

Практикум 4. Валидация

В данном практикуме анализировалась полученная методом PCA структура субъединицы никотинового ацетилхолинового рецептора альфа 1, связанного с альфа-бунгаротоксином (PDB ID: 2QC1). Задача заключалась в проверке на пригодность для работы по изучению структурных и функциональных свойств.

Задание 1.

Структура имеет следующие показатели метрик качества:

- **Разрешение:** 1.94 Å
- **R free:** 0.233
- **R value:** 0.214

Как видно, разрешение хорошее. Соответствие структурных факторов модели экспериментальным среднее, однако разница в R free и R value довольно большая, что может указывать на переоптимизацию.

Также была проанализирована электронная плотность структуры (Рис. 1). Белок почти полностью покрыт ЭП за исключением некоторых боковых радикалов с краю молекулы, не несущих функциональной значимости.

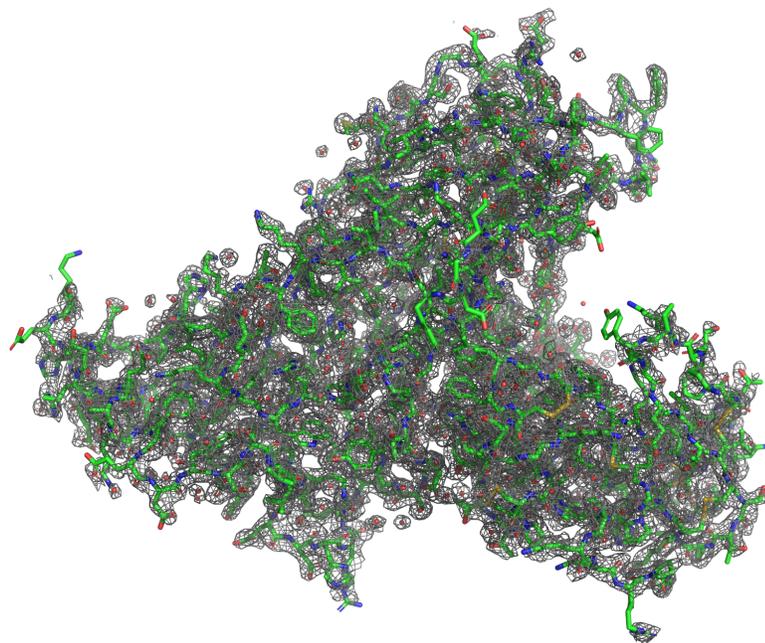


Рис. 1 Белок покрытый электронной плотностью. PyMOL session

Для изучаемого комплекса ацетилхолинового рецептора альфа 1 и бунгаротоксина есть альтернативная структура (PDB ID: 5HBV), причем здесь ацетилхолиновый рецептор представлен полностью. Хотя по показателям разрешения, R free и R value данная структура проигрывает, значения некоторых метрик у нее все же сильно лучше (перекрывания Ван-дер-Ваальсовых радиусов, процент остатков в неоптимальной зоне карты Рамачандрана меньше). Также есть комплекс бунгаротоксина с человеческим ацетилхолиновым рецептором (PDB ID: 5HBT). Здесь метрики качества аналогичны таковым для структуры 5HBV. Кроме того, есть структуры ацетилхолиновых рецепторов альфа 7 и альфа 9, связанных с бунгаротоксином (PDB ID: 7KOO, 4UY2).

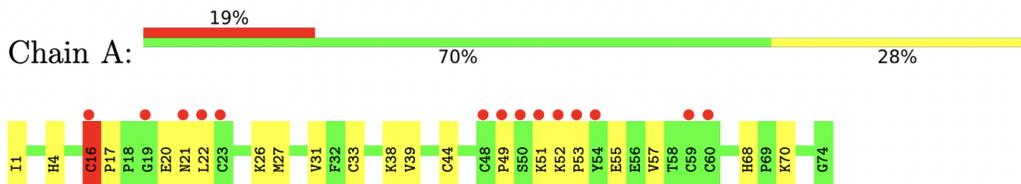
В целом для изучения связывания ацетилхолинового рецептора с бунгаротоксином анализируемая структура подходит, так как имеет самое высокое разрешение. Однако если необходимо рассмотреть не только ту субъединицу, где происходит взаимодействие, а рецептор полностью, то придется обратиться к структурам, описанным выше.

