

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА**

ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

**Отчет по качеству расшифровки структуры олигомера В
веротоксина 1 (PDB ID 2XSC)**

***студентки 4-го курса
Морозовой Екатерины Анатольевны***

Москва

2018 г.

Аннотация

В данной работе было проанализировано качество расшифровки модели 2XSC, полученной рентгеноструктурным анализом. Были также рассмотрены некоторые индикаторы качества модели в целом и для некоторых аминокислотных остатков в отдельности.

Введение

Веротоксин VT-1 (индикатор PDB 2XSC) представляет собой цитотоксин (близкий к цитотоксину *Shigella dysenteriae*) энтерогеморрагических штаммов *Escherichia coli*. Он вызывает гибель эпителия толстой кишки и повреждает эндотелий мелких кровеносных сосудов, таких как капилляры легких, печени и почек. Веротоксины являются причиной гемолитико-уремического синдрома, состояния, характеризующейся гемолитической анемией, почечной недостаточностью и тромбоцитопенией [1].

Данный белок принадлежит к семейству Shiga-токсинов. Это семейство относится к классу бактериальных токсинов А-В, который включает в себя семейство токсинов холеры, коклюша и дифтерии. Все эти токсины имеют двукомпонентные структуры, состоящие из ферментативной субъединицы А, связанной с олигомером В. Последний в свою очередь связывается со специфическими рецепторами клеточной поверхности [2].

В данном отчете рассматривается структура олигомера В веротоксина (рис. 1).

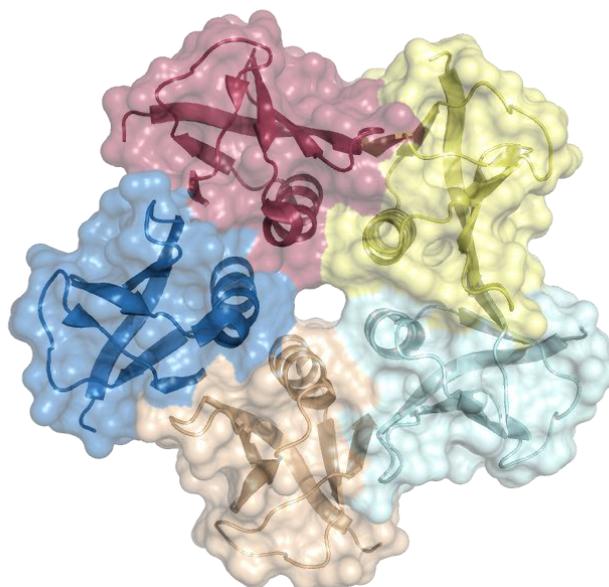


Рисунок 1. Структура олигомера В веротоксина 1 (PDB 2XSC). Разными цветами обозначены цепи А-Е.

Механизм действия веротоксина 1 представлен на рисунке 2 и заключается в следующем. Пять В-субъединиц токсина связываются с компонентом клеточной мембраны, известным как гликолипид глоботриазилцерамид (Gb3). Связывание субъединицы В с Gb3 вызывает индукцию инвагинации узкой трубчатой мембраны, что в свою очередь приводит к образованию внутренних мембранных канальцев и бактерия поглощается клеткой-хозяином. Когда белок находится внутри клетки, субъединица А взаимодействует с рибосомами, чтобы инактивировать их. Эта субъединица представляет собой N-гликозидазу, которая модифицирует РНК составляющую рибосомы для ее последующей инактивации и, таким образом, останавливает синтез белка, что приводит к гибели клетки. Так как сосудистый эндотелий должен постоянно обновляться, уничтожение клеток приводит к разрушению слизистой оболочки и кровоизлиянию [3].

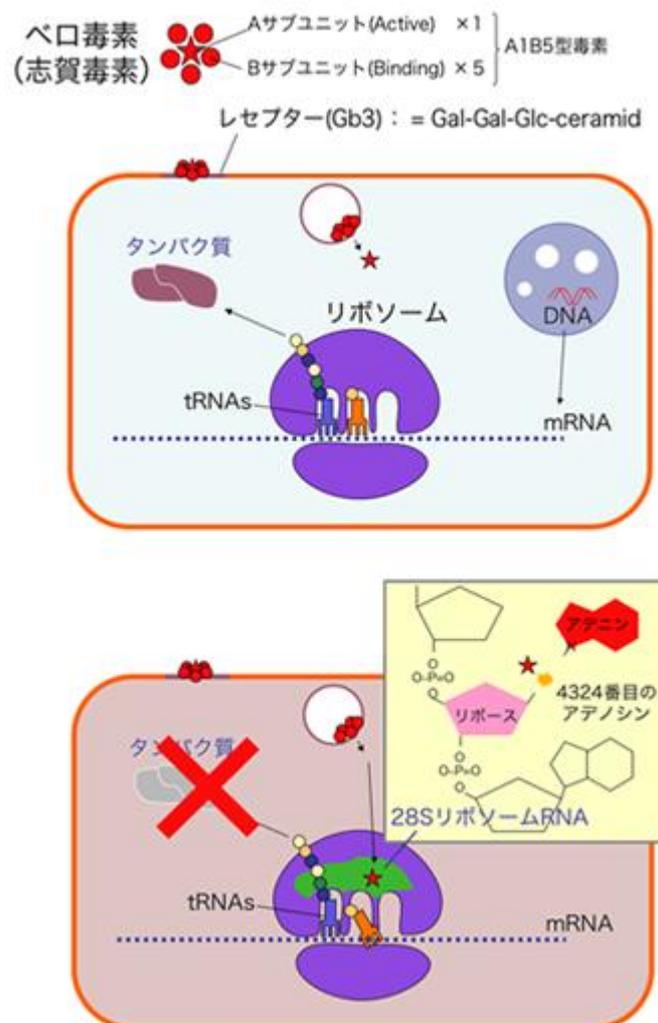


Рисунок 2. На верхней картинке изображен процесс попадания веротоксина 1 внутрь хозяйской клетки, на нижней - последствия. Субъединицы В представлены красными кружочками, а субъединица А – звездочкой. Рибосома покрашена в фиолетовый цвет.

