

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М. В. ЛОМОНОСОВА**

ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

Отчёт по качеству расшифровки структуры мутантной енолазы
S39N/D321A ENO1 из *Saccharomyces cerevisiae*

**Выполнила студентка 4-го курса
Широковских Татьяна Сергеевна**

**Москва
2017 г.**

АННОТАЦИЯ

Отчет представляет собой анализ качества расшифровки структуры 2хh2 мутантной енолазы S39N/D321A ENO1 из *Saccharomyces cerevisiae* из статьи «Engineering the Enolase Magnesium II Binding Site: Implications for Its Evolution» [1].

ВВЕДЕНИЕ

Енолаза – димерный фермент, который катализирует предпоследнюю стадию гликолиза, превращение 2-фосфоглицерата в фосфоенолпируват. Она содержит два иона магния, хотя другим членам суперсемейства для катализа достаточно одного иона магния. Предполагают, что второй ион нужен для стабилизации заряда интермедиата. (Рис. 1)

В статье, которая описывает структуру, рассматриваемую в данном отчете, описан эксперимент, в котором пытались выяснить функцию второго иона. Для этого были сконструированы различные мутантные белки: с заменой аминокислотных остатков в центре связывания магния на положительно заряженные, что предотвращало как связывание иона, так и катализ, а также контрольные белки без положительно заряженных аминокислот, которые сохраняли активность енолазы без второго иона магния. Мутант S39N/D321A (произведена замена серина на аспарагин и аспартата на аланин) относится к контрольным енолазам.

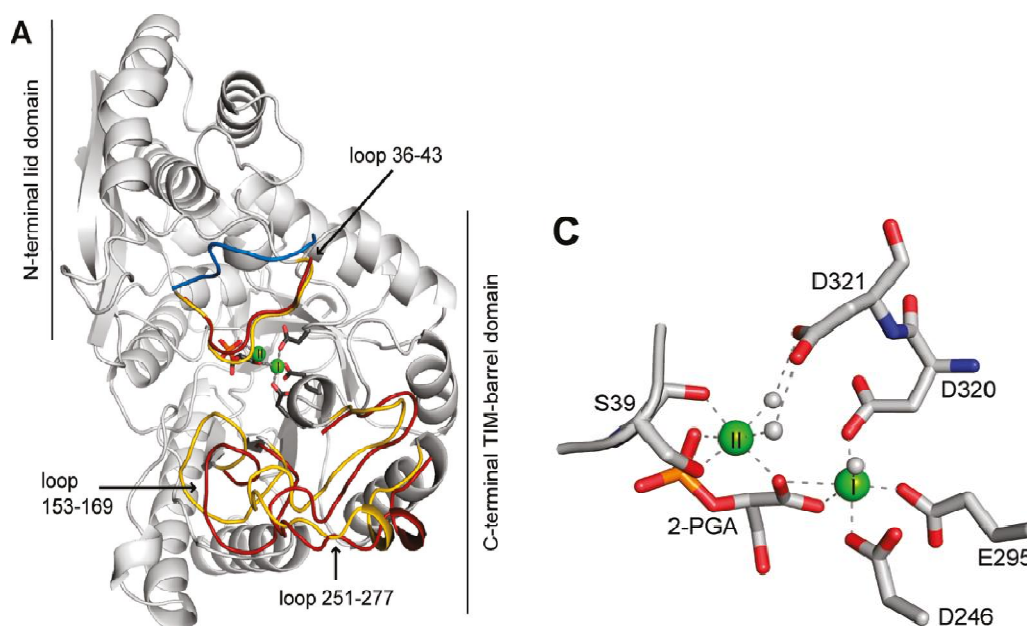


Рис. 1 [1]

Структура мономера енолазы дикого типа (1one), отдельно показаны аминокислотные остатки, координирующие ионы магния.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

1. Общая информация о модели

Структура мутантной енолазы 2xh2 была расшифрована в 2010 году, расшифровку описывает статья «Engineering the enolase magnesium II binding site: implications for its evolution» авторов Schreier B., Höcker B. [1].

Метод решения фазовой проблемы – метод молекулярного замещения с использованием структуры енолазы дикого типа 1one.

В состав кристалла помимо фермента (4 цепи) содержатся ионы магния (по одному на цепь), молекулы 2-фосфоглицерата (по одной на цепь) и вода (по 624-691 молекул на цепь). (Рис. 2)

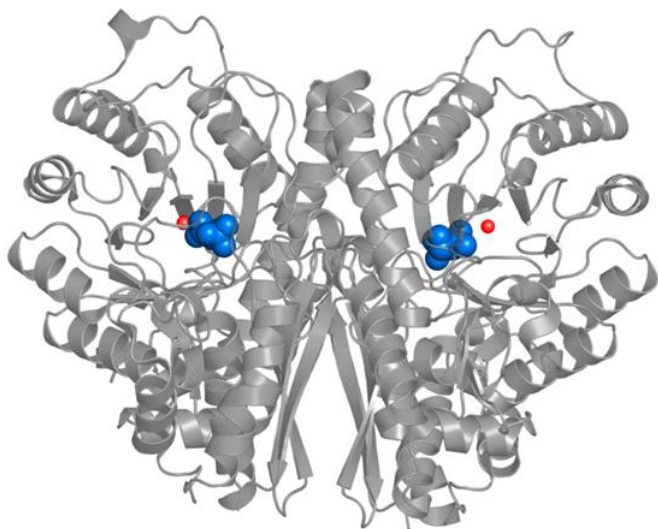


Рис. 2

Димер енолазы 2xh2, красным показаны ионы магния, синим – молекулы 2-фосфоглицерата.

Всего измерен 162601 рефлекс.

Разрешение структуры 1.80 Å, диапазон разрешений структурных факторов 35.65 – 1.80 Å. Полнота набора структурных факторов в этом диапазоне 93,5%. [2]

Кристаллографические характеристики структуры 2xh2, которые содержатся в PDB файле:

CRYST1 64.720 82.540 95.610 89.41 71.31 84.80 P 1 4

Первые три числа обозначают длины направляющих векторов кристалла в ангстремах, следующие три числа – углы между ними. Кристалл принадлежит к группе симметрии P 1. В ячейке находится четыре молекулы, то есть две нативные структуры.