Задание 2.

На основе данных из отчёта по валидации структуры (Residue-property plots, Рис. 2) было выбрано 5 остатков, маргинальных по:

- Близости контактов: **LYS26** (цепь A), **SER1** (цепь B);
- Картам Рамачандрана: **VAL132** (также маргинал по показателю RSRZ и длине связей, цепь B);
- Ротамерам боковых цепей: **CYS16** (также маргинал по длине и углу связей и по показателю RSRZ, цепь A) и **CYS33** (цепь A).

- Molecule 1: Alpha-bungarotoxin



- Molecule 2: Acetylcholine receptor subunit alpha

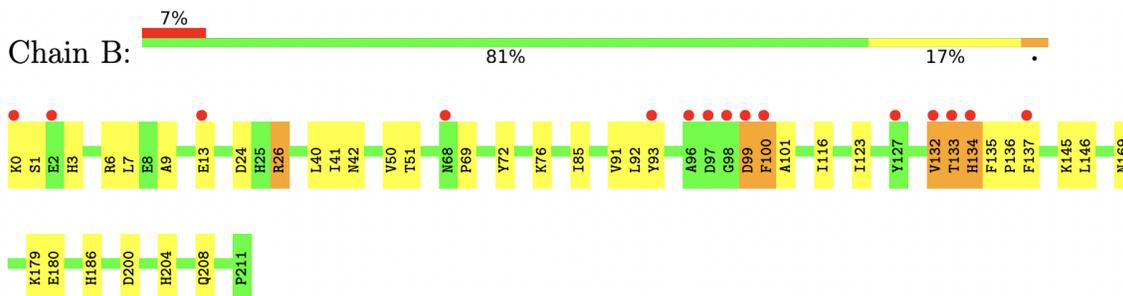


Рис. 2 Раздел Residue-property plots из отчёта по валидации

Для дополнительной проверки качества структуры была использована программа MolProbity. На Рис. 3 приведена сводная таблица по остаткам, полученная в результате работы сервиса. Видно, что значения метрик не самые лучшие.

CYS16 оказался ротамерным маргиналом, а также маргиналом по длине и углу связей, VAL132 маргинал по картам Рамачандрана, CYS33 ротамерный маргинал. SER1 и LYS26 в выдаче MolProbity не были выделены как маргинальные.

Protein Geometry	Poor rotamers	7	2.67%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	242	92.37%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	1	0.35%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	273	96.81%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-1.29 ± 0.46		Goal: abs(Z score) < 2
	Cβ deviations >0.25Å	2	0.73%	Goal: 0
	Bad bonds:	2 / 2363	0.08%	Goal: 0%
Bad angles:	6 / 3222	0.19%	Goal: <0.1%	
Peptide Omegas	Cis Prolines:	2 / 20	10.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0/394		

Рис. 3 Сводная таблица по остаткам из MolProbity

Также с помощью MolProbity можно попробовать оптимизировать модель, добавив водороды и проверив структуру на инверсии His, Asn и Gln. Программа выдает список позиций, требующих разворота (Рис. 4).

Chain	Res#	Alt	Res ID	Orig	Flip	Flip-Orig	Code	Explanation
A	4		HIS	-4.4	1	5.4	FLIP	Clear evidence for flip.
A	68		HIS	-8.4	-1.6	6.8	FLIP	Clear evidence for flip.
B	48		GLN	-0.4	0.63	1.03	FLIP	Some evidence recommending flip.
B	59		GLN	4.5	5	0.5	FLIP	Some evidence recommending flip.
B	140		GLN	-0.044	1.6	1.644	FLIP	Some evidence recommending flip.
B	186		HIS	-7.7	3	10.7	FLIP	Clear evidence for flip.
B	204		HIS	-2.8	0.27	3.07	FLIP	Clear evidence for flip.

