

BIOINFORMATICĂ APLICATĂ ÎN BIOLOGIA STRUCTURALĂ

Seminar IX

Baza de date RCSB PDB și identificarea
aminoacizilor din situsul catalitic

Care sunt aminoacizii cu care interacționează glicerolul din situs-ul activ al 2,6-Dihydroxipiridin 3-hidroxilazei produse de *Arthrobacter nicotinovorans*?

doi:10.1016/j.jmb.2008.03.032

J. Mol. Biol. (2008) 379, 94–104

JMB

Available online at www.sciencedirect.com



ScienceDirect



ELSEVIER

Structure of 2,6-Dihydroxypyridine 3-hydroxylase from a Nicotine-degrading Pathway

Nora Treiber and Georg E. Schulz*

Institut für Organische
Chemie und Biochemie,
Albert-Ludwigs-Universität,
Albertstr. 21, 79104 Freiburg
im Breisgau, Germany

Received 19 February 2008;
received in revised form
17 March 2008;
accepted 18 March 2008
Available online
26 March 2008

The enzyme 2,6-dihydroxypyridine-3-hydroxylase catalyzes the sixth step of the nicotine degradation pathway in *Arthrobacter nicotinovorans*. The enzyme was produced in *Escherichia coli*, purified and crystallized. The crystal structure was solved at 2.6 Å resolution, revealing a significant structural relationship with the family of FAD-dependent aromatic hydroxylases, but essentially no sequence homology. The structure was aligned with those of the established family members, showing that the FAD molecules are bound at virtually identical locations. The reported enzyme is a dimer like most other family members, but its dimerization contact differs from the others. The binding position of NAD(P)H to this enzyme family is not clear. Since the reported enzyme accepts only NADH for flavin reduction in contrast to the other established members using NADPH, we searched through the structural alignment and found an indication for the position of the 2'-phosphate of NADPH that is in general agreement with mutational studies on a related enzyme, but contradicts a crystal soaking experiment. Using a bound glycerol molecule and the known substrate positions of three related enzymes as a guide, the substrate 2,6-dihydroxypyridine was placed into the active center. The access to the binding site is discussed. The new active center geometry introduces constraints that render some reaction scenarios more likely than others. It suggests that flavin is reduced at its *out*-position and then drawn into its *in*-position, where it binds molecular oxygen. The geometry is consistent with the proposal that peroxy-flavin is protonated by the solvent to yield the electrophilic hydroperoxy-flavin. The substrate is activated by two buried histidines but there is no appropriate base to store the surplus proton of the hydroxylated carbon atom. The implications of this problem are discussed.

Protein Data Bank accession code

The coordinates and structure factors have been deposited in the RCSB Protein Data Bank under accession code **2vou**.

Identificarea unui fișier cu coordonate tridimensionale în RCSB PDB

1. **Accesați** <https://www.rcsb.org/>
2. **În căsuța de căutare introduceți PDB ID-ul identificat din lucrare – 2vou;**

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB

RCSB PDB PROTEIN DATA BANK 138878 Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education

Search by PDB ID, author, macromolecule, sequence, or ligands Go

Advanced Search | Browse by Annotations

PDB-101 WORLDWIDE PDB PROTEIN DATA BANK EMDataBank NUCLEIC ACID DATABASE Worldwide Protein Data Bank Foundation

Welcome

Deposit

Search

Visualize

Analyze

Download

Learn

A Structural View of Biology

This resource is powered by the Protein Data Bank archive-information about the 3D shapes of proteins, nucleic acids, and complex assemblies that helps students and researchers understand all aspects of biomedicine and agriculture, from protein synthesis to health and disease.

As a member of the wwPDB, the RCSB PDB curates and annotates PDB data.

The RCSB PDB builds upon the data by creating tools and resources for research and education in molecular biology, structural biology, computational biology, and beyond.

New Video: What is a Protein?

VIDEO WHAT IS A PROTEIN?

