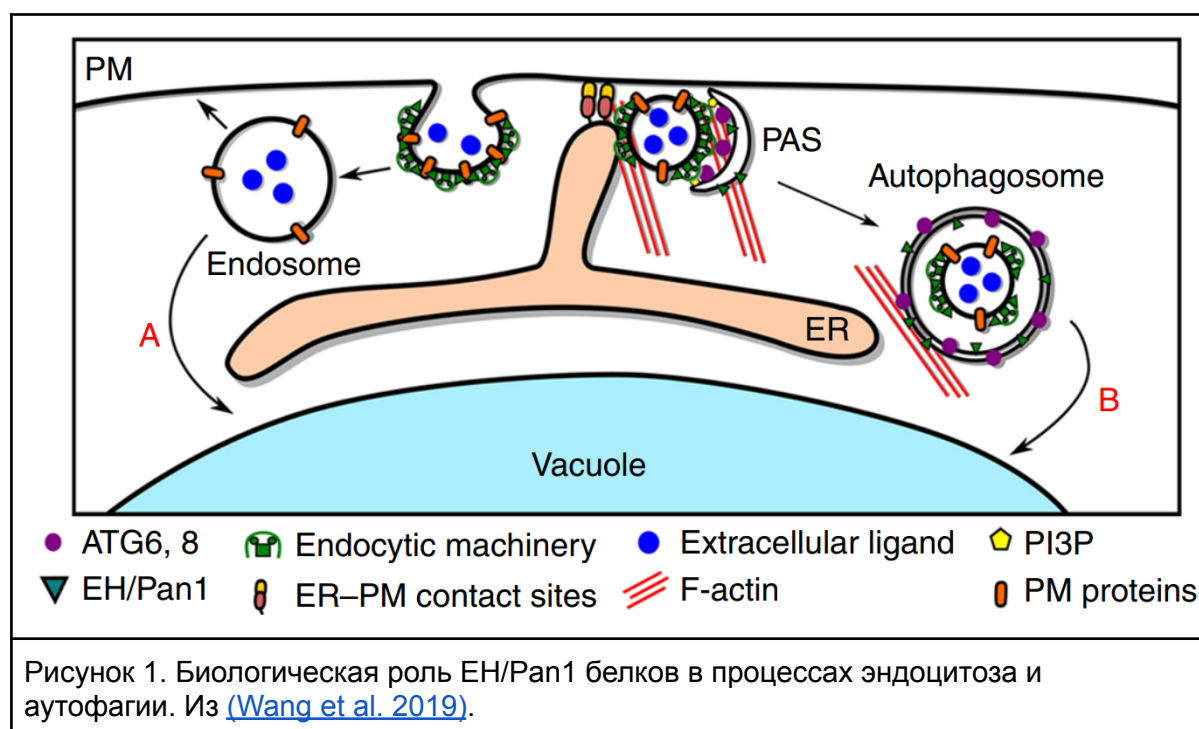


Введение

В рамках данного практикума необходимо было исследовать структурные модели N-концевого домена белка AtEH1/Pan1 (получен из резуховидки Таля). Этот домен способен связывать ион кальция, а сами белки EH играют важную роль в процессах эндоцитоза у растений. Также данные белки могут играть важную роль и в процессе актин-опосредованной аутофагии.



В рамках данного практикума необходимо было сравнить модели N-концевого домена данного белка, полученные различными методами -- ЯМР и РСА, найти отличия в них на макро- и микроуровне и сопоставить структуры друг другу.

Задание 1

	Метод получения структуры	Разрешение	Число моделей
6YIG	РСА	1.55Å	1
6YEU	ЯМР	-	20

Модели, полученные разными методами, довольно схожи друг с другом на макроуровне: значительные различия наблюдаются лишь для концевых участков молекулы. Также стоит отметить, что ансамбль ЯМР-структур имеет неплохую сходимость внутри себя и довольно неплохо выравнивается на РСА-структуру, что может говорить о хорошем качестве моделей, полученных обоими методами.

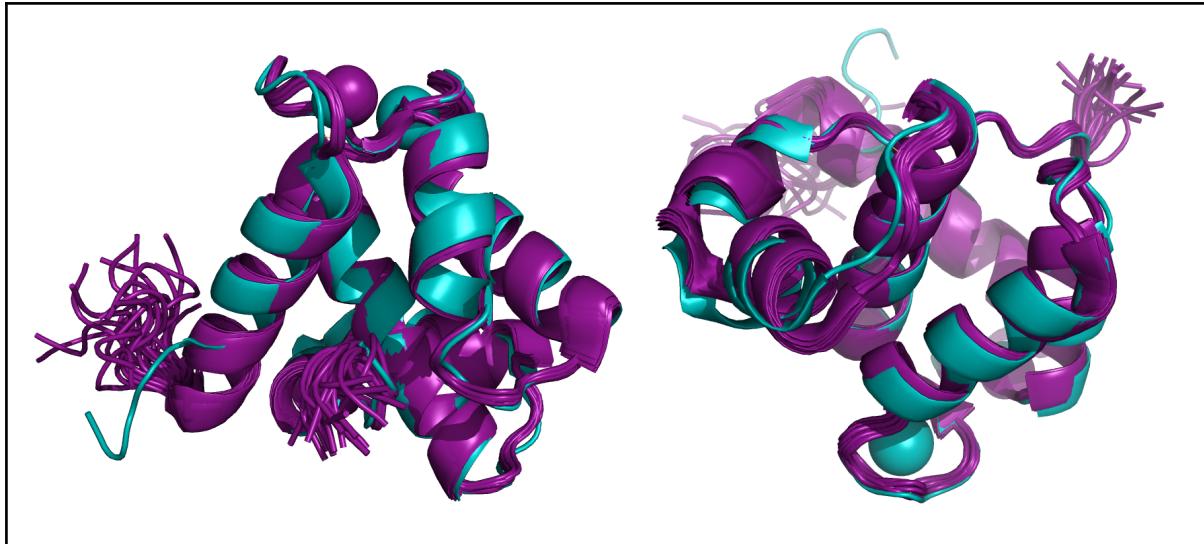


Рисунок 2. Отличия между моделями на макроуровне. Бирюзовым покрашена модель, полученная в РСА-эксперименте, фиолетовым -- ансамбль моделей ЯМР. Наблюдается неплохая сходимость между моделями в центральных участках белка; значимые различия наблюдаются в концевых участках.

Стоит отметить, что в РСА-модели нет первых четырех и последних двух аминокислотных остатков белка, что может объясняться очень высокой подвижностью данных аминокислотных остатков.

