

# Практикум № 6. Валидация

Мой PDB ID 1n8z

## 1 Общий анализ структуры

Мой PDB ID 1n8z

В ходе PCA эксперимента была получена структура внеклеточного домена рецептора HER2, во взаимодействии с молекулой Herceptin Fab (моноклональное антитело). HER2 относится к семейству белков-рецепторов эпидермального фактора роста. Повышенная экспрессия этих рецепторов скоррелирована с развитием рака груди, поэтому "отключение" этих рецепторов может быть терапией при некоторых видах рака груди. Одним из способов запретить связывание рецептора HER2 с гормоном роста - добавление моноклонального антитела Herceptin Fab против HER2, и структура этого комплекса и являлась объектом исследования.

[Ссылка на оригинальную публикацию](#)

[Отчет о валидации](#)

Сначала посмотрим на разрешение модели: есть гармоника от 2.52Å до 20Å с процентом заполнения 92.88%. В принципе, все более или менее в порядке, 93 процента - терпимо. А вот R-factor (соответствие структурных факторов, посчитанных по модели, экспериментальным структурным факторам) - оставляет желать лучшего. На рабочей выборке, по которой оптимизировался R-factor было достигнуто значение 0.22, а на валидации - 0.28. В принципе разница в 6 процентов не говорит о переоптимизации, однако значения факторов больше 20% говорят о том, что соответствие не очень хорошее. Так что можно ожидать, что некоторые атомы плохо будут соответствовать электронной плотности.

Видно также, что аутлаеры на карте рамачандрана составляют 0.8%, что в случае нашей структуры соответствует  $(214 \text{ (легкая цепь антитела)} + 220 \text{ (тяжелая цепь антитела)} + 607 \text{ (рецептор)}) * 8\% = 83$  остатка.

Аутлаеров по боковой цепи 13.4% - это 139 остатков.

RSRZ outliers - это остатки, пространственный R factor (отвечает за соответствие электронной плотности модели и эксперимента) которых сильно выше, чем среднее для PDB RSR по тому же остатку. Так что видимо, достаточно много будет остатков, которые не вписываются в электронную плотность.

Также в отчете о валидации перечислены атомы, которые находятся на слишком близком расстоянии друг от друга (clashes) и их много

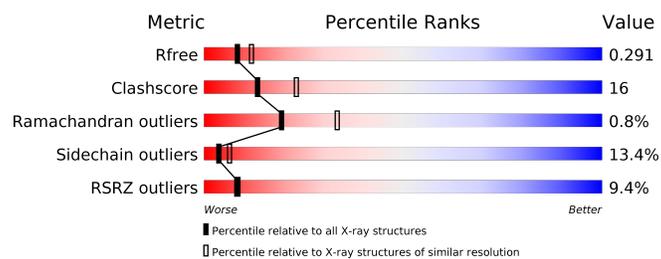


Рис. 1

Теперь посмотрим на ЭП структуры.

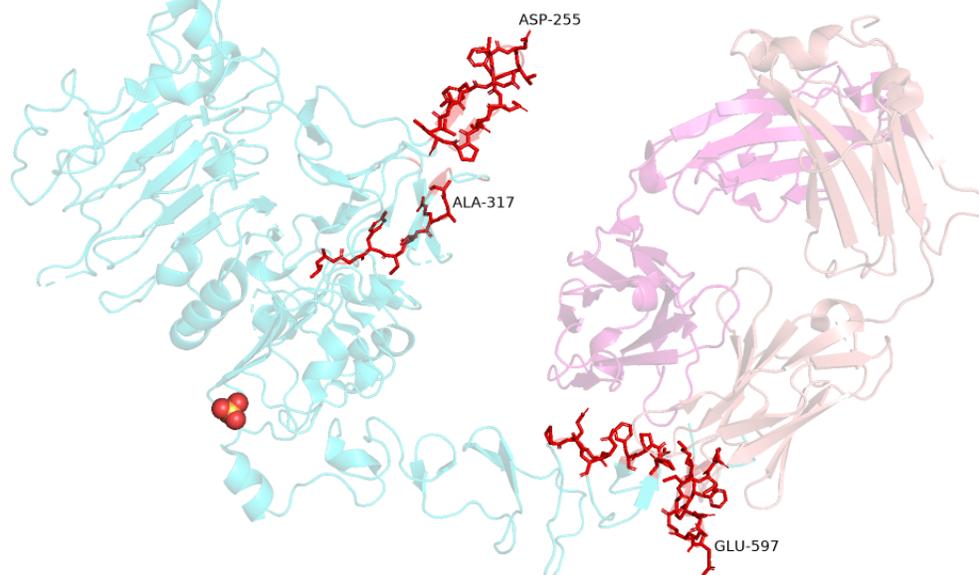


Рис. 2: Красным помечены значимые области. Синим - рецептор, темно-розовым - тяжелая цепь антитела, светло-розовым - легкая.

