

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

---

ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

Отчет по качеству рентгеноструктурного анализа АНВА  
синтазы из *Amycolatopsis mediterranei*

Работа студента 4 курса  
Мошенского Дениса Михайловича

Москва

2017 г.

## Аннотация

В отчёте рассмотрены основные индикаторы качества модели структуры 1В9Н синтазы 3-амино-5-гидроксибензойной кислоты (АНВА) из *Amycolatopsis mediterranei*, а также проведён анализ индикаторов локального качества структуры для ряда аминокислотных остатков. В ходе работы над отчётом были исследованы возможности, предоставляемые серверами для оценки качества структур белковых молекул.

## Введение

В данной работе рассмотрена структура белка АНВА синтазы из актинобактерии *Amycolatopsis mediterranei*, идентификатор PDB 1В9Н [1]. АНВА – промежуточное вещество в пути синтеза антибиотика рифамицина В (рис. 1). Фермент является пиридоксаль 5'-фосфат (PLP) зависимым и использует 5-деокси-5-амино-3-дегидрошикимат (амино-DHS) в качестве субстрата для синтеза АНВА [2].

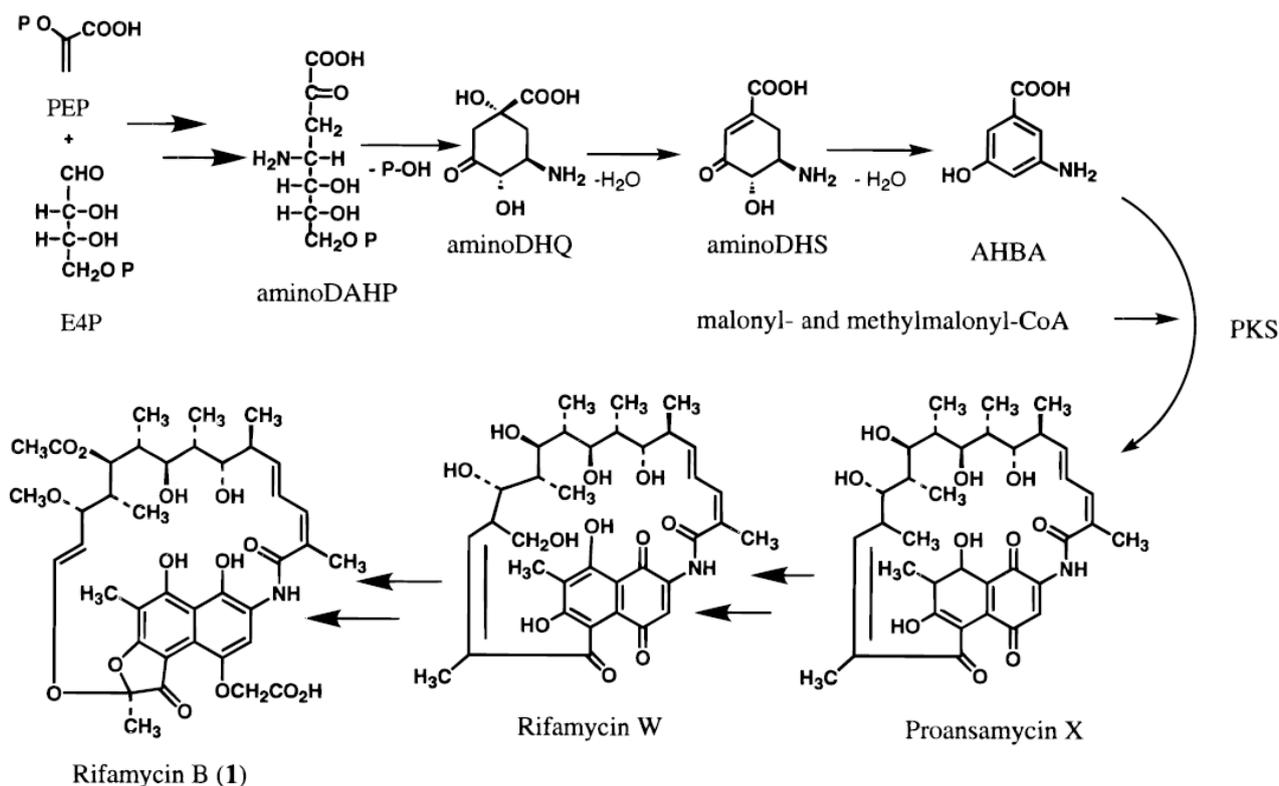
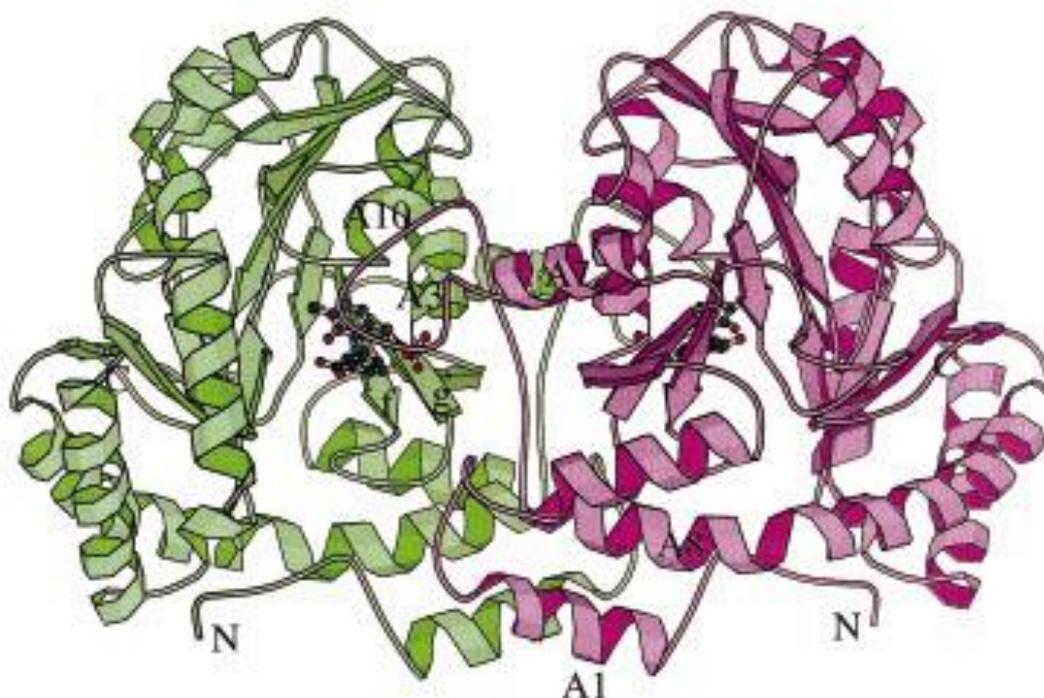


