

Navodila za vaje pri predmetu Struktura proteinov

dr. Aljaž Gaber
izr. prof. dr. Marko Novinec

Ljubljana, 2021

Navodila za vaje pri predmetu Struktura Proteinov

Napisala dr. Aljaž Gaber in izr. prof. dr. Marko Novinec

Strokovni pregled izr. prof. dr. Marjetka Podobnik in izr. prof. dr. Matej Butala

Oblikovanje in prelom dr. Aljaž Gaber

Risbe in fotografije dr. Aljaž Gaber

Urednica založbe doc. dr. Barbara Modec

© (2020) Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Založila Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Za založbo prof. dr. Jurij Svete

1. spletna izdaja

Ljubljana, 2021

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID=49747715

ISBN 978-961-7078-14-5 (pdf)

Predgovor

Proteini so makromolekule, ki opravijo veliko večino funkcij v živih bitjih, kot so npr. strukturna opora, kataliza kemijskih reakcij, transport snovi, prenos informacij med celicami in njihovo okolico ter obramba telesa pred tujki. Glede na širok nabor funkcij ne preseneča, da je tudi struktura proteinov izjemno raznolika, po drugi strani pa le točno določen vzorec prostorske razporeditve atomov oz. zvitje vsakemu proteinu omogoča, da svojo biološko funkcijo tudi izvede.

Proteinov si ne smemo predstavljati kot statične molekule. To so izrazito dinamične tvorbe, ki so sposobne svojo strukturo prilagajati okolici in interagirati z vsemi ostalimi vrstami molekul v bioloških sistemih. Pri predmetu Struktura proteinov boste spoznali raznolikost struktur proteinov ter osnovne zakonitosti, ki povezujejo njihovo strukturo in funkcijo. Pri vajah boste spoznali dva eksperimentalna pristopa ter nekaj temeljnih računalniških metod za analizo strukture proteinov.

Uporaba računalniških programov za vizualizacijo je na področju raziskovanja strukture proteinov nepogrešljiva. Ne omogoča nam samo, da »vidimo« njegovo prostorsko strukturo, ampak lahko z uporabo ustreznih analiz izluščimo tudi informacije, ki nam na osnovi njegovih strukturnih lastnosti pomagajo razložiti njegovo delovanje.

Kazalo

Predgovor	i
Kazalo	ii
Računalniške vaje – program UCSF Chimera	1
Namestitev programa UCSF Chimera in viri za učenje	1
Osnovno okno in pregled menijev	2
1. Naloga/vprašanje	3
2. Naloga/vprašanje	4
File>Save Image	4
3. Naloga/vprašanje	5
Save Session	5
Tools>Depiction	5
4. Naloga/vprašanje	7
5. Naloga/vprašanje	8
Tools>Sequence>Sequence	8
6. Naloga/vprašanje	10
Tabela modelov – Model Panel	10
Tools>Structure Comparison>MatchMaker	11
Find Clashes/Contacts.....	15
FindHBonds	16
Prikaz površine in porazdelitve naboja na površini	17
7. Naloga/vprašanje	18
Biološko ozadje	18
Navodila	18
Tools>Structure Editing>Rotamers.....	19
Tools>Structure Editing>Minimize Structure	21
Tools>MD/Ensemble analysis>MD Movie.....	22
Tools>Structure Analysis>Distances	23
8. Naloga/vprašanje	24
Biološko ozadje	24
Navodila	24
Tools>Structure Comparison>Morph Conformations	25
9. Naloga/vprašanje	26
Tools>Structure Analysis>Render by Attribute	26
10. Naloga/vprašanje	28
Tools>Sequence>Multalign View.....	28
Dodatna naloga/vprašanje	29
Eksperimentalni vaji	30
Analiza oligomernega stanja proteinov in sestave proteinskih kompleksov z uporabo prečnih povezovalcev	31
Namen.....	31
Materiali.....	31
Izvedba vaje – prvi teden.....	31
Izvedba vaje – drugi teden.....	32

Fragmentacija človeškega imunoglobulina G (IgG)	33
Namen.....	33
Materiali.....	33
Izvedba vaje – prvi teden.....	33
Izvedba vaje – drugi teden.....	34

Računalniške vaje – program UCSF Chimera

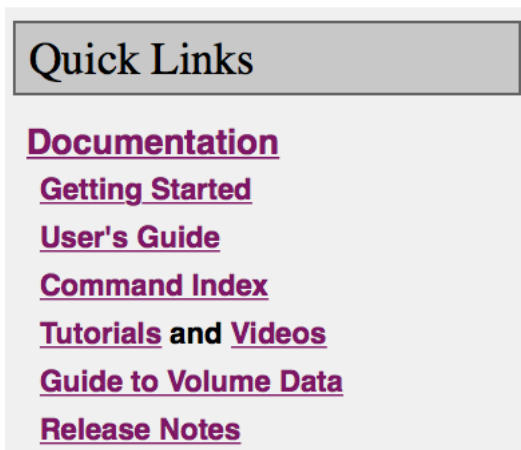
Za vizualizacijo proteinov je na spletu mogoče najti več različnih programov. Ti se med seboj razlikujejo po namenu in kompleksnosti uporabe, vrsti in številu dodatnih analiz, ki jih lahko izvajate neposredno iz programa ali z namestitvijo dodatnih vtičnikov, itd. Program **UCSF Chimera** je eden popularnejših programov, saj je relativno enostaven za osnovno uporabo (vizualizacija proteinov), ima širok nabor osnovnih analiz, ki jih lahko izvršite neposredno iz programa, in preko vtičnikov omogoča dobro povezljivost s številnimi bolj kompleksnimi ter specifičnimi bioinformatičnimi orodji. Hkrati je njegova uporaba za akademske namene brezplačna in prosto dostopna.

Na prvi vaji se bomo spoznali z osnovnimi ukazi, ki so nujno potrebni za nadaljnje delo, v naslednjih vajah bomo znanje na konkretnih primerih nadgradili še z uporabo dodatnih orodij za analizo. Preden začnemo, moramo seveda na računalnik najprej naložiti program. V računalniški učilnici, kjer bomo izvajali vaje, je program že naložen, vendar ga boste za pripravo seminarskih nalog in lastno delo potrebovali tudi doma. Hkrati želimo izvedbo teh vaj čim bolj prilagoditi nivoju predznanja in hitrosti osvajanja novih računalniških orodij posameznega študenta, zato vas zelo spodbujamo, da različne ukaze preizkusite tudi doma; kot ponovitev po vajah ali pa, še boljše, kot priprava na vajo.

Namestitev programa UCSF Chimera in viri za učenje

Program UCSF Chimera je najlažje naložiti prek njegove [uradne spletne strani](#).

Preden se lotimo namestitve, bi vas opozorili na nekaj dodatnih virov za učenje, ki jih ponuja že sama spletna stran. Na levi strani imate meni s hitrimi povezavami – **Quick Links** (slika 1). Med njimi najdete:



Slika 1: Hitre povezave

[Getting Started](#) – osnove dela v programu.