Рис. 4 Таблица предлагаемых разворотов

После добавления водородов и поворота остатков качество геометрии было проверено ещё раз, но уже со всеми доступными контактами (Рис. 5). Как видно, никаких серьезных изменений не произошло.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	13.51		61 st percentile* (N=744, 1.94Å ± 0.25Å)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	7	2.67%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	243	92.75%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	1	0.35%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	273	96.81%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-1.29 ± 0.46		Goal: abs(Z score) < 2
	MolProbity score [^]	2.16		56 th percentile* (N=11856, 1.94Å ± 0.25Å)
	Cβ deviations >0.25Å	2	0.73%	Goal: 0
Bad bonds:	2 / 2363	0.08%	Goal: 0%	
Bad angles:	6 / 3222	0.19%	Goal: <0.1%	
Peptide Omegas	Cis Prolines:	2 / 20	10.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
Additional validations	Chiral volume outliers	0/394		
	Waters with clashes	7/187	3.74%	See UnDowser table for details

Рис. 3 Сводная таблица с учетом всех контактов из MolProbity

Далее был проведен анализ электронной плотности ранее выбранных остатков. На Рис. 1 изображена ЭП для SER1, который в отчёте по валидации структуры был отмечен как маргинальный по близости контакта с LYS0. На структуре не очень заметно, в чем заключается маргинальность. Кроме того, модель вполне

соответствует своей электронной плотности и остаток образует две водородные связи соседями. Также в выдаче MolProbity SER1 не был выделен как маргинальный.

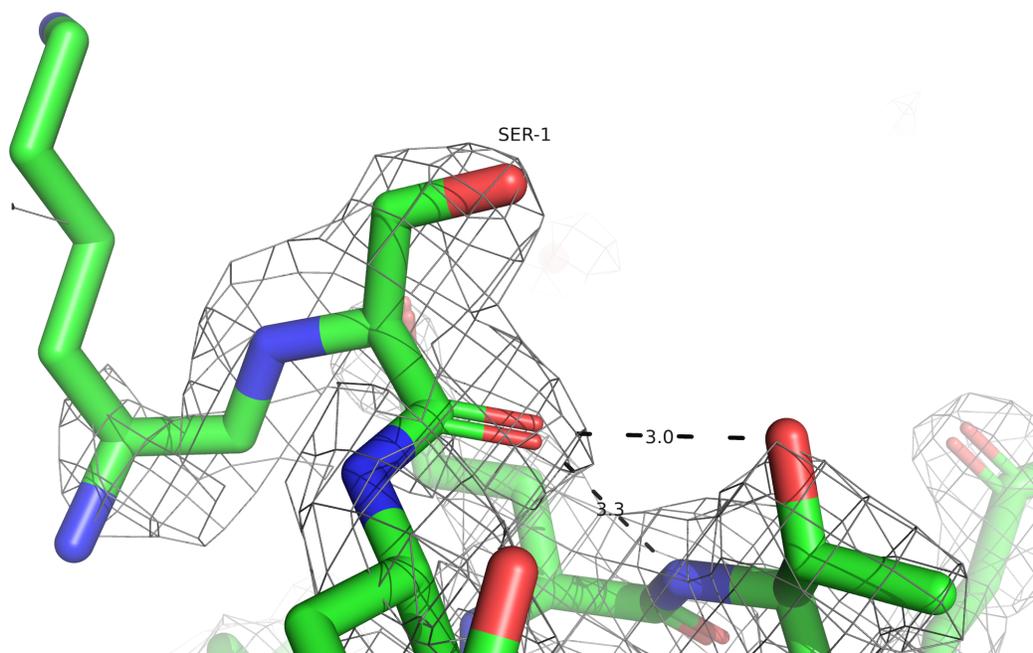


Рис. 4 Электронная плотность SER1. PyMOL session

По данным из PDB LYS26 также является маргинальным из-за близости контакта с VAL57. При анализе электронной плотности видно, что часть бокового радикала ЭП не покрыта, а остальная часть соответствует расположению своей электронной плотности. LYS26 не образует никаких контактов с VAL57, поэтому если он действительно является маргинальным, скорее всего это следствие неточности расшифровки PCA, однако MolProbity не выделил LYS26 как маргинальный остаток.

