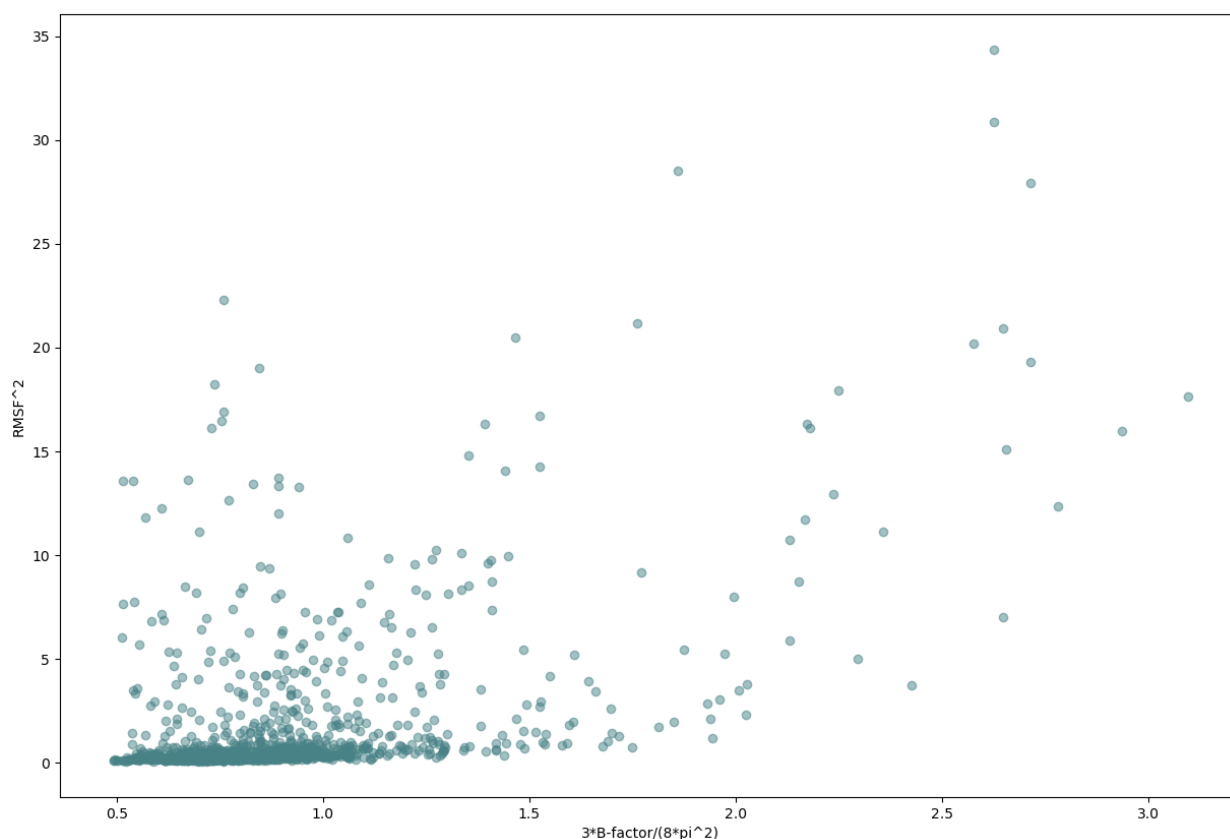


Рисунок 5. Зависимость RMSF от B-факторов для каждого атома

Из графика видно, что либо я ошиблась в коде, либо не все так идеально с моделями, потому как линейной зависимости между выражениями, которые отображены на осях координат, не наблюдается, тогда как, согласно теоретическим данным, величины должны быть равны.

Если полученный график не является результатом моей ошибки, можно предположить, что причиной такой картины может быть разница условий, в которых проводятся эксперименты ЯМР и РСА. Если посмотреть на строение кристалла белка (symmetry mates в PyMol), можно отметить, что его упаковка довольно плотная, молекулы расположены близко друг к другу, что может затруднять свободное движение петель и принудительно фиксировать поверхностные остатки за счет взаимодействий с соседними молекулами кристалла. Кристалл, в отличие от водного раствора, в котором проводится ЯМР, не является естественным способом существования белка, поэтому всегда могут иметь место отклонения от нативного «поведения» структуры. Если аминокислоты белка в кристалле, даже находясь на поверхности, могут быть зафиксированы взаимодействиями с молекулами соседних ячеек, то в динамике они могут двигаться очень активно, что можно наблюдать по большому разбросу расстояний между атомами, которые потенциально могут формировать водородную связь, в динамике, как было показано в первом задании. Белок довольно небольшой, и поверхностные остатки составляют значительную долю от него, поэтому ошибочная характеристика их подвижности очень сильно сказывается на общем результате сравнения.

Список литературы

1. Zhang, L., Kent, J.E., Whitaker, M. et al. A periplasmic cinched protein is required for siderophore secretion and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun* 13. 2022; 2255
2. Kuzmanic A, Zagrovic B. Determination of ensemble-average pairwise root mean-square deviation from experimental B-factors. *Biophys J*. 2010 Mar 3; 98(5):861-71