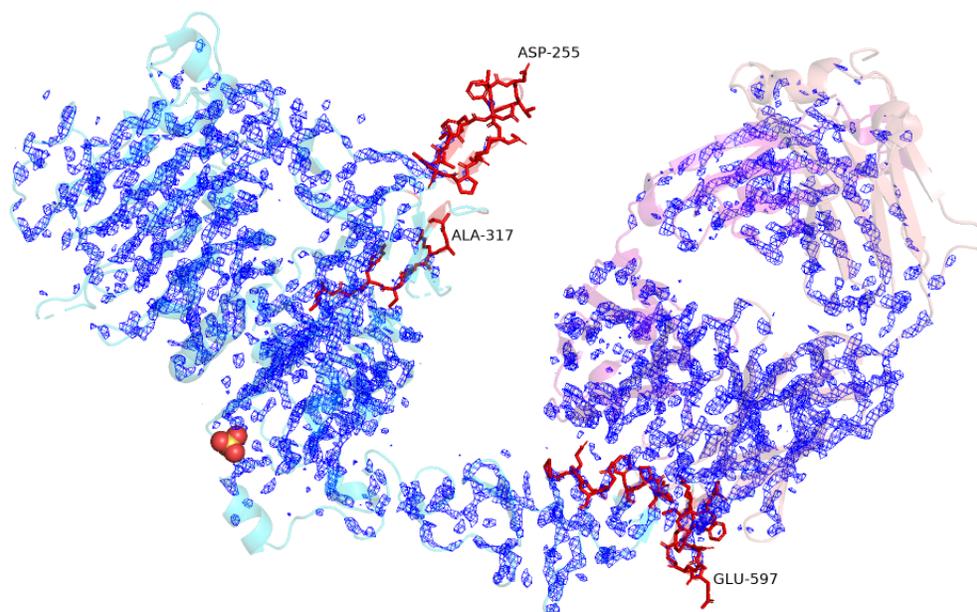


Рис. 3: Электронная плотность на уровне подрезки 3.

На карте электронной плотности видно, что в некоторых местах структуры высокой ЭП нет, при чем иногда это функционально-значимые места (покрашены красным), а иногда - края белка.

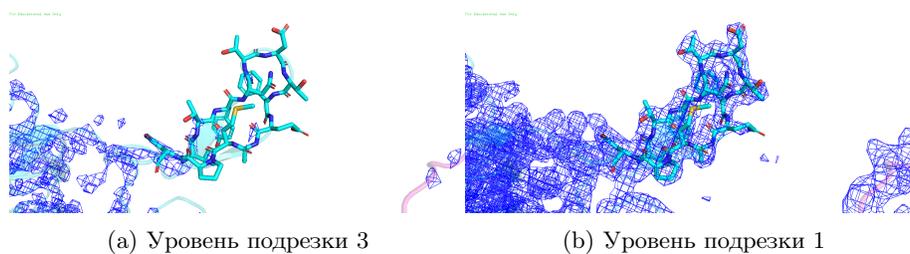


Рис. 4: "Петля димеризации остатки с 250 по 262"

Для петли (остатки с 250 по 262), которая ответственна за димеризацию рецептора мало электронной плотности. Хотя если изменить уровень подрезки на 1, то электронная плотность в этом месте в принципе есть. Так что

может это и не так страшно, в конце концов эта петля находится в растворе и можно ожидать что она будет сильно подвижна, и тогда в ее плохой электронной плотности нет ничего удивительного.

