

# Отчет по расшифровке структуры 4GUW

Выполнен студентом 4 курса ФББ МГУ

Пензаром Дмитрием

Москва 2016 год

# Введение

## Кристалл

Структура 4GUW – одна из нескольких структур RIP 1 (рибосом-инактивирующего белка типа 1), полученных в результате эксперимента в 2012 группой ученых - **Singh, A., Pandey, S., Kushwaha, G.S., Bhushan, A., Sinha, M., Kaur, P., Sharma, S., Singh, T.P.** К сожалению, на данный момент нельзя найти ни статьи, ни ее черновой версии, в которых бы рассказывалось о целях и способе получения этих структур (однако параметры эксперимента доступны на сайте PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>), о чем речь пойдет несколько дальше).

Белок был кристаллизован целиком, удалось установить положение всех тяжелых атомов аминокислот. Кристаллизация производилась в растворе pH 6.7 при температуре 298 градусов Кельвина. Белок кристаллизовался в виде комплекса с липосахаридом.

Фазовая проблема решалась молекулярным замещением (известно большое количество гомологов данного белка, из которых и была получена модель).

В ходе эксперимента было получено 33243 рефлексов, с разрешением от 1.6Å до 65.12 Å. Полнота данных составляет 99.7%, что позволяет также доверять указанному разрешению.

Далее было использовано 31148 рефлексов, 1681 (5 % всех рефлексов) из которых в ходе оптимизации не использовались, а использовались для расчета R-free.

В результате было получено  $R = 0.193$  и  $R\text{-free} = 0.223$ . Отсутствие сильного различия между ними позволяет доверять полученным цифрам. Полученное значение R-free приемлемо, хотя и превышает порог для очень хороших структур (0.2).

В ассиметричной ячейке, как и в биологической единице, представлен мономер белка, что соответствует данным о RIP-1.

Симметрия в кристалле  $H3$  (в современной номенклатуре -  $P3$ )

Параметры элементарной ячейки приведены в таблице 1.

**Таблица 1.** Параметры элементарной ячейки кристалла

Unit Cell	
Length (Å)	Angle (°)
a = 130.24	$\alpha = 90$
b = 130.24	$\beta = 90$
c = 39.82	$\gamma = 120$

## О белке

**RIP** (Ribosome Inactivating Protein) - семейство белков, инактивирующих рибосому за счет расщепления в ней N-гликозидной связи определенного нуклеотида (в случае белков 2-го типа это A4324). Данная группа белков широко распространена у растений (печально известный рицин, находящийся, к примеру, в семенах клещевины), а также встречается у некоторых типов бактерий.

Выделяют два типа RIP – RIP-1, состоящий из одной цепи, обеспечивающей как проникновение в клетку, так и каталитическую активность (N-гликозид гидролаза), и RIP-2, в котором за эти функции отвечают две разные белковые цепи.

Как уже говорилось выше, белок, структура которого была получена, относится как раз к RIP первого типа.

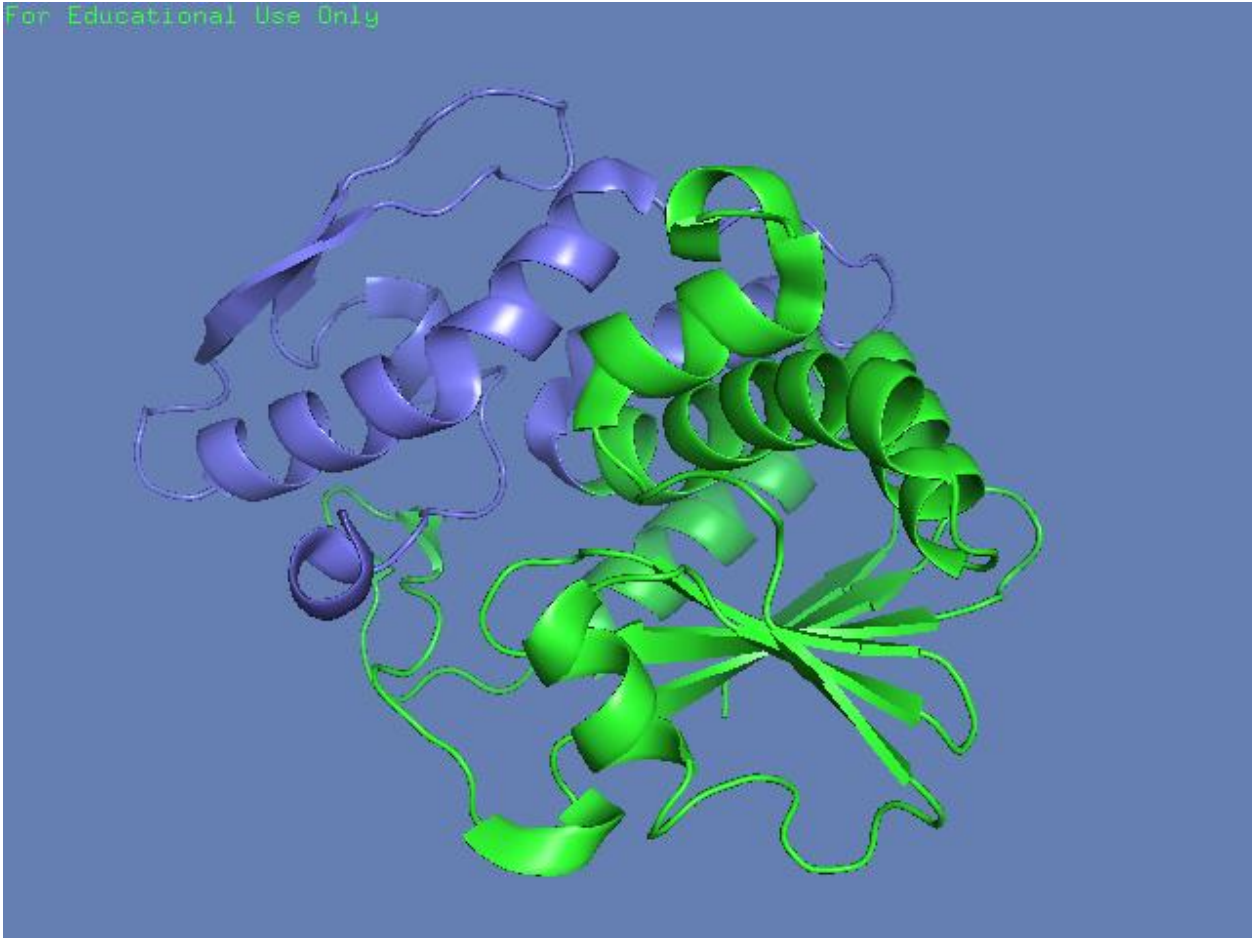
По данным CATN белок состоит из двух доменов, данные о которых приведены в таблице 2.

Изображение структуры белка, покрашенной по доменам приведено на рис.1.

**Таблица 2.** Доменный состав белка 4guw по данным CATN

Координаты	Домен	Класс	Архитектура	Топология	Гомология
A, 1-162	4guwA01	<u>Альфа и Бета</u>	<u>3-слойный(aba) сэндвич</u>	1 домен А-субъединицы 1 рицина	1 домен А-субъединицы рицина
A2, 163-246	4guwA02	<u>Несколько вторичных структур</u>	<u>Иррегулярная</u>	2 домен А-субъединицы рицина	2 домен А-субъединицы рицина

For Educational Use Only



**Рисунок 1.** Раскраска белка 4guw по доменам. Зеленым покрашен домен 4guwA01, синим – 4guwA02.

Следует отметить, что для белка 4guw характерно наличие сравнительно большого количества спиралей типа 3-10 (пример на рисунке 2) и бета-мостов – «бета-листов», состоящих из двух аминокислот соединенных связями, как в бета-листе (рисунок 3). На рисунке 4 показано предсказание вторичной структуры при помощи STRIDE, т.к для DSSP хорошей визуализации найдено не было, а выдачи программ практически не отличаются.

For Educational Use Only

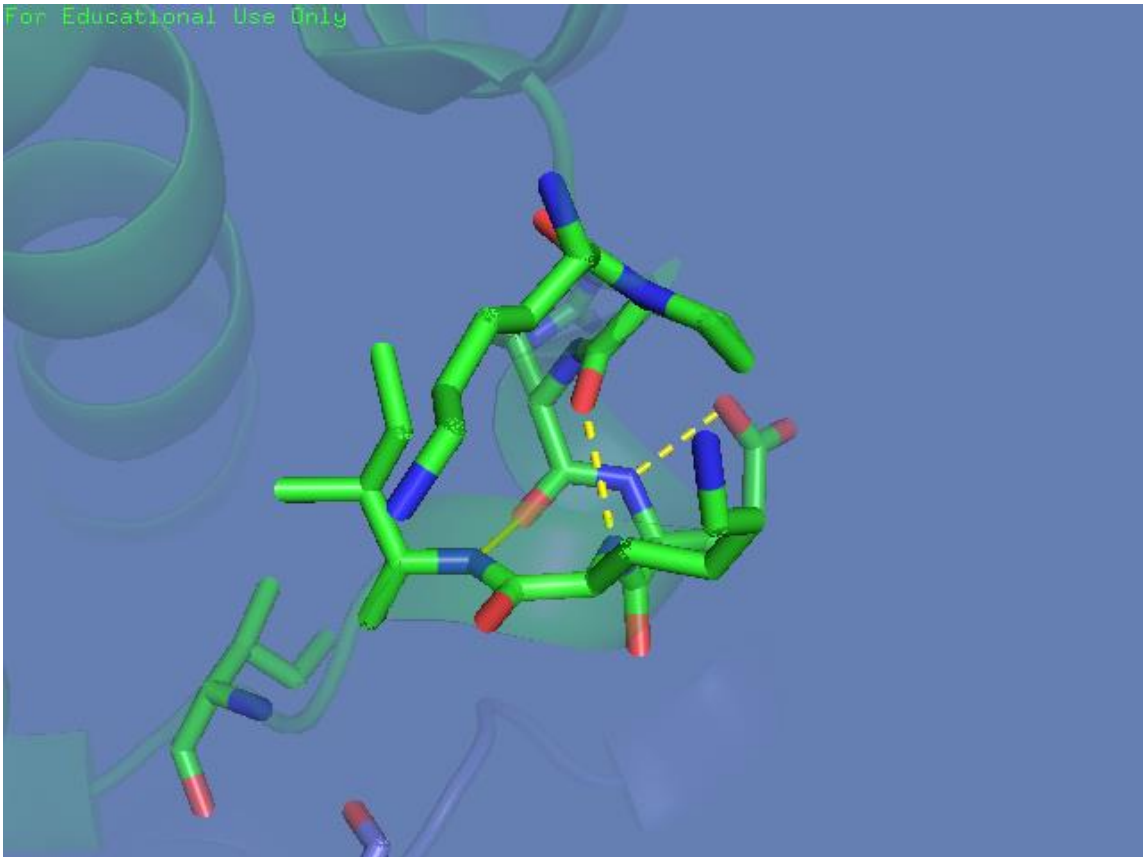


Рисунок 2. 3-10 спираль, образующийся между остатками 120-125 белка, предсказание получено при помощи сервиса DSSP (<http://www.cmbi.ru.nl/dssp.html>).