2. Значения индикаторов качества модели в целом

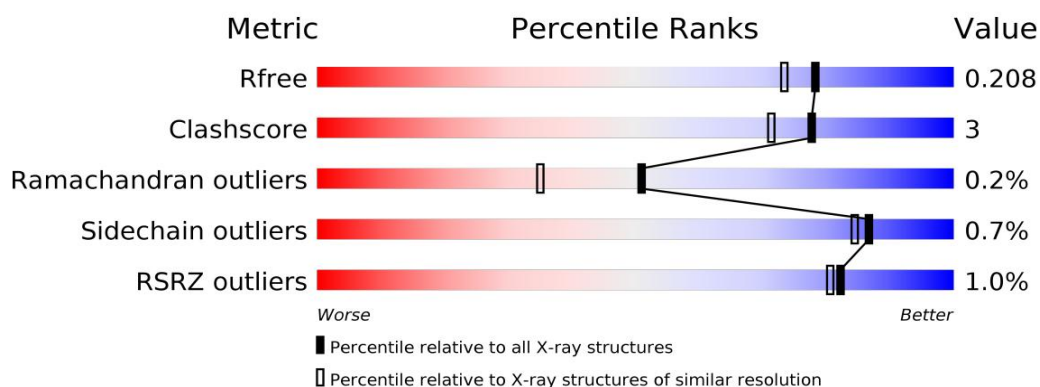


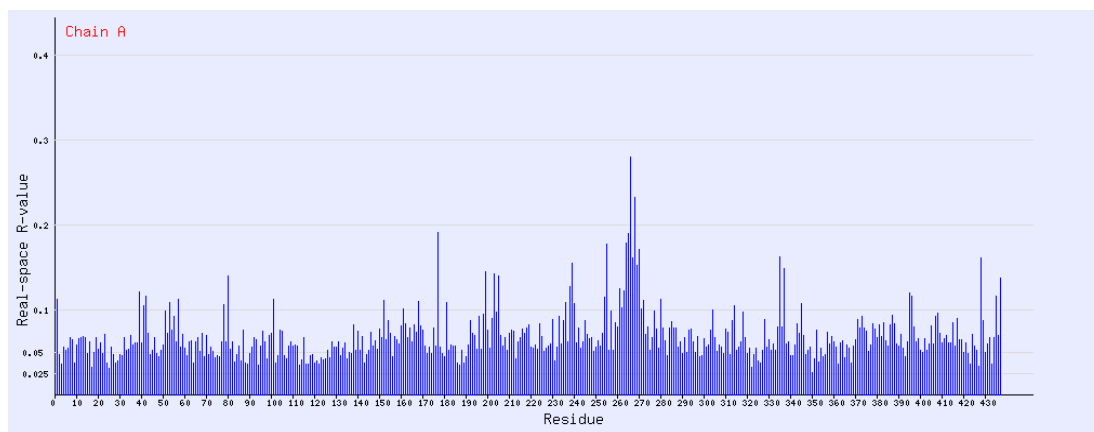
Рис. 3 [2]

Значения различных индикаторов качества модели.

На рис.3 показаны значения индикаторов модели относительно всех РСА структур и всех структур с таким же разрешением. Видно, что все значения, кроме количества выбросов на карте Рамачандрана, хорошие.

R-фактор характеризует соответствие кристаллографической модели экспериментальным данным. Для структуры 2xh2 он равен 16,6%. R-free более точно показывает качество модели и позволяет избежать переоптимизацию, поскольку он рассчитывается по контрольным рефлексам, не участвующим в построении модели. R-free равен 20,9. Так как $R\text{-free} < 25\%$ и $R\text{-free} - R < 10\%$, можно заключить, что у модели высокое качество и она не переобучена.

Пространственный R-фактор (RSR) позволяет найти маргинальные остатки по соответствию боковой цепи экспериментальной электронной плотности (рис. 4). Особенно выбивается остаток ASN266 на всех цепях, а также PRO265 цепей В и D, ASP268 цепи С.



