

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
YFFDDHVRYLDAFIEALGLEEVVLVIHDWGSALGFHWAKRNPERSVKGIACMEFIRPIPTWDEWPEFARETFFQAFRTAD
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