For Educational Use Only

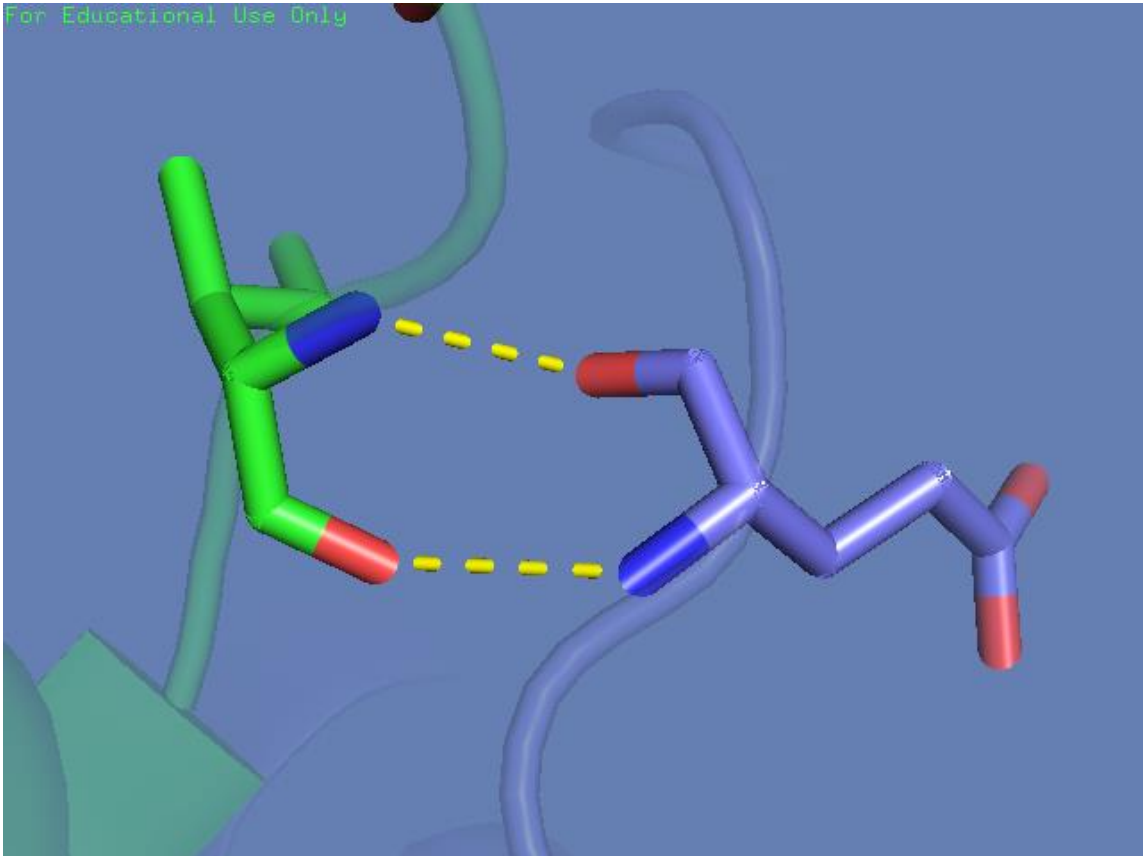








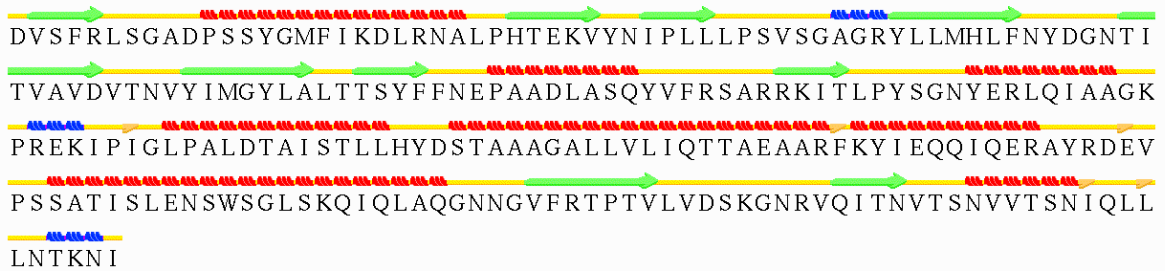


Рисунок 3. Бета-мост, образующийся между 127ILE и GLU 179, предсказание получено при помощи сервиса DSSP (<http://www.cmbi.ru.nl/dssp.html>)

**Legend of secondary structure icons:**

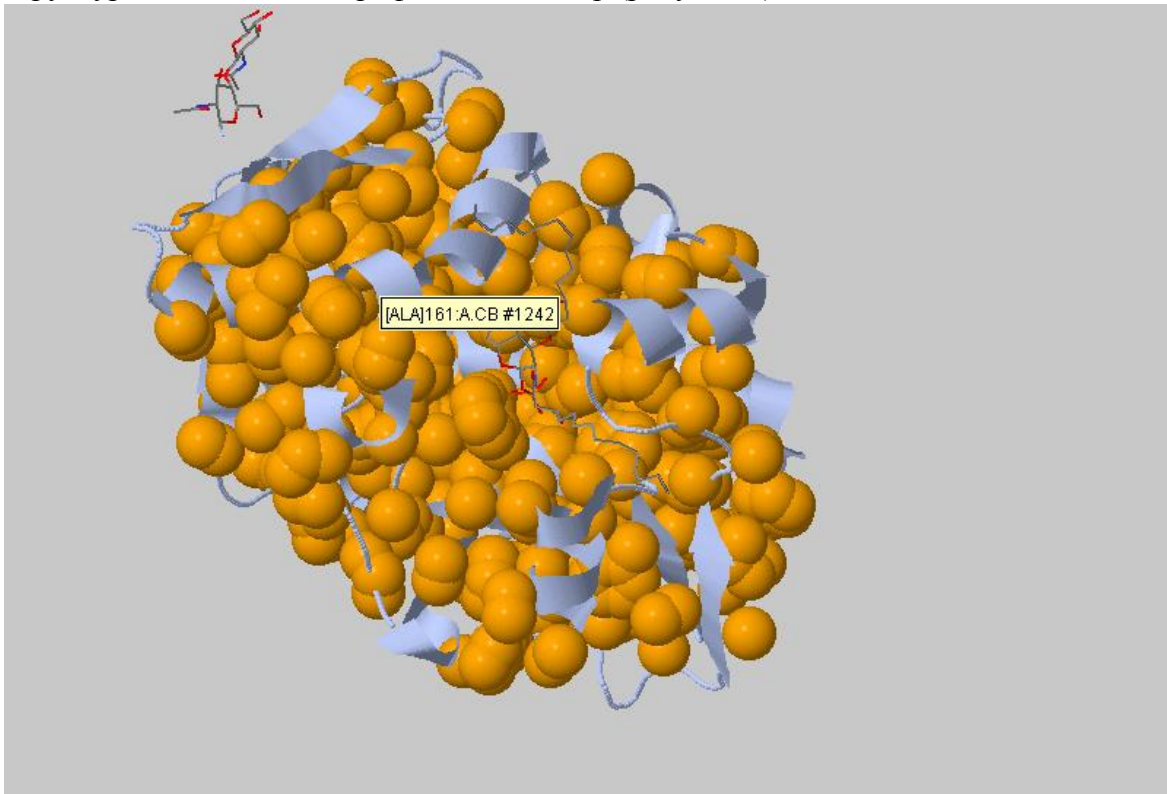
 H Alpha-Helix	 T Turn
 E Extended Configuration (Beta-sheet)	 C or " " Coil
 B Isolated Beta Bridge	 G 3-10 Helix
 b Isolated Beta Bridge (Type 3 Fig 4.cd)	 I Pi-Helix

**HYDROLASE 30-AUG-12 4GUW**  
Chain: A



**Рисунок 4.** Разметка, полученная при помощи сервиса STRIDE (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/>)

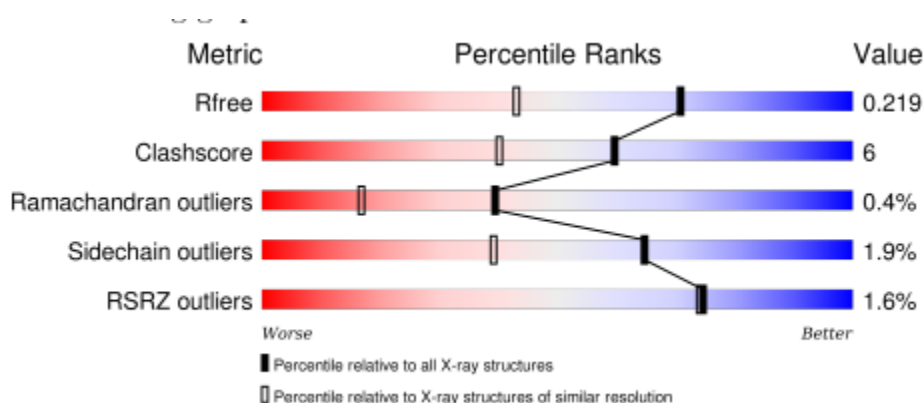
По данным Clud (<http://mouse.belozersky.msu.ru/npidb/cgi-bin/hftri.pl>) (порог 5A) структура имеет один гидрофобный кластер (рисунок 5).