Результаты

Общая информация о модели

Структура 2XSC была добавлена в Protein Data Bank 13 октября 2010 года группой исследователей Stein, P.E.; Boodhoo, A.; Tyrrell, G.J.; Brunton, J.L.; Oeffner, R.D.; Bunkoczi, G.; Read, R.J. Разрешение структуры составляет 2.05 Å, диапазон разрешений: 2.05 – 24.63 Å. Полнота набора структурных факторов составляет 88.8%. Число измеренных в ходе эксперимента рефлексов - 19617. Фазовая проблема для данной структуры была решена с помощью метода изоморфного замещения с использованием пяти производных исходного белка. В качестве «тяжелых» меток использовали такие соединения, как CdCl₂, K₂PtCl₄, AgNO₃, ацетат свинца и мерсалиловую кислоту. Результаты приведены в таблице 1 [2].

TABLE 1 Summary of native and heavy atom derivative data

	Native	CdCl ₂	K ₂ PtCl ₄	Trimethyl lead acetate	AgNO ₃	Mersalyl acid
Number of crystals	1	2	1	1	1	1
Total reflections	84,281	106,731	75,124	62,713	72,494	86,978
Complete (%)	98	98	85	85	71	93
R_{merge} (%) [*]	5.4	5.5	6.2	4.8	5.2	4.6
R_{deriv} (%) [†]	—	17.2	33.8	19.8	15.0	13.7
Number of sites	—	2	7	4	2	3
Phasing power [‡]	—	0.46	1.24	1.14	1.05	0.65

Таблица 1.

Структура веротоксина 1 представляет собой пентамер в котором каждый мономер (69 аминокислотных остатков, масса 7.7 кДа) включает в себя трехцепочечные антипараллельные β-листы и α-спираль. β-листы соседних мономеров формируют шестицепочечные антипараллельные β-листы на внешней поверхности пентамера, в то время как 5 спиралей формируют пору в центре олигомера. Диаметр поры составляет 11 Å и выстелен незаряженными и неполярными аминокислотными остатками. Биологическая единица состоит из пяти асимметрических единиц [2]. Тип кристаллографической симметрии - P 2₁ 2₁ 2₁. Кристаллографическая имеет параметры a: 59.6Å b: 102.4Å c: 56.1Å. В одной ячейке находится 20 молекул.

Индикаторы качества модели

К основным индикаторам индикаторам качества модели относятся:

- **R-фактор** – индикатор соответствия полученной модели экспериментальным данным; минимизируется при оптимизации модели. Хорошими считаются показатели меньше 0.25. R-фактор модели 2XSC составляет 0.152 по DCC, что говорит о хорошем соответствии модели эксперименту.
- **R-free** – индикатор контроля преоптимизации. Хорошими значениями считаются R-free меньше 0,2. R-free полученной модели составляет 0,184 по DCC. Значение R-free – R \approx 3.2% < 10%, что соответствует хорошему качеству кристаллографической модели белка (преоптимизация отсутствует).
- **Clashscore** – индикатор числа недопустимых наложений атомов (> 0.4 Å) на 1000 атомов.
- **Карта Рамачандра** – индикатор оценки конформации остова.
- **Ротамеры** – индикаторы конформации боковых цепей.

С помощью сервиса MolProbity [4], в анализируемую структуру были внесены атомы водорода. Полученное значение Clashscore составило 2,73 и является 99-м перцентилем (таблица 2).

