# 1 INTERAKCIE A INTERAKČNÉ MAPY

## 1.1 Štruktúry biomakromolekúl a ich komplexov

sú publikované vo voľne prístupnej PDB databáze.

URL: <u>http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</u> (k 11.04.2017 ca 129 000 štruktúr). (Obr. 1)



**Obr. 1.** Úvodná stránka PDB databázy.

### 1.2 Interakcie ligandov

z PDB databázy možno zobraziť a analyzovať pomocou programu **DicoveryStudio (DS)**. DS software umožňuje prácu napr. s pdb súbormi (záznam o štruktúrnom usporiadaní proteínov, nukleových kyselín a ich komplexov), ktoré je možné voľne stiahnuť z PDB DB.

### 1.3 DS software

sa dá získať po registrácii tu:

http://accelrys.com/products/collaborative-science/biovia-discovery-studio/visualization-download.php (Obr. 2)

Návod na vyhotovenie interakčnej mapy 2017.04.12.docx



Obr. 2. Úvodná stránka Biovia na stiahnutie programu Discovery Studio.

# 1.4 Práca s DiscoveryStudio

### 1.4.1 Všeobecný úvod

Na obrázku 3 sú hviezdičkou (\*) označené často používané nástroje z úvodnej obrazovky po otvorení DS a označené ako 1 je tlačidlo na *on-line* načítanie štruktúrneho súboru z PDB DB *(ak viete 4 miestny alfanumerický kód požadovaného PDB záznamu, ktorý idete analyzovať)*. (Obr. 3)

🔜 D	overy Studio 4.0 Client	ΞX
File	t View Chemistry Structure Sequence Chart Scripts Tools Window Help	
OFF	९, जे %, %, [] (स से ■ ▶ Ⅲ ≫ ))  ✿ ╤ [] जा / / ∅ ∅ ℓ ℓ / + [] ▶ 😣 🔯 🖻 ≧	
-65	※※ 12 4 1 ス / え ダ T T T I m - ノ ー ー 0 い い ひ み の い い ス の ● し い い ひ ひ A B I B E B E B Y Y Y Y	ا ا
H	₩ % % L H E H ⊨ M E \$\$\$\$\$\$\$\$\$	
M	omolecules Simulation Receptor-Ligand Interactions Pharmacophores Small Molecules X-ray My Tools	Q
**	v 🔻 🛅 😪 🔚 🔷 💉 X 🕾 👕 🗇 🕸 🔣 Display Style 👘 🤅	
7	🛛 DS Weicome 🗵 📔 👽 40x4 🖂	P
	Welcome Discovery Studio 4.0	<u>^</u>
	Actions Data Notifications	

**Obr. 3.** Úvodná stránka programu DS s označenými užitočnými funkciami (1, \*).

#### 1.4.2 Načítanie komplexu

Ak chcete načítať napr. PDB komplex **4QX4** (*ALR2 enzým s inhibítorom Cemtirestat (3E2)*), stlačte tlačidlo **1** (*open URL*) a napíšte **4QX4** do riadku ID, prípadne upravte (starý) automaticky generovaný link na <u>http://files.rcsb.org/download/4QX4.pdb</u> (*k zmene došlo na strane PDB databázy a nemusí byť premietnutá v použitej verzii DS*)

# 1.4.3 Otáčanie, posúvanie komplexu a označovanie, či dobrazovanie jednotlivých častí komplexu

sa uskutočňuje na strednej lište kurzormi označenými hviezdičkou \* (Obr. 3). Významnou je aj klávesová skratka **Alt H**, ktorá otvorí obsahové okno (biele vľavo), kde môžte vidieť pod označením A v poradí AAs, ligandy (*na obrázku rozbalené*) a vody v kryštálovej štruktúre. (Obr. 4)



**Obr. 4.** Štruktúra "správne" natočeného komplexu PDB: 4QX4 *(dobre vidno ligand, ako na obrázku Int Mapa 1)* a otvorené obsahové okno.

A znamená prvý komplex (delí sa na A-aminokyseliny, A-ligandy a A-vody, ktoré detailne uvidíte po rozbalení. Na obrazku 4 máte rozkliknuté ligandy NAP401 je kofaktor NADP+ a su

tam aj dva **Cemtirestaty** označené ako 2E2402 a 3), pokiaľ by v kryštalovej mriežke bolo viac komplexov spolu, môžu tam byť aj písmená B, C, D... Analyzujeme len jeden komplex. Ostatné, pre zjednodušenie môžme ignorovať, alebo zmazať *(po označení myšou cez klávesové tlačidlo Delete)*.