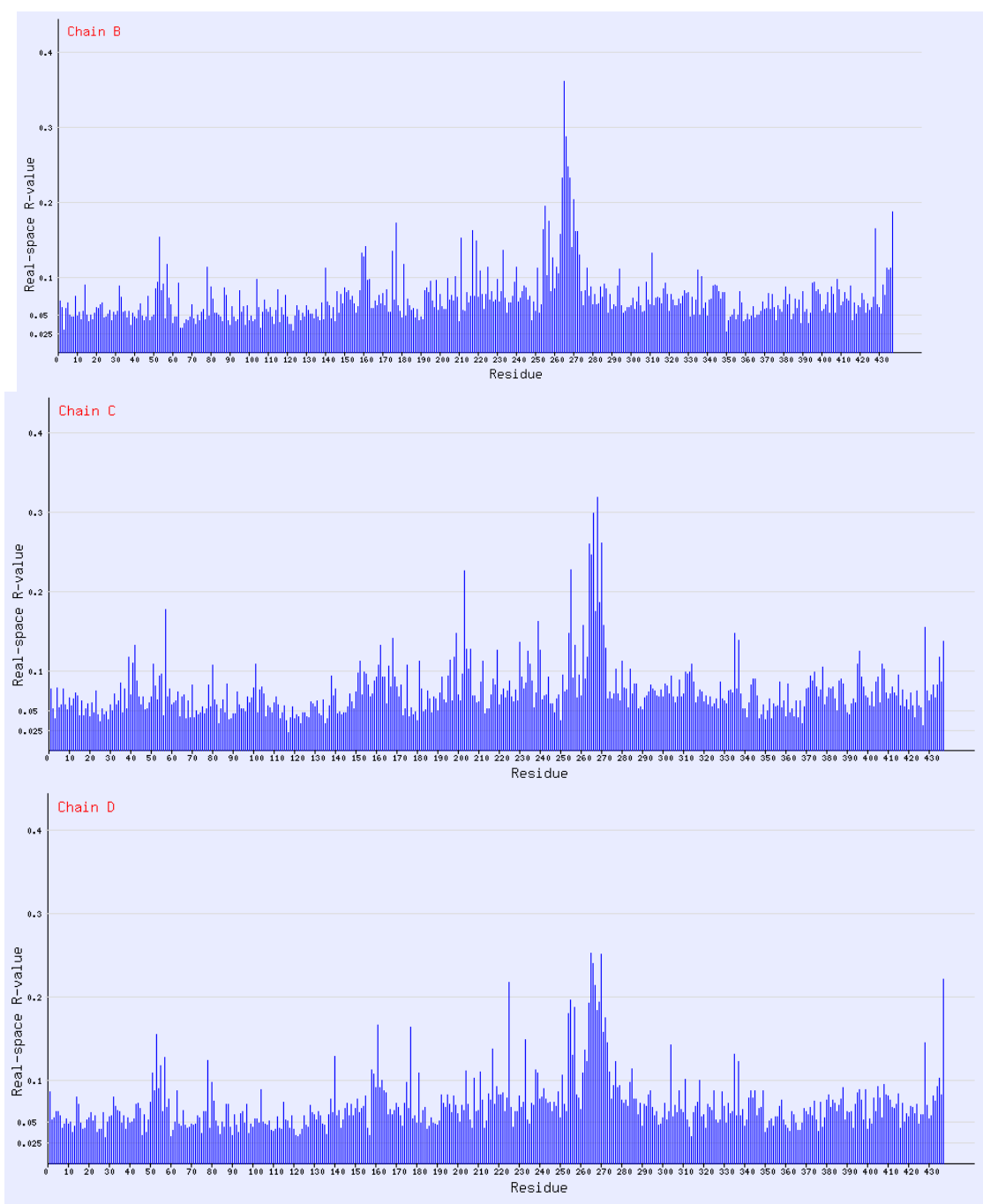


Рис. 4
RSR аминокислотных остатков, полученные с помощью сервиса EDS [4].

Относительная оценка RSRZ показывает RSR остатка в равнении с RSR аналогичных остатков. На графиках (рис. 5) наглядно видна маргинальность ASN266 и его соседей, кроме того видны некоторые единичные маргиналы: LEU437 (B, D), LEU225 (D), SER204(C). Но общее значение RSRZ для структуры хорошее.

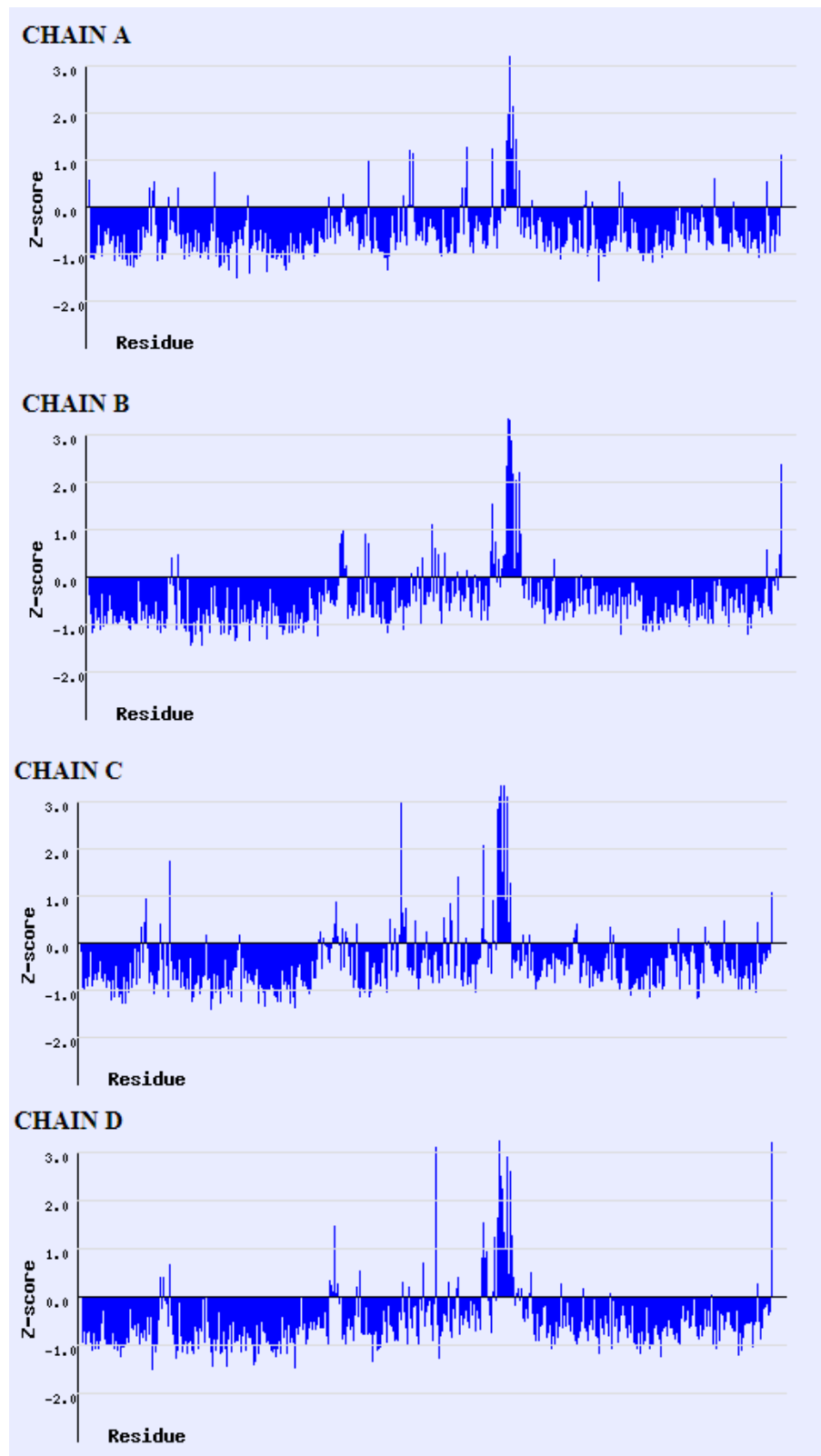
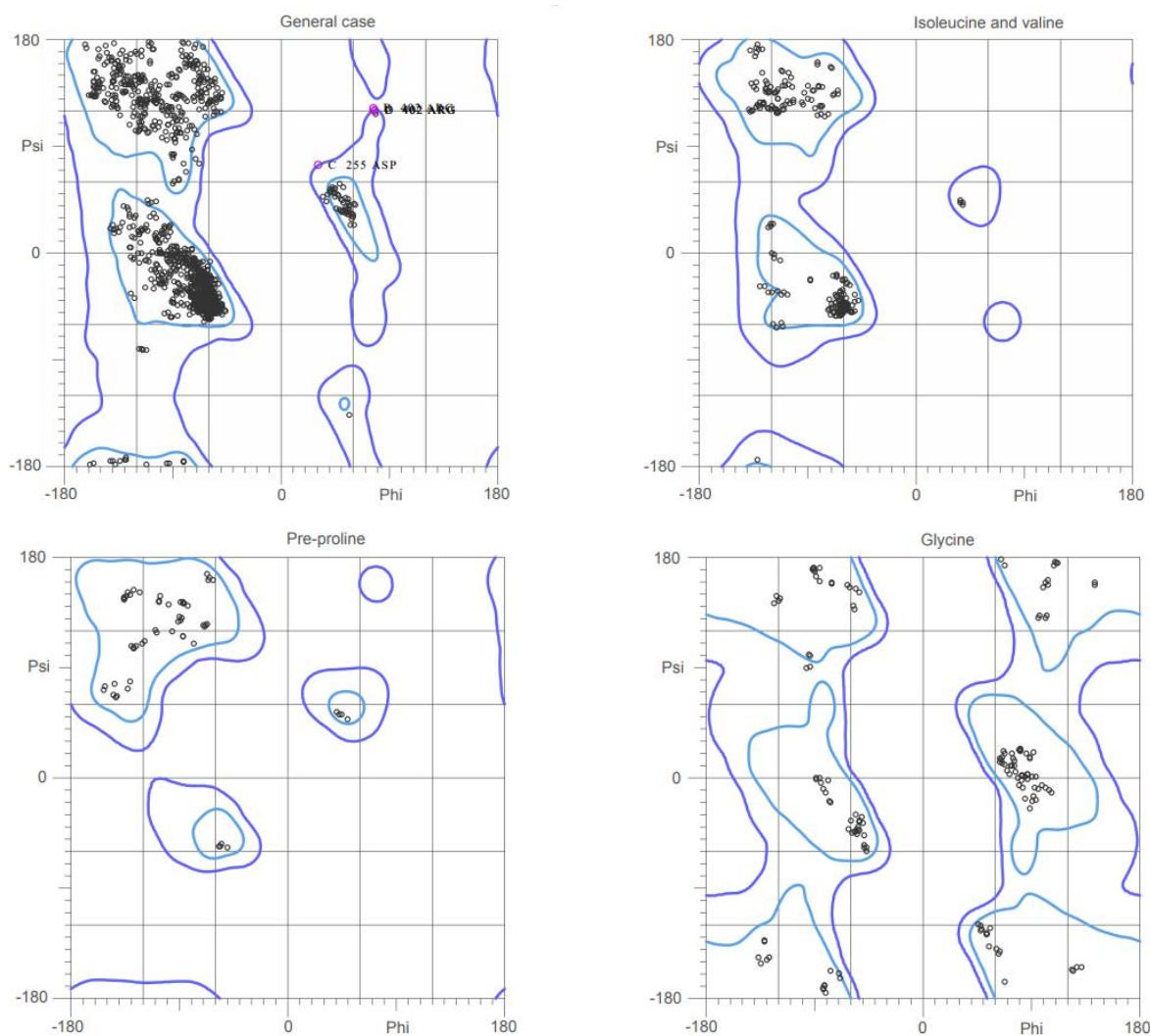