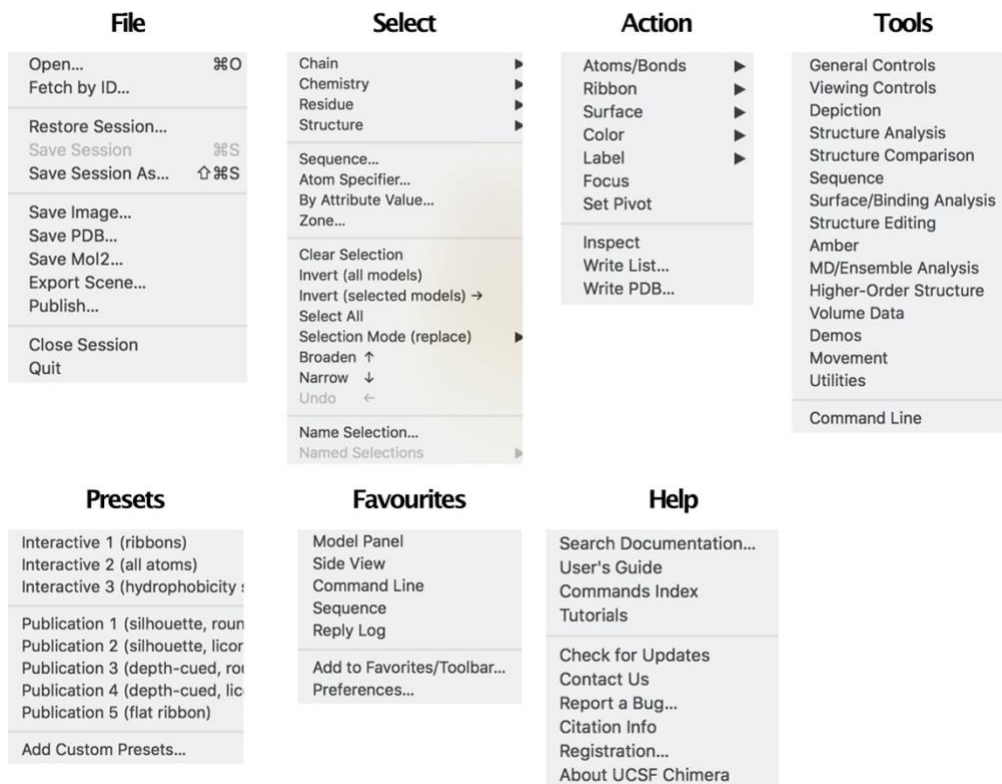
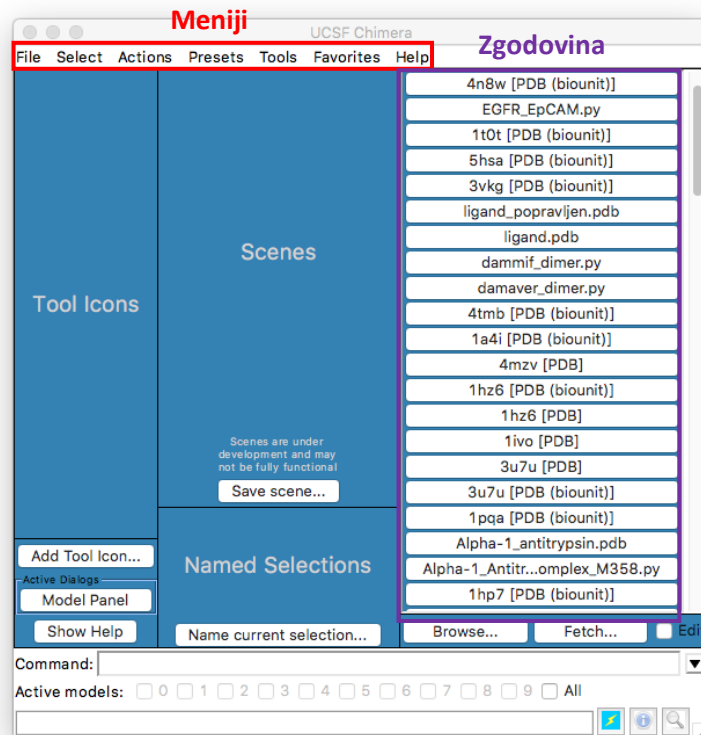
[User's Guide](#) – osnovna navodila, razlaga funkcij in orodij (na teh navodilih so osnovane vaje).

[Command Index](#) – seznam vseh ukazov s primeri njihove uporabe. Ti ukazi se uporabljajo v ukazni vrstici – študenti se ji praviloma raje izognete, tudi če je namesto enega ukaza treba »preklikati« deset menijev. Kljub temu vas spodbujamo k pogumni uporabi ukazov, saj je ta pri kompleksnejših nalogah neizogibna.

[Tutorials and Videos](#) – navodila in posnetki konkretnih primerov (napredne) uporabe programa.

Datoteke za namestitev programa lahko najdete pod zavihkom [Download](#). Izbrati morate le še vaš operacijski sistem in pognati datoteko, ko se prenese (dodatna navodila za namestitev bomo dodali na podlagi težav pri namestitvi, o katerih boste poročali).

Osnovno okno in pregled menijev

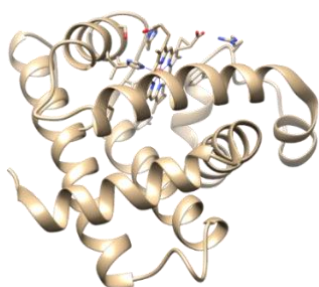


Slika 2: Osnovno okno programa (zgoraj) in pregled menijev (spodaj).

1. Naloga/vprašanje: Spoznajmo osnovno navigacijo v Chimeri in si pogledjmo razliko med različnimi možnostmi prenosa struktur proteinov iz baze Protein Data Bank – PDB.

Najprej naložimo eno najstarejših rešenih struktur proteinov, strukturo **mioglobina iz kita glavača** (opomba: PDB takrat še ni obstajal, zato bomo naložili novejšo različico, ki jo lahko najdemo pod kodo **1MBN**). Če poznamo štiriznakovno oznako strukture v bazi PDB, lahko do nje dostopamo neposredno prek menija **File>Fetch by ID ...**

Poleg tega takoj odpremo še ukazno vrstico (**Command line**) in tabelo modelov (**Model Panel**). Obe najdemo v meniju **Favourites**.

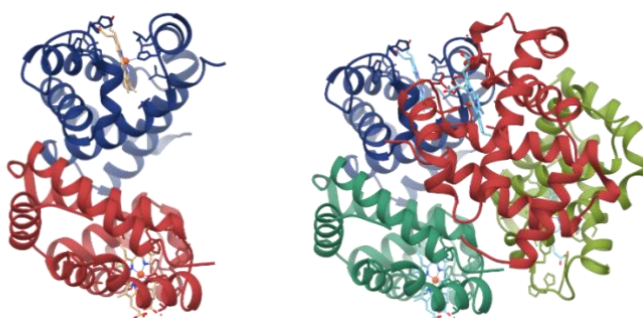


Osnovna navigacija z miško

Rotacija (vrtenje)	levi gumb + premik
Translacija (premikanje)	Alt + levi gumb + premik <i>ali</i> srednji gumb + premik
Približevanje/oddaljevanje (Zoom)	desni gumb + premik <u>ali</u> srednje kolo

Slika 3: Struktura mioglobina.

V podoknu, ki se odpre pod gumbom Fetch by ID ..., imamo tri različne možnosti: PDB, PDB (mmCIF) in PDB (biounit). Na vajah bomo uporabljali le prvo (**PDB**) in zadnjo (**PDB(biounit)**). Razliko si najlažje pogledamo na primeru človeškega hemoglobina, ki je sestavljen iz štirih podenot. Z opcijo PDB sta naloženi le dve podenoti, z opcijo PDB (biounit) pa vse štiri. S PDB namreč naložimo le to, kar je v eni asimetrični enoti (osnovni celici, ki se v kristalu ponavlja), to je lahko cel protein, lahko več proteinov ali le del, kot je v tem primeru. PDB (biounit) po drugi strani prenese biološko relevantno obliko proteina, ki pa se ne ujema nujno s tem, kar je v asimetrični enoti. V opazovanem primeru se tako en hemoglobin nahaja v dveh asimetričnih enotah. Če želite, lahko preverite tudi sami, struktura hemoglobina se nahaja pod kodo 1OUT. Delo bomo nadaljevali z že odprto strukturo mioglobina.



Slika 4: Razlika med PDB (levo) in PDB (biounit) (desno) na primeru hemoglobina (PDB:1OUT). Vsaka veriga v strukturi je obarvana z drugačno barvo, hem je predstavljen s paličicami in obarvan glede na elementarno sestavo.

2. Naloga/vprašanje: Obarvajte polipeptidno verigo z zeleno barvo, prostetično skupino (hem) obarvajte glede na elementarno sestavo!

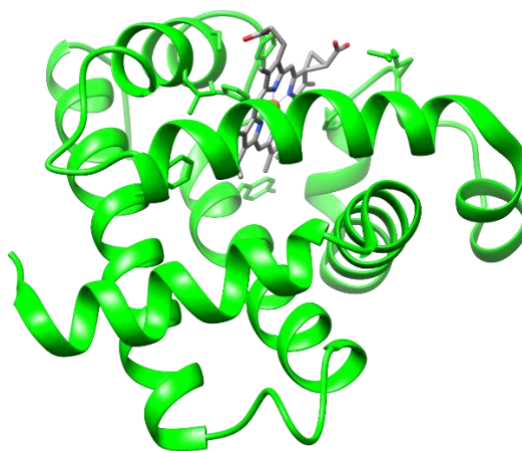
V večini primerov pri delu sledimo naslednjim korakom:

1. Označimo del, ki nas zanima oz. na katerem želimo izvesti operacijo ali analizo (**Select**).
2. Izvedemo preprosti ukaz (**Actions**) ali analizo (**Tools**).

V našem primeru bomo najprej označili proteinski del molekule (**Select>Residue>standard amino acids**), spremenili barvo (izvedli ukaz **Actions>Color>green**), nato označili še neproteinski del molekule (**Select>Residue>all nonstandard**) in spremenili barvo (**Actions>Color>by element**). Rezultat je prikazan na sliki 5.