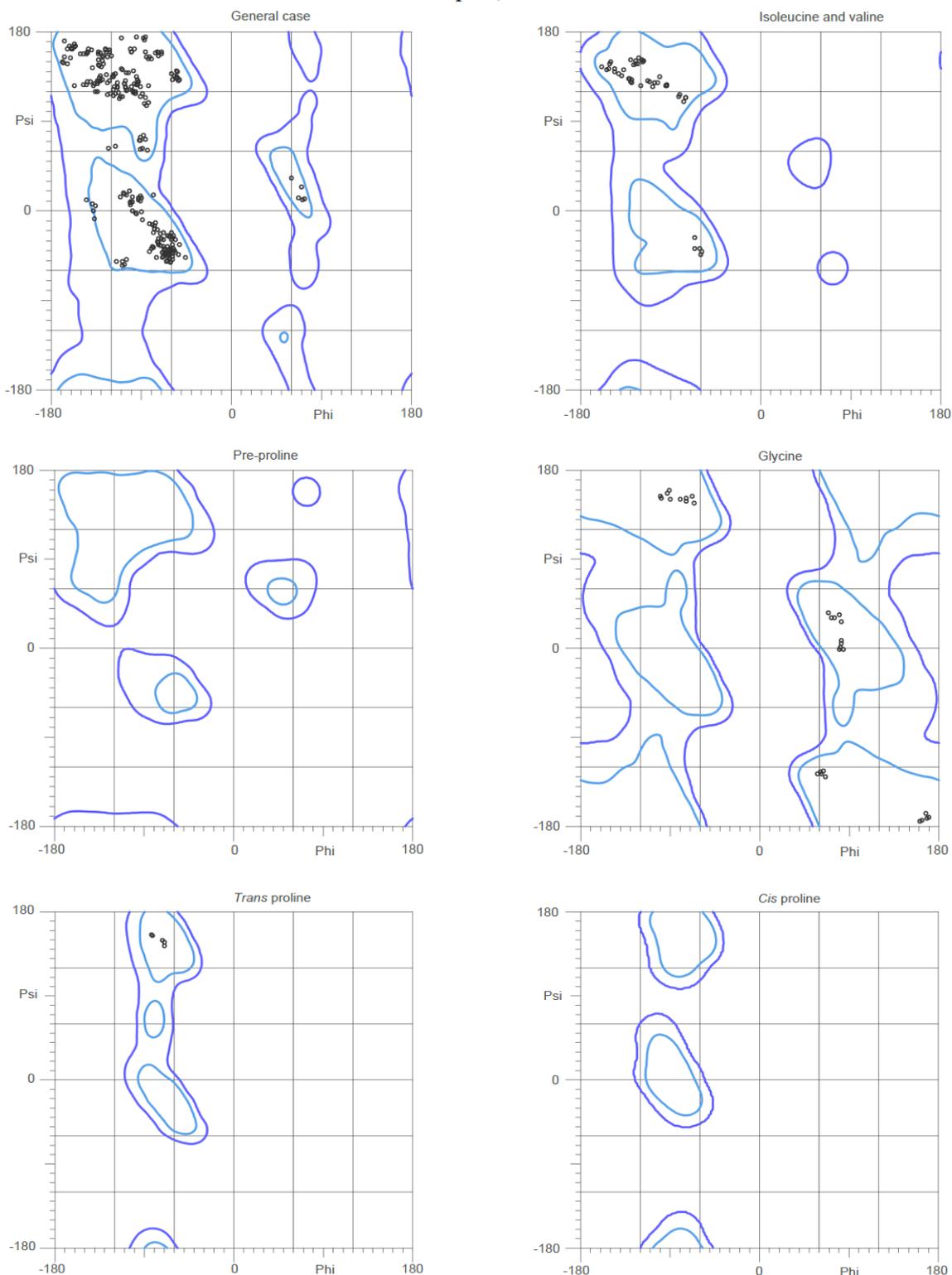
All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	2.73	99 th percentile* (N=725, 2.05Å ± 0.25Å)	
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.			
Protein Geometry	Poor rotamers	1	0.32%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	299	94.92%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	0	0.00%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	330	98.51%	Goal: >98%
	MolProbity score [^]	1.06	100 th percentile* (N=13512, 2.05Å ± 0.25Å)	
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 2831	0.00%	Goal: 0%
	Bad angles:	0 / 3845	0.00%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 5	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%

Таблица 2. Индикаторы качества структуры 2XSC, определенные сервисом MolProbity.

С помощью сервиса MolProbity [4] была построена карта Рамачандра для структуры 2XSC. Маргинальных остатков по данному индикатору обнаружено не было. Карты Рамачандрана для разных типов остатков модели 2XSC представлены на рисунке 3 (слева направо, сверху вниз): всех остатков, кроме Val, Ile, pre-, cys-, trans-Pro, Glu; изолейцина и валина; остатков перед пролином; глицина; транс-пролина; цис-пролина.

MolProbity Ramachandran analysis

2xscFH.pdb, model 1



98.5% (331/336) of all residues were in favored (98%) regions.

100.0% (336/336) of all residues were in allowed (>99.8%) regions.

Рисунок 3. Карты Рамачандра для 2XSC.

Z-score является относительной оценкой RSR и показывает насколько RSR для остатка отличается от среднего RSR для такого же типа остатков в структурах PDB с похожим разрешением. Если значения Z-score > 2, то это значит, что остаток плохо вписан в электронную плотность. С помощью сервиса EDS [5] были получены графические отображения Z-score, результаты также приведены в таблице 3. В структуре 2XSC маргинальные остатки по RSR (Z-score > 2) находятся только в цепи В.

Chain	Nres	<Z>	Sigma	%<-1	%<0	%>1	%>2
A	69	-0.56	0.73	14.49	89.86	1.45	0.00
B	69	-0.31	0.83	4.35	81.16	7.25	4.35
C	69	-0.55	0.79	23.19	85.51	1.45	0.00
D	69	-0.71	0.81	21.74	94.20	0.00	0.00
E	69	-0.17	0.64	1.45	69.57	4.35	0.00
All	345	-0.46	0.76	13.04	84.06	2.90	0.87

Таблица 3. Значения Z-score для каждой из цепей.

Важно отметить, что в структуре 2XSC нет нарушений по длине химических связей и величинам валентных углов, что говорит о хорошем качестве модели.

Анализ маргинальных остатков

На рисунке 4 визуализировано качество моделирования остатков в цепях А-Е структуры 2XSC. Первый график отражает пропорции различных маргинальных остатков в цепи, которые подробно изображены ниже. Остатки имеют цветовую маркировку в соответствии с количеством геометрических критериев качества, для которых они содержат по крайней мере один маргинал: зеленый = 0, желтый = 1, оранжевый = 2 и красный = 3 или более. Красная точка над остатком указывает на плохое соответствие остатка электронной плотности ($RSRZ > 2$). Стречи из 2-х и более не маргинальных остатков изображены в виде зеленой линии. Остатки, которые были в кристалле, но не вошли в модель, окрашены серым.

В таблице 4 приведен список некоторых маргинальных остатков, найденных в структуре 2XSC.

- Molecule 1: SHIGA-LIKE TOXIN 1 SUBUNIT B

Chain A:  97%



- Molecule 1: SHIGA-LIKE TOXIN 1 SUBUNIT B

Chain B:  4% 87% 12%



- Molecule 1: SHIGA-LIKE TOXIN 1 SUBUNIT B

Chain C:  96%



- Molecule 1: SHIGA-LIKE TOXIN 1 SUBUNIT B

Chain D:  99%



- Molecule 1: SHIGA-LIKE TOXIN 1 SUBUNIT B

Chain E:  3% 91% 9%



Рисунок 4. График качества остатков в структуре 2XSC.

