

**Отчёт по качеству РСА расшифровки структуры белка изоцитратдгидрогеназы
(PDBID – 1T0L)**

Автор: Воробьева Маргарита

Аннотация

В данной работе было проанализировано качество PCA расшифровки белка изоцитратдегидрогеназы, который катализирует одну из реакций цикла трикарбоновых кислот. Был проведен анализ качества модели в целом, а также были исследованы частные случаи ошибок на уровне отдельных аминокислотных остатков. Кроме того, было проведено сравнение структуры со структурой из PDBredo. В заключение были сделаны выводы о качестве рассматриваемой структуры.

Введение

Изоцитратдегидрогеназа (ИДГ) катализирует одну из реакций цикла Кребса, а именно, окислительное декарбоксилирование изоцитрата до α -кетоглутарата через промежуточный продукт оксалосукцинат (Рис. 1).

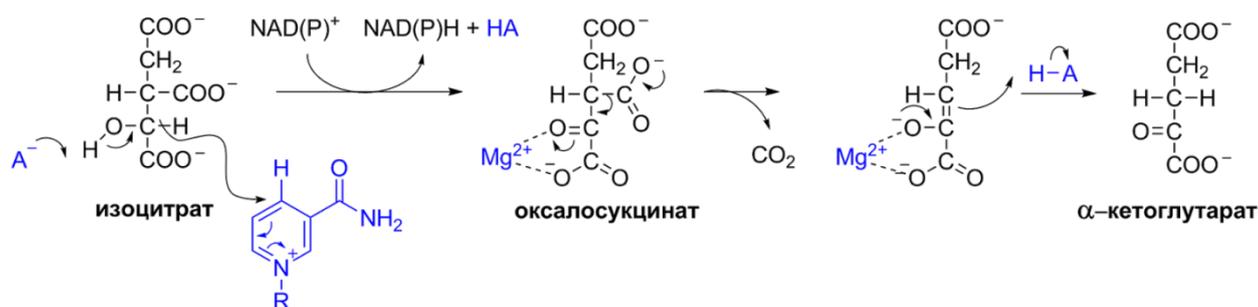


Рисунок 1. Общая схема реакции окислительного декарбоксилирования [3].

Эукариотические клетки экспрессируют два разных класса ИДН, которые используют НАД или НАДФ в качестве кофакторов и выполняют различные биологические функции. НАД-зависимая ИДН локализуется в митохондриальном матриксе и хорошо известна своей центральной ролью в производстве энергии в цикле Кребса. НАДФ-зависимые ИДГ преимущественно локализуются либо в митохондриях, либо в цитоплазме [2]. У бактерий присутствуют только НАДФ-зависимые ИДГ.

Основные аминокислоты, участвующие в каталитической реакции у бактерий - TYR160, LYS230, ASP283, ASP307 [1][3]. Также ключевую роль играет SER113, фосфорилирование которого приводит к переходу фермента в закрытую форму [2][3].

Механизм действия ИДГ у млекопитающих до конца не изучен, однако многочисленные исследования позволяют предположить, что он схож с таковым у бактериальных гомологов, несмотря на наличие только 20% сходства с ними [2][4].

Работа, связанная с использованием 1T0L, была посвящена более детальному изучению механизма работы человеческой ИДГ [4].

Результаты и обсуждение

Общая информация

Год получения модели: 2004, тогда же опубликована статья [4].

Авторы: Xu, X., Zhao, J., Xu, Z., Peng, B., Huang, Q., Arnold, E., & Ding, J.

Состав комплекса: human cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase in complex with NADP, isocitrate, and calcium(2+).

Метод решения фазовой проблемы: молекулярное замещение. В качестве стартовой модели использовалась НАДФ-зависимая ИДГ из свиного сердца.

Число измеренных рефлексов: 70684

Разрешение: 2.41 Å

Полнота набора структурных факторов: 94.2%

Диапазон разрешений структурных факторов: 2.41 - 12

Кристаллографическая группа: P 1 21 1

Параметры кристаллографической ячейки:

a = 103.298 Å α = 90 °

b = 86.738 Å β = 107.15 °

c = 115.766 Å γ = 90 °

Наличие некристаллографических симметрий в асимметрической ячейке: нет

Качество модели

На странице PDB присутствуют показатели качества модели (Рис. 2).

