

# Отчет по качеству РСА-расшифровки структуры токсин-антитоксинового комплекса AtaTR (PDB ID: 6AJM)

Бруман Софья

## **Аннотация**

В работе был проведен анализ качества расшифровки структуры токсин-антитоксинового комплекса AtaTR (6AJM), полученного методом РСА. Рассмотрены показатели качества модели в целом, и показатели качества отдельных остатков. Проведено сравнение со структурой 6AJM отредактированной сервисом PDB-REDO.

## **Введение**

AtaT-AtaR - это энтерогеморрагическая токсин-антитоксиновая система *Escherichia coli*, которая модулирует рост клеток в стрессовых условиях. Они действуют как токсин и его репрессор-антитоксин соответственно. Антитоксин намного более лабилен и склонен к деградации при определенных условиях. Отсутствие антитоксина делает токсин свободным, что вызывает остановку роста или клеточную смерть. AtaT принадлежит к семейству N-ацетилтрансфераз GNAT. Мишенью для специфического ацетилирования AtaT является аминокислотный фрагмент инициаторной tRNA<sup>fMet</sup>, в результате чего ацетилированный Met-tRNA<sup>fMet</sup> не может взаимодействовать с фактором инициации трансляции 2 в комплексе с GTP (IF2-GTP) и, таким образом, AtaT блокирует клеточную трансляцию, вызывая ингибирование клеточного роста[1].

В статье 2019 года группа японских ученых провела кристаллографический анализ комплекса AtaT-AtaR *E. coli*[2] для того, чтобы тщательнее изучить предотвращение антитоксином AtaR образование ферментативно активного димера токсином AtaT. Анализ показал, что белки AtaT-AtaR образуют гетерогексамерный комплекс [AtaT-(AtaR4)-AtaT], где два V-образных димера AtaR соединяют две молекулы AtaT. N-концевой участок AtaR необходим для его димеризации, а C-концевой участок AtaR взаимодействует с AtaT.

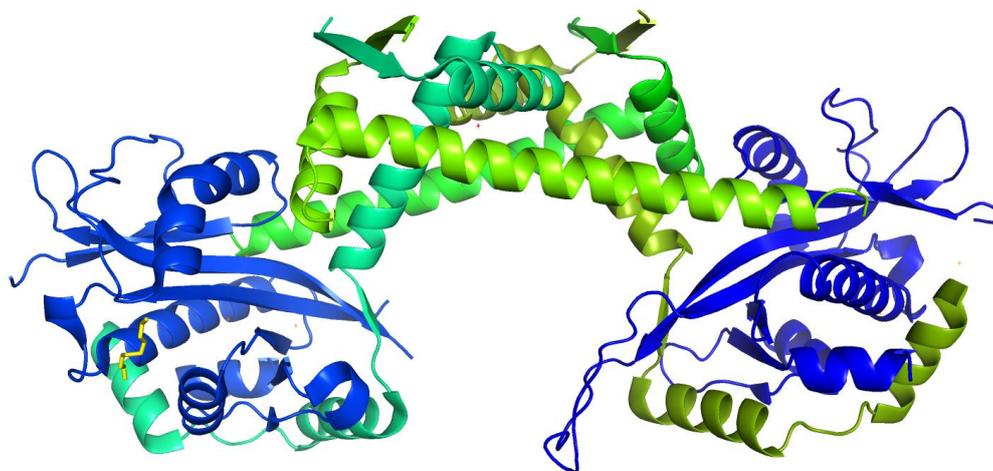


Рис.1. Структура гетерогексамерного комплекса [AtaT-(AtaR4)-AtaT]. Мономеры AtaT показаны синим, а мономеры AtaR – оттенками зеленого.

## Результаты и обсуждения

### Общая информация о модели

Год, авторы: 2019; Yashiro, Y., Yamashita, S., Tomita, K.

Статья: Yashiro Y, Yamashita S, Tomita K. Crystal Structure of the Enterohemorrhagic *Escherichia coli* AtaT-AtaR Toxin-Antitoxin Complex. *Structure*. 2019 Mar 5;27(3):476-484.e3. doi: 10.1016/j.str.2018.11.005. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30612860.

Состав комплекса:

- А, В – N-ацетилтрансферазы (AtaT), в каждой по 183 аминокислоты
- С, D, E, F - DUF1778 домен-содержащие белки (AtaR), в каждом по 88 аминокислот

Организм: *Escherichia coli*

Метод решения фазовой проблемы: молекулярное замещение

Число рефлексов: 28543

Разрешение и полнота набора структурных факторов: 2.60 Å с полнотой 99,8%

Диапазон разрешений структурных факторов: 2.6 Å - 19.957 Å

Параметры кристаллографической ячейки:  $a = 101.09 \text{ \AA}$ ;  $b = 116.42 \text{ \AA}$ ;  $c = 77.49 \text{ \AA}$ ;  
 $\alpha = 90^\circ$ ;  $\beta = 90^\circ$ ;  $\gamma = 90^\circ$ .

Кристаллографическая группа:  $P 2_1 2_1 2$

### Значения индикаторов качества модели в целом

R-value: 0,216

R-free: 0,267

R-work: 0,213

Хорошее значение R-фактора – не более 0,25. Приведенный R-фактор меньше, что говорит о хорошем соответствии модели ее экспериментальным значениям (модулям структурных факторов). Если смотреть на значение R-free, который нужен для того, чтобы модель не только подгонялась под R-фактор при оптимизации, но еще и не теряла в других параметрах качества, мы увидим средние значения. Хорошие значения для R-free меньше 25%, в нашем случае значение немного больше. Нужно отметить, что  $(R\text{-free} - R) < 10\%$ , таким образом, при рассмотрении данной структуры, можно не настораживаться в отношении переоптимизации.

С помощью сервиса MolProbity была получена таблица 1, в которой ниже представлены некоторые параметры качества интересующей модели. Также, при

добавлении водородов для выявления недопустимых наложений атомов, не было обнаружено возможных инверсий боковых цепей Asn, Gln, His.

Таблица 1. Выдача сервиса MolProbity. Таблица с суммарными характеристиками.

Clashscore, все атомы:		7,76		99 <sup>ый</sup> перцентиль (N=227, 2.60Å ± 0.25Å)
Геометрия белка	Poor rotamers	62	11.46%	Цель: <0.3%
	Favored rotamers	425	78.56%	Цель: >98%
	Ramachandran outliers	1	0.16%	Цель: <0.05%
	Ramachandran favored	586	96.22%	Цель: >98%
	MolProbity score <sup>^</sup>	17564		83 <sup>ый</sup> перцентиль (N=6237, 2.60Å ± 0.25Å)
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00%	Цель: 0
	Bad bonds:	0 / 5029	0.00%	Цель: 0%
	Bad angles:	0 / 6784	0.00%	Цель: <0.1%

Расшифровка обозначений таблицы:

*ClashScore* — число недопустимых наложений атомов на 1000; перцентиль данной структуры по отношению к структурам примерно такого же разрешения;  
*Poor rotamers* — число остатков с маргинальными по отклонению от ротамеров боковыми цепями;

*Ramachandran outliers* — полные маргиналы по карте Рамачандрана, лежат вне допустимой области; такие встречаются в 0,05% остатков при высоком разрешении;  
*Ramachandran favored* — число и процент остатков в предпочитаемой области; в идеале таких должно быть > 98%.

*MolProbity score* — интегральная оценка структуры по данным этого сервиса;  
*Cβ deviations > 0.25Å* — число Cβ-атомов с неприемлемым отклонением от ожидаемого положения;

*Bad backbone bonds* — число ковалентных связей, существенно отклоняющихся от теории (типично — 0);

*Bad backbone angles* — число валентных углов, существенно отклоняющихся от теории (типично — 0);

Сразу можно отметить, что значения двух из четырех основных параметров (отмечены в таблице голубым) геометрии белка, - число остатков с маргинальными по отклонению от ротамеров боковыми цепями и число ротамеров с предпочитаемыми боковыми цепями, сильно отклоняются от допустимых значений. Ротамеры - типичные конформации боковых цепей остатков. Задаются значениями  $\chi_1, \dots, \chi_4$  и доверительными интервалами к ним.

