

Практикум 4. Валидация.

Николай Николаев

В рамках практикума работали со структурой [1LF2](#) плазмепсина II малярийного плазмодия (*Plasmodium falciparum*) (UniProt [P46925](#)). Это протеаза, во время асексуальной стадии жизненного цикла паразита осуществляющая первый этап переваривания гемоглобина хозяина, разрезая α -цепь между остатками Phe33 и Leu34.

В начале асексуальной стадии зимоген, находящийся в мембране, перемещается к цитостому. После эндоцитоза он оказывается в мембране пищевой вакуоли. Затем протеаза фасципаин отщепляет от белка первые 124 аминокислоты (включаящие в себя его цитозольную и трансмембранную части), переводя его в растворимую, активную форму. Таким образом, остаток №1 в структуре из PDB соответствует остатку №125 в последовательности из UniProt. Далее нумерация остатков будет приводиться в соответствии с записью в PDB.

Задание 1

На карте электронной плотности все атомы остатков, участвующих в катализе (Asp34 и Asp214; см. Рис. 1, 1) или образующих дисульфидные мостики (47-52 и 249-285; см. Рис. 1, 2-3) ясно различимы. Электронная плотность плохо различима у двух поверхностных петель (пример – Рис. 1, 4), которые находятся вдали от активного центра и не участвуют напрямую в катализе.