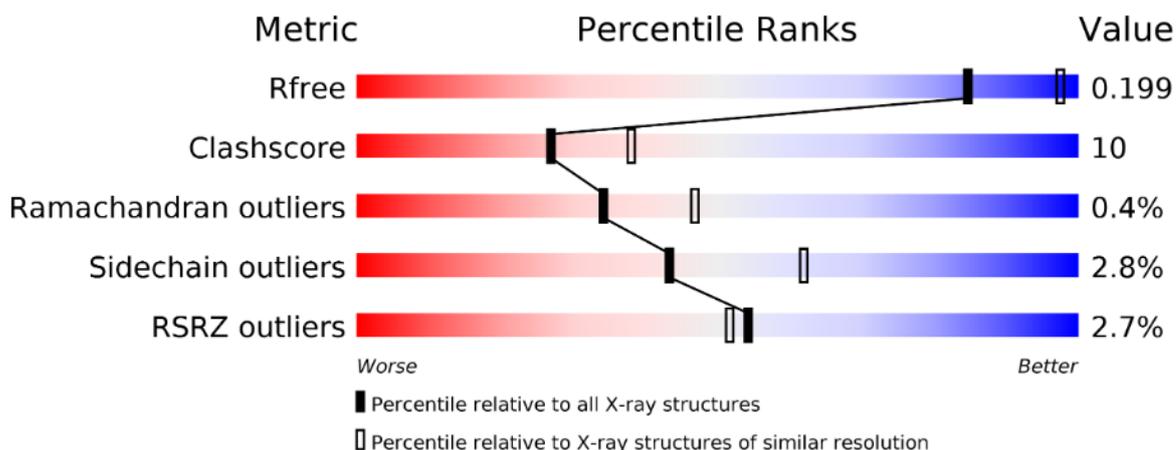


Рисунок 2. Показатели качества модели с сайта PDB.

Модель обладает неплохим R-фактором - 0.214, а R-free составил 0.253 (размер тестовой выборки – 3562 (5.04%)), что позволяет сделать предположение об удовлетворительном качестве расшифровки (разница между ними меньше, чем 0.1), однако это не окончательный вывод.

В целом другие параметры также удовлетворительны: Clashscore при добавлении атомов водорода составляет 10 (это показатель количества близко расположенных атомов на 1000), а также остатки достаточно хорошо вписаны в электронную плотность: процент плохо вписанных всего 2.7.

Также были проанализировано, как хорошо остатки ложатся на карту Рамачандрана (Рис. 3).

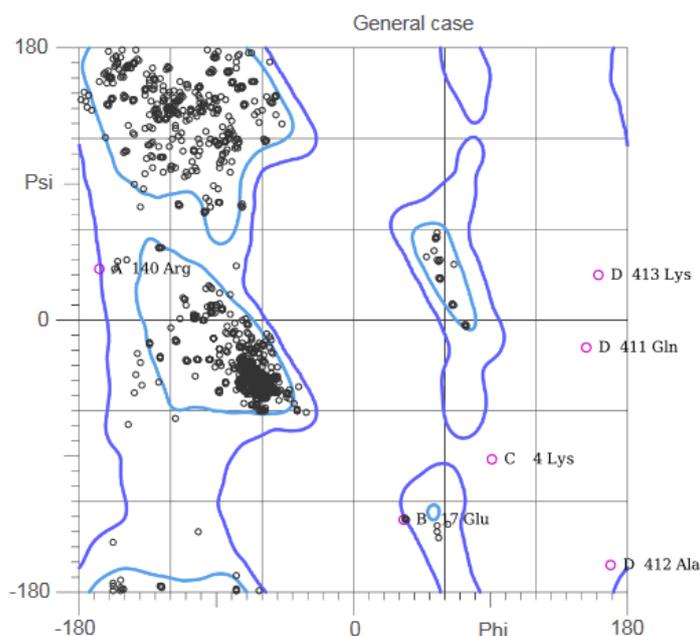


Рисунок 3. Карта Рамачандрана структуры 1T0L, полученная с помощью сервиса MolProbity [5].

Как можно заметить, большинство остатков находится в предпочитаемой области (95.0%), и почти все в разрешенной (99.6%) однако можно легко заметить несколько маргинальных остатков (Таблица 1). Пролинов в цис-конформации нет. Также структура имеет достаточно большой процент неротамеров (2.43%) и достаточно низкий предпочтительных ротамеров (93.57%).

Таблица 1. Маргинальные остатки по карте Рамачандрана.

Цепь	Номер остатка	Остаток
A	140	Arg
B	17	Glu
C	4	Lys
D	407	Ile
D	411	Gln
D	412	Ala
D	413	Lys

Анализ маргинальных остатков

Ниже приведены маргинальные остатки, которые я посчитала наиболее интересными для изучения (Таблица 2).

Таблица 2. Важные маргинальные остатки

Маргинальный остаток	Показатели
ARG140 chain A	Плохой торсионный угол
LYS413 chain D	Перекрытие атомов с 1:D:407:ILE (HA, CA), 1:D:410:ALA:HB2, 1:D:406:LYS:C, 1:D:412:ALA:O, 1:D:414:LEU:CB Плохой торсионный угол RSRZ =6.6 Плохое окружение (<-5)*
GLU17 chain B	Плохой торсионный угол
ASP252 chain A (участвует в связывании субстрата)	Перекрытие атомов с 1:B:279:ASP:OD2 Неротамер
GLU28 chain A	Неротамер RSRZ =2.4
ASN393 chain A	Перекрытие атомов Неротамер Подозрение на инверсию боковой цепи
LYS4 chain C	Плохой торсионный угол Перекрытие атомов с 1:C:3:LYS:O, Неротамер

*Измерено с помощью сервиса WHAT_CHECK[6]

1. Lys413 chain D

У данного остатка имеется целая куча проблем. Мало того, что он является маргиналом согласно карте Рамачандрана (Рис. 3) (углы ϕ и ψ -161.1, 30.3 соответственно, при том, что угол ϕ должен быть в районе -40° и -130°), так еще и перекрывается с атомами соседей (Рис. 4). Причем такое положение дел можно увидеть и во всех остальных цепях (судя по всему, авторы сами вставили туда остаток, основываясь на ранее полученных данных).