File>Save Image

Kako naredimo sliko? Seveda jo lahko naredite tako, da s telefonom slikate ekran ali uporabite zajem zaslonske slike (Print Screen). Za lastne zapiske je tak način morda še sprejemljiv, nikakor pa ne pripravi slik za predstavitev, seminarske naloge, članke ipd. V teh primerih morate nujno uporabiti ukaz **File>Save Image**, kjer lahko natančno določite format, velikost in resolucijo slike ter npr. prozornost ozadja. Kot osnovno nastavitev priporočamo format .tiff, velikost, ki čim bolj ustreza dejanski končni velikosti, resolucijo vsaj 300 dpi in prozorno ozadje, saj samo to omogoča lažje pozicioniranje slik v shemah.



Slika 5: Prikaz strukture proteina z zeleno obarvanimi α -vijačnicami.

Da se izognemo težavam v prihodnje, je pred vsako novo operacijo smiselno odstraniti označitev trenutno označenih delov strukture (Namig: označeni deli so obrobljeni s tanko zeleno črto). To lahko storimo na najmanj tri načine, najbolj pogosto uporabimo **Select>Clear Selection** ali preprosto pritisnemo tipko **Ctrl + z levim gumbom** kliknemo v prazno. S slednjim postopkom tehnično ne odstranimo označitve, ampak označimo nič, kar je v praksi isto. **Ctrl + levi gumb** se sicer z uporabo miške lahko uporablja tudi za označevanje točno določenih delov v strukturi. Če želimo na ta način označiti več stvari, uporabimo kombinacijo tipk **Ctrl + Shift + levi gumb**.

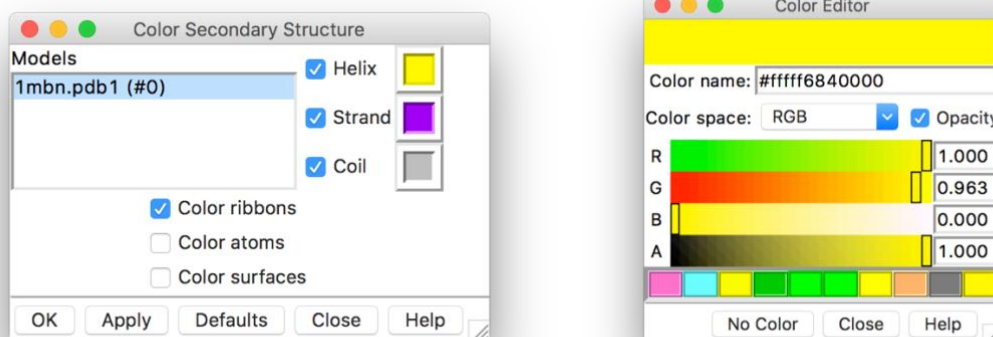
3. Naloga/vprašanje: Obarvajte protein glede na elemente sekundarne strukture (β -ploskve vijolično, α -vijačnice rumeno) in glede na potek polipeptidne verige od N- proti C-koncu!

Save Session

Za začetek bi seveda radi, da proteinska struktura ni obarvana oz. obarvana tako kot na začetku. Hitro boste ugotovili, da UCSF Chimera nima ukaza razveljavi (Undo). Ker predhodno nismo shranili seje, nam ne preostane drugega, kot da sejo zapremo (**File>Close Session**) in na novo odpremo (npr. iz zgodovine v osnovnem oknu). Da do podobnih težav ne bo prihajalo pri nadaljnjem delu, ko bomo morda vmes v strukturo že uvedli določene spremembe, bomo na tem mestu spoznali tudi shranjevanje seje (**File>Save Session As ...** oz. kasneje samo še **File>Save Session**). S sejo shranimo sistem v takem stanju, kot ga vidimo v trenutku shranjevanja, vključno z vsemi označenimi deli, odprtimi okni, spremembami ipd., ki smo jih že naredili. Zelo vam priporočamo, da seje shranjujete sproti, po možnosti tudi v več različnih datotek, npr. pred ali po vsakem pomembnem koraku.

Tools>Depiction

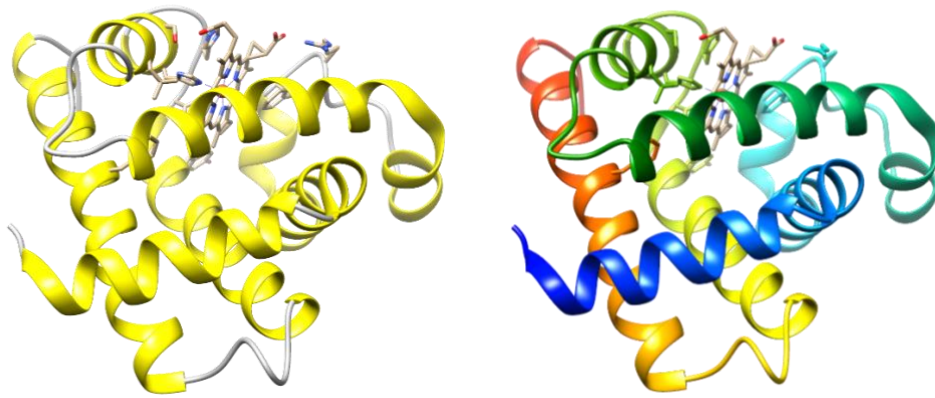
V novi seji sedaj označimo protein glede na elemente sekundarne strukture. Seveda je mogoče ročno označiti vsak element sekundarne strukture in ga pobarvati na željeno barvo, vendar tak pristop ni smiseln. Boljši način je označevanje z uporabo ukaza **Select>Structure>secondary structure>helix/strand**, nato pa obarvanje z ukazom **Action>Color> ...** Ker je to zelo pogosto uporabljen način obarvanja struktur proteinov, lahko uporabimo tudi ukaza **Tools>Depiction>Color Secondary Structure** (slika 6, levo).



Slika 6: Obarvanje elementov sekundarne struktur (levo) in urejevalnik barv (desno).

Barve spremenimo s klikom na barvno polje in uporabo urejevalnika barv (slika 6, desno). Izbrane barve si lahko tudi shranimo tako, da jih iz zgornjega polja potegnemo v spodnjo vrstico s shranjenimi barvami. Na koncu barvanje potrdimo z ukazom **OK** ali **Apply**. V praksi je razlika v tem, da pri uporabi **Apply** podokno ostane odprto, pri uporabi **OK** se zapre.

Rezultat je prikazan na sliki 7 (levo). Sami raziščite, kateri ukaz v podmeniju **Tools>Depiction>** morate uporabiti za obarvanje glede na potek polipeptidne verige od N- proti C-koncu. Rezultat je prikazan na Sliki 6 (desno). Kateri ukaz ste uporabili?



Slika 7: Elementi sekundarne strukture (levo) in potek polipeptidne verige od N- proti C-terminalnem koncu proteina (desno).

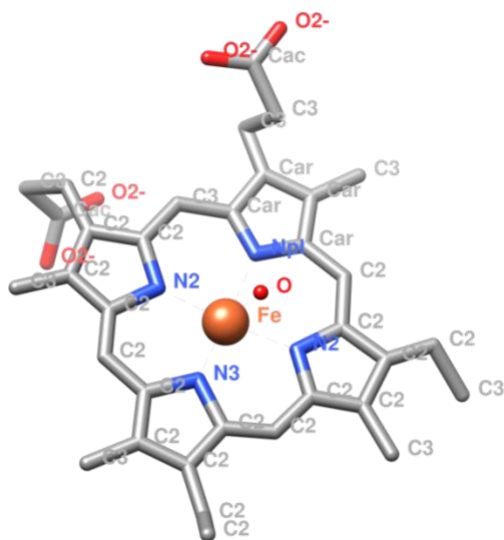
4. Naloga/vprašanje: Prikažite oznake atomov (število in element) v prostetični skupini [hem](#).

Nalogo bomo izvedli v več korakih:

1. Skrijemo prikaz proteinskega dela molekule (označimo, nato **Actions>Atoms/Bonds>hide** in **Actions>Ribbons>hide**).
2. Približamo hem v središče prikaza (**Actions>Focus**).
3. Označimo vse atome hema.
4. Prikažemo oznake (sami preizkusite, kateri ukaz pod **Actions>Labels>** ... vam da želeni rezultat).

Dodatna informacija: Oblikovanje oznak lahko spreminjamo v meniju **Actions>Labels>options** ...

Pričakovani rezultat je prikazan na sliki 8.



Slika 8: Prostetična skupina hem z oznakami atomov.