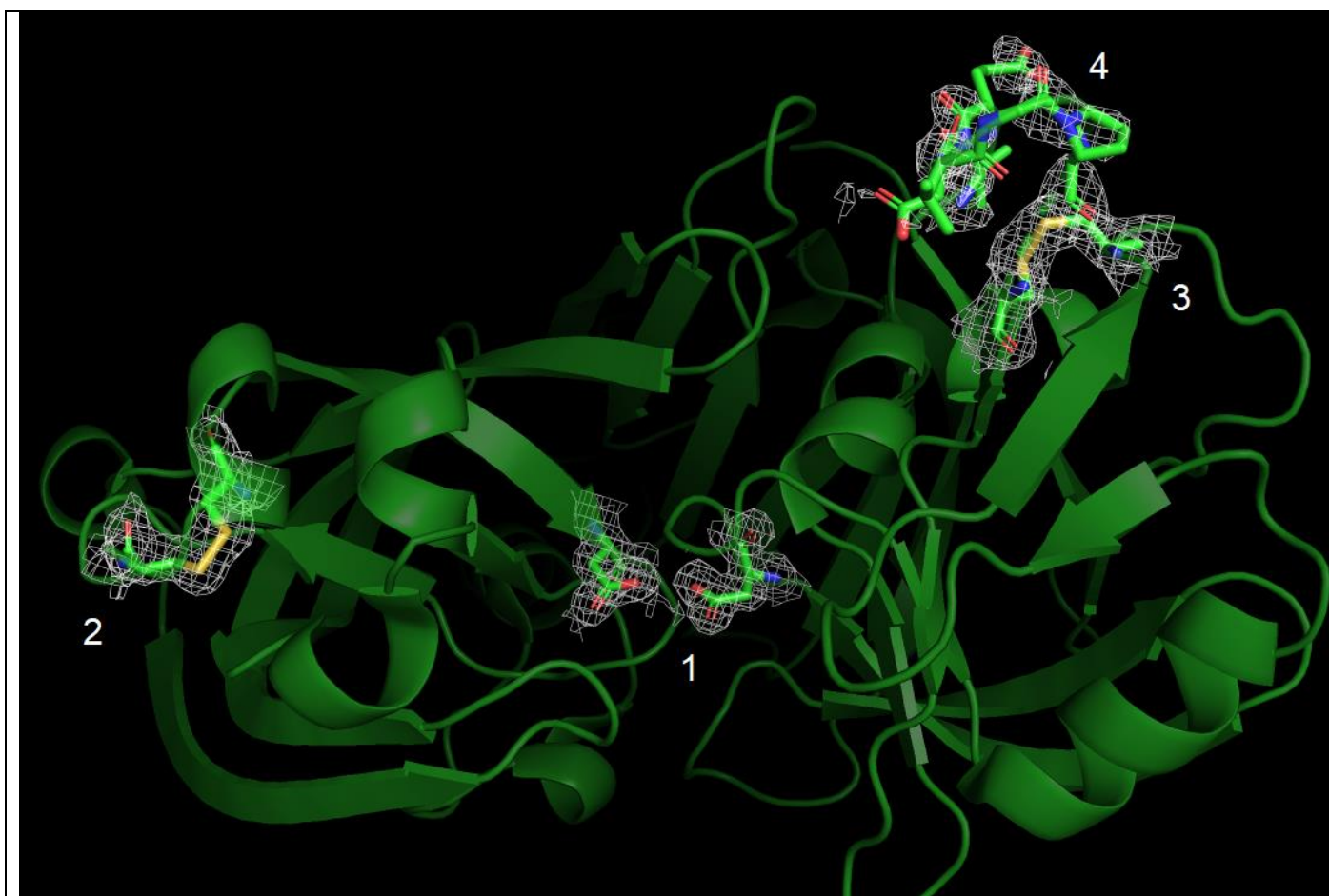


Рис. 1. Плазмепсин II и фрагменты карты электронной плотности для каталитически важных остатков Asp34 и Asp214 (1), образующих дисульфидные мостики остатков Cys47 и Cys52 (2), Cys249 и Cys285 (3), а также петля из остатков 277-283 с «пропадающей» электронной плотностью (4) (везде уровень отсечки – 1, $\sigma_{\text{cut}}=2$) ([Ссылка на PyMol-сессию](#)).

Таким образом, по внешнему виду карты электронной плотности нельзя заключить, что структура непригодна для анализа.

Задание 2

Ионов металлов в структуре нет, поэтому работу с Checkymetal не проводили. Отчёт по валидации структуры в PDB доступен [по ссылке](#). MolProbity запускали по инструкциям из задания со стандартными параметрами. Сводные таблицы MolProbity доступны по ссылкам: [до добавления водородов](#), [после](#). Выдача Undowser после добавления водородов и анализа контактов атомов и геометрии в MolProbity доступна [по ссылке](#) и на Рис. 2.

Стерические столкновения воды

Water ID	Clashes with	Water B	Contact B	Clash Severity	Clash with Polar May be ion	Clash with non-polar Unmodeled alt or noise	Clash with water Occ <1 or ligand	Clash with altloc Add or rename alts
A: 392 :HOH:	HB3 of A: 55 :LYS:	96.25	20.77	0.904		x		
	H63 of A: 43 :PRO:	96.25	7.93	0.534		x		
	O of A: 56 :HIS:	96.25	20.55	0.512	+ ion			
	HB3 of A: 121 :ASP:	96.25	14.05	0.439		x		
A: 653 :HOH:	CG of A: 43 :PRO:	96.25	7.93	0.432		x		
	HB2 of A: 88 :LYS:	93.24	21.60	0.573		x		
A: 572 :HOH:	HB2 of A: 69 :ASP:	93.24	23.16	0.474		x		
A: 572 :HOH:	HD3 of A: 327 :LYS:	30.25	50.30	0.767		x		
A: 652 :HOH:	HB2 of A: 205 :SER:	35.23	28.57	0.744		x		
A: 625 :HOH:	HE1 of A: 276 :HIS:	79.20	79.63	0.665		x		
A: 596 :HOH:	O of A: 503 :HOH:	55.15	52.86	0.596			x	
A: 503 :HOH:	O of A: 596 :HOH:	52.86	55.15	0.596			x	
A: 334 :HOH:	HA of A: 115 :TYR:	100.00	16.03	0.586		x		
A: 398 :HOH:	N of A: 190 :ASP:	21.68	18.60	0.572		x		
A: 582 :HOH:	HB2 of A: 200 :HIS:	29.71	28.99	0.549		x		
A: 331 :HOH:	HE1 of A: 241 :PHE:	78.93	2.00	0.528		x		
A: 557 :HOH:	HA3 of A: 283 :GLY:	38.70	51.09	0.525		x		
A: 643 :HOH:	HE2 of A: 68 :LYS:	23.43	34.67	0.484		x		
A: 668 :HOH:	ND2 of A: 13 :ASN:	42.36	32.73	0.462		x		
A: 613 :HOH:	OD2 of A: 10 :ASP:	33.50	23.86	0.459	+ ion			
A: 386 :HOH:	H62 of A: 255 :PRO:	96.81	18.95	0.458		x		
A: 555 :HOH:	O of A: 234 :LEU:	15.35	36.39	0.447	+ ion			

Рис. 2. Вода в структуре, имеющая «столкновения» с другими атомами.

Из выдачи Undowser видно, что большое число столкновений с аминокислотными остатками имеет вода 392 (столкновения с Lys55, Pro43, His56 и Asp121). Она также имеет большой B-фактор (96,25). Большая часть столкновений происходит с неполярными частями остатков. Авторы инструмента указывают, что в таком случае вероятнее всего, что «вода» - это несмоделированное альтернативное положение атома белка либо шум. На карте электронной плотности (Рис. 3) даже на уровне отсечки 1 не детектируется никакой электронной плотности, которая могла бы соответствовать кислороду воды.

