

## Domácí úloha z 30.10.2020

1. Stáhněte si z proteinové databáze <https://www.rcsb.org/pdb/home/sitemap.do> souřadnice krystalové struktury 4u2t.pdb

Uvedená webová adresa shodou okolností nyní ohlašuje, že od 31.12.2020 nebude fungovat. Dosud je v ní však vyhledávací okénko "Enter search term" funkční, a zadáním kódu "4u2t" se dostanete na stránky této struktury s možností stáhnout soubor souřadnic kliknutím na "Download files". V budoucnu bude lepší se na databázi napojovat adresou <https://www.rcsb.org>

Ta vás přivede na domovskou stránku bez jakékoliv hlášky. Chápu, že některé z vás hláška "Page not found" vyděsila.

2. Načtete si souřadnice do programu VMD a použijte modul Extensions-Analysis-Hydrogen bonds k výpisu seznamu « hbonds.details » vodíkových můstků mezi kofaktorem FAD a enzymem. Tento seznam obsahuje pouze údaje o aminokyselinách a o tom, zda je aminokyselina donorem či akceptorem. Identifikujte zúčastněné atomy jako v minulém cvičení a udejte délku vodíkové vazby. Navíc u každé změřte úhel D-H---A.

a) Po načtení struktury 4u2t.pdb do programu VMD jděte v hlavním menu do Extensions-Analysis-Hydrogen bonds a vyplňte zadávací okno "Hydrogen Bonds", jako je ukázáno v následujícím snímku mé obrazovky vlevo nahoře. Kofaktor FAD specifikujete jako "resname FAD", a enzym např. udáním pořadových čísel aminokyselin. Ta získáte, když otevřete soubor 4u2t.pdb nějakým textovým editorem (např. Textedit nebo Blocknotes, jde také Word) a najedete na seznam souřadnic, ty zabírají největší část souboru. V souboru 4u2t.pdb začínají (po počátečních informacích o celé struktuře) takto:

```
ATOM 1 N GLY A 9 24.802 1.746 48.561 1.00 26.63 N
ANISOU 1 N GLY A 9 3911 3280 2928 211 1031 434 N
ATOM 2 CA GLY A 9 25.932 0.896 49.040 1.00 23.95 C
ANISOU 2 CA GLY A 9 3293 3076 2729 449 957 494 C
ATOM 3 C GLY A 9 26.973 0.567 47.980 1.00 20.09 C
ANISOU 3 C GLY A 9 2727 2814 2092 360 562 662 C
ATOM 4 O GLY A 9 26.978 1.139 46.887 1.00 20.29 O
ANISOU 4 O GLY A 9 2341 2969 2399 346 453 786 O
ATOM 5 H GLY A 9 24.087 1.236 48.420 1.00 31.96 H
ATOM 6 HA2 GLY A 9 26.381 1.350 49.770 1.00 28.73 H
ATOM 7 HA3 GLY A 9 25.576 0.060 49.379 1.00 28.73 H
ATOM 8 N TYR A 10 27.829 -0.391 48.319 1.00 17.83 N
ANISOU 8 N TYR A 10 2504 2602 1670 107 190 402 N
ATOM 9 CA TYR A 10 28.971 -0.793 47.505 1.00 14.84 C
```

z čehož je vidět, že atom č. 1 patří aminokyselině GLY A 9 (A označuje monomer, v žargonu VMD "chain", který je v této struktuře jen jeden). Aminokyseliny 1 až 8 se očividně nepodařilo při řešení struktury zobrazit s dostatečnou přesností, takže v seznamu jejich souřadnice chybí.

Souřadnice pokračují až k poslední aminokyselině, jejíž souřadnice se podařilo zjistit, totiž Threoninu č. 507. Poté následuje iont síranu  $\text{SO}_4^{2-}$  (residue number 601), který slouží k vyrovnání náboje a stabilizaci krystalové mřížky, kofaktor FAD s číslem 602, a poté vidíme velký počet krystalových molekul vody, HOH701 až HOH1083 (souřadnice máme jen pro atomy kyslíku). Protein se tedy skládá z aminokyselin 9 až 507, takže jej můžeme zadat jako "resid 9 to 507".

Obejít hledání pořadových čísel aminokyselin lze tak, že místo "resid 9 to 507" napíšete prostě "protein". Nahlédnout do souboru souřadnic ale není na škodu, to vám např. ukáže, kolik molekul vody bylo možné v krystalu identifikovat.

Jak už jsem vás upozorňoval, "Donor-Acceptor distance" je u vodíkové vazby D-H---A vzdálenost mezi D a A, nikoliv mezi H a A. "Angle cutoff" udává maximální tolerovanou odchylku úhlu D-H---A od  $180^\circ$ .