Посмотрев на карту электронной плотности (а еще на показатель RSRZ) (Рис. 5), становится понятно, что характеристики данного остатка могут вытекать из неправильной интерпретации экспериментальных данных.

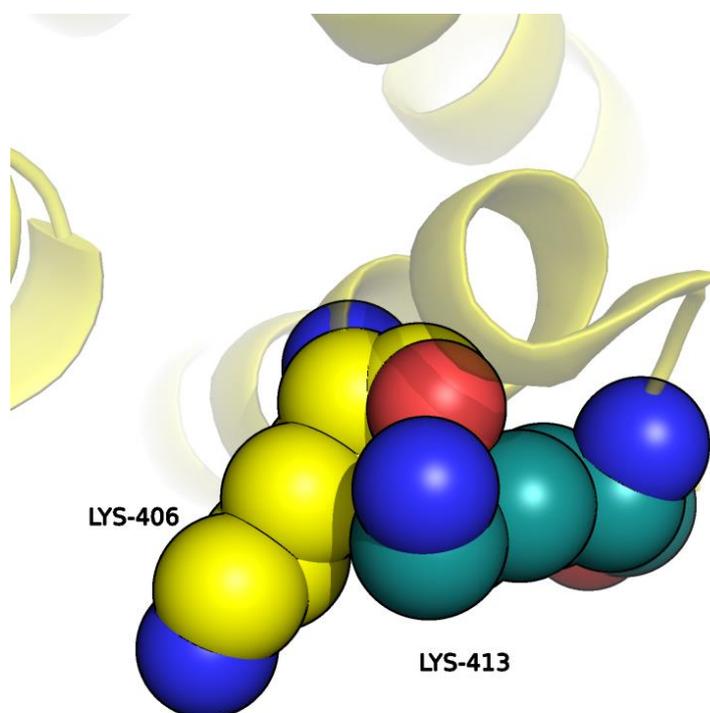


Рисунок 4. Lys413 chain D (deepsteel) и его ближайшее окружение. Перекрывание атомов на примере Lys406.

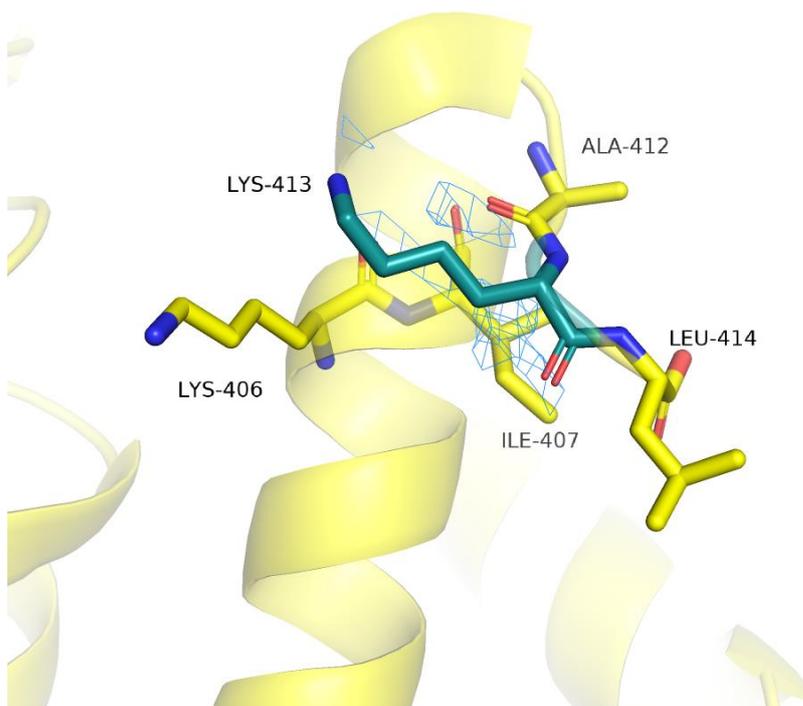


Рисунок 5. *Lys413 chain D (deepsteel) и его ближайшее окружение. Электронная плотность показана на уровне подрезки 1.*

2. Asp252 chain A

Этот остаток участвует в связывании субстрата, поэтому важно определить его положение правильно. Остаток ложится на электронную плотность достаточно хорошо, значит, дело в другом (Рис. 6).