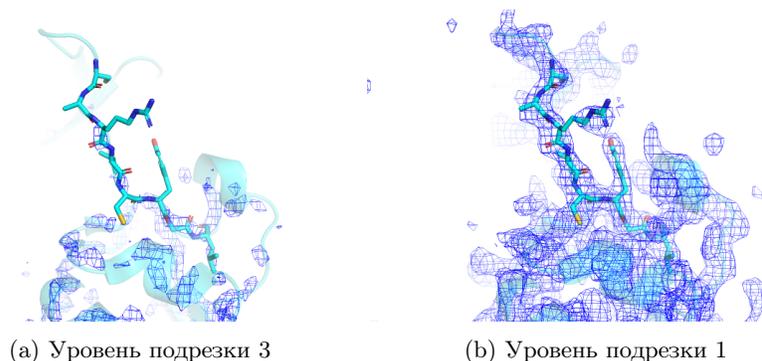


Рис. 5: "Линкер остатки с 316 по 323

Для "линкера" (остатки с 316 по 323), который соединяет между собой домены II и III (кстати, на самом деле представляет из себя тандемный повтор двухдоменной субъединицы, поэтому домен I похож на домен III, а II на IV, поэтому линкер соединяет эти две субъединицы), тоже нет, хотя появляется на более низком уровне подрезки. В целом кажется, что и в этом нет ничего страшного - ведь на самом деле этот линкер тоже подвижен, так как субъединицы движутся друг относительно друга: у рецептора есть неактивная конформация, когда сближены домены II и IV, а есть активная - когда присоединяется лиганд и сближает домены I и III, так что может ЭП нет именно из-за подвижности остатков.

В месте взаимодействия с антителом (остатки 557-561, 570-573 и 593-603) электронная плотность в принципе есть!

## 2 Маргинальные остатки

Ниже приведена таблица для некоторых маргинальных остатков.

Name	Number	Why marginal	Comment
ASN	253	Flip	
SER	167	Ramachandran and rotamer	OUTLIER (0%) General / 156.0,-7.4 chi angles: 257.6
GLN	53	Bond angles	OUTLIER(S) worst is C-CA-CB: 4.1 $\sigma$
ARG	181	CaBLAM and cis peptides	CA Geom Outlier (0.099%); Twisted nonPRO omega= -147.04
PHE	257	C $\beta$ deviation	0.29Å
LEU	492	Rotamers	OUTLIER (0%) chi angles: 264.8,348.8
CYS	498	Clash	1.10Å O with C 457 THR HG22
GLY-GLY-SER	200-202	RSRZ	2.4-3.8-5.5

Итак, вот несколько из них визуализированы. Также для некоторых сразу даны исправления PDBRedo. Я сколько не разглядывала маргиналов по ротамерам и углам и длинам связей - их все-таки тяжело увидеть и удивиться. Так что покажу несколько совсем очевидных.

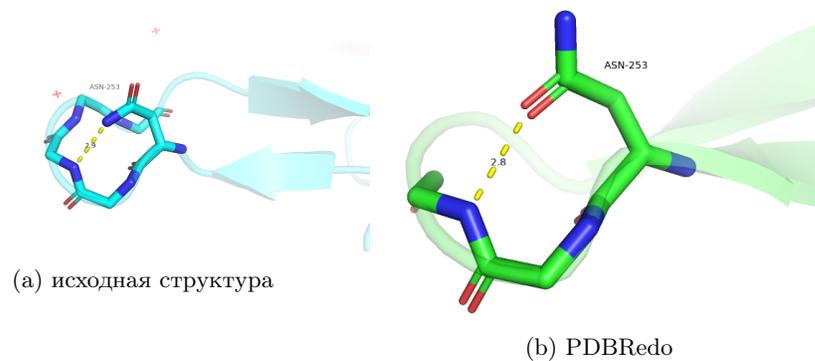


Рис. 6: ASN-253 как пример маргинала по Flip

Видно, что N-атом аспарагина находится слишком близко к атому остова. Более того, в этом месте есть электронная плотность, и если перевернуть остаток, то в этом месте можно предполагать водородную связь, в то время как существование там азота - сомнительно! PDBRedo ровно так и исправляет этот маргинал.