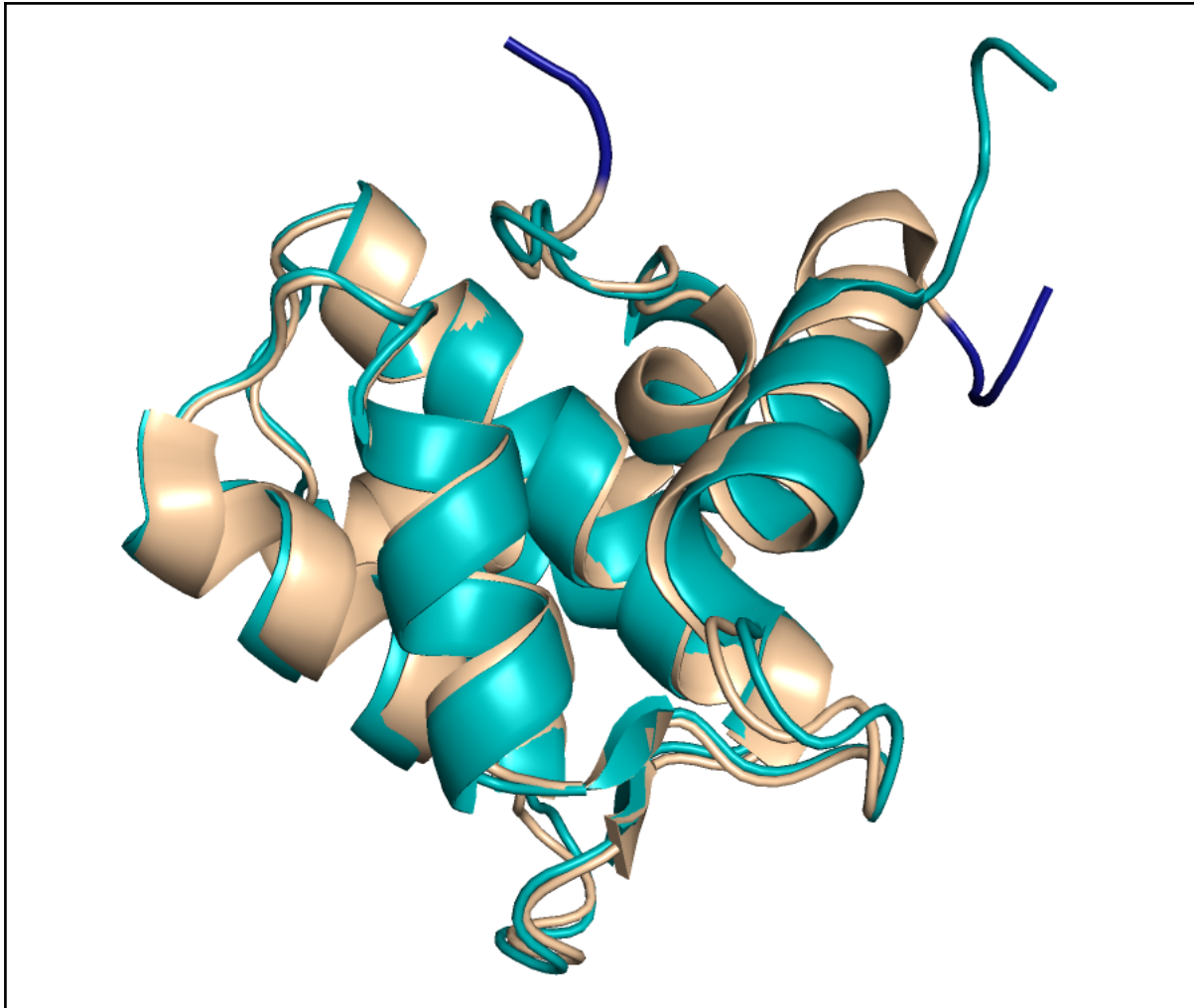


Рисунок 3. Участки белка, отсутствующие в PCA-модели. Бирюзовым покрашена модель, полученная в PCA-эксперименте, песочным -- одна из моделей ансамбля моделей ЯМР. Синим покрашены аминокислотные участки, отсутствующие в PCA-модели, но присутствующие в ЯМР-модели.

Однако, несмотря на то, что модели достаточно схожи на макроуровне, на микроуровне, при рассмотрении отдельных аминокислотных остатков, в глаза бросаются различия. В первую очередь, для PCA структур возможно наличие альт-локов (один из таких будет рассмотрен далее). Во-вторых, многие аминокислотные остатки из моделей не сопоставляются друг с другом при наложении структур. Так, остаток Gln-63 из ЯМР-моделей не принимает такое же положение, как и аналогичный ему остаток из PCA-модели ни в одной из моделей ансамбля. Однако данный остаток располагается поверхности белковой глобулы и электронная плотность вокруг его боковой цепи разрешена не самым лучшим образом, что может объяснять такие различия.

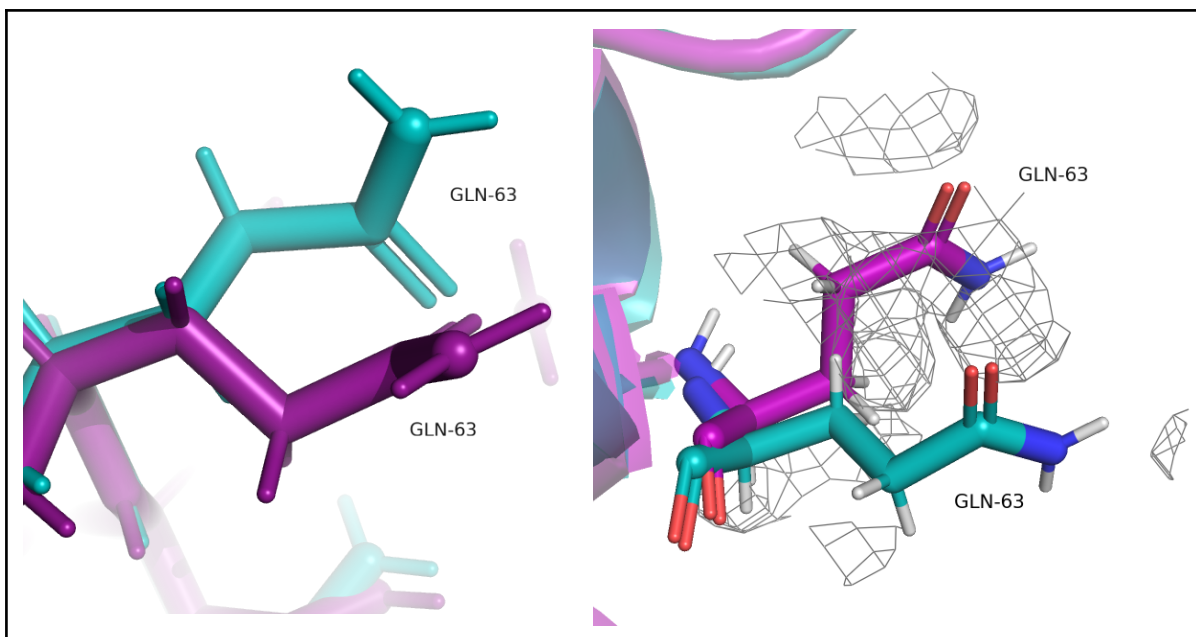


Рисунок 4. Различные положения остатка глутамата-63 в ЯМР-модели и PCA-модели. Бирюзовым покрашена модель, полученная в PCA-эксперименте, фиолетовым -- ансамбль моделей ЯМР. Уровень подрезки электронной плотности -- 2, carve = 1.5.

Такое разное положение имеют и другие остатки моделей. Некоторые из них также не очень хорошо соответствуют своей электронной плотности, что может говорить о их высокой подвижности.

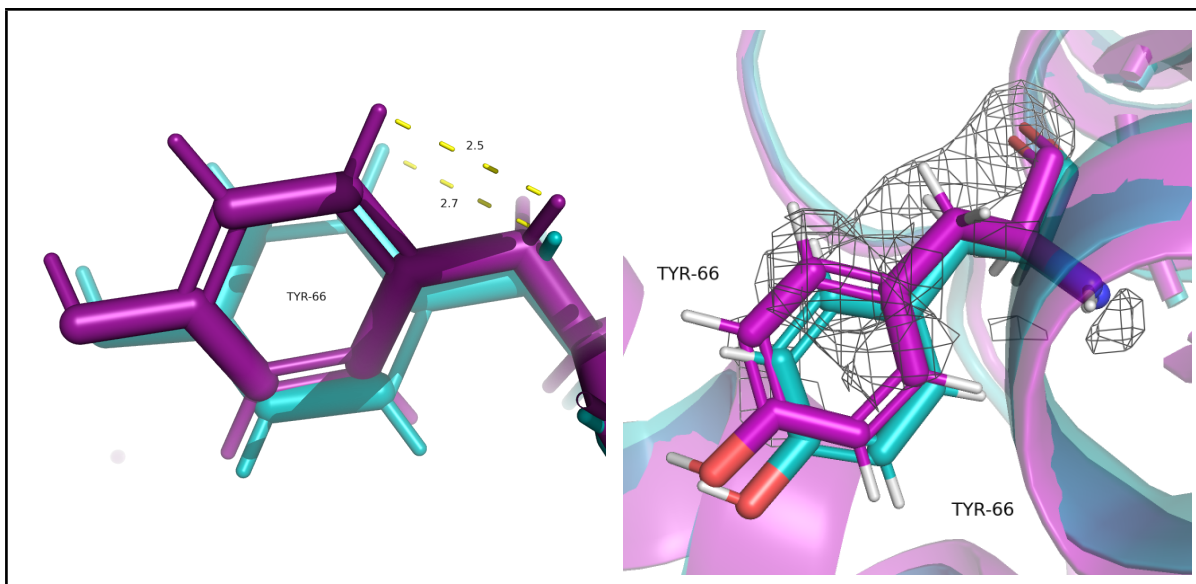


Рисунок 5. Различные положения остатка тирозина-63 в ЯМР-модели и PCA-модели. Бирюзовым покрашена модель, полученная в PCA-эксперименте, фиолетовым -- ансамбль моделей ЯМР. Уровень подрезки электронной плотности -- 2, carve = 1.5.

Задание 2

Задание выполнено с применением jupyter-notebook (приложен на странице).

Задание 3

В данном задании необходимо было исследовать водородные связи между различными участками белковой молекулы в PCA-модели и ансамбле ЯМР-моделей. Стабильны ли водородные связи в разных участках молекулы? Рассмотрим их.