**Рисунок 5.** Гидрофобный кластер в структуре, результаты получены при помощи программы Clud (<http://mouse.belozersky.msu.ru/npidb/cgi-bin/hftri.pl>).

## Главные параметры для оценки качества расшифровки структуры

Для оценки качества структуры мною использовался генерируемый самим сайтом PDB Validation report и сервис c. Наиболее распространенные общие индикаторы качества приведены на **рисунке 5**. Из него видно, что наша структура во многом лучше, чем остальные структуры из PDB-банка.



**Рисунок 6.** Параметры качества структуры 4guw по сравнению с другими структурами из PDB-банка.

В случае с сервисом MolProbity можно получить более детализированную информацию о нашей структуре (**Таблица 3**). Важно отметить, что она несколько отличается, т.к сервис убрал три инверсии боковой цепи в модели, речь о которых пойдет дальше. Видим, что в нашей структуре, по мнению сервиса, недостаточно аминокислот, находящихся в предпочитаемой зоне (на самом деле, на мой взгляд, критерий  $>98\%$  слишком строг в данном случае). Отчасти это должно объясняться наличием в полученной структуре большого числа спиралей 3-10 типа. Кроме того видно, что у нас много аминокислот, для которых углы боковых цепей не находятся в предпочитаемой зоне. Это можно объяснить отчасти тем, что электронная плотность на боковых цепях в нашей структуре в целом ниже, чем на основной цепи (смотри ниже). Сервис считает, что в нашей структуре много “плохих” связей и углов, то есть сильно отличающихся от своих оптимальных параметров. Следует, однако отметить, что большая часть плохих связей и углов дается лигандами, а не самим белком, что вполне приемлемо.

**Таблица 3.** Общая характеристика структуры 4guw с исправленными инверсиями боковой цепи, сервис MolProbity.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	5.72	91 <sup>st</sup> percentile* (N=718, $1.60\text{\AA} \pm 0.25\text{\AA}$ )	
	Clashscore is the number of serious steric overlaps ( $> 0.4\text{\AA}$ ) per 1000 atoms.			
	Poor rotamers	3	1.44%	Goal: $<0.3\%$

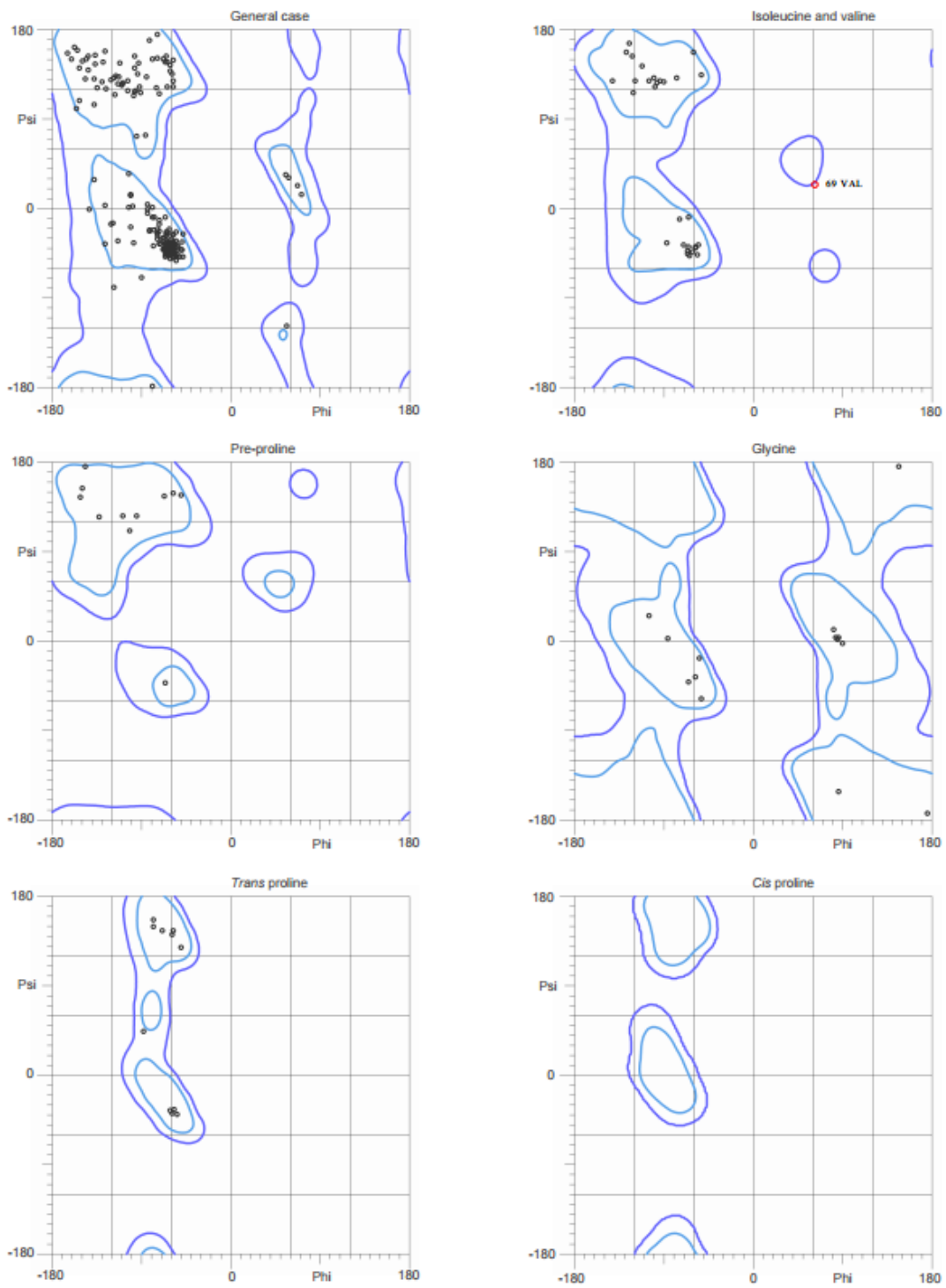
Protein Geometry	Favored rotamers	197	94.26%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	1	0.41%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	235	96.31%	Goal: >98%
	MolProbity score	1.68		77 <sup>th</sup> percentile* (N=7200, 1.60Å ± 0.25Å)
	C $\beta$ deviations >0.25Å	3	1.29%	Goal: 0
	Bad bonds:	10 / 1976	0.51%	Goal: 0%
	Bad angles:	17 / 2690	0.63%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 11	0.00%	Expected: $\leq 1$ per chain, or $\leq 5\%$

Так же и validation report, и MolProbity выдает карты Рамачандрана и положение наших остатков в них. В случае второго они явно качественнее, так как учитывают больше фактов из физики белка, к примеру то, что остаток, идущий перед пролином имеет несколько другую карту. Выдача MolProbity представлена на **рисунке 7**.

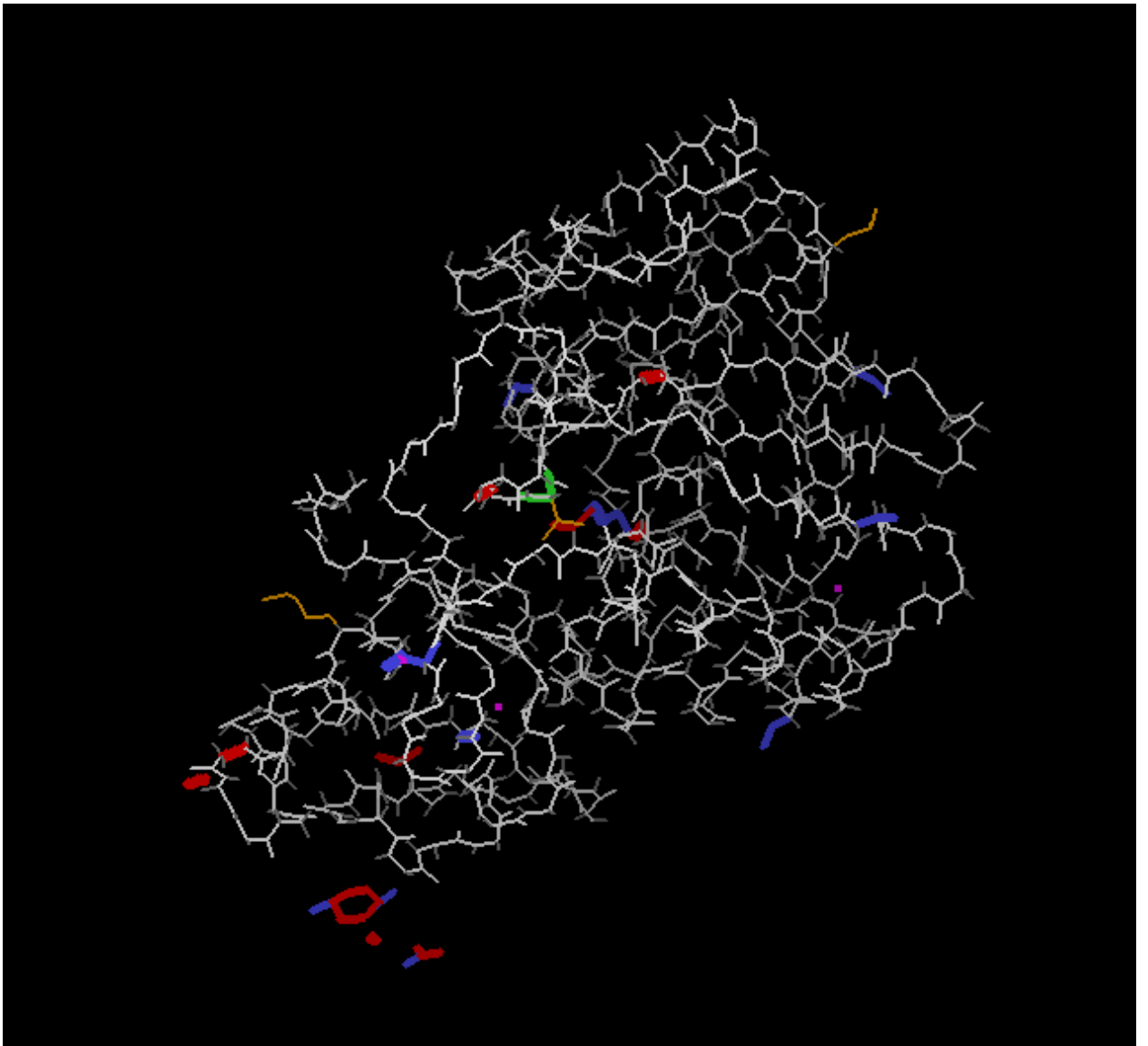
Также сервис предоставляет возможность визуализировать все ошибки в структуре (**рисунк 8**). Видно, что в нашей структуре ошибок достаточно мало.

