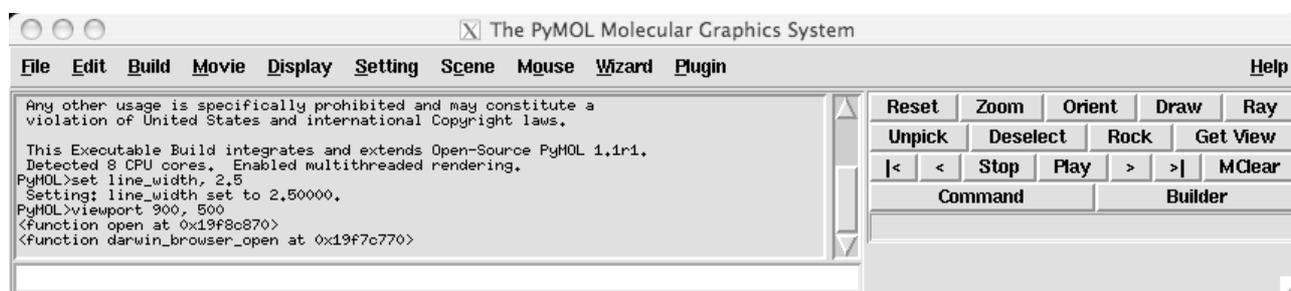


7. Introduzione a PyMol

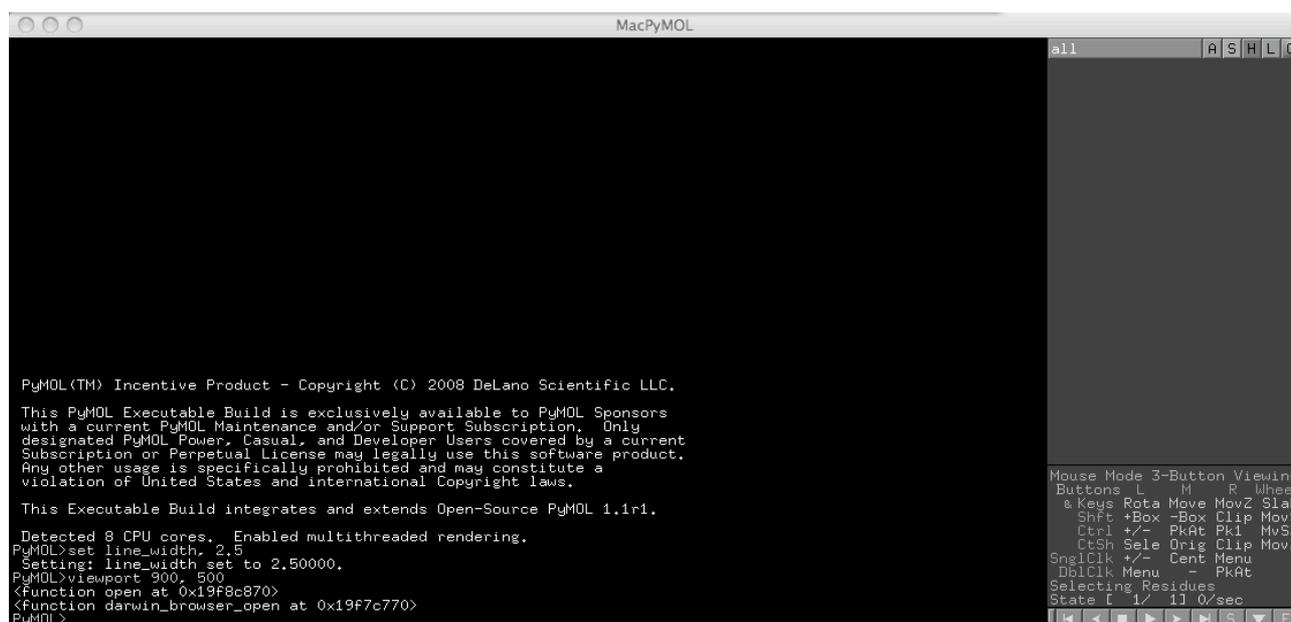
PyMol

(versione utilizzata: 1.1r1)

PyMol è un programma di grafica e modellistica molecolare open source ed estendibile attraverso l'implementazione di script in linguaggio Python (appendice A). Grazie alle numerosissime funzioni di cui dispone, alla facilità di utilizzo, all'ottima resa grafica e alla capacità di generare immagini e filmati di alta qualità, PyMol si è affermato come standard nell'ambito della grafica e modellistica molecolare. Il programma è distribuito gratuitamente a studenti e insegnanti dal sito <http://pymol.org>, dal quale è possibile scaricare i pacchetti di installazione per i sistemi operativi Linux, MAC OS X e Windows. Una volta installato, è possibile avviare PyMol cliccando due volte sull'icona relativa. All'avvio, compariranno due finestre:



La prima finestra, chiamata **PyMol External GUI** (GUI è l'acronimo di *Graphical User Interface*), contiene nella parte superiore un menù attraverso il quale è possibile accedere a finestre di comandi, nella parte centrale un resoconto (*log*) dei comandi eseguiti, nella parte inferiore un'area per l'inserimento di comandi testuali (*Command Input Area*; quest'ultima opzione, che consente un utilizzo avanzato del programma, non verrà considerata nella presente esercitazione introduttiva; per maggiori informazioni su questo argomento si rimanda alla documentazione ufficiale del programma) e sulla destra una pulsantiera con alcuni comandi comunemente utilizzati.

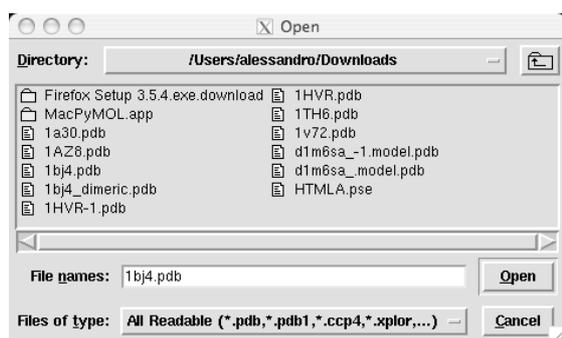


La seconda finestra è suddivisa in due quadranti: in quello principale, l'**ambiente grafico** (*viewer*), avviene la visualizzazione delle molecole caricate all'interno del programma; in quello secondario, detto **PyMol Internal GUI**, è presente: 1) un pannello (in alto) con la lista degli oggetti presenti nel *viewer*, le eventuali selezioni effettuate e le operazioni effettuabili su di essi; 2) un pannello inferiore relativo alle operazioni effettuabili con il mouse e ai comandi dei filmati (play, stop e così via).

PyMol come Viewer

PyMol è principalmente un programma per la visualizzazione molecolare, nonostante con esso sia possibile effettuare (e soprattutto con gli script in Python con cui può essere esteso) anche diverse analisi strutturali e funzionali sulle molecole indagate. In questa esercitazione, che non ha la pretesa di esplorare in maniera esaustiva tutte le funzioni del programma, illustreremo solo alcune operazioni comunemente effettuate.

In PyMol è possibile caricare una molecola, nell'esempio che segue una proteina, in diversi modi. Uno di questi prevede che il file contenente le coordinate della proteina (solitamente, un file di tipo .pdb, anche se PyMol riesce a leggere moltissimi altri formati) sia già presente nel nostro computer (scaricato, per esempio, dalla Protein Data Bank) e non necessiti di una connessione attiva a Internet. In questo caso, selezionate la voce *File* dall'*External GUI* (in alto a sinistra), quindi *Open*: La finestra che comparirà è simile alla finestra mostrata di seguito:

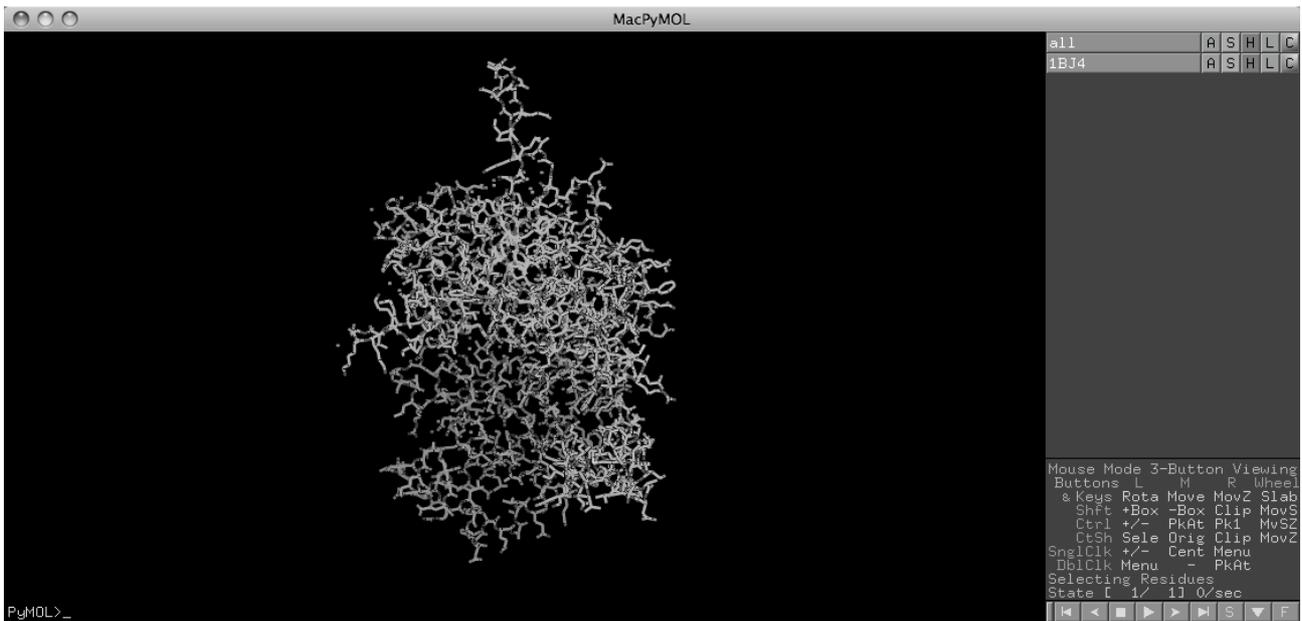


Da questa schermata è possibile selezionare un file e/o navigare nelle directory del nostro calcolatore.

