

Лабораторная работа № 5

«МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОГО СТРОЕНИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ»

Для моделирования пространственного строения биологической макромолекулы необходимо сначала найти информацию о ее первичной нуклеотидной или аминокислотной последовательности.

Рассмотрим, как это осуществить при помощи поисковой базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI -National Centre for Biotechnological Information) и Белкового банка данных (Protein Data Bank, PDB).

Поиск с помощью базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI)

Для этой цели в веб браузере откроем URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

На открывшейся странице проведем поиск фермента пируватдегидрогеназы человека, для этого в поисковой строке введем: *pyruvate dehydrogenase Homo sapiens*, а в раскрывающемся контекстном меню выберем All Databases (Все базы данных). В результатах поиска в разделе Proteins (Белки) и подразделе Structure (Структура) выберем запись со следующей цифровой подписью (Human Pyruvate Dehydrogenase[Oxidoreductase, EC: 1.2.4.1]) и номером (MMDB ID: 23453 PDB ID: 1NI4). В открывшемся окне (рисунок 1) скачиваем в строке (PDB ID: 1NI4) файл: (1ni4.pdb), нажав кнопку Download.

The screenshot shows the NCBI Structure Summary page for Human Pyruvate Dehydrogenase (PDB ID: 1NI4). The page includes the following information:

- Structure Summary MMDB**
- 1NI4: Human Pyruvate Dehydrogenase**
- Citation:** Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase. Ciszak EM, Korotchkina LG, Dominiak PM, Sidhu S, Patel MS. J Biol Chem (2003) 278 p.21240-6.
- Abstract:** The derivative of vitamin B1, thiamin pyrophosphate, is a cofactor of enzymes performing catalysis in pathways of energy production. In alpha2beta2-gammatetrameric human pyruvate dehydrogenase, this cofactor is used to cleave the Ca(alpha-Ci-O) bond of pyruvate followed by reductive acetyl transfer to lipoyl-dihydrolipoamide acetyltransferase. The dynamic nonequivalence of two,...
- PDB ID:** 1NI4
- MMDB ID:** 23453
- PDB Deposition Date:** 2002/12/20
- Updated in MMDB:** 2012/10
- Experimental Method:** x-ray diffraction
- Resolution:** 1.95 Å
- Source Organism:** Homo sapiens
- Similar Structures:** (link to similar structures)
- Biological Unit:** Asymmetric Unit
- Biological Unit for 1NI4:** tetrameric; determined by author and by software (PISA)
- Molecular Graphic:** 3D view of the protein structure.
- Interactions:** Diagram showing subunits A, B, C, and D.
- Download Structure Data:** (link to download structure data)
- Download Ch3D:** (link to download Ch3D)

Рисунок 1 – Результат поиска фермента пируватдегидрогеназы человека с помощью базы данных NCBI

Поиск с помощью Белкового банка данных (PDB)

Второй способ получения необходимого файла проведем с помощью Белкового банка данных (Protein Data Bank, PDB): <https://www.rcsb.org>

Для этого на главной странице в строке поиска нужно ввести «1NI4» или *pyruvate dehydrogenase* (*Homo sapiens* нужно выбрать в разделе **Refinements – Уточнения**). В появившемся списке найти запись «1NI4. HUMAN PYRUVATE DEHYDROGENASE» и открыть ее.



Рисунок 2 – Результат поиска фермента пируватдегидрогеназы человека с помощью Белкового банка данных (PDB)

Затем нужно в опции сохранения (**Download Files**) выбрать «**PDB format**» (рисунок 2). Файл **1ni4.pdb** автоматически скачается на компьютер.

Задание 1. Схожим образом скачайте файлы для ферментов *малатдегидрогеназы* (*malate dehydrogenase*) и *цитратсинтазы* (*citrate synthase*) человека и кишечной палочки (*Escherichia coli*).

Построение модели пространственного строения макромолекулы белка при помощи RasMol_2.7.4.2

Как уже не раз отмечалось, файлы в формате GenBank представляют белки как строки символов 20-и буквенного алфавита. Хотя эти строки и несут информацию, как, например, ДНК, эта информация реализуется через трехмерную структуру белка и присущие ему свойства. Мы будем использовать бесплатную кросс-платформенную программу **RasMol** для визуализации этой структуры. <http://rasmol.org>

1) Скачайте программу **RasMol** по ссылке:

http://www.rasmol.org/software/RasMol_2.7.4.2_Windows_Installer.exe

и установите её на компьютер.

2) Запустите установленную программу **RasMol**.

После запуска программы RasMol на панели задач внизу появляется свернутое командное окно **RasMol Command Line**, которое активизируется кликом мыши. Если уменьшить его размеры, можно иметь на экране одновременно и рабочее окно программы с молекулой, и командное окно.

Нажатие левой клавиши мыши на атоме в основном окне дает его краткую характеристику в командном, например:

Atom: CA 2092 Group: Asp 54 Chain: H

(α -углеродный атом, 2092-й в молекуле, входит в состав аспарагиновой кислоты, стоящей на 54 месте в Н-цепи молекулы).