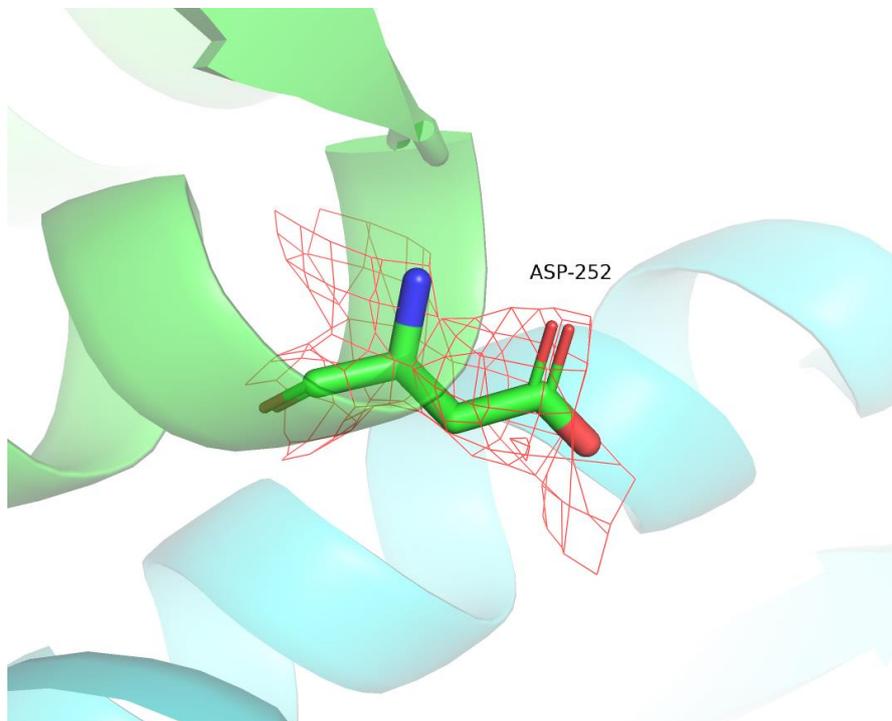


Рисунок 6. Asp252 chain A. Электронная плотность показана на уровне подрезки 1.

Посмотрим на его окружение (Рис. 7). Судя по всему, такое положение остатка объясняется особенностями взаимодействия, а не ошибками эксперимента. Поскольку аспарат участвует в связывании субстрата, ему выгоднее быть именно в таком состоянии, несмотря на небольшое перекрытие атомов (Рис. 8). Кроме того, его неротамерность стабилизируется азотом лизина 212.

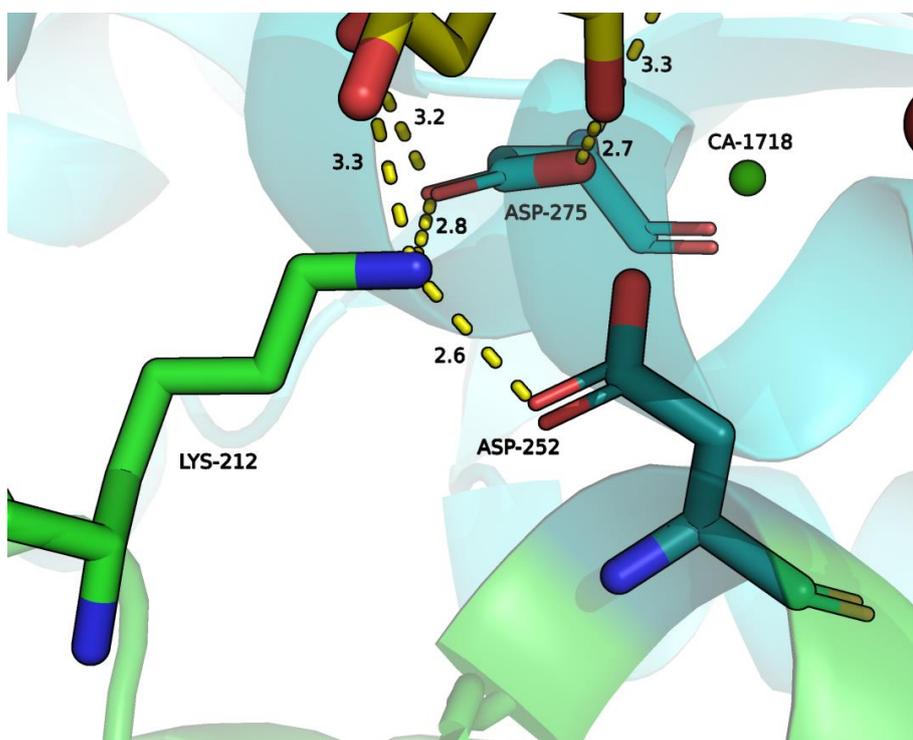


Рисунок 7. Asp252 chain A (deepsteel) и его ближайшее окружение. Показаны некоторые водородные связи. Субстрат обозначен желтым.

