

Laboratorium 12 i 13

Autorzy: Adam Kuzdrałiński, Marek Miśkiewicz

Nazwa pliku: imie_nazwisko_12_13_bio.pdf

Typ ćwiczenia: dwutygodniowe

Cel: Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z możliwościami analizy struktury białek, ich modelowania oraz wybranych technik stosowanych w projektowaniu leków białkowych.

1. Znajdź plik pdb białka, którego PDB ID to 1VOT. Znajdź je w bazie RCSB i pobierz jego plik pdb. Następnie otwórz je w PyMOL.
 - a. w PyMOL wybierz Display->Sequence, żeby móc zobaczyć sekwencję tego białka
 - b. znajdź w sekwencji oznaczenie HUP (na końcu sekwencji) czyli skrót nazwy "hupercyne A" (hupercyna A) czyli alkaloidu znajdującego się w kompleksie z tym białkiem. Zrób screena zaznaczonego na strukturze białka tego alkaloidu (jeśli zaznaczysz go na sekwencji to zaznaczy się w strukturze białka) **[task 1]**
 - c. po prawej stronie w menu widnieje napis "sele_", a obok niego litery "A, S, H, L, C". Kliknij w "A"->rename selection, a następnie zmień nazwę zaznaczonego obszaru na HUP
 - d. zmień tło na białe (szukaj w menu "Display")
 - e. żeby lepiej zwizualizować strukturę białka i zobaczyć struktury typu alpha-helix oraz beta-sheets kliknij po prawej stronie "1vot", z menu "A, S, H, L, C" wybierz "C"-->"by chain"-->"chainbows"
 - f. korzystając z polecenia (wpisz w linii poleceń) "util.cbay HUP" zmień kolor hupercyny A na żółty i podaj liczbę atomów (suma atomów z komunikatu), która została pokolorowana **[task 2]**.
 - g. użyj polecenia "show sticks, byres all within 5 of HUP" do uwidocznienia otoczenia białkowego hupercyny A (można w ten sposób oznaczać centrum aktywne enzymu) i wyjaśnij w szczegółach poszczególne elementy tego polecenia i efekt ich zastosowania **[task 3]**.
 - h. po prawej stronie w menu kliknij "1vot"-->"H"-->"Cartoon". Zrób screena tej struktury **[task 4]**.
 - i. Zaznacz wszystkie atomy widocznej struktury klikając w każdą cząstkę. Upewnij się, że wszystko jest zaznaczone obracając nią. Po prawej stronie w menu widnieje napis "sele_", zmień jego nazwę na "active". Żeby mieć tę strukturę na środku kliknij w "A" obok "Active", a następnie "Zoom".

W kontekście PyMOL, "polar contacts" to wynik oddziaływań elektrostatycznych między atomami.

W białkach, "polar contacts" odgrywają ważną rolę w utrzymaniu struktury przestrzennej białka (struktura 3D) oraz w oddziaływaniach między białkami. "Polar contacts" obejmują: wiązania wodorowe, wiązania jonowe, oddziaływania między grupami polarnymi a wodą.

- j. żeby zobaczyć wiązania hupercyny A utrzymujące ją w tej strukturze kliknij przy "HUP"-->"A"-->"Find"-->"Polar contacts"-->"By any atoms". Zaznacz te wiązania na czerwono (po prawej stronie w menu w odpowiedniej sekcji kliknij "C"-->"reds"-->"red". Teraz lepiej je widać. Ile tego typu wiązań utrzymuje hupercynę A (podaj liczbę) **[task 5]**
- k. jeśli niewidoczne są cząsteczki wody (jako krzyżyki) wpisz w linii poleceń "show nonbonded" i odpowiedz na pytanie: z iloma cząsteczkami wody oddziałuje hupercyna A **[task 6]**? Zaznacz te cząsteczki wody, następnie zmień nazwę tego zaznaczenia na "Active_water" i obok Active_water wybierz "S"-->"Spheres" żeby je dobrze uwidocznić.

- l. schowaj cząsteczki wody (poza tymi, które oddziałują z badanym metabolitem) za pomocą polecenia "hide nonbonded"
- m. zmierz odległość pomiędzy tymi dwiema cząsteczkami wody, wybierz Menu górne->Wizard->Measurement. Następnie w ramce tego narzędzia wybierz "Distances"->"Measurement mode" i kliknij najpierw w jedną cząsteczkę wody, a potem w drugą. Jaka jest odległość między nimi [task 7]. Pomijamy jednostkę.