Остаток	Критерий маргинальности
(B) Phe 30	Перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов атома O данного остатка и атома HA2 остатка (B) Gly 62
(B) Gly 62	Перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов атома HA2 данного остатка и атома O остатка (B) Phe 30
(C) Thr 12	Перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов атома HG22 данного остатка и атома HG12 остатка (C) Val 22;
(C) Val 22	Перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов атома HG12 данного остатка и атома HG22 остатка (C) Thr 12;
(B) Trp 34 (B)	Перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов атома CE3 данного остатка и атома HA остатка (B) Asn 35, радиусов атома HE3 данного остатка и атома HA остатка (B) Asn 35, радиусов атома HE3 данного остатка и атома CA остатка (B) Asn 35; «плохой» ротамер

(B) Trp 34 (A)	Плохое соответствие экспериментальной электронной плотности ($RSRZ = 2.5 > 2$); «плохой» ротамер
(B) Asn 35	Перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов атома HA данного остатка и атома CE3 остатка (B) Trp 34 (B), радиусов атома HA данного остатка и атома HE3 остатка (B) Trp 34 (B), радиусов атома CA данного остатка и атома HE3 остатка (B) Trp 34 (B)
(B) Asp 26	Плохое соответствие экспериментальной электронной плотности ($RSRZ = 2.6 > 2$)

Таблица 4. Некоторые маргинальные остатки структуры 2XSC.

Маргинальные остатки по перекрытию Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов

С помощью сервиса MolProbity [4] в структуру белка 2XSC были добавлены атомы водорода. Сначала была рассмотрена водородная связь образующаяся между остатками **30 Phe O** и **62 Gly HA2**. Здесь наблюдается перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов на **0,44 Å** (длина водородной связи здесь составляет 1,99 Å вместо привычной в 3,5 Å). Как видно из рисунка 5, на уровне подрезки $\sigma=1,5$ оба остатка достаточно хорошо вписываются в электронную плотность, в связи с чем можно заключить, что данные остатки скорее всего истинно маргинальные.

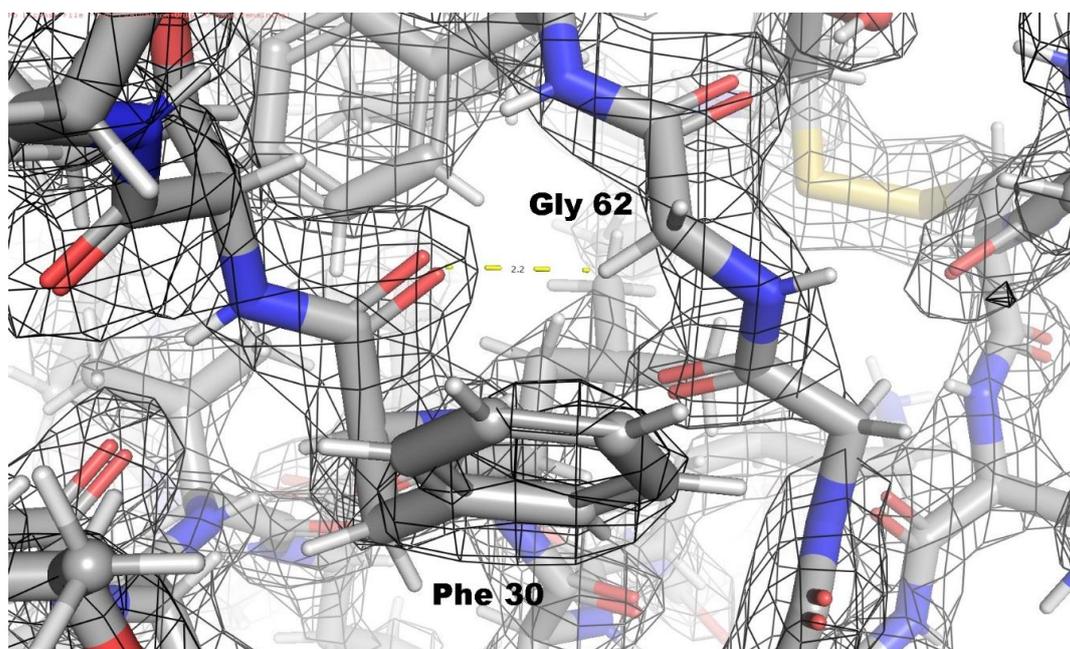


Рисунок 5. Водородная связь образующаяся между остатками 30 Phe O и 62 Gly HA2. Уровень подрезки ЭП $\sigma=1,5$.