При помощи командного окна можно выполнять на клавиатуре все операции, доступные через пункты меню основного окна программы, а также выделять отдельные атомы и группы в молекуле, изменять фон изображения и др.

Выделение осуществляется вводом **select**, обозначения объекта выделения и нажатием Enter. Можно выделять:

атомы определенного химического элемента (по порядковому номеру в Периодической таблице Д.И.Менделеева (например, кислород:)

select elemno=8

определенное вещество (например, воду:)

select HON

определенные аминокислоты (используются стандартные трехбуквенные латинские обозначения)

select lys

select lys, arg, val

конкретную аминокислоту

select asp54

группы аминокислот (полярные, кислые, основные, гидрофобные)

select hydrophobic

select polar

небелковые компоненты молекулы (гетероатомы)

select hetero.

После выделения атомов или групп можно изменять их отображение при помощи команд пунктов меню **Вид, Цвет**. После выделения все команды касаются только выделенных элементов молекулы; чтобы снова изменить всю молекулу в целом, необходимо ввести **select all**, или использовать пункт меню **Edit - Select all**.

Командное окно позволяет также изменять цвет фона (введением **Background** (Фон) и желаемого цвета (**white**):

background white

Кроме того, имеется также on-line manual, содержащий полный набор команд и ключей программы.

http://www.rasmol.org/software/RasMol_2.7.4.2_Manual.html

3) Загрузите файл **1ni4.pdb** при помощи команды **Открыть (Open)** из меню **Файл (File)**.

4) Белок появится в изображении **Каркас (Wireframe)**. Данное изображение бывает полезно для биологов, поскольку позволяет изучать отдельные аминокислоты, но в этом случае может быть сложно связать их с первичной структурой белка, то есть с его последовательностью.

5) Выберите из меню **Вид (Display)** режим **Скелет (Backbone)**. Вы увидите начало белка, однако его конец будет трудно найти на экране.

6) Выберите в меню **Цвет** режим **Индекс**. Теперь вы можете проследить всю цепь благодаря градиенту цвета от голубого до красного, вращая молекулу с помощью вертикального и горизонтального бегунков.

7) Выберите из меню **Вид** режим **Молекулярная поверхность**. Теперь вы можете наблюдать белок как целостный объект, а не набор точек и линий с промежутками между ними. Но такой вариант просмотра затрудняет изучение внутренних структур и работать в нем неудобно.

8) Выберите из меню **Вид** режим **Ленты** и попробуйте вращать и перемещать молекулу. Вращать (rotate) молекулу белка можно при помощи левой кнопки мыши или правой кнопки мыши + Shift key; перемещать (move) – при помощи правой кнопки мыши; увеличивать или уменьшать масштаб изображения при помощи Shift key + левой кнопки мыши.

Теперь давайте взглянем на лиганд этого фермента.

1) Выберите в меню **Вид** режим **Каркас**.

2) Выберите в меню **Цвет** режим **Химический элемент**.

Каждый химический элемент отображается своим цветом, как в таблице ниже.

Element	Colour Name	Sample	RGB Values	Hexadecimal
Carbon	light grey		[200,200,200]	C8C8C8
Oxygen	red		[240,0,0]	F00000
Hydrogen	white		[255,255,255]	FFFFFF
Nitrogen	sky blue		[143,143,255]	8F8FFF
Sulfur	yellow		[255,200,50]	FFC832
Phosphorus	orange		[255,165,0]	FFA500
Chlorine	green		[0,255,0]	00FF00
Bromine, Zinc	brown		[165,42,42]	A52A2A
Sodium	blue		[0,0,255]	0000FF
Iron	orange		[255,165,0]	FFA500
Magnesium	forest green		[34,139,34]	228B22
Calcium	dark grey		[128,128,144]	808090
Unknown	deep pink		[255,20,147]	FF1493

3) В командной строке наберите **select ligand**.

4) Выберите в меню Вид режим Ван-дер-Ваальсов радиус.

Теперь вы видите лиганд пируватдегидрогеназы (рисунок 3). Очевидно, что он находится внутри молекулы белка.

