

**Отчет о качестве РСА расшифровки белка-рецептора AimR фага  
бактерий рода *Bacillus***

Подготовил: Вячеслав Сафронов

## Аннотация

В этой работе исследуется качество трехмерной структуры белка, полученной методом рентгеноструктурного анализа. Рассмотрены как показатели качества модели в целом, так и отдельные остатки, наиболее плохие по показателям, проведено небольшое сравнение выбранной структуры со структурой из PDB-redo.

## Введение

Для оценки качества PCA структуры я выбрал белок AimR с которым работаю в рамках моей курсовой. Белок интересен тем, что обеспечивает коммуникацию бактериофагов SPbeta в культуре бактерий *Vacillus*. Этот белок служит фактором транскрипции [1] для гена AimX который препятствует вхождению фага в лизогенный цикл. Однако, при накоплении сигнального пептида AimP (который также производят эти фаги) в среде и дальнейшем поступлении его в клетку, белок AimR перестает связываться с ДНК и фаг может войти в лизогенный цикл. Таким образом, система коммуникации фагов позволяет им при попадании в новую среду максимально быстро заразить большое число бактерий благодаря усиленной наработке вирусных частиц в литическом цикле и, затем, перейти в лизогенный цикл.

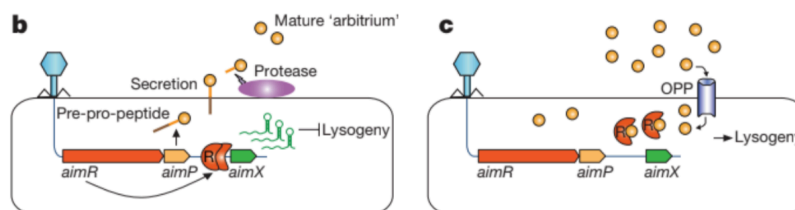
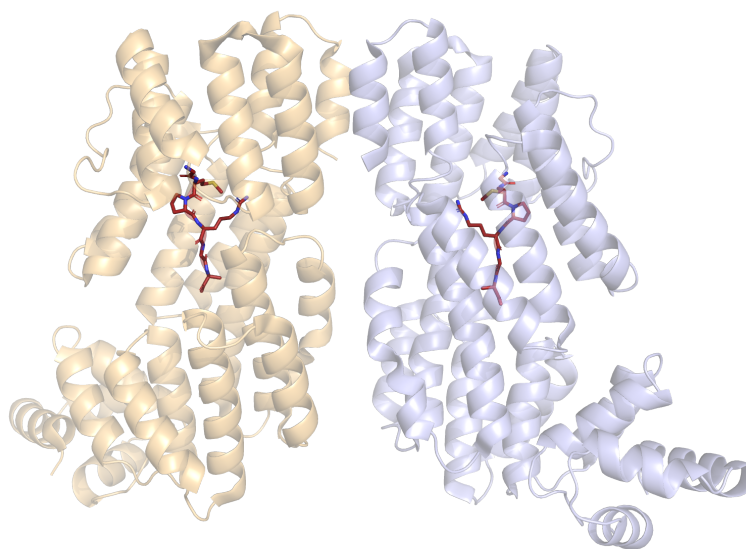


Рисунок 1. Механизм работы белка AimR

## Результаты и обсуждение

### 1. Общая информация о модели

Структура димера белка AimR в комплексе с пептидом (6HP5) была выложена в PDB Alberto Marina и Francisca Gallego del Sol в 2018 году, а в 2019 была опубликована статья [2], в которой подробно разбирались механизмы связывания AimR с ДНК и пептидом.



**Рисунок 2.** Общий вид структуры 6HP5 белка AimR. Красным отмечены сигнальные пептиды AimR.

Авторам структуры удалось измерить 52488 структурных факторов с полнотой 100% и диапазоном разрешений от 2.28 до 88.26 ангстрем. Соответственно итоговое разрешение структуры составило 2.28 Å. Для решения фазовой проблемы авторы использовали метод аномального рассеяния (SAD). В таблице 1 приведена информация о кристаллографической ячейке.

