

## Základy bioinformatiky

### Tutorial 9: Vizualizace prostorových struktur biomakromolekul

Experimentálně změřené struktury je možné nalézt v databasi PDB (protein databank), kterou najdete na adrese [www.pdb.org](http://www.pdb.org). V současnosti zde naleznete téměř 100 000 struktur. My se podíváme na prostorovou strukturu komplexu Abelsonovy proteinkinasy s protinádorovým léčivem Imatinib. Tato sloučenina byla vyvinuta firmou Novartis a kolem roku 2000 uvedena na trh pod názvem Glivec nebo Gleevec pro léčbu chronické myeloidní leukemie. Když do vyhledávače na stránce PDB zadáte název této sloučeniny (Imatinib), nalezne vám 32 struktur, ve kterých je navázán Imatinib, nebo s touto sloučeninou nějak jinak souvisí. Z nich vyberte prostorovou strukturu 1IEP. Struktury v PDB mají čtyřmístný kód (zatím, dokud nedojdou), kde prvním znakem je číslo a další tři jsou čísla nebo písmena.

Záznam struktury 1IEP (*Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571)*) obsahuje odkaz na článek přes databasi Pubmed. Přes ni se můžete dostat na originální článek v časopise *Cancer Research*. Tento článek rovněž prezentuje strukturu stejného enzymu s jiným inhibitorem s kódem 1M52. Zajímat nás bude i položka *Molecular description*. Ta obsahuje schema doménové struktury proteinu, odkaz na sekvenci v databasi UniProt, místa pro vazbu ligandů, posttranslační modifikace a hlavně informaci jaká část proteinu je studována ve struktuře 1IEP.

Další položka *Structure validation* obsahuje schematické zobrazení kvality prostorové struktury. Význam veličin *Rfree* nebo co jsou to *Ramachandran outliers* se můžete dozvědět v předmětu *Strukturální biologie*.

Položka *Source* nám říká, že se jedná o protein z myši a že byl rekombinantně exprimován v hmyzích buňkách *Spodoptera frugiperda*, patrně v linii Sf9.

Následuje seznam neproteinových ligandů a modifikací struktury. Kromě chloridového iontu je pro nás důležitý právě Imatinib. Najetím myši na levý obrázek se vám zobrazí jeho chemická struktura. Najetím na pravý obrázek se vám zobrazí rezidua s kterými Imatinib interaguje. Na položku *3D view* se dívat nebudeme, protože obsahuje různé prohlížeče struktur, vesměs v Javě, a ty my používat nebudeme, protože použijeme PyMOL.

Důležitější položka je *Sequence*, kde se můžeme dostat k sekvenci proteinu. Je nutné dát pozor na to, že při měření prostorové struktury proteinu pomocí strukturální krystalografie se může stát, že některé části struktury nejsou v mapách elektronových hustot čitelné. Tato rezidua jsou v záznamu sekvence, ale nejsou v prostorové struktuře. Položka *Annotations* obsahuje odkazy na nástroje pro identifikaci strukturálních domén proteinu. Položka *Seq. similarity* vám ukáže, že existuje dalších osm struktur se stejnou sekvencí, 23 s více než 95% identitou v aminokyselinové sekvenci (tedy mutanti nebo různé druhy) a 1 295 struktur s více než 30% identitou (tedy různé proteinkinasy).

Položka *3D similarity* umožňuje nalézt proteinu s podobnou prostorovou strukturou bez ohledu na podobnost sekvencí. K tomuto tématu se dostaneme později.

Položka *Methods* nám sděluje, že krystal proteinu byl získán metodou visící kapky (hanging drop) a že difrakční záznamy byly získány na synchrotronu CHESS, konkrétně CHESS beamline F1 a další informace.