Номер и тип	Вторичная структура	Пространственное положение	Расстояние, PCA, Å	Процент ЯМР со связью	Минимальное, Å	Максимальное, Å	Медиана, Å
LYS12-GLU16	α -спираль	поверхность	2.9	100% (20)	2.6	3.5*	2.95
Ser52-SER68	α -спирали	глобула	2.5	95% (19)	2.6	4.1*	3.15
ASP19-GLY22	петля	поверхность	3.0	100% (20)	3.3	3.6	3.4
SER57-PHE59	петля	поверхность	3.3	50% (10)	3.2	3.75	5.3

Рассмотрим водородную связь в α -спирали остова.

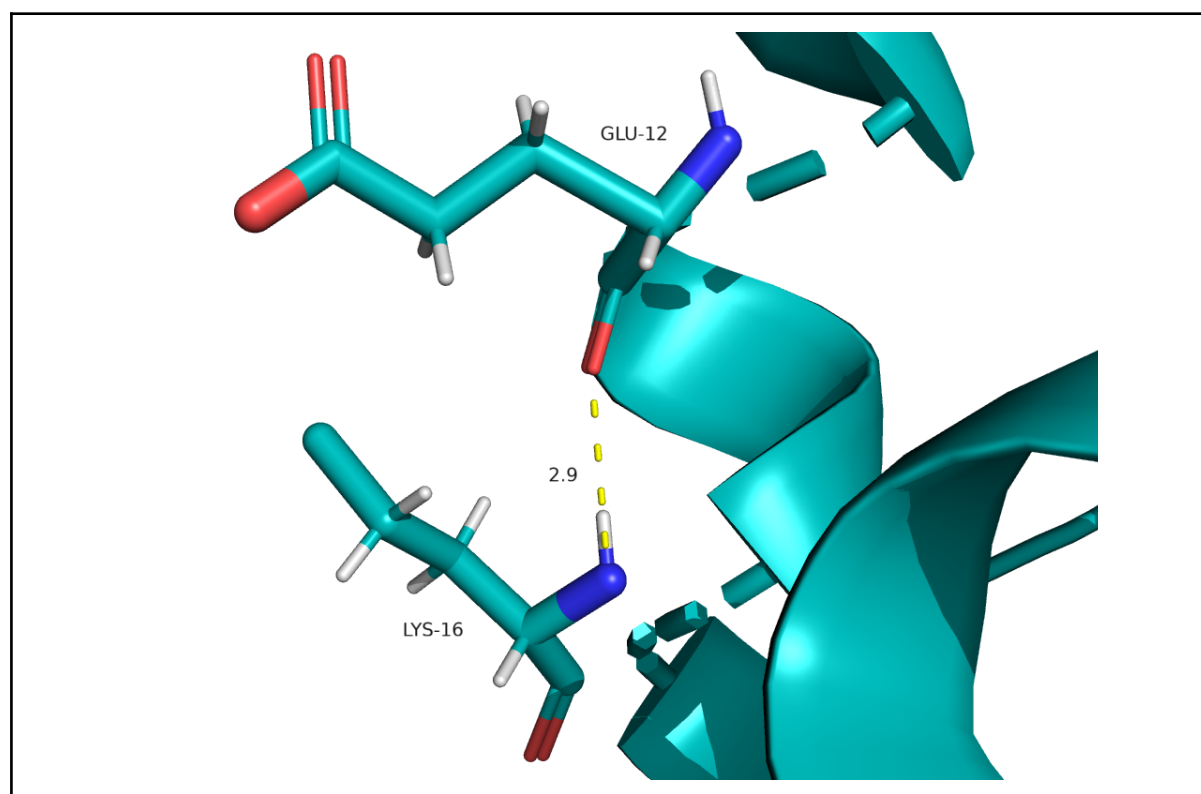


Рисунок 6. Водородная связь между остатками остова в PCA-модели.

И рассмотрим распределение расстояния между соответствующими группами в ЯМР-моделях.

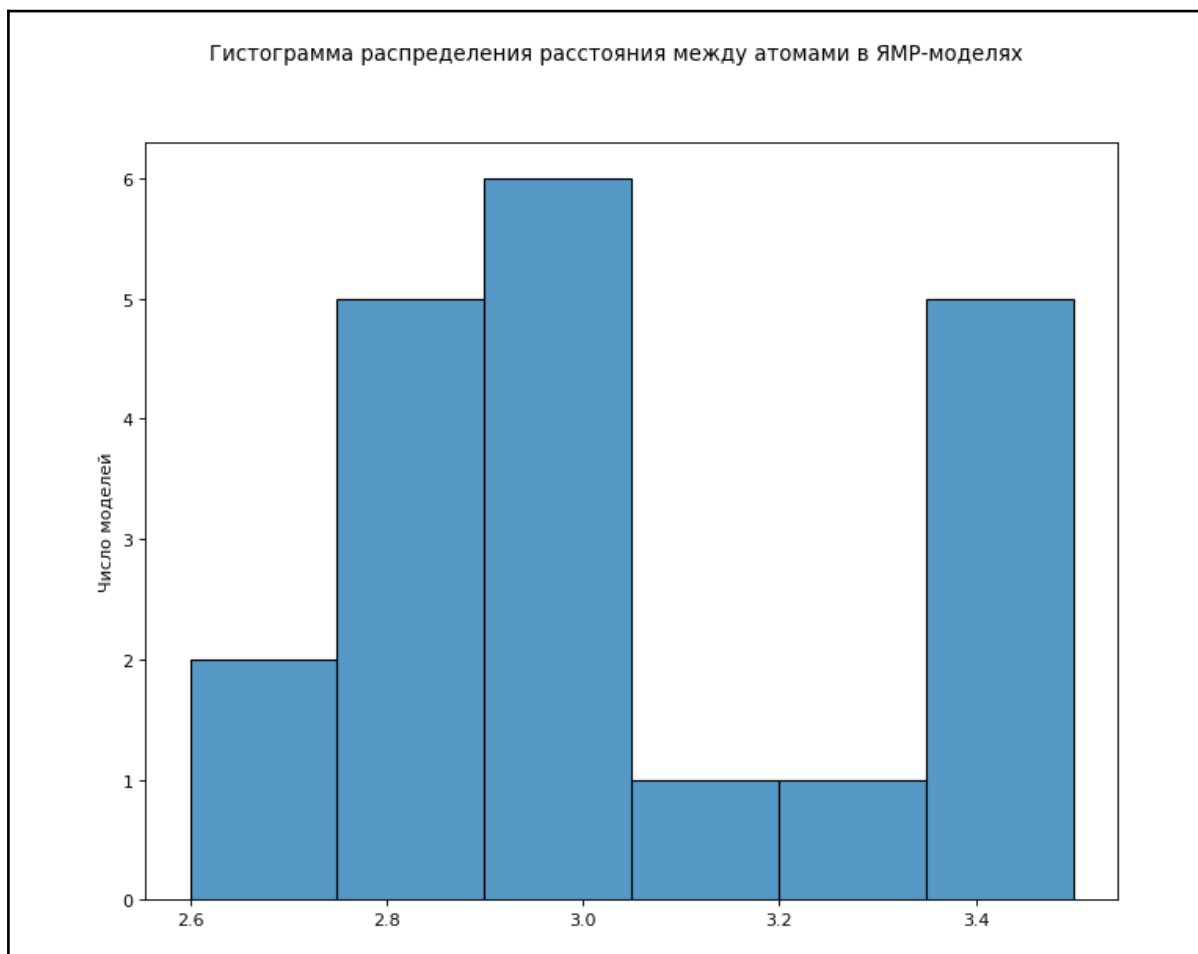
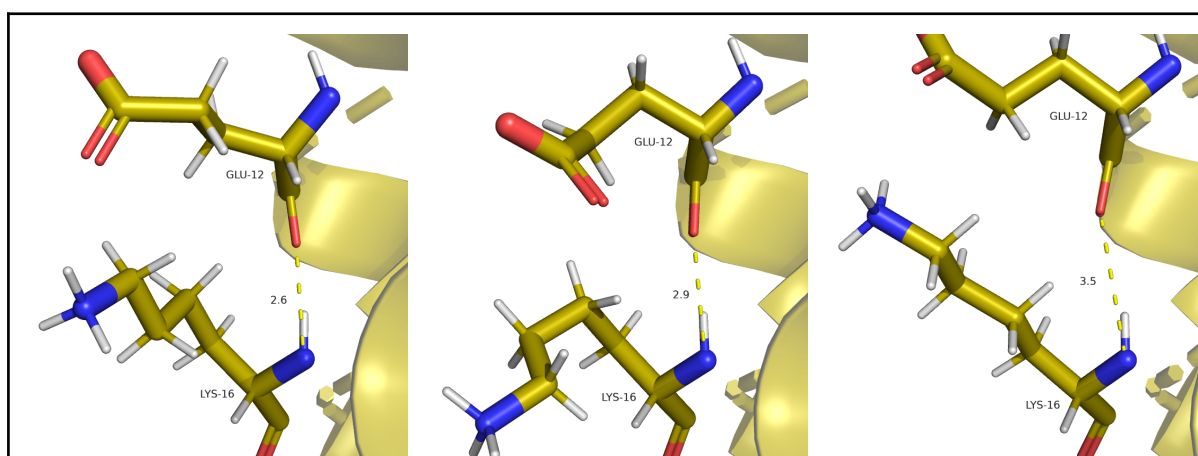


Рисунок 7. Гистограмма распределения расстояния между атомами остова аминокислотных остатков ансамбля ЯМР-моделей.