**Таблица 1.** Характеристики кристаллографической ячейки

Длина (Å)	Угол ( ° )
a = 94.34	$\alpha = 90$
b = 94.34	$\beta = 90$
c = 249.95	$\gamma = 90$
Группа симметрии: P 41 21 2	

В общем, структура получена в достаточно хорошем разрешении. Но так как этим белком заинтересовались относительно недавно — авторам пришлось использовать метод аномального рассеяния (а не метод молекулярного замещения), что могло внести изменения в структуру белка, так как метионины в нем заменены на селенметионины. Это может быть критично, если такие остатки расположены, например, в центре связывания пептида.

## 2. Значения индикаторов качества модели

Для оценки качества модели я использовал wwPDB Validation, сервис MolProbity. Для выявления остатков в плохом окружении использовался WHAT\_CHECK [3]

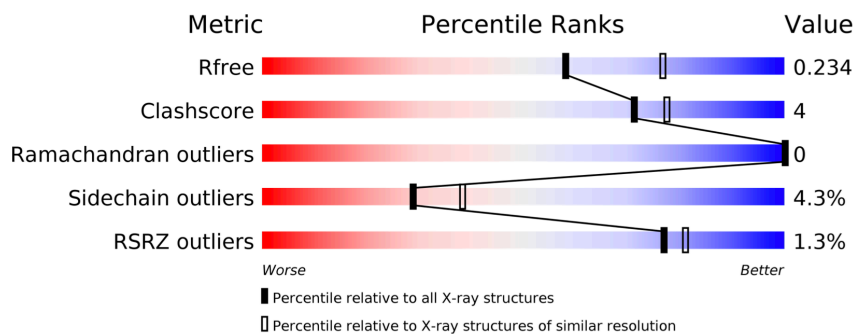


Рисунок 2. Показатели качества модели с сайта PDB

Модель обладает хорошим R-фактором (19%) при этом не переоптимизирована —  $R_{free} = 22,6\%$ . Почти все параметры качества структуры выше среднего. Так Clashscore (количество слишком близко расположенных атомов на 1000) при добавлении атомов водорода в структуру составил 4; процент плохо вписанных в электронную плотность остатков — 1,3%. Особенно хорошо остатки структуры попадают в карту Рамачандрана (рисунок 3). Как видно из рисунка — все остатки попадают в разрешенную область, а 97,81% попадают в предпочтительные области. Пролинов в цис- конформации обнаружено не было.

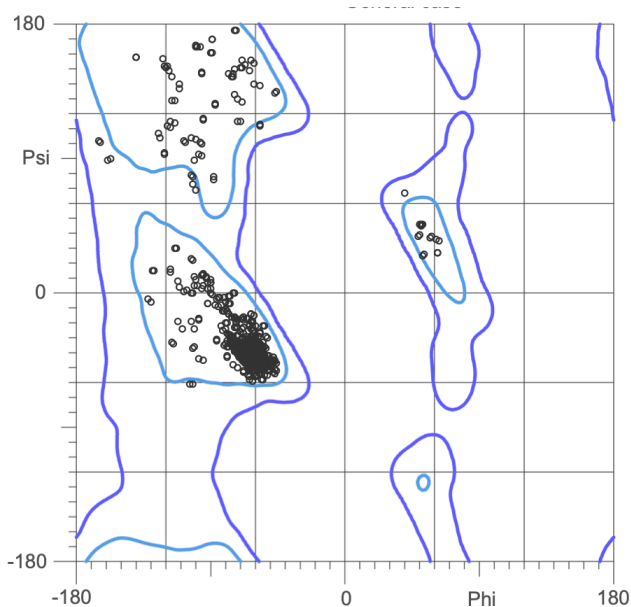


Рисунок 3. Карта Рамачандрана для всех остатков структуры 6HP5, полученная в программе MolProbity [4]

Структура, однако, содержит относительно большой процент неротамеров (4.3%), и низкий процент предпочтительных ротамеров (90.2%)