Рис. 5
RSRZ аминокислотных остатков, полученные с помощью сервиса EDS [4].

All-Atom Contacts	Clashscore, all atoms:	1.83	100 th percentile* (N=837, 1.80Å ± 0.25Å)
	Clashscore is the number of serious steric overlaps (> 0.4 Å) per 1000 atoms.		
Protein Geometry	Poor rotamers	16	1.15% Goal: <0.3%
	Favored rotamers	1343	96.55% Goal: >98%
	Ramachandran outliers	4	0.23% Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	1709	98.22% Goal: >98%
	MolProbity score [^]	0.99	100 th percentile* (N=11444, 1.80Å ± 0.25Å)
	Cβ deviations >0.25Å	0	0.00% Goal: 0
	Bad bonds:	0 / 13589	0.00% Goal: 0%
Bad angles:	0 / 18481	0.00% Goal: <0.1%	
Peptide Omegas	Cis Prolines:	4 / 59	6.78% Expected: ≤1 per chain, or ≤5%

Рис. 6
Результат выдачи сервиса MolProbity [5]

Результаты выдачи сервиса MolProbity (рис. 6) показывают хорошие показатели различных оценок, в том числе, очень низкий Clashscore, который вычисляется из количества пар атомов, расположенных необычно близко друг к другу. Наименее хорошие показатели – количество выбросов на карте Рамачандрана и неправильных ротамеров.