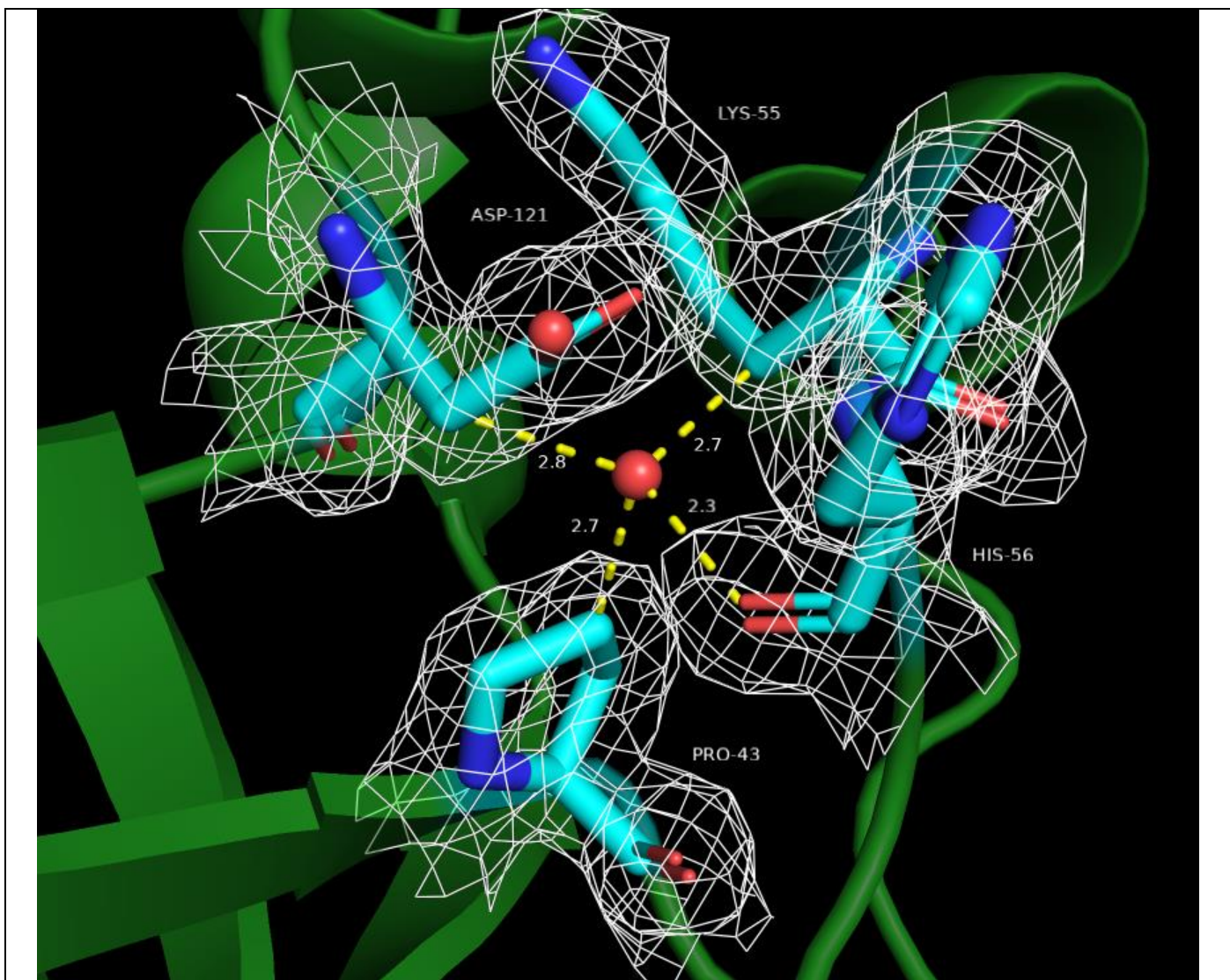


Рис. 3. Вода 392, её столкновения с аминокислотными остатками и электронная плотность данного участка структуры на уровне отсечки 1 ($\sigma_{\text{ave}}=2$). Обратите внимание на «отсутствие» электронной плотности вокруг воды. ([Ссылка на PyMol-сессию](#)).