Рисунок 1. Биосинтез рифамицина В [2]

АНВА синтаза представляет собой димер [2]. Структура 1В9Н (рис. 2) была получена, чтобы подтвердить предполагаемый механизм катализируемой АНВА синтазой реакции [2] и определить, какие аминокислотные остатки непосредственно участвуют в катализе.



**Рисунок 2.** Структура димера АНВА синтазы, идентификатор PDB 1В9Н [1]

В данной работе качество модели структуры 1В9Н было оценено по основным показателям таким, как карты Рамачандрана, положение ротамеров и R-free.

## Результаты и обсуждение

### *Общая информация о модели*

Асимметричная единица 1B9H представлена одной цепью (A) из 388 аминокислотных остатков. Биологическая единица состоит из двух идентичных субъединиц. В структуре белка есть лиганд PLP (идентификатор PDB PLP), который представляет собой фосфорилированный витамин B6.

Модель структуры 1B9H была размещена в PDB и опубликована в 1999 году [1]. Общая информация о модели 1B9H была получена с использованием сервиса EDS [3] и систематизирована в таблице 1.

Таблица 1. Общая информация о модели 1B9H

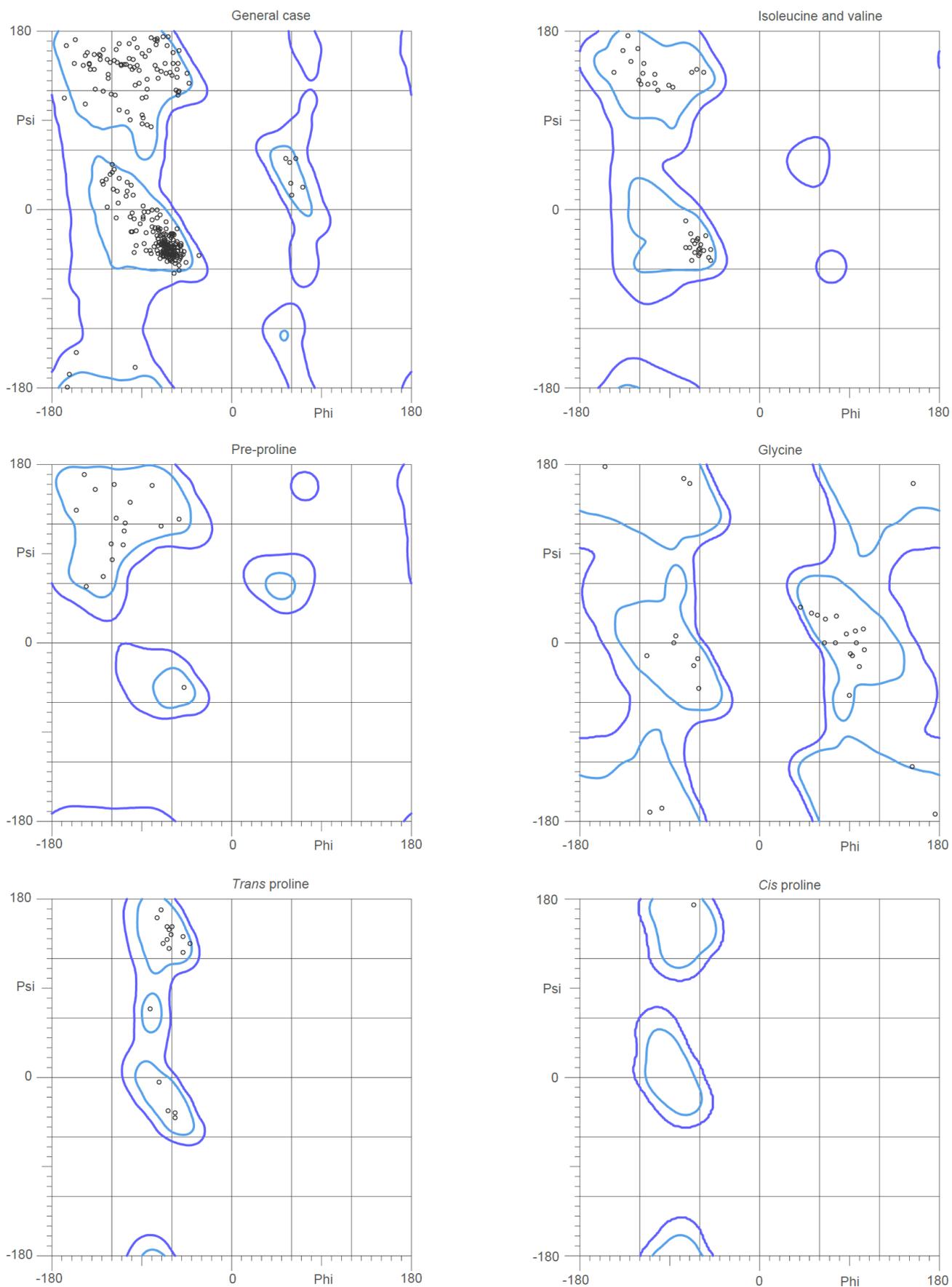
Разрешение, Å	2,0	
Диапазон разрешения, Å	9,97 – 2,00	
Число измеренных рефлексов	40234	
Число использованных рефлексов	39738	
Полнота данных	98,4%	
Кристаллографическая группа	P 32 2 1	
Параметры ячейки	Длина, Å	Угол, °
	89,70	90,00
	89,70	90,00
	127,70	120,00

Для решения фазовой проблемы использовался метод изоморфного замещения с использованием ртути.

### *Индикаторы качества модели в целом*

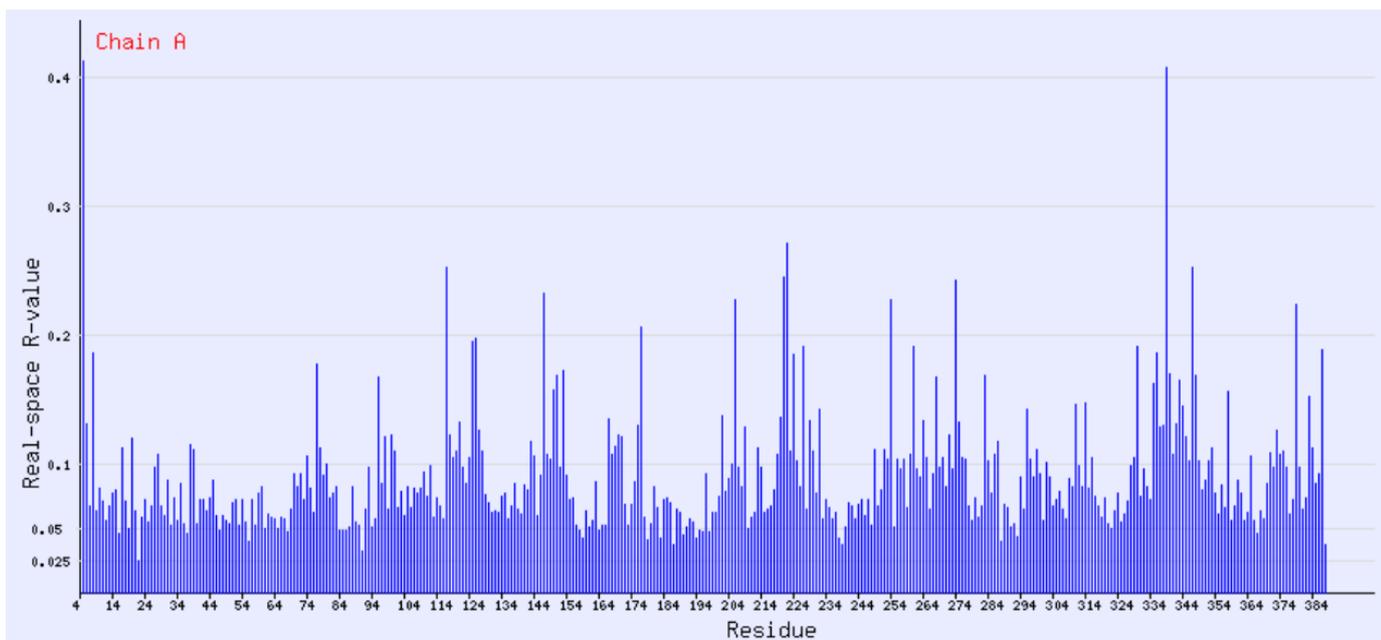
Для данной структуры значение R-фактора равно 0,218, а R-free составляет 0,252. Если принять, что хорошие значения R-free – меньше 20%, а плохие – больше 40%, то такое значение R-free можно назвать удовлетворительным. Разность R-free и R-фактора составляет 0,034, что свидетельствует о том, что модель не была переоптимизирована.