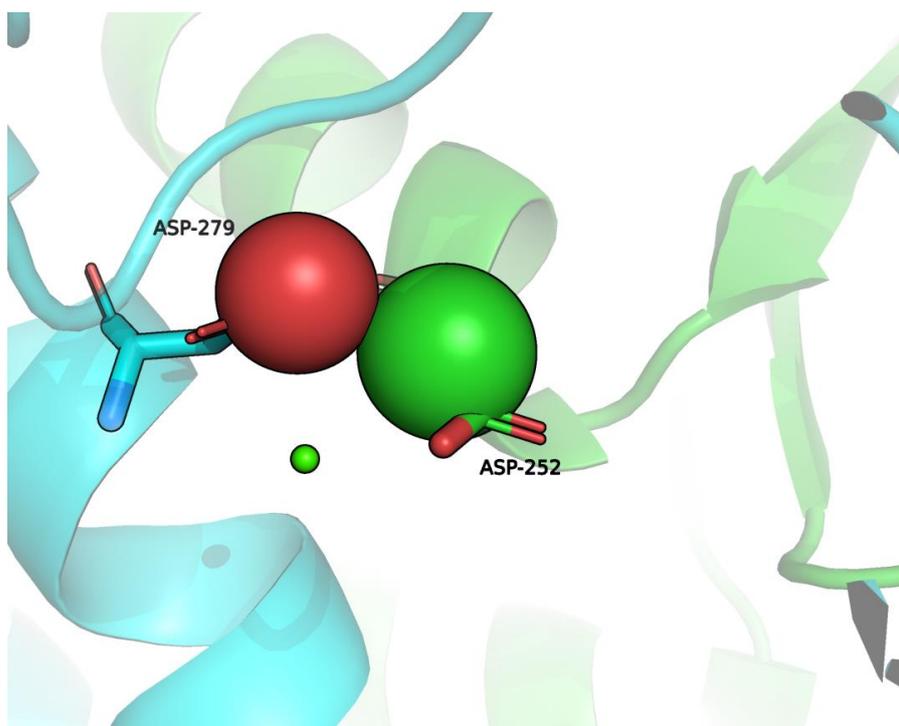


Рисунок 8. Asp252 chain A перекрытие атомов.

3. Glu28 chain A

Судя по всему, неротамерность этого остатка является следствием ошибок эксперимента. Если мы посмотрим на его электронную плотность (Рис.9), то можно заметить, что на конце радикала она практически отсутствует. Таким образом, наблюдаемые характеристики вполне могут следовать из неверной расшифровки электронной плотности ввиду её посредственного качества.

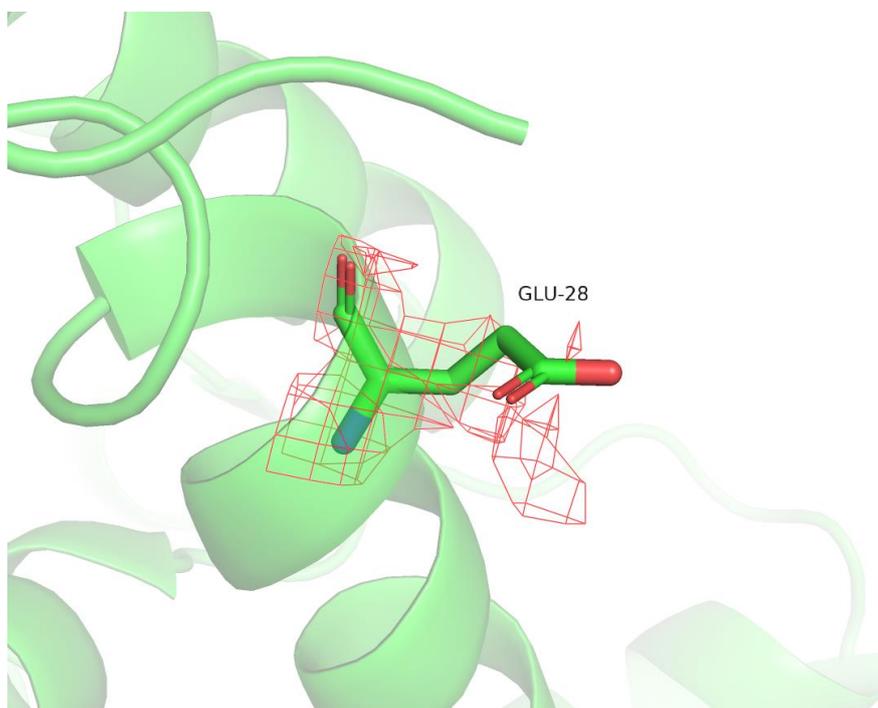


Рисунок 9. Glu28 chain A. Электронная плотность показана на уровне подрезки 1.

4. Asn393 chain A

Сложно объяснить такое положение этого остатка (Рис. 10), ведь так он не стабилизируется водородными связями. Если инвертировать атомы азота и кислорода, то возможна водородная связь с глутаматом 324, и появится возможность объяснить такое положение остатка в цепи.