PDB суммирует информацию при помощи графика (**рисунк 9**). Сверху изображено качество покрытия остатков белка электронной плотностью, ниже полоса, показывающая количество параметров, по которым остаток является аутлайером – 0 – зеленый цвет, 1 – зеленый, 2 – оранжевый, 3 и более – красный. Остатки, положение которых плохо описывается электронной плотностью помечены красными точками над ними.

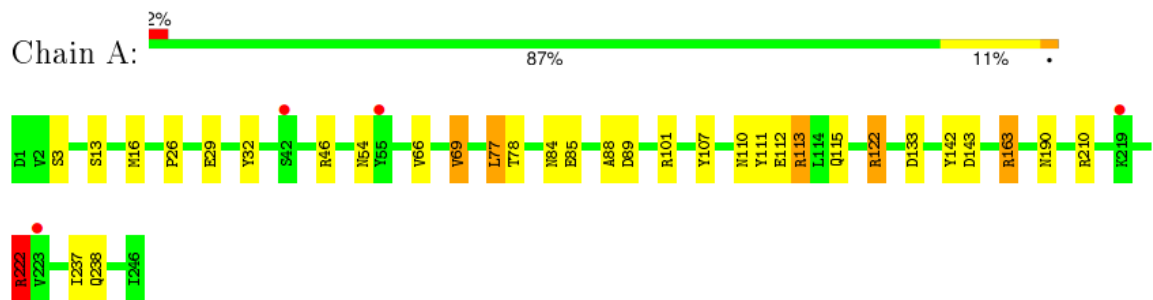




**Рисунок 7.** Положение аминокислотных остатков 4guw на картах Рамачандрана. Единственный аутлайер – это Val69.



**Рисунок 8.** Визуализация проблемных мест в структуре 4guw. Изображение получено с помощью KiNG + MolProbity.



**Рисунок 9.** Визуализация проблемных мест в структуре 4guw в pdb validation report. Особый интерес представляют V69, являющийся единственным аутлайером по картам Рамачандрана, и пара R222V223, где первый является сильным аутлайером, а второй плохо соответствует электронной плотности.

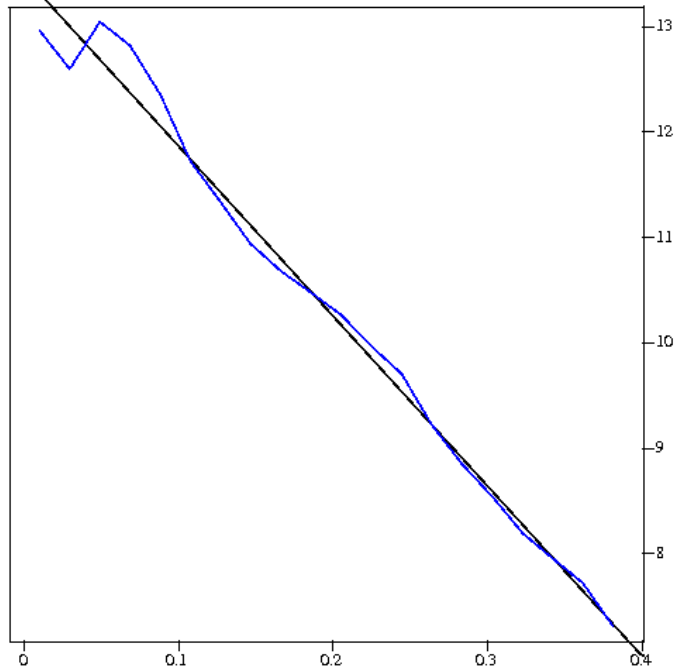
Сервер EDS также предоставляет важную информацию о качестве полученной модели и экспериментальных данных. Из графика Вильсона (**рисунок 10**) видно, что часть рефлексов (особенно в области высокого разрешения) отклоняются от прямой, что ставит под сомнение выбор авторов использовать все рефлекссы. Из графика Padilla-Yeates (**рисунок 11**) графика видно, что в кристалле, использовавшемся в эксперименте не было одного из дефектов – perfect twinning (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/Twinning/intro.html>) встречающегося у структур с данной симметрией и затрудняющего (хотя и не делающим невозможным) расшифровку рентгенограммы.

Кроме этого сервис предоставляет график Real-space R-value Z-score для остатков в структуре (**рисунок 12**). В целом можно заключить, что в нашей структуре большинство остатков хорошо соответствуют экспериментальной электронной плотности, хотя аутлайеры ( $z\text{-score} > 2$ ) присутствуют.

График температурного фактора (**рисунок 13**) для остатков свидетельствует от относительно малой подвижности остатков, среднее значение фактора находится в районе 26.3 Å для остатков белка. Из покраски структуры белка по значению B-фактора (**рисунок 14**) можно сделать наблюдение, что в основном структура малоподвижна, но у нее имеется подвижные участки. Особенно любопытен подвижный участок в составе домена 4guwA02, возможно, он принимает участие в функционирование фермента.

На **рисунке 15а-в** визуализирована электронная плотность белка при различных уровнях подрезки. Видно, что на уровне подрезки 1 и 2 сигма покрывается все части белка. Однако на уровне подрезки 3 сигма заметно, что упомянутый выше участок электронной плотности почти полностью оголен.

File wilson\_plot.ps



X = DST

Y = LNI

Created by DATAMAN V. 061208/6.4.2 at Wed Sep 18 07:26:34 2013 for A. Nonymous

DATAMAN bin plot

Filename = wilson\_plot.plt

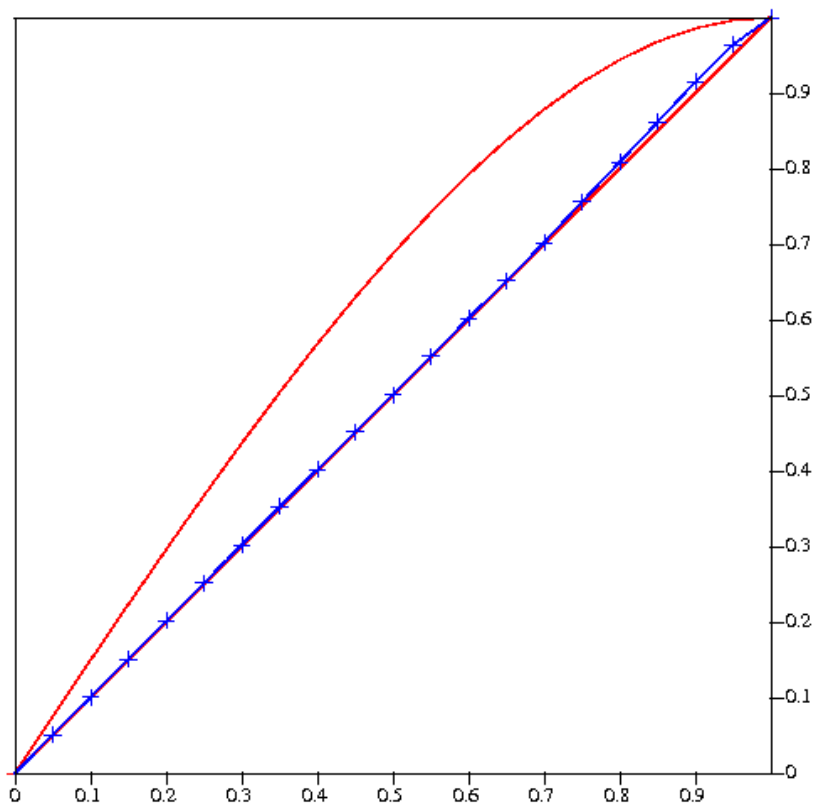
Dataset = M1 File = 4guw.cv

Comment = Read from orig.cv

Linear fit: slope -1.6096E+01 ... intercept 1.3479E+01

**Рисунок 10.** График Вилсона для померенных рефлексов. В идеале экспериментальная часть (синяя кривая) должна соответствовать прямой линии. Получено с помощью сервиса EDS (<https://eds.bmc.uu.se/cgi-bin/eds/>).

└ File local\_intensity\_plot.ps



X = |L|

Y = N(|L|) acentrics

DATAMAN Local Intensity Statistics plot

Cumulative N(|L|) vs. |L| (acentrics)

Dataset M1 File 4guw.cv

Comment Read from orig.cv

<|L|> = 0.496 Untwinned = 0.500 Perfectly twinned = 0.375

<L^2> = 0.328 Untwinned = 0.333 Perfectly twinned = 0.200

See: JE Padilla & TO Yeates, Acta Cryst D59, 1124 (2003).