Такая же ситуация наблюдается для **воды 653**, сталкивающейся с водородами при β -углеродах Asp69 и Lys88 (Рис. 4). Она так же имеет большой В-фактор (93,24) и отсутствует на карте электронной плотности на уровне отсечки 1.

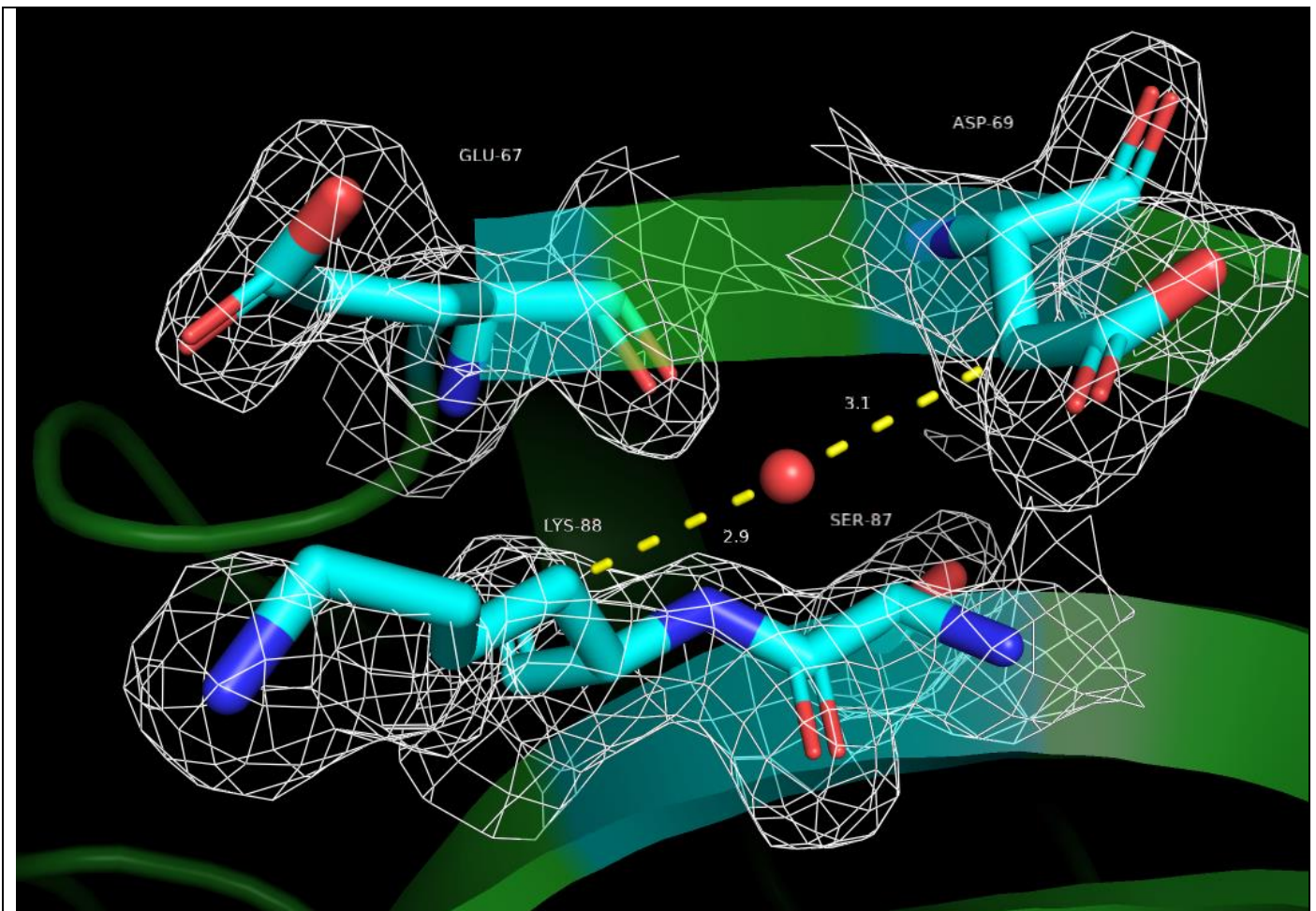


Рис. 4. Вода 653, её столкновения с аминокислотными остатками и электронная плотность данного участка структуры на уровне отсечки 1 ($\sigma_{\text{cut}}=2$). Обратите внимание на «отсутствие» электронной плотности вокруг воды. ([Ссылка на PyMol-сессию](#)).

Таким образом, скорее всего, в реальном кристалле в этих позициях не содержится никаких тяжелых атомов и воду 392 и 653 следует удалить.