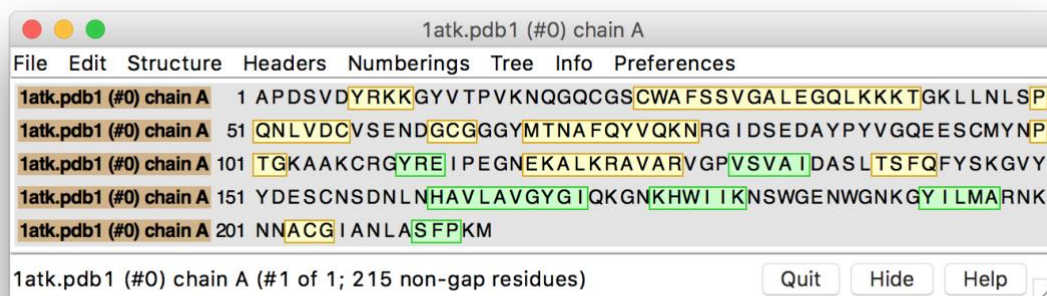
5. Naloga/vprašanje: Kje je aktivno mesto človeškega katepsina K (PDB: 1ATK) in kateri aminokislinski ostanki ga sestavljajo?

Dodatna navodila:

1. Skrijte vse stranske verige in neproteinske molekule, z izjemo stranskih verig aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu.
2. Strukturo proteina pobarvajte sivo, stranske skupine aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu zeleno.
3. Oznake aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu tudi označite z rdečo barvo (zaporedna številka in tričrkovna oznaka za aminokislino). Barve oznak aminokislinskih ostankov spreminjamo z **Actions>Colors>all options ...>residue labels**.

Tools>Sequence>Sequence

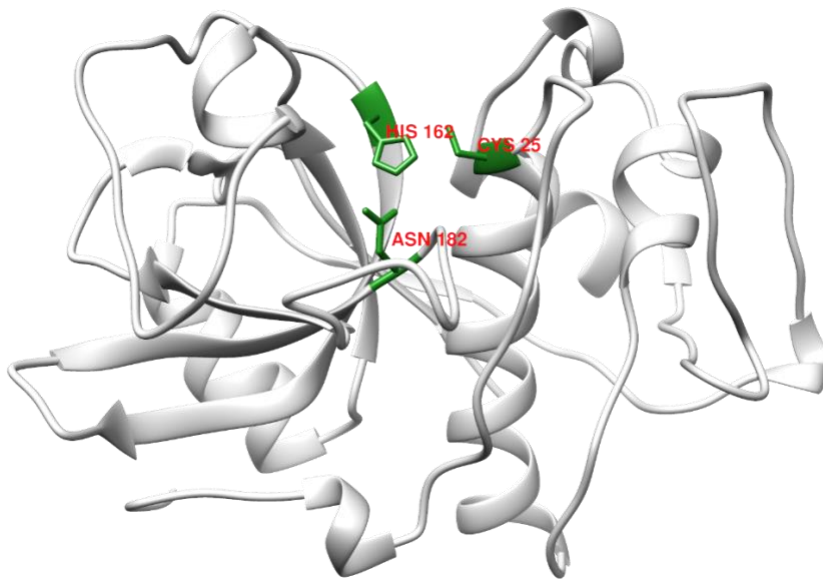
Določene korake lahko izvedete že sami. Za pomoč si pogledjte, kako ste rešili prejšnje naloge/vprašanja. Aminokislinske ostanke, ki predstavljajo aktivno mesto, lahko v program UCSF Chimera preberemo direktno iz baz podatkov (PDB, Uniprot). Najprej moramo prikazati zaporedje aminokislinskih ostankov v proteinu (**Tools>Sequence>Sequence**) – slika 9.



Slika 9: Pregled prikaza aminokislinskega zaporedja. V zaporedju z rumeno označeni segmenti β -ploskev, z zeleno α -vijačnice.

Pri tem bodite zelo pozorni, da je, sploh v starejših strukturah, položaj aminokislinskih ostankov lahko narobe oštevilčen! Katepsin K ima še signalni in aktivacijski peptid, ki v kristalni strukturi nista prisotna. Aminokislinski ostanek alanina na mestu 1 v vaši strukturi je pravzaprav ostanek alanina na mestu 115 v celotnem zaporedju proteina. Nepazljivost na morebitno napačno številčenje lahko vodi v napačno označitev aktivnega mesta, v večini primerov to lahko opazimo že, če uporabljamo zdrav razum. Aminokislinski ostanke, ki predstavljajo aktivno mesto, se ne morejo nahajati vsak na svojem koncu proteinske strukture. Če dobimo tak rezultat, je verjetno nekaj narobe. Podobno, če želimo označiti položaj disulfidnih mostičkov, je vredno preveriti, če smo dejansko označili cisteinske aminokislinske ostanke, ne pa katerih drugih. Kadar označevanje izvajamo neposredno iz baze podatkov, teh težav praviloma ni. Podatke iz baz podatkov pridobimo z ukazom **Info>UniProt/CDD Annotations**. Ta se nahaja v okencu, ki se je odprl z ukazom **Sequence**. S tem pridobimo celoten seznam anotacij iz baze

podatkov. Kaj nas zanima, pa moramo izbrati sami (v našem primeru je to active sites). Preostanek naloge do končnega rezultata (slika 10) že znate narediti.



Slika 10: Aktivno mesto človeškega katepsina K.

6. Naloga/vprašanje: Analizirajte kompleksa katepsina K s hondroitin sulfatom (PDB: 3C9E in 4N8W). Katere vrste interakcij so prisotne med molekulama?

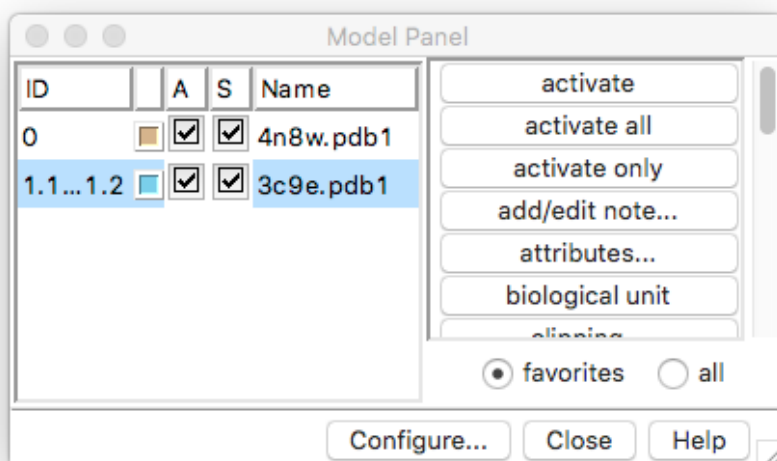
Strukturna analiza interakcij med makromolekulami je zelo pomembna, saj lahko na njeni osnovi pojasnimo obnašanje kompleksov v raztopinah, celicah, tkivih itd. Naloga se morda zdi kompleksna, vendar je sestavljena iz več preprostih korakov:

1. Najprej izvedemo strukturno poravnavo obeh struktur katepsina K.
2. Odstranimo vse molekule, ki nas ne zanimajo in nas lahko ovirajo pri analizi.
3. Komplekse pretvorimo v ločene modele.
4. Izvedemo analize in sproti shranimo seje in slike, s katerimi bomo podkrepili naše ugotovitve.

Pristop je seveda lahko tudi nekoliko drugačen, vendar je zelo pomembno, da smo pri delu natančni in pozorni na morebitne posebnosti pri posameznih ukazih (razlaga je v nadaljevanju).

Tabela modelov – Model Panel

Najprej odprimo obe strukturi. Ker tokrat prvič delamo z različnimi strukturami hkrati, bomo spoznali tudi tabelo modelov (**Model Panel**, slika 11).



Slika 11: Tabela modelov (Model Panel).

V panelu modelov so prikazane vse strukture, ki so odprte v trenutni seji. Na levi strani je seznam, desno meni s povezavami do ukazov. Do njih lahko dostopate tudi po drugih poteh, vendar so zaradi praktičnosti pri uporabi še enkrat predstavljeni tudi tukaj. Levo na seznamu vidimo oznako modela (**ID**), stanje aktivnosti (**A**) in vidnosti (**S**) ter ime (**Name**).

ID

Na oznako modela morate biti pozorni, ker se določeni ukazi lahko nanašajo tudi nanj. Strukture so lahko v istem modelu (ista cela številka, npr. 1), v različnem modelu (različna cela številka, npr. 1 in 2) in v istem modelu, vendar različnih podmodelih (npr. številki 1.1 in 1.2). V našem primeru sta tako strukturi s 4n8w.pdb1 in 3c9e.pdb1 v različnih modelih, znotraj modela 3c9e.pdb1 je očitno več struktur v istem modelu, vendar v različnih podmodelih (1.1 in 1.2).