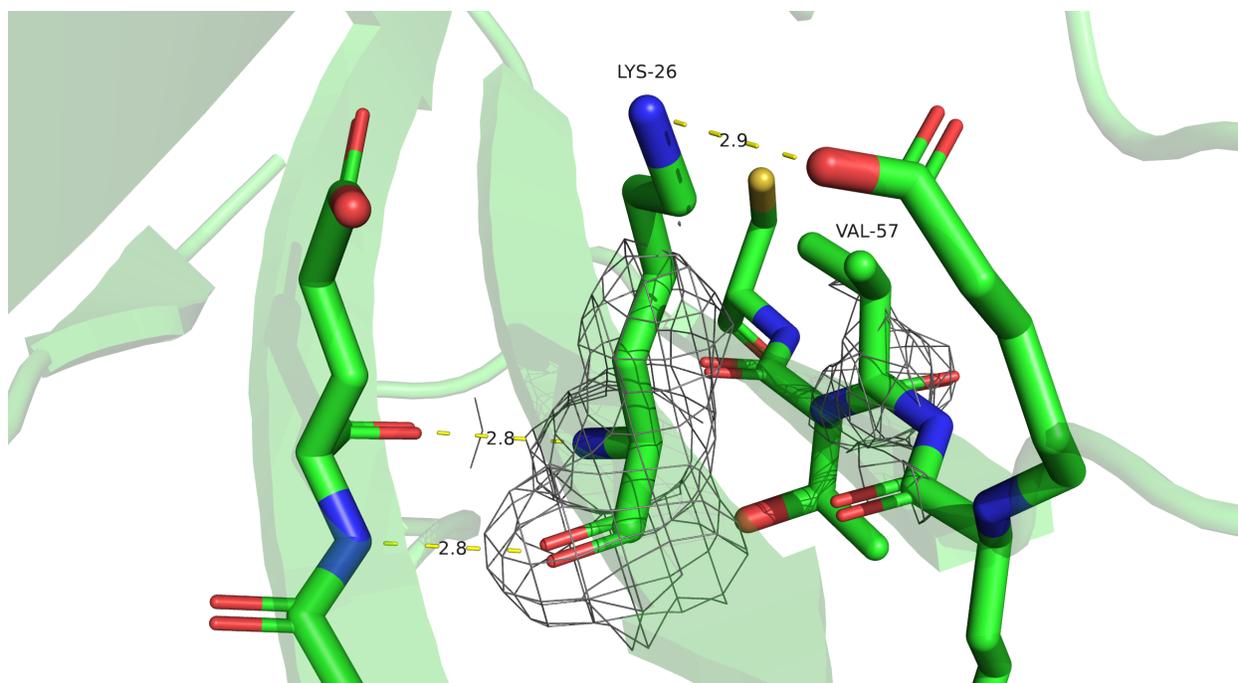


Рис. 5 Электронная плотность LYS26. PyMOL session

У остатка VAL132 боковой радикал также не полностью покрыт электронной плотностью (Рис. 6). В покрытой ЭП части заметно, что азот остова немного выбивается за пределы электронной плотности. Возможно это дает остатку образовать водородную связь с ILE130, а также делает его маргинальным по картам Рамачандрана. Однако VAL132 все-таки находится с краю молекулы и скорее всего не является функционально значимым, так что возникает вопрос, насколько необходима связь с ILE130. Тем более что даже такое расположение атомов не выглядит оптимальным для связи.