March Molecule of the Month

Vacuolar ATPase

Structura paginii corespunzătoare unui PDB ID

RCSB PDB Deposit Search Visualize Analyze Download Learn More MyPDB

138878 Biological Macromolecular Structures Enabling Breakthroughs in Research and Education

Search by PDB ID, author, macromolecule, sequence, or ligands Go

Advanced Search | Browse by Annotations

Structure Summary 3D View Annotations Sequence Sequence Similarity Structure Similarity Experiment

Biological Assembly 1

2VOU 1

Structure of 2,6-dihydropyridine-3-hydroxylase from *Arthrobacter nicotinovorans* 2

DOI: 10.2210/pdb2VOU/pdb

Classification: [OXIDOREDUCTASE](#)

Organism(s): [Paenarthrobacter nicotinovorans](#)

Expression System: [Escherichia coli BL21\(DE3\)](#)

Mutation(s): 1

Deposited: 2008-02-21 Released: 2008-05-13

Deposition Author(s): [Treiber, N., Schulz, G.E.](#)

Experimental Data Snapshot

Method: [X-RAY DIFFRACTION](#)

Resolution: 2.6 Å 3

R-Value Free: 0.222

R-Value Work: 0.185

3D View: Structure | Electron Density | Ligand Interaction 4

Standalone Viewers

Protein Workshop | Ligand Explorer

Global Symmetry: Cyclic - C2 (3D View)

Global Stoichiometry: Homo 2-mer - A2

Biological assembly 1 assigned by authors and generated by PISA (software)

wwPDB Validation

Metric	Percentile Ranks	Value
Rfree		0.212
Clashscore		7
Ramachandran outliers		0.1%
Sidechain outliers		4.2%
RSRZ outliers		6.2%

This is version 1.1 of the entry. See complete history.

Literature Download Primary Citation

Display Files Download Files 6

1. PDB ID-ul corespunzător intrării în baza de date;
2. Denumirea proteinei corespunzătoare din baza de date;
3. Date referitoare la metoda experimentală de stabilire a structurii 3D;
4. Imagine cu structura 3D;
5. Date statistice legate de procesul de validare;
6. Buton de descărcare.

3. Apăsați butonul Download Files și selectați PDB Format. Salvați fișierul rezultat în folderul dm.v. sub numele 2vou.pdb

Display Files Download Files

FASTA Sequence

thro

PDB Format

PDB Format (gz)

PDBx/mmCIF Format

PDBx/mmCIF Format (gz)

PDBML/XML Format (gz)

Biological Assembly 1

Biological Assembly 2

Structure Factors (CIF)

Structure Factors (CIF - gz)

2fo-fc Map (DSN6)

fo-fc Map (DSN6)

worse

Percentile relative to X-ray structures of similar resolution

Structura fisierului cu coordonate tridimensionale in format PDB

4. Deschideți fișierul 2vou.pdb descărcat cu ajutorul unui editor text pentru a vizualiza conținutul (click dreapta pe fisier, Open with > Chose another app > WordPad. Selectați întreg textul și reduceți dimensiunea fontului pentru a obține o imagine similară cu cea de mai jos)

```
HEADER      OXIDOREDUCTASE                21-FEB-08   2VOU
TITLE       STRUCTURE OF 2,6-DIHYDROXYPYRIDINE-3-HYDROXYLASE FROM
TITLE       2 ARTHROBACTER NICOTINOVORANS
COMPND      MOL_ID: 1;
COMPND      2 MOLECULE: 2,6-DIHYDROXYPYRIDINE HYDROXYLASE;
COMPND      3 CHAIN: A, B, C;
COMPND      4 SYNONYM: 2,6-DIHYDROXYPYRIDINE-3-HYDROXYLASE, DHPH;
COMPND      5 EC: 1.14.13.10;
COMPND      6 ENGINEERED: YES;
COMPND      7 MUTATION: YES
SOURCE      MOL_ID: 1;
SOURCE      2 ORGANISM_SCIENTIFIC: ARTHROBACTER NICOTINOVORANS;
SOURCE      3 ORGANISM_TAXID: 29320;
SOURCE      4 EXPRESSION_SYSTEM: ESCHERICHIA COLI;
SOURCE      5 EXPRESSION_SYSTEM_TAXID: 469008;
SOURCE      6 EXPRESSION_SYSTEM_STRAIN: BL21 (DE3)
KEYWDS      OXIDOREDUCTASE, AROMATIC HYDROXYLASE, NICOTINE DEGRADATION, FLAVIN
KEYWDS      2 MONO-OXYGENASE, FAD-DEPENDENT HYDROXYLASE
EXPDTA      X-RAY DIFFRACTION
AUTHOR      N.TREIBER,G.E.SCHULZ
REVDAT      4   13-JUL-11 2VOU   1   VERSN
REVDAT      3   24-FEB-09 2VOU   1   VERSN
REVDAT      2   20-MAY-08 2VOU   1   JRNL
REVDAT      1   13-MAY-08 2VOU   0
JRNL        AUTH  N.TREIBER,G.E.SCHULZ
JRNL        TITL  STRUCTURE OF 2,6-DIHYDROXYPYRIDINE 3-HYDROXYLASE FROM A
JRNL        TITL 2 NICOTINE-DEGRADING PATHWAY.
JRNL        REF   J.MOL.BIOL.          V. 379    94 2008
JRNL        REFN                      ISSN 0022-2836
JRNL        EMID  18440023
JRNL        DOI   10.1016/J.JMB.2008.03.032
```

```
REMARK 800 SITE_IDENTIFIER: AC1
REMARK 800 EVIDENCE_CODE: SOFTWARE
REMARK 800 SITE_DESCRIPTION: BINDING SITE FOR RESIDUE FAD A1395
REMARK 800
REMARK 800 SITE_IDENTIFIER: AC2
REMARK 800 EVIDENCE_CODE: SOFTWARE
REMARK 800 SITE_DESCRIPTION: BINDING SITE FOR RESIDUE GOL A1396
REMARK 800
REMARK 800 SITE_IDENTIFIER: AC3
REMARK 800 EVIDENCE_CODE: SOFTWARE
REMARK 800 SITE_DESCRIPTION: BINDING SITE FOR RESIDUE ACT A1397
REMARK 800
REMARK 800 SITE_IDENTIFIER: AC4
REMARK 800 EVIDENCE_CODE: SOFTWARE
REMARK 800 SITE_DESCRIPTION: BINDING SITE FOR RESIDUE FAD B1389
REMARK 800
```