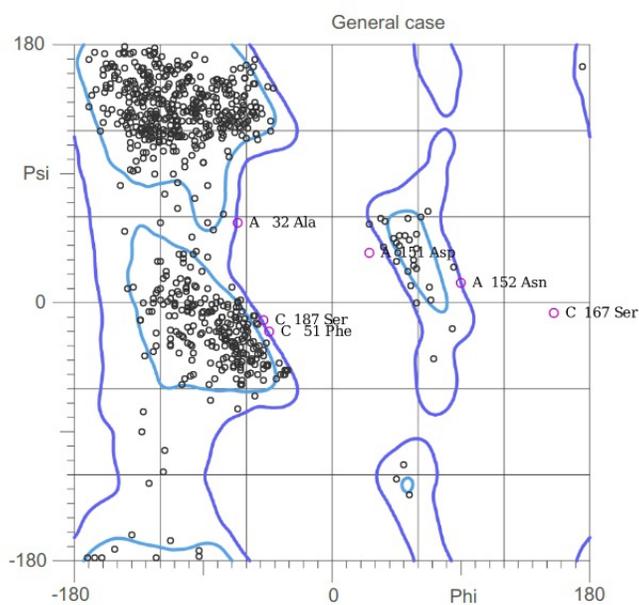


Рис. 7: Карта Рамачандрана для структуры

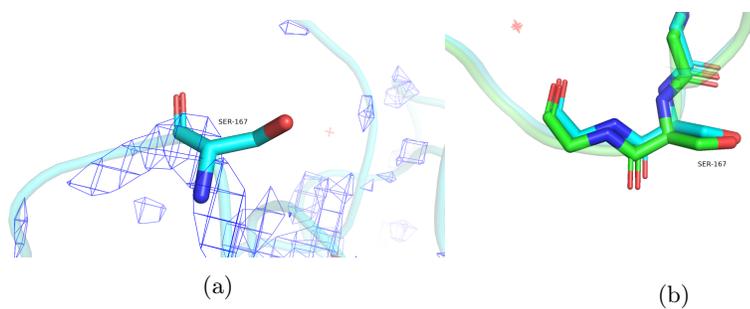


Рис. 8: Маргинал в карте Рамачандрана - Серин 167

Вот, кстати карта рамачандрана, и остаток Ser-167, который очень сильно выбивается. Заметно, что углы действительно совсем уж странные. И совсем непонятно, почему авторы вписали атомы в электронную плотность именно так. Исправить этот остаток PDBRedo не смог.

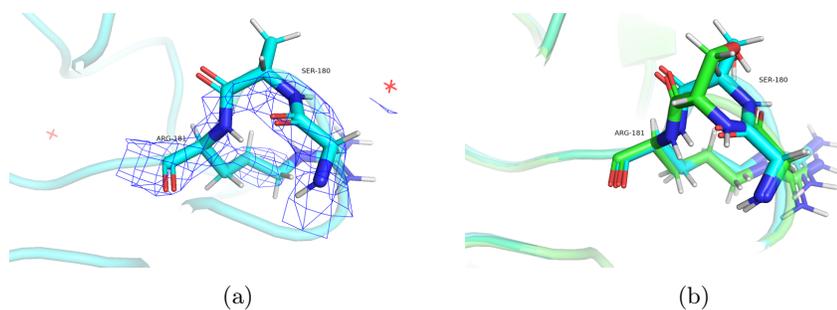


Рис. 9: Цис-пептид на примере ARG-181

Тут MolProbity говорит, что есть цис-пептид. Я очень долго пыталась найти в чем заключается маргинальность пока не посмотрела на выдачу PDB Redo. Маргинальность заключается в том, что слишком близко расположены атомы остова: азот аргинина и азот серина. Зеленым показана исправленная структура, видно, что серин вывернут так, чтобы рядом располагались азот и кислород.

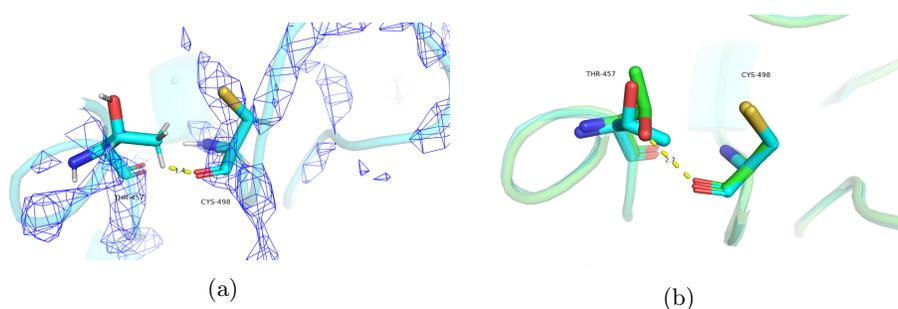


Рис. 10: Слишком близко расположенные атомы. Треонин 457 и Серин 498

Тут видно, что C=O атом слишком близко находится к метильной группе. При этом электронная плотность в этом месте не позволяет подтвердить такого положения треонина. PDBRedo хитро исправил это столкновение - треонин развернут и повернуть кислородом к азоту серина, так что можно даже предположить водородную связь.