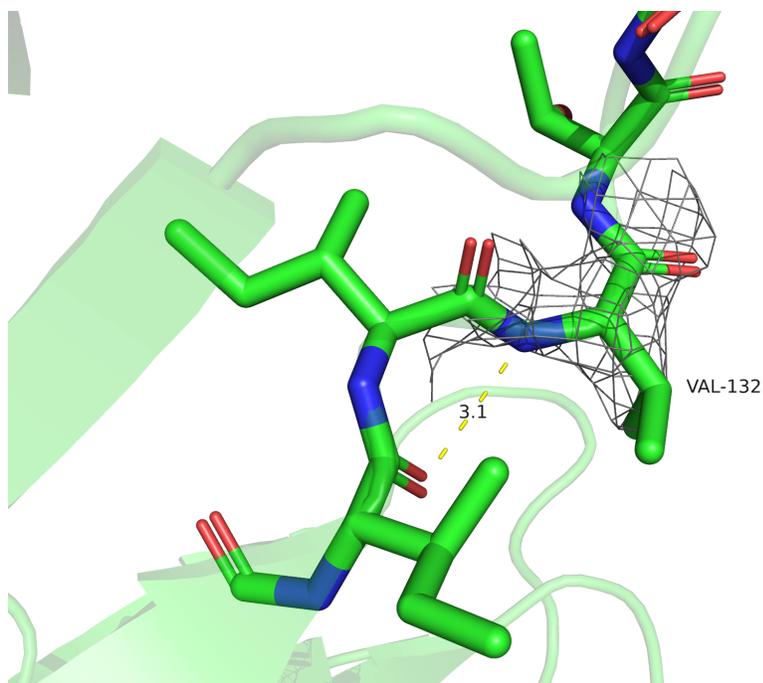


Рис. 6 Электронная плотность VAL132. PyMOL session

Наконец переходим к CYS16 и тут происходит нечто очень странное: сера цистеина 16 образует 3 ковалентных связи: с бета углеродом своего остатка, серой CYS44 и еще одной серой CYS3 (Рис. 7, CYS16 покрашен серым для наглядности). При этом такое положение CYS16 не поддерживается электронной плотностью, так как он ей практически не покрыт. Неудивительно, что по данным из PDB и MolProbity этот остаток самый маргинальный: он нетипичен по конформации боковой цепи, длинам и углам связей, а также по показателю RSRZ. Думаю очевидно, что в данном случае маргинальность является не следствием особенности структуры, а ошибкой.