### 3. Анализ маргинальных остатков

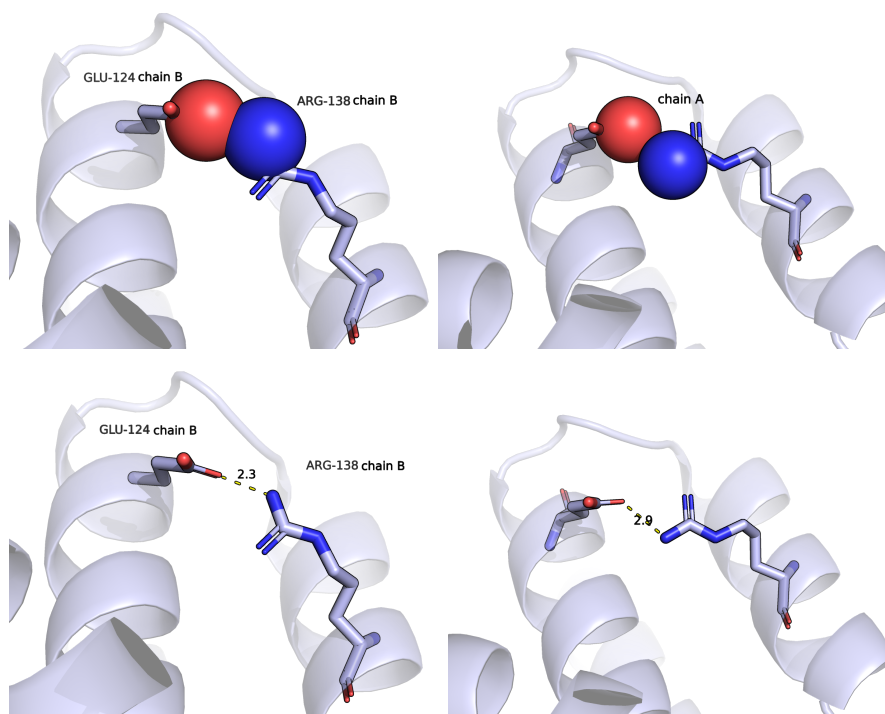
Далее я попытался найти и проанализировать остатки с худшими показателями качества, а также наиболее важные для взаимодействия пептида с рецептором.

Таблица 2. Список важных маргинальных остатков.

Маргинальный остаток	Показатели качества
ARG-138 (Цепь В)	Угол NE-CZ-NH2 = 117.11 Угол NE-CZ-NH1 = 122.85 Перекрытие с В:124:GLU:OE1 Боковая цепь — неротамер
PHE-276	Перекрытие атомов Боковая цепь — неротамер Плохой RSRZ = 6.7
GLY-1 (Цепь С)	Перекрытие атомов Плохой RSRZ = 2.3
MSE-333	Перекрытие атомов
ARG-228	Боковая цепь — неротамер (+ важен т.к. участвует в связывании пептида)
GLN-262	Перекрытие атомов Боковая цепь — неротамер Подозрение на инверсию боковой цепи Плохое окружение (z-score = -3)
MET-2 (Цепь С)	Перекрытие атомов

## ARG-138

На рисунке ниже показан аргинин 138 в цепи В. Его атом азота находится слишком близко к атому кислорода глутаминовой кислоты 124, а сама боковая цепь остатка находится в плохой конформации. Интересно, что тот же остаток из цепи А находится в хорошей конформации и образует почти идеальную водородную связь с глутаминовой кислотой. Такое странное положение аргинина в цепи В не вызвано влиянием соседей по ячейке т.к в этой области они не соприкасаются с белком. Остается только предположить, что такое отклонение вызвано погрешностью в экспериментальных данных.



**Рисунок 4.** Маргинальный остаток ARG-138 в цепи В (слева) и аналогичный ему немаргинальный остаток из цепи А (справа)

## PHE-276

Следующий остаток — фенилаланин 276 очень важен так как находится в кармане связывания пептида (красный). Если включить отображение электронной плотности на уровне подрезки 1 (синяя сетка) становится ясно почему этот остаток имеет такой высокий RSRZ. Судя по всему авторы не зафиксировали в этой области электронную плотность и решили сами вставить туда остаток. В цепи А на том же уровне подрезки можно увидеть электронную плотность, но она все равно не позволяет наверняка судить о положении остатка. Помимо этого, атом углерода PHE-276 находится слишком близко к водороду при СВ атоме метионина пептида. В целом не очень понятно почему от радикала этого остатка не удалось зафиксировать почти никакой электронной плотности, ведь он находится в довольно комфортном для себя гидрофобном окружении. Возможно он дестабилизируется глутаминовой кислотой(рисунок 5, сзади).

