## 3. vaja

Interakcije med proteini so stabilizirane s tvorbo različnih vrst nekovalentnih interakcij med vezavnima partnerjema (vodikove vezi, van der Waalsove sile, hidrofobne interakcije, ...). Pomembno vlogo pri specifičnosti interakcije odigra komplementarnost površin med vezavnima partnerjema, ki omogoča, da se molekuli geometrično orientirata tako, da se lahko zgoraj omenjene interakcije vzpostavijo. Večja kot je interakcijska površina, močnejša je ponavadi vezava.

Kot primer interakcije boste na vajah analizirali vezavo inhibitorja p41 fragment nevariantne verige v aktivno mesto katepsina L. Gre za primer izjemno močne interakcije, ravnotežna konstanta disociacije (konstanta inhibicije) kompleksa je okoli 10 pM.

<u>Naložite PDB datoteko s koordinatami kompleksa</u> (PDB koda 1ICF). V osnovni celici kristalne strukture sta dva para molekul kompleksa. Za lažje delo je najbolje enega izmed njiju odstraniti (kakor tudi vse heteroatome). To najlažje storite tako, da model razdelite na kovalentno povezane dele z ukazom *»split connected*«, ki ga vnesete v ukazno vrstico. Ugotovite, katera dva modela predstavljata en kompleks in preostala dva zbrišite (ali deaktivirajte).

Analizirajte interakcije med molekulama, tako vodikove vezi kot ostale kontakte, kot ste to naredili na prejšnjih vajah. Ugotovite, kako je stabiliziran Cys25 v aktivnem mestu encima.

Oglejte si komplementarnost površin med obema molekulama, najprej tako, da prikažete vsako od njiju v prikazu molekulske površine. Za podrobnejšo analizo interakcijskih površin je na voljo ukaz  $Tools \rightarrow Surface/Binding$ Analysis  $\rightarrow$  Intersurf (slika desno). Program vam daje tudi možnost, s katero vam označi vse atome v stičnih površinah, na spodnjem histogramu pa lahko spreminjate obarvanost stične površine. Ustvarite stično površino in si jo oglejte. Za kvantifikacijo intezitete interakcije lahko izmerimo volumen in površino stične površine. To storimo z ukazom  $Tools \rightarrow Surface/Binding$ Analysis→Measure Volume and Area (slika spodaj).

🔍 Measure Volume and Area 🛛 🗖 📉 🗙					
Surface	Interface Surface (#0.1)				
Volume = 300.7 (1 holes)					
Area = 2667					
Update automatically					
	Update Close Help				

Q	Compute Interface Surface	,	_		x	
Molecules Chains						
 1icf 1 (≢0.1 <u>1icf 4 (</u> ≢0.4						
🔽 Solid su	rface (rather than mesh)					
Reuse la	ast surface (if any)					
Select interface atoms						
Residue centroid distance pruning						
Prune distance: 30.0						
Molecule bia:	s: 🔳 0.5					
	Ctrl-click on histogram to add or de	elete thre	sholds			
2.80548					43.4966	
	Value 3.50128	Co	olor			
		OK A	pply	Close	Help	

**Naloga**: na podoben način analizirajte še interakcijo med človeškim rastnim hormonom in njegovim receptorjem (PDB koda 3HHR). Kot ste spoznali na predavanjih, v tem primeru ena molekula liganda interagira z dvema molekulama receptorja na asimetričen način. Analizirajte interakcijo liganda z vsako molekulo receptorja posebej in ju primerjajte. Kaj ugotovite?

Ukaz MatchMaker, ki ste ga do sedaj uporabili za strukturno prileganje dveh modelov istega proteina, se v splošnem uporablja za ustvarjanje strukturnih poravnav proteinov s podobno tridimenzionalno strukturo (najbolj učinkovito seveda deluje v primeru homologov), na podlagi katerih lahko izračuna tudi poravnavo primarnih struktur (avtomatsko ali preko ulaza Tools  $\rightarrow$  Structure Comparison  $\rightarrow$  Match-Align. Na tem mestu ga bomo uporabili za poravnavo struktur katepsina K (PDB koda 1ATK) ter katepsina B (PDB koda 1GMY).

Katepsin B glede na katepsin K vsebuje insercijo, ki jo imenujemo zaporna zanka in prekriva del aktivnega mesta (zato katepsin B deluje kot karboksidipeptidaza). <u>Poiščite zaporno zanko v</u> tridimenzionalni strukturi in v primarni strukturi katepsina B in jo označite.

Reference Match	וMaker — 🗖 🗙				
Reference structure:	eference structure: Structure(s) to match:				
1ATK.pdb (#0)	1ATK.pdb (#0)				
1gmy (#1)	1gmy (#1)				
Further restrict matching to current selection	Further restrict matching to current selection				
Chain pairing					
<ul> <li>Best-aligning pair of chains between reference and match structure</li> </ul>					
C Specific chain in reference structure with best-aligning chain in match structure					
C Specific chain(s) in reference structure with specific chain(s) in match structure					
Alignment algorithm: Needleman-Wunsch 🔟 Matrix: BLOSUM-62 🛁					
Gap opening penalty 12 Gap extension penalty 1					
✓ Include secondary structure score (30%) Show parameters					
Compute secondary structure assignments					
✓ Show pairwise alignment(s)					
Matching					
Iterate by pruning long atom pairs until no pair exceeds:					
2.0 angstroms					
After superposition, compute structure-based multiple sequence alignment					
Save settings	Reset to defaults				
	OK Apply Cancel Help				

**Naloga:** Na podoben način kot ste primerjali molekuli katepsin B in katepsina K, primerjajte še katepsina K in dipeptidil-peptidaze I (PDB koda 1K3B). Kaj opazite? Kakšno zvitje ima dodaten del? V resnici je DPPI tetramer. V PDB datoteki je prikazana le ena podenota, ki predstavlja asimetrično enoto kristala. Celoten tetramer dobite iz baze PDB v obliki »Biological Assembly«. Datoteka s strukturo tetramera DPPI je za vas že pripravljena. Oglejte si jo in komentirajte, kako je tetramer sestavljen. Analizirajte kontaktne površine med podenotami. Kot mejo za maksimalno razdaljo med dvema površinama, ki še šteje za stično površino, nastavite 5 Å (slika desno).

Q	Compute Interface Surface	e — 🗖 🗙				
Molecule	s Chains					
DPPI_te DPPI_t DPPI_te DPPI_te	ramer.pdb (#0.1) tramer.pdb (#0.2) tramer.pdb (#0.3) tramer.pdb (#0.4)					
Solic	I surface (rather than mesh)					
🗌 Reu:	e last surface (if any)					
Sele	ct interface atoms					
🔽 Resi	due centroid distance pruning					
Prune dis	Prune distance: 5					
Molecule	bias: 🔳 0.5	▶				
Ctrl-click on histogram to add or delete thresholds						
		Π				
2.06029		17.1129				
	Value	Color No				
		OK Apply Close Help				