Длины связей

Любопытно, что в то время, как в отчёте по валидации из PDB говорится об отсутствии неестественных длин связей в аминокислотных остатках, MolProbity выделяет два маргинальных по этому признаку остатка: **Met15** (Рис. 5) и **Met286** (Рис. 6). В обоих случаях связь серы с CH_3 -группой неестественно длинная: 2,0 Å у Met15, 1,9 Å у Met286 против нормальной для связи S-C длины 1,8 Å.

В случае Met15 мы выдвигаем предположение, что радикал был неправильно вписан в электронную плотность: возможно, его цепь изогнута так, что атом серы находится в положении, отмеченном на Рис. 4 стрелкой 1, а CH_3 -группа – в положении, отмеченном стрелкой 2. Тогда электронная плотность, которую авторы структуры приписали CH_3 -группе метионина, может принадлежать молекуле воды, донирующей водородную связь сере метионина.

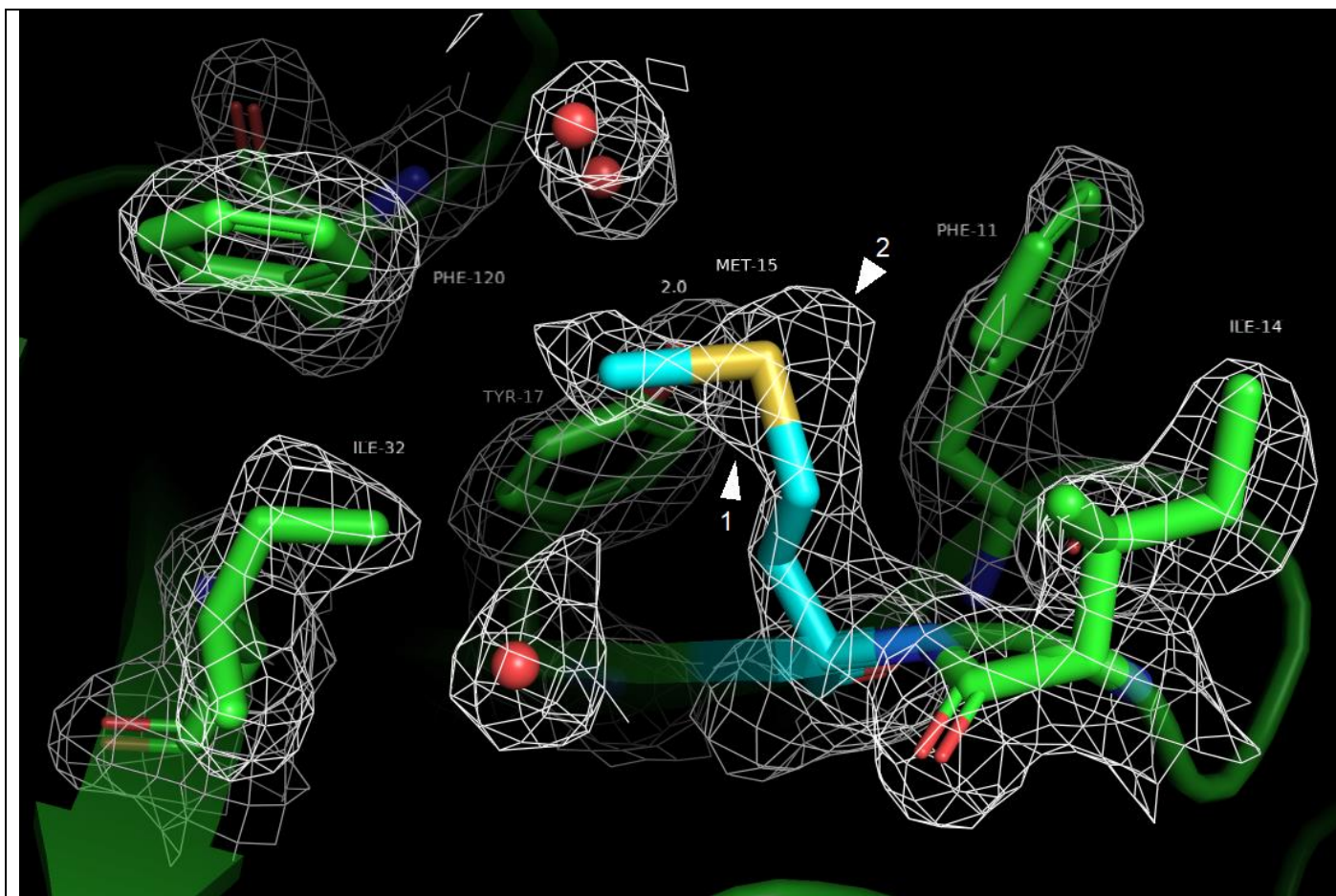


Рис. 5. Met15 и его ближайшее окружение. Уровень подрезки 1, $\sigma_{\text{cut}}=2$. Стрелками 1, 2 указаны предполагаемые истинные положения атомов S и C, соответственно ([Ссылка на PyMol-сессию](#)).