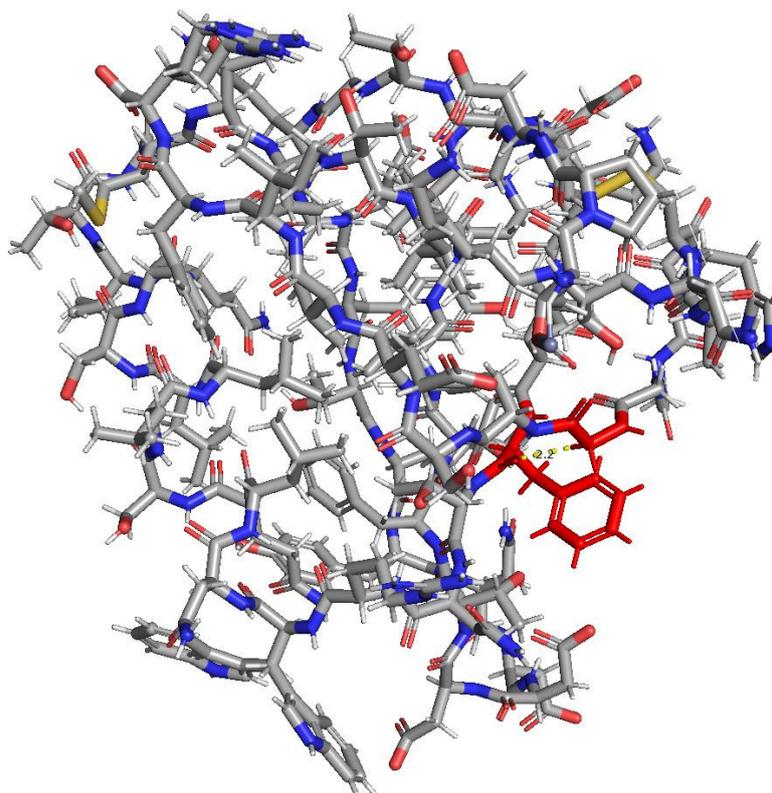


Рисунок 6. Маргинальные остатки 30 Phe и 62 Gly (отмечены красным) в цепи В.

Другим примером перекрывания Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов могут послужить остатки Thr 12 и Val 22 цепи С. Здесь перекрывание также, как и в предыдущем примере, составляет **0,44 Å** (длина водородной связи здесь составляет 1,99 Å вместо привычной в 3,5 Å). На рисунке 7 визуализированы данные остатки на уровне подрезки $\sigma=1$.

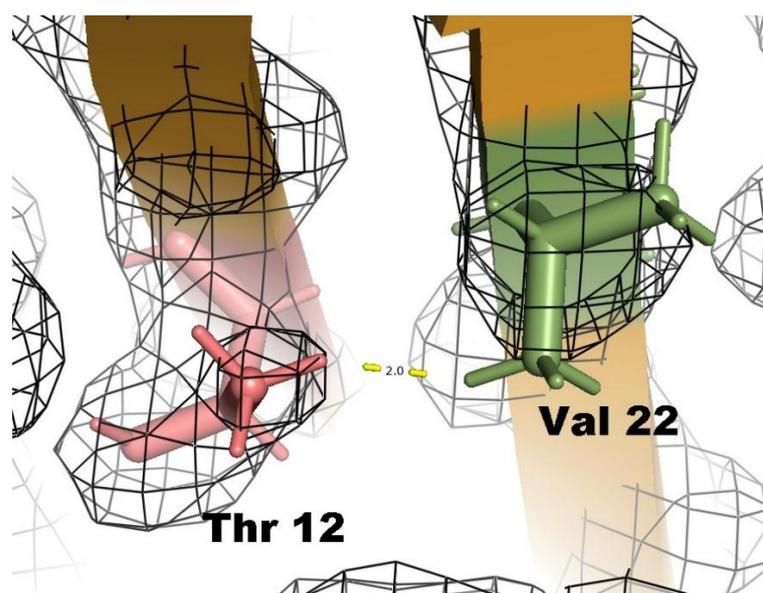


Рисунок 7. Водородная связь образующаяся между остатками 12 Thr HG22 и 22 Val HG12. Уровень подрезки ЭП $\sigma=1$.

Так как остатки хорошо вписываются в электронную плотность, вряд ли это ошибка расшифровки. Предположительно эти остатки также можно отнести к истинно маргинальным.

Еще одним примером перекрытия Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов могут послужить остатки Trp 34 (B) и Asn 35 цепи B. Важно отметить что индекс (B) после номера триптофана обозначает не цепь, которой принадлежит данный аминокислотный остаток, а ротамер. В этом примере перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов происходит при трех различных взаимодействиях (рис. 8). Это атом CE3 Trp 34 (B) и атом HA остатка Asn 35 (перекрытие $0,7\text{\AA}$), атом HE3 Trp 34 (B) и атом HA остатка Asn 35 (перекрытие $0,5\text{\AA}$) и наконец атом HE3 Trp 34 (B) и атом CA остатка Asn 35 (перекрытие $0,42\text{\AA}$).