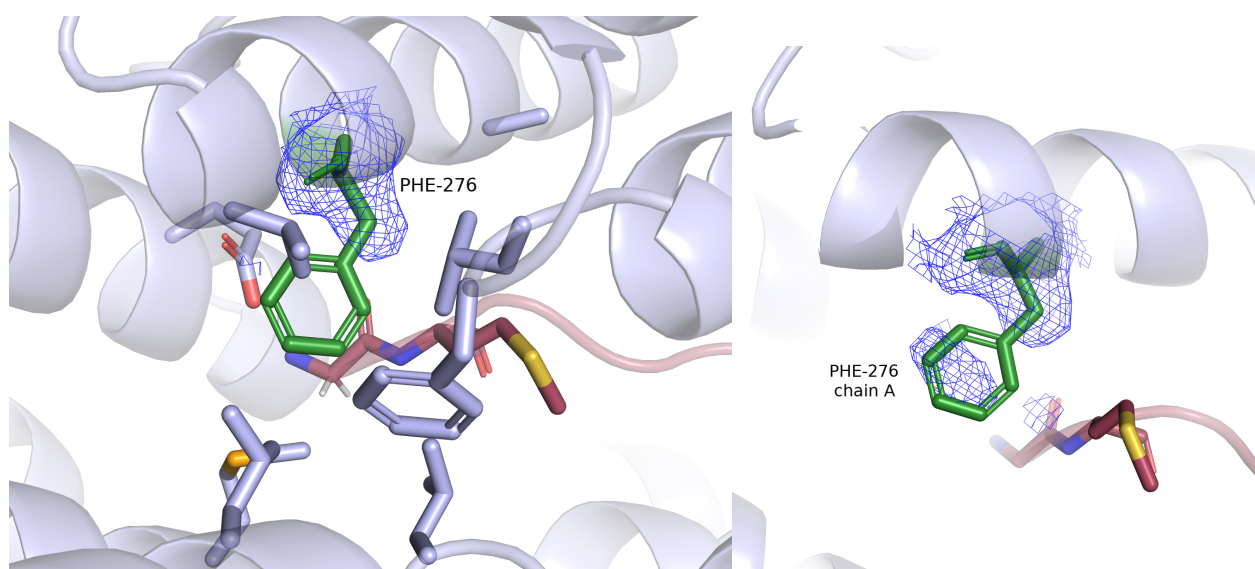


Рисунок 5. Остаток PHE-276 и его электронная плотность в разных цепях (B — слева, A — справа)

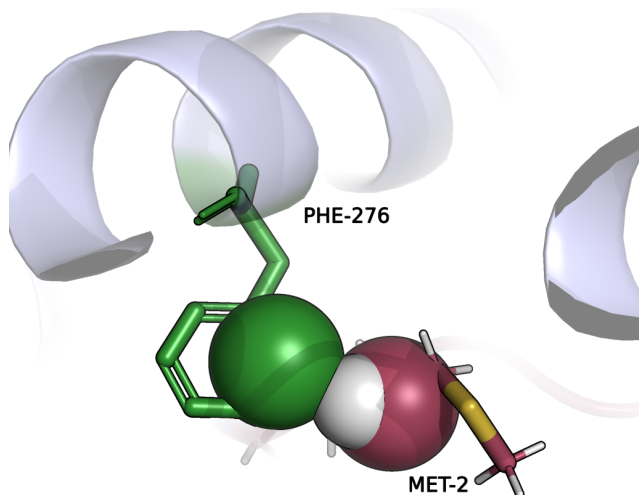


Рисунок 6. Остаток PHE-276 перекрывается с остатком метионина в пептиде

## GLY-1

Остаток глицина находится в пептиде, связывающемся с рецептором, поэтому важно достоверно определить его положение. Как видно на рисунке 7 его СА атом не лучшим образом вписан в электронную плотность и возможно отчасти поэтому водород при нем перекрывается с водородом из селенметионина. На мой взгляд это довольно незначительная погрешность и ей можно пренебречь.