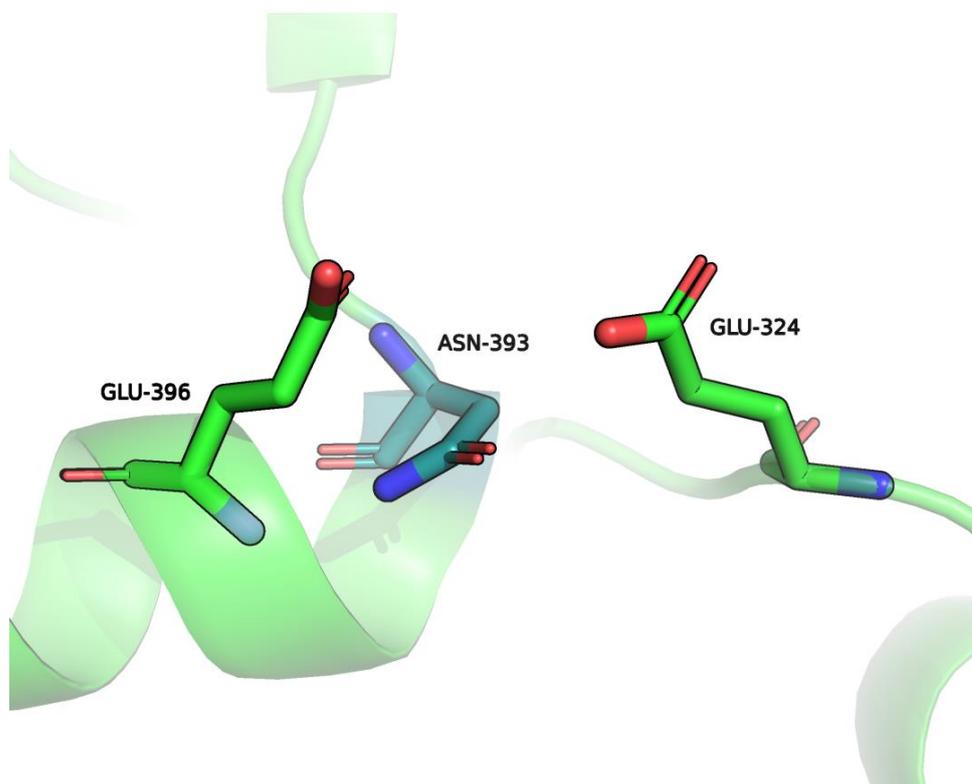


Рисунок 10. Asn393 chain A (deepsteel) и его ближайшее окружение.

5. Lys4 chain C

Этот остаток является маргиналом согласно карте Рамачандрана (Рис. 3), судя по всему это связано с неверной расшифровкой электронной плотности (Рис. 11), как и его неротамерность. Кроме того, происходит перекрывание Cbeta радикала с кислородом остова соседнего лизина (Рис. 12).

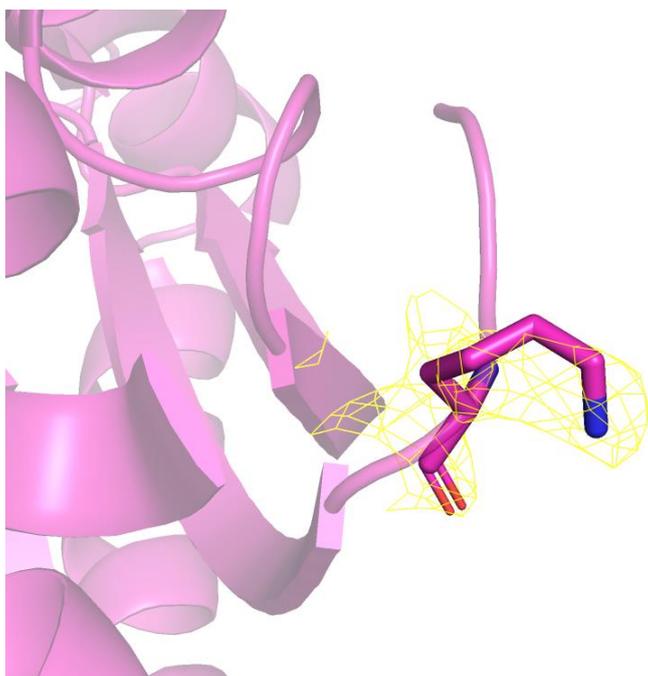


Рисунок 11. Lys4 chain C. Электронная плотность показана на уровне подрезки 1.