В случае с Met286 CH_3 -группа вообще «выпадает» из облака электронной плотности на уровне подрезки 1. Возможно, координаты атома углерода были указаны неточно из-за шума. Возможно также, что его следовало поместить диаметрально противоположно относительно атома серы.

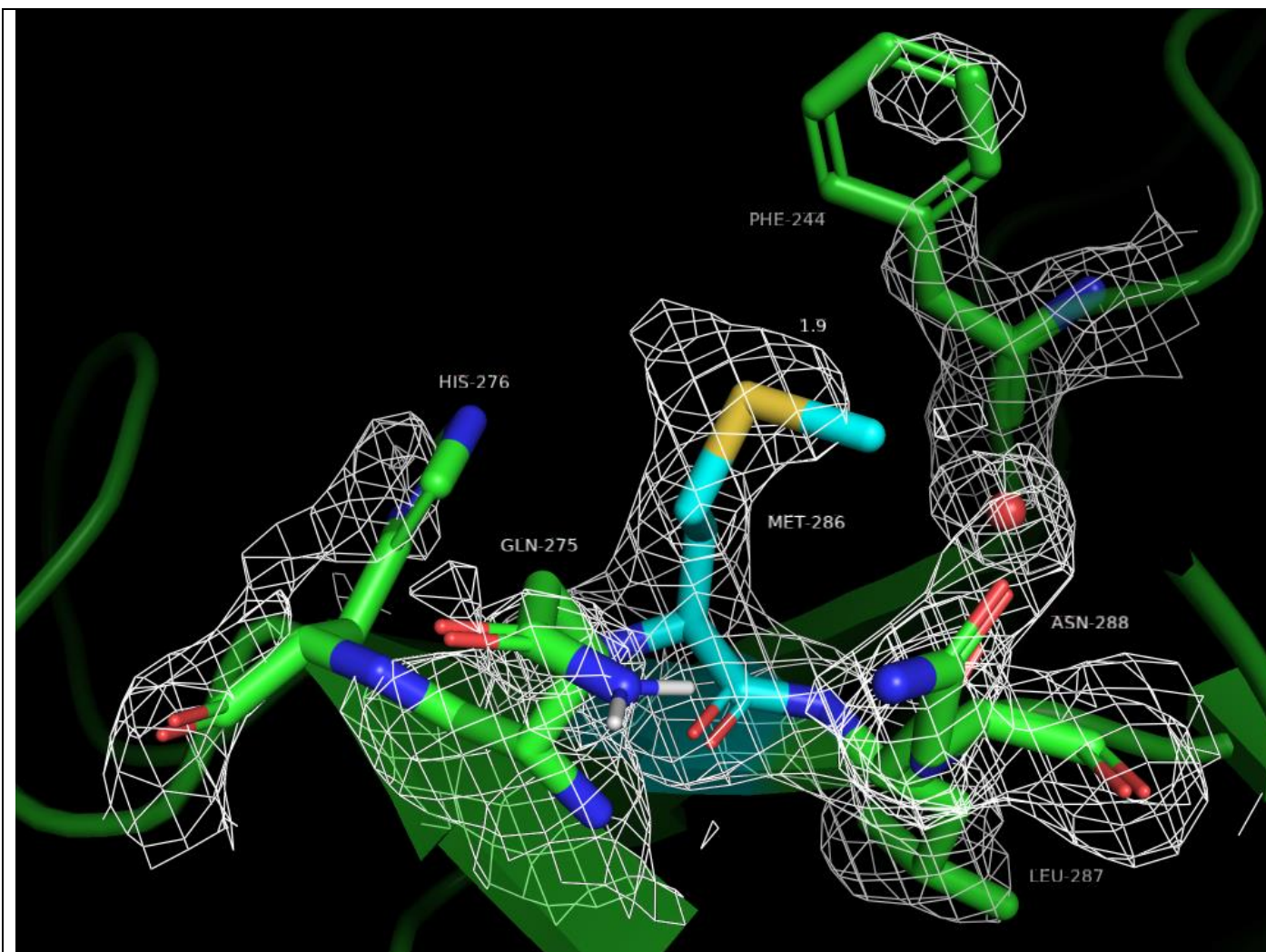


Рис. 6. Met286 и его ближайшее окружение. Уровень подрезки 1, carve=2 ([Ссылка на PyMol-сессию](#)).

