

Analiza neznanega nukleotidnega zaporedja

1. Protein in organizem

Z danim zaporedjem iščemo po blastx. Izberemo prvi zadetek.

- Ime: Vezikularni acetilholinski transporter (VACHT)
- Organizem: miš (*Mus musculus*)

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

DownloadSelect columnsShow100?

select all

100 sequences selected

GenPept

Graphics

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	VecName: Full=Vesicular acetylcholine transporter; Short=VACHT; AltName: Full=Solute carrier family 18 me...	Mus musculus	978	978	100%	0.0	100.00%	530	Q35304.1
<input checked="" type="checkbox"/>	vesicular acetylcholine transporter [Mus musculus]	Mus musculus	975	975	100%	0.0	99.62%	530	NP_068358.2
<input checked="" type="checkbox"/>	vesicular acetylcholine transporter [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	973	973	100%	0.0	99.43%	530	NP_113851.1
<input checked="" type="checkbox"/>	vesicular acetylcholine transporter [Rattus norvegicus]	Rattus norvegicus	972	972	100%	0.0	99.25%	530	AAA50831.1
<input checked="" type="checkbox"/>	vesicular acetylcholine transporter [Mus caroli]	Mus caroli	971	971	100%	0.0	99.25%	530	XP_021038301.1

2. Pregledni članki

Na PubMed-u z »advanced search« poiščemo VACHT pod kategorijo Title/Abstract. Dodatno izberemo filter »review«.

- Število vseh člankov: 41
- Največ člankov leta: 2000

3. Posttranslacijske modifikacije

Na UniProt-u poiščemo dan protein in pod predelkom PTM/Processing najdemo rezultate:

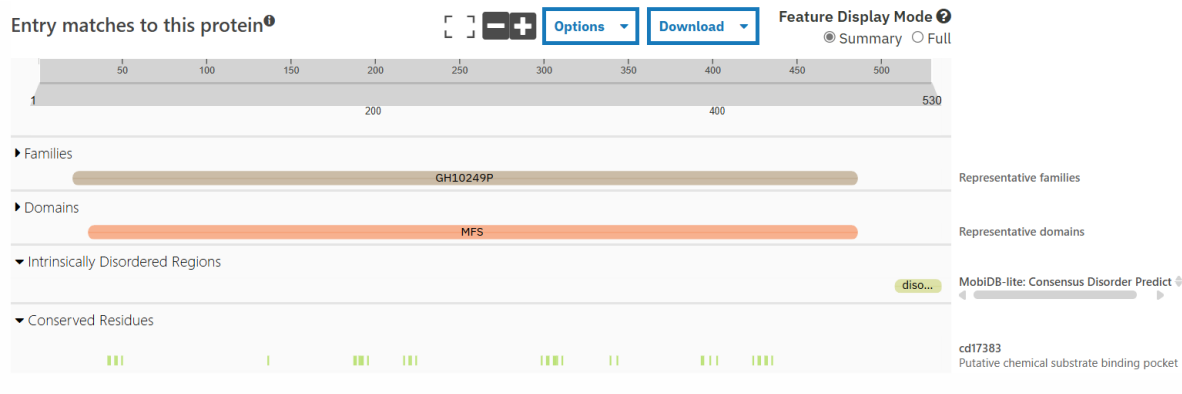
- Glikozilacija (89 in 96 aminokislinski ostanki)
- Modificiran ostanek: 512 fosfoserin

4. Ligand

Še kar smo na UniProt-u, zavihek Function. Protein veže acetilholin in protone.

5. Domene

Aminokislinsko zaporedje iz UniProt-a prekopiramo v InterPro. Edina domena je MFS in sega od 35 do 481 aminokislinskega ostanka.



6. Izolacija

Za potrebe izolacije potrebujemo teoretično izoelektrično točko, ki jo izračunamo s pomočjo programa ProtParam. Izoelektrična točka je tako 5,68. To pomeni, da je protein pri pH=7,3 pozitivno nabit. Uporabimo kationski izmenjevalec.

7. Interakcije

Na UniProt-u pod zavihkom Interaction se nahaja povezava na STRING, kjer si ogledamo graf. Proteini, s katerimi VACHT interagira so:

- Syt1 – kalcijev senzor, ki sodeluje pri sproščanju nevrottransmitorja v sinapso,
- Slc17a6 – vezikularni glutamatni transporter,
- Slc17a7,
- Slc17a8,
- Slc18a1,
- Slc18a2,
- Slc32a1,
- Slc5a7,
- Chat – holin O-acetiltransferaza, ki katalizira sintezo acetilholina,
- Crat.