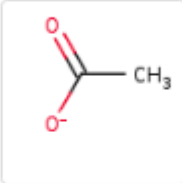
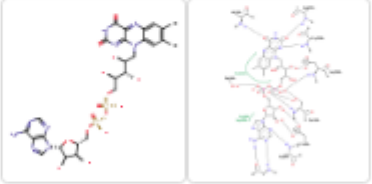
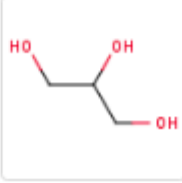
```
ATOM       1  N   SER A   2   46.102  93.157  6.330  1.00  74.24
N
ATOM       2  CA  SER A   2   46.419  92.010  7.235  1.00  75.17
C
ATOM       3  C   SER A   2   46.770  92.444  8.665  1.00  74.57
C
ATOM       4  O   SER A   2   47.719  93.214  8.880  1.00  74.42
O
ATOM       5  CB  SER A   2   47.584  91.144  6.701  1.00  75.29
C
ATOM       6  OG  SER A   2   47.542  90.994  5.285  1.00  77.89
O
ATOM       7  N   PRO A   3   46.029  91.908  9.649  1.00  74.09
N
ATOM       8  CA  PRO A   3   46.441  91.963  11.053  1.00  73.71
C
ATOM       9  C   PRO A   3   47.809  91.298  11.209  1.00  72.86
C
ATOM      10  O   PRO A   3   48.245  90.554  10.317  1.00  73.10
O
ATOM      11  CB  PRO A   3   45.376  91.118  11.755  1.00  73.65
C
ATOM      12  CG  PRO A   3   44.841  90.209  10.636  1.00  74.24
```

Ce tipuri de înregistrări recunoașteți în fișierul deschis?

Identificarea liganzilor în RCSB PDB

5. Reveniți la pagina din RCSB PDB corespunzătoare intrării 2vou și dați identificați secțiunea Small Molecules.

Câte molecule non proteice mici (liganzi) conține molecula deschisă?

Small Molecules				
Ligands 3 Unique				
ID	Chains	Name / Formula / InChI Key	2D Diagram & Interactions	3D Interactions
ACT Query on ACT Download SDF File Download CCD File	A, B, C	ACETATE ION C ₂ H ₃ O ₂ QTBSBXVTEAMEQO-UHFFFAOYSA-M		Ligand Interaction
FAD Query on FAD Download SDF File Download CCD File	A, B, C	FLAVIN-ADENINE DINUCLEOTIDE C ₂₇ H ₃₃ N ₉ O ₁₅ P ₂ VWWQXMAJTJZDQX-UYBVJOGSSA-N		Ligand Interaction
GOL Query on GOL Download SDF File Download CCD File	A, B, C	GLYCEROL GLYCERIN; PROPANE-1,2,3-TRIOL C ₃ H ₈ O ₃ PEDCQBHIVMGVHV-UHFFFAOYSA-N		Ligand Interaction