Для построения карты Рамачандрана был использован сервис MolProbity [4]. Карты приведены на рис. 3. Не обнаружилось ни одного остатка из запрещенной области карты Рамачандрана. MolProbity анализировал только 382 из 388 остатков структуры. 371 остаток из 382 (97.1%) попал в предпочитаемую область карты Рамачандрана. Процент остатков в предпочитаемой области не соответствует критерию хорошей модели (98%), что допускает возможность подгонки модели. Также MolProbity выдал количество «неправильных» торсионных углов и связей (таблица 2).



**Рисунок 3.** Карты Рамачандрана для структуры 1B9H. Получено с помощью MolProbity.

Пространственный R-фактор (Real Space R, RSR) характеризует, насколько модель соответствует «экспериментальной» электронной плотности. Среднее значение RSR составляет 0,09, что можно назвать хорошим значением. Все остатки со значением RSR больше 0,2 можно рассматривать как маргинальные. Таких обнаружилось 11 остатков, это 2,9% всей последовательности. Карта RSR для каждого аминокислотного остатка структуры приведена на рис. 4.



**Рисунок 4.** Карта RSR для структуры 1B9H. Получено с помощью EDS

Для RSR каждого остатка можно определить Z-score, взяв параметры распределения (среднее значение и стандартное отклонение) из RSR всех остатков из всех структур с похожим разрешением. В данном случае использовались все структуры с разрешением 1,8 Å – 2,0 Å. Если RSR плохой, а RSR-Z – хороший, то значит, координаты атомов расшифрованы плохо, но не хуже, чем в других подобных структурах. Высокие значения Z-score ( $Z > 2$ ) свидетельствуют о том, что остаток плохо вписан в электронную плотность по сравнению с другими структурами с близким разрешением. Карта RSR-Z для каждого аминокислотного остатка структуры приведена на рис. 5. Средний RSR-Z равен -0,44. Это значит, что в среднем остатки вписаны в электронную плотность лучше, чем в других моделях с близким разрешением. В данном случае маргинальных остатков 4, это 1%.

В таблицу 2 сведены все описанные выше индикаторы качества модели для структуры 1B9H. В таблице 3 приведено 11 маргинальных остатков:  $RSR > 0,2$  или  $RSR-Z > 2$ .