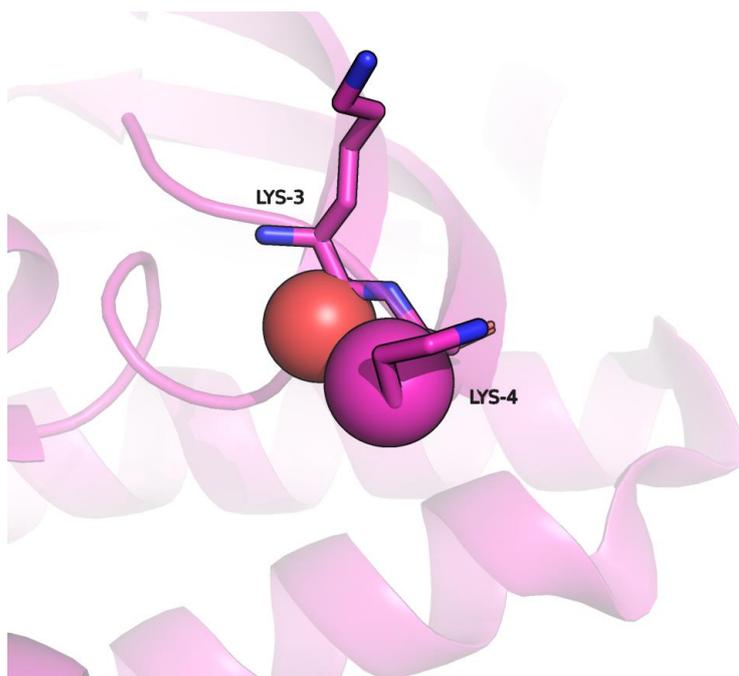


Рисунок 12. Lys4 chain C перекрывание атомов.

PDBredo

База данных PDB_redo[7] содержит оптимизированные по различным параметрам версии моделей PDB.

PDB-redo немного улучшил R-free и качество ротамеров, торсионные углы почти не изменились (Рис. 13). Также было убрано 13 молекул воды.

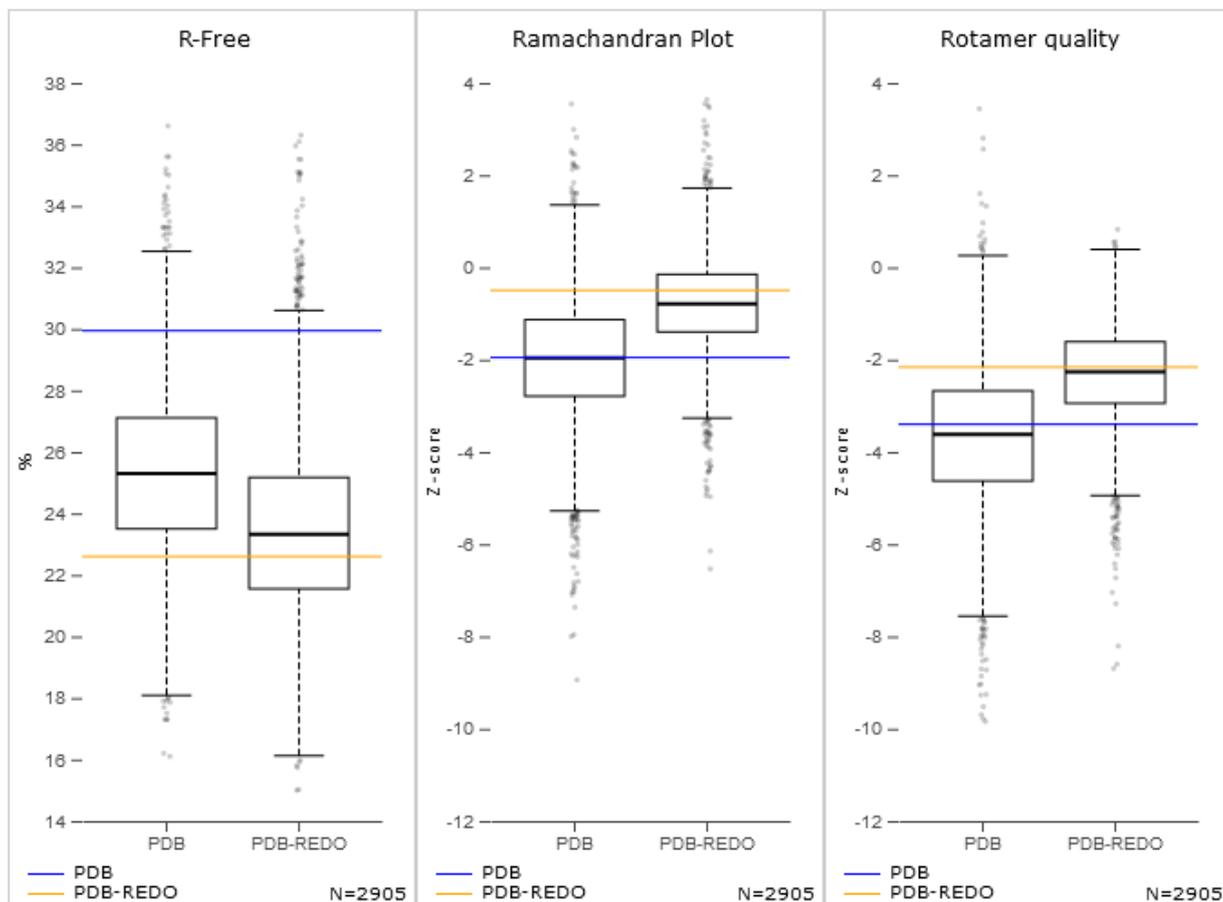


Рисунок 13. Результаты PDBredo.

При наложении двух моделей друг на друга можно увидеть, что они практически идеально накладываются (Рис. 14).