Также, нужно отметить, что при просмотре перекрывающихся атомов (параметр Clashscore) в большинстве случаев перекрывания происходят с атомами водорода, которые программа достраивала сама (поскольку в изначальной структуре они

отсутствуют). Видимо, это частая ситуация, поэтому значения параметра не превышает критическое.

Также, с помощью этого же сервиса была получена карта Рамачандрана, на которой виден один маргинальный остаток модели – GLU-155, цепь А (рис.2.). Карта Рамачандрана – это отображение для каждой аминокислоты на плоскости ( $\phi$ ,  $\psi$ ) всех наблюдаемых конформаций. Остаток GLU-155 также указывался в отчете Full wwPDB X-ray Structure Validation Report, как маргинальный. В целом, хорошей моделью считается модель, в которой  $>90\%$  остатков не считая Gly, Pro, находятся в предпочитаемой области. В целом, согласно выдаче MolProbity (Ramachandran favored = 96,22%), модель можно считать хорошей.

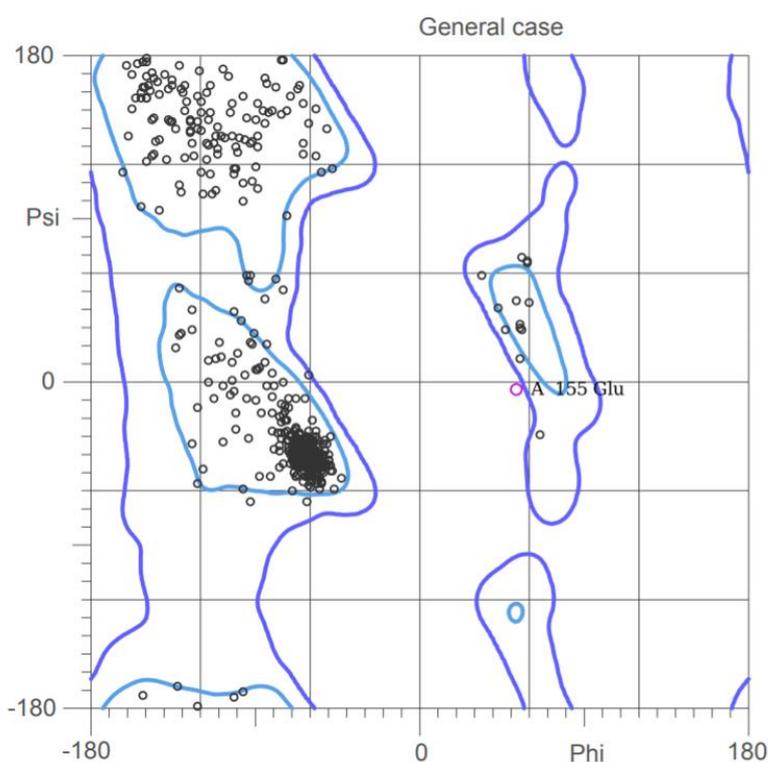


Рис.2. Карта Рамачандрана, построенная с помощью MolProbity для структуры 6AJM.

Также было найдено 59 неротамерных остатков (список приведен в отчете Full wwPDB X-ray Structure Validation Report [3]) и 28 остатков с RSR Z-score большим 2. RSR – это пространственный R-фактор, который сравнивает соответствие электронной плотности модели и “экспериментальной” электронной плотности. RSR Z-score – это относительная оценка RSR для конкретного остатка, хорошее значение  $< 2$ .

Ниже приведена таблица 2 с некоторыми маргинальными остатками (получены программой MolProbity и WHAT\_CHECK). Маргиналы выбирались по следующим параметрам:

- пересечение  $> 0.4\text{\AA}$ . Случаи с пересечениями между атомами водорода не рассматривались по причине указанной выше;
- остатки из запрещенной области карты Рамачандрана;

- остатки с неблагоприятной конформацией боковых цепей;
- остатки с неблагоприятным окружением (Coarse Packing Quality Control в WHAT\_CHECK);
- с худшими значениями RSRZ.

Таблица 2. Описание маргинальных остатков

№	Остаток	Пересечение > 0.4Å	Углы по карте Рамачандрана (φ,ψ)	Ротамеры (χ1,...,χn)	RSRZ>2	CPQC<-5
A 155	GLU	0,54 Å HG2 с O GLY-154 A	Маргинал (0,01%) 53.3, -4.6	Маргинал (0,1%) 63.2, 226.1, 20.1	-	-
A 77	LYS	0,53 Å HG2 с HD21 LEU-74 A	Предпочтительный (2,19%) -94.3, 56.5	Предпочтительный (11,1%) 203, 62.6, 193.3, 169.6	5,6	-
B 1	MET	0,71 Å N с SD MET-1 B	-	Маргинал (0,2%) 316.3, 59.7, 60.3	2	-
A 55	GLU	0,61 Å OE2 с OG1 THR-53 A	Предпочтительный (99%) -61.8, -43.4	Маргинал (0,1%) 42.5, 98.9, 52.2	-	-
E 8	ARG	0,44 Å H с HG3 GLN-7 E	Предпочтительный (25,52%) -143.9, 134.9	Маргинал (0,1%) 63.3, 284.4, 157.8, 180.6	2,6	-6.885
B 14	ASP	0,71 Å HB2 с HB3 ASP-12 B	Допустимый (1,47%) -102.3, 39.6	Допустимый (1,4%) 265.9, 309.5	-	-
F 28	SER	0,43 Å O с HG3 GLN-30 F	Допустимый (1,84%) -91.3, 27.8	Допустимый (0,6%) 37	-	-
A 80	GLN	-	Допустимый (1,84%) -122.2, -56.9	Предпочтительный (32,8%) 285.9, 156.6, 323.8	4,1	-6,963
A 136	LEU	-	Предпочтительный (55,24%) -76.4, -22.1	Маргинал (0%) 322.3, 120.8	-	-5,73

С помощью программы WHAT\_CHECK был рассчитан Z-score для комфортности окружения каждой боковой цепи остатков. Маргиналами считаются боковые цепи с Z-score<-5. Также, нужно отметить, что среднее значение параметра по всем остаткам в выданной таблице составило 0.230, что говорит о хорошей комфортности окружения

остатков в целом. Самое низкое значение рассчитан Z-score для комфортности окружения получилось у остатка GLN-80 A = -6,963; следующим по возрастанию значения Z-score после него идет остаток ARG-8 цепи E, упомянутый также в таблице выше.

### Анализ нескольких маргинальных остатков

- GLU-155 цепи A
  - Пересечение HG2 с O GLY-154 A (0,54 Å)
  - Маргинал по углам  $\phi$  и  $\psi$ :  $\phi = 53,3$ ,  $\psi = -4,6$
  - Имеет неротамерную конформацию:  $\chi_1 = 63.2$ ,  $\chi_2 = 226.1$ ,  $\chi_3 = 20.1$

Ниже, на рисунке 3 приведено изображение данного остатка.