A in S

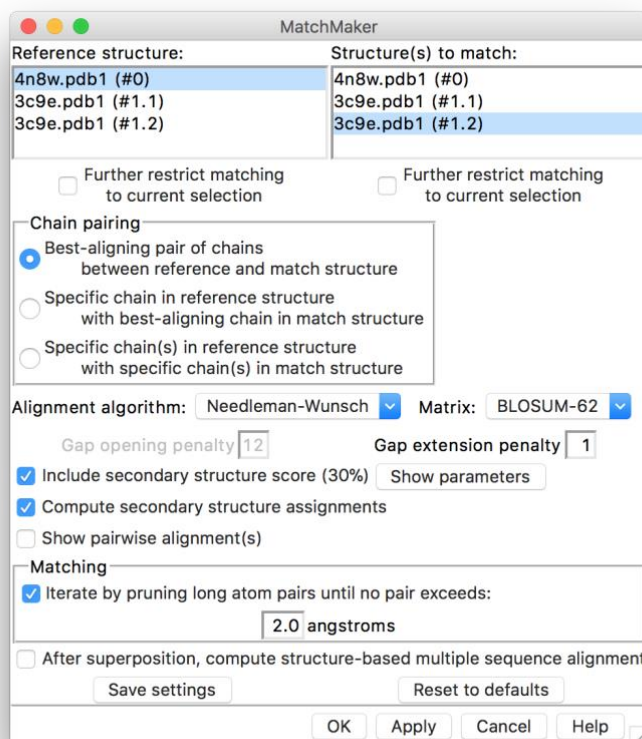
Kljukica pod A označuje, da je model trenutno aktiven. To pomeni, da z miško lahko vrtimo, premikamo in približujemo/oddaljujemo določene dele strukture. Če to polje odznačimo, se model na naše ukaze ne bo več odzival. Podobno kljukica pod S označuje, da je model viden – prikazan na ekranu. Če polje odznačimo, model sicer ne bo več viden, še vedno pa bo lahko ostal aktiven. Še posebno pri delu s kompleksi je zelo pomembno, da smo pozorni, kateri modeli so aktivni oziroma vidni. Če imamo en del kompleksa v enem, drug del v drugem modelu, se lahko hitro zgodi, da enega pomotoma deaktiviramo in hkrati premaknemo drugega. S tem se struktura kompleksa spremeni in jo zelo težko dobimo nazaj v pravilno orientacijo, razen če odpremo shranjeno sejo ali z delom začnemo od začetka. Za te vaje naj velja, da kompleksov ni mogoče vrniti v začetno stanje, da ne boste pomotoma prišli do napačnih struktur, na osnovi katerih vaje ne bo mogoče nadaljevati. Premike je sicer možno razveljavljati z ukazom **Tools>Movement>Undo Move**.

Name

To je ime modela. V osnovi je to ime datoteke, v panelu modelov imamo v desnem meniju tudi možnost preimenovanja z ukazom **rename ...**

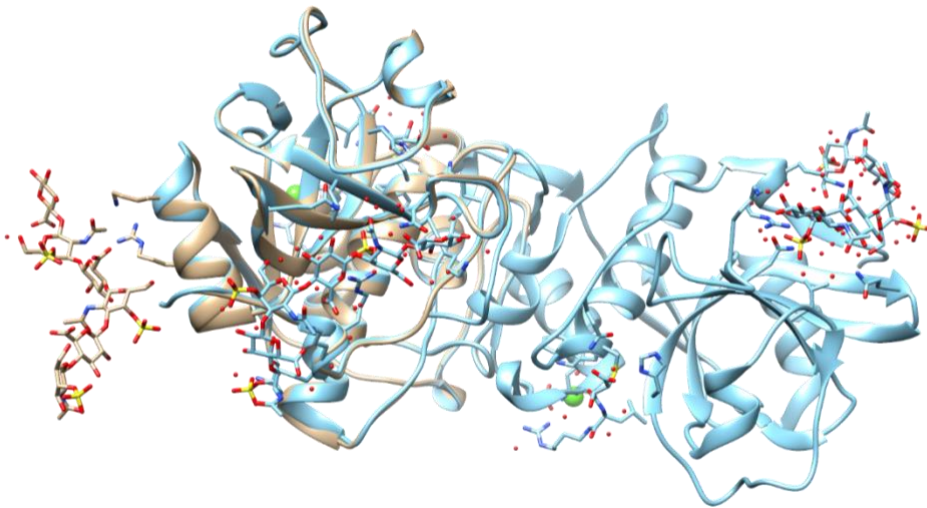
Tools>Structure Comparison>MatchMaker

Poravnavo struktur proteinov izvedemo z ukazom **Tools>Structure Comparison>MatchMaker** (slika 12).



Slika 12: Prikaz zavihka MatchMaker, v katerem lahko izberemo, kaj želimo prilegati in parametre prileganja.

Pravilno moramo izbrati referenčno strukturo (**Reference structure**), to je tisto, za katero želimo, da ostane pri miru, in strukturo, ki se bo prilegala (**Structure(s) to match**). V določenih primerih bomo želeli prilegati tudi le del strukture, ki ga v ta namen predhodno označimo in v podoknu izberemo možnost **Further restrict matching to current selection**. Z ostalimi parametri lahko podrobno nadziramo algoritem, ki bo uporabljen za prileganje; na tej točki bomo uporabili prednastavljene vrednosti. Na koncu poravnavo izvedemo z ukazom **OK**.

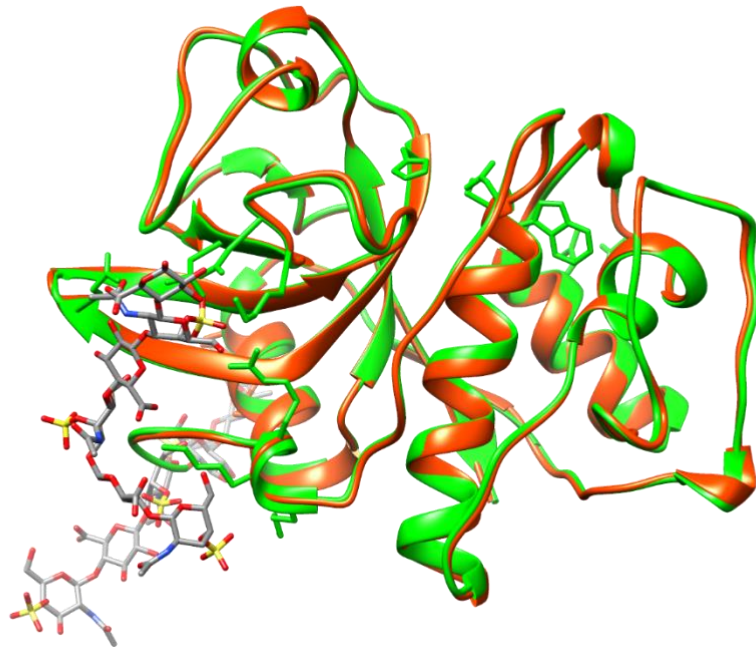


Slika 13: Poravnava struktur proteinov. Z rjavo je obarvana struktura pod kodo 4N8W, z modro struktura pod kodo 3C9E.

Ker gre za dve strukturi istega proteina v malenkost različnih konformacijah, je poravnava zelo dobra (slika 13). Sedaj se lotimo odstranjevanja delov strukture, ki nas ne zanimajo (slika 14):

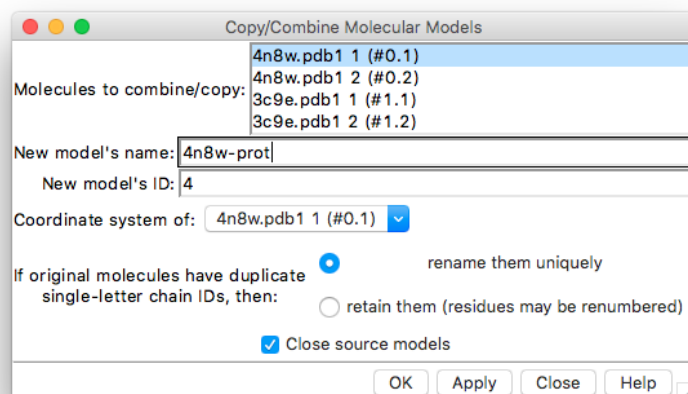
1. Odstranimo molekule vode (HOH) in kalcijeve ione (CA) ter inhibitorja (E64).
2. Odstranimo neporavnano podenoto v modelu 3c9e.pdb1. (Protein se nahaja v dimerni obliki, kar pomeni, da sta v strukturi prisotni dve simetrični podenoti.)