Il secondo approccio, più veloce e comodo se si dispone di una connessione attiva e si conosce già il codice PDB associato alla macromolecola di interesse, prevede l'utilizzo di un *plugin* (un programma secondario che amplia le funzioni di quello primario) preinstallato in PyMol, chiamato *PDB Loader Service* (accessibile dalla voce *Plugin* dall'*External GUI*). Una volta selezionato, comparirà la seguente finestra:



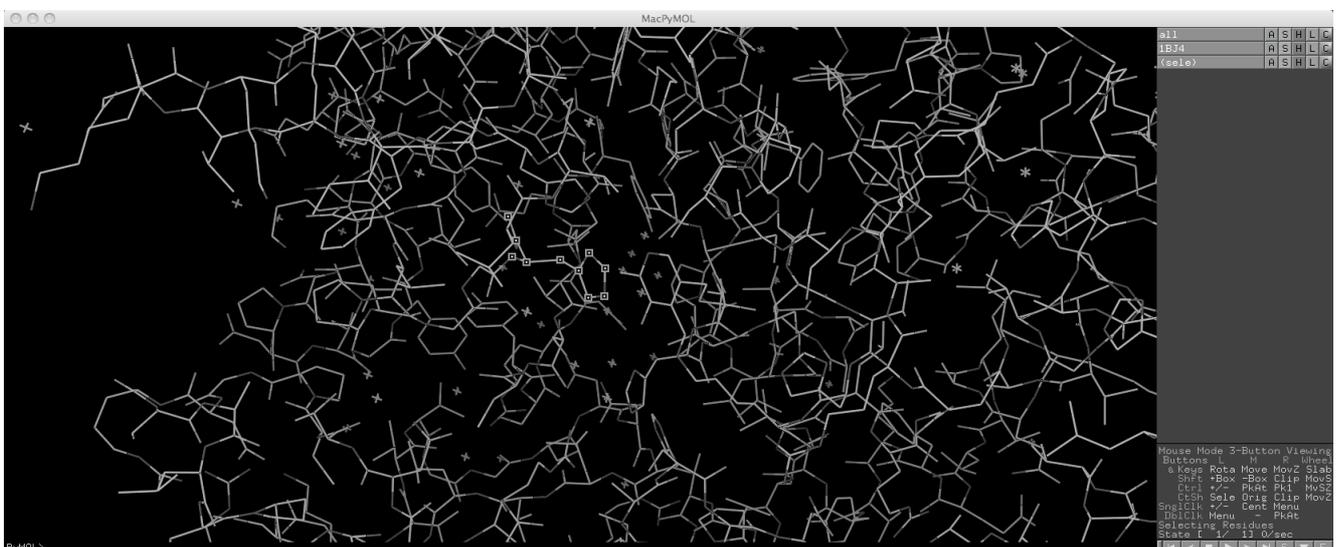
Come esempio digitate al suo interno il codice «1BJ4» (struttura cristallografica del monomero della serina idrossimetiltrasferasi umana in complesso con il cofattore PLP) e premete *Invio*. Dopo alcuni secondi, in base alla velocità della connessione, la struttura apparirà sul *Viewer*:



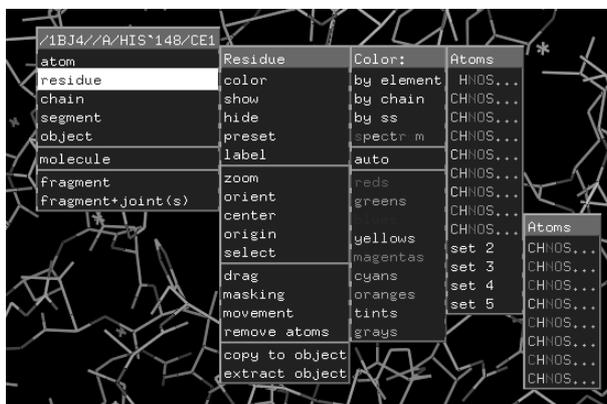
Notate che, insieme alla struttura, nel pannello superiore dell'*Internal GUI* è comparsa una nuova linea, chiamata «1BJ4» (la riga superiore, *all*, sempre presente, indica tutti gli oggetti visualizzati). Prima di esplorare il significato di questa linea, prendiamo confidenza con i movimenti del mouse (per utilizzare al meglio PyMol è altamente consigliato l'utilizzo di un mouse a tre tasti; in questa esercitazione introduttiva saranno analizzati solo i comandi principali del mouse). Poniamo il cursore nella finestra del Viewer e:

- mantenendo premuto il tasto sinistro, ruotiamo la molecola;
- mantenendo premuto il tasto centrale, trasliamo la molecola;
- mantenendo premuto il tasto destro, applichiamo lo zoom sulla molecola;
- se il mouse possiede una rotella, ruotandola possiamo nascondere sezioni della molecola attraverso l'utilizzo di *clipping plane*, piani immaginari di fronte e dietro la molecola.

Se clicchiamo con il tasto sinistro su un atomo qualsiasi della nostra molecola, il residuo corrispondente sarà selezionato e nel pannello superiore dell'*Internal GUI* comparirà una nuova voce, *sele*:



Notate che la selezione del residuo avviene perché il mouse è impostato in *Selecting Residues* (voce in basso a destra). Cliccando ripetutamente su questo campo (sulla scritta *Residues*) potete ridefinire la selezione come *Molecules*, *Chains*, *Atoms*, *Segments* e così via. Se invece clicchiamo con il tasto centrale su un residuo, centreremo la visuale su di esso. Infine, cliccando con il tasto destro su un atomo non selezionato comparirà un menù a tendina con l'elenco di una serie di azioni (queste sono le stesse che si trovano nel pannello dell'*Internal GUI* e saranno discusse più avanti):

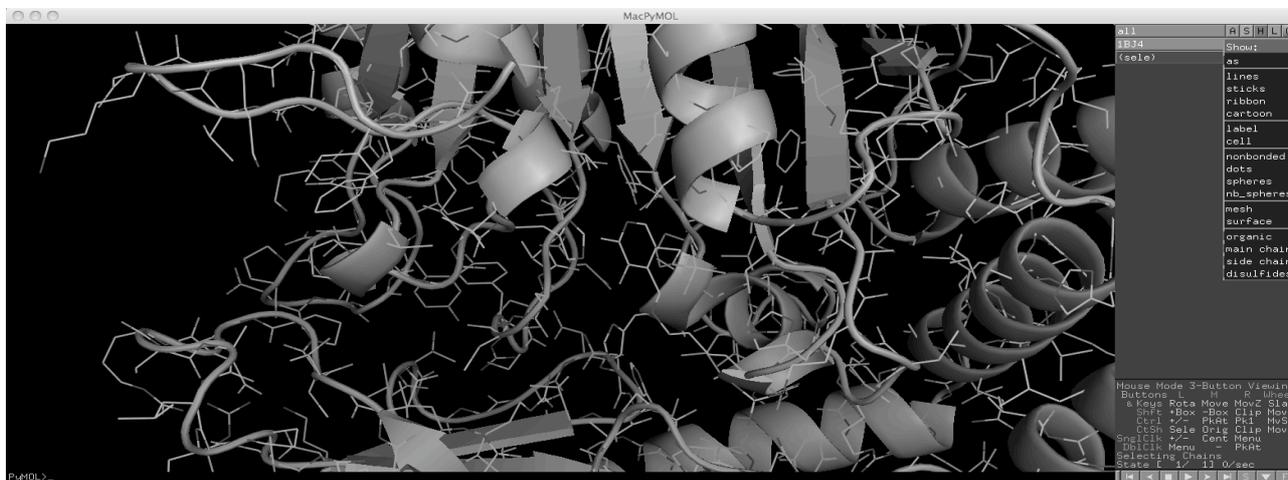


Ritorniamo ora alla descrizione delle righe che appaiono (*all*, *1BJ4*, *sele* e così via) nel pannello superiore dell'*Internal GUI*. Queste linee descrivono gli oggetti presenti e le azioni effettuabili su di essi. Per esempio, se vogliamo far scomparire momentaneamente dal viewer la molecola *1BJ4*, è sufficiente cliccare con il tasto sinistro del mouse sul suo nome nel pannello superiore dell'*Internal GUI*. Per far riapparire *1BJ4*, è sufficiente cliccare nuovamente sul nome. Accanto a ogni oggetto dell'*Internal GUI* è presente una fila di pulsanti, i quali permettono di:

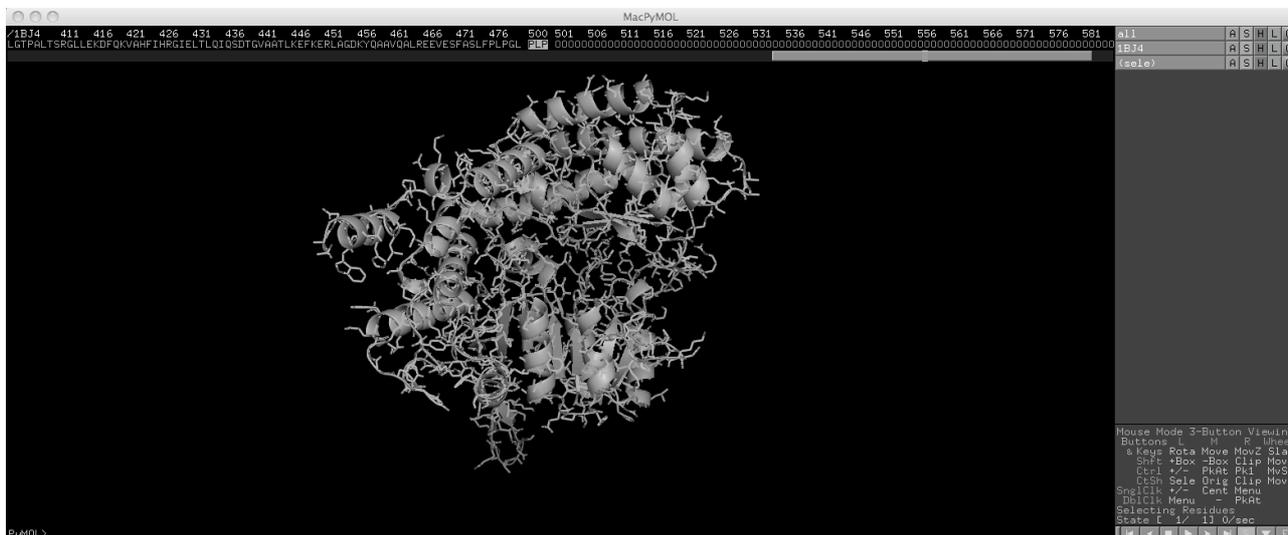
- accedere alle azioni che sono eseguite sull'oggetto (tasto *A*, *actions*);
- modificare la rappresentazione dell'oggetto (tasto *S*, *show*);
- nascondere le rappresentazioni dell'oggetto (tasto *H*, *hide*);
- applicare delle "etichette" all'oggetto (tasto *L*, *label*);
- colorare l'oggetto (tasto *C*, *color*; si noti che i colori di base delle proteine sono verde per il carbonio, rosso per l'ossigeno, azzurro per l'azoto, giallo per lo zolfo, bianco per gli atomi di idrogeno e arancione per il fosforo).

Naturalmente è impossibile esplorare nel dettaglio tutte le azioni e le modifiche effettuabili grazie a questi pulsanti. Vedremo quindi, di seguito, solo quelle più comuni.

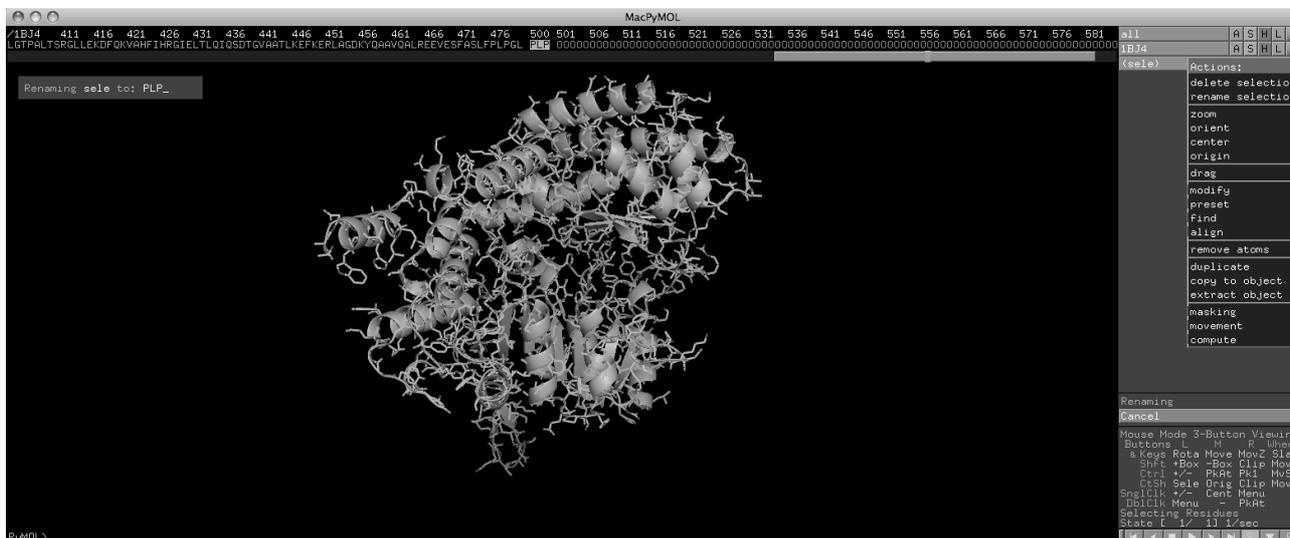
Partiamo con le rappresentazioni: PyMol consente di visualizzare la molecola in moltissimi stili, ognuno personalizzabile attraverso la voce *Setting* dall'*External GUI* (in particolare, *Edit all...*). Per esempio, rappresentiamo 1BJ4 come *Cartoon*, selezionando la voce relativa dal menù del tasto S:



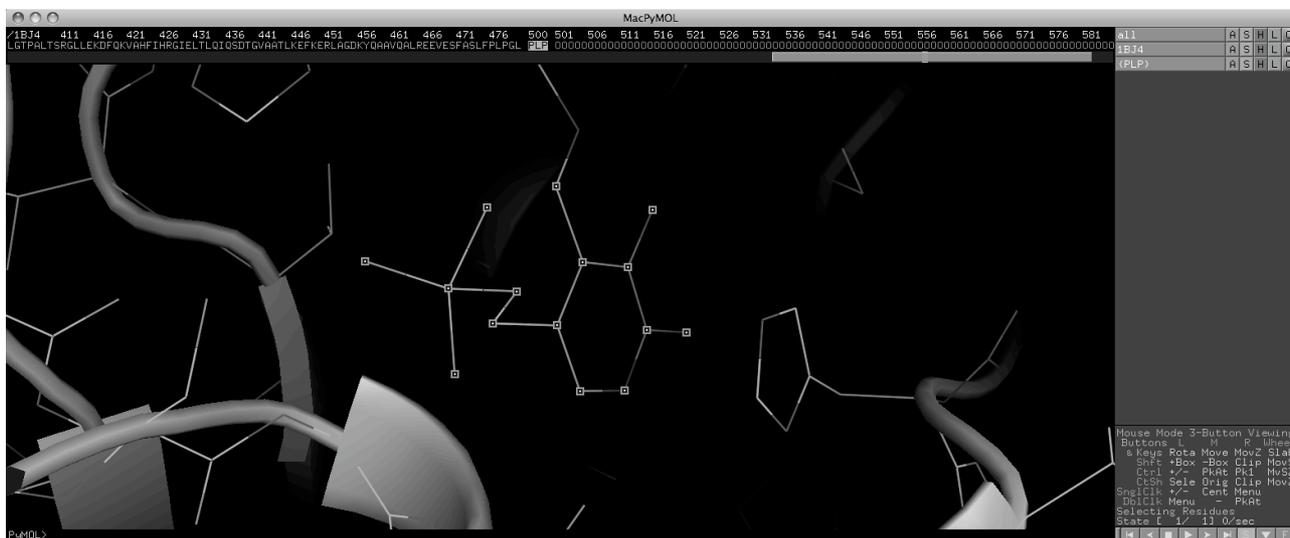
Vogliamo adesso rappresentare il PLP come bastoncini (*stick*). Per prima cosa, per agevolare l'identificazione del PLP, apriamo la finestra con la sequenza di 1BJ4 premendo il tasto S in basso a destra nel pannello inferiore accanto alle azioni sui filmati. Poi scorriamo la finestra finché non identifichiamo il residuo indicato come «PLP». A questo punto, selezioniamolo con il tasto sinistro del mouse:



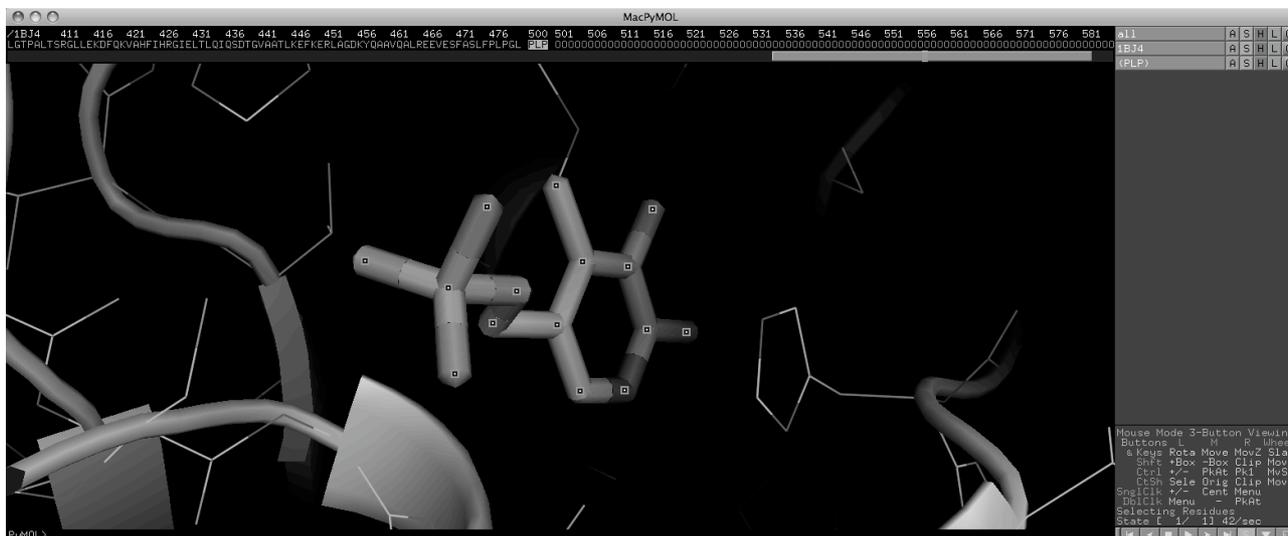
Rinominiamo la selezione apparsa nel pannello superiore dell'*Internal GUI* come PLP, cliccando sul tasto A accanto alla voce *sele* e selezionando l'opzione *rename selectio*". Nel campo che compare, inseriamo PLP e premiamo *Invio*:



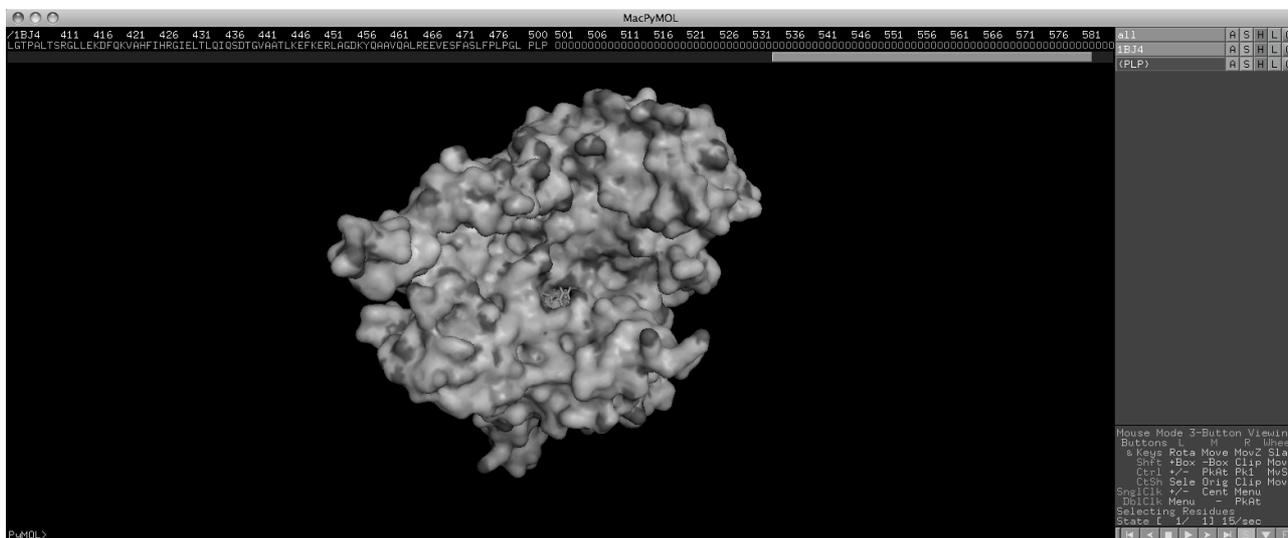
Ora, cliccando sul tasto A accanto alla voce PLP del pannello superiore dell'*Internal GUI* e selezionando l'opzione *zoom*, inquadrriamo il PLP:



Infine, cliccando sul tasto S accanto alla voce PLP del pannello superiore dell'*Internal GUI* e selezionando l'opzione *stick*, modifichiamo la rappresentazione del PLP:



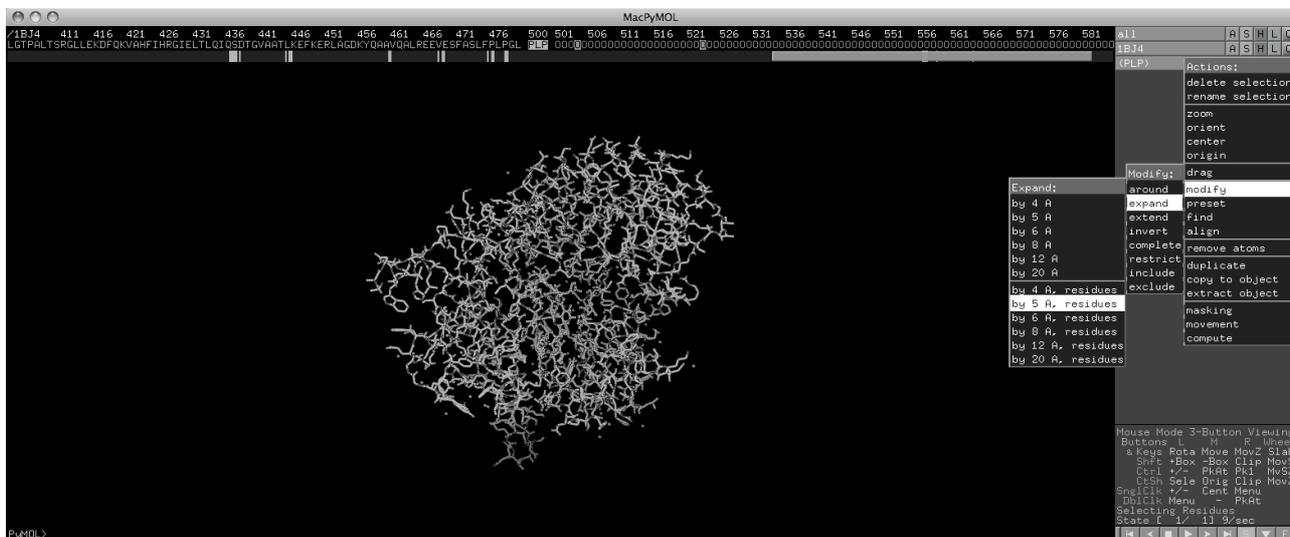
PyMol consente di rappresentare anche le sfere di Van der Waals delle molecole e le superfici accessibili al solvente. Per esempio, cliccando su S accanto alla voce 1BJ4 del pannello superiore dell'*Internal GUI* e selezionando l'opzione *surface*, modifichiamo la rappresentazione della macromolecola:



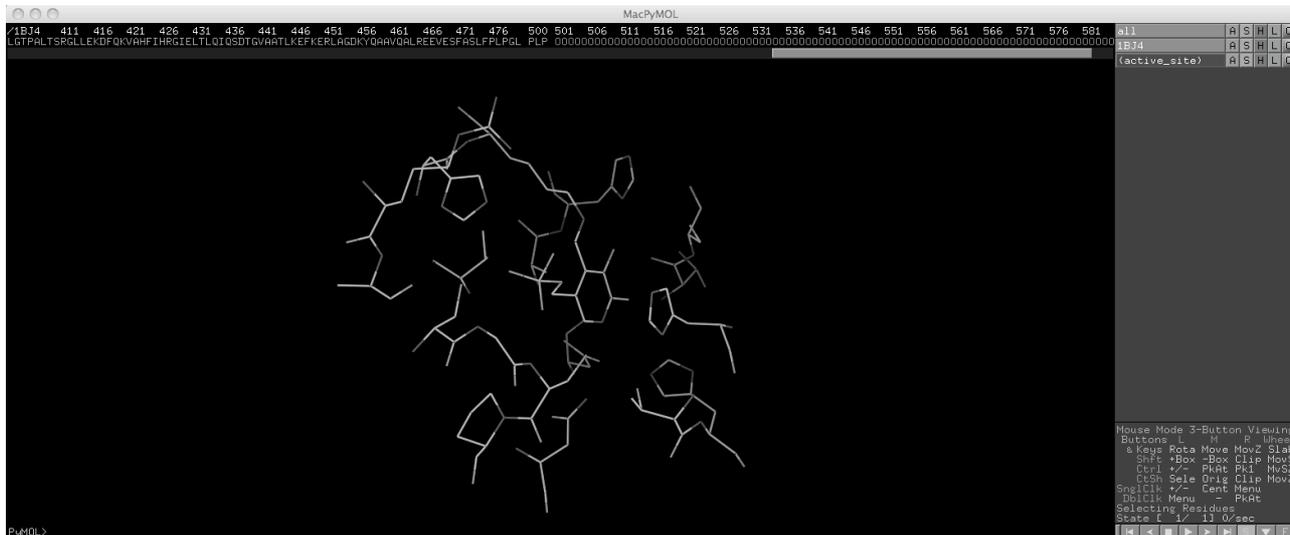
Cliccando sul tasto S accanto alla voce PLP e selezionando l'opzione *spheres*, modifichiamo la rappresentazione del PLP. A questo punto per tornare alla visualizzazione iniziale clicchiamo sul tasto A accanto alla voce 1BJ4 e selezioniamo le opzioni *preset->default* (il pannello *preset* contiene altri tipi di visualizzazione comuni. Vi invitiamo a esplorarli. Quando avete terminato, tornate alla visualizzazione di default).

Può essere molto utile identificare e analizzare in dettaglio il sito attivo ed i residui presenti in esso specialmente quando si studiano gli enzimi. Cliccando su A accanto alla voce PLP e selezionando l'opzione *modify*, quindi *expand* e di seguito *by 5 A, residues*, modifichiamo la selezione PLP in

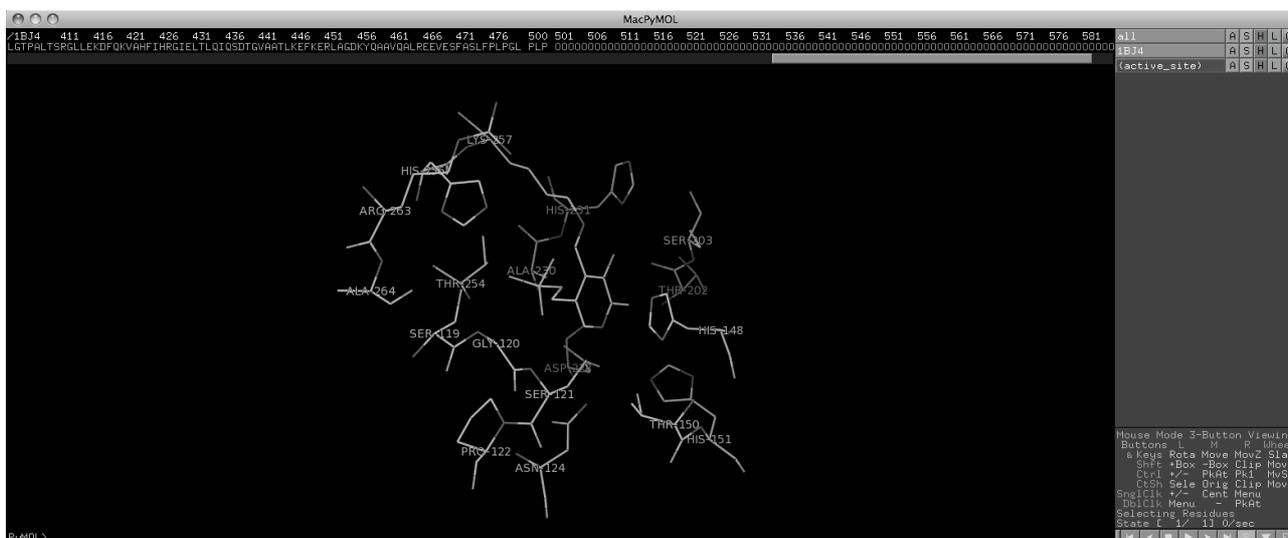
modo che comprenda i residui limitrofi (almeno un atomo di essi deve trovarsi a non più di 5 Å dal PLP). Possiamo poi rinominare la selezione come *active_site*:



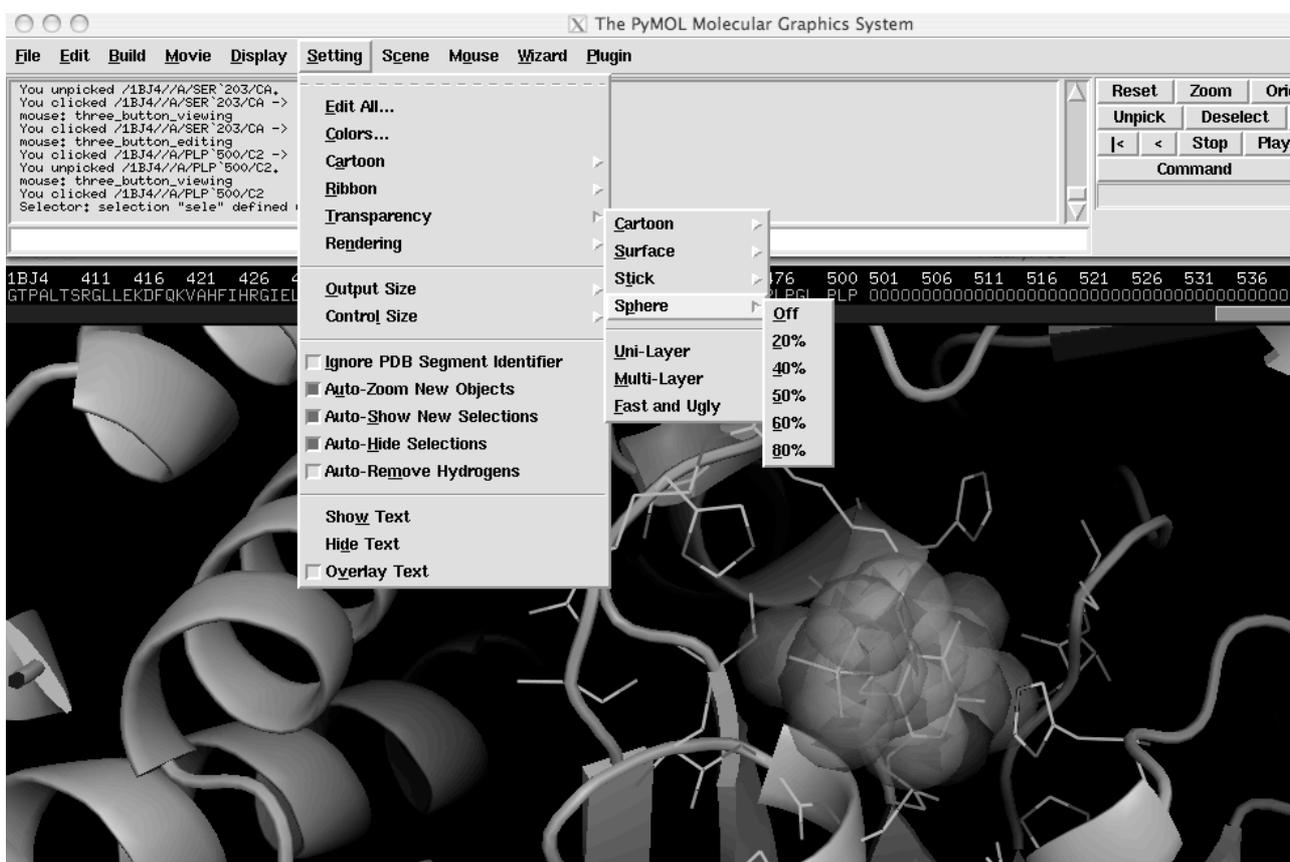
Ora nascondiamo 1BJ4 (cliccando sul tasto H accanto alla voce 1BJ4 e selezionando l'opzione *everything*) e visualizziamo solo *active_site* (cliccando sul tasto S accanto alla voce *active_site* e selezionando l'opzione *lines*). Poi, inquadriamo solo *active_site* (tasto A accanto alla voce *active_site* e selezione dell'opzione zoom):



Quali residui sono presenti nel sito attivo? Per rispondere a questa domanda, clicchiamo sul pulsante L accanto alla voce *active_site* e selezioniamo l'opzione *residues*:

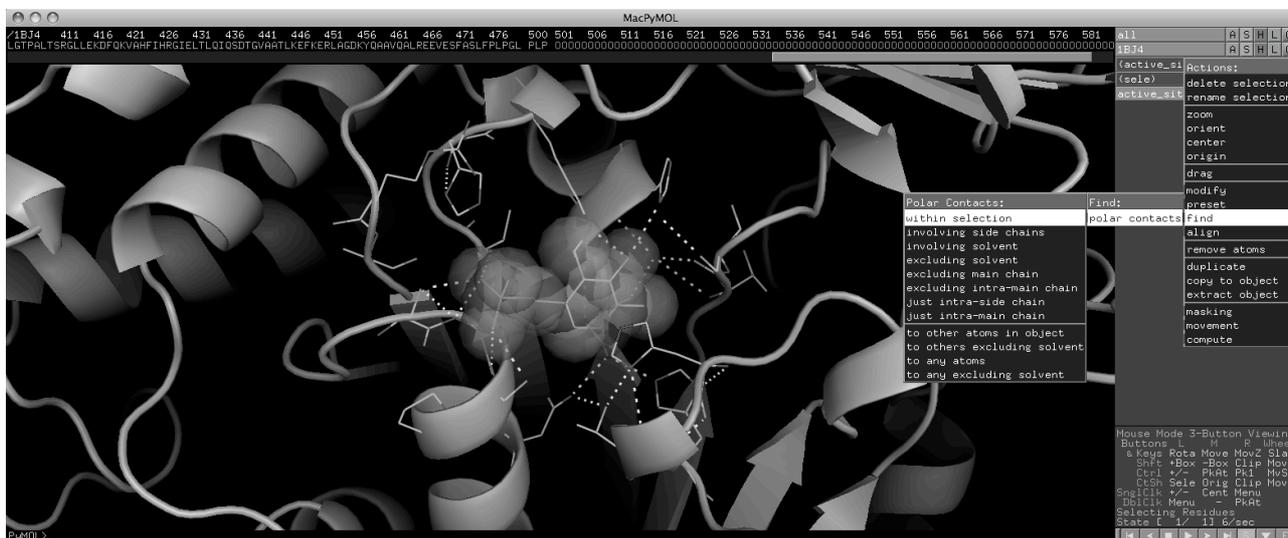


Vogliamo ora realizzare una bella immagine del sito attivo per una presentazione o una pubblicazione. Facciamo ricomparire i cartoons di 1BJ4 (S -> *cartoons*), nascondiamo le etichette dei residui (L -> *clear*), selezioniamo nuovamente il PLP con il tasto sinistro del mouse, rappresentiamolo come *spheres* e infine dalla voce *Setting* del menù dell'*External GUI* selezioniamo, come mostrato di seguito, la trasparenza delle sfere al 50%:

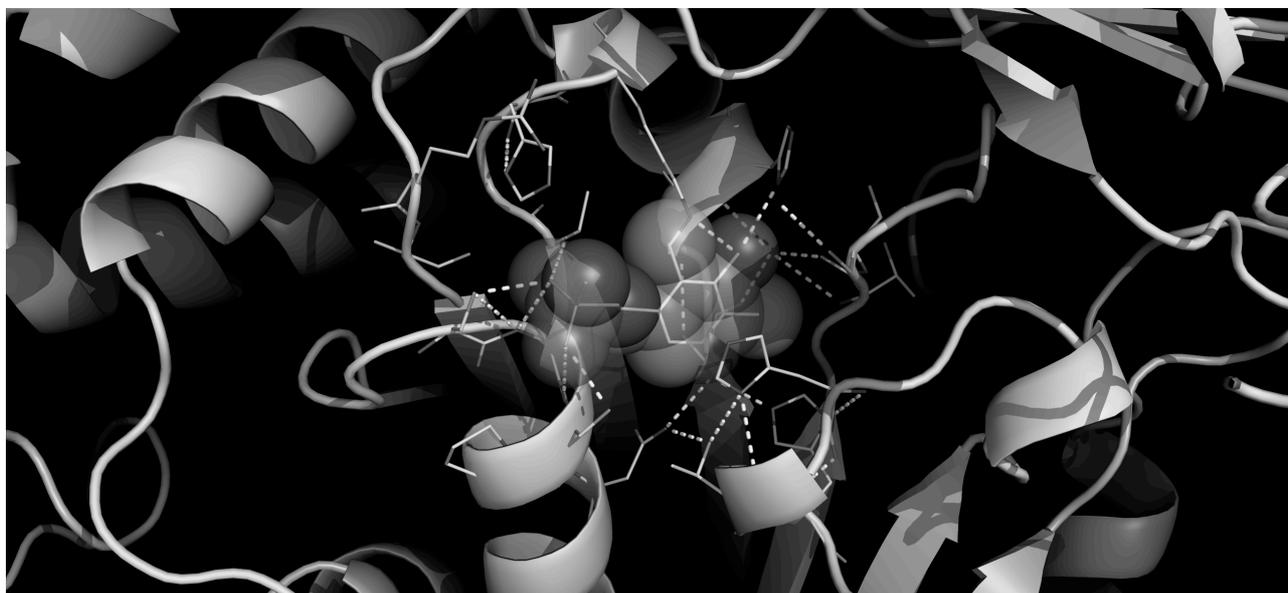


È possibile anche evidenziare i contatti polari che il PLP stabilisce con i residui del sito attivo (tasto A accanto alla voce *active_site* e poi *find -> polar contacts -> within selection*).