#### 1.4.4 Príprava na analýzu komplexu v DS

- a) natočte komplex tak, aby bol ligand dobre viditeľný (ak robíte analýzu série komplexov s jedným biologickým cieľom, natočenie komplexu treba mať vždy rovnaké). Viď napr. obrázok Interakčná Mapa 1.
- b) Potom klinutím na ligand ho označte (vyžltí sa) a zobrazte len ligand tak, že kliknete do zobrazovacieho okna pravou myšou a dajte Show only. Potom ligand skontrolujte, či má dobrú štruktúru (v prípade PDB: 4QX4, software DS zobrazuje zlý SH konformer, je preto treba spraviť úpravu podľa štruktury Cemtirestatu (3E2) uvedenej v PDB databáze: <a href="http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4qx4">http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4qx4</a> jeho štruktúra je na stránke dole IUPAC menom aj obrázkom. Úprava tautoméru sa robí označením vazieb (*vyžltia sa kliknutím myšou*) a premenou ich väzbovosti nástrojmi na lište. (Obr. 3 a 5)



**Obr. 5.** Štruktúra ligandu *Cemtirestatu* z PDB: 4QX4 pred úpravou (vľavo) a po úprave (vpravo). Nezabudnite na konci uprav znovu oznacit ligand a pridať vodíky cez lištu Chemistry / Hydrogens / Add.

 c) Po úprave ligandu kliknite na zobrazovacie pole pravou myšou a dajte Show All (objaví sa okrem ligandu aj proteín a všetky vody)

- d) Potom označte všetko napr. Ctrl A ako vo Worde, chodte na lište do Chemistry / Hydogens / Add (pridáte všade vodíky)
- e) Potom kliknite na zobrazovacie pole pravou myšou a dajte Display Style / Atom / (Color by element) Line (všetky väzby AAs aj vody a ligand zmenia vzhľad na lines)
- f) Potom poklikajte len na ligand  $(\tilde{z}lt\hat{y})$  a zmente tak isto ako v e/ jeho zobrazenie na Stick cez myš a Display Style. Mali by ste dostat toto (Obr. 6):



**Obr. 6.** Komplex po kontrole, úprave ligandu s pridaním vodíkov na ligande aj všetkých vodách a AAs (aminokyselinových zvyškoch).

- g) Potom s vyžlteným ligandom chodte na lištu Menu / Structure / Show by radius a dajte 6A. (dostanete AAs okolo ligandu do vzdialenosti 6A)
- h) Potom kliknite na zobrazovacie pole pravou myšou a dajte Display Style / Protein / Off (zmizne slučka a zostanú len AAs do vzdialenosti 6A od ligandu) (Obr. 7)

Návod na vyhotovenie interakčnej mapy 2017.04.12.docx



**Obr. 7.** Ligand *Cemtirestat* z komplexu PDB: 4QX4 a jeho AAs zvyšky do vzdialenosti 6 A od ligandu.

 i) Potom označte ligand a chodte na lištu Structure / Monitor / Non-bond interactions a dajte nasledovne nastavenie: (Obr. 8)



Obr. 8. Nastavenie zobrazovania interakcii ligandu s AAs z jeho väzobého miesta.

 j) Potom OK a zobrazia sa interakcie. Na zobrazenie vzdialeností choď te na lištu, dajte Structure / Monitor / Interaction options a zakliknite Show distances a zobrazia sa vzdialenosti. (Obr. 9) Následne môžte analyzovať interakcie a robiť interakčnú mapu.



**Obr. 9.** Ligand, vody a AAs do vzdialenosti 6 A spolu so zobrazenými typmi interakcii a ich vzdialenosťami v A.

k) Poklikaním na jednotlivé AAs zvyšky sa Vám tieto predstavia nápisom mena AA v ľavom dolnom rohu (alebo aj klikom pravou myškou v zobrazovacou okne a v otvorenej tabuľke dole kliknite na Attributes). Ostatné nechám na Vašu šikovnosť a tvorivosť pri používaní DS.