Red line = theoretical untwinned

Red curve = theoretical perfectly twinned

Blue curve + points = observed

└

**Рисунок 11.** График Padilla-Yeates для умеренных рефлексов. Линия нашего кристалла соответствует кристаллу без дефекта perfect twinning. Получено с помощью сервиса EDS (<https://eds.bmc.uu.se/cgi-bin/eds/>).

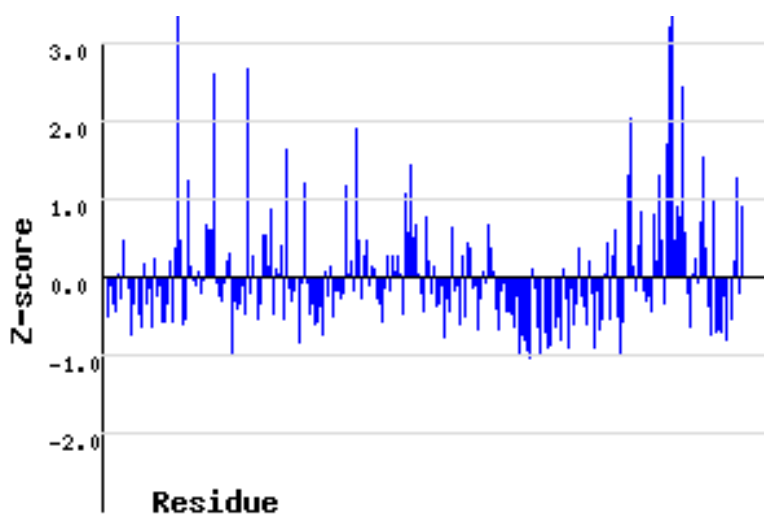
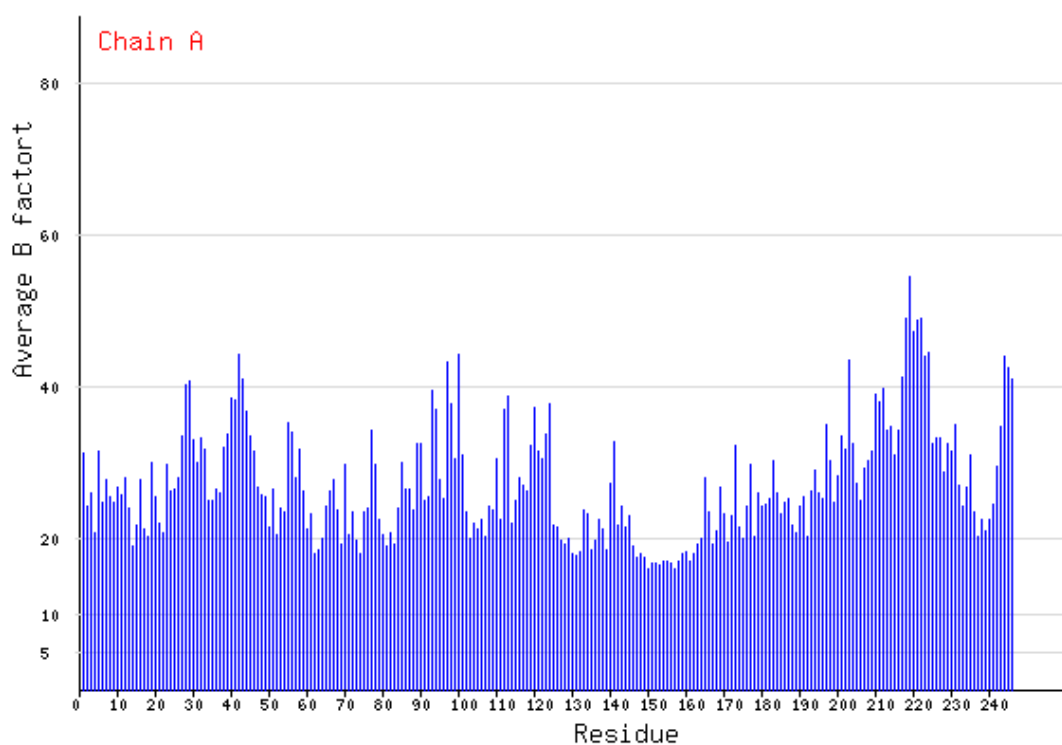


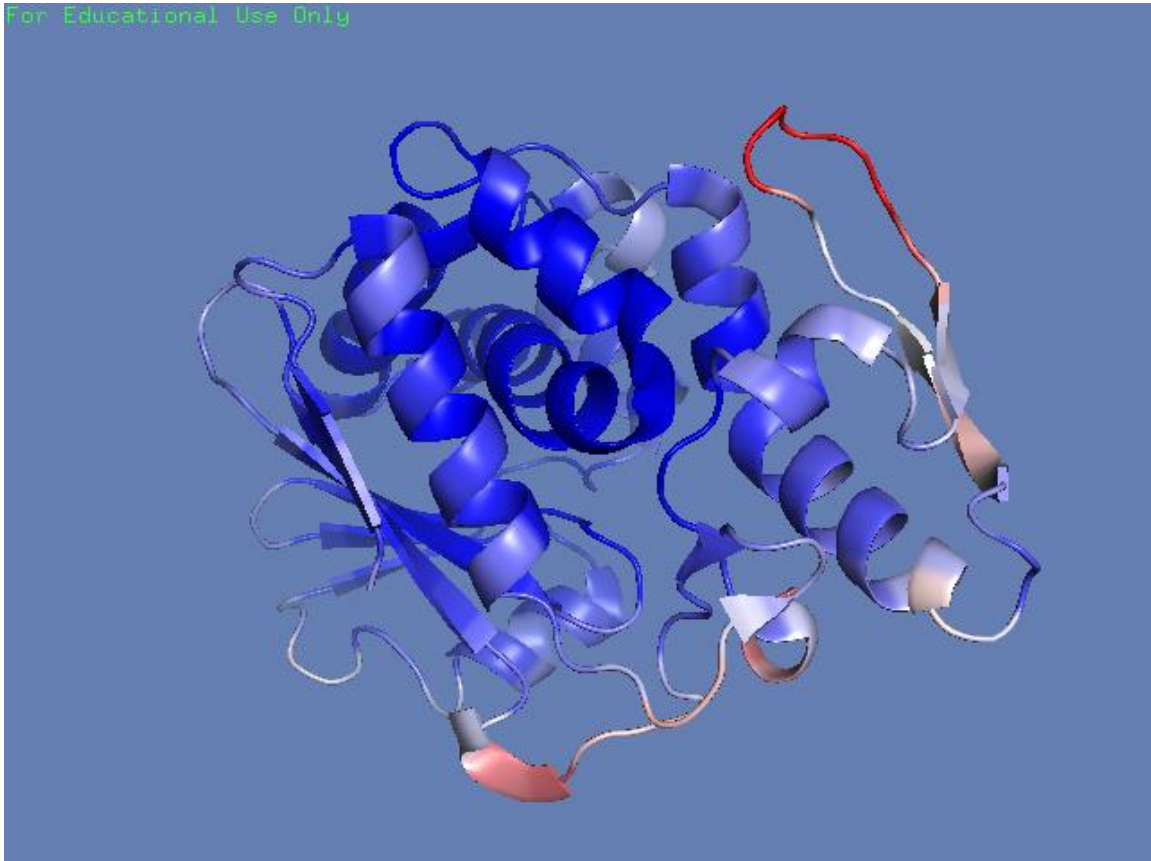
Рисунок 12. Real-space R-value Z-score для остатков структуры. Получено с помощью сервиса EDS (<https://eds.bmc.uu.se/cgi-bin/eds/>)



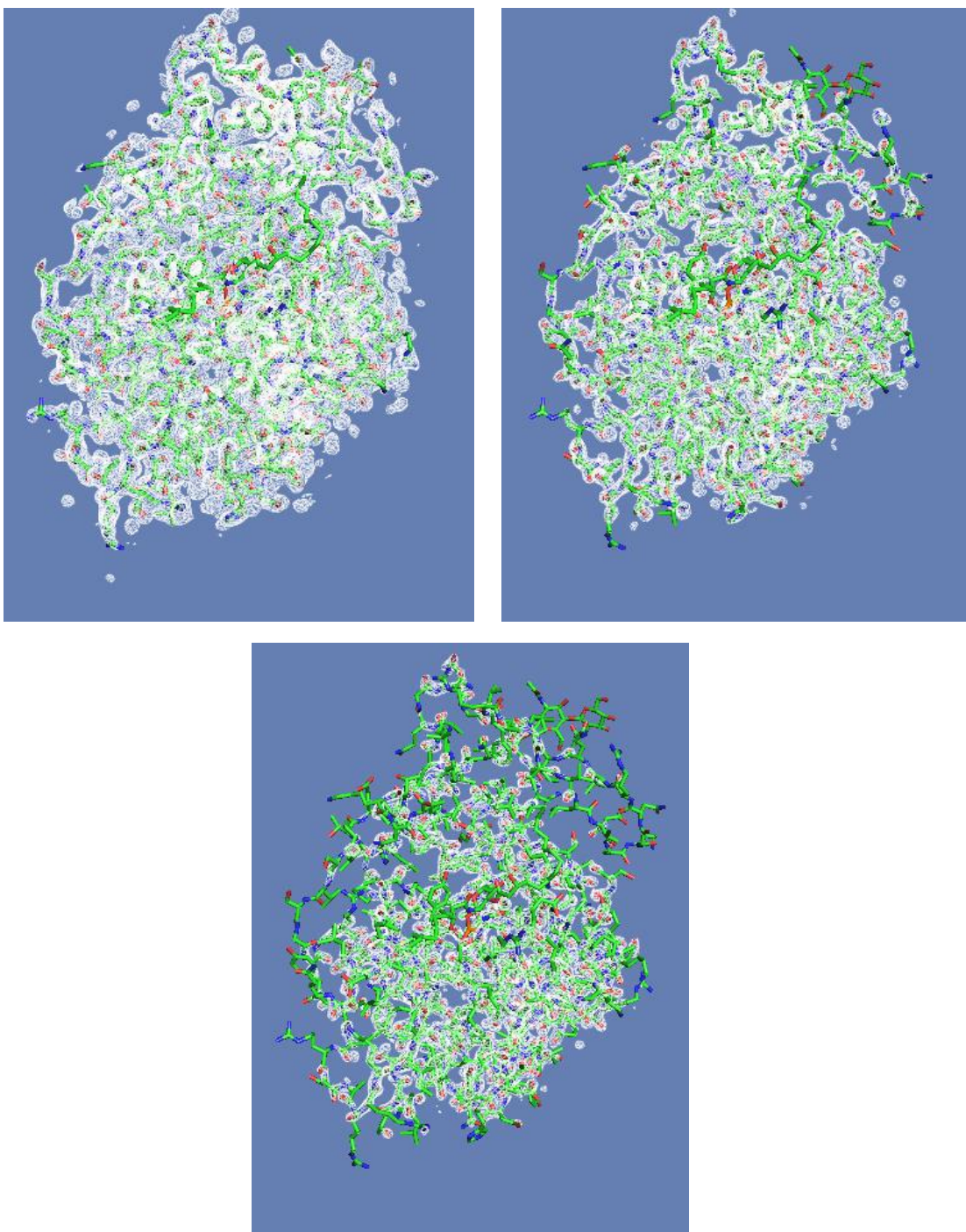
13. B-фактор для остатков структуры. Получено с помощью сервиса EDS (<https://eds.bmc.uu.se/cgi-bin/eds/>)