(Namig: odstranjujemo tako, da najprej označimo zeleno molekulo, nato uporabimo ukaz **Actions>Atoms/Bonds>delete**.)

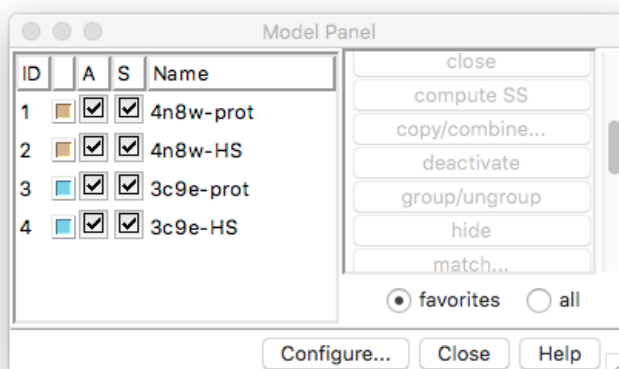


Slika 14: Prikaz ostanka obeh struktur po brisanju odvečnih delov. Za lažje opazovanje razlik sta strukturi obarvani z bolj kontrastnima barvama (oranžno in zeleno).

Ločevanje struktur v ločene modele ni obvezno, vendar nam bo olajšalo nadaljnjo analizo. Najprej ločimo povezane podenote, tako da v ukazno vrstico napišemo **split connected** in izvršimo ukaz (**Enter**). V panelu modelov sedaj vidimo štiri strukture, vendar je posamezen kompleks v različnih podmodelih. Posamezno strukturo premaknemo vsako v svoj model tako, da jo v panelu modelov označimo in v meniju izberemo ukaz **copy/combine ...** Hkrati lahko določimo tudi ime novega modela in njegovo oznako. Da se izognemo nesporazumom, proteinski del označimo s pripono **-prot**, hondroitin sulfat pa s pripono **-HS**. Da ne bo prišlo do podvajanja modelov, v podoknu **copy/combine ...** označimo še možnost **Close source models** (slika 15). Podobno storimo še za ostale strukture (slika 16).



Slika 15: Prikaz zavikhka Copy/Combine...

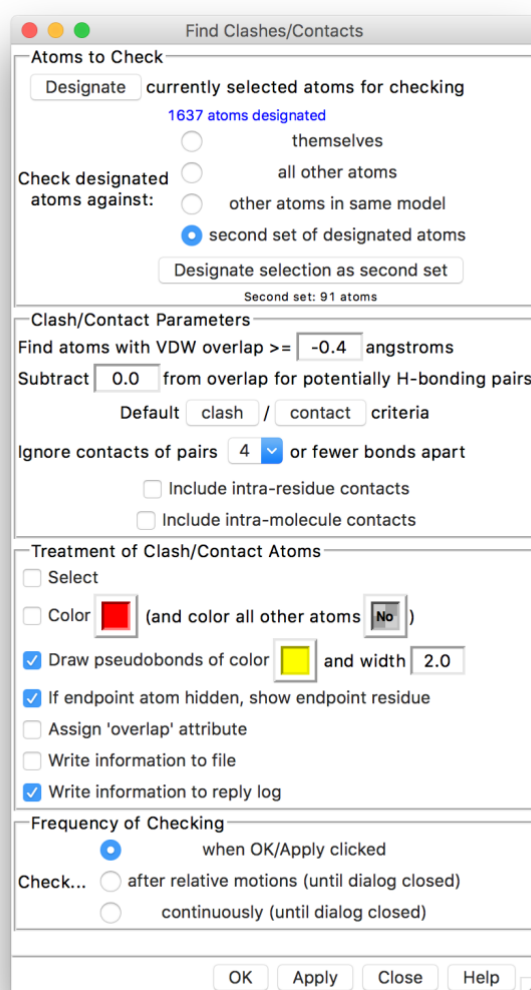


Slika 16: Preurejeni in poimenovani modeli.

Analizo interakcij bomo naredili v več korakih. Najprej bomo preverili število in vrsto kontaktov, nato število vodikovih vezi, na koncu še razporeditev naboja na interakcijski površini.

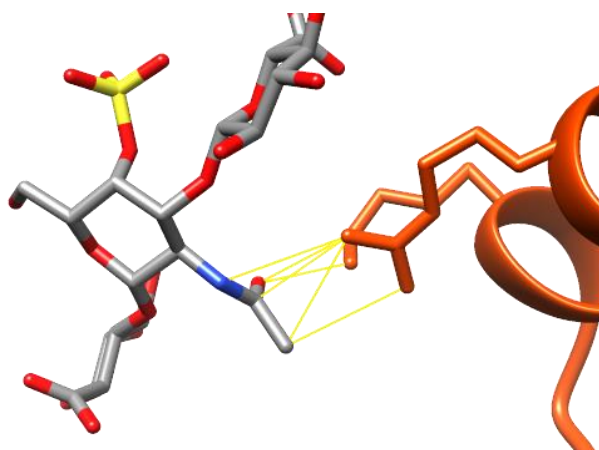
Find Clashes/Contacts

Kontakte opazujemo z ukazom **Tools>Structure Analysis>Find Clashes/Contacts** (slika 17).



Slika 17:Prikaz zavihka Find Clashes/Contacts.

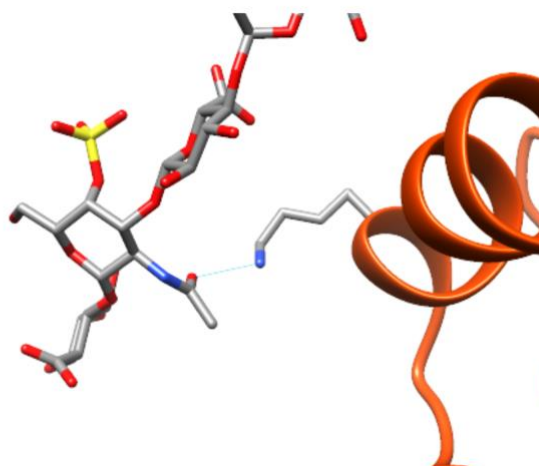
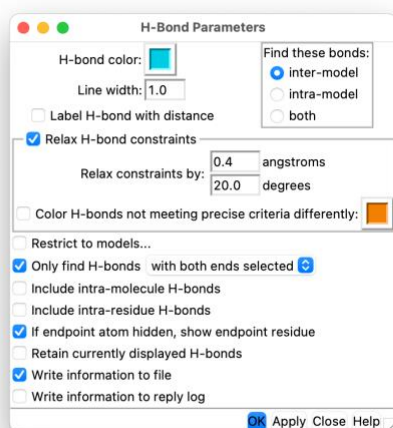
Pomembno je, da ustrezno označimo, kateri kontakti nas zanimajo. Najprej si oglejmo kontakte med hondroitin sulfatom in katepsinom K v strukturi 4n8w. V panelu modelov izberite 4n8w-prot in v meniju kliknite select. V podoknu Find Clashes/Contact nato izberite **Designate**. Za tem na enak način označite še hondroitin sulfat (4n8w-HS), izberite možnost **second set of designated atoms** in **Designate selection as second set**. Ker nas zanimajo interakcije med dvema molekulama, odznačimo možnosti **Include intra-residue contacts** in **Include intra-molecule contacts** (te bi nas zanimalo v primeru analize interakcij znotraj ene molekule). Kontakti bodo prikazani, če je izbrana možnost **Draw pseudobonds of color** in so atomi stranske skupine prikazani. Če niso, lahko ukažemo njihov prikaz z **If endpoint atom hidden, show endpoint residue**. Za konec kliknemo še gumb **Contact**, da nam program prikaže kontakte in ne trke (Clashes) in **OK** (slika 18). Obvezno shranite sliko in sejo, saj boste analizo interakcij izvedli na koncu, ko bomo proučili vse vrste interakcij! Na enak način si oglejte še kontakte med katepsinom K in hondroitin sulfatom v strukturi 3c9e! Že prikazane vezi lahko odstranimo z ukazom ~findclash v ukazni vrstici.



Slika 18: Prikaz kontaktov med sladkorjem in strukturo proteina.