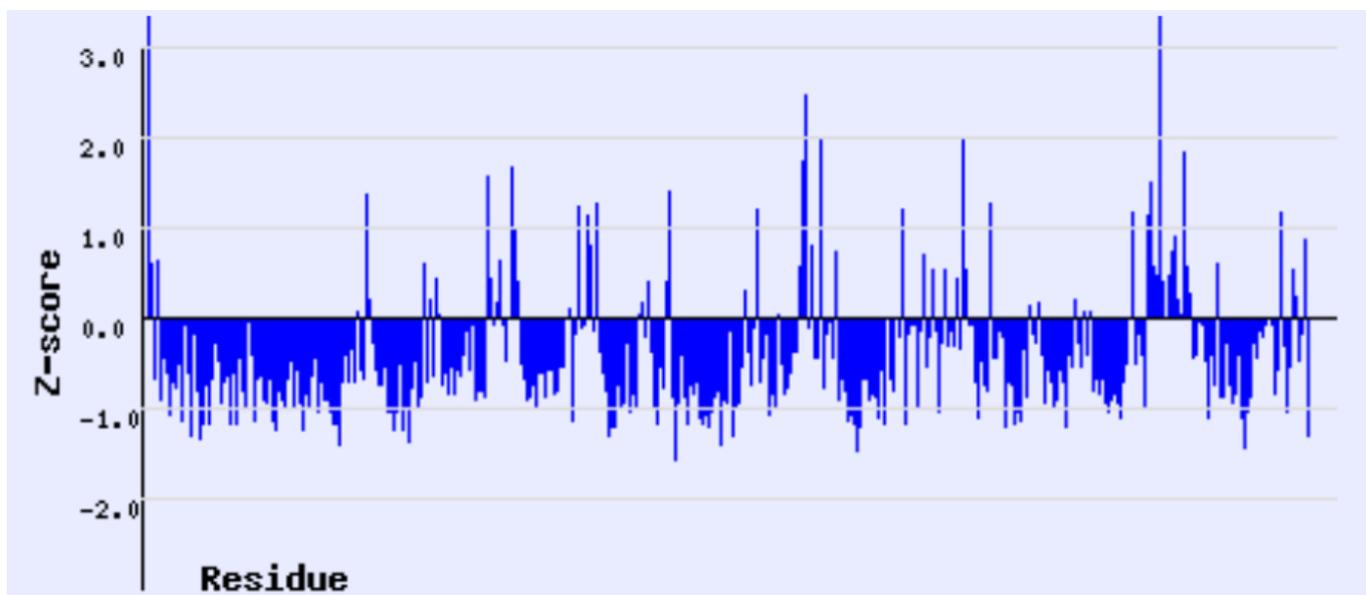


Рисунок 5. Карта RSR-Z для структуры 1B9H. Получено с помощью EDS

Таблица 2. Величины некоторых индикаторов качества структуры в целом для модели 1B9H

R-фактор	0,218
R-free	0,252
R - R-free	0,034
Ротамеры в предпочитаемой зоне карты Рамачандрана	271/382 (97,1%)
Ротамеры в разрешенной зоне карты Рамачандрана	382/382 (100%)
Ротамеры в запрещенной зоне карты Рамачандрана	0/382 (0,0%)
Отклоняющиеся от нормы ковалентные связи	4/3020 (0,13%)
Отклоняющиеся от нормы валентные углы	107/4107 (2,61%)
RSR	0,09
Остатков с $RSR > 0,2$	11/384 (2,9%)
RSR-Z	-0,44
Остатков с $RSR-Z > 2$	4/384 (1%)

Каждая программа не анализировала несколько аминокислотных остатков N-конца. Сервис MolProbity выдал результат для 382 из 388 остатков, а EDS – для 384. У остатков на N-конце в целом наблюдаются большие значения RSR и RSR-Z.

Таблица 3. Маргинальные аминокислотные остатки

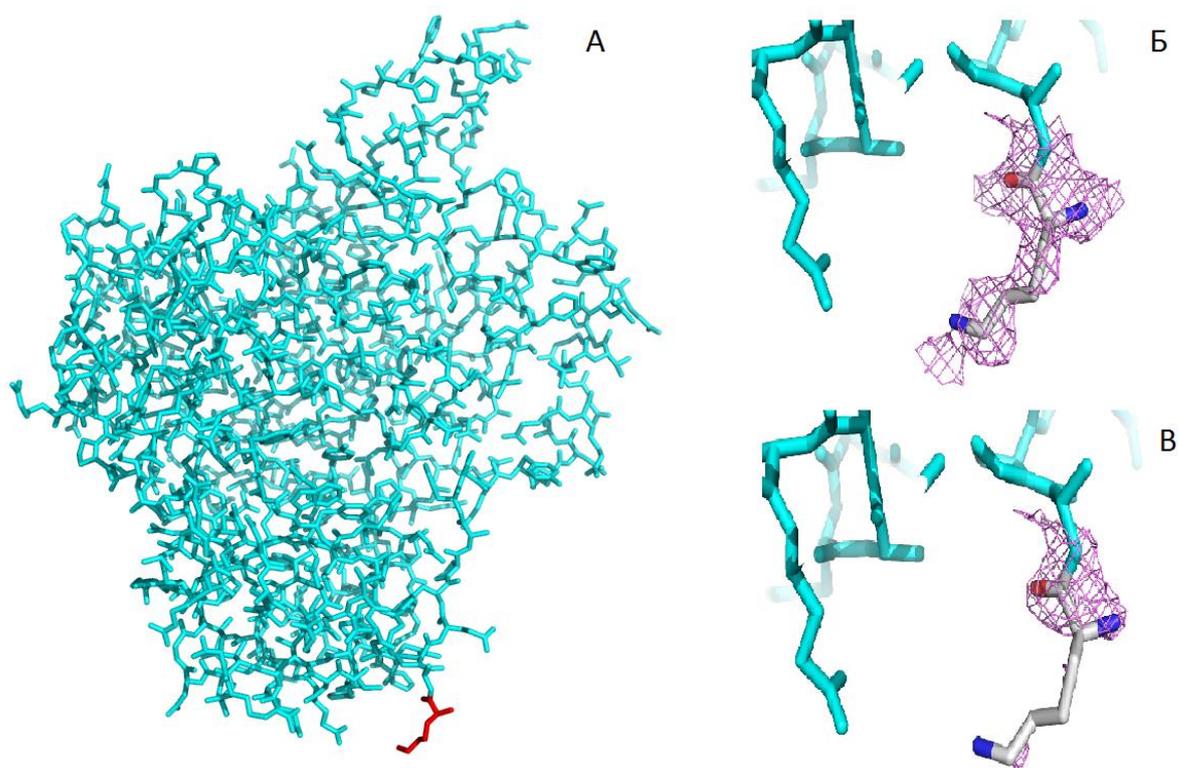
Остаток	RSR	RSR-Z	Комментарий
LYS 5	0,412	3,84	Выбран для детального изучения.
GLU 117	0,252	1,57	
LYS 147	0,233	1,24	
ASP 177	0,206	1,40	
GLU 206	0,227	1,21	
ARG 221	0,245	1,72	Выбран для детального изучения.
ASP 222	0,271	2,45	Выбран для детального изучения.
GLU 254	0,227	1,21	
ASP 274	0,243	2,00	Выбран для детального изучения.
ASP 339	0,408	4.67	Выбран для детального изучения.
ARG 347	0,253	1,84	
GLU 379	0,224	1,17	