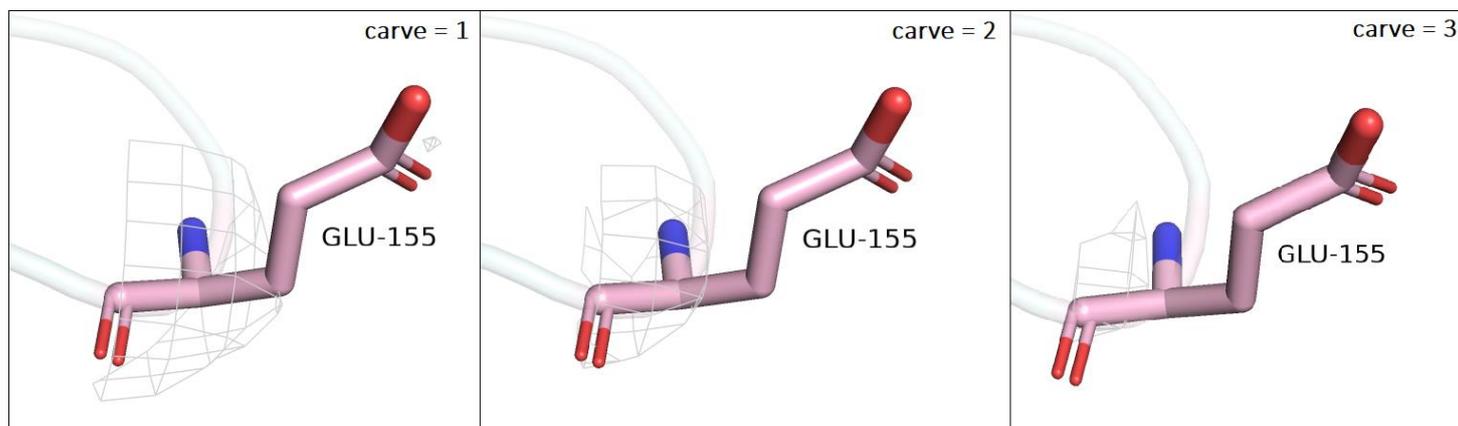


Рис.3. GLU-155 цепи A структуры 6AJM, показан розовым. Слева – уровень подрезки = 1, в центре – уровень подрезки = 2, справа уровень подрезки = 3.

Можно сразу отметить, что даже при уровне подрезки = 1, электронной плотности рядом с атомами углерода радикала не наблюдается, однако заметно небольшое скопление электронной плотности рядом с OE1 и OE2 глутамата, что логично, так как кислороды имеют больше электронов, чем углероды. Таким образом, абсолютно понятно, что данный остаток имеет неротамерную конформацию, так как непонятно, как точно атомы расположены в пространстве и, соответственно, какие углы  $\chi$ . Если присмотреться внимательнее, можно заметить, что остовные атомы остатка очень неоднозначно вписаны в электронную плотность, а при увеличении уровня подрезки до 3, в нее остается вписан только C атом остатка, а также незадействованным остается небольшой кусок электронной плотности, в который ничего не вписано (кажется, что если сдвинуть остаток на картинке немного влево, то он вписался бы в электронную плотность лучше – сгусток электронной плотности на уровне подрезки = 3 оказался бы около кислорода, что выглядело бы более объяснимым). Таким образом, маргинальность остатка по значениям торсионных углов также не кажется удивительной.

Нужно отметить, что было решено проверить гипотезу о том, что почти отсутствие электронной плотности на радикальной части остатка вызвано его высокой подвижностью, в связи с чем структура была покрашена по значениям B-фактора с помощью 'rainbow' (красный – высокий B-фактор, фиолетовый - низкий). Результат представлен на рисунке 4 ниже. Можно отметить, что, подвижность радикала этого остатка не так высока (оранжевый) (возможно поэтому и остается сгусток электронной плотности между OE1 и

ОЕ2 глутамата), а также, что значение В-фактора убывает от конца радикала к остову и атом О остова остатка становится зеленым, в связи с чем понятно, что низкое качество электронной плотности у остова обусловлено не повышенной подвижностью, а просто низким качеством полученных данных.

Что касается пересечения Ван-дер-Ваальсовых радиусов более, чем на 0,4 ангстрема: было измерено расстояние между НG2 и О GLY-154 А, которое составило 2,1 Å. Ван-дер-Ваальсовы радиусы атомов водорода и кислорода равны 1,1 и 1,4 ангстрема соответственно, то есть то есть для отсутствия отталкивания, расстояние между ними должно быть на 0,4 Å больше. Как мне кажется, данная проблема вызвана тем, что в данной области и отсутствует электронная плотность, и программа достраивала водороды сама. А как известно, программа делает это совсем неточно.

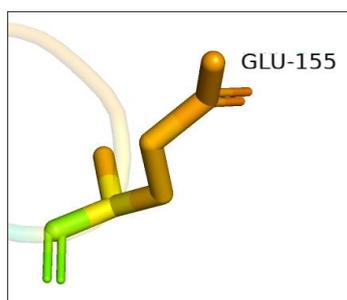


Рис.4. GLU-155 цепи А структуры 6AJM, структура покрашена по В-фактору с помощью 'rainbow' (красный – высокий В-фактор, фиолетовый - низкий).

Нужно также отметить, что этот же остаток, только в цепи В состоит в альфа-спирали, и также является маргиналом, но только по торсионам боковой цепи также по причине отсутствия электронной плотности у всего радикала, кроме ОЕ2, которая также пропадает уже на уровне подрезки = 2 (см. рисунок 5).

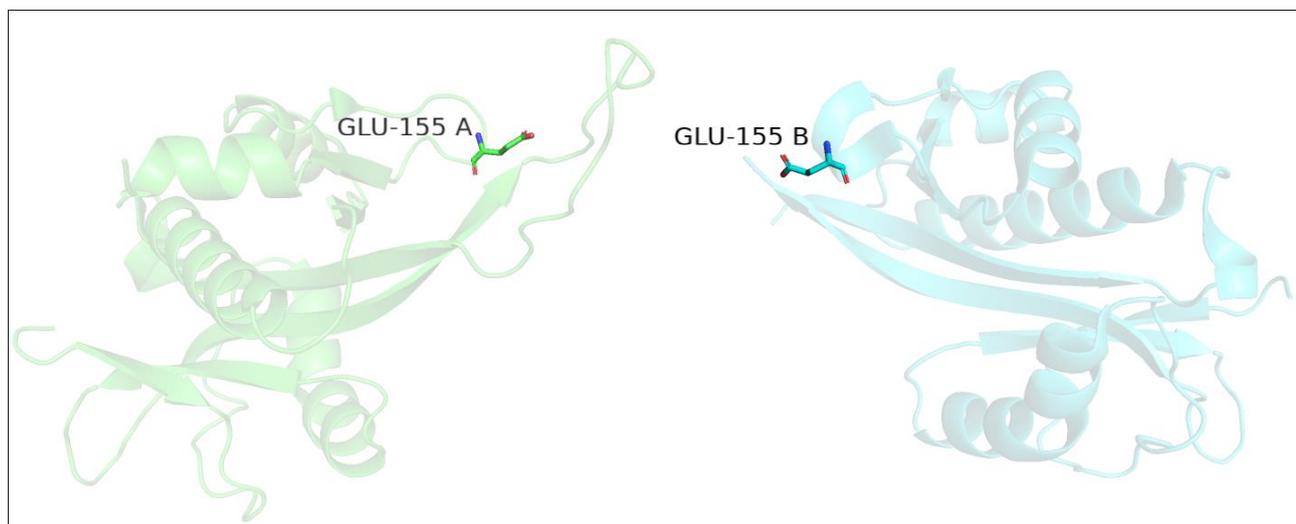


Рис.5. GLU-155 цепей А и В.

- ARG-8 цепи E
  - Имеет неротамерную конформацию:  $\chi_1 = 63,3$ ,  $\chi_2 = 284,4$ ,  $\chi_3 = 157,8$ ,  $\chi_4 = 180,6$
  - RSRZ = 2,6 > 2
  - Маргинал по Z-score для комфортности окружения = -6,885 < -5

Ниже, на рисунке 6 приведено изображение данного остатка.

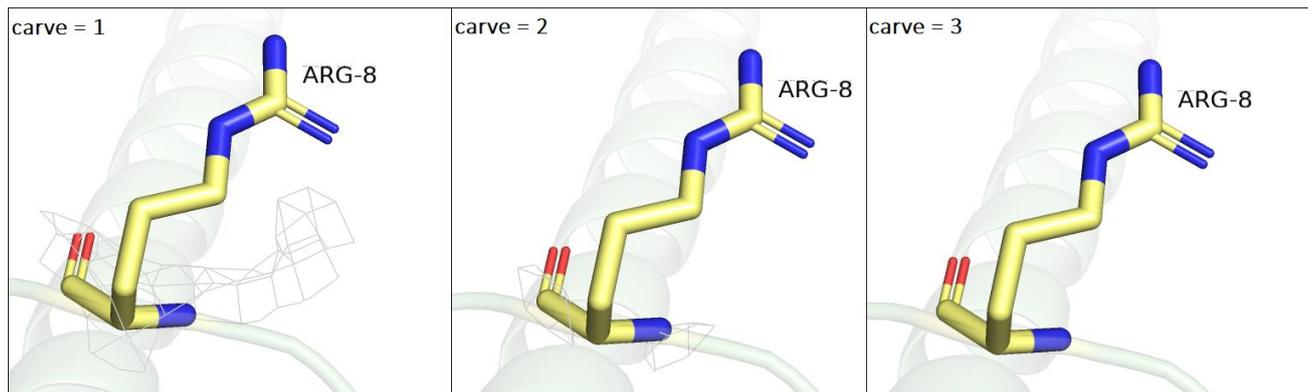


Рис.6. ARG-8 цепи E структуры 6AJM, показан желтым. Слева – уровень подрезки = 1, в центре – уровень подрезки = 2, справа уровень подрезки = 3.