FindHBonds

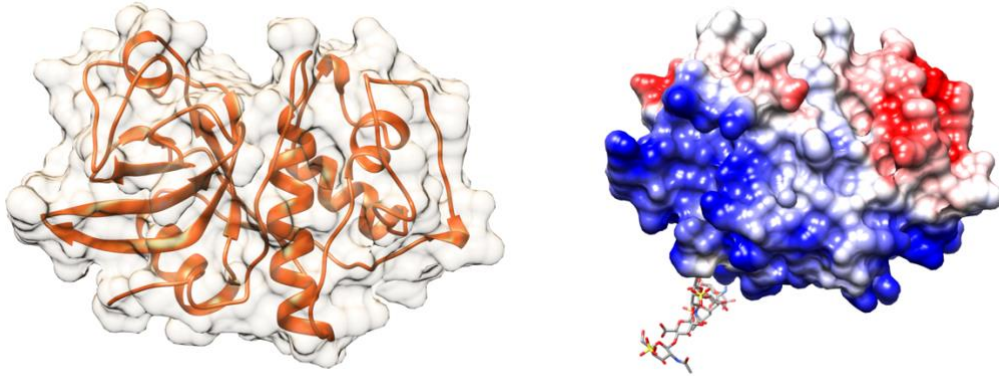
Vodikove vezi na zelo podoben način opazujemo z ukazom **Tools>Structure Analysis>FindHBonds**. Tudi tokrat je predhodno označevanje nujno, da se izognimo izračunu vodikovih vezi, ki nas ne zanimajo. Uporabimo možnost **Only find H-bonds, with both ends selected** (slika 19, levo). Program najde eno vodikovo vez (slika 19, desno). Obvezno shranite sliko in sejo, saj boste analizo interakcij izvedli na koncu, ko bomo preučili vse vrste interakcij! Na enak način si oglejte še vodikove vezi med katepsinom K in hondroitin sulfatom v strukturi 3c9e.



Slika 19: Prikaz vodikovih vezi. Podmeni FindHBonds (levo) in rezultat (desno).

Prikaz površine in porazdelitve naboja na površini

Če želimo analizirati površino proteinskih molekul, jo moramo najprej ustvariti. Označite obe proteinski verigi (4n8w-prot in 3c9e-prot) in ustvarite površino z ukazom **Actions>Surface>Show**. V panelu modelov boste videli, da se površine MSMS main surface of ... ustvarijo v isti številki modela kot struktura proteina, kateri pripadajo. (Namig: z ukazom **Actions>Surface>Transparency** lahko nadzorujete tudi prozornost površine – slika 20, levo).



Slika 20: Prikaz prozorne površine proteinske strukture (levo) in prikaz naboja na površini (desno). Območje pozitivnega naboja je obarvano z modro, območje negativnega naboja z rdečo barvo.

Načinov za izračun naboja na površini je več. Najhitrejši, a tudi najbolj poenostavljen, je izračun elektrostatskega potenciala z uporabo Coulombovega zakona (**Tools>Surface/Binding Analysis>Coulombic Surface Coloring**), prikazan na sliki 20, desno. Obvezno shranite sliko in sejo, saj boste analizo interakcij izvedli na koncu, ko bomo proučili vse vrste interakcij! Na enak način si oglejte še porazdelitev naboja na površini katepsina K v strukturi 3c9e.

S tehničnim delom analize ste zaključili, zato ugotovitve zberite v spodnji tabeli.

Struktura		
	4n8w	3c9e
Kontakti		
Število kontaktov		
Katere vrste atomov so v kontaktih? Mislite, da gre pretežno za hidrofobne interakcije, solne mostičke ...?		
Vodikove vezi		
Število vodikovih vezi		
Naboj na interakcijski površini (na proteinu)		

Katere interakcije med katepsinom K in hondroitin sulfatom so po vašem mnenju najbolj pomembne?

7. Naloga/vprašanje: [Piknodisostoza](#) je izjemno redka dedna bolezen okostja. Do sedaj je bilo opisanih le okrog 2 00 primerov, predvideva se, da je trenutno prizadetih 1–1,7 milijona ljudi. Kot vzrok bolezni so identificirali več mutacij v genu za katepsin K. Razložite, kakšne posledice imajo te mutacije na strukturo in posledično na delovanje encima. (Na vajah se bomo omejili le na mutacijo, ki privede do spremembe aminokislinskega ostanka Gly na mestu 146 v Arg - G146R).

Biološko ozadje

Točkovne mutacije v kodirajočih delih genoma imajo lahko različne posledice na delovanje proteinov. Najbolj problematične so tiste, katerih posledica je STOP kodon v bralnem okvirju, zaradi česar se protein ne prevede v celoti. V teh primerih je posledica mutacije na delovanje proteina očitna, vendar ni vedno tako. Velike spremembe v ključnih proteinih so lahko zelo hitro usodne za preživetje in se zato ne obdržijo v populaciji. Marsikatera bolezen je tako posledica na videz majhne spremembe, ki ni usodna, vseeno pa vpliva na pravilno delovanje celice oziroma organizma.

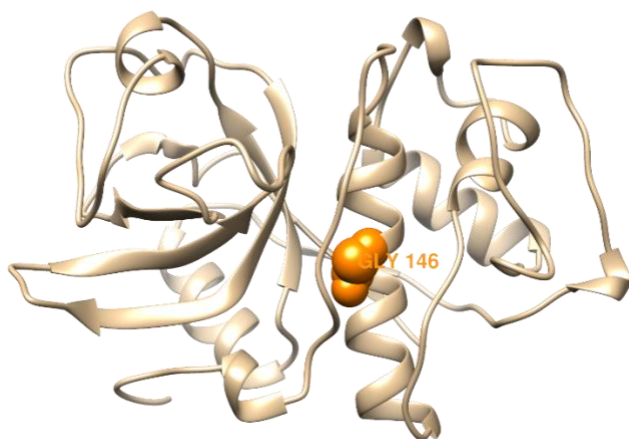
Kako analiziramo vpliv spremembe aminokislinskega zaporedja na delovanje proteina? V protein uvedemo mutacijo, ki nas zanima, ponovimo analize, ki smo jih naredili z divjim tipom, in primerjamo rezultate. Kadar imamo na voljo rešeno strukturo proteina, lahko mutacijo tudi simuliramo. S tem lahko ne samo predvidimo vpliv mutacije na delovanje proteina, ampak z uporabo bioinformatičnih pristopov pridobimo tudi informacije, ki jih z eksperimenti zelo težko – npr. gibanje proteina je težko opazovati drugače kot prek simulacije molekulske dinamike.

V našem primeru bomo mutacijo G146R vnesli v strukturo katepsina K (PDB: 1ATK) in opazovali vpliv te mutacije na strukturo proteina.

Navodila

Najprej odprite strukturo katepsina K v programu UCSF Chimera in iz strukture izbrišite vse neproteinske molekule. Sedaj označimo glicin na mestu 146. Nekaj načinov za označevanje že poznamo. Kadar poznamo točno mesto aminokislinske, ki nas zanima, je označevanje najbolj preprosto narediti direktno v ukazni vrstici. Vpišite **select :146**. Z uporabo ukaza select lahko kadarkoli označujemo poljubne modele, verige, aminokislinske ostanke, atome itd., če jih znamo nasloviti z uporabo ustreznih specifikacij ([Atom Specifications](#)). V našem primeru smo uporabili dvopičje (:), kar programu sporoči, da želimo označiti aminokislinski ostanek. Ostale primere specifikacij si lahko ogledate na [spletni strani](#) programa UCSF Chimera.

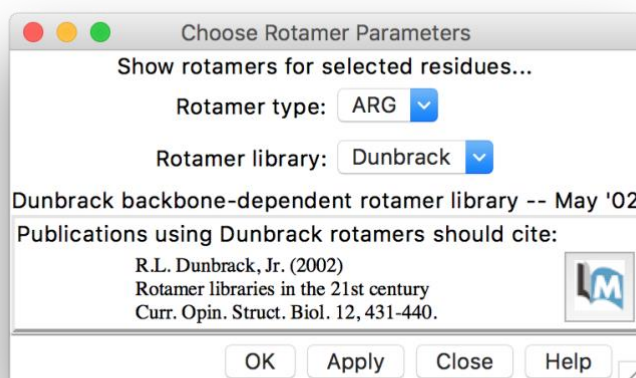
Če ste pozorni, boste ugotovili, da smo v resnici označili serin 146, in ne glicin 146. Problem je v tem, da aminokislinski ostanke v strukturi 1ATK niso ustrezno oštevilčeni (o tem smo govorili že pri 4. nalogi). Prvi aminokislinski ostanek v naši strukturi je pravzaprav aminokislinski ostanek 115 (vir: [UniProt](#)). Številčenje aminokislinskih ostankov popravimo z ukazom **Tools>Structure Editing>Renumber Residues**. Označite verigo 1 v strukturi 1ATK in napišite, da se začne s 115. Poskusite sedaj na mestu 146 ponovno označiti aminokislinski ostanek (slika 21).



Slika 21: Položaj ostanka Gly146 v strukturi katepsina K.