Стоит отметить, что маргинальными оказались только заряженные аминокислотные остатки.

#### *Детальный анализ некоторых маргинальных аминокислотных остатков*

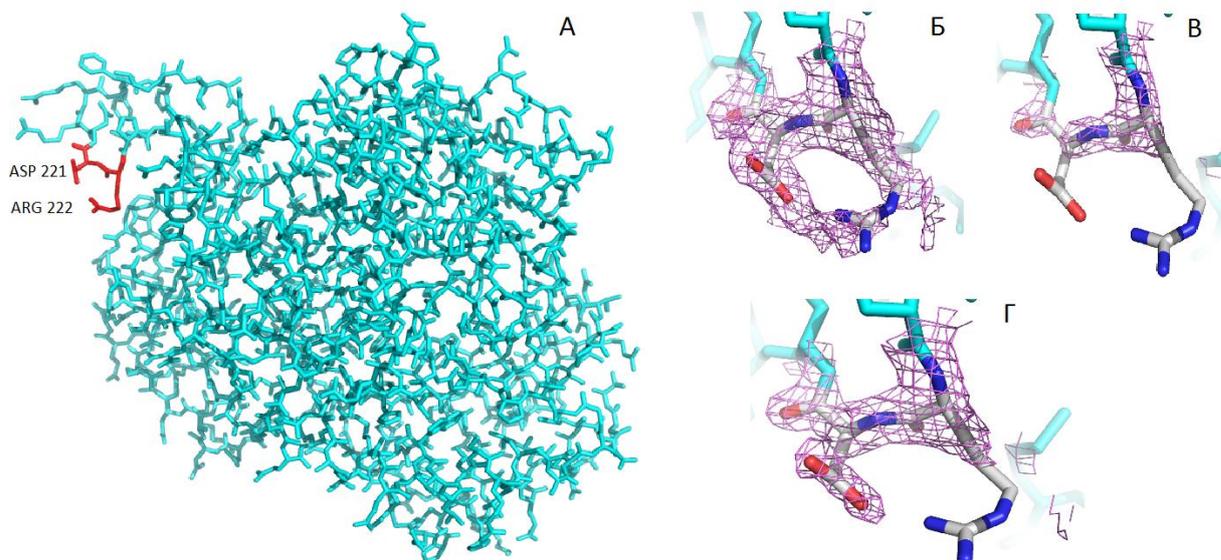
Рассмотрим, насколько маргинальные аминокислотные остатки, выделенные в таблице 3, вписываются в электронную плотность структуры.

Первые 4 остатка с N-конца отсутствуют, поэтому было изучено, как LYS 5, который имеет высокие значения RSR и RSR-Z, располагается относительно электронной плотности (Рис. 6). Видно, что при достаточно слабой отсечке шума (1,0) электронная плотность остаётся только вокруг C<sub>α</sub>-атома.