Данная ситуация немного похожа на вышеописанную, однако в данном случае остовные атомы аргинина вписаны в электронную плотность гораздо лучше, чем в прошлом случае – это отлично видно на уровне подрезки 2. Тем не менее, на уровне подрезки 3 электронной плотности уже не наблюдается совсем ни у радикала, ни у остова, что говорит о плохом ее качестве, так как в данном остатке много атомов азота и кислорода у которых много электронов и часто на данном уровне подрезки у них остаются сгустки электронной плотности. Таким образом, так как остовные остатки неплохо вписаны в электронную плотность, понятно, почему не возникает проблем с торсионными углами. Однако, данный остаток имеет неротамерную конформацию, что вполне объяснимо тем, что даже на уровне подрезки = 1, на радикале вообще нет электронной плотности и непонятно, как он расположен в пространстве – это происходит, возможно, потому что остаток располагается близко к концу белковой глобулы, который сильно подвижен.

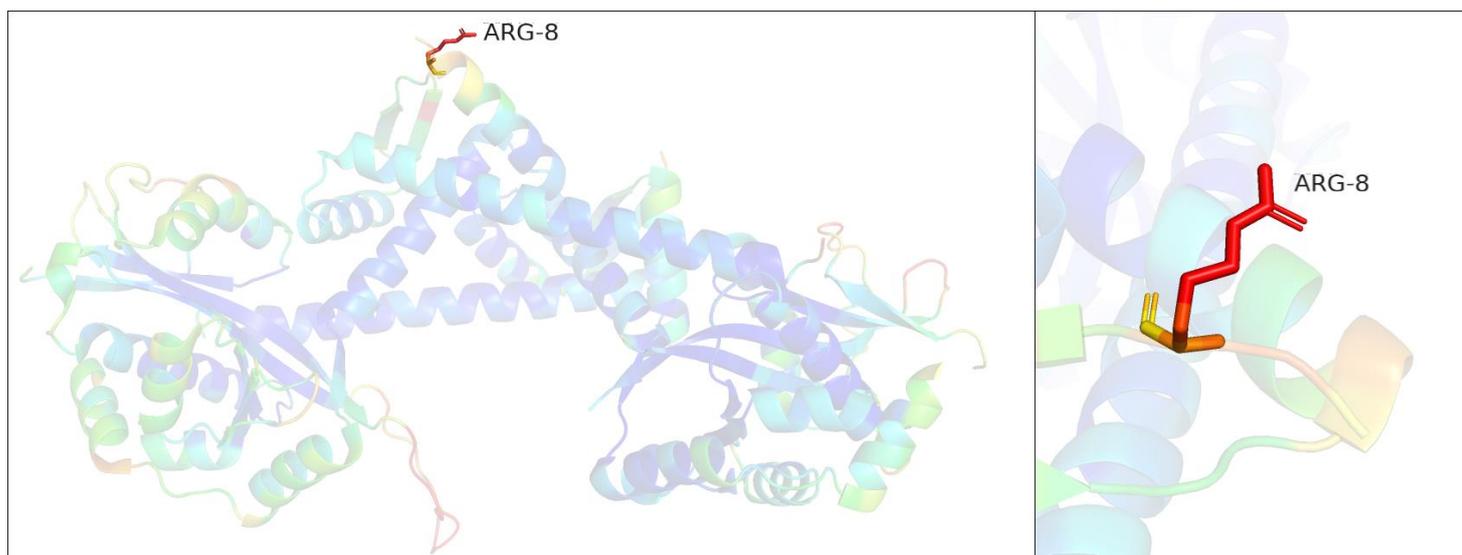


Рис.7. ARG-8 цепи E структуры 6AJM, структура покрашена по B-фактору с помощью 'rainbow' (красный – высокий B-фактор, фиолетовый - низкий).

Для того, чтобы это проверить, структура была покрашена по значениям B-фактора, результат представлен на рисунке 7 выше. Видно, что остаток аргинина красный

(подвижный) в области радикала, что объясняет отсутствие электронной плотности, а также видно, что от радикала к остову остаток становится сначала оранжевым, а ближе к атому О даже желтым, что объясняет неплохо вписанные в электронную плотность атомы остова.

Также, нужно отметить, что если внимательно посмотреть на рисунок 5 слева (уровень подрезки = 1), то можно увидеть достаточно большой кусок электронной плотности, в который ничего не вписано: кажется, что если аргинин зеркально отразить, то, возможно, он мог бы лечь в это облако электронной плотности.

Что касается низкого значения Z-score комфортности окружения, тут, как мне кажется, он обусловлен выходом остатка на поверхность белковой глобулы, нахождением на практически конце пептидной цепи и отсутствием водородных связей с молекулами растворителя (в данном случае нужно отметить, что в структур всего 8 молекул воды).

Наличие же высокого (>2) значения RSRZ свидетельствуют о том, что остаток плохо вписан в электронную плотность по сравнению с другими структурами с тем же разрешением.

- MET-1 цепи В
  - Пересечение N с SD MET-1 В (0,71 Å)
  - Имеет неротамерную конформацию:  $\chi_1 = 316.3$ ,  $\chi_2 = 59.7$ ,  $\chi_3 = 60.3$
  - RSRZ = 2

Ниже, на рисунке 8 приведено изображение данного остатка.

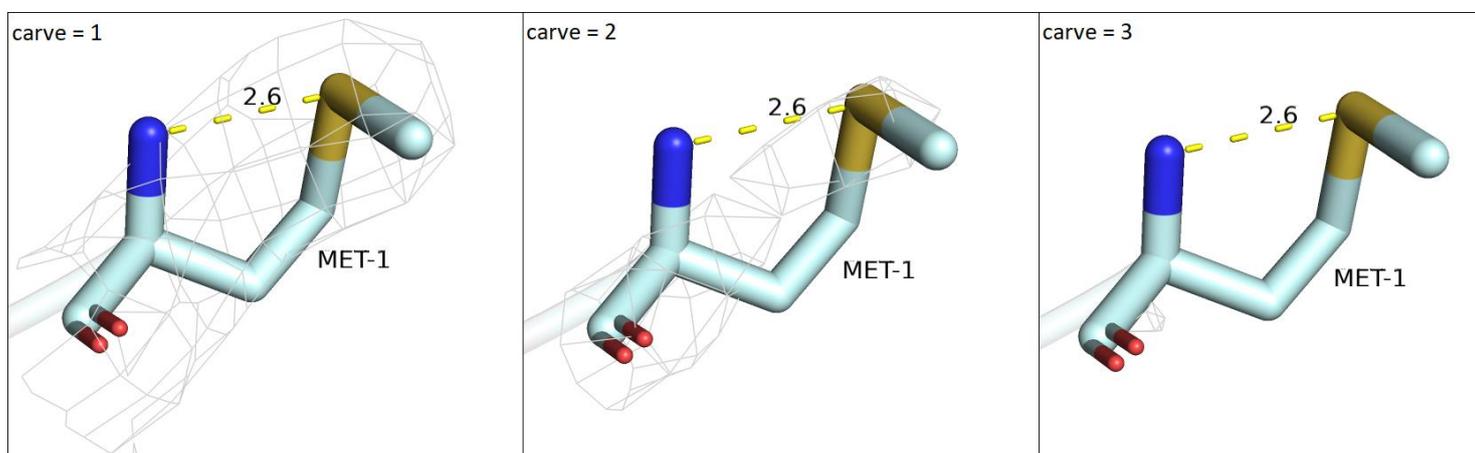


Рис.8. MET-1 цепи В структуры 6AJM, показан голубым. Слева – уровень подрезки = 1, в центре – уровень подрезки = 2, справа уровень подрезки = 3.