Рисунок

For Educational Use Only



**Рисунок 14.** Покраска структуры 4giw по величине В-фактора. Области с большим В-фактором покрашены красным, маленьким – синим.



**Рисунок 15.** Электронная плотность вокруг структуру 4guw при уровне подрезки 1, 2 и 3 сигма.



## Маргинальные остатки

В качестве примера маргинальных остатков было 11 аминокислотных остатков, приведенных в таблице 4.

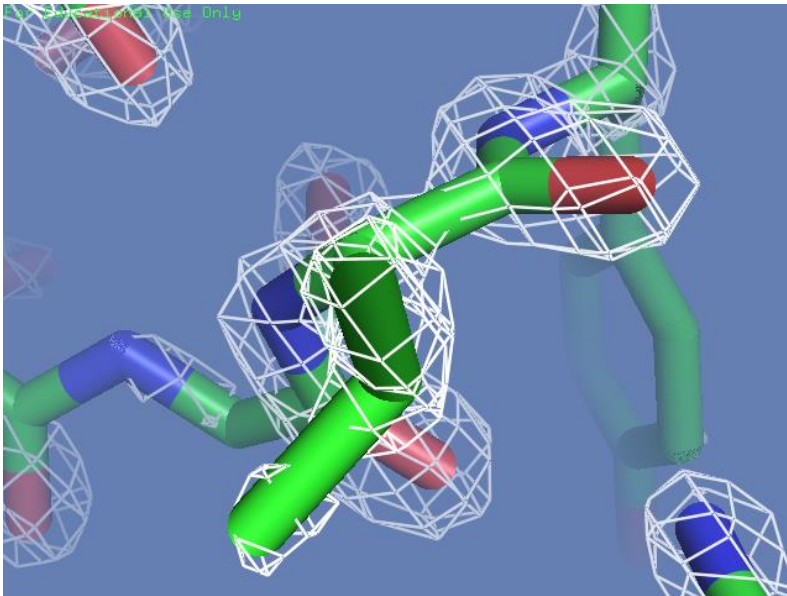
Таблица 4. Примеры маргинальных остатков в структуре 4GUW.

Название остатка	Причина маргинальности
Val69	Не попадает в предпочитаемую зону на карте Рамачандрана и имеет нетипичную конформацию боковой цепи
Arg222	Нетипичный угол связи NE-CZ-NH, нетипичная конформация боковой цепи
Val223	Плохо соответствует экспериментальной электронной плотности
Asn58	Инверсия боковой цепи(flip)
Gln169	Инверсия боковой цепи(flip)
Arg122	Нетипичные длины связей CG-CD, CB-CG,
Ser42	Плохо соответствует экспериментальной электронной плотности
Tyr55	Плохо соответствует экспериментальной электронной плотности
Asn245	Инверсия боковой цепи(flip)
Leu77	Clash L77:HD22 и THR78:HG23, Leu77:HA и Leu77:HD23, нетипичная конформация боковой цепи
Tyr107	имеет нетипичную конформацию боковой цепи

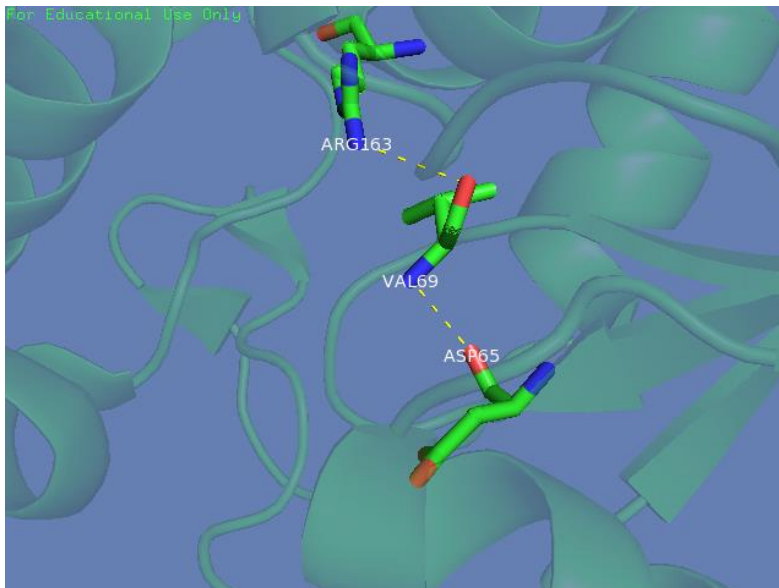
Остатки, выделенные зеленым были далее рассмотрены.

### Val69

Даже на визуализация электронной плотности на уровне 3 сигма дает изображение (**рисунок 16**), в котором четко определяются центры всех атомов, из чего заключаем, что его нетипичное положение полностью соответствует электронной плотности. Если визуализировать контакты 69 остатка с другими остатками в белке замечаем, что он связан двумя водородными связями с остатками Asp65 и Arg163 (**рисунок 17**), что компенсирует энергетических проигрыш от невыгодной конформации.



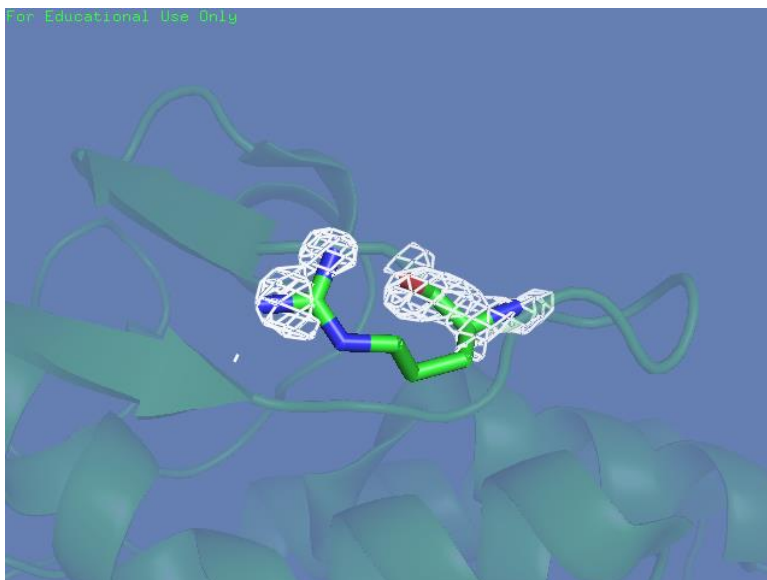
**Рисунок 16.** Визуализация экспериментальной электронной плотности вокруг Val69.



**Рисунок 17.** Визуализация водородных связей Val69 с остатками Asp65 и Arg163.

## **Arg222**

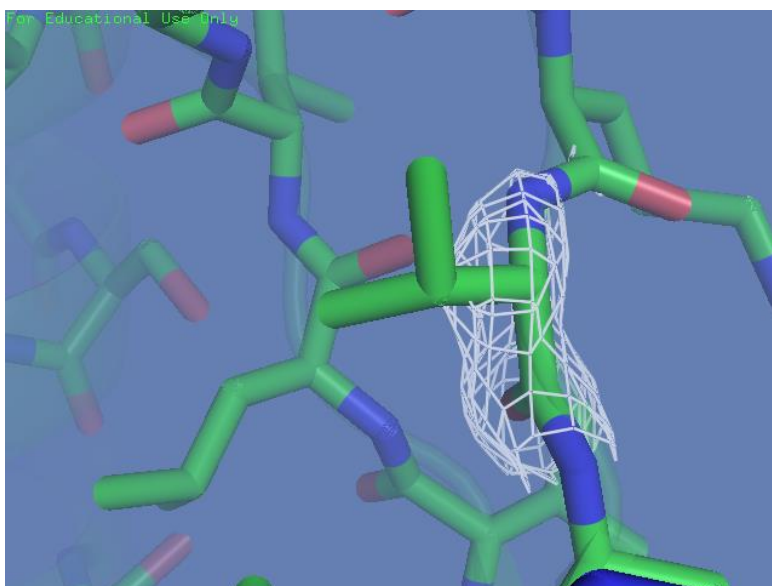
В случае этого остатка при визуализации электронной плотности даже на уровне 2.5 сигма все не так хорошо (рисунок 18). Логичных объяснений в отхождении от предпочтительных параметров связей найдено не было, потому в данном случае это скорее всего ошибка авторов.