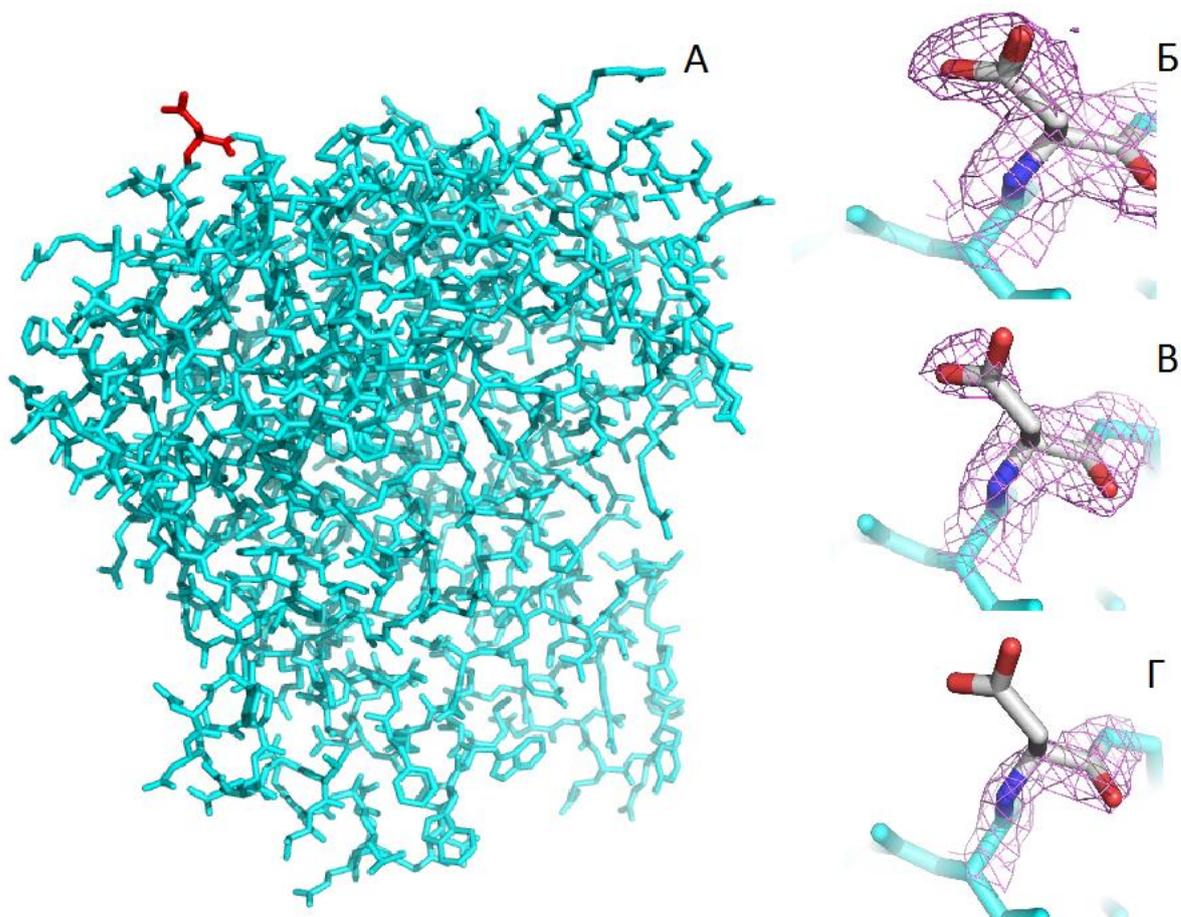
**Рисунок 6.** Маргинальный остаток LYS 5 в структуре 1B9H: положение на структуре (А), электронная плотность вокруг остатка при различных порогах: 0,5 (Б), 1,0 (В)

Пара остатков – ARG 221 и ASP 222 имеет слишком большие значения RSR. На рисунке 7 видно, что ARG 221 плохо вписан в электронную плотность, ASP 222 немного лучше. При подрезке в 1,5 в электронную плотность вписывается остов. По-видимому, два заряженных остатка, находящиеся рядом, размывают сигнал.



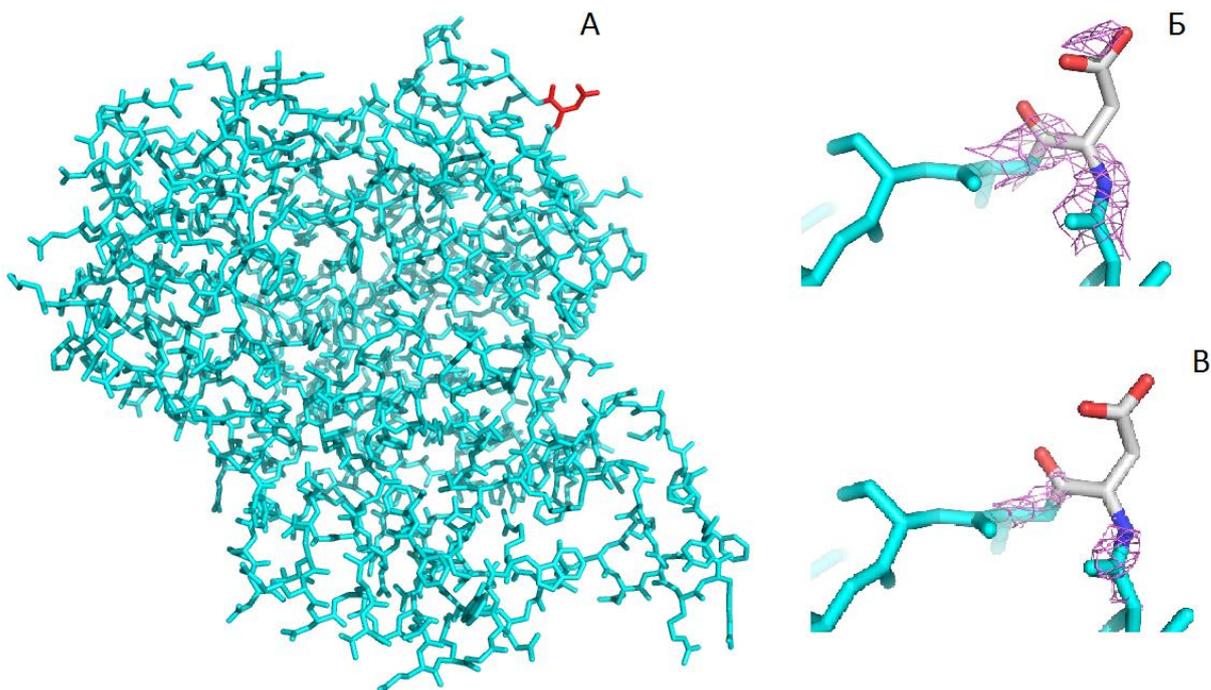
**Рисунок 7.** Маргинальные остатки ARG 221 и ASP 222 в структуре 1B9H: положение на структуре (A), электронная плотность вокруг остатков при различных порогах: 0,5 (Б), 1,5 (Б'), 1,0 (Г)