Рассмотрим перекрытие Ван-дер-Ваальсовых радиусов: у серы и азота Ван-дер-Ваальсовы радиусы составляют примерно 1,85 и 1,5 ангстремов соответственно. В данной ситуации перекрытие достаточно большое (на 4м месте по убыванию среди перекрытий Ван-дер-Ваальсовых радиусов атомов) и происходит оно по причине низкого качества электронной плотности и соответствующего качества вписывания атомов в нее. В отличие от предыдущих случаев, у данного остатка на уровне подрезки = 1, электронной плотностью покрыты все атомы, однако они не совсем удачно вписаны: основной атом азота выступает из электронного 'облака', так же, как и SE атом радикала. Стоило бы ожидать, что при увеличении уровня подрезки, электронная

плотность останется на атомах с большим количеством электронов (сера радикала и азот и кислород остова), однако так как азот практически не вписан в электронную плотность (а также плохо вписан СВ углерод радикала), будем смотреть на серу и кислород. При увеличении уровня подрезки до  $= 2$ , действительно, электронная плотность остается вокруг кислорода серы и немного между ними (возможно в эту плотность должны быть вписаны радикальные атомы углерода), а вот при переходе к уровню подрезки  $= 3$ , электронная плотность остается только на кислороде, что достаточно странно, так как у серы больше электронов. В связи с этим было решено проверить B-фактор (см. рисунок 9 ниже), так как остаток находится на N-конце белковой цепи и может быть очень подвижным.

Ниже можно увидеть, что наиболее подвижными является CG атом углерода, а также, соседствующие с ним атомы серы и СВ углерода, в связи с этим понятно, почему атомы плохо вписаны в облако электронной плотности на уровне подрезки  $= 2$  и, почему на уровне подрезки  $= 3$  на атоме серы совсем не остается электронной плотности. Зато интересно, что самый крайний CE атом углерода радикала имеет невысокий B-фактор, как и атомы остова, что удивительно, учитывая, что остаток находится на конце белковой глобулы.

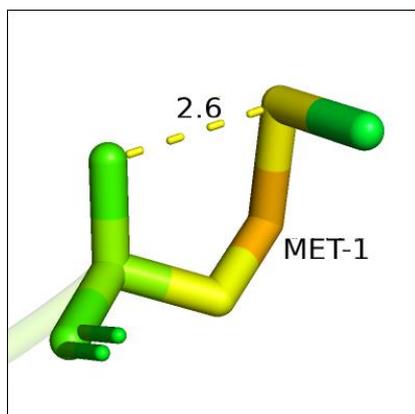


Рис.9. MET-1 цепи B структуры 6AJM, структура покрашена по B-фактору с помощью 'rainbow' (красный – высокий B-фактор, фиолетовый - низкий).

Теперь отлично видно, что так как радикал достаточно подвижен и неоднозначно вписан в электронную плотность, соответственно, остаток вполне может иметь неротамерную конформацию, так как атомы углерода и серы по сути были помещены в электронную плотность достаточно произвольно. Собственно, эти же мысли подтверждаются граничным значением RSRZ, которое говорит о том, что остаток плохо вписан в электронную плотность по сравнению с другими структурами с тем же разрешением.

В целом, были просмотрены все остатки с низким Z-score для комфортности окружения, и все остатки находились на поверхности белковой глобулы (в основном, в петлях) и в основном их электронная плотность была плохо интерпретирована.

- GLU-55 A
  - Пересечение OE2 с OG1 THR-53 A (0,61 Å)
  - Имеет неротамерную конформацию:  $\chi_1 = 42.5$ ,  $\chi_2 = 98.9$ ,  $\chi_3 = 52.2$

Ниже, на рисунке 10 представлено изображение данного остатка.

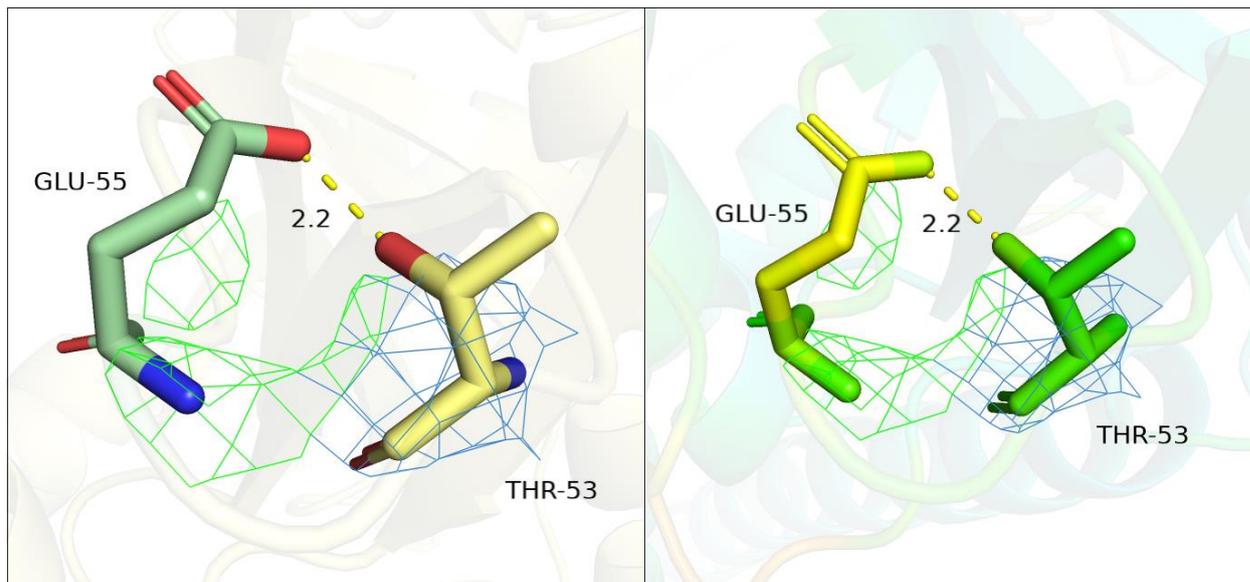


Рис.10. GLU-55 цепи A структуры 6AJM, показан зеленым слева, его электронная плотность показана зеленым. Слева – уровень подрезки = 2. Справа - структура покрашена по B-фактору с помощью 'rainbow' (красный – высокий B-фактор, фиолетовый - низкий). Дополнительно показан остаток THR-53, его электронная плотность показана синим цветом отдельно.

Первое, что нужно отметить – это то, что расстояние между атомами кислорода OE2 GLU-55 и OG1 THR-53 A действительно мало, если учесть, что Ван-дер-Ваальсов радиус атома кислорода составляет 1,4 ангстрема. Однако, мне кажется это ошибкой расшифровки, так как электронная плотность на радикале глутамата практически не сосредоточена. Так как остаток, опять же, находится в петле и на поверхности белковой глобулы достаточно далеко от центра масс белка, было предположено, что низкое качество электронной плотности обусловлено высокой подвижностью, и, в связи с этим, структура была покрашена по B-фактору. Отлично видно на рисунке 10 слева, что радикал треонина, который оказался менее подвижным (также за счет того, что он меньше) имеет большее скопление электронной плотности вокруг своих атомов, чем глутамат. Что интересно, тот самый OE2 GLU-55 имеет меньший B-фактор, чем другие атомы радикала и показан более стабильным, однако электронной плотности не наблюдается в этой области вообще, даже на уровне подрезки = 1. По этой же причине, как и в прошлый случаях, так как атомы остатка были помещены в структуру практически рандомно в то место, где остаток теоретически должен быть, торсионные боковых цепей вполне могут не соответствовать норме. Нужно так же отметить, что Z-score для комфортности окружения близок к -5 (равен -4,122), вероятно по причине близкого контакта с треонином и отсутствия у глутамата, как полярного остатка, водородных связей с растворителем, однако, как уже отмечалось в структуре всего 9 молекул воды.