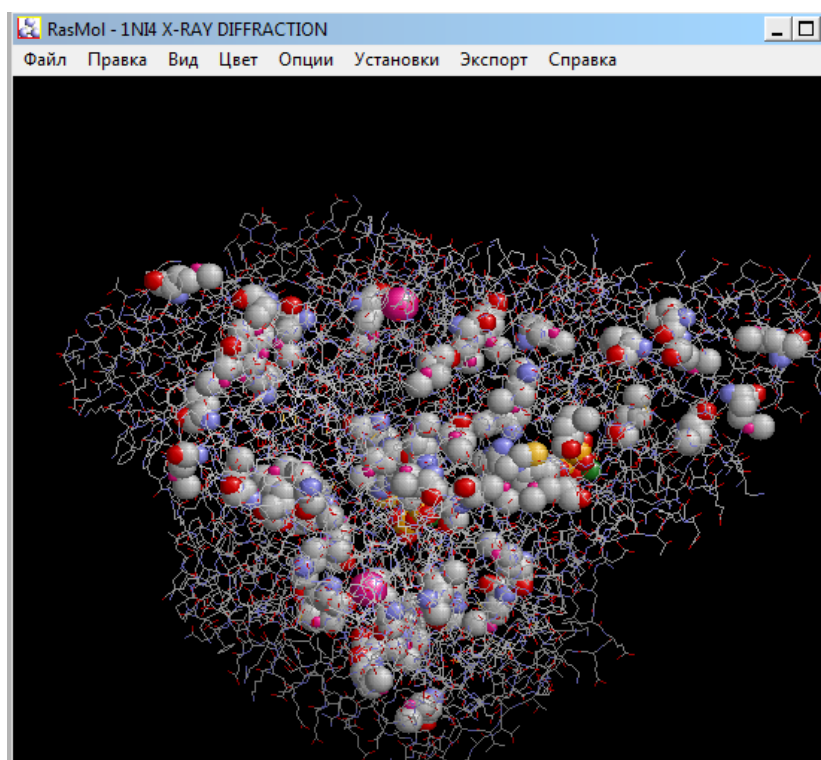


Рисунок 3 – Лиганды пируватдегидрогеназы

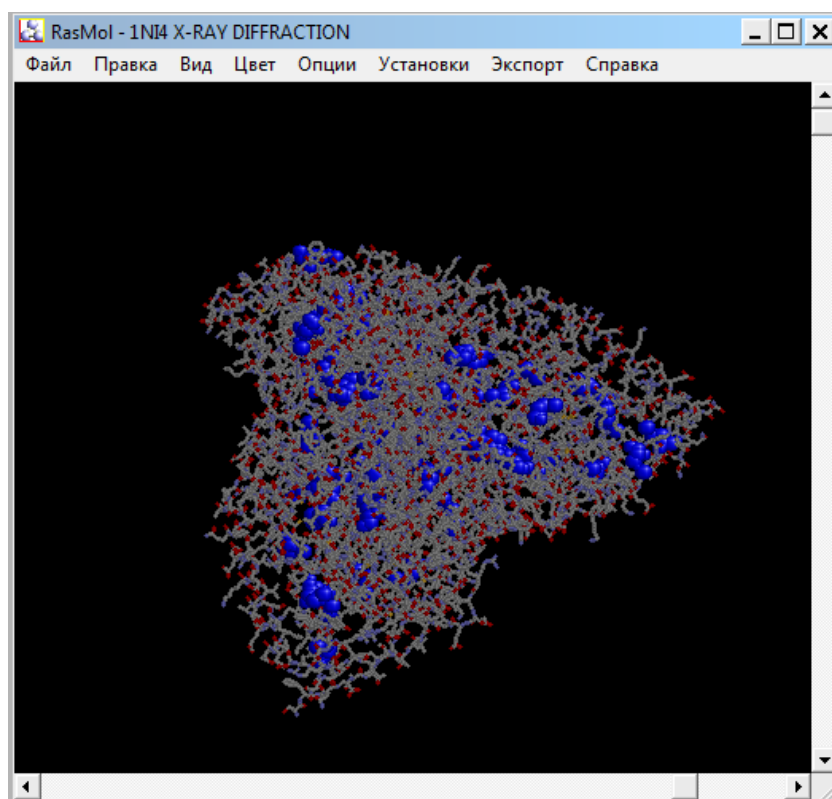


Рисунок 4 – Белковая часть пируватдегидрогеназы

- 1) В командной строке наберите **colour blue**.
- 2) В командной строке наберите **select protein**.
- 3) Выберите в меню **Вид режим Атомы и связи**.

Вращая молекулу, вы можете увидеть, что молекула, окрашенная в синий цвет (лиганд фермента) находится в «кармане» на поверхности белка (рисунок 4). Так происходит каталитическая реакция.

Необходимо отметить, что изменения в молекуле белка в области связывания фермента вследствие мутации в ДНК может привести к нарушению взаимодействия молекул. Вероятно, что связывания не произойдёт вообще. Однако изменения в других частях молекулы белка могут не повлиять на связывание.

Задания для самоконтроля

1. Проведите весь цикл заданий с помощью программы RasMol для фермента изоцитратдегидрогеназы (isocitrate dehydrogenase) *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Проведите весь цикл заданий с помощью программы RasMol для фермента изоцитратдегидрогеназы (isocitrate dehydrogenase) *Homo sapiens*.
3. Проведите весь цикл заданий с помощью программы RasMol для фермента малатдегидрогеназы (malate dehydrogenase) *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Проведите весь цикл заданий с помощью программы RasMol для фермента малатдегидрогеназы (malate dehydrogenase) *Homo sapiens*.
5. Проведите весь цикл заданий с помощью программы RasMol для фермента цитратсинтазы (citrate synthase) *Saccharomyces cerevisiae*.
6. Проведите весь цикл заданий с помощью программы RasMol для фермента цитратсинтазы (citrate synthase) *Homo sapiens*.