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

PřF: Bi4013 (jaro 2021)

**Návrh stabilních mutantů a příprava chytré knihovny pro vylepšení aktivity hologenalkandehalogenasy 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 thermodynamické stability proteinu na flexibilních regionech. Dále navrhnou chytrou knihovnu pro screening aktivity za účelem zlepšení katalytických schopností enzymu halogenalkandehalogenasy.*

Vstup:

>Halogenalkandehalogenasa

MSELGTGFPFDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGTPVLFLHGNPTSSYLWRNIIPHVAPSHRCIAPDLIGMGKSDKPDLDYFFDDHVRYLDAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERVKGIACMEFIRPIPTWDEWPEFARETFQAFRTADVGRELILDQNAFIEGALPKCVVRPLTEVEMDHYREPFLKPVDREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEAYMNWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAARLAESLPNCKTVDIGPGLHYLQEDNPDLIGSDIARWLPVL

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.*

1. Identifikace katalytických aminokyselin pro zadání esenciálních residuí

*Pro identifikaci pozic důležitých residuí využijte příbuzný protein (UniProtKB - P0A3G2, PDB ID - 4E46)*

1. Výpočet HotSpot Wizardem s defaultním nastavením

*Výpočet proveďte jak na zadané cílové sekvenci, tak i na struktuře příbuzného proteinu.*

1. 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)*

1. 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.*

1. 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*

1. 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.*

1. Vygenerujte PDF reporty z designu mutací i knihovny