Аминокислоты в запрещённых областях карты Рамачандрана

И отчёт в PDB, и MolProbity указывают на 5 аминокислот, маргинальных по значениям двугранных углов ϕ или ψ : Ser2, Asp162, His276, Ile277, **Pro282**. Последний остаток был рассмотрен подробнее.

Карта Рамачандрана для транс-пролинов с нанесёнными на неё транс-пролинами из белка приведена на Рис. 7. Видно, что Pro282 имеет нормальный угол ϕ и запрещённый угол ψ .

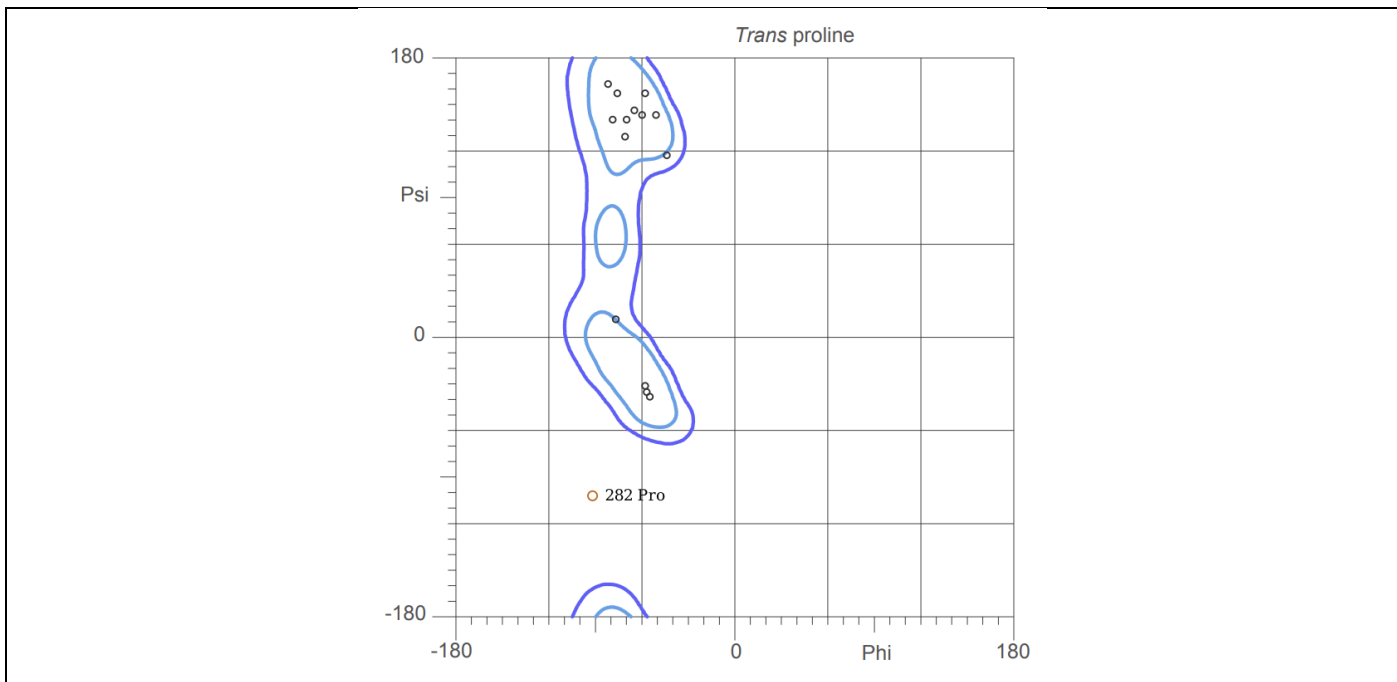


Рис. 7. Карта Рамачандрана для транс-пролина. Отмечены транс-пролины из белка.

На Рис. 8 представлена петля, частью которой является Pro282. С одной стороны, возможно, что запрещённый угол ψ пролина стабилизируется смыканием β -тяжей, между которыми находится петля. Однако наверняка заключить это нельзя, поскольку, как уже обсуждалось ранее, данная петля очень плохо представлена на карте электронной плотности (см. Рис. 1(4)).