PDB soubor si můžete stáhnout do počítače kliknutím na link *Download files* a *PDB File (text)*. Soubor si nejprve můžeme ukázat v nějakém textovém editoru, např. Wordpadu. Význam jednotlivých řádků závisí na jejich počátku. Například řádky začínající REMARK představují poznámku, obvykle různé informace o dané struktuře. Řádky začínající ATOM představují jednotlivé atomy systému. Struktury získané strukturální krystalografií obvykle neobsahují vodíkové atomy. U každého atom nalezne jeho číslo, typ, typ residua, řetězec, číslo residua a Kartézské souřadnice, případně další položky.

Soubor si nyní otevřeme v programu PyMOL. Zobrazí se nám struktura, s kterou můžeme rotovat pomocí levého tlačítka, zoomovat pomocí pravého tlačítka, posouvat kolečkem myši

a měnit mlhu otáčením kolečka myši. V pravém okně máme položky *All* a *IIEP* a písmenka A, S, H, L a C. Pokud kliknete na H (jako *hide*) a vyberete *everything*, pak vám struktura zmizí. Pokud pak zmáčknete S (jako *show*) a *cartoon*, pak se vám struktura znova zobrazí v modelu „cartoon“. Podobně můžeme kliknout na C (jako *color*) a vybrat *chain*, čímž se nám struktura vybarví podle řetězců. Je evidentní, že v případě IIEP jsou podjednotky artefaktem krystalizace.

Pokud chcete podobně změnit zobrazení, ale pouze na vybraných atomech, pak je nutné je vybrat. K tomuto účelu je možné použít příkazový řádek, který je označen „**PyMOL>**“. Například zde můžete zadat **select chain B**. Tím se přidá řádek (**sele**). U něj můžete změnit typ zobrazení, barvu atd, případně atomy smazat. Výběr můžete zrušit napsáním **select none**. PyMOL umožňuje zobrazit atomy jako linie, tyčky, kuličky, schemata sekundární struktury (*cartoon*) a nebo jako plochu. Barvy mohou být podle typu atomu, řetězce, *rainbow* nebo si je můžeme vybrat z palety.

V případě IIEP je možné vybrat Imatinib jako residuum STI, pomocí **select resname STI**. Další možností je vybrat všechny heteroatomy pomocí **select hetatm**. Výběry je možné logicky kombinovat (např. **select resname STI and chain A**). Další možností jak vybrat určitý atom nebo residuum je na něj dvojité kliknout.

Atomy nebo residua v blízkosti Imatinibu je možné vybrat takto: Nejprve vyberte Imatinib (**select resname STI**). Vznikne tak výběr s defaultním názvem *sele*. Pak udělejte výběr *neighbours* napsáním **select neighbours, sele around 5**. Tyto atomy si opět můžete zobrazit a nabarvit dle libosti.

Pomocí PyMOLu je možné na sebe strukturně fitovat dva proteiny. Pro tento účel si stáhněte druhou strukturu publikovanou spolu s IIEP, tedy 1M52. Otevřete si obě struktury v PyMOLu. Nejprve vyberte řetězce B obou struktur a atomy smažte kliknutím na *A* a *remove atoms*. Pak je možné obě struktury nafitovat příkazem **align IIEP, 1M52**. Pak je možné si prohlédnout rozdíly mezi strukturami.

PyMOL umožňuje řadu dalších vychytávek pro hezké zobrazení molekulárního systému. Poslední které si ukážeme je trasování paprsků, které můžete spustit tlačítkem *Ray*. Strukturu je možné uložit jako obrázek v menu *File > Save Image As > PNG*.

Úkoly:

1. Zobrazte strukturu IIEP tak, aby byl zobrazen jen řetězec A bez Imatinibu jako modrá plocha a Imatinib jako kuličky s barvami podle atomu. Vytvořte obrázek
2. Zjistěte s karbonylovou skupinou kterého residua může interagovat piperazinová část Imatinibu. Vhodně ilustруйте.
3. Zjistěte která residua se podílejí na kontaktu podjednotky A a B.