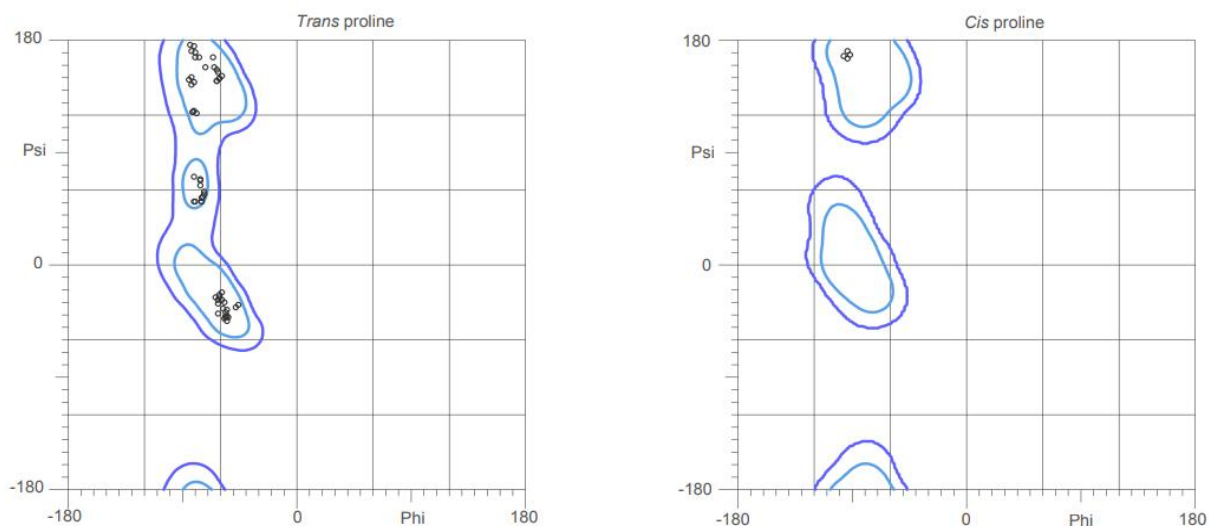


Рис. 7

Карты Рамачандрана, полученные с помощью сервиса MolProbity для обычных аминокислотных остатков, для изолейцинов и валинов, для остатков, лежащих перед пролином, для глицинов, для пролинов в транс- и цис-конформациях. Разрешенные области обведены синим цветом, благоприятные – голубым.

По этим картам видно, что 98,1% (1753/1787) всех остатков находятся в благоприятных областях, 0,2% (4/1787) находятся в недопустимых. Это остатки ARG402 цепей B, C и D и ASP255 цепи C.

Если строить карту Рамачандрана с помощью сервиса EDS [3], получается примерно 1,5% маргинальных остатков: ASP320, VAL324, ARG402 на всех четырех цепях, SER142 (цепи A, D), THR397 (A, C), HIS432 (A, C), ASP255 (C, D), MET57 (B), ASN217 (B), ASP302 (C), LYS269 (D).

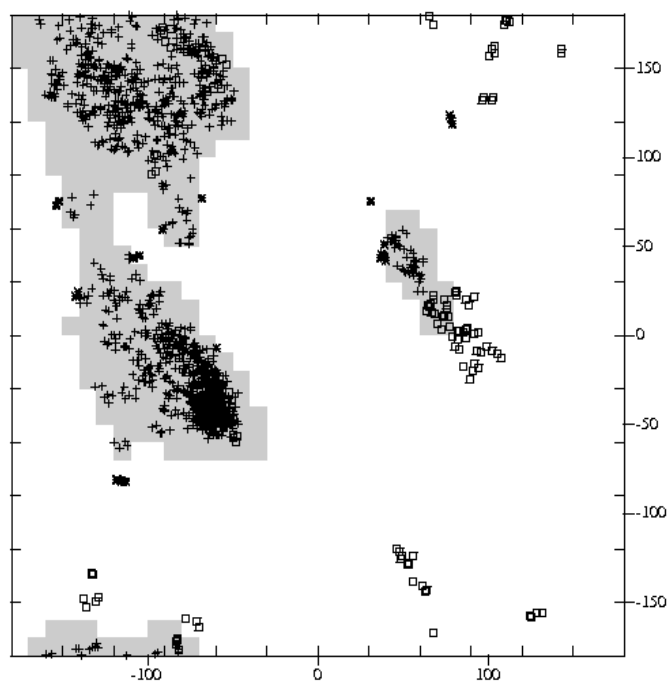


Рис. 8
Карта Рамачандрана, полученная с помощью сервиса EDS.

3. Маргинальные остатки

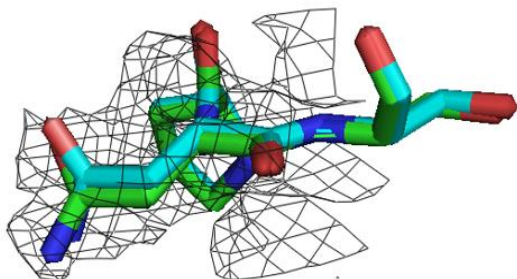
Таблица 1. Примеры маргинальных остатков

№	Аминокислотный остаток	Цепь	Показатель маргинальности
1	ASN266	все	RSRZ
2	ASP320	все	карта Рамачандрана
3	VAL324	все	карта Рамачандрана
4	ARG402	все	карта Рамачандрана
5	PRO265	B, D	RSRZ
6	LEU437	B, D	RSRZ
7	SER142	A, D	карта Рамачандрана
8	THR397	A, C	карта Рамачандрана
9	HIS432	A, C	карта Рамачандрана
10	ASP255	C, D	карта Рамачандрана

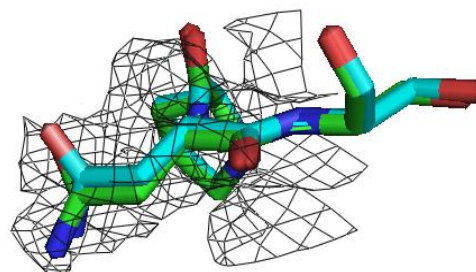
ASN266

Показатель маргинальности – слишком высокие RSRZ, равные 3.2, 3.3, 3.5, 2.5 для цепей А, В, С и D.

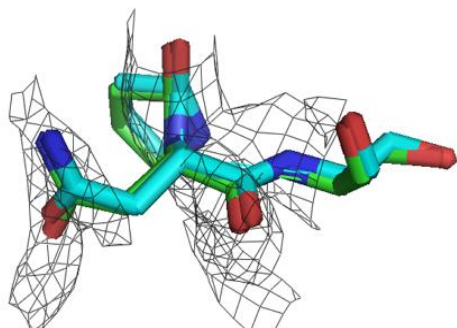
А



В



С



Д

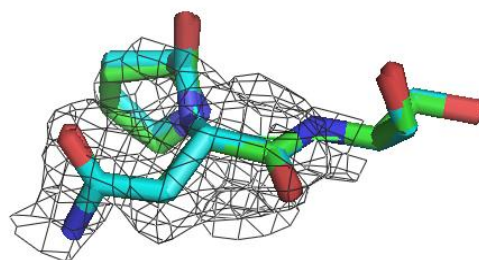


Рис. 9

Остаток ASN266 с соседними остатками и его электронная плотность (цепи А, В, С, D); зеленым показана структура из PDB, а голубым – из PDB_redo.