Минимальное расстояние

Медианное расстояние

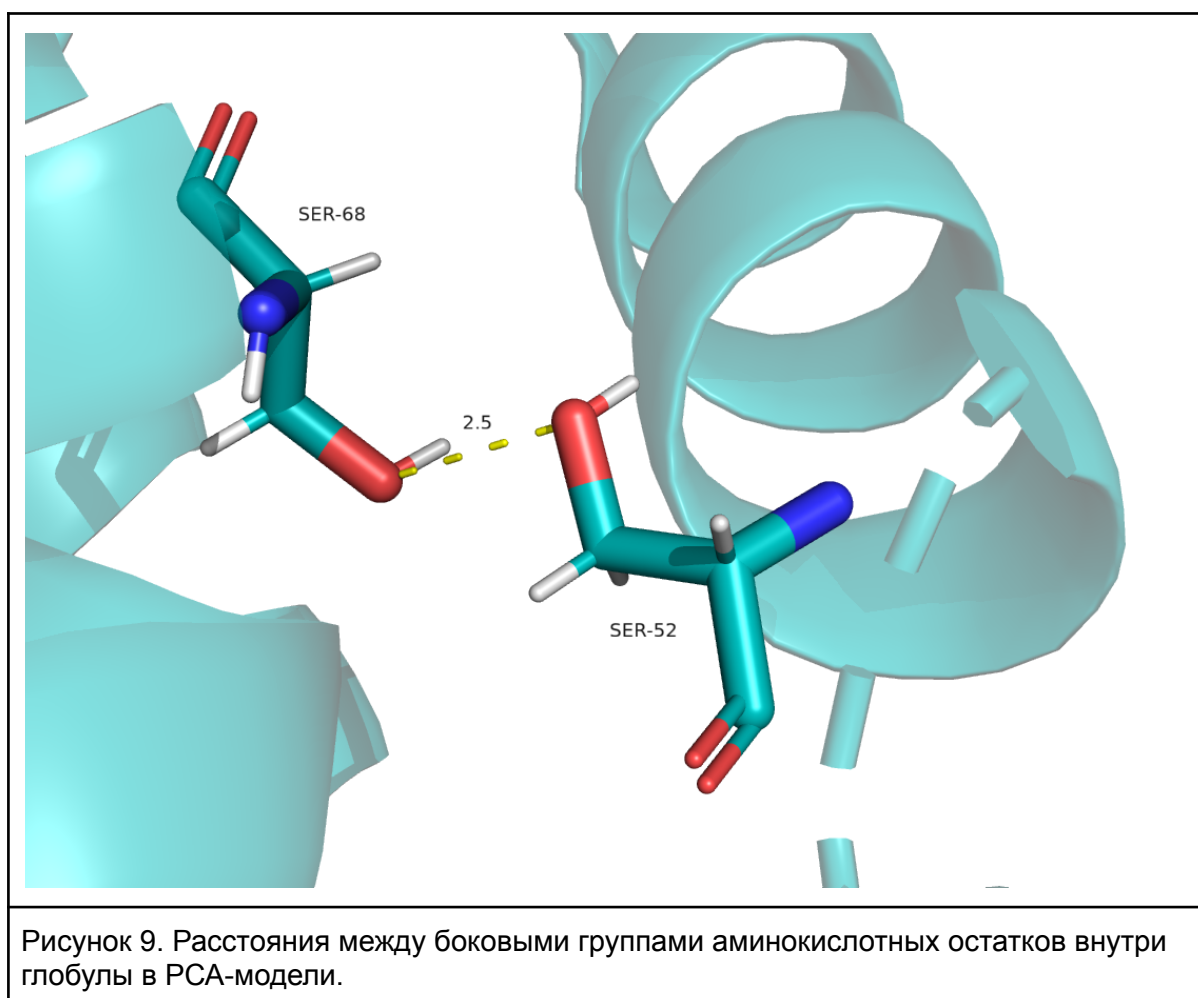
Максимальное расстояние

Рисунок 8. Минимальное, медианное и максимальное расстояние между атомами в

ансамбле ЯМР-моделей.

Стоит отметить, что в ансамбле из 20 моделей всего лишь 6 моделей имеют расстояние более 3.3 Å и в каждой модели данные атомы связаны водородной связью.

Связи между боковыми группами аминокислотных остатков в центре белковой глобулы более стабильны.



Рассмотрим распределение расстояния между соответствующими группами в ЯМР-моделях.

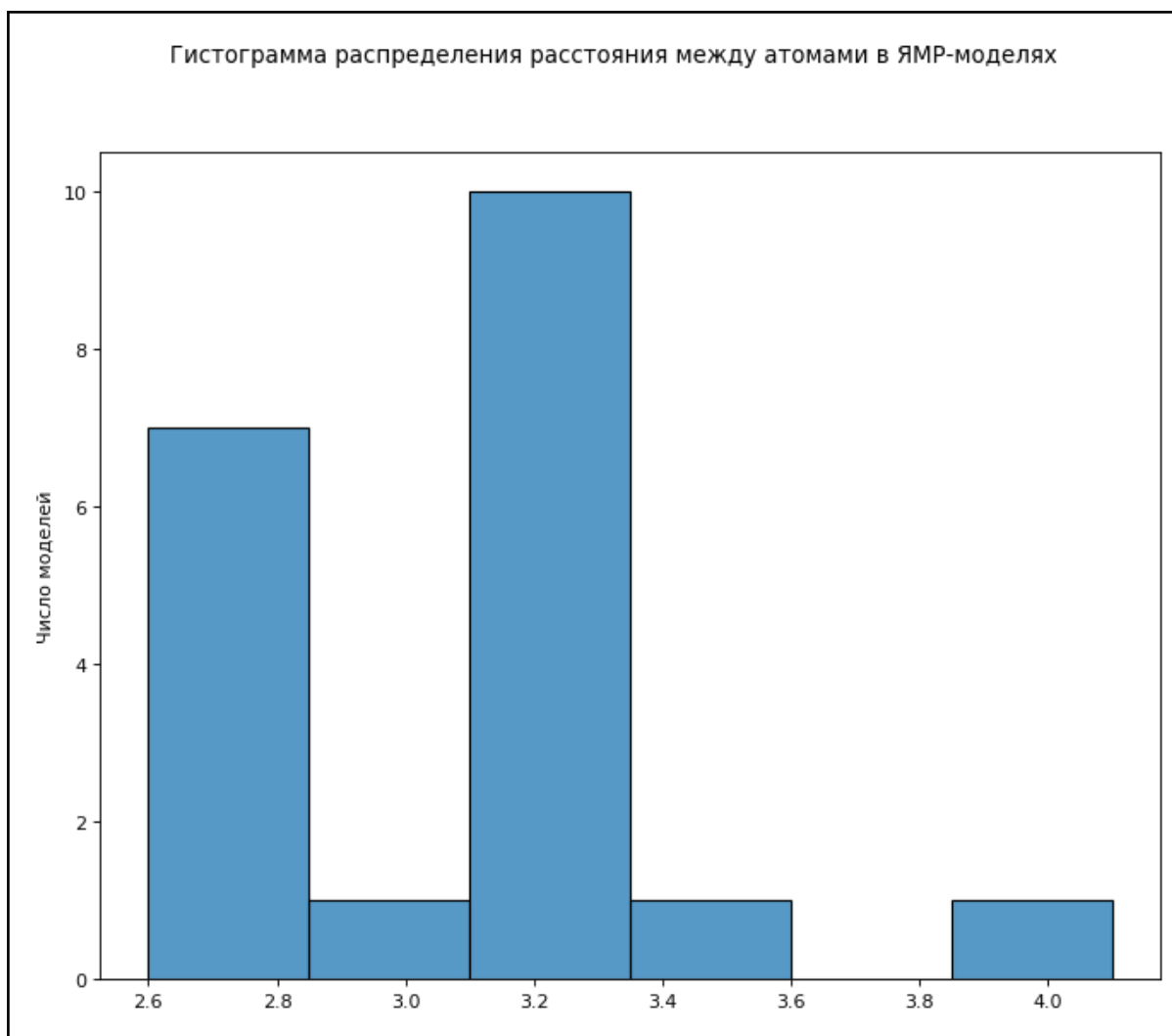


Рисунок 10. Гистограмма распределения расстояния между боковыми группами аминокислотных остатков внутри глобулы ансамбля ЯМР-моделей.