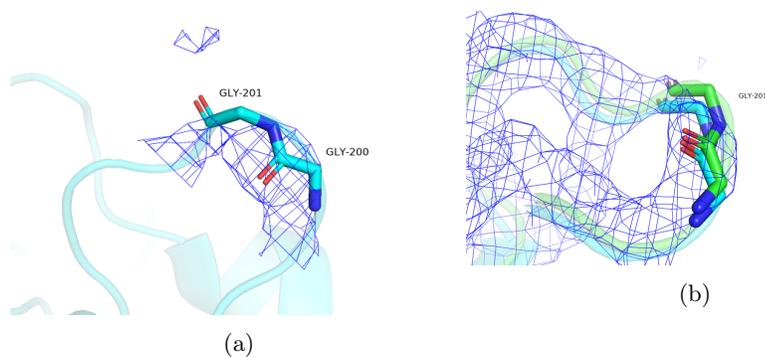


Рис. 11: Остатки с низким RSRZ - Gly 201 и 200

Тут два подряд идущих остатка с плохим соответствием модельной и экспериментальной ЭП. Это отлично заметно на рисунке - атомы совсем сильно выступают за границы ЭП. Петля явно должна быть приближена к белку. Интересно, что PDBRedo не смог исправить этого маргинала - остатки также плохо вписаны в плотность.