Fișiere cu structura 3D a liganzilor

5. Apăsați butonul **Ligand Interaction**.

Identificarea liganzilor în RCSB PDB

2VOU

Structure of 2,6-dihydropyridine-3-hydroxylase from *Arthrobacter nicotinovorans*

Note: Use your mouse to drag, rotate, and zoom in and out of the structure. Mouse-over to identify atoms and bonds. [Mouse controls documentation](#).

Display Files Download Files

Structure View Electron Density Maps Ligand Viewer

Ligand View Documentation

The ligand pocket is only visible if the pocket opacity is set to greater than zero.

Ligand [GOL]1396:A

Pocket

Opacity 0

Near Clipping 0

Radius Clipping 0

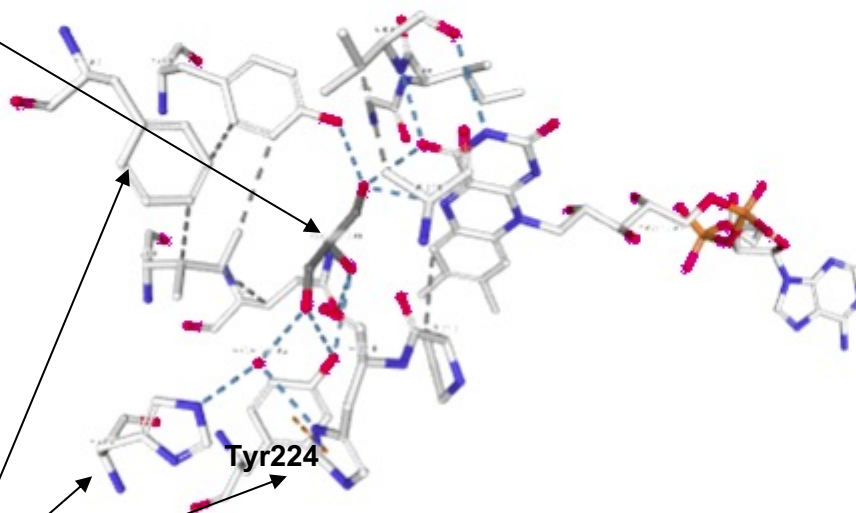
Color By Hydrophobic

Show/hide halogen bonds.

Candidate halogens atoms within 4.0 Å of acceptor atoms.

- Hydrogen Bonds (blue)
- Halogen Bonds (turquoise)
- Hydrophobic Contacts (grey)