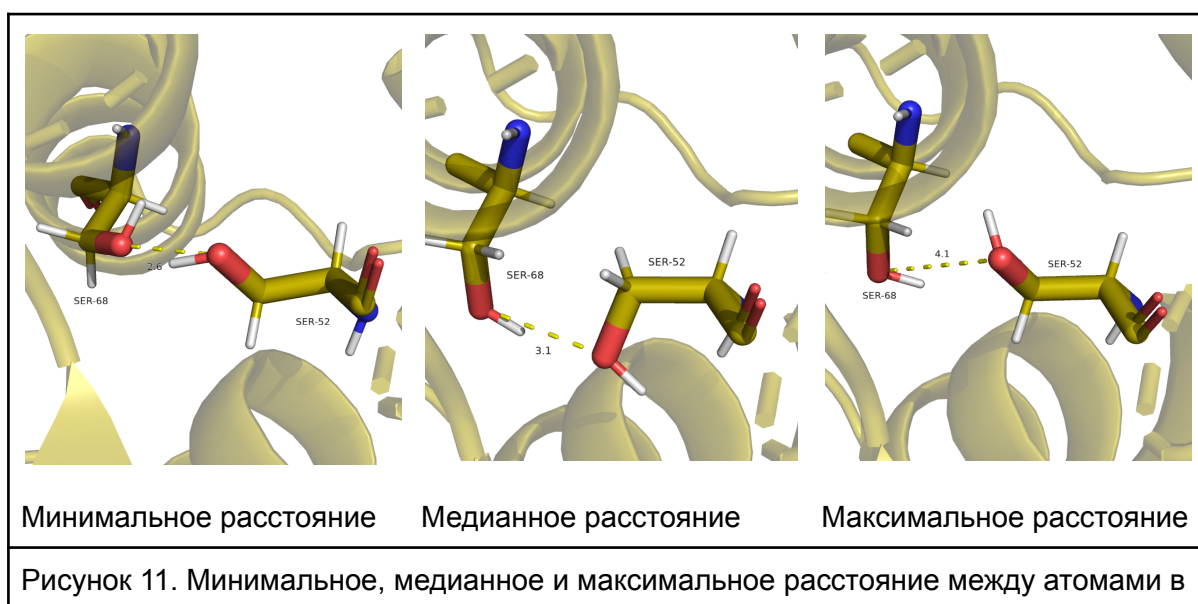


Рисунок 11. Минимальное, медианное и максимальное расстояние между атомами в

ансамбле ЯМР-моделей.

Для данной пары атомов есть только одна структура с расстоянием между атомами более 3.3 Å (модель с максимальным расстоянием), в 19 других моделей водородная связь сформирована и имеет подходящую геометрию; расстояние между этими двумя атомами не сильно колеблется в пределах моделей, что отражает стабильность данного участка цепи.

Посмотрим на водородные связи в петлях структуры.

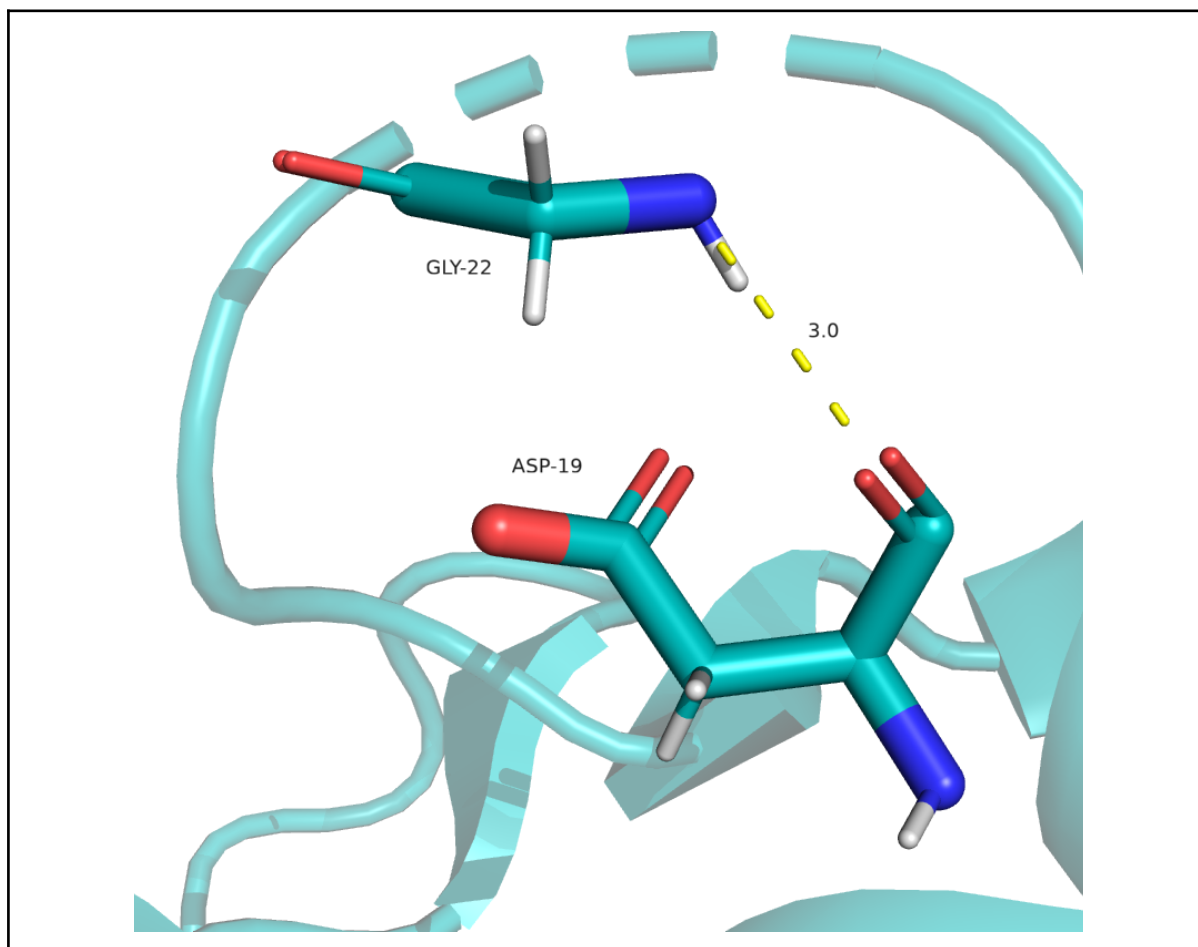


Рисунок 12. Водородная связь в петле в PCA-модели.

Рассмотрим распределение расстояния между соответствующими группами в ЯМР-моделях.