- LEU-136 цепи A
  - Имеет неротамерную конформацию:  $\chi_1 = 322.3$ ,  $\chi_2 = 120.8$

- Маргинал по Z-score для комфортности окружения =  $-5,73 < -5$

Ниже, на рисунке 11 приведено изображение данного остатка и его окружения, которое будет обсуждено далее.

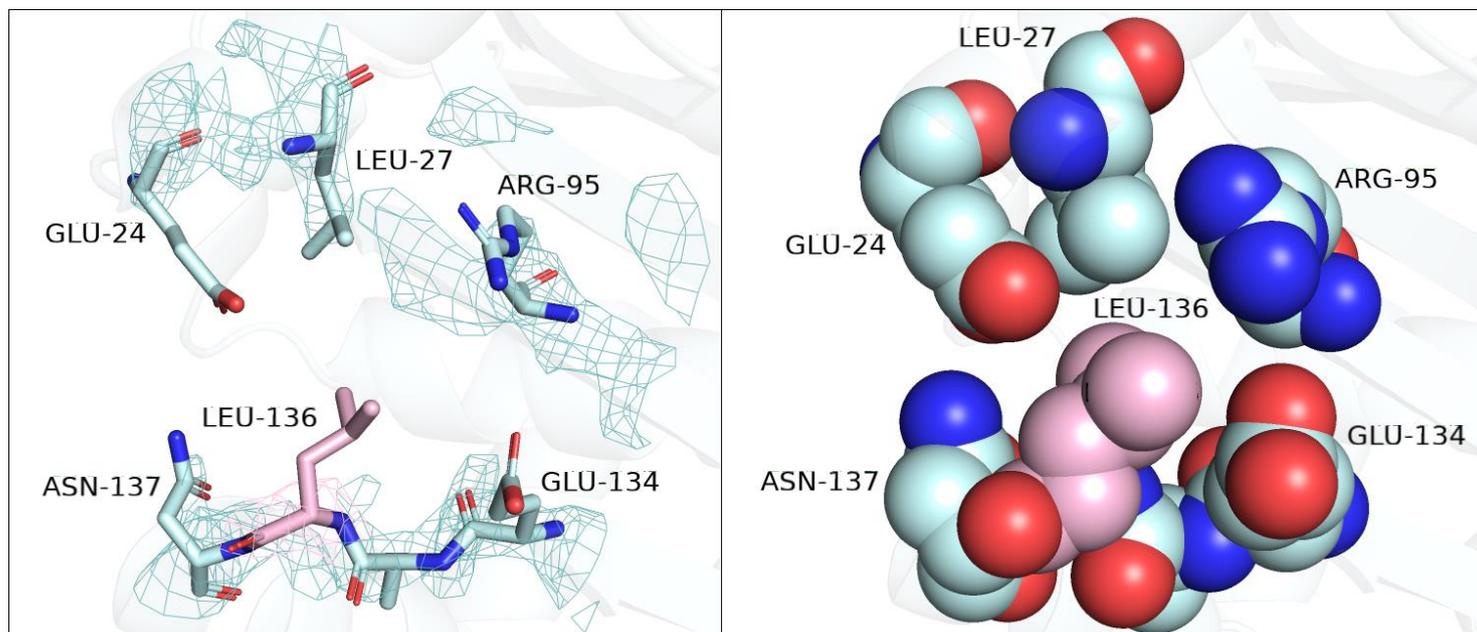


Рис.11. LEU-136 цепи A структуры 6AJM, показан розовым, его соседи – голубым, электронная плотность показана соответствующими цветами справа на уровне подрезки = 2. Слева изображение тех же остатков с помощью 'spheres'.

Первое, что нужно обсудить, - это то, что LEU-136 покрыт электронной плотностью только в области остовных атомов и совершенно не покрыт в области радикальных атомов в связи с чем, что многократно обсуждалось выше, непонятно, каким образом расположены атомы радикала в реальности и могут возникать маргиналы торсионных боковых цепей. Что здесь интересно, так это плохое значение Z-score для комфортности окружения. Мы видим, что LEU-136 окружен заряженными остатками за исключением LEU-27, который также окружен полярными заряженными остатками, однако значение Z-score для окружения у LEU-27 составляет 0,234, что говорит о достаточно хорошем окружении. Между собой лейцины соединены как будто небольшим 'гидрофобным мостиком'. Также нужно отметить, что LEU-27 имеет достаточно хорошую расшифровку электронной плотности. Как мне кажется, большее значение Z-score для комфортности окружения у LEU-27 вызвано его гидрофобными взаимодействиями с атомами углерода радикала GLU-24, а также достаточной удаленностью от заряженного ARG-95. Нужно также отметить, что LEU-136 равноудален от заряженных остатков, окружающих его по бокам, что также кажется выгодной конформацией. В целом, остаток LEU-136 и не может расположиться как-то сильно иначе, так чтобы ситуация улучшилась и чтобы транс-конформация пептидной связи сохранилась: единственное, что можно сделать – это рассмотреть другие ротамеры, что и было сделано далее. Результат показан на рисунке 12 ниже.

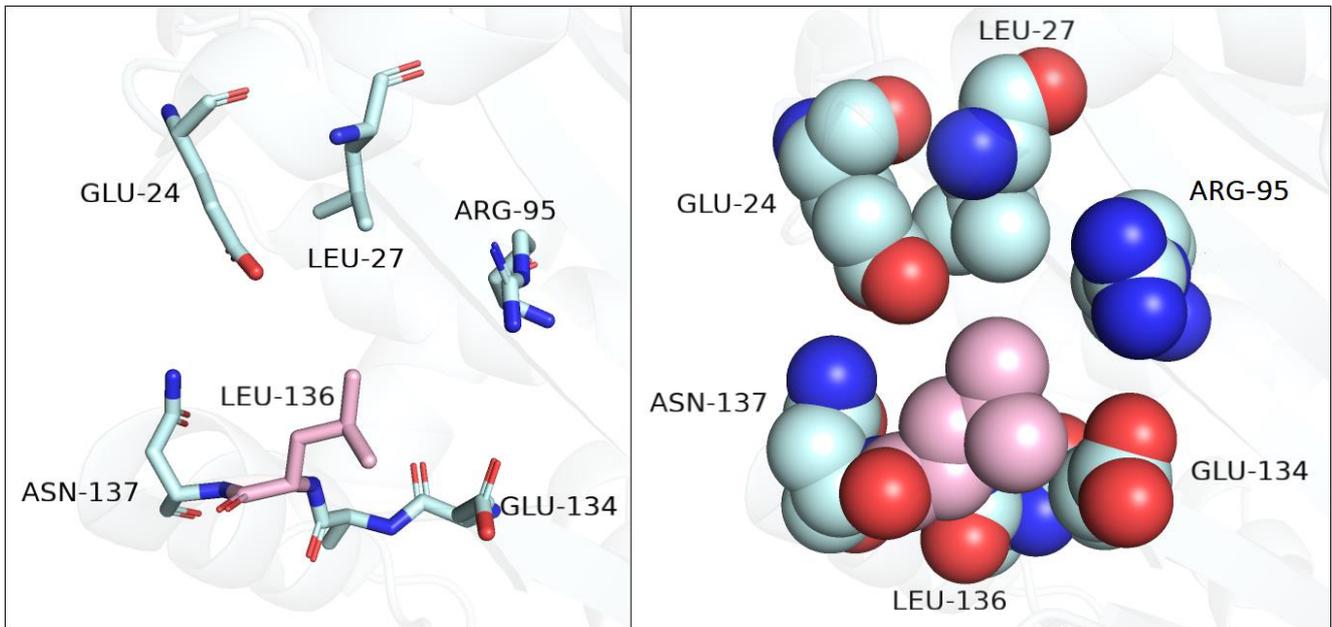


Рис.12. LEU-136 цепи А структуры 6AJM, показан розовым, его соседи – голубым. Слева изображение тех же остатков с помощью 'spheres'.