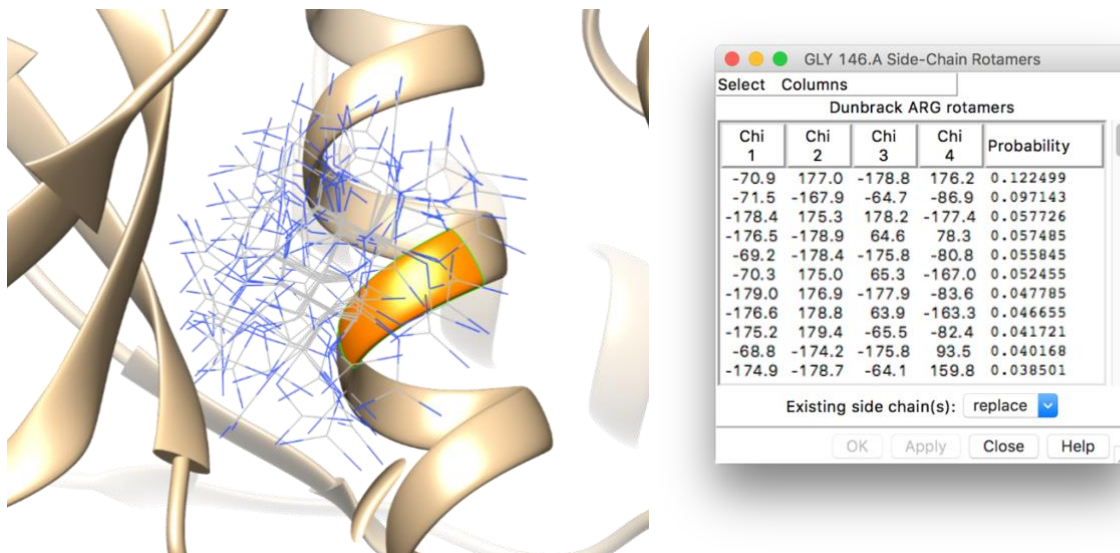
Tools>Structure Editing>Rotamers

Sedaj bomo Gly *in silico* mutirali v Arg. To dosežemo z ukazom **Tools>Structure Editing>Rotamers**. Kot vrsto rotamera (**Rotamer type**) izberite Arg (ARG) in nato **OK** (slika 22)



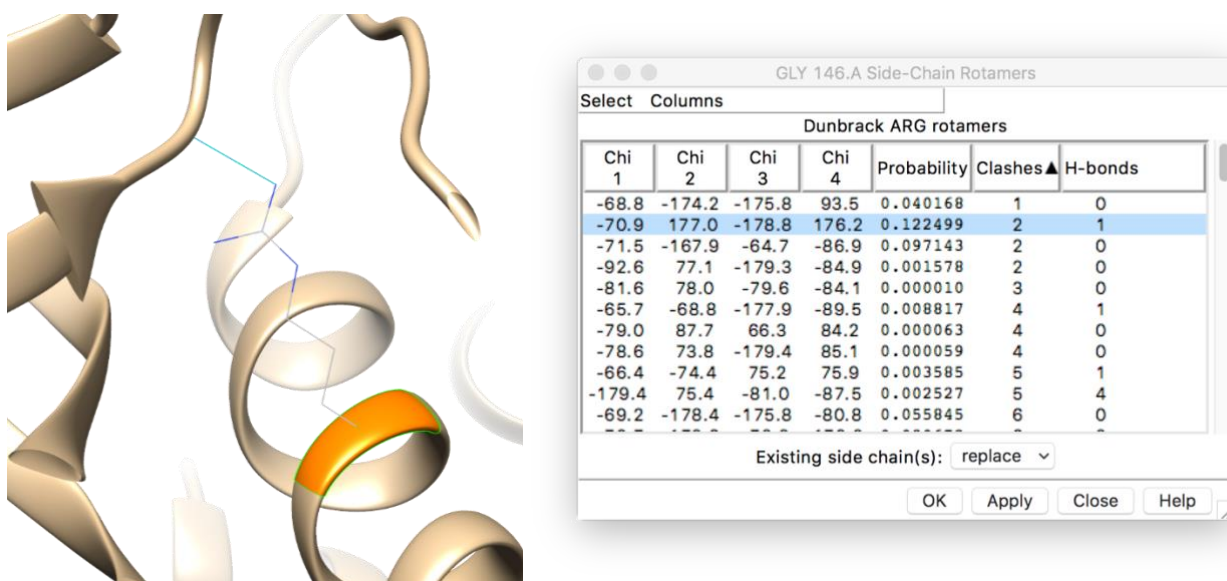
Slika 22: Prikaz zavihka Izbira rotamerov.

Rezultat ukaza je zelo nepregleden, saj se nam najprej prikaže superpozicija vseh možnih rotamerov (slika 23, levo). V novem podoknu lahko vidimo seznam vseh možnih rotamerov, skupaj z njihovimi kiralnimi koti in verjetnostjo (slika 23, desno). Opozoriti moramo, da verjetnost (probability) ni verjetnost, da je posamezni rotamer ustrezen, ampak gre zgolj za statistično pogostost posameznega rotamera v strukturah, ki so bile analizirane v knjižnici (Rotamer library v prejšnjem podoknu). Te verjetnosti ne smemo zanemariti, vendar je treba vseeno upoštevati še potencialne trke s preostankom molekule in morebitne potencialne vodikove vezi. Pregled obojih si lahko dodamo z ukazoma **Columns>Add>Clashes ...** oz. **Columns>Add>H-Bonds** (v obeh primerih uporabite kar prednastavljene vrednosti – samo kliknite OK).



Slika 23: Uvedba mutacije G146R. Prikaz možnih rotamerov v strukturi (levo) in seznam njihovih kiralnih kotov ter pogostosti (desno).

Izberite rotamer, ki je sterično najmanj neugoden (ima najmanj trkov in največ vodikovih vezi) in ima najvišjo verjetnost. Odločitev ni vedno enoznačna, zato se zanašamo tudi na lastne izkušnje ter presojo. V našem primeru smo na račun višje verjetnosti in dodatne vodikove vezi izbrali rotamer, ki ima dva trka namesto enega (rotamerov brez trkov ni bilo, slika 24). Izbiro potrdimo z OK.



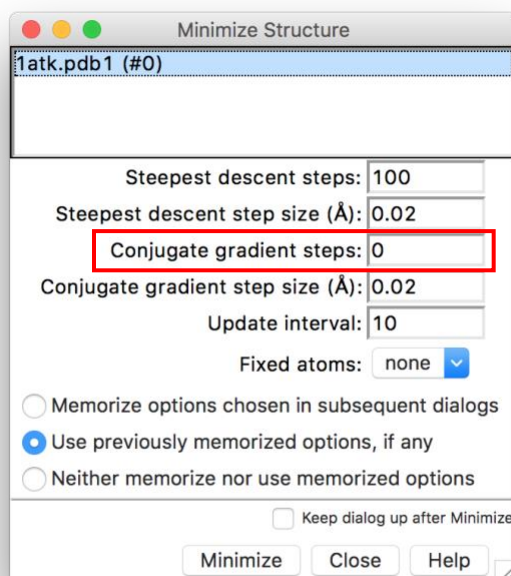
Slika 24: Izbrani rotamer.

Na videz se ni zgodilo nič. Vendar to ni res, gre za nazoren primer delovanja programa UCSF Chimera. Trenutno so označeni (Select) le atomi, ki so bili prisotni že v glicinu, hkrati pa stranske skupine niso prikazane (Actions). Treba je ponovno označiti aminokislinski ostanek 146 in ukazati prikaz stranskih skupin.

Z že znanim ukazom **Tools>Structure Analysis>Find Clashes/Contacts** si oglejmo, s katerimi atomi je uveden Arg v nedovoljenem kontaktu (o ustreznih nastavitvah razmislite sami). Ugotovili boste, da gre za atome ogrodja. Prisotnost trka, še posebej pa z atomi ogrodja, znotraj strukture proteina ni mogoča. Trk namreč pomeni, da se Van der Waalovi radii atomov v strukturi prekrivajo, kar je energijsko izrazito neugodno. Vemo torej, da je v strukturi prisotna napaka. Ta ni presenetljiva, če pomislimo, da smo v sredini strukture aminokislinski ostanek Gly, ki nima stranske skupine, zamenjali z Arg, ki ima veliko stransko skupino, hkrati pa protein »ni imel priložnosti«, da se na to spremembo prilagodi. Ko torej pride do mutacije in se prevede napačen aminokislinski ostanek, se preostali del strukture proteina lahko zvije nekoliko drugače; v skrajnih primerih se protein ne zvije v funkcionalno obliko. V tem primeru ima mutiran katepsin K okvarjeno funkcionalnost glede na divji tip, kar povzroči razvoj piknodisostoze.

Tools>Structure Editing>