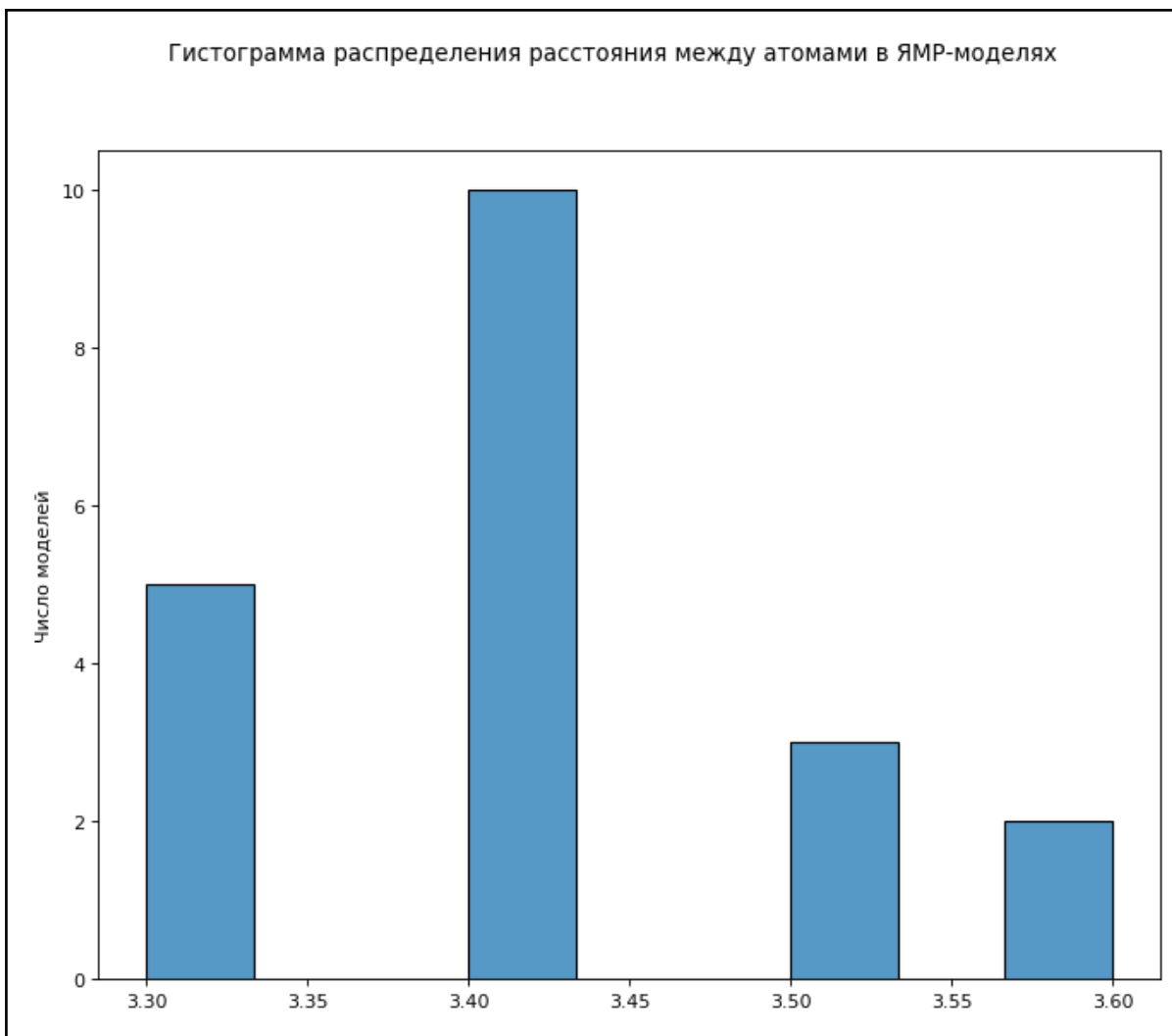


Рисунок 13. Гистограмма распределения расстояния между соответствующими атомами ансамбля ЯМР-моделей.

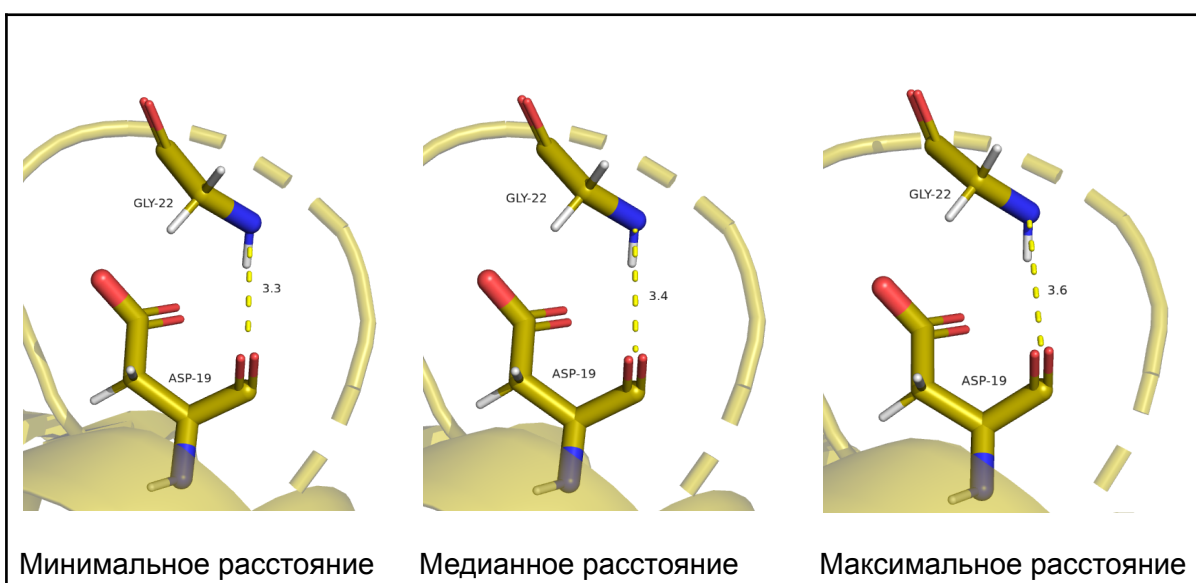


Рисунок 14. Минимальное, медианное и максимальное расстояние между атомами в

ансамбле ЯМР-моделей.

Как мы видим по распределению расстояний, данная петля является достаточно стабильной и, вероятно, не претерпевает значительных колебаний в растворе. Справедливо ли это для всех петель? Рассмотрим еще одну.

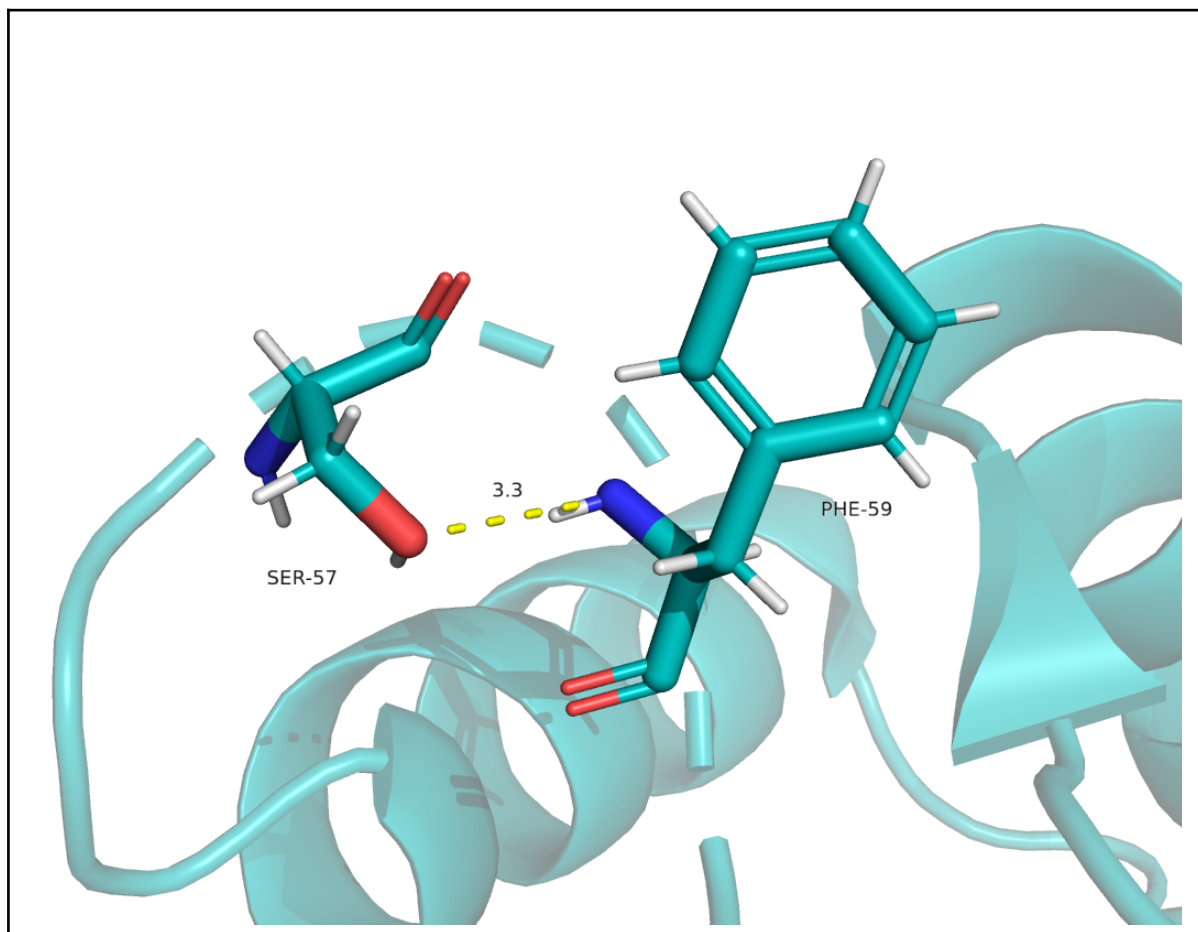


Рисунок 15. Водородная связь в петле в PCA-модели.

