

## Týmový projekt z Matematické biologie a biomedicíny – biomedicínská bioinformatika

PřF: Bi4013 (jaro 2021)

### **Návrh stabilních mutantů a příprava chytré knihovny pro vylepšení aktivity halogenalkandehalogenasy vůči yperitu.**

Halogenalkandehalogenasy jsou enzymy schopné odštěpovat halogeny z alifatických uhlovodíků a přeměnit je na příslušné alkoholy. Halogenované látky jsou často toxické a je tomu tak i u bojového plynu yperitu. Enzymatické odbourávání yperitu by mělo uplatnění při dekontaminaci různých předmětů, nicméně známé halogenalkandehalogenasy nemají dostatečnou aktivitu pro odbourávání této látky. Vylepšení aktivity a specificity vůči yperitu je tedy nutné pro potenciální použití v praxi. Navrhněte chytrou knihovnu, která má šanci vylepšit katalytické vlastnosti tak, aby se screening pohyboval v řádech tisíců. Mutace zlepšující aktivitu ale vedou často ke ztrátě stability. Navrhněte tedy paralelně také konkrétní mutace, které by stabilitu vylepšily.

*Studenti se naučí používat webový nástroj HotSpot Wizard. Na základě sekvenčních i strukturních analýz provedou návrh mutací pro zvýšení termodynamické stability proteinu na flexibilních regionech. Dále navrhnou chytrou knihovnu pro screening aktivity za účelem zlepšení katalytických schopností enzymu halogenalkandehalogenasy.*

#### Vstup:

```
>Halogenalkandehalogenasa  
MSELGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPLVFLHGNPTSSYLWRNIIPHVAPSHRCIAPDLIGMGKSDKPDLD  
YFFDDHVRYLDAFIEALGLEEVVLIHDWGSALGFHWAKRNPERSVKGIACMEFIRPIPTWDEWPEFARETFFQAFRTAD  
VGRELILDQNAFIEGALPKCVVRPLTEVEMDHYREPFLKPVDPREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEAYMNWLHQSPV  
PKLLFWGTPGVLIIPAEAAARLAESLPNCKTVDIGPGLHYLQEDNPDLIGSDIARWLPVL
```

Všechny výpočty a analýzy se dají vytvořit přímo v grafickém rozhraní nástroje HotSpot Wizard, který naleznete na adrese <https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard/>. K nastudování jednotlivých funkcí Vám mohou pomoci sekce Help a Example a také publikace zabývající se tímto nástrojem:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4987947/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6030891/>

Postup řešení projektu:

- 1) Vytvoření homologního modelu ze vstupní sekvence.  
*HotSpot Wizard umožňuje využití nástrojů Modeller a I-Tasser.*
- 2) Identifikace katalytických aminokyselin pro zadání esenciálních residuí  
*Pro identifikaci pozic důležitých residuí využijte příbuzný protein (UniProtKB - P0A3G2, PDB ID - 4E46)*
- 3) Výpočet HotSpot Wizardem s defaultním nastavením  
*Výpočet proveďte jak na zadané cílové sekvenci, tak i na struktuře příbuzného proteinu.*
- 4) Identifikace 5 nejflexibilnějších residuí podle B-faktorů (B-FITTER)  
*Pro identifikaci pozic důležitých residuí využijte příbuzný protein (použití metody B-Fitter popisuje následující publikace <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/anie.200602795>)*
- 5) Saturační mutageneze flexibilních pozic a výběr mutací s nejvyšším příspěvkem ke stabilitě  
*Spočítejte všechny jednobodové mutace na vybraných pozicích pomocí modulu Design mutations. Pro každou pozici identifikujte nejlepší mutaci.*
- 6) Identifikace mutabilních (nekonzervovaných) pozic ve funkčních oblastech enzymu  
*Aminokyseliny s přímým efektem na funkci jsou nejčastěji lokalizovány ve vazebných místech pro ligand a přístupových cestách*
- 7) Vytvořte chytrou knihovnu s nejméně 3 pozicemi, tak aby byly využity pouze aminokyseliny, které v mnohonásobném sekvenčním přiložení mají frekvenci alespoň 4 % a pokrytím knihovny 99 %.  
*Pro návrh knihovny použijte modul Design library.*
- 8) Vygenerujte PDF reporty z designu mutací i knihovny