Kliknutím na "Find hydrogen bonds!" dole v tabulce spustíte program, který vám v adresáři, který jste zadali, vytvoří soubor "hbonds-details.dat" (tabulka uprostřed nahoře). V našem případě program našel 13 H-můstek.

The screenshot shows the VMD (Visual Molecular Dynamics) software interface. The 'Hydrogen Bonds' dialog box is open, displaying input options for the molecule '4u2t.pdb' and selection 'resid 9 to 507'. The 'hbonds-details.dat' file is open, displaying a table of 13 hydrogen bonds. The table columns are: donor, acceptor, occupancy, atomFAD, am.acid, atom, dist, D-H---A, and angle. The table data is as follows:

donor	acceptor	occupancy	atomFAD	am.acid	atom	dist	D-H---A	angle
FAD602-Side	MET122-Main	100.00%	N3	HN3	MET122:O	1.98	161.7	
FAD602-Side	GLU40-Side	100.00%	O28	HO28	GLU40:O1	1.80	166.6	
FAD602-Side	VAL250-Main	100.00%	N6A	HN6A	VAL250:O	2.04	162.3	
MET122-Main	FAD602-Side	100.00%	O4	HO4	MET122:H-N	2.09	155.8	
GLY120-Main	FAD602-Side	100.00%	N5	HN5	GLY120:H-N	2.33	170.9	
PHE487-Main	FAD602-Side	100.00%	O2	HO2	PHE487:H-N	1.95	170.8	
ASN119-Side	FAD602-Side	100.00%	O2	HO2	ASN119:ND22-ND2	2.27	171.1	
GLY475-Main	FAD602-Side	100.00%	O2P	HO2P	GLY475:H-N	2.02	170.41	
GLY21-Main	FAD602-Side	100.00%	O1P	HO1P	GLY21:H-N	2.40	157.4	
GLY115-Main	FAD602-Side	100.00%	O1A	HO1A	GLY115:H-N	2.00	160.9	
GLY111-Main	FAD602-Side	100.00%	O3B	HO3B	GLY111:H-N	2.08	159.8	
ARG110-Side	FAD602-Side	100.00%	O28	HO28	ARG110:HH1-NH1	2.83	171.51	
VAL250-Main	FAD602-Side	100.00%	N1A	HN1A	VAL250:H-N	2.24	159.3	

Nyní je třeba si zobrazit aminokyseliny, o kterých z tabulky hbonds-details víte, že tvoří s FAD vodíkové můstky, tedy Met122, Glu40, Val250, Gly120, Phe487, Asn119, Gly475, Gly21, Gly115, Gly110 a Arg110, nejlépe v malých skupinkách spolu s FAD. A změřit odstupy mezi atomem vodíku a jeho akceptorem (kliknutím na číslovku 2 na klávesnici nebo zadáním Mouse-Label-Bonds, a kliknutím na atomy H a A), a úhel D-H---A (kliknutím na číslovku 3 na klávesnici nebo zadáním Mouse-Label-Angles, a kliknutím na atomy D,H,A). Moje stáhnutá verze VMD mi občas toto měření odstupů a úhlů zablokuje (délky nebo úhly se prostě neobjevují) a musím jít zpět na hlavní menu a někdy to i vícekrát zopakovat. Domníval jsem se, že to je jen zádrhel na mé, starší, verzi VMD, ale z některých vašich zoufalých komentářů jsem pochopil, že na tento problém jste narazili také. Lituji tedy, že jsem vás na tento

"zádrhel" neupozornil. Někdy je prostě nutné restartovat VMD. Tak to bohužel s informatikou často chodí.