Ligandul - GOL

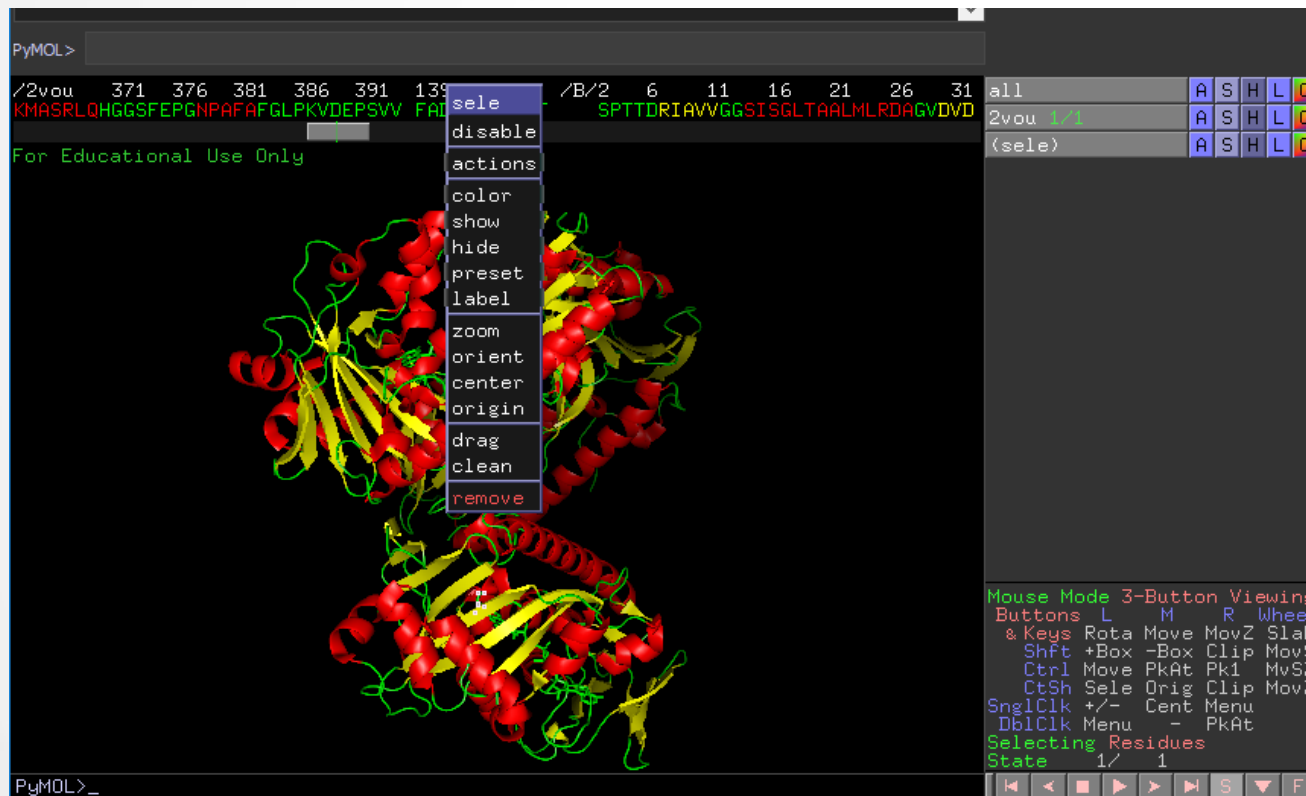


Aminoacizii cu care interacționează

Punctat sunt reprezentate legăturile (de H) în care este implicat ligandul

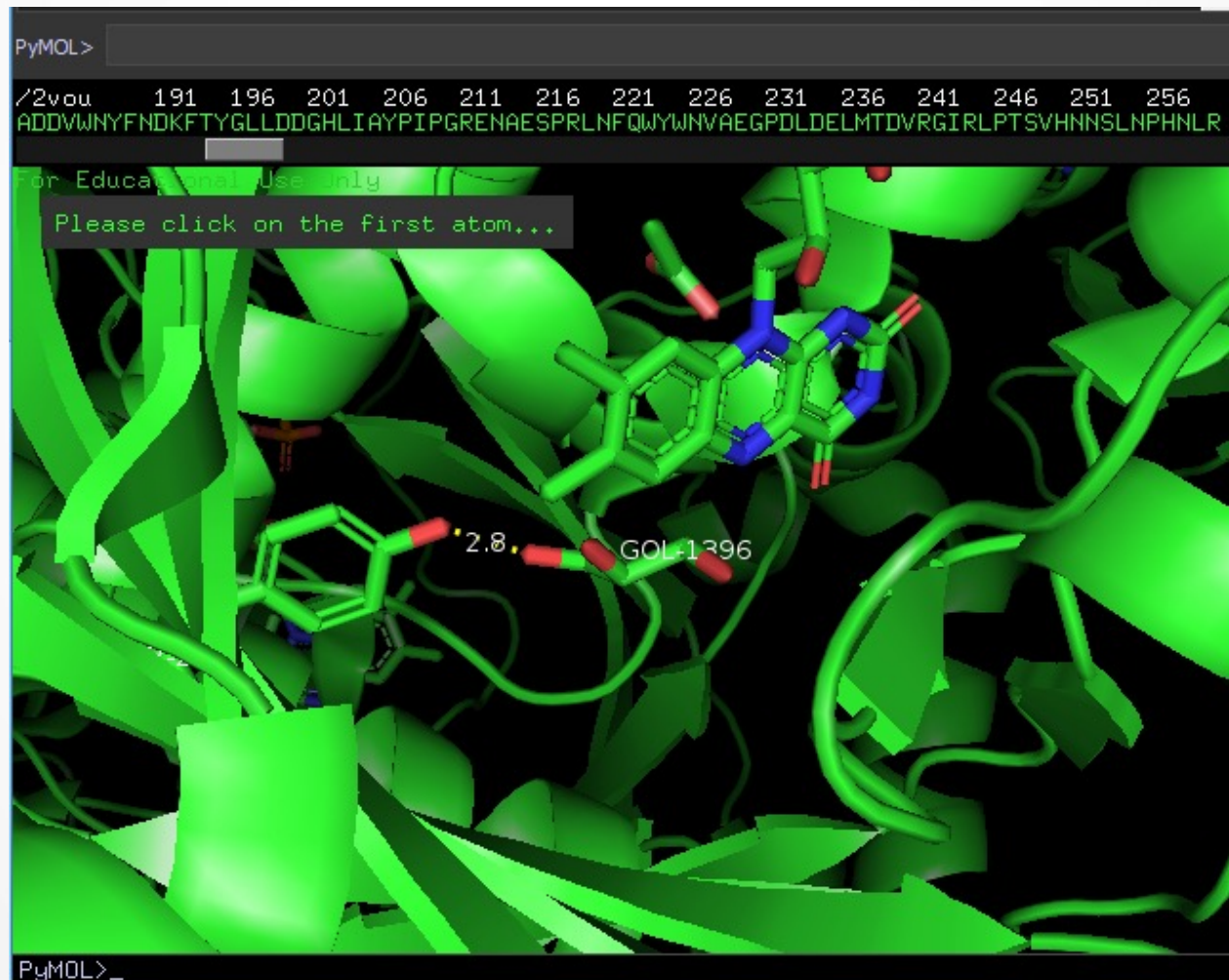
Vizualizarea ligandului în pyMol

1. Lansați PyMol și deschideți fișierul 2vou.pdb;
2. Ascundeți moleculele de apă (A>Remove waters) și colorați molecula funcție de structura secundară;
3. Afișați secvența de aminoacizi și selectați pe secvență ligandul GOL de la sfârșitul catenei A;
4. Click dreapta pe ligandul selectat și alegeți Center. Rotiți molecula stânga-dreapta pentru verifica dacă centrul de rotație al întregii molecule a fost modificat.



Vizualizarea ligandului în pyMol

5. Selectați Tyr224, adăugați la vizualizare modul Licorice > Stiks și măsurați distanța dintre atomul de O al Tyr224 și unul dintre atomii ligandului GOL (Nu uitați să apăsați Done după finalizarea măsurătorii);