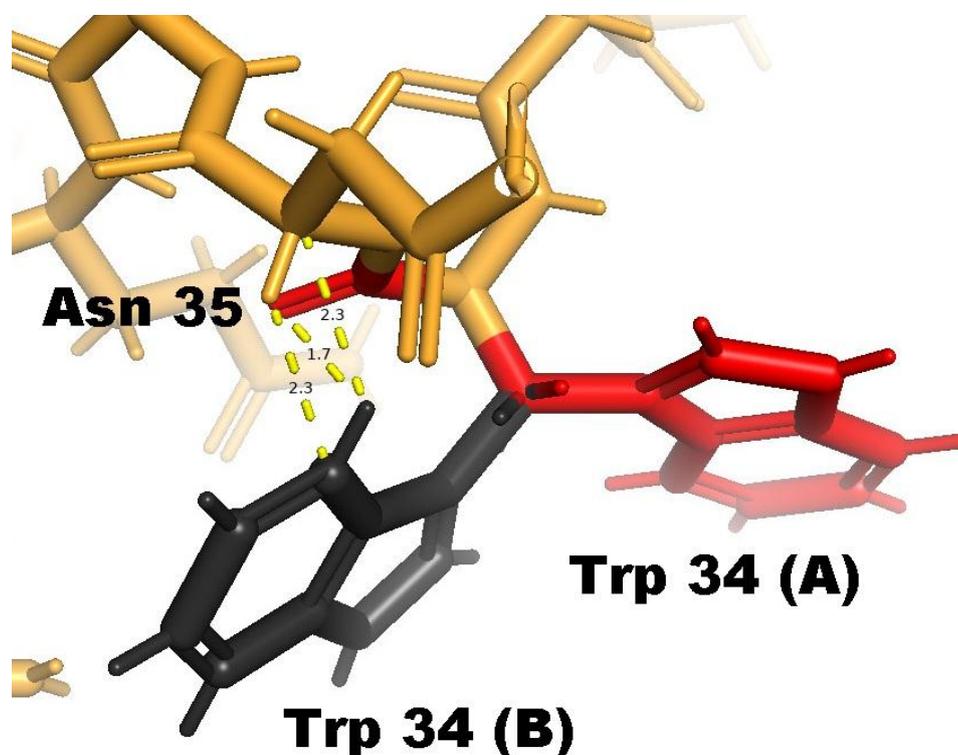


Рисунок 8. Водородные связи образующиеся между атомом CE3 34 Trp (B) и атомом HA остатка Asn 35; между атомом HE3 Trp 34 (B) и атомом HA остатка Asn 35; между атомом HE3 Trp 34 (B) и атомом CA остатка Asn 35. Ротамер Trp (B) изображен черным цветом.

На рисунке 9 визуализированы данные остатки на уровне подрезки $\sigma=1$. Остаток Asn 35 хорошо вписан в ЭП, в то время как остаток Trp 34 (B) плохо. Сделать однозначный вывод о маргинальности остатков не представляется возможным в связи с тем, что один из них является ротамером. Если бы остаток Trp 34 был однозначно определен, скорее

всего перекрытия Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов не наблюдалось бы вовсе.

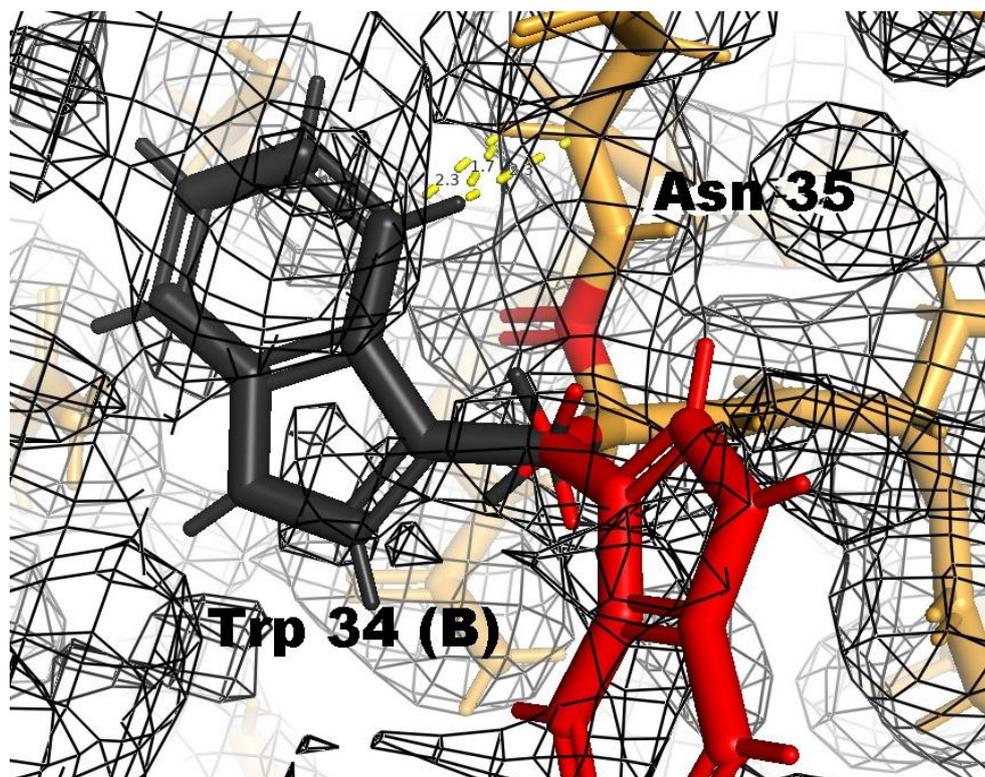


Рисунок 9. Водородные связи, образующиеся между остатками 34 Trp (B) и 35 Asn. Уровень подрезки ЭП $\sigma=1$.

Маргинальные остатки по RSR

В данном случае были рассмотрены остатки, у которых значения RSR демонстрировали несоответствие экспериментальной электронной плотности. Во всем пентамере таких остатков насчитывается шесть штук, но здесь мы разберем подробно лишь два из них. Первый маргинальный остаток по данному индикатору – Asp 26 цепи B. Его Z-score составляет 2,6, и значит этот остаток плохо вписан в электронную плотность по сравнению с остатками того же типа в других структурах с тем же разрешением. На рисунке 10 приведено изображение данного маргинала с визуализацией электронной плотности на уровне уровня подрезки $\sigma=1,5$. Как видно из этого рисунка, электронная плотность покрывает остов полипептидной цепи остатка Asp 26. Причина по которой весь остаток не вписывается в ЭП скорее всего заключается в высокой подвижности данного остатка, так как он находится в петле.

Вторым примером маргинала по RSR стал остаток цепи B – Trp 34, ротамер A. Его Z-score также составляет 2,6. Визуализация ЭП на уровне $\sigma=0,5$ представлена на рисунке 11 (красный ротамер).