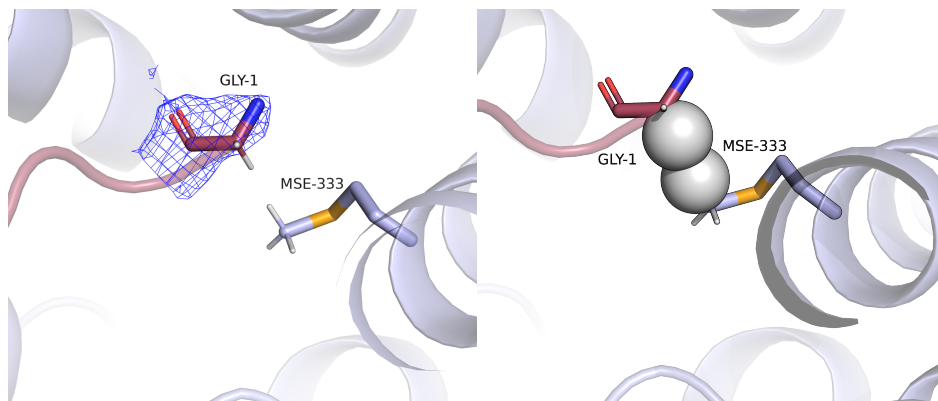


Рисунок 7. GLY-1 и его электронная плотность (слева) и перекрывание атомов водорода

## ARG-228

На мой взгляд неротамерность этого остатка объясняется не ошибками эксперимента, а особенностями взаимодействия. Видно, что в таком положении аргинин стабилизируется СООН группой боковой цепи ALA-6 и кислородом в остоле ALA-90. И хотя аргинин находится не в самом лучшем положении для образования водородных связей, видимо это самое оптимальное положение из возможных.

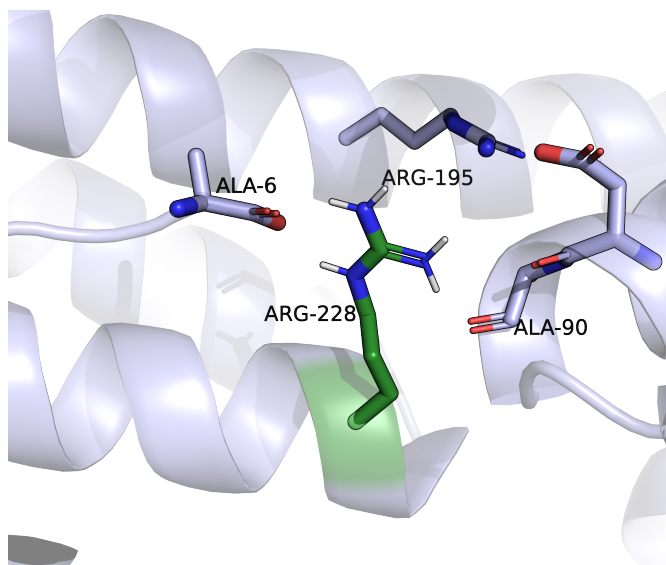


Рисунок 8. Неротамерный ARG-228



## GLN-262

При наблюдаемом положении атомов азота и кислорода в глутамин 262 невозможно объяснить такое положение этого остатка, ведь он в таком случае не стабилизируется водородными связями и по-идее должен был бы быть направлен в раствор или образовывать водородные связи с аспаратом справа. Однако если поменять местами атомы кислорода и азота, то появятся водородные связи с азотом и кислородом остова (желтый пунктир) и наблюдаемое положение остатка можно будет объяснить этими взаимодействиями.

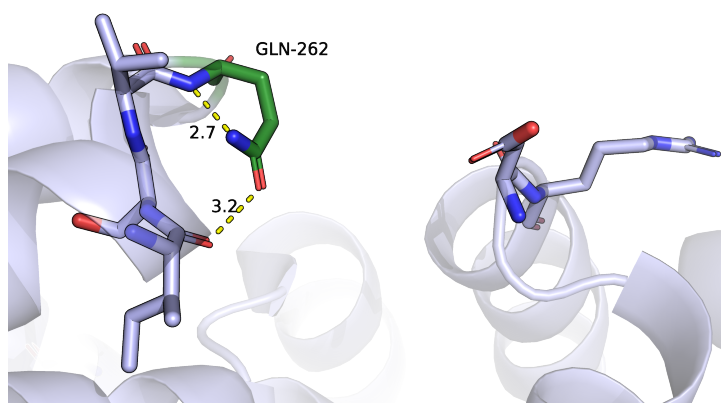


Рисунок 9. GLN-262 и его окружение

#### 4. Сравнение с PDB-redo

PDB-redo [5] немного улучшил R-free и качество ротамеров, торсионные углы остались почти без изменений. Еще программа удалила 26 молекул воды.