Просмотрев другие ротамеры остатка, нашелся ротамер 1/3 с strain = 7, что немного и распространенностью 90,3%. В целом, ситуация не сильно меняется: и 'гидрофобный мостик' между лейцинами остается, и LEU-136 все также равноудален от заряженных остатков, однако торсионы боковых цепей лучше вписываются в норму.

### Сравнение модели из PDB с моделью PDB\_redo

В целом, модели достаточно похожи, однако все же существуют некоторые отличия, которые нетрудно заметить на рисунке 13 ниже.

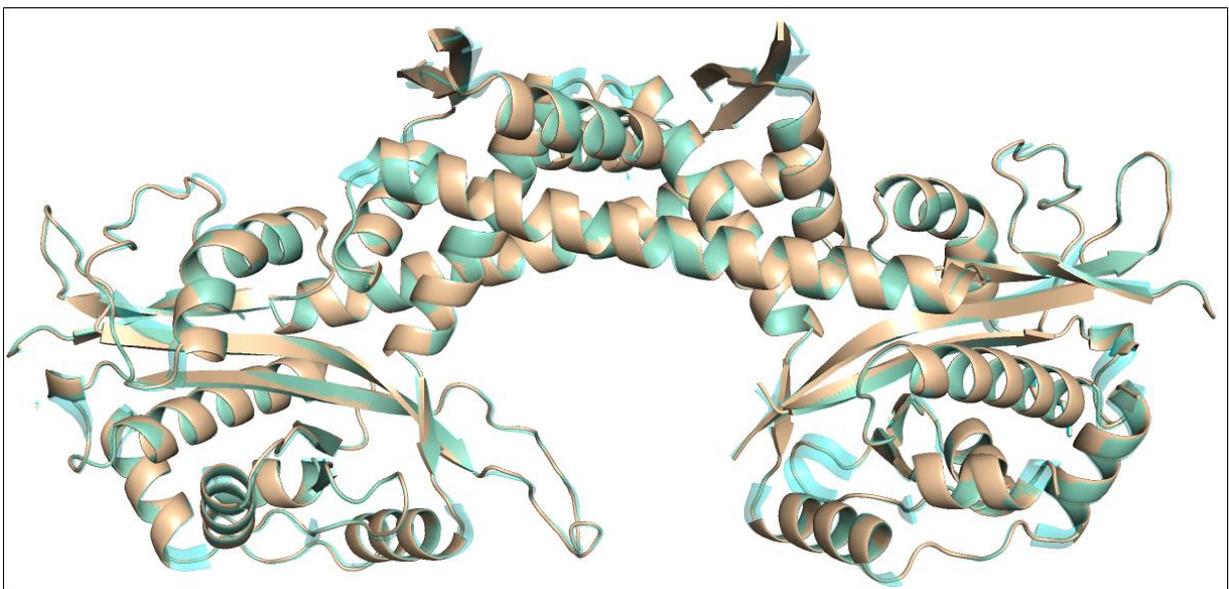


Рис.13. Структура PDB 6AJM показана голубым, структура PDB\_redo 6AJM показана телесным.

Нужно отметить, что новая модель и оптимизировалась и ухудшилась по некоторым параметрам. Прежде всего, замечу, что по-видимому, валидация модели изначально проводилась и авторами и автоматизированным протоколом, при этом протокол при валидации выдал значение  $R = 0,219$  и  $R_{free} = 0,273$ , а когда авторы независимо вписывали модель самостоятельно, они получили значения  $R = 0,213$  и  $R_{free} = 0,267$ . Однако, при работе с PDB\_redo именно для структуры изначально неисправленной PDB были показаны совершенно другие значения  $R = 0,2326$  и  $R_{free} = 0,2815$ . Замечу, что вне зависимости от валидации, значения  $R_{free}$  являлись чем-то средним между хорошими и плохими. А что касается переоптимизации, при валидации протоколом и авторами значения  $(R_{free} - R) = 5,4\%$ , что меньше 10% и не настораживает в этом отношении, а для у сервиса PDB-REDO для исходной структуры PDB, значения  $(R_{free} - R) = 4,89\%$ , что даже меньше, однако при этом значение  $R_{free}$  самое худшее и вышеописанных. Аналогично и со значением R-фактора: хоть оно и меньше 0,25 и можно назвать качество структуры хорошим, значение  $R = 0,2326$  все же ближе к 0,25, чем остальные. Если все же мы будем опираться на параметры, полученные сервисом PDB-REDO для исходной структуры и сравним их с параметрами для отредактированной структуры PDB\_redo, то заметим, что значения  $R_{redo} = 0,2208$  и  $R_{free\_redo} = 0,2722$ , что меньше, чем было у исходной структуры, однако все равно больше, чем у значений полученных авторами структуры. Значение  $(R_{free\_redo} - R_{redo}) = 5,14\%$ , что даже больше, чем было, однако данное значение не превышает критическое в 10% и, следовательно, соответствует норме. Таким образом, можно заключить, что улучшение параметров  $R_{free}$  и R-фактора весьма сомнительно: то есть оно лучше, по сравнению с тем, что выдано для изначально структуры сервисом PDB-REDO, но хуже, чем в валидации авторов.

Кроме того, были увеличены по сравнению с PDB моделью RMS Z-scores по длинам связей и углам (с 0,362 до 0,691 и с 0,679 до 1,061 соответственно), что, конечно, в пределах нормы ( $<2$ ), однако все равно в случае углов увеличение RSRZ было помечено программой, как критическое. Также, число маргиналов по карте Рамачандрана увеличилось с 0 (хотя в отчете PDB указывался один GLU-155 A) до 6 (что, кажется, связано с подходом к определению маргинальности остатков в MolProbity и PDB-REDO), а также были изменены 9 ротамеров. 63 остатка стали лучше вписываться в электронную плотность, а 13 — хуже. Интересно, что также из и так малого количества молекул воды (8ми) было удалено еще 3. Общие показатели можно увидеть на рисунке 14.

Заметим, что среднее по  $R_{free}$  стало меньше (однако помним, по соотношению  $R_{free}$  и  $R$ , модель стала более переобученной), однако средний Z-score по карте Рамачандрана немного вырос, а в случае качества ротамеров — вырос достаточно сильно.

Отмечу, что из обсужденных выше пяти маргинальных остатков, значительно были изменены остатки LEU-135 A и GLU-55 A. Остаток LEU-135 A стал вписан в электронную плотность лучше, а остаток GLU-55 A — хуже. Собственно, как я и предполагала, в случае LEU-135 A было изменено положение атомов радикала, что показано на рисунке 15 ниже.

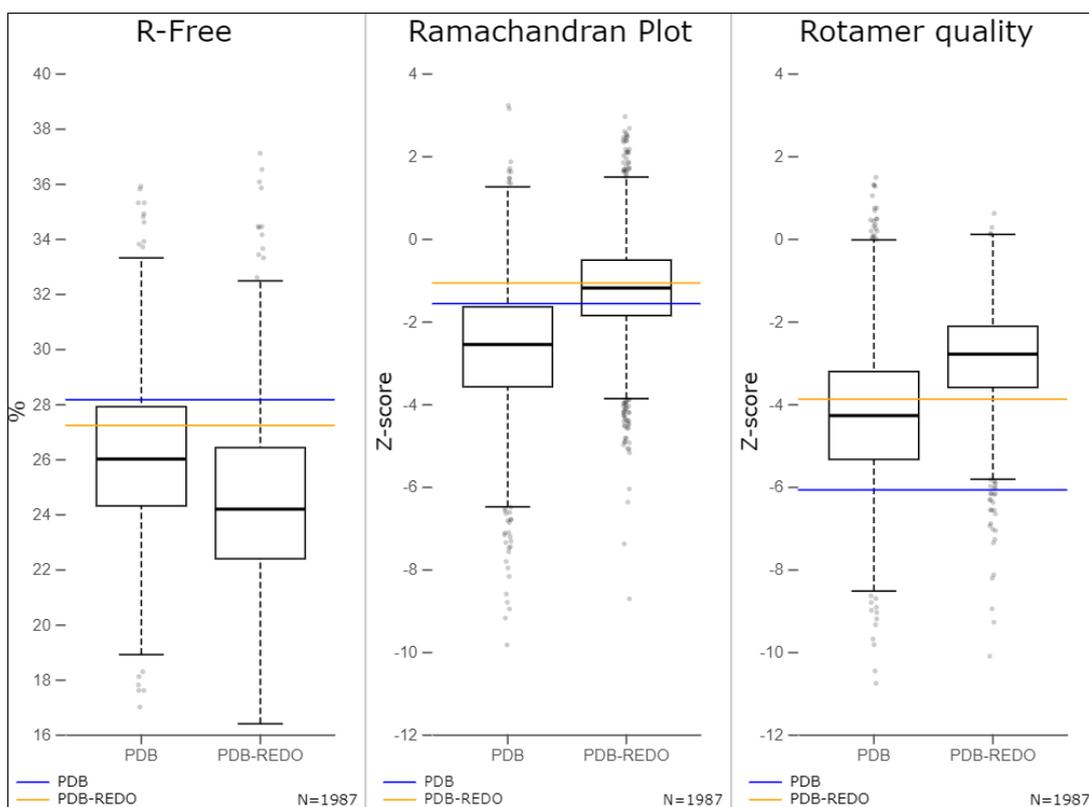


Рис.14. Сравнение показателей качества изначальной модели и PDB\_redo.