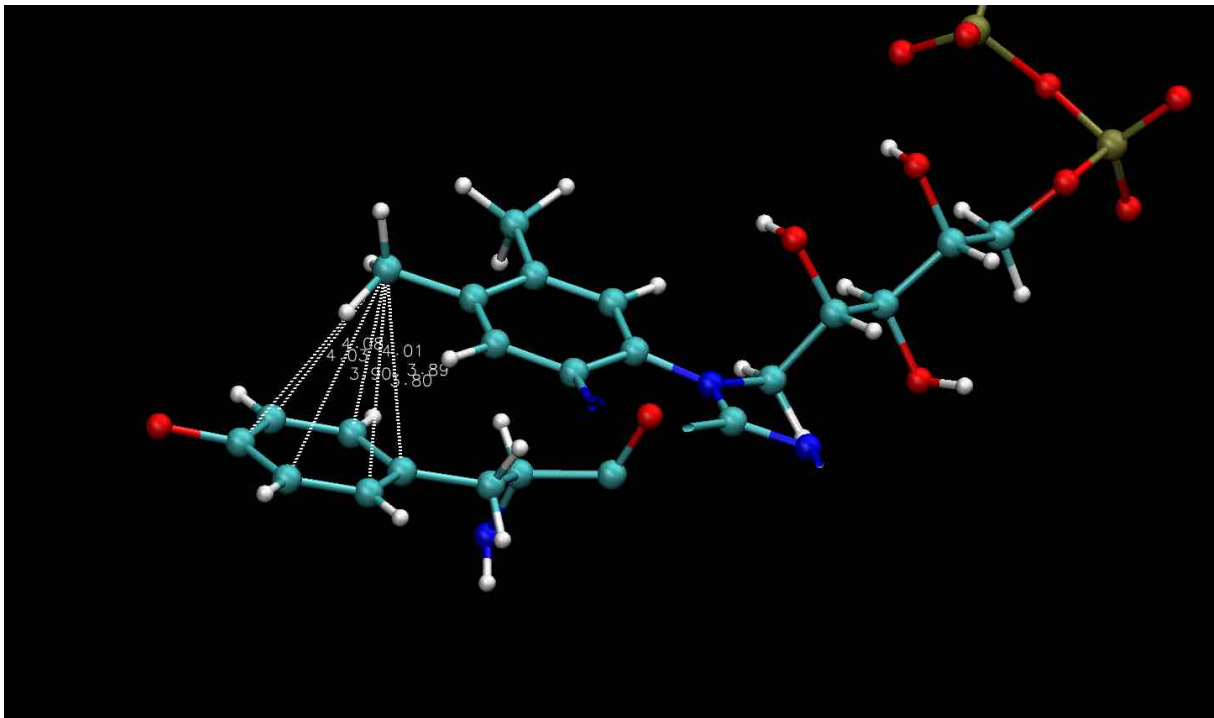
Výsledky měření vodíkových vazeb a úhlů jsem vepsal do tabulky, v nahoře zobrazeném "Screen-shotu" vpravo dole.

Alternativní metodu hledání H-můstek jsme si vyzkoušeli minule pomocí Graphics-Representations a zadáním "Selected Atoms" jako "within 3 of resname FAD". Zde ale dostaneme kontakty FAD nejen s aminokyselinami, ale i např. s molekulami vody. Navíc u všech kontaktů musíme rozhodnout sami, zda se jedná o vodíkový můstek. Program Extensions-Analysis-Hydrogen bonds toto udělal za nás, ovšem, jak jsme již viděli, tento program není stoprocentně spolehlivý.

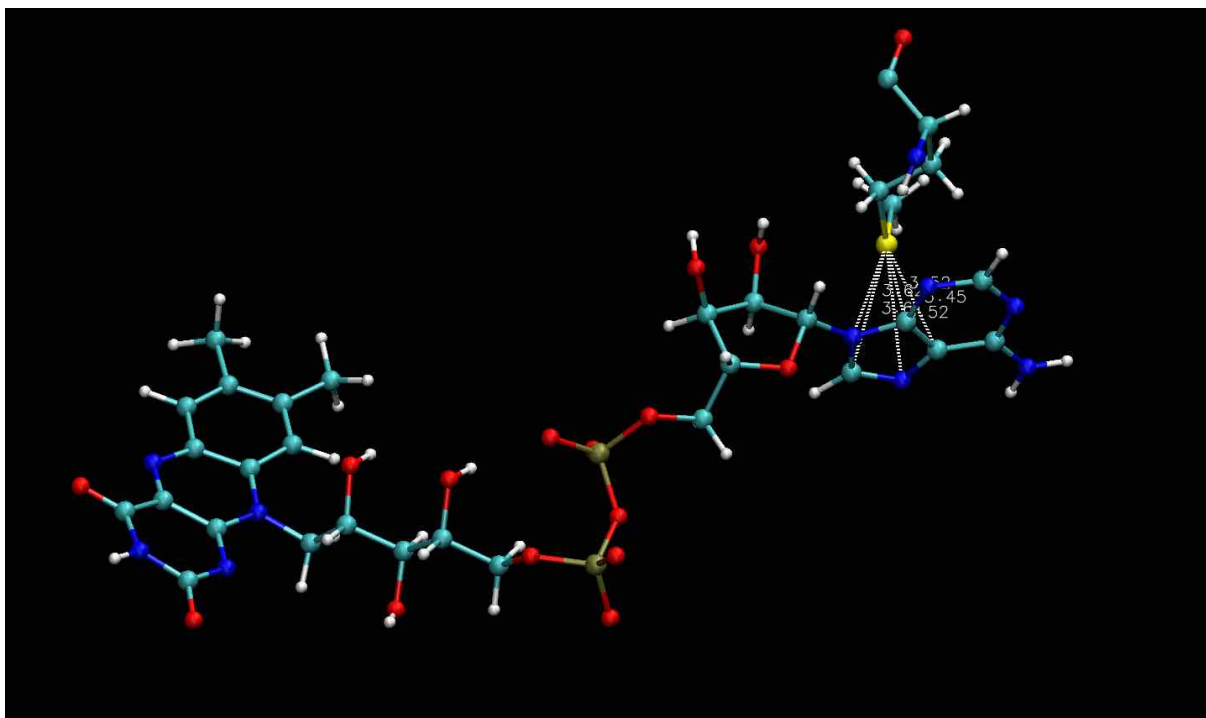
### 3. Prostudujte následující kontakty:

- Tyrosin TYR446- metylová skupina na atomu uhlíku C7M kofaktoru FAD
- Atom síry metioninu MET41- adenin kofaktoru FAD

Obrázky dole ukazují, že tyto páry atomových skupin jsou vázány Londonovými silami, podobně jako jsme to viděli v prezentaci z 30.10.2020 na diapozitivu 10 mezi metylovou skupinou izoleucinu ILE269 a šestičlenným kruhem adeninu kofaktoru NAD<sup>+</sup>. Metylová skupina uhlíku C7M kofaktoru FAD je umístěna přímo nad aromatickým kruhem tyrosinu TYR446. Podobně Atom síry metioninu MET41 leží přímo nad pětičlenným kruhem adeninu kofaktoru FAD.



Struktura 4u2t. Detail interakce tyrosinu TYR446 s metylovou skupinou kofaktoru FAD



Struktura 4u2t. Detail interakce atomu síry metioninu MET41 a adeninem kofaktoru FAD

### Komentář k distanční výuce

Myslím, že je zřejmé, že distanční výuka klade zvýšené nároky jak na studenty, tak na vyučující. Jako vyučující mohu říci, že příprava komentované prezentace vyžaduje několikanásobek času v porovnání s klasickou přednáškou. Jak jste, myslím, všichni zjistili, obzvláště u praktických cvičení je přímý kontakt jen obtížně nahraditelný. Tím spíše platí, že studenti by se neměli ostýchat a klást otázky. Řada z vás se očividně snažila se s programem VMD samostatně vypořádat a "neotravovat" mě s dotazy. Rád bych tedy znovu připomněl, že odpovídat na vaše otázky je přirozená úloha vyučujícího, a že čím dříve se zeptáte, tím lépe. Tuším, že jste si nyní všichni ověřili, že ne všechno si vyklikáte na počítači sami, a že čtení manuálů a používání různých vyhledávačů je často mnohem zdlouhavější než dotaz položený někomu, kdo se s daným problémem již setkal.

Po technické stránce: Problémy, které jste měli s používáním vizualizačního programu VMD, byly, myslím, všechny řešitelné pomocí telefonu či skypu, programu, který mají skoro všichni instalovaný. Někteří znáte program Zoom. Ten umožňuje přenos jednoho jediného okna počítače, zatímco u VMD neustále přecházíme mezi několika okny. Máme-li otevřené stejné programy před sebou, není podle mého problém, abych vás po telefonu vedl, že v oknu "Main" máte jít na hlavní lištu nahoře, zakliknout třeba "Mouse", v podokně zakliknout to a to a udělat to a to, atd. Přenášet celou obrazovku umožňuje program Teams. Ovšem v praxi jsem zažil s tímto programem spoustu zádrhelů. Navíc: vy byste si měli během rozhovoru zkusit, že co vám radím, na VAŠEM počítači skutečně funguje. Chcete-li si pomocí programu Teams "okoukat", co vám ukazuji, a hned si to zkusit, potřebujete dva počítače nebo alespoň dva monitory, na jednom si přenášíte moji obrazovku a díváte se, co dělám, a na druhém si to zkoušíte sami. Vylepšení oproti tomu, když vám po telefonu či skypu radím, co máte dělat na svém vlastním počítači, je podle mého tak malé (sledovat současně dva monitory není

vůbec snadné, zatímco poslouchat ve sluchátkách návod učitele a provádět operace na svém počítači lze snadno zvládnout!), že komplikaci s organizací konference na Teams v žádném případě nevyváží.

Toto je moje vlastní zkušenost, samozřejmě si budu vážit všech vašich komentářů!

JK