**Рисунок 18.** Визуализация электронной плотности Arg222.

### Val223

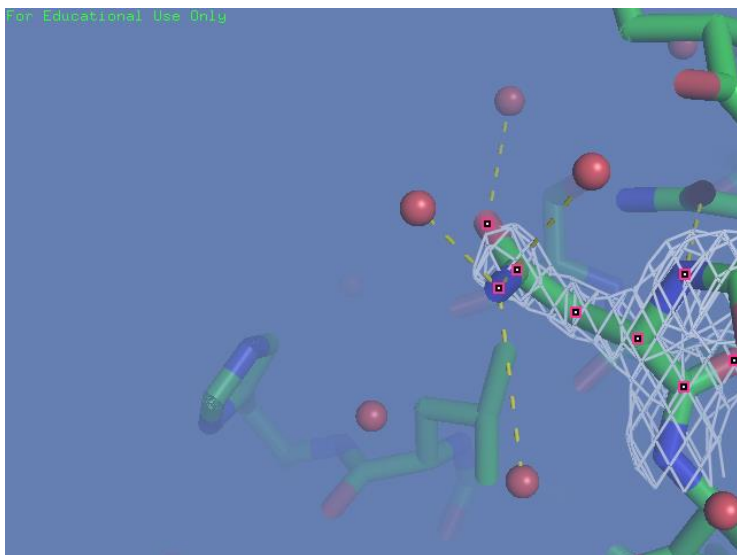
У боковой цепи этого остатка нет электронной плотности уже на 1.5 сигма (рисунок 223). Потому тут вставлялась боковая цепь просто из соображений авторов.



**Рисунок 19.** Визуализация электронной плотности Val223.

### Asn58

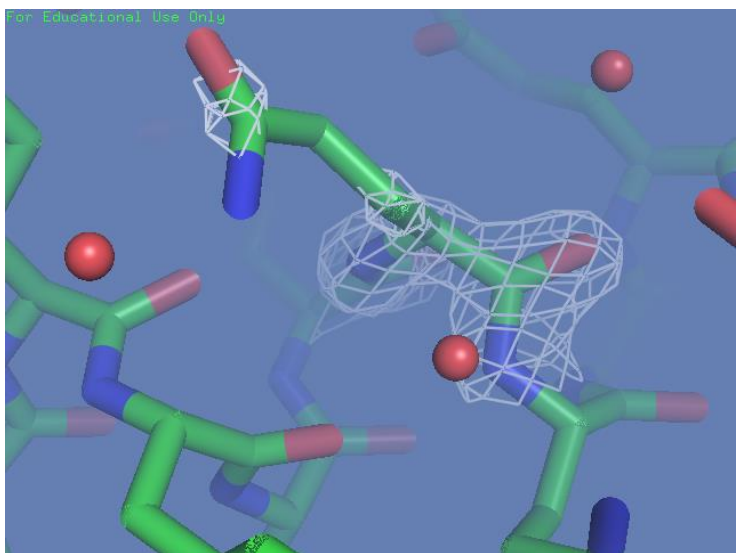
По утверждению сервиса Molprobity у данного остатка произошла инверсия боковой цепи. Однако никаких свидетельств ни в пользу этого, ни против этого мною найдено не было (**рисунок 20**). Электронная плотность (сигма = 2.5) не позволяет установить положения кислорода и азота. По ходу боковой цепи действительно похоже, что в данном случае наблюдаем инверсию. Перемена местами кислорода и азота к увеличению/уменьшению числа водородных связей не ведет.



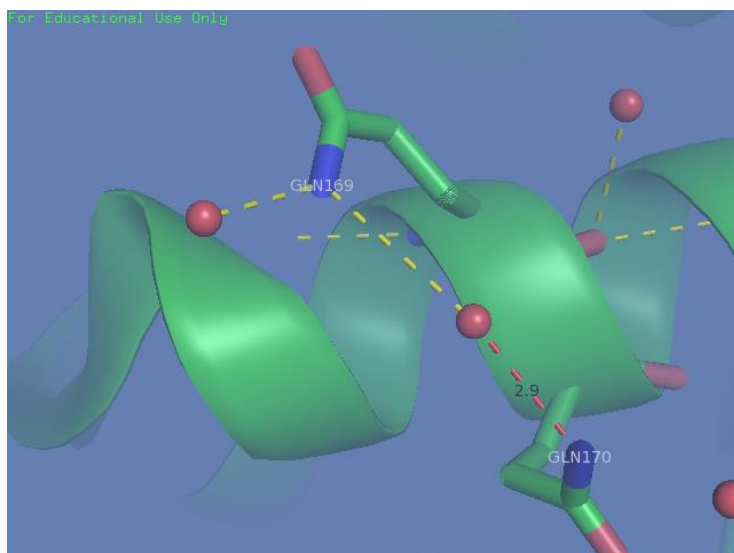
**Рисунок 20.** Визуализация электронной плотности Asn58 и водородных связей кислорода и азота боковой цепи с водой.

### **Gln169**

По утверждению сервиса, у данного остатка также наблюдается инверсия боковой цепи. При визуализации электронной плотности (сигма = 2.5, рисунок 21) видим, что координаты всей боковой цепи Gln169 определить затруднительно. По ходу боковой цепи действительно можно сделать подобное утверждение. Кроме того, если поменять кислород и азот местами, то получаем возможность образования водяного мостика, который до этого образоваться не мог (рисунок 22)



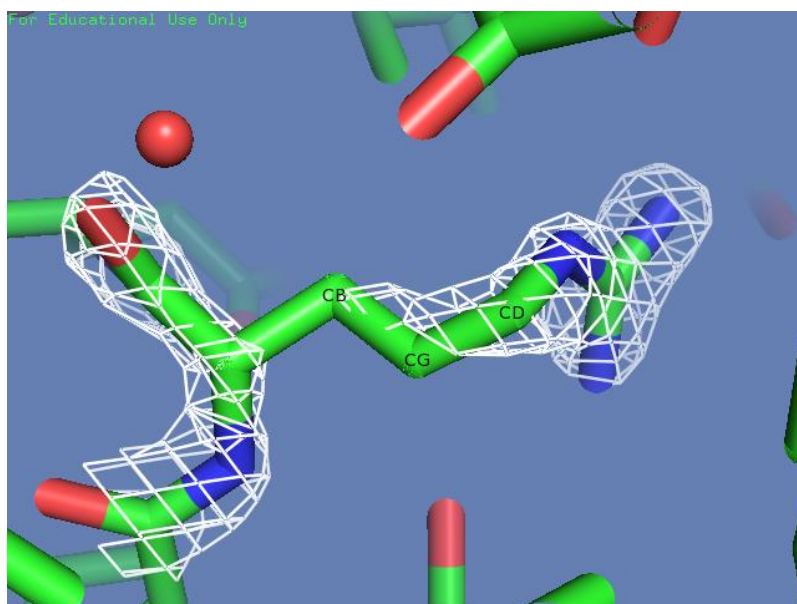
**Рисунок 21.** Визуализация электронной плотности Gln169.



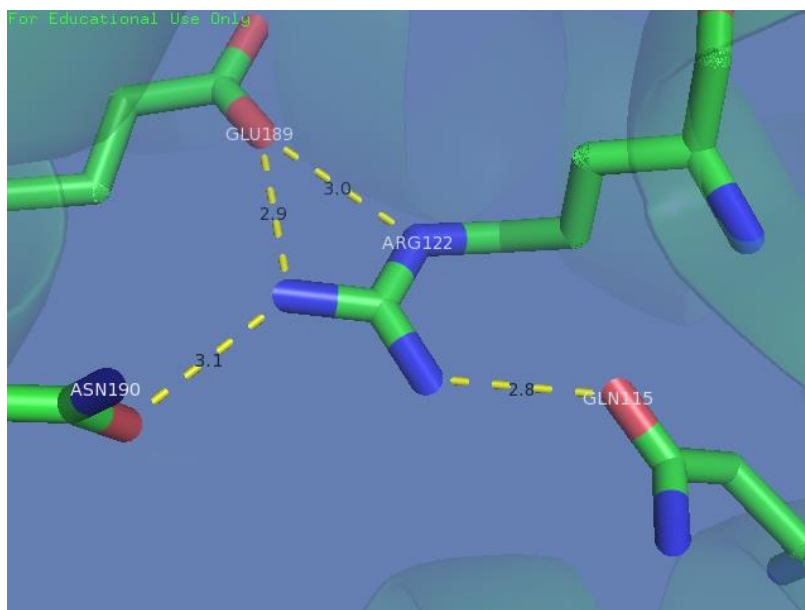
**Рисунок 22.** В при данном положении кислорода и азота в боковой цепи образование водяного мостика между Gln169 и Gln170(невозможная на данный момент часть показана красной связью) невозможно. Однако если поменять их местами, образование мостика становится возможным.

### Arg122

Для данного остатка наблюдаем нетипичные длины связей между углеродными атомами в боковой цепи. При визуализации электронной плотности видим уже при сигма равном 2.5 (рисунок 23), что координаты именно этих атомов определить затруднительно. Потому вполне возможно, что они они были расшифрованы неверно. Однако стоит отметить, что при просмотре возможных связей данного остатка с окружающими его остатками (рисунок 24) видно обилие возможностей для него образовать водородную связь с различными остатками. Возможно, именно это делает выгодным в данной ситуации некоторое укорочение длины связи между атомами боковой цепи (она не переходит через минимально допустимое расстояние, то есть, в принципе возможна).



**Рисунок 23.** Визуализация электронной плотности Arg122



**Рисунок 24.** Возможные водородные связи боковой цепи Arg122.

## PDB\_redo

Сервис PDB\_redo содержит структуры из банка PDB, на основании экспериментальных данных

переделанные заново или исправленные. Структура 4guw также есть на этом сайте. Два способа оптимизации, примененные на сайте, в основном улучшали характеристики структуры (кроме конформации боковых цепей)(рисунок 25).

### WHAT\_CHECK validation

	Original PDB entry	Conservatively optimised	Fully optimised
1st generation packing quality <sup>1</sup>	0.270	0.286	0.288
2nd generation packing quality <sup>1</sup>	-0.467	-0.396	-0.143
Ramachandran plot appearance <sup>1</sup>	0.146	0.193	0.098
Chi-1/Chi-2 rotamer normality <sup>1</sup>	-1.165	0.493	0.583
Backbone conformation <sup>1</sup>	0.589	0.442	0.450
Bond length RMS Z-score <sup>2</sup>	1.336	0.656	0.673
Bond angle RMS Z-score <sup>2</sup>	1.130	0.803	0.783
Total number of bumps <sup>3</sup>	22	15	13
Unsatisfied H-bond donors/acceptors <sup>3</sup>	12	12	12
Full WHAT_CHECK reports	<a href="#">Link</a>	<a href="#">Link</a>	<a href="#">Link</a>

<sup>1</sup> Higher is better

<sup>2</sup> Should be lower than 1.000

<sup>3</sup> Fewer is better

**Рисунок 25.** PDB\_redo – характеристики оригинальной структуры, консервативно-оптимизированной и полностью оптимизированной.

Далее мною была скачана полностью оптимизированная структура и подана на вход сервису Molprobability.

Сервис Molprobability считает, что в структуре в Gln93 наличествует боковая инверсия. На этот раз я проигнорировал это предупреждение. Характеристика оптимизированной структуры представлена в таблице 5. Кроме этой информации стоит отметить, что для оптимизированной структуры R-value и R-free уменьшились, став соответственно 0.17159 и 0.19969.

**Таблица 5.** Общая характеристика структуры полностью оптимизированной 4guw. сервис MolProbability.

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	3.73	97 <sup>th</sup> percentile* (N=718, 1.60Å ± 0.25Å)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	2	0.96% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	205	98.09% Goal: >98%

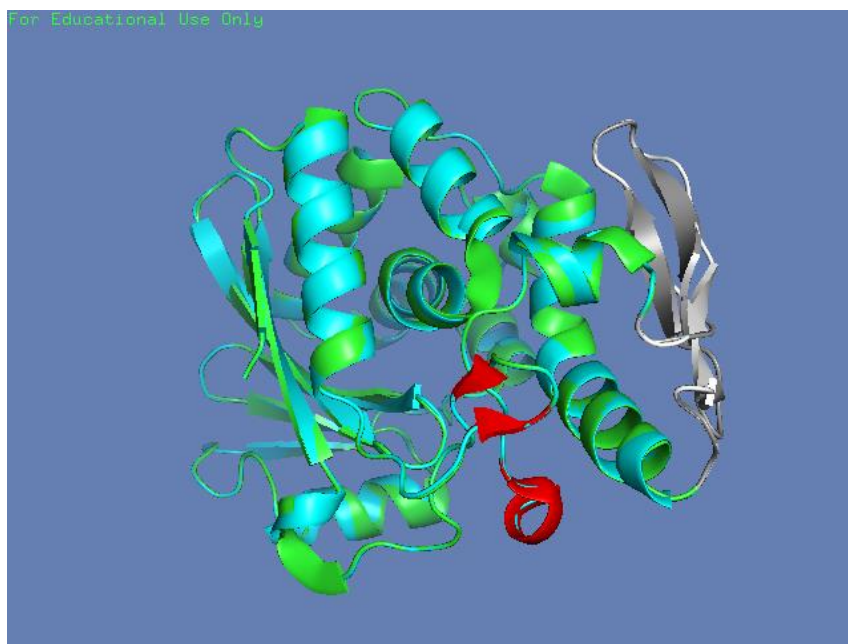
	Ramachandran outliers	1	0.41%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	238	97.54%	Goal: >98%
	MolProbity score <sup>^</sup>	1.26		97 <sup>th</sup> percentile* (N=7200, 1.60Å ± 0.25Å)
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%	Goal: 0
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 11	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%

Видно, что характеристики структуры значительно улучшились. Посмотрим, что случилось с разобранными нами подробно аминокислотами.

Val69 по-прежнему является аутлайером из-за нехарактерных углов вращения в боковой и основной цепях, но, как было показано выше, этому есть биологическое обоснование. Все аминокислоты, у которых были инверсии боковой цепи в исходной структуре их больше не имеют. Arg222 по-прежнему является аутлайером, что объясняется, скорее всего, просто недостатком информации для его качественной реконструкции. Arg122 больше не является аутлайером из-за длины связей, но теперь он является аутлайером из-за clash с одним из водородов (HD11) ILE171. Потому нельзя точно сказать, какой из вариантов был правильнее.

Сравним исходную структуру и оптимизированную.

Из их совмещения (рисунок 26) видно, что в значимо они не отличаются, однако в оптимизированной структуре отсутствуют несколько вызывавших подозрение вторичных структур (одна из которых находилась прямо на конце белка, что довольно странно, а другая достаточно мала). Также видно различие в той области, для которой выше наблюдался высокий температурный фактор и меньшее качество покрытия экспериментальной электронной плотностью. Отличие, впрочем, незначительно и потому, вероятно, его можно проигнорировать.



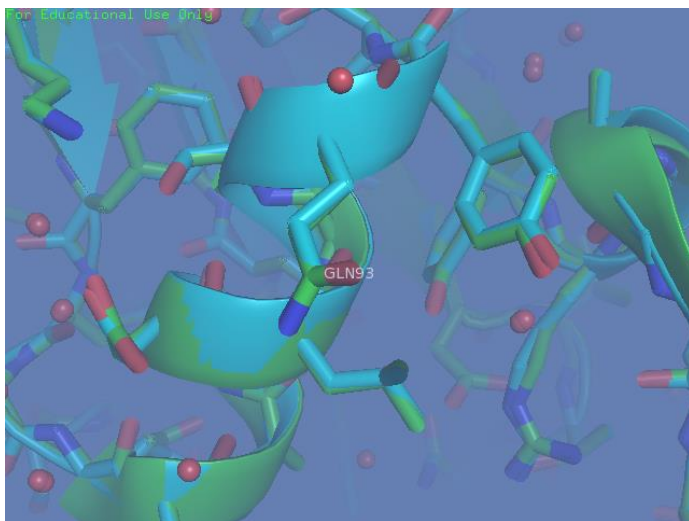


**Рисунок 26.** Совмещение исходной структуры с полностью оптимизированной в pdb\_redo. Зеленая структура – исходная, голубая – полученная из pdb\_redo. Улучшенные различающиеся участки показаны в исходной структуре красным цветом, отличающиеся, но про улучшение которых достоверно что-то сказать затруднительно показаны в сером и белый цвета.

Рассмотрим в оптимизированной структуре Gln93, для которого сервис утверждает наличие инверсии боковой цепи и остаток, сохранивший положение на карте Рамачандрана не в оптимальной области, но не рассматривавшийся раньше – Leu77, который в обеих структурах является аутлайером.

## Gln93

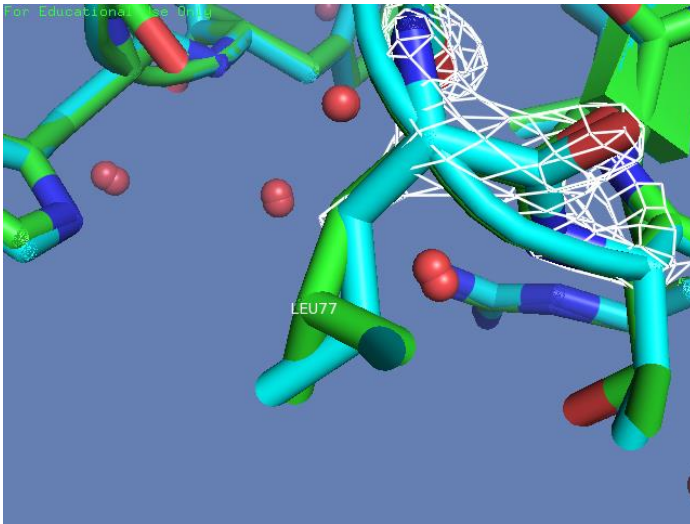
Положение данной аминокислоты (как и соседних) существенно не отличается в обеих структурах (**рисунок 27**). Каких либо свидетельств в пользу инверсии найдено не было.



**Рисунок 27.** Совмещение исходной структуры с полностью оптимизированной в pdb\_redo. Показан Gln93, который в оптимизированной структуре стал детектироваться MolProbity как остаток с инвертированной боковой цепью.

## Leu77

Для данного остатка при визуализации электронной плотности (сигма = 2.5) видно, что местоположение атомов боковой цепи установить практически невозможно (**рисунок 28**). Геометрия остатка отличается в исходной и оптимизированных структурах, однако он по-прежнему остается аутлайером, причина скорее всего просто в недостатке экспериментальных данных.



**Рисунок 28.** Совмещение исходной структуры с полностью оптимизированной в `pdb_redo`. Показан `Leu77`, который в обеих структурах является аутлайером.

В целом же можно заключить, что оптимизация в `PDB_redo` улучшило качество структуры.

## Выводы

- 1) Структура 4guw с заявленным разрешением 1.6 А расшифровано в достаточной мере хорошо.
- 2) В структуре есть нескольких маргинальных остатков, однако в ряде случаев (пример Val66) маргинальность остатков биологически обусловлена.
- 3) Часть структуры (участок цепи 205-229) имеет более низкую по сравнению с остальной структурой величину электронной плотности, по которой сложнее определить положения всех атомов участка, что может быть объяснено увеличенной подвижностью этого участка.
- 4) В структуре отсутствуют явные грубые ошибки, в работе не замечено попытки подогнать значение каких-то оценок качества структуры под оптимальные
- 5) Оптимизация в сервисе PDB\_redo улучшает качество структуры, уменьшая число маргинальных остатков и улучшая многие характеристики качества структуры.