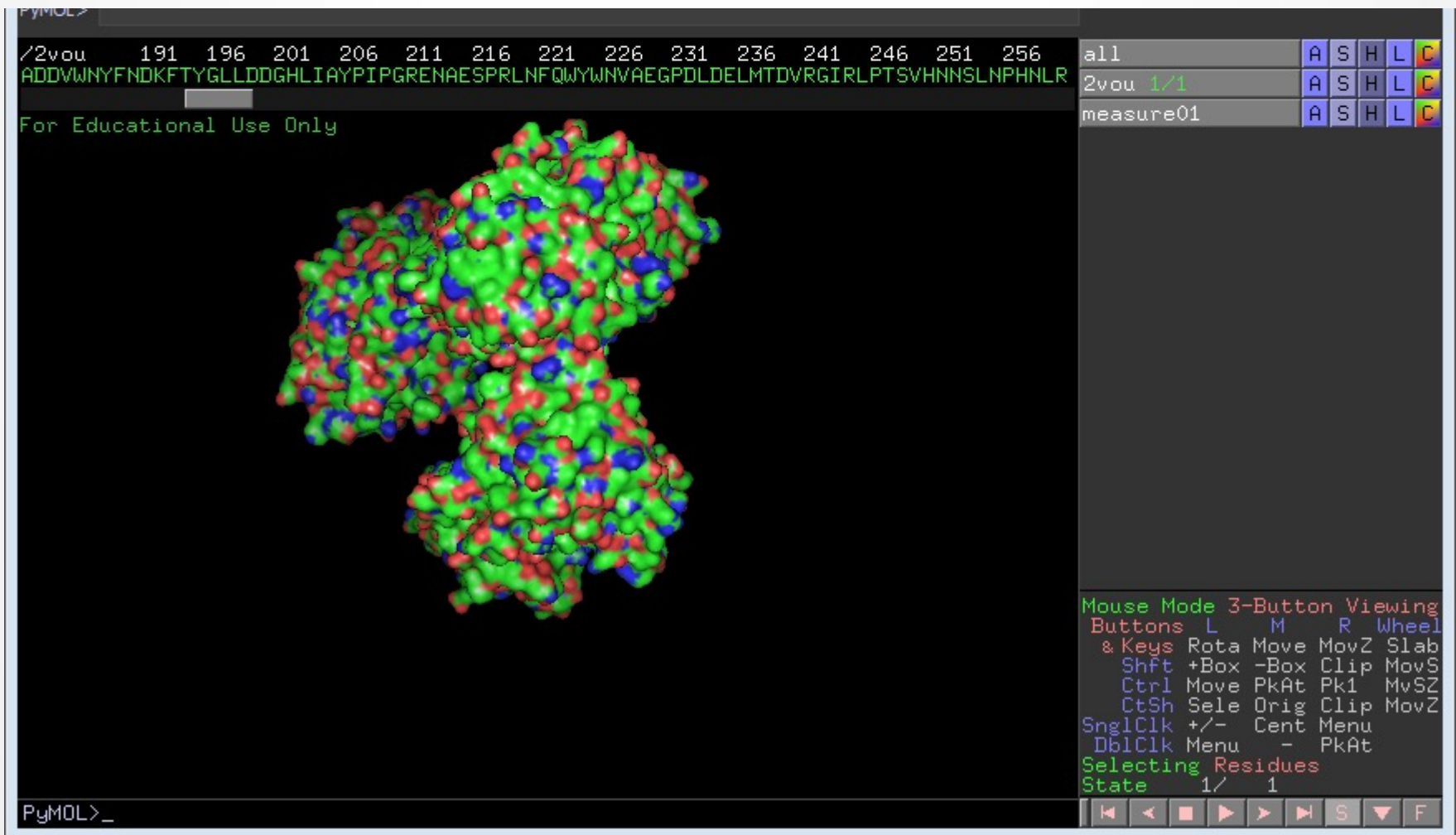


Ce alte molecule non proteice se află în apropiere de GOL?

Vizualizarea ligandului în pyMol

5. Deselectați totul (click într-o zonă neagră) și schimbați modul de vizualizare al proteinei 2vou la Surface (S>As>Surface);

6. modificați zona de vizualizare pentru a putea observa suprafața întregii molecule proteice. Este vizibil GOL? De ce?



The screenshot displays the PyMOL interface. The central window shows a protein structure rendered as a surface, colored by element type: carbon (green), oxygen (red), and nitrogen (blue). The structure is complex and multi-domain. The top-left panel shows the command line with the following text:

```
PyMOL> /2vou 191 196 201 206 211 216 221 226 231 236 241 246 251 256  
ADDVWNYFNDKFTYGLDDGHLIAYPIPGRENAESPRLNFQWYWNVAEGPDLDELMTDVRGIRLPTSVHNNSLNPHNLR  
For Educational Use Only
```

The top-right panel shows the object list:

Object	A	S	H	L	C
all					
2vou 1/1					
measure01					

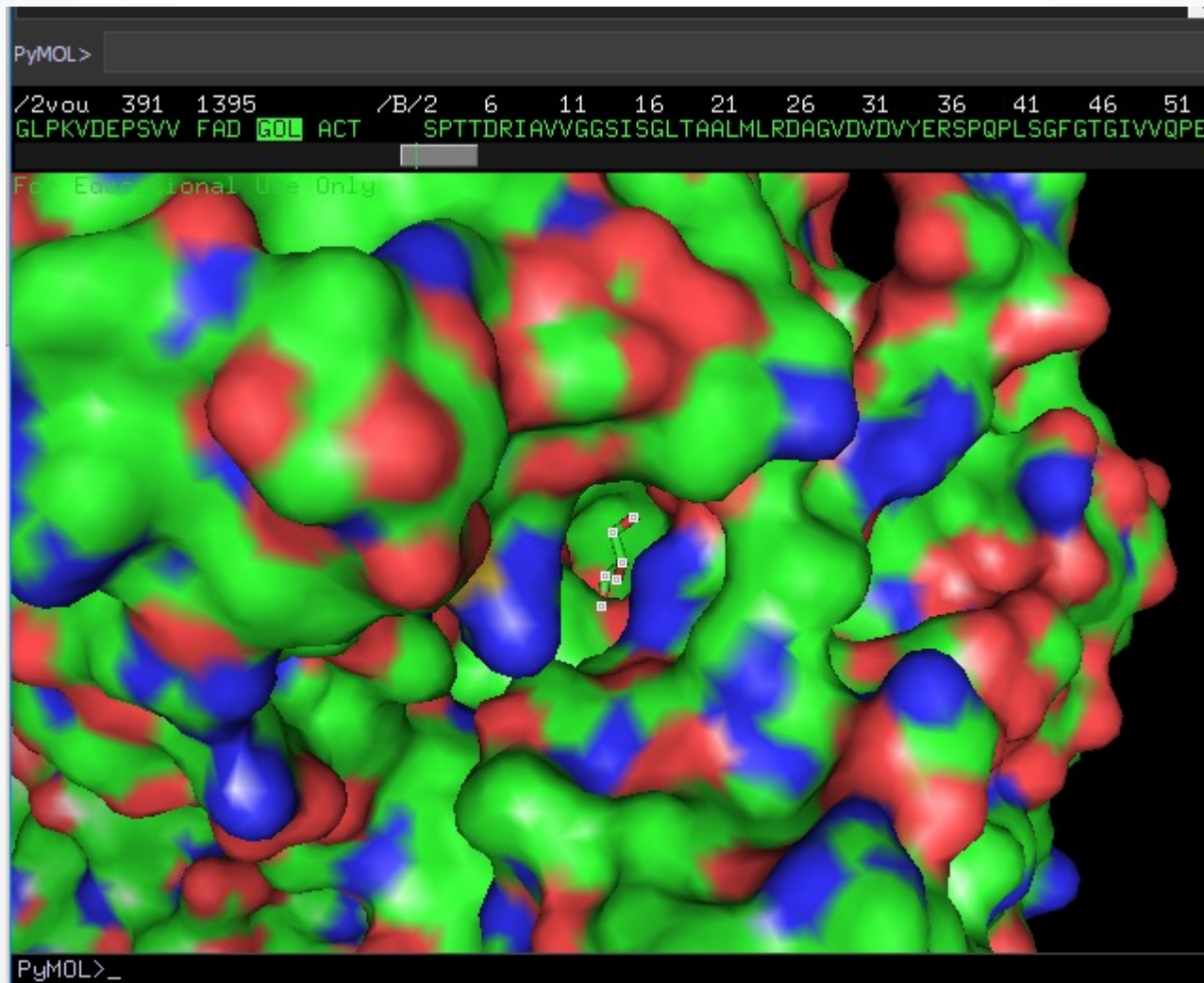
The bottom-right panel shows the mouse mode settings:

```
Mouse Mode 3-Button Viewing  
Buttons L M R Wheel  
& Keys Rota Move MovZ Slab  
Shft +Box -Box Clip MovS  
Ctrl Move PkAt Pk1 MvSZ  
CtSh Sele Orig Clip MovZ  
SnglClk +/- Cent Menu  
Db1Clk Menu - PkAt  
Selecting Residues  
State 1/ 1
```

The bottom status bar shows the PyMOL prompt and navigation icons.

Vizualizarea ligandului în pyMol

7. selectați din nou GOL (va fi vizibil ca puncte albe) și reprezentați-l ca licorice > stiks. Mișcați molecula și faceți zoom pentru a surprinde canalul prin care ligandul (și deci și substratul) pătrunde în molecula proteică și cavitatea în care este amplasat.



Exercițiu de introdus în prezentare

1. Deschideți fișierul fasta alocat cu un editor de text pentru a vizualiza conținutul;
2. Identificați PDBID în fișierul text deschis;
3. Deschideți RCSB PDB și căutați după codul identificat;
4. Identificați în pagina RCSB PDB deschisă secțiunea cu informații generale confrunțați aceste informații cu cele legate de funcție din seminarul **anterior**;
5. Identificați în pagina RCSB PDB deschisă secțiunea Small Molecules și completați cu denumiri toate moleculele non-proteice din tabelul realizat în seminarul 3;
6. Alegeți un ligand (pe cat posibil multiatomic) și identificați aminoacizii din situsul de legare al ligandului;
7. Alegeți doi aminoacizi implicați în legarea ligandului. Dechideți fisierul alocat în PyMol și măsurați distanța dintre catena laterală a acestor aminoacizi și unul dintre atomii ligandului; Salvați o imagine și introduceți imaginea în prezentare; scrieți o scurta legendă;
8. **Este ligandul ales amplasat într-un buzunar/cavitate? Comunică cavitatea cu exteriorul?** Salvați o imagine care să suporte raspunsul dmv. și introduceți-o în prezentare; scrieți o scurta legendă.