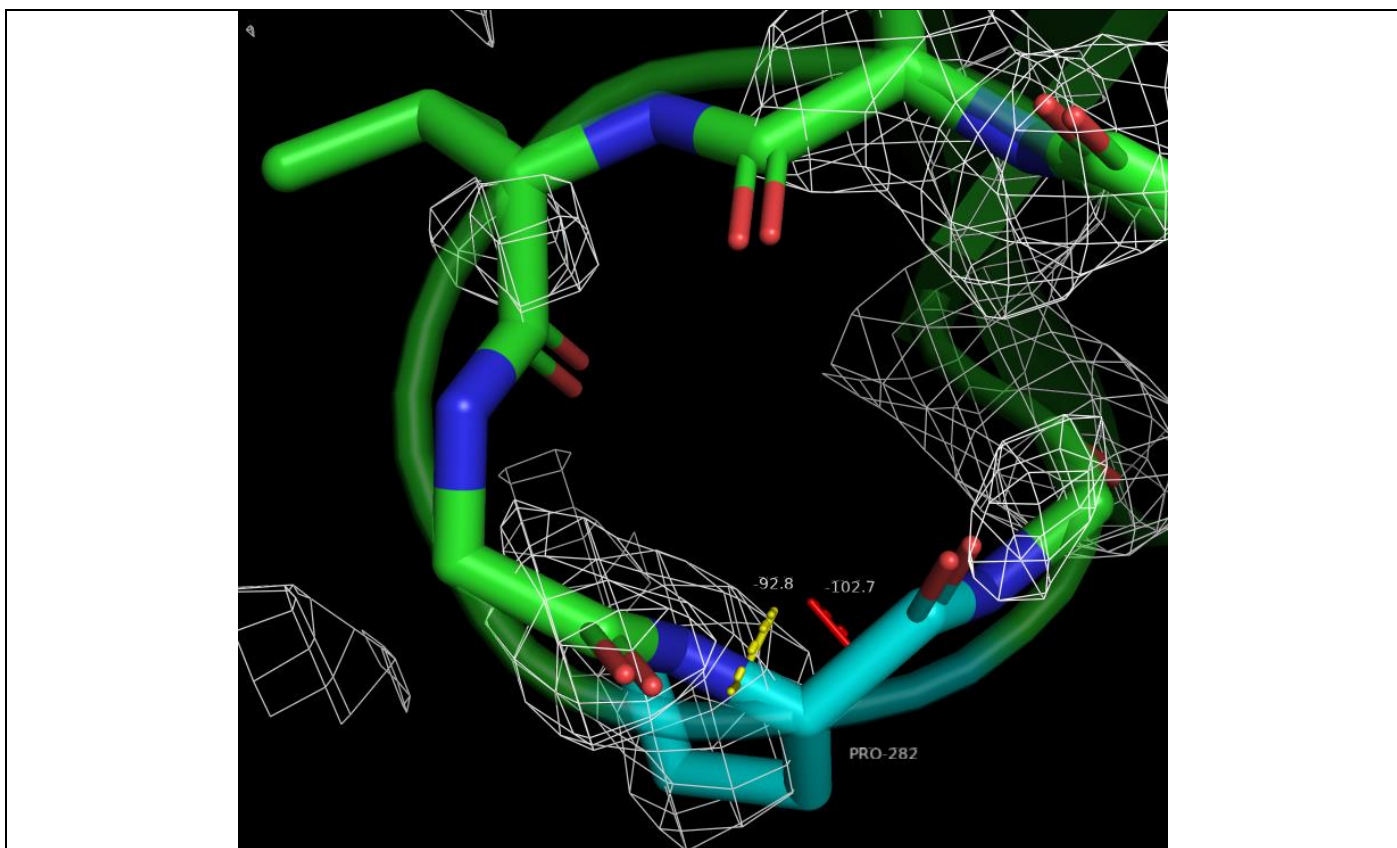


Рис. 8. Пролин 282 и его ближайшее окружение. Угол ϕ отмечен жёлтым, угол ψ – красным ([Ссылка на PyMol-сессию](#)).

Заключение

Были рассмотрены две молекулы воды, имеющие стерические столкновения с аминокислотными остатками (392 и 653), которые, скорее всего, возникли в структуре из-за шума и должны быть удалены. Также были

рассмотрены два остатка (Met15 и Met286) с аномально длинной связью C-S, что могло возникнуть по причине неправильного вписывания радикалов в электронную плотность. Наконец, был рассмотрен остаток Pro282 с запрещённым значением двугранного угла ψ , что может объясняться изгибанием петли для образования β -листа.