

## Przewidywanie struktury drugorzędowej

Sekwencja:

```
>tRNA_Ile_AAT
```

```
GGCCGGTTAGCTCAGTTGGTCAGAGCGTGGTGCTAATAACGCCAAGGTCGCGGGTTCGAT
```

```
CCCCGTACGGGCCA
```

### Cw1. MFOLD

1. Wejdź na stronę serwisu mfold: <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>
2. Wklej sekwencję tRNA i używając domyślnych ustawień uruchom program.
3. Obejrzyj wykresy *dot plot* oraz *ss-count*.
4. Obejrzyj wizualizacje poszczególnych struktur drugorzędowych w formacie jpeg. Zapisz do protokołu:
  - a. ile możliwych struktur drugorzędowych zostało przewidzianych w obrębie ustawionego domyślnie progu 5% suboptymalności?
  - b. Ile jest możliwych par zasad w obrębie ustawionego domyślnie progu 5% suboptymalności? Ile z nich zawartych jest w otrzymanych strukturach?
  - c. Jaka jest różnica w energii pomiędzy otrzymanymi strukturami?
  - d. Która ze struktur odpowiada klasycznej strukturze tRNA?
5. Przejdź do szczegółowych informacji termodynamicznych przewidzianych struktur. Wyświetlone zostaną szczegóły termodynamiczne poszczególnych elementów struktury. Dla każdej z otrzymanych struktur, zapisz do protokołu która pętla powoduje największą destabilizację struktury (pozycje + energia).
6. Wyświetl porównanie obu uzyskanych struktur. Zapisz do protokołu która helisa jest wspólna dla obu struktur.
7. Powtórz przewidywanie ustawiając próg suboptymalności na poziomie 50%. Zapisz do protokołu:
  - a. Ile struktur zostało przewidzianych?
  - b. Jaka jest maksymalna różnica energii pomiędzy strukturą optymalną (MFE) a „najgorszą”?
  - c. Na podstawie wykresu *ss-count* sprawdź, czy rejony które formują pętle w klasycznej strukturze tRNA posiadają podwyższone prawdopodobieństwo bycia jednoniciowymi?

## Ćw2. Vienna RNA package (RNAfold, RNAsubopt)

1. Wykonaj przewidywanie struktury tRNA za pomocą narzędzia RNAfold (komenda: `RNAfold < trna.fas`). Zapisz do protokołu, czy uzyskana struktura oraz obliczona energia swobodna odpowiadają którejkolwiek ze struktur uzyskanych przez mfold?
2. Powtórz przewidywanie dodając parametr `-p` (sprawdź w opisie programu, co on oznacza). Zapisz do protokołu, czy informacje uzyskane z funkcji podziału (partition function) popierają proponowaną strukturę MFE?
3. Powtórz przewidywanie dodając parametr `--MEA` (sprawdź w opisie programu, co on oznacza). Zapisz do protokołu, czy uzyskana struktura MEA (maximum expected accuracy) różni się od MFE? Czy odpowiada ona klasycznej strukturze tRNA? Czy jest w zgodności z informacjami z funkcji podziału?
4. Użyj programu RNAsubopt aby przewidzieć struktury suboptymalne. Ustaw zakres suboptymalności (opcja `-e`) na 1 kcal/mol. Zapisz do protokołu:
  - a. Jaka jest różnica w energii między strukturą MFE a „najgorszą”? Czy odpowiada ona różnicy uzyskanej za pomocą mfold w pierwszym podejściu (5% suboptymalności)?
  - b. Czy liczba uzyskanych struktur jest taka sama jak w przypadku programu mfold? Dlaczego?
5. Powtórz przewidywanie programem RNAsubopt. Tym razem ustaw próg suboptymalności na 50% (w kcal/mol – połowa energii struktury MFE). Zapisz wyniki do pliku. Sprawdź czy pogorszenie energii ma związek ze zwiększoną ilością nukleotydów jednoniciowych. W tym celu napisz skrypt który obliczy liczbę nukleotydów jednoniciowych w powiązaniu z energią struktury. Następnie wyniki przedstaw w formie wykresu punktowego. Oblicz współczynnik korelacji. Wyniki załącz do protokołu.

## Ćw3. RNASHAPES

1. Wejdź na stronę serwisu RNASHAPES: <https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnashapes>
2. Wybierz zakładkę Submission, a następnie analizą probabilistyczną (probs). Następnie zaznacz opcję obliczania prawdopodobieństw dla indywidualnych struktur oraz ustaw poziom abstrakcji na najwyższy: 5. Zapisz do protokołu:
  - a. Ile kształtów zostało przewidzianych?
  - b. Czy kształt o najwyższym prawdopodobieństwie odpowiada kanonicznej strukturze tRNA?
  - c. Ile kształtów obejmuje wspólnie 90% prawdopodobieństwa?
  - d. Czy kształty te zawierają struktury MFE uzyskane w poprzednich zadaniach?

3. Powtórz przewidywanie 4 razy zmniejszając poziom abstrakcji do 4, 3, 2 oraz 1. Za każdym razem zapisz do protokołu odpowiedzi na pytania a-c z poprzedniego punktu (może być w formie tabeli). Zapisz, jakie wnioski nasuwają Ci się z porównania tych wyników?