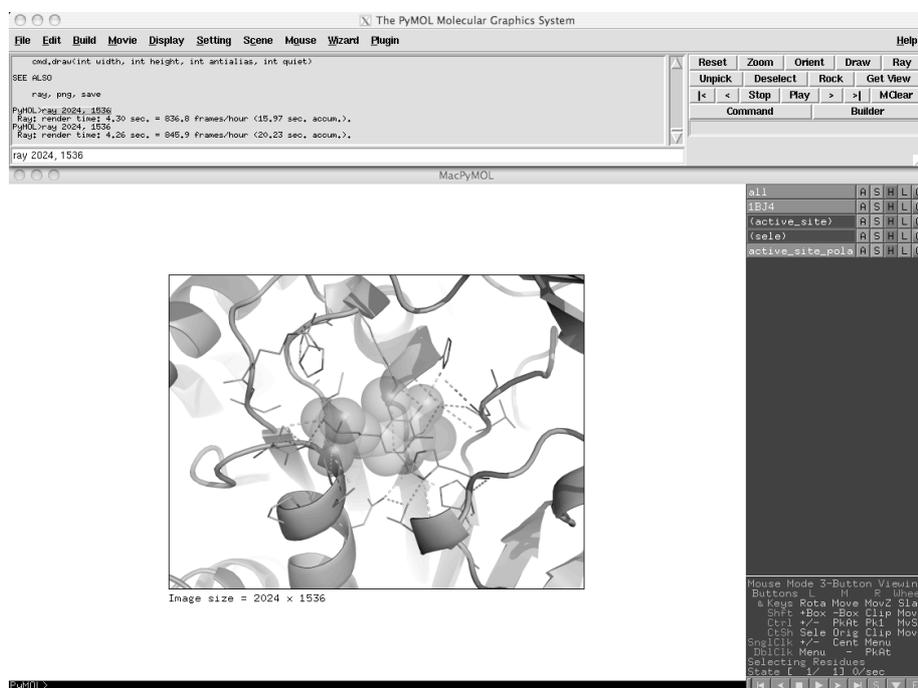
Le interazioni compariranno come trattini gialli e un nuovo oggetto sarà creato nel menù sulla destra:



Se siamo soddisfatti della nostra rappresentazione, salviamo il lavoro effettuato per non rischiare di perderlo selezionando *Save Session as* dal menù *File* dell'*External GUI* (in alto a sinistra), quindi scegliendo il nome del file nella finestra che apparirà (i file di PyMol hanno estensione .pse). Infine, generiamo una figura: dai pulsanti in alto a destra dell'*External GUI* premiamo il tasto *Ray* e attendiamo qualche secondo. L'immagine sarà soggetta a un processo di *rendering* che ne raffinerà i dettagli. Salviamo poi l'immagine selezionando *Save Image as... -> PNG* dal menù *File* dell'*External GUI* (in alto a sinistra), quindi scegliendo il nome del file nella finestra che apparirà la seguente immagine:



Se l'immagine deve essere ad alta risoluzione, è possibile anche utilizzare il comando testuale *ray* nella *Command Input Area* (per maggiori informazioni sull'utilizzo del comando consultate la guida ufficiale o utilizzate l'area *help ray*). Per esempio, se volessimo generare un'immagine di 2024 × 1536 pixel, dovremmo scrivere il comando *ray 2024, 1536*:



Lo sfondo bianco è stato generato attraverso il comando *Background -> white* accessibile dal menù *Display*.

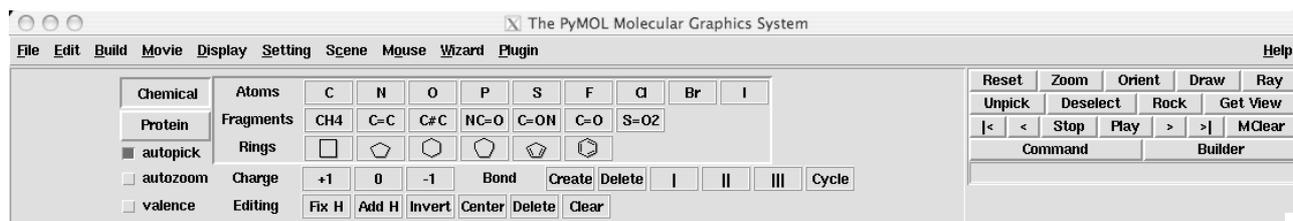
Per tornare alla finestra iniziale e cancellare le molecole presenti sullo schermo, selezioniamo il comando *Reinitialize* accessibile dal menù *File*.

Nei prossimi paragrafi saranno descritte alcune funzioni di PyMol comunemente utilizzate nella modellistica molecolare.

Pymol come Builder

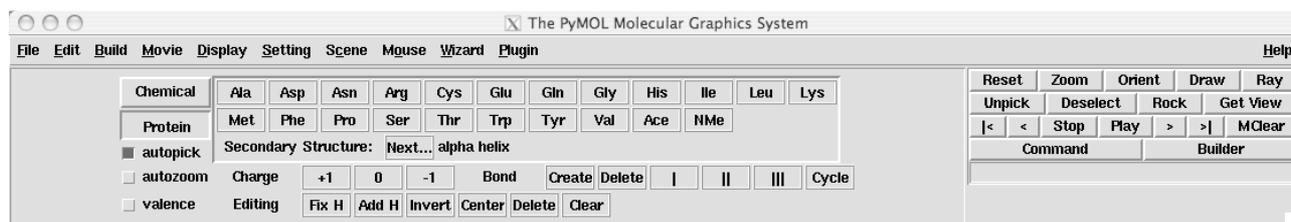
Pymol può essere utilizzato anche per costruire e modellare peptidi e piccole molecole organiche. Nell'esempio che segue, costruiremo un' α -elica costituita da residui di alanina.

Clicchiamo sul pulsante *Builder* situato a destra dell'*External GUI*. Quest'ultima sarà modificata, e il mouse entrerà in modalità *Editing* (come indicato nella parte inferiore dell'*Internal GUI*):

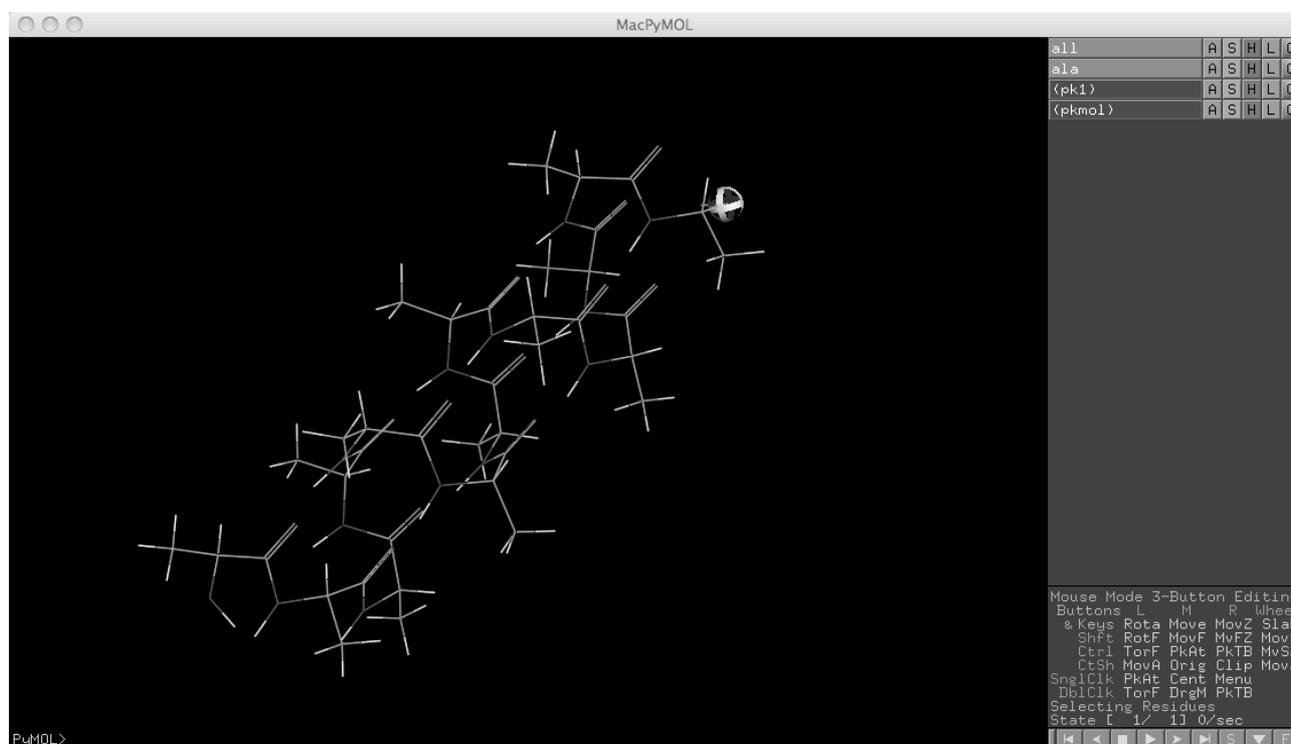


Nella finestra che appare è possibile selezionare atomi e frammenti comuni per la costruzione di piccole molecole organiche. È inoltre possibile modificare la carica, i tipi di legame e la

protonazione delle strutture generate. Cliccando sul pulsante *Protein*, situato in alto a sinistra, accediamo invece al menù per la costruzione di polipeptidi:

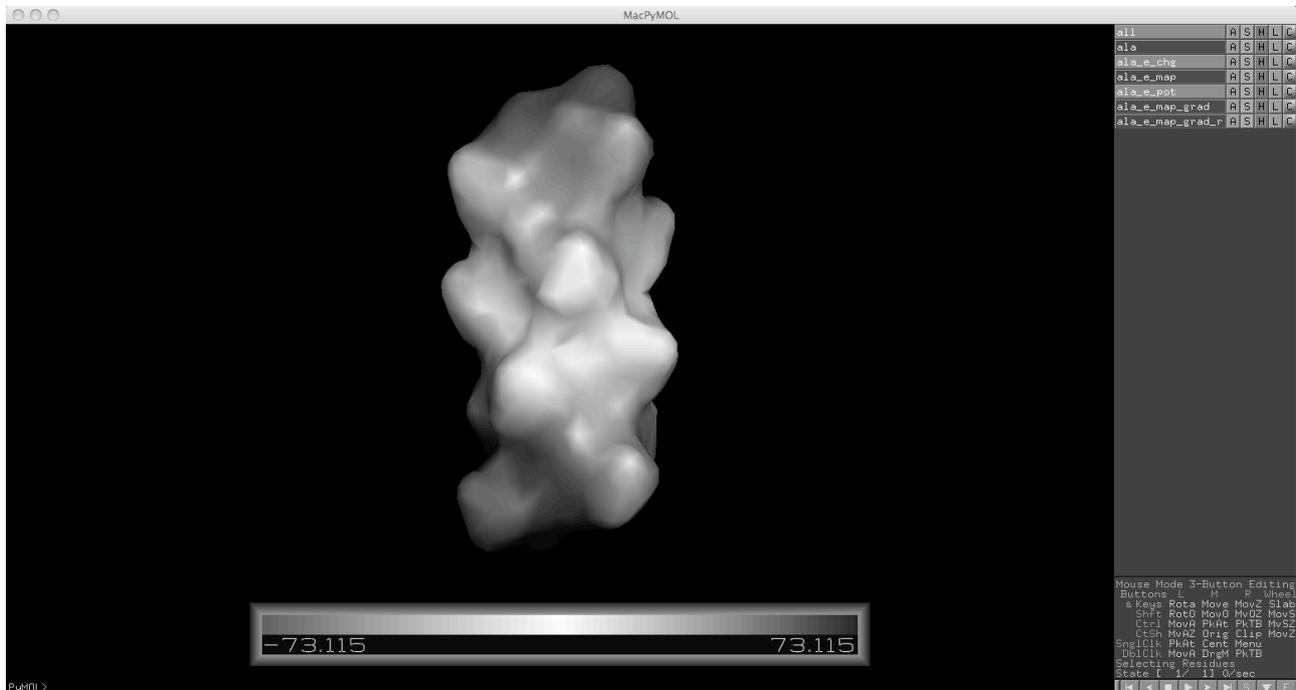


Cliccando sul pulsante *Next...*, in corrispondenza della voce *Secondary Structure*, selezioniamo *alpha helix*. Poi, cliccando ripetutamente sul pulsante *Ala*, generiamo un' α -elica costituita da residui di alanina (aggiungiamo almeno dieci residui):

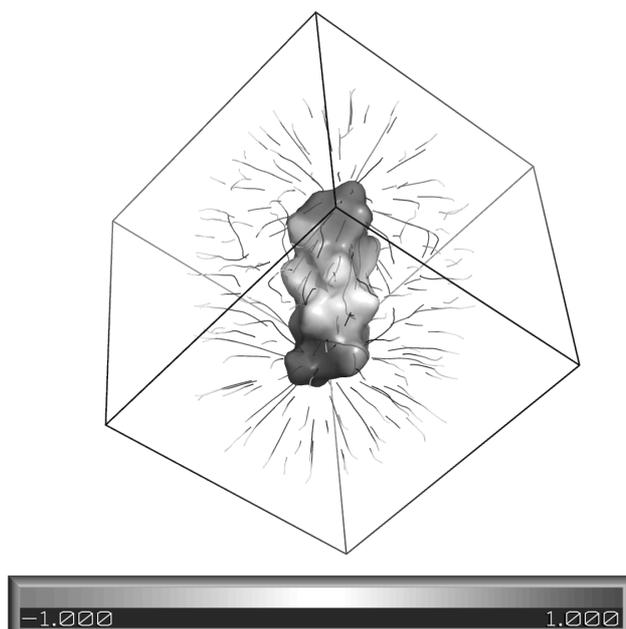


La sfera che appare nel viewer indica il punto in cui sarà attaccato, attraverso legame peptidico, il nuovo residuo. Insieme al nuovo oggetto creato (“ala” nelle voci dell’*Internal GUI*) vengono automaticamente generate due selezioni, *pk1* (*pick1*, relativa all’atomo indicato con la sfera) e *pkmol* (*pick molecule*, relativo all’intera molecola).

L' α -elica è caratterizzata da un **momento di dipolo** dovuto ai piccoli dipoli elettrici dei legami peptidici che, essendo tutti direzionati parallelamente alla lunghezza dell' α -elica, si sommano gli uni agli altri. È possibile visualizzare questa separazione di carica mappandone la distribuzione sulla superficie accessibile al solvente della molecola. Selezioniamo il tasto A in corrispondenza di "ala" e poi *generate -> vacuum electrostatic -> protein contact potential*:



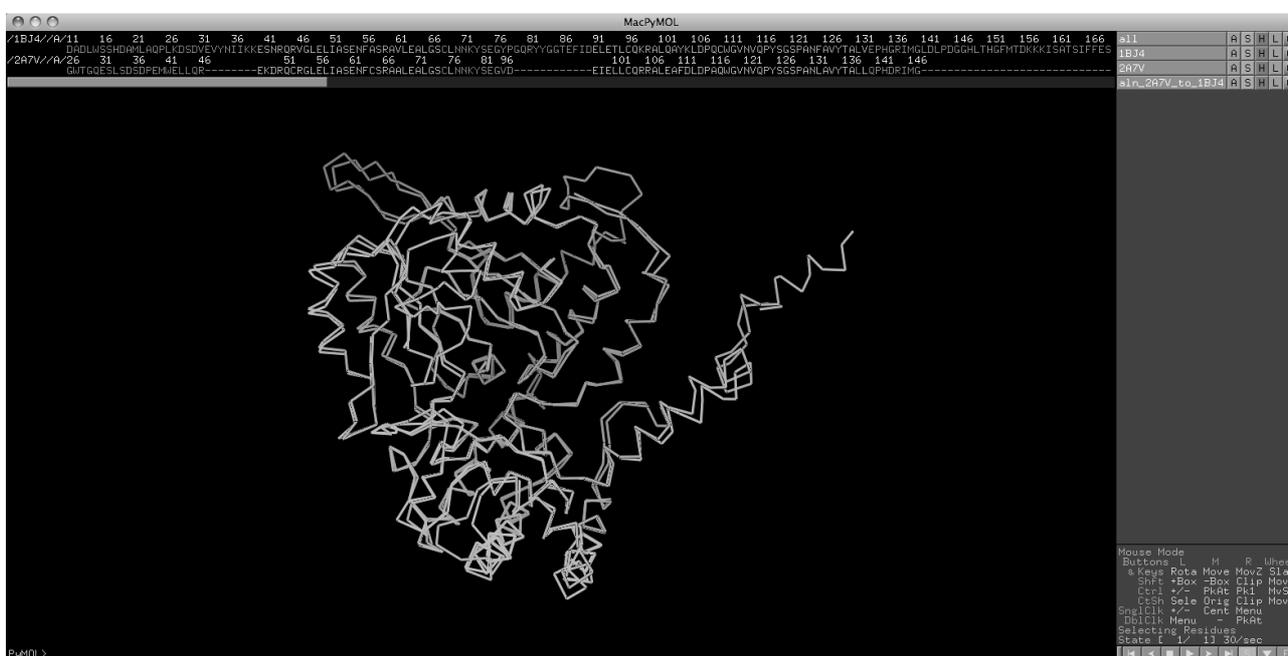
La superficie carica positivamente è colorata in blu, quella carica negativamente in rosso. La scala, in unità di kT/e , è mostrata in basso e a essa è associato un nuovo oggetto, *ala_e_pot*. Cliccando con il tasto centrale del mouse mantenendo premuto il tasto *ctrl* sulla scala e spostandosi a sinistra e a destra, è possibile variare i valori minimi e massimi della scala. Un altro oggetto creato è "*ala_e_map*", che consente di analizzare con diverse rappresentazioni il campo elettrostatico generato dalla molecola. Per esempio, premiamo il tasto A in corrispondenza di *ala_e_map* e di seguito selezioniamo *gradient -> default*, per visualizzare il gradiente del campo elettrostatico:



Allineare e sovrapporre due molecole con Pymol

Una funzione di PyMol che spesso si rivela utile nel confronto di proteine omologhe è l'allineamento di due sequenze e, sulla base di quest'ultimo, la sovrapposizione delle strutture proteiche corrispondenti.

Importiamo in PyMol le strutture con codici pdb 1BJ4 e 2A7V (serina idrossimetiltrasferasi umana citosolica e mitocondriale, rispettivamente), utilizzando il *plugin PDB Loader Service*. Apriamo la finestra con le sequenze di 1BJ4 e 2A7V, premendo il tasto S in basso a destra nel pannello inferiore accanto alle azioni sui filmati. Successivamente, selezioniamo il tasto A in corrispondenza di 1BJ4 e di seguito *align -> to molecole -> 2A7V* per visualizzare le sequenze allineate e le strutture delle proteine sovrapposte (per semplificare la rappresentazione, possiamo nascondere le linee e visualizzare esclusivamente lo scheletro dei carboni α , selezionando dalla S di *all* la voce *Ribbons*):

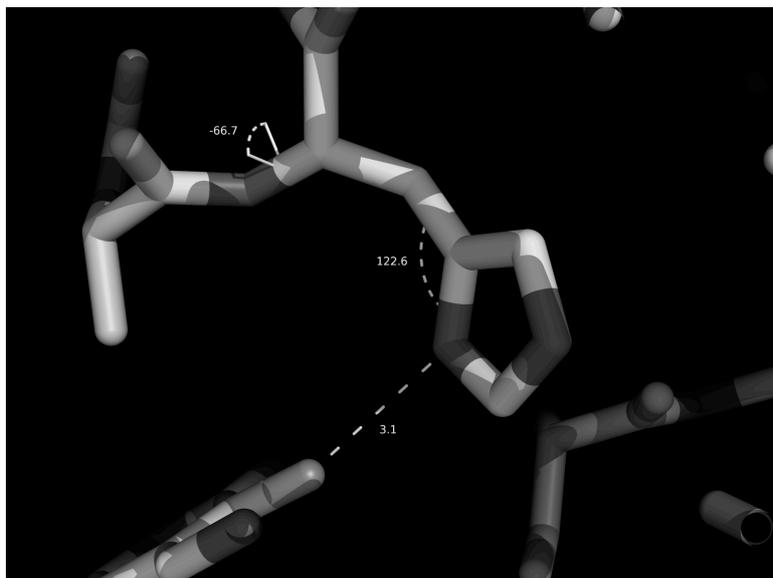


Per effettuare una sovrapposizione strutturale indipendente dalla sequenza, utile quando le proteine presentano sequenza dissimile, è possibile anche utilizzare il comando testuale *super* nella *Command Input Area* (per maggiori informazioni sull'utilizzo del comando fate riferimento alla guida ufficiale o utilizzate l'*help super*). Per esempio, se volessimo generare una sovrapposizione tra 1BJ4 e 2A7V, dovremmo scrivere il comando *super 1BJ4, 2A7V* e premere *Invio*.