Далее рассмотрим остаток ASP 274 (рис. 8). Видно, что данные электронной плотности в этом участке низкого качества. На уровне  $2,0\sigma$  в электронную плотность вписан только остов.



**Рисунок 8.** Маргинальный остаток ASP 274 в структуре 1B9H: положение на структуре (A), электронная плотность вокруг остатка при различных порогах: 0,5 (Б), 1,0 (В), 2,0 (Г)

Пятый остаток – ASP 339. Это один из самых плохо вписанных в электронную плотность остатков, потому как на уровне  $1,5\sigma$  даже  $C_{\alpha}$ -атом оказывается вне электронной плотности.



**Рисунок 9.** Маргинальный остаток ASP 339 в структуре 1B9H: положение на структуре (A), электронная плотность вокруг остатка при различных порогах: 1,0 (Б), 1,5 (В)

По-видимому, плохое качество электронной плотности вокруг некоторых заряженных аминокислотных остатков связано с их высокой подвижностью, так как все они располагаются на поверхности молекулы. Возможно, именно по этой причине качество кристалла в этих участках плохое, из-за чего наблюдается шум.

#### *Сравнение модели из PDB с моделью из PDB\_REDO*

Было проведено сравнение модели 1B9H из PDB с оптимизированной моделью из PDB\_REDO [5]. По выложенным в PDB структурным факторам сервис не смог определить параметр R\_free, так как авторы структуры выложили только рабочий сет структурных факторов. Это стоит иметь в виду при оценке качества модели по R\_free. Поэтому R\_free определялся заново по 5% случайно выбранным структурным факторам. Значения некоторых параметров для оценки качества двух моделей приведены в таблице 4.

Таблица 4. Некоторые параметры модели 1B9H из PDB и из PDB\_REDO

Индикатор качества структуры	PDB	PDB_REDO
R-фактор	0,218	0,187
R_free	0,252	0,215
R_free - R	0,034	0,028
Z(R-free)	8,21	1,24
Доноров/акцепторов протона без водородной связи	23	29

Значения R-фактора и R\_free улучшились, разница их тоже. Впрочем, эти изменения невелики. Любопытно заметить, что значительно улучшился параметр Z-score (R-free), хотя неизвестно, как соотносятся исходный тестовый сет и новый, определенный программой PDB\_REDO. Также 32 аминокислотных остатков заметно улучшили свое положение относительно электронной плотности, а 1 остаток заметно ухудшил. Таким образом, можно утверждать, что новая модель лучше подогнана под экспериментальные данные. Но при этом увеличилось число доноров и акцепторов протона, не образующих водородной связи.

1B9H представляет собой структуру с хорошим разрешением. Остатки в целом хорошо вписаны в электронную плотность. Интересно, что в среднем остатки в данной структуре вписаны лучше, чем в других структурах с похожим разрешением. Также по картам Рамачандрана не было обнаружено ни одного маргинального остатка. Таким образом, качество структуры 1B9H можно оценить как «хорошее». Стоит отметить, что сервер PDB\_REDO немного улучшил такие показатели модели, как R-фактор и R\_free, но при этом улучшились не все параметры структуры.

## Ссылки

1. Eads JC, Beeby M, Scapin G, Yu T-W, Floss HG. Crystal Structure of 3-Amino-5-hydroxybenzoic Acid (AHBA) Synthase † ‡. *Biochemistry (Mosc.)*. 1999;38:9840-9.
2. Kim CG, Yu TW, Fryhle CB, Handa S, Floss HG. 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC7N units in rifamycin and related antibiotics. *J. Biol. Chem.* 1998;273:6030-40.
3. Kleywegt GJ, Harris MR, Zou JY, Taylor TC, Wählby A, Jones TA. The Uppsala Electron-Density Server. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2004;60:2240-9.
4. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2010;66:12-21.
5. Joosten RP, Long F, Murshudov GN, Perrakis A. The PDB\_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrj.* 2014;1:213-20.