Рассмотрим распределение расстояния между соответствующими группами в ЯМР-моделях. Мы видим, что для данных остатков наблюдаются гораздо более значительные колебания в расстоянии, что может указывать на то, что данная петля является более подвижной по сравнению с предыдущей.

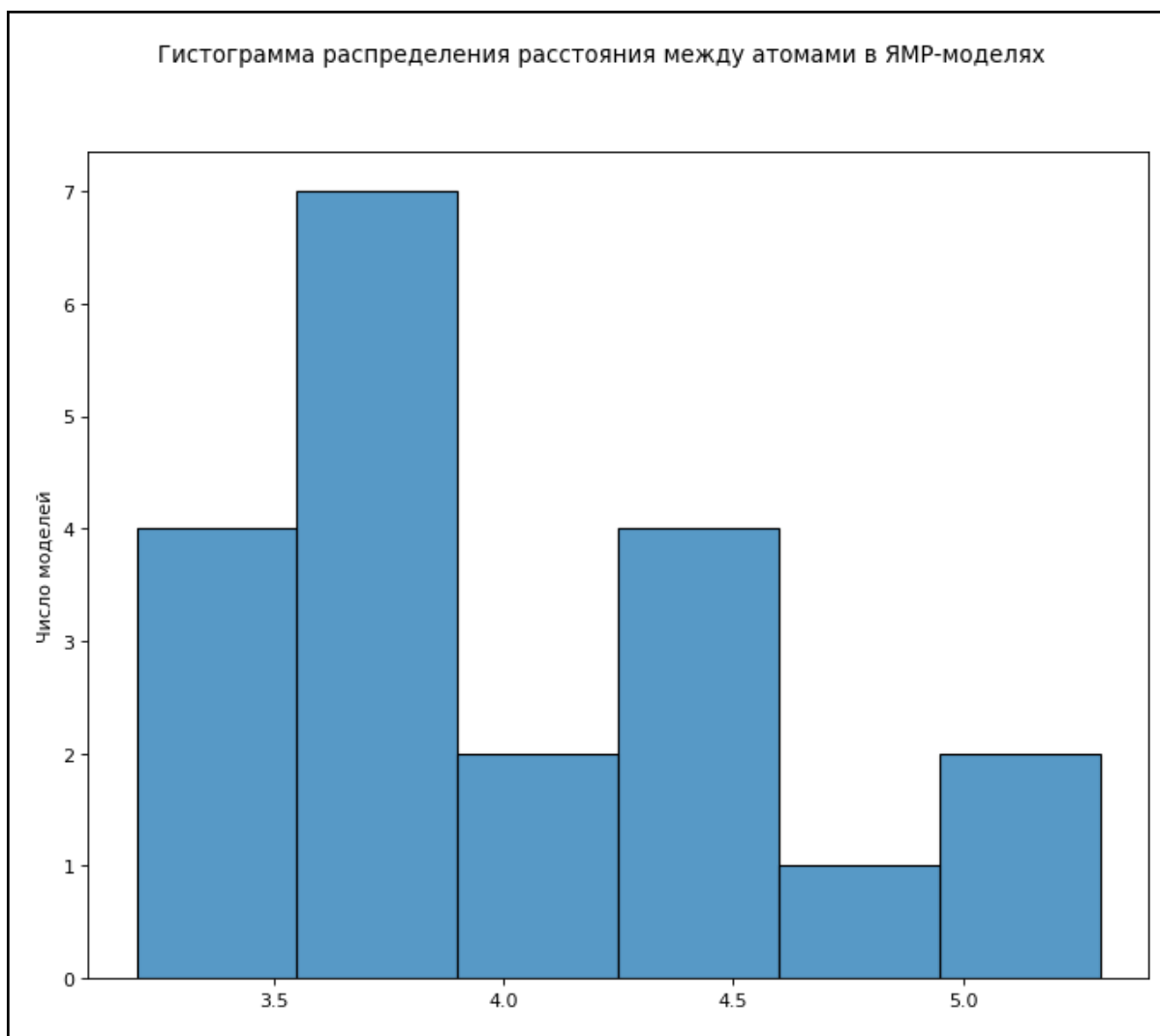


Рисунок 16. Гистограмма распределения расстояния между соответствующими атомами ансамбля ЯМР-моделей.

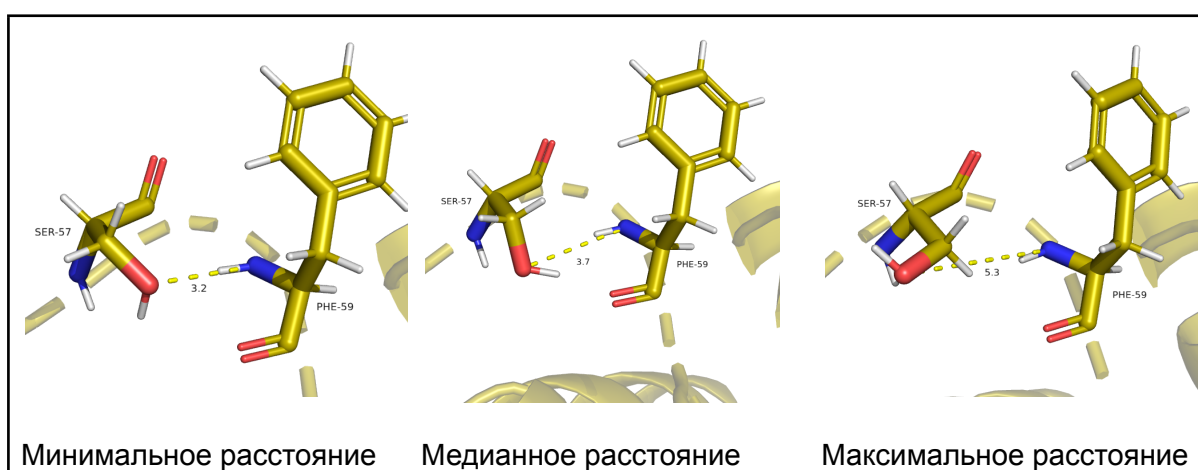
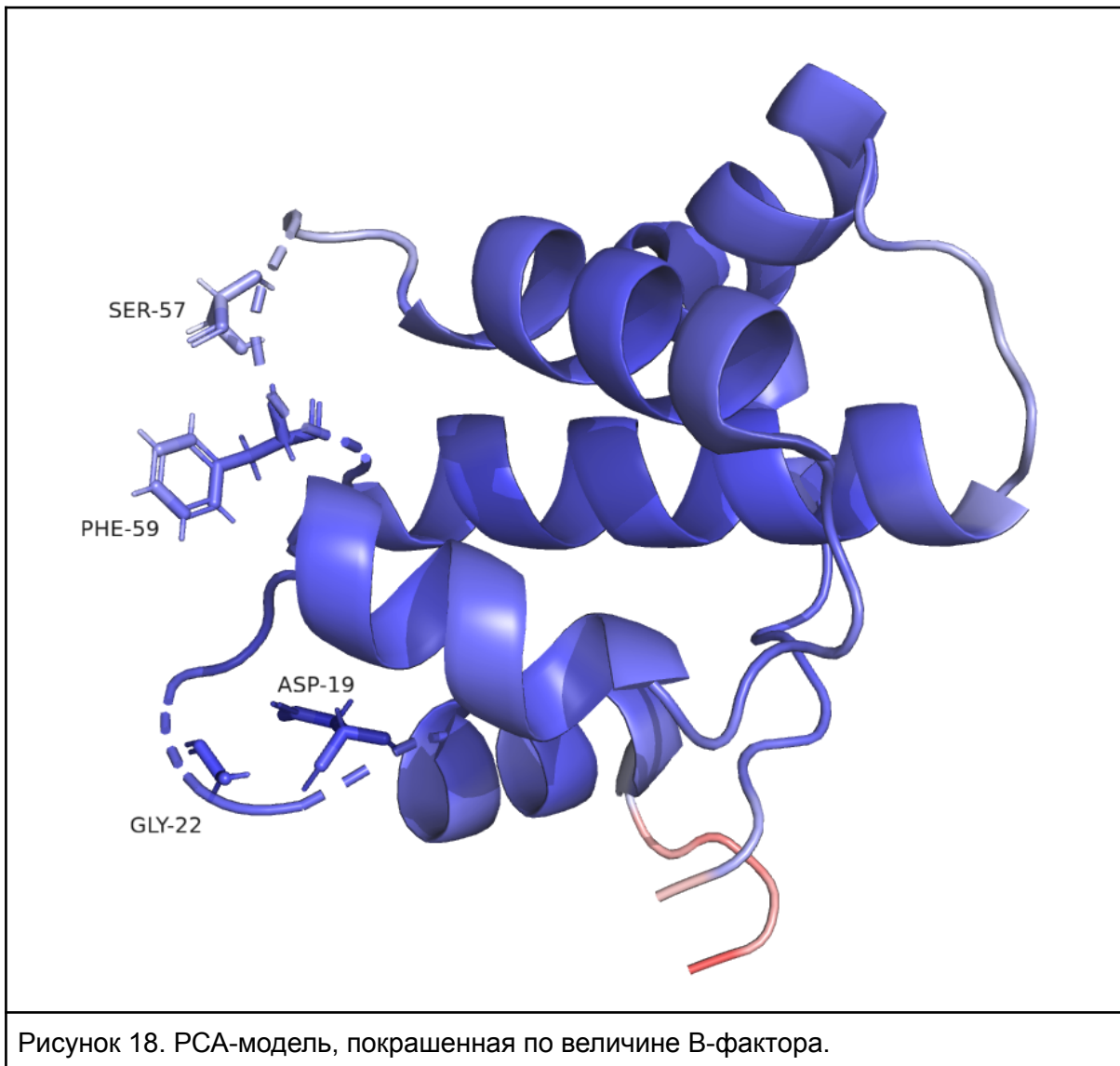


Рисунок 17. Минимальное, медианное и максимальное расстояние между атомами в ансамбле ЯМР-моделей.