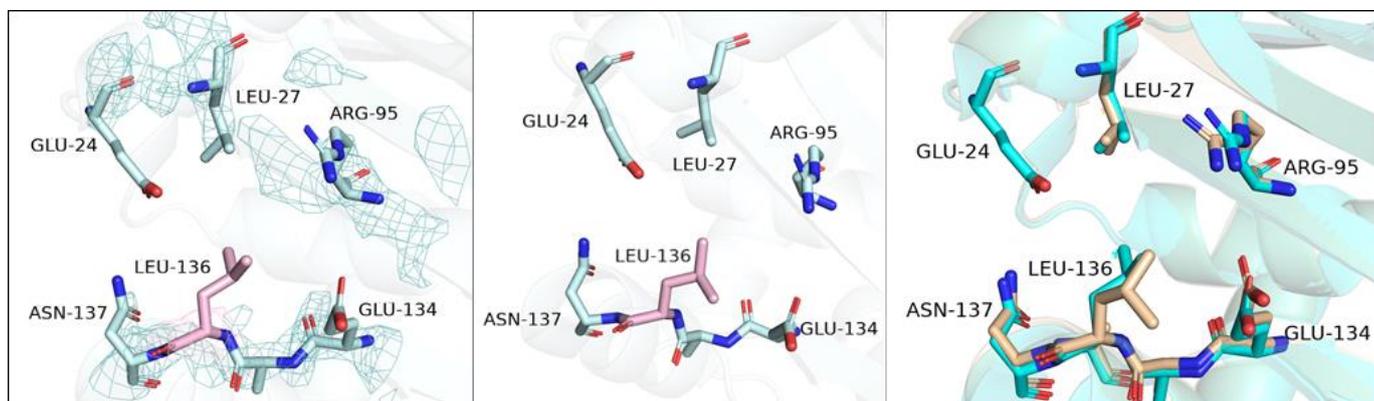


Рис.15. Слева – положение остатка LEU-136 в PDB, посередине – ротамер 1/3 остатка LEU-136, подобранный вручную, справа – положение остатка LEU-136 в PDB\_redo (голубым показана структура PDB, телесным – PDB\_redo).

Собственно, видимое отличие заключается в том, что CG атом лейцина становится повернут к читателю в структуре PDB\_redo. Честно говоря, непонятно, чем эта позиция остатка лучше, так как он достаточно сильно отдален и отвернут от LEU-27 и, кажется, что 'гидрофобного мостика', о котором шла речь выше, тут уже не наблюдается, так как расстояние между ними становится сильно больше.

Что касается остатка GLU-55 A (рисунок 16), мы помним, что основная проблема была в расстоянии между OE2 глутамата и OG1 треонина. В данной ситуации, хоть качество электронной плотности на остатке и стало хуже, положение остатка и его стабилизация стала лучше! Так как теперь, глутамат немного развернут

и расстояние от OE1 глутамата до OG1 треонина составляет 2,9 ангстрема, возможно образование водородной связи между этими атомами, хоть геометрия и не идеальна, и электронная пара кислорода глутамата смотрит немного в другую сторону, чисто гипотетически, связь возможна.

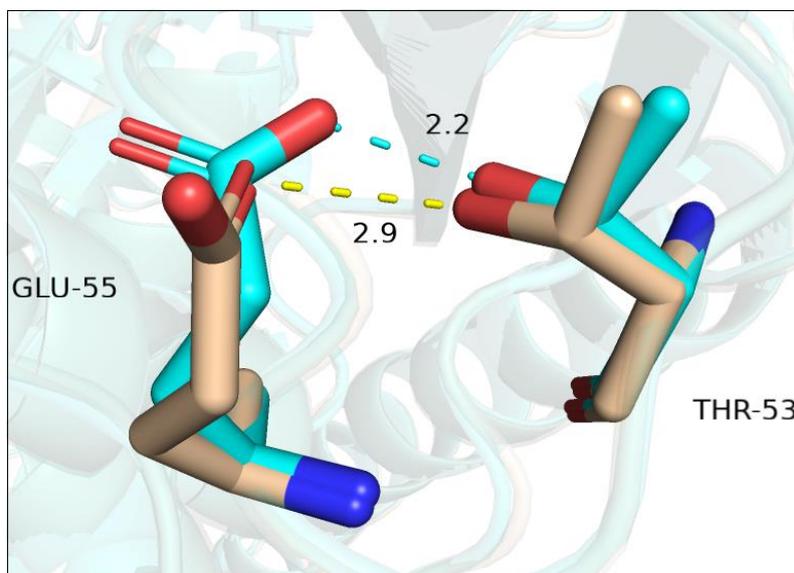


Рис.16. Положение остатка GLU-55 в PDB и в PDB\_redo (голубым показана структура PDB, телесным – PDB\_redo).

## Заключение

Подводя итоги анализа данной модели, хочется сказать, что на мой взгляд данная модель была расшифрована вполне неплохо. Было найдено довольно много недочетов, но в основном они касались остатков, имеющих плохое покрытие электронной плотностью (особенно подвижные остатки, находящиеся на поверхности белковой глобулы), что являлось причиной маргинальности остатков по различным параметрам (отнюдь не структурные особенности). При оптимизации модели с помощью ресурса PDB-REDO было усовершенствовано довольно большое количество параметров, в том числе изменены некоторые ротамеры, и 63 остатка лучше вписаны в электронную плотность, однако выявились и некоторые недочеты, обсуждаемые выше, например увеличение Z-score по величинам углов, а также увеличение переобученности модели из-за увеличения разности  $R_{free}$  и  $R$ , ухудшение вписывания 13ти остатков в электронную плотность и др. На мой взгляд эта структура хорошо подходит, чтобы делать на ее основе какие-то биологические выводы и без правок PDB\_redo.

## Список литературы

[1] - Jurėnas, D., Chatterjee, S., Konijnenberg, A. et al. AtaT blocks translation initiation by N-acetylation of the initiator tRNA<sup>fMet</sup>. Nat Chem Biol 13, 640–646 (2017). <https://doi.org/10.1038/nchembio.2346>

[2] - Yashiro Y, Yamashita S, Tomita K. Crystal Structure of the Enterohemorrhagic Escherichia coli AtaT-AtaR Toxin-Antitoxin Complex. Structure. 2019 Mar 5;27(3):476-484.e3. doi: 10.1016/j.str.2018.11.005. Epub 2019 Jan 3. PMID: 30612860.

[3] - [https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation\\_reports/aj/6ajm/6ajm\\_full\\_validation.pdf](https://files.rcsb.org/pub/pdb/validation_reports/aj/6ajm/6ajm_full_validation.pdf)

### **Список использованных ресурсов**

1. PDB: <https://www.rcsb.org/>
2. MolProbity: <http://molprobity.biochem.duke.edu/>
3. WHAT\_CHECK: <https://swift.cmbi.umcn.nl/servers/html/>
4. PDB\_redo: <https://pdb-redo.eu/>