#### 1.5 Analýza interakcií - Interakčná mapa

Interakčná mapa predstavuje grafický diagram zobrazujúci interakcie medzi ligandom a biomakromolekulou napr. enzým / ligand (inhibítor). Mapa sa robí v programe **ChemDraw** nasledovne:

- a) **komplex v DS natočte** tak, aby bol ligand dobre viditeľný (*ak robíte analýzu série komplexov s jedným biologickým cieľom, natočenie komplexu treba mať rovnaké*)
- b) skontrolujte, či DS načítalo štruktúru ligandu správne, teda tak, ako je uvedená v PDB DB (býva niekedy problém s tautomérmi). Ak sa stane, že ligand v DS nezodpovedá štruktúre deklarovanej autormi, upravte ligand v DS, inak nemusia byť nájdené interakcie úplné.
- c) nakreslite štruktúru ligandu v ChemDraw (Object / Object setings / Line width 0.045, atomy dajte Arial 14 bold s farbou podla prvku) v konformácií presne tak, ako ho vidíte z natočeného komplexu v DS. (príklad mapy interakcií nájdete v priloženom cdx súbore a tiež na obrázku Interakčná mapa 1)
- d) doplňte interakcie do int. mapy (Obr. 12) podľa analýzy komplexu v DS (Obr. 10) (interakciu udávajte na jednu desatinu) po zapísaní interakcie do obrazku v DS danu väzbu oznacte a skryte (*pravé tlačidlo myši / hide*) aby ste zachytili všetko podstatne, nič nevynechali a nepomylili sa. Pri interakciách a ich zápise do mapy dodrzte ca uhly a rel. polohy AAs (aminokys. zvyškov) voči príslušnému atómu ligandu s ktorým AA interaguje. Zakreslite: iónovú int. do vzdialenosti 6 A; vodíkovú väzbu HB do 2.5 A (+ vyznačite skupinu a atom z AA, s ktorým sa farmakofor viaže); halogénové väzby do 4A; +PI, PIPI interakcie a VdW (lipofilné) do 5 A. Interakcie siry s Ar a -COO<sup>-</sup> (či iných aniónov) s Ar do mapy nedávame.

Návod na vyhotovenie interakčnej mapy 2017.04.12.docx



**Obr. 10.** Interakcie v DS: *Cemtirestat* a AAs z komplexu PDB: 4QX4. Vľavo je pohľad na ligand z predu, vpravo pohľad na ligand z jeho boku.

 e) pomocou v DS vytvoreného SAS (Solvent Accessibility Surface) povrchu okolo ligandu, určte tiež solvent accessibility parts teda atómy ligandu, ktoré sú exponované do cytosolu. (Obr. 11)

**SAS povrch** v Discovery Studio spravite tak, ze pojdete na Receptor-Ligand Interactions *(na lište v DS)*, oznacite ligand v zobrazovacom okne *(objaví sa žltým)* a otvorite na lavej strane DS okna záložku Tools, tam date Define Ligand a pod nim v Dispaly receptor surfaces date SAS. Ked sa povrch vytvori, natocite ho tak, aby ste jasne videli ligand v otvore v SAS povrchu pri jeho modrom vyfarbení(-iach) (Obr. 11) a tam uvidíte, ktoré atómy su dostupné cytosolu (rozpúšťadlu, teda sú mimom AAs proteínu). Tie atómy v int. mape označte guličkou, ako je vidno v Int. Mape 1 (Obr. 12). Pozrite či nie je otvorov s modrým okrajom v SAS povrchu viac otočením ligandu okolo jeho osi.



**Obr. 11.** Otvor v SAS povrchu s atómami ligandu *(Cemtirestat)* exponovanými do rozpúšťadla *(modrý okraj otvoru SAS povrchu)*.

- f) na konci analýzy zhodnoťte a uveďte počet významných interakcii za názov látky interakcie uvádzajte v poradí ich sily (ionové, HB, +PI, halogénová väzba, PIPI, VdW), hodnotíme aj menej kvalitné interakcie (napr. 2 interakcie z jedného atómu..., zlá vzdialenosť pre HB (nad 2.4), či menej vhodný uhol pri HB (optimum je 180 ° na voľný el. pár)). Z tohto dôvodu sa môžu objaviť v závere aj čísla ako 0.5 (napr.: 1 IONIC, 3.5 HB, 2.5 PIPI) (Obr. 12)
- g) ostatné zvyklosti pri tvorbe interakčnej mapy môžte vidieť na priloženom obrázku (Obr. 12)



His110 bolo treba v DS upravit na jeho protonizovanú formu, podla info z PDB int.

**Obr. 12.** Interakčná mapa 1 (*Cemtirestat*). Interakcie inhibítora s aminokyselinovými zvyškami (AAs) v aktívnom mieste ALR2 enzýmu (PDB: 4QX4) s označením atómov smerujúcich do cytosolu (solvent accessible part, striebornou značkou). V komplexe sú náhodne *Cemtirestaty* dva, z toho jeden je menej významne viazaný, nachádza sa na okraji komplexu a smeruje do cytosolu. Zobrazený a analyzovaný je *Cemtirestat*, ktorý sa viaže v aktívnom mieste ALR2 (aldóza - reduktázy 2).