В данном случае мы видим структуры со слабой водородной связью (расстояния 3.6 Å - 3.7 Å), с сильной водородной связью и вообще с полным ее отсутствием. Соотносится ли это с величиной В-фактора?

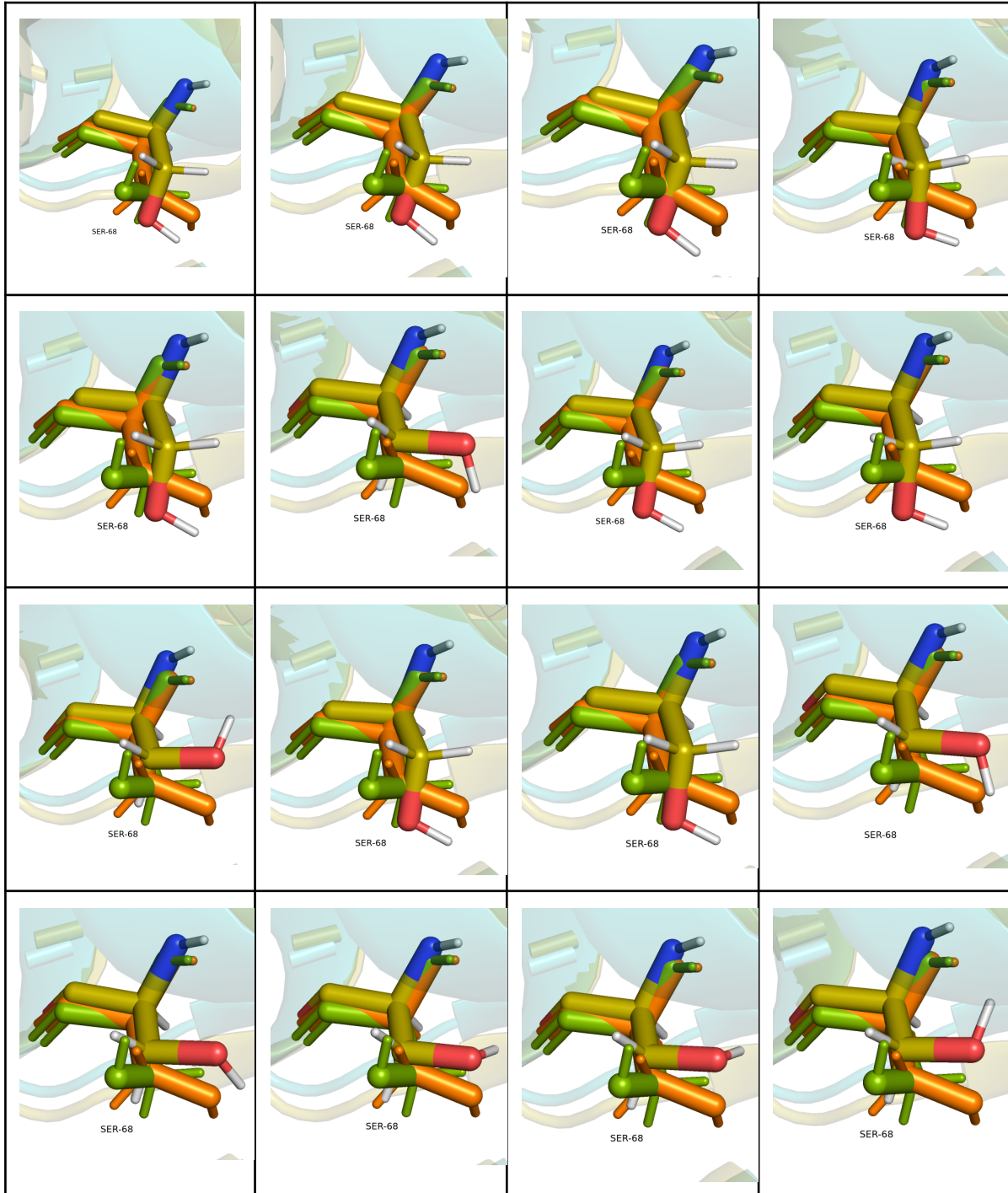


И действительно, более подвижная по нашим предположением петля имеет большую величину В-фактора по сравнению со стабильной петлей.

В общем, стоит отметить, что вариации в ансамбле ЯМР-моделей действительно могут отражать подвижность отдельных участков молекул белка, однако утверждать это можно при достаточно неплохой сходимости в моделях. Расстояния между остатками в ЯМР-ансамбле стабильны внутри стабильных участков молекулы (например, стабильные петли и внутренние связи в глобуле) и менее стабильны внутри подвижных участков.

Дополнение: альт-локи и ЯМР

В процессе поиска аминокислотных остатков я обнаружила, что для остатка серина-68 имеется два альт-лока. Как эти альтернативные положения соотносятся с ансамблем ЯМР-моделей?



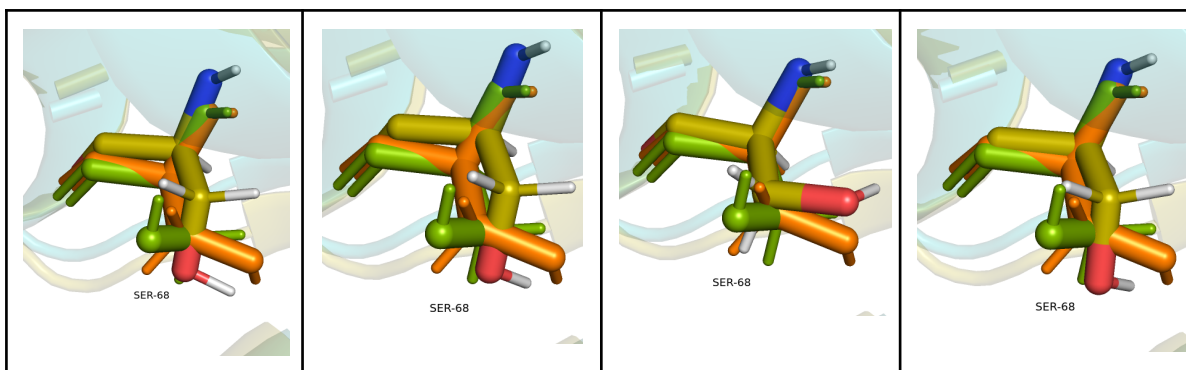


Рисунок 19. Альт-локи PCA структуры и соответствующие им положения боковой группы ЯМР-моделей. Оранжевым окрашен альт-лок “А”, зеленым -- “В”, оливковым -- одна из ЯМР-моделей.

В 8 из 20 (40%) моделей положение группы в целом соответствует альт-локу “А”, альт-локу “В” не соответствует ни одна из моделей ЯМР. Остальные 12 моделей (60%) располагают группу достаточно близко к PCA-моделям: она располагается как бы между альт-локами. Это в некоторой степени полностью отражает заселенность в PCA-модели: альт-лок “А” встречается в 41% ячеек (у нас 8 из 20 моделей -- 40%), а вот альт-лок “В” -- в 59% (у нас 12 из 20 моделей -- 59%). Конечно, второе частое положение группы не совсем соответствует альт-локу “В”, однако соотношения положений в моделях обоих методов совпадают. Это может говорить о том, что альт-лок “В” является не совсем нативным, однако данный аминокислотный остаток в растворах может принимать два разных положения с такой же частотой, которую мы и наблюдаем в кристалле.