2. Otwórz narzędzie PyMOL, nie wczytuj żadnego białka.

- a. za pomocą polecenia "fab DSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGYDSHAKRHHGYKRKFHEKHHSHRGY" umieść pierwszorzędową strukturę tego białka w edytorze PyMOL
- b. następnie przeprowadź losowe fałdowanie białka poprzez Builder (prawy, górny róg)->Sculpt (kliknij w oknie)->"Scramble Unrestrained Coords" (to menu znajduje się po prawej stronie na dole). Przybliż tą strukturę (zoom) i zrób screena [task 8]. Następnie wróć do struktury pierwszorzędowej (undo).
- c. wybierz "Builder"->"Rest", a następnie kliknij w pierwszy i ostatni aminokwas białka, po czym wybierz "Builder"->"Sculpt"->"Scramble Unrestrained Coords" i odpowiedz na pytanie czy Twoje białko uległo sfałdowaniu czy też nie? [task 9]
- d. jeśli tak zrób screena, a jeśli jego struktura wraca do pierwszorzędowej to spróbuj ponownie zaznaczyć inne miejsca tak, aby jakiś rodzaj struktury wyższego rzędu okazał się trwały i zrób screena jeśli to się uda [task 10].
- e. zapisz utworzoną strukturę w pliku pdb, a jako odpowiedź do tego zadania umieść pierwsze 10 linijek Twojego pliku [task 11].

3. Wpisz w google "colab alphafold2" i wejdź w pierwszy rekord.

- a. znajdź sekwencję białka oznaczonego jako "COBRA_ARATH" w bazie danych UniProtKB. Pobierz sekwencję tego białka w formacie FASTA i wklej jako odpowiedź do tego zadania [task 12].
- b. zmień fragment sekwencji tego białka z "ISVGAAGTTN" na "ISVGAAATTN" i wklej całość sekwencji z tą zmianą w pole "query_sequence" w otwartej poprzednio podstronie Colab. W polu "jobname" wpisz "COBRA_mutation_167GtoA", zaznacz "save_to_google_drive", kliknij "Połącz" ("Connect") żeby mieć dostęp do zasobów. W menu "Środowisko wykonawcze" kliknij "Uruchom wszystko". Nie zamykaj tej podstrony dopóki algorytm nie zakończy pracy.
- c. wklej wykres "Sequence coverage" wygenerowany podczas tworzenia predykcji struktury białka [task 13]. Co przedstawia ten wykres [task 14]?
- d. po zakończeniu pracy w Colab, kliknij "Odłącz.."
- e. Otwórz w PyMOL plik "COBRA_mutation_167GtoA_5fc83_unrelaxed_rank_003_alphafold2_ptm_model_1_seed_000.pdb" wygenerowany przez AlphaFold2 oraz jednocześnie jego odpowiednik o rozszerzeniu pdb z bazy danych UniProtKB z rekordu "COBRA_ARATH", znajdź linijkę: "AlphaFold AF-Q94KT8-F1 Predicted" i kliknij w pobierz. Następnie zmień nazwę tych białek na krótszą niż jest obecnie żeby ułatwić sobie kolejne analizy.
- f. w PyMOL za pomocą polecenia "align protein1, protein2" (wstaw nazwy analizowanych białek, które wyświetlają się w ramce po prawej stronie) przyrównaj struktury tego białka. Zrób screena [task 15].
- g. posługując się poleceniem o składni "color blue, protein_name" zmień kolor jednego białka na niebieski, a drugiego (mutanta) na czerwony. Żeby lepiej widzieć struktury drugorzędowe użyj polecenia "show cartoon", następnie zachowaj przyrównanie w pliku "aligned_proteins.pdb"

posługując się na przykład poleceniem “save aligned_proteins.pdb”. Plik ten dołącz do raportu jako oddzielny plik [task 16].

4. Przeprowadź z użyciem AlphaFold2 predykcję struktury białka z zadania 8 (czyli z task 8) i dodaj do raportu wygenerowany plik pdb o nazwie “strange_protein.pdb” [task 17].
5. Z wykorzystaniem znanych Ci narzędzi zaprojektuj własną sekwencję białka o długości minimum 200 aminokwasów, które składa się wyłącznie z alpha-helis oraz łączników pomiędzy helisami (pomiędzy każdą helisą musi być łącznik). Dołącz plik pdb z AlphaFold2 o nazwie “additional_task.pdb” jako dowód, że się udało [task 18-27].