На рис. 9 видно, что на цепях А и В остаток действительно не очень хорошо вписывается в электронную плотность, тот же остаток из PDB_redo вписывается в нее еще хуже. На цепи С электронная плотность не соответствует остатку – это явно ошибка расшифровки. У остатка на цепи D вписывание лучше всего, и структуры из PDB и PDB_redo совпадают. Я думаю, что причина маргинальности этого остатка – ошибки при расшифровке, вероятно из-за того, что этот остаток находится в петле на поверхности белка и может обладать повышенной подвижностью (рис. 10).

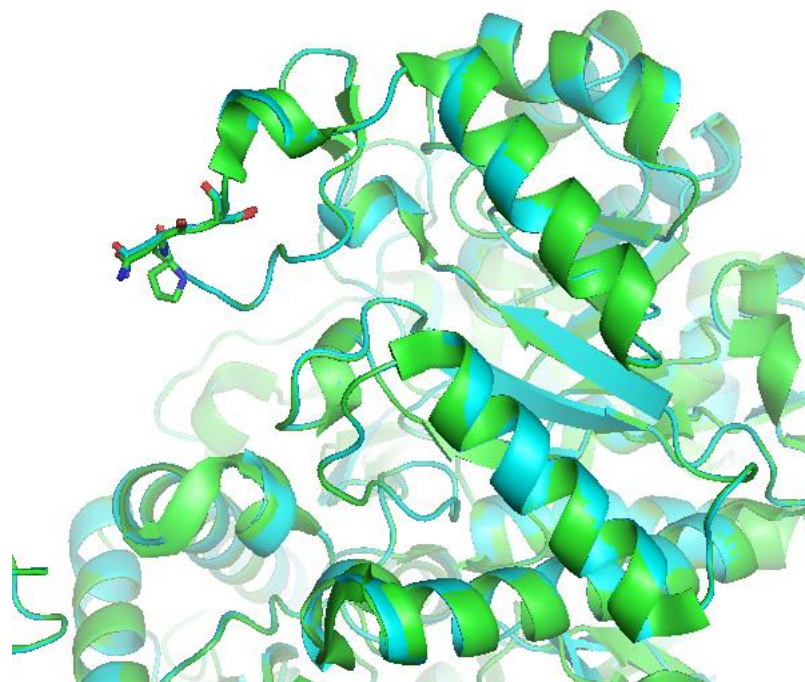


Рис. 10
 Расположение остатка ASN266 (цепь A) в белке; зеленым показана структура из PDB, а голубым – из PDB_redo.

ASP320

Показатель маргинальности – неправильные углы ϕ и ψ : -115.4 и -82.1, -112.7 и -82.3, -116.2 и -81.6, -118.0 и -81.3 для цепей A, B, C, D.

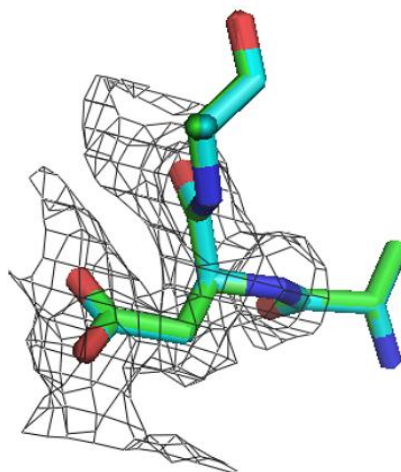


Рис. 11
 Остаток ASP320 (цепь A) с соседними остатками и его электронная плотность; зеленым показана структура из PDB, а голубым – из PDB_redo.

Структуры остатка из PDB и PDB_redo полностью совпадают и

хорошо вписываются в электронную плотность. Маргинальность этого остатка функциональна – он находится в активном центре и координирует ион магния (рис. 12).

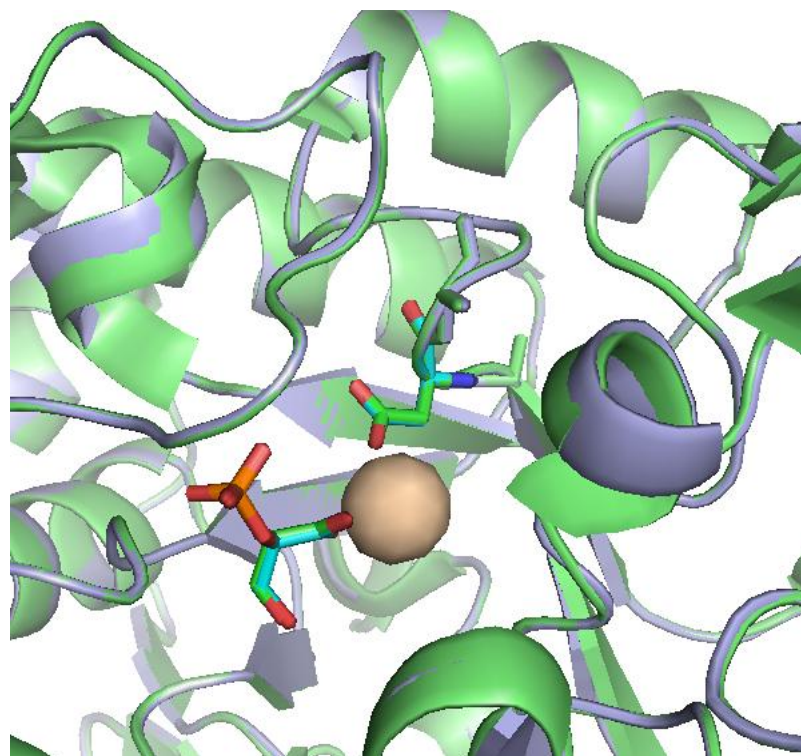


Рис. 11

Положение остатка ASP320 (цепь А) в белке, показаны ион магния и молекула 2-фосфоглицерата; зеленым показана структура из PDB, а голубым – из PDB_redo.