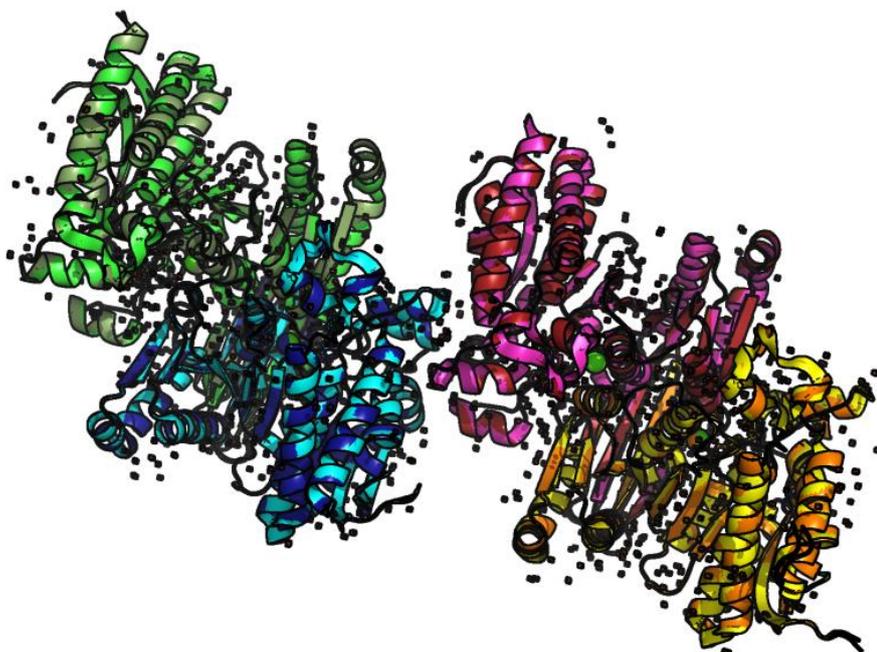


Рисунок 14. Наложение структур. Темные цвета относятся к структуре, полученной с помощью PDBredo.

В структуре из PDB-redo не был изменен ни один из остатков, которые рассматривались ранее, кроме Glu28 (Рис. 15) и Asn393. У первого было улучшено качество, тогда как у второго инвертированы азот и кислород радикала.

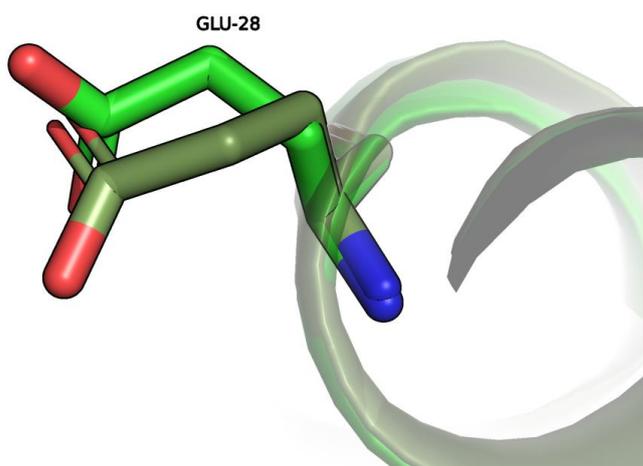


Рисунок 15. Glu28 chain A. Темный цвет относится к структуре, полученной с помощью PDBredo.

Заключение

В целом, структура имеет достаточно хорошее разрешение и показатели. Стоит отметить, что, хотя в структуре есть недочеты в виде инвертированных боковых цепей и плохо вписанных в электронную плотность остатков, они не влияют на исследование, т.к. большинство находятся на поверхности структуры. На мой взгляд, структура хорошо подходит для того, чтобы делать по ней какие-то биологические выводы.

Список литературы

- [1] Hurley, J. H., Thorsness, P. E., Ramalingam, V., Helmers, N. H., Koshland, D. E., Jr, & Stroud, R. M. (1989). Structure of a bacterial enzyme regulated by phosphorylation, isocitrate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(22), 8635–8639. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.22.8635>
- [2] Hurley, J. H., Dean, A. M., Koshland, D. E., Jr, & Stroud, R. M. (1991). Catalytic mechanism of NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase: implications from the structures of magnesium-isocitrate and NADP+ complexes. *Biochemistry*, 30(35), 8671–8678. <https://doi.org/10.1021>
- [3] Gonçalves, S., Miller, S. P., Carrondo, M. A., Dean, A. M., & Matias, P. M. (2012). Induced fit and the catalytic mechanism of isocitrate dehydrogenase. *Biochemistry*, 51(36), 7098–7115. <https://doi.org/10.1021/bi300483w>
- [4] Xu, X., Zhao, J., Xu, Z., Peng, B., Huang, Q., Arnold, E., & Ding, J. (2004). Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *The Journal of biological chemistry*, 279(32), 33946–33957. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404298200>

Использованные ресурсы

- [5] MolProbity: <http://molprobity.biochem.duke.edu/3>.
- [6] WHAT_CHECK: <https://swift.cmbi.umcn.nl/servers/html/4>
- [7] PDB_redo: <https://pdb-redo.eu/>