8. Struktura

Ta protein nima eksperimentalno določene strukture, zato izvedemo blastp, pri čemer iščemo po PBD zbirki. Prvi zadetek je sintetični ortolog, katerega strukturo poiščemo v PBD.

- PBD id: 8ZMR
- Organizem: človek (Homo sapiens)
- Ekspresijski sistem: človek (Homo sapiens)

Descriptions	Graphic Summary	Alignments	Taxonomy					
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100 ?								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 16 sequences selected								
GenPept Graphics Distance tree of results Multiple alignment MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A_Maltose/maltodextrin-binding periplasmic protein Vesicular acetylcholine transporter DARPinoff7 [synthetic construct]	synthetic construct	883	883	92%	0.0	95.10%	1047	8ZMR_A
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A_Green fluorescent protein Vesicular acetylcholine transporter antibody [synthetic construct]	synthetic construct	827	871	87%	0.0	94.81%	851	8XTW_A
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A_Green fluorescent protein Vesicular acetylcholine transporter antibody [synthetic construct]	synthetic construct	825	825	84%	0.0	94.81%	826	8XTX_A
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A_XIVMAT2 [Xenopus laevis]	Xenopus laevis	339	339	84%	2e-110	40.34%	514	8XIU_A
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A_Soluble cytochrome b562 Synaptic vesicular amine transporter [synthetic construct]	synthetic construct	305	305	87%	9e-96	38.16%	632	8X3K_A
<input checked="" type="checkbox"/> Chain A_Synaptic vesicular amine transporter [Homo sapiens]	Homo sapiens	301	301	84%	1e-95	38.54%	497	8WUJ_A

9. Dodatna zaporedja na ortologu

V PBD pod Macromolecules vidimo, da so transporterju na N-konec vezali maltoza/maltodekstrin-vezavni periplazmatski protein, na C-konec pa so vezali sintetični DARPinoff7.

Da ugotovimo, kako dolga sta ta dodatka, kar v PDB-u odpremo strukturo in preštajemo koliko ostankov je na vsakem izmed koncev:

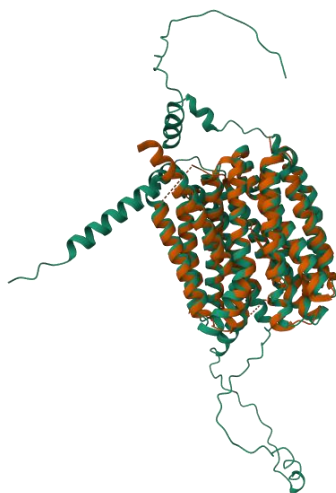
- N-konec: 364 AK-ostankov
- C-konec: 228 AK-ostankov

10. Ligand v strukturi

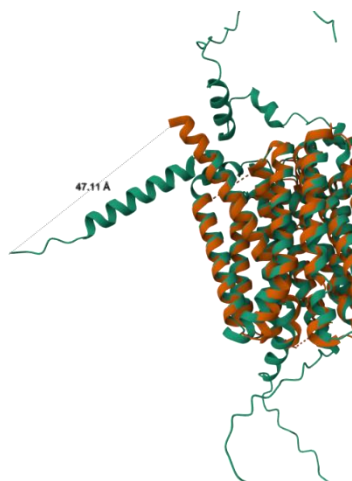
V PBD-u ugotovimo, da je v strukturo vezan vezamikol.

11. Primerjava struktur ortologa in začetnega proteina

Ker struktura začetnega proteina še ni določena, v AlphaFold-u zgeneriramo model. Nato v programu MolStar odpremo model in strukturo človeškega ortologa. Naredimo superpozicijo in opazujemo spremembe.



Zelena struktura je AlphaFold model, z redečo je označena že znana struktura. Opazimo, da sta si strukturi v osrednjem delu zelo podobni, razlike so v neurejenih zankah (v določeni strukturi jih sploh niso modelirali). Naslednja razlika je v N-končnih vijačnicah, ki sta med seboj skoraj pravokotni.



Razdaljo med N-končnima deloma izmerimo/označimo kar v MolStar-ju, ta razdalja znaša 47,11 Å.