VAL324

Показатель маргинальности – неправильные углы ϕ и ψ : 37.4 и 45.3, 39.3 и 43.7, 37.0 и 43.3, 40.0 и 41.8 для цепей А, В, С, D.

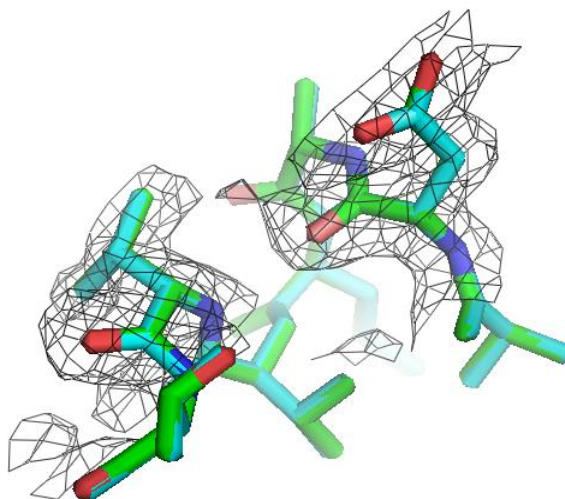


Рис. 12

Остаток VAL324 (цепь А), близко к нему расположенный ASP320 и их электронная плотность; зеленым показана структура из PDB, а голубым – из PDB_redo.

Структуры остатка из PDB и PDB_redo полностью совпадают и хорошо вписываются в электронную плотность. Причина маргинальности этого остатка, по-видимому, близкое расположение к ASP320.

ARG402

Показатель маргинальности – неправильные углы ϕ и ψ : 79.0 и 118.5, 77.7 и 123.5, 78.7 и 121.7, 78.2 и 121.7 для цепей А, В, С, D.

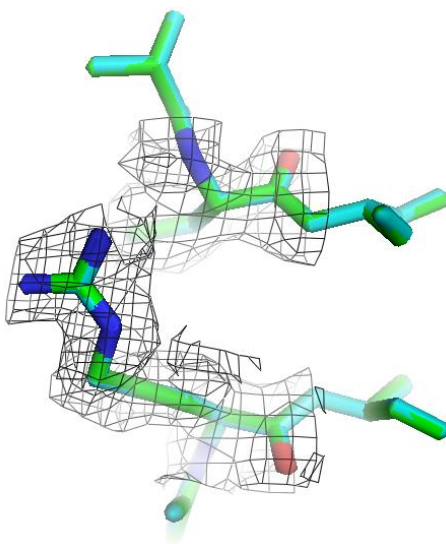


Рис. 12

Остатки ARG402 (цепи А и В) и их электронная плотность; зеленым показана структура из PDB, а голубым – из PDB_redo.

Структуры остатка из PDB и PDB_redo полностью совпадают и хорошо вписываются в электронную плотность. Причина маргинальности этого остатка – расположение в месте контакта субъединиц.

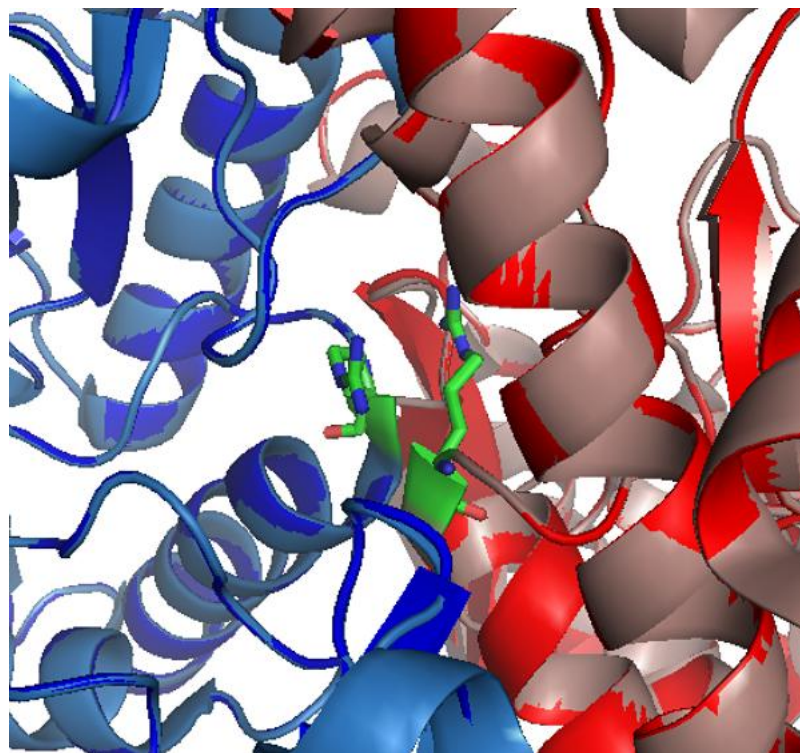


Рис. 13
Расположение остатков ARG402 в месте контакта цепей А и В.

SER142

Показатель маргинальности – неправильные углы ϕ и ψ : -153.6 и 72.8, -152.1 и 75.2 для цепей А, D.

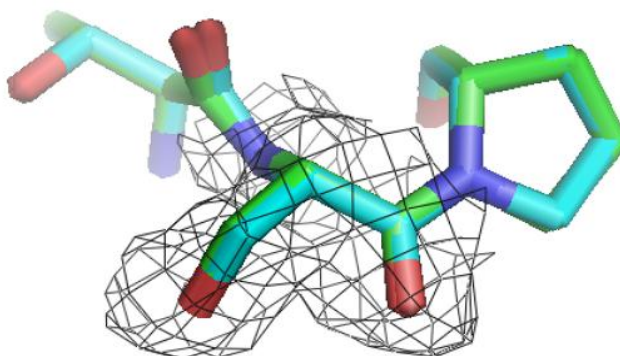


Рис. 13
Остаток SER142 (цепь А) с соседними остатками и его электронная плотность; зеленым показана структура из PDB, а голубым – из PDB_redo.

Структуры остатка из PDB и PDB_redo полностью совпадают и хорошо вписываются в электронную плотность, несмотря на то, что этот остаток расположен на петле на поверхности белка. Возможно, этот остаток действительно имеет такую структуру.