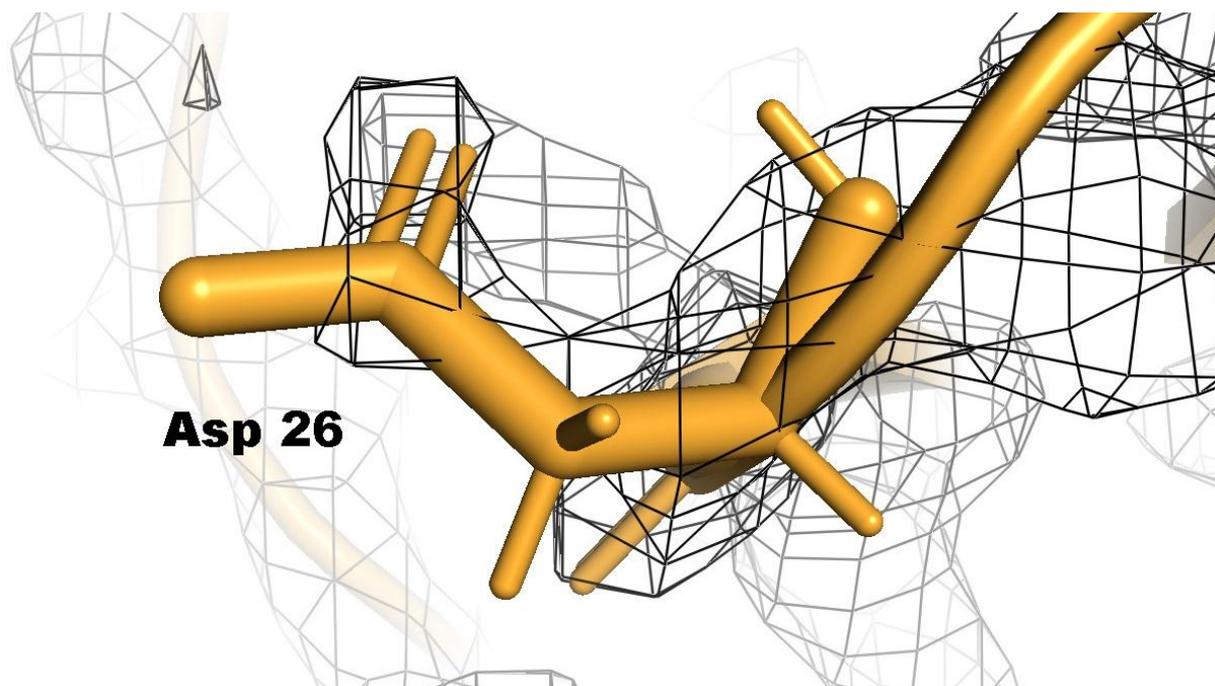


Рисунок 10. ЭП на уровне подрезки $\sigma=1,5$ для остатка Asp 26 цепи В.

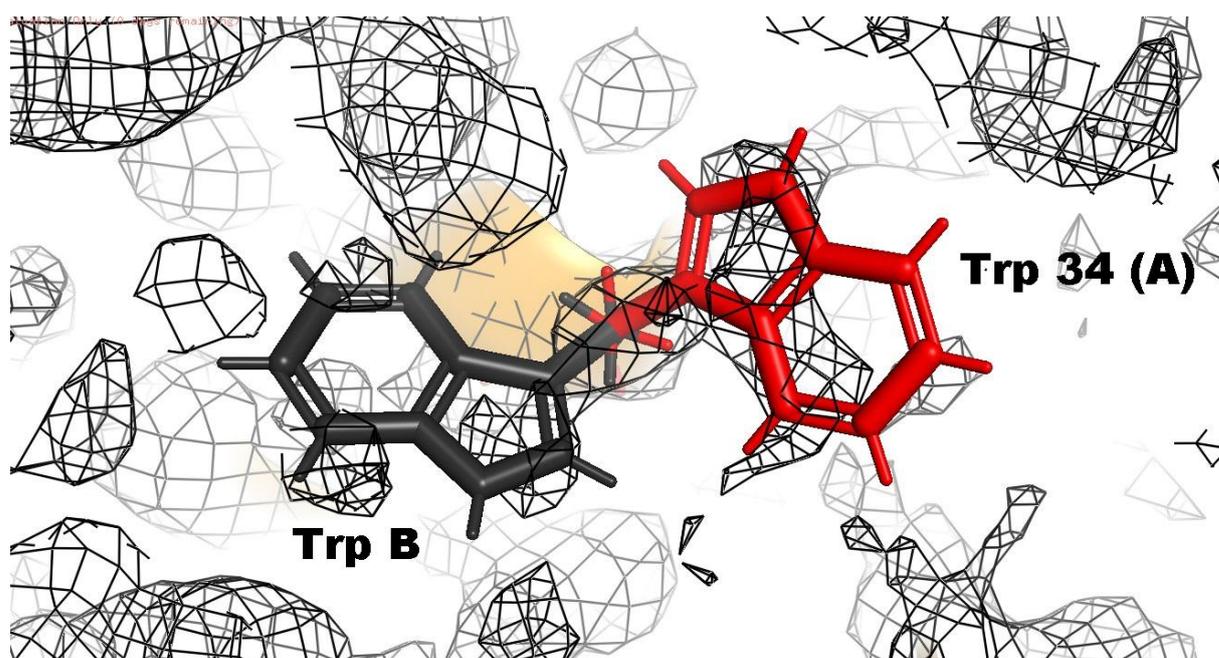


Рисунок 11. ЭП на уровне подрезки $\sigma=0,5$ для остатка Trp 34 цепи В. Красным изображен ротамер А, черным – В.

Уже на таком небольшом уровне подрезки остаток почти не вписывается в ЭП, что в принципе не удивительно. Сделать однозначный вывод о истинной маргинальности данного остатка весьма сложно.

«Плохие» ротамеры

В качестве плохого ротамера данной структуры можно привести ротамер А остатка Trp 34 цепи В. В таблице 5 (выдача MolProbity [4]) представлены торсионные углы для данного ротамера, они составили $\chi_1=342.2$, $\chi_2=80.9$ (рис. 12). А на рисунке 11 визуализированы их ЭП на уровне подрезки $\sigma=0,5$.