Il menù *wizard* di Pymol

Attraverso il menù *wizard* di PyMol è possibile accedere a strumenti avanzati di analisi strutturale che comprendono, per esempio, la misura di lunghezze di legame, distanze, angoli, la sovrapposizione di tre o più coppie di atomi, la mutagenesi *in silico* di un residuo o lo *sculpting* di una molecola. Selezionando per esempio la voce *Measurement*, appare nell'*Internal GUI* un nuovo menù. Cliccando con il tasto sinistro del mouse sulla prima voce del nuovo menù, è possibile selezionare il tipo di misura da effettuare (distanze, angoli, angoli diedrici e via dicendo). Dopo aver selezionato una di queste voci, saremo guidati da PyMol nella scelta degli atomi sui quali si vuole

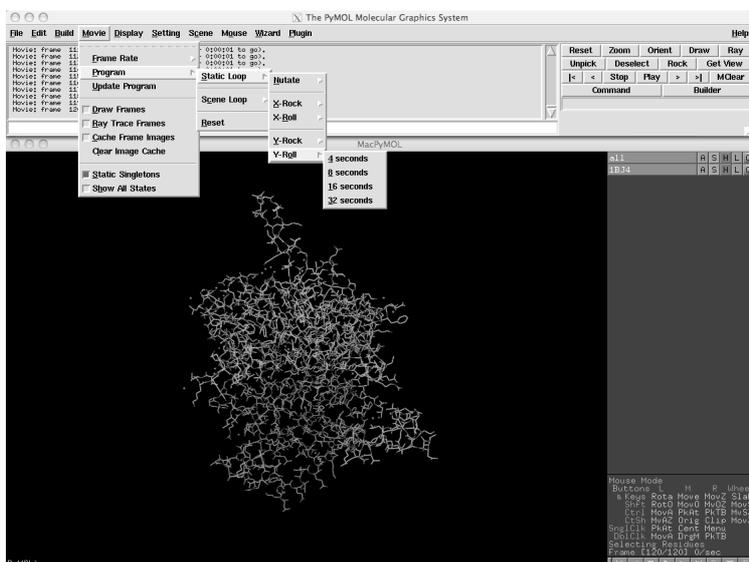
effettuare la misura. Nella figura che segue, per esempio, sono mostrate le misure di distanze, angoli e angoli diedrici:



Generare filmati con Pymol

Utilizzando gli script è possibile generare con PyMol filmati abbastanza complessi. Nel caso di semplici rotazioni o oscillazioni, comunque, PyMol mette a disposizione strumenti che non prevedono l'utilizzo di script. Nella distribuzione per MAC OS X, PyMol permette di esportare il filmato direttamente come file .mov, mentre in quella per Windows è possibile generare un file di tipo MPEG. Negli altri sistemi operativi PyMol genera una serie di immagini statiche consecutive (*frame*), che possono poi essere assemblate in filmati grazie all'utilizzo di programmi esterni (per esempio ImageMagick).

Per esempio, per generare il filmato della rotazione di una molecola (utilizzeremo ancora una volta 1BJ4), effettuiamo dal menù dell'*External GUI* la seguente selezione: *Movie -> Program -> Static Loop -> Y-Roll -> 4 seconds*:



A questo punto, clicchiamo sul pulsante *Play* (nell'area delle azioni sui filmati, in basso a destra). La molecola inizierà a ruotare rispetto all'asse Y, compiendo un giro completo in 4 secondi. Per salvare il filmato è sufficiente selezionare la voce *Save Movie...* nel menu *File* dell'*External GUI*.

Utilizzare gli Script di Pymol

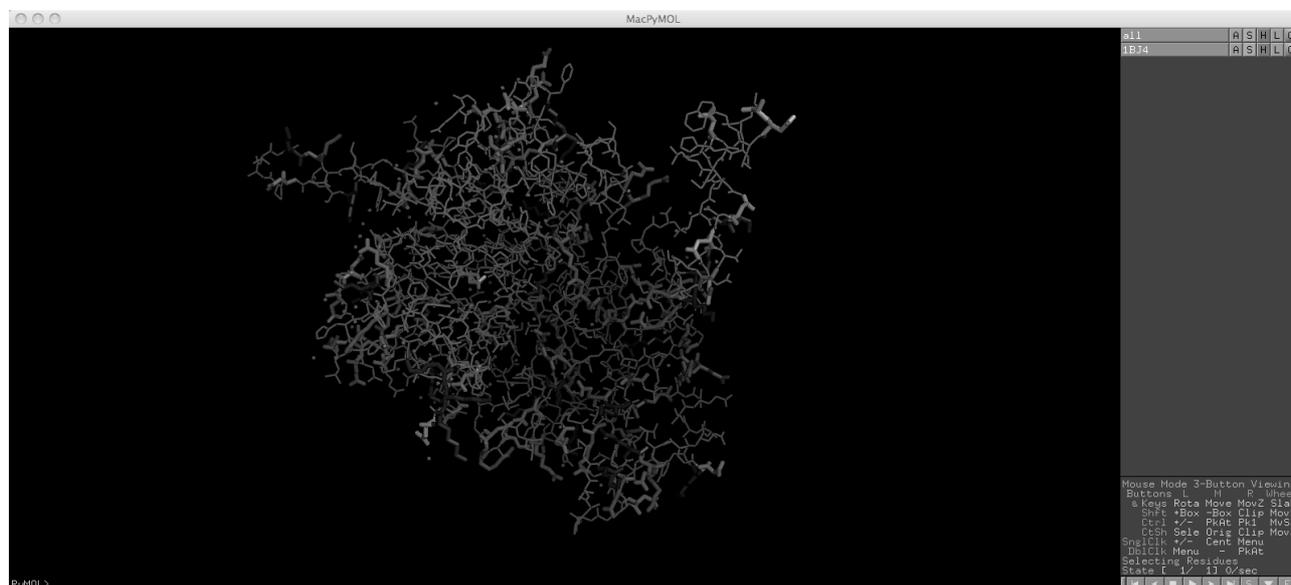
È possibile aggiungere nuove funzionalità a PyMol attraverso Python. Nei casi più semplici, è sufficiente incorporare uno script Python come comando di PyMol eseguibile dalla *Command Input Area*. Nell'esempio che segue utilizzeremo un breve script che rappresenta alcuni tipi di residui (arginina, lisina, aspartato e glutammato) con colori decisi dall'utente.

Apriete un editor di testo e scrivete il seguente codice Python (per saperne di più su Python si veda l'appendice A):

```
def colora_carichi():
    cmd.set_color("rosso", [1.0,0.0,0.0])
    cmd.set_color("marrone", [0.7,0.4,0.0])
    cmd.set_color("blu", [0.0,0.0,1.0])
    cmd.set_color("azzurro", [0.0,0.4,0.7])
    cmd.set_color("grigio", [0.3,0.3,0.3])
    cmd.color("grigio", "all")
    cmd.color("rosso", "resn glu")
    cmd.color("marrone", "resn asp")
    cmd.color("blu", "resn lys")
    cmd.color("azzurro", "resn arg")
    carichi = "resn glu+asp+lys+arg"
    cmd.show("sticks", carichi)

cmd.extend("colora_carichi", colora_carichi)
```

Salvate il file nominandolo «colora_carichi.py». Come si può vedere, nello script è definita una funzione, *colora_carichi()*, all'interno della quale sono definiti alcuni comandi di PyMol (*cmd.set_color*, che definisce un colore su di una scala di tipo RGB; *cmd.color*, che colora una selezione di PyMol con il colore dato come argomento; *cmd.show*, che mostra la selezione come *sticks*). Al termine dello script, il comando *cmd.extend* permette di utilizzare la funzione appena generata come comando di Pymol. Per importare il comando in PyMol, selezionate *Run...* dal menù *File* dell'*External GUI* e scegliete il file *colora_carichi.py*. A questo punto, è sufficiente utilizzare il comando testuale *colora_carichi* nella *Command Input Area* per lanciare la funzione appena scritta:



Conclusioni

PyMol costituisce uno strumento formidabile per la grafica e la modellistica molecolare. Forse l'aspetto più affascinante di PyMol è rappresentato proprio dalla semplicità con la quale è possibile estenderlo con script e plugin propri. Questa caratteristica ha dato vita a una comunità di utenti e programmatori che mettono a disposizione il loro tempo e le loro capacità per estendere e migliorare costantemente PyMol. È possibile conoscere e unirsi a questa comunità visitando il sito <http://www.pymolwiki.org>. Buona navigazione!

Il 3 ottobre 2009, all'età di 37 anni, è scomparso prematuramente Warren L. DeLano, creatore di PyMol e convinto sostenitore della filosofia open source. Un sentito grazie a Warren DeLano, per il contributo notevole apportato alla ricerca e alla didattica scientifica.

Gli Autori