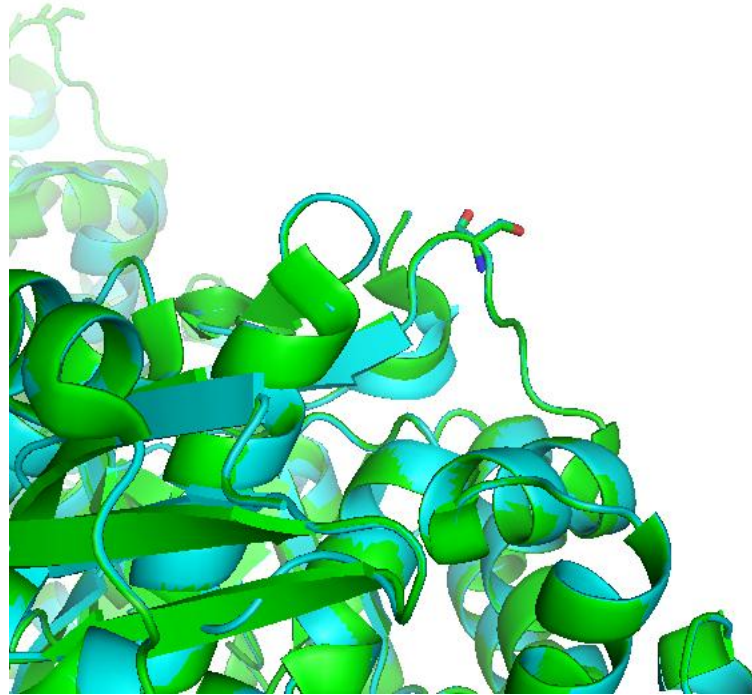


Рис. 14
Расположение остатка SER142 (цепь A) в белке; зеленым показана структура из PDB, а голубым – из PDB_redo.

4. Сравнение модели из PDB с моделью PDB_redo

Модель из PDB_redo представляет собой оптимизированную PDB модель. В целом, структуры совпадают (рис. 15).

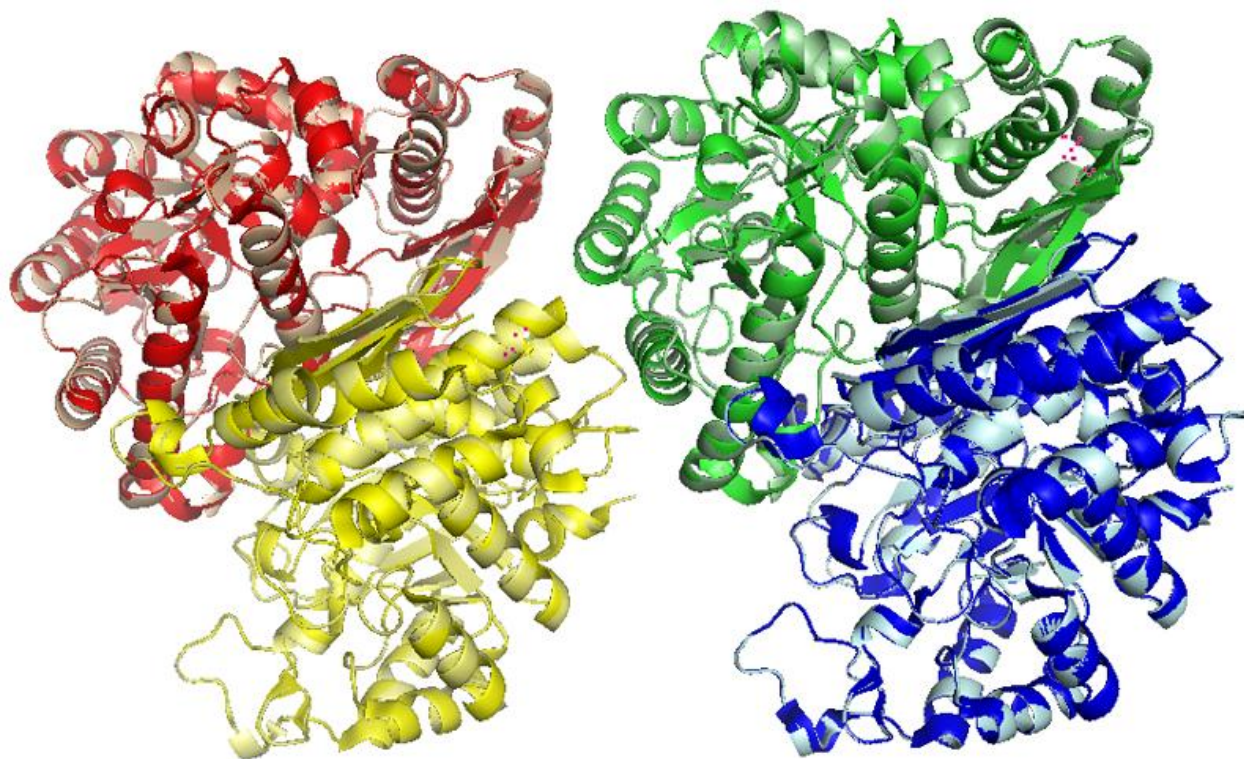


Рис. 15

Сравнение моделей из PDB и PDB_redo: структуры раскрашены по цепям, модель из PDB ярче, из PDB_redo – бледнее.

PDB_redo улучшает параметры R (с 16,3% до 14,7%) и R-free (с 20,1% до 18,8%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Качество расшифровки структуры 2xh2 мутантной енолазы S39N/D321A ENO1 из *Saccharomyces cerevisiae* высокое. Индикаторы качества, в основном, выше среднего. В структуре довольно много маргинальных остатков, но рассмотренные остатки скорее являются функциональными особенностями структуры, а не ошибками расшифровки. Искусственно введенные мутации не привели к возникновению дополнительных маргинальных остатков.

ИСТОЧНИКИ

1. Schreier B., Höcker B. (2010) Engineering the Enolase Magnesium II Binding Site: Implications for Its Evolution. *Biochemistry*. 49(35):7582-9
2. http://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry-files/2xh2_full_validation.pdf
3. <http://eds.bmc.uu.se>
4. <http://molprobity.biochem.duke.edu>