#	Alt	Res	High B	Clash > 0.4Å	Ramachandran	Rotamer
			Avg: 36.22	Clashscore: 2.73	Outliers: 0 of 341	Poor rotamers: 1 of 315
B 34	A	TRP	86.76	0.44Å C with B 34 BTRP CE3	Favored (99.29%) General / -62.8,-41.6	OUTLIER (0%) chi angles: 342.2,80.9
B 34	B	TRP	83.98	0.70Å CE3 with B 35 ASN HA	Favored (99.29%) General / -62.8,-41.6	Favored (5.2%) <i>t60</i> chi angles: 173.5,103.8

Таблица 5.

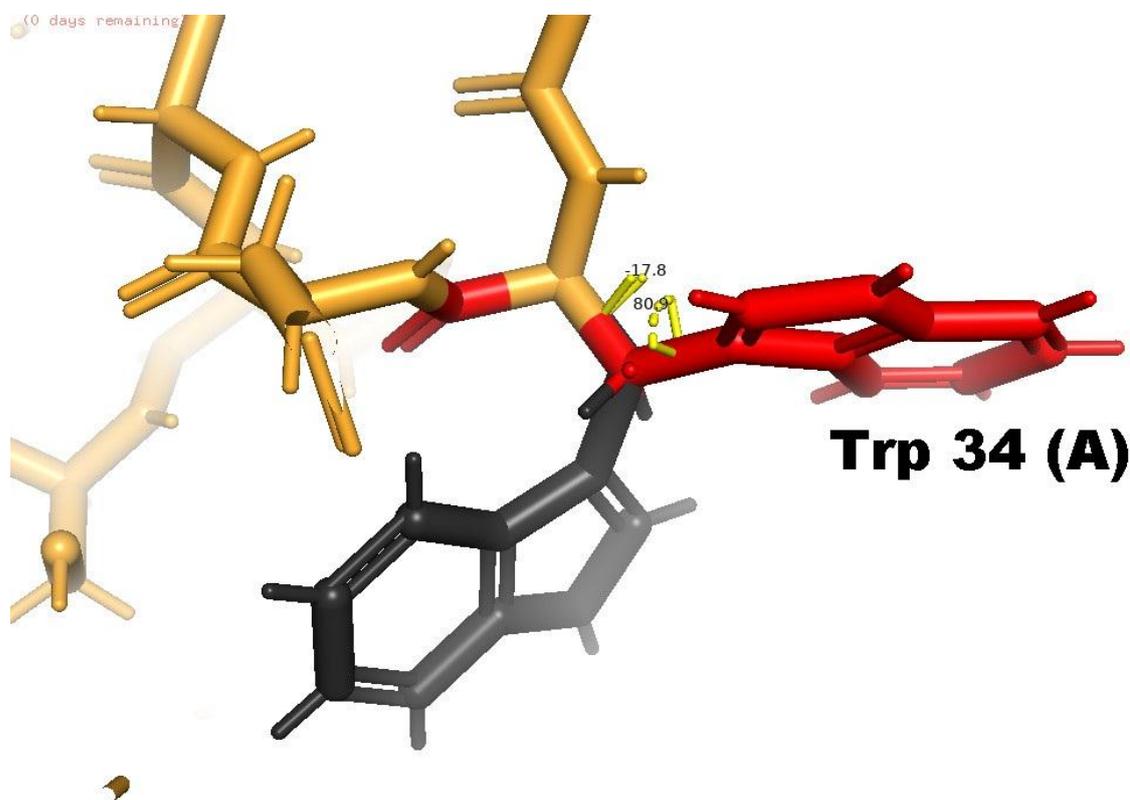


Рисунок 12. Торсионные углы χ_1 , χ_2 ротамера А остатка Trp 34 цепи В.

PDB_REDO

Было проведено сравнение модели из PDB с моделью из PDB_REDO [6]. Значения некоторых параметров для оценки качества двух моделей приведены в таблице 6.

Критерий	2XSC (PDB)	2XSC (PDB_REDO)
R-фактор	0.143	0.144
R-free	0.188	0.177
Валентные углы	0	2
Длины связей	0	4
Карта Рамачандра	0	0
Ротамеры	1	4
Clashscore	2.73 (99-ый перцентиль)	2.37(99-ый перцентиль)
MolProbity Score	1.06 (100-ый перцентиль)	1.10 (100-ый перцентиль)

Таблица 6. Сравнение результатов PDB и PDB_REDO.

Из таблицы 6 видно, что структура практически не улучшилась. Было также обнаружено несколько больше маргинальных остатков по разным критериям (валентным углам, длинам связей и ротамерам) в сравнении с исходной моделью.

Выводы

Структура олигомера В веротоксина 1 PDB ID 2XSC имеет хорошее разрешение и смоделирована достаточно хорошо. Большинство индикаторов качества имеют значения выше среднего для аналогичных структур из PDB. Маргинальные остатки наблюдаются по трем параметрам – RSR, перекрыванию Ван-дер-Ваальсовых радиусов и наличию ротамеров. Дополнительная оптимизация структуры по средствам PDB_REDO излишня.

Список литературы

- [1] <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- [2] Stein et al., 1992, Nature
- [3] https://biosciencedbc.jp/dbsearch/Literature/get_pne_cgpdf.php?year=1997&number=4204&file=w9QOyqr4nX6yPejV1AyCSA==
- [4] <http://molprobity.biochem.duke.edu/>
- [5] <http://eds.bmc.uu.se/eds/>
- [6] <https://pdb-redo.eu/>