### 3 Можно ли изучать структуру?

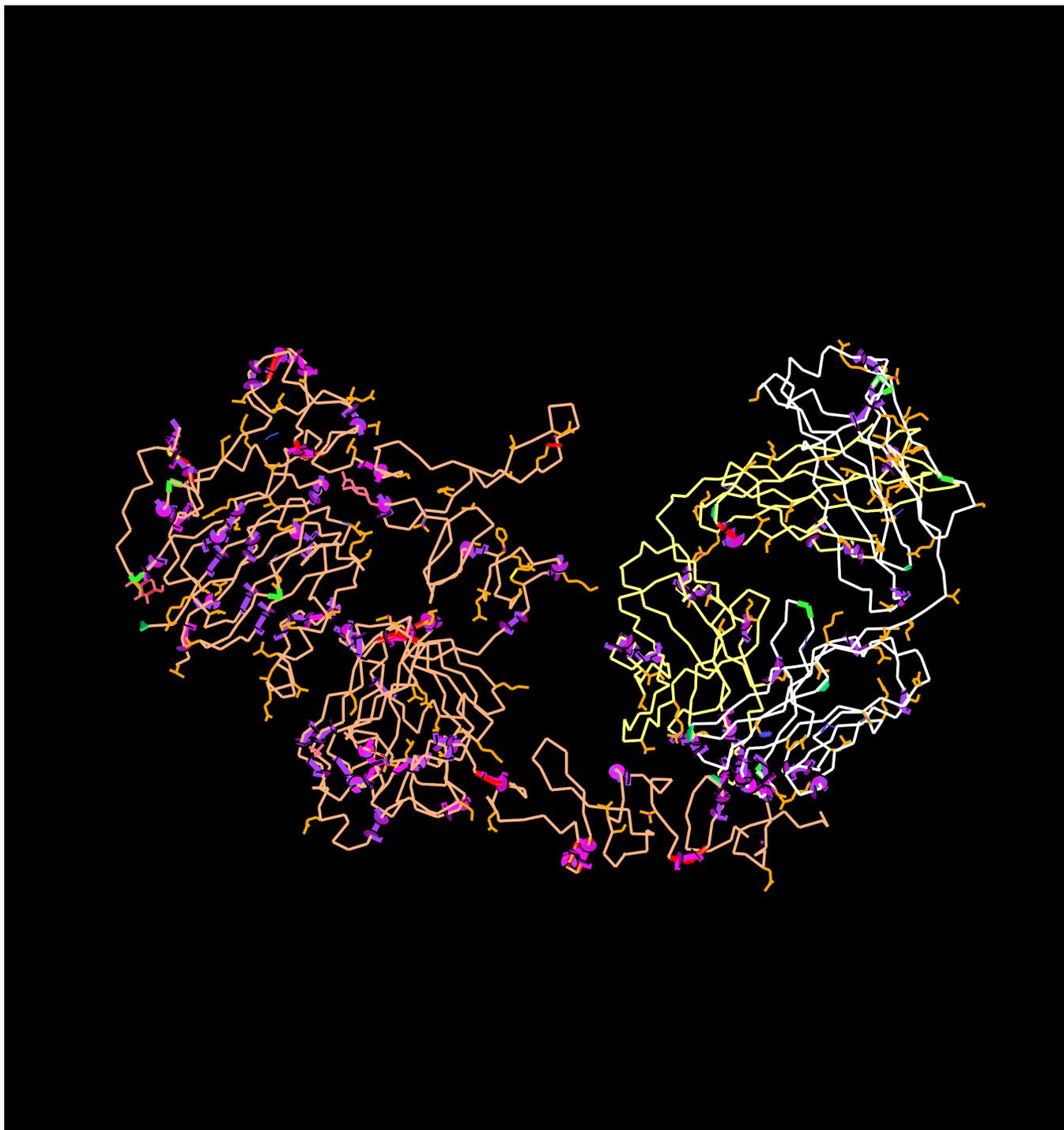


Рис. 12: Визуализация выдачи MolProbity. Оранжевым показан белок рецептора. Видно, что в месте контакта с антителом много маргиналов. Место линкера тоже содержит несколько маргинальных остатков.

Итого, маргинальных остатков много, и заметно, даже в значимых областях, даже там где есть взаимодействие с антителом есть маргиналы. По выдаче Molprobity есть три аутлаера в области контакта с антителом, 1 аутлаер в месте линкера и 5 аутлаеров в петле, отвечающей за димеризацию. Тем не менее, надо отметить, что в опубликованной статье авторы не делают детальных выводов ни про конкретные остатки, ни про конкретные взаимодействия. Их выводы скорее связаны со взаимным расположением доменов и экспонированностью определенных участков. Такие выводы делать, безусловно, можно, имея такую структуру. Детально анализировать взаимодействия конкретных остатков с лигандами или изучать поверхности взаимодействия, наверное, не стоит.

## 4 PDB Redo

В задании 2 я уже немного сравнила результаты PDBRedo с исходным файлом, тут я приведу еще пару примеров, связанных со вписанностью в ЭП.

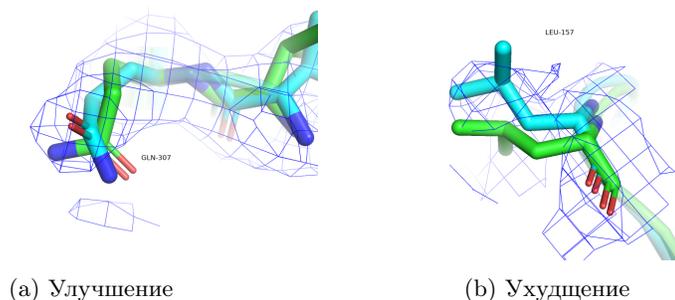


Рис. 13: Изменение вписанности в ЭП. Уровень электронной плотности тут 0.7!

Видно, что в случае лейцина его вписанность действительно ухудшилась. В случае глутамина все не так однозначно, я бы даже на первый взгляд и не сказала, что что-то радикально изменилось. Тем более что эти изменения на самом деле в краевых структурах белка, ЭП там вообще плохо разрешена. Так что я не сказала бы, что эти улучшения или ухудшения так уж важны.

С чем PDBRedo действительно хорошо справляется, так это с Clashes и flips. Также, судя по выдаче MolProditу для улучшенной структуры, PDBRedo хорошо подправляет геометрию - длины и углы связей, изменяет ротмеры. У нас это тоже заметно на том, что он изменил Аргинин.

Насколько я могу судить по своей структуре, если ЭП низкого качества, то PDBRedo вряд ли сильно улучшит вписанность атомов в ЭП.

Итого, кажется, что для изучения взаимодействий (определения конкретных связей и структур карманов и контактов с лигандом) все-таки

нужна структура более высокого разрешения - PDBRedo хоть и улучшает структуру, однако качественно, как мне кажется, сильно не меняет. Однако структура такого разрешения - все же гораздо лучше, чем ничего: на ней можно изучать доменную структуру, восстанавливать вторичную структуру, смотреть на подвижные части молекулы.