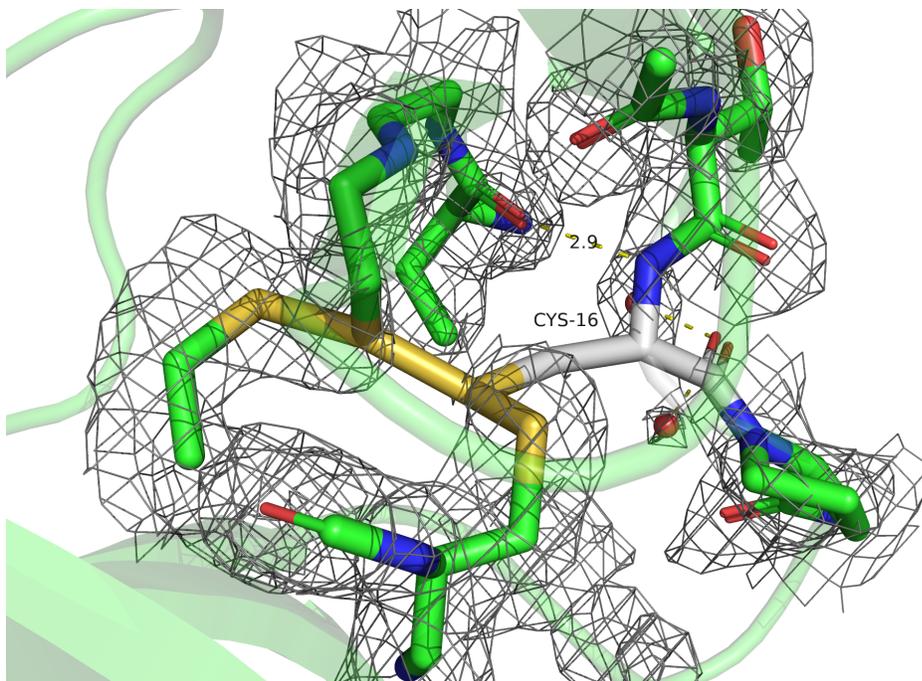


Рис. 7 Электронная плотность CYS16 (окрашен серым). [PyMOL session](#)

И последний рассматриваемый остаток - CYS33. Здесь тоже по какой-то причине сера цистеина 33 образует ковалентную связь с серой другого цистеина. Опять же ясно, что такая конформация является ошибочной и неизбежно приводит к маргинальности остатка. Неудивительно, что электронная плотность CYS33 не окружает (Рис. 8).

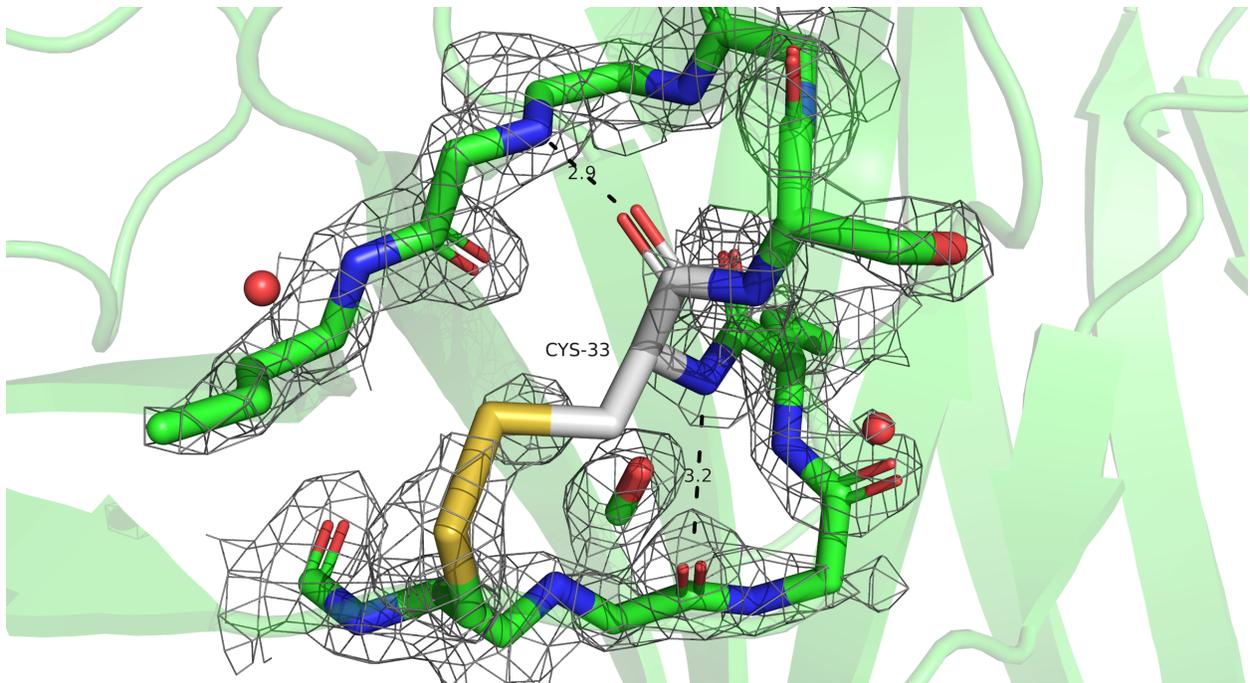


Рис. 8 Электронная плотность CYS33 (окрашен серым). PyMOL session