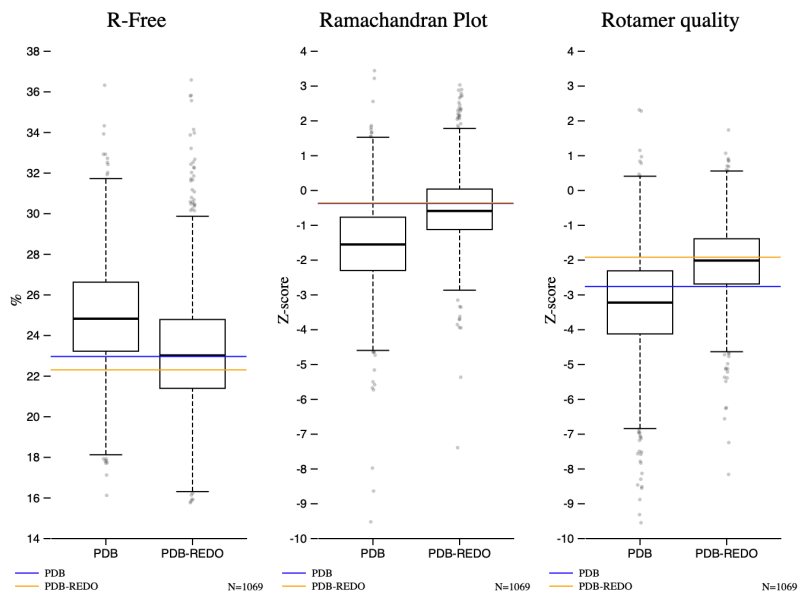


Рисунок 10. Сравнение показателей качества моделей из PDB и PDB-redo

В структуре из PDB-redo не был изменен ни один из остатков, которые рассматривались выше, кроме GLN-262. В нем поменялись местами атомы азота и кислорода в боковой цепи.

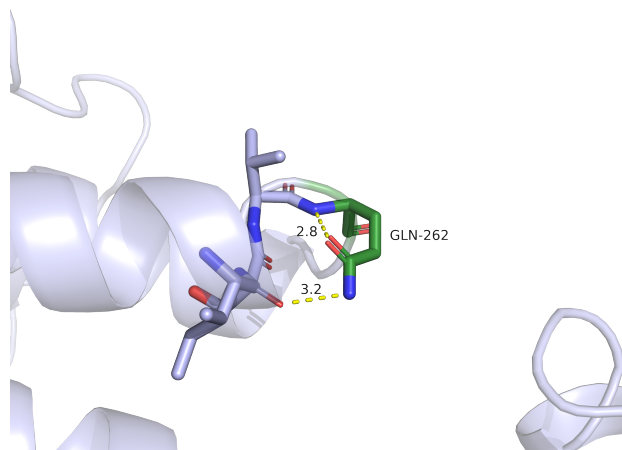


Рисунок 11. GLN-262 из PDB-redo

## **Заключение**

Выбранная структура имеет достаточно хорошее разрешение, а ее показатели качества выше среднего. В структуре имеются недочеты в виде инвертированных боковых цепей и плохо вписанных в электронную плотность остатков, однако они в основном находятся на поверхности белка и в условиях моей задачи не влияют на работу. На мой взгляд эта структура хорошо подходит, чтобы делать на ее основе какие-то биологические выводы.

## Литература и ссылки

[1] Zohar Erez et al. // Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions // (2017) *Nature* 541, 488–493. DOI:10.1038/nature21049

[2] Gallego Del Sol, F., Penades, J.R., Marina, A. // Deciphering the Molecular Mechanism Underpinning Phage Arbitrium Communication Systems // (2019) *Mol Cell* 74: 59-72.e3 DOI: 10.1016/j.molcel.2019.01.025

[3] <https://swift.cmbi.umcn.nl/servers/html/index.html>

[4] <http://molprobit.biochem.duke.edu/>

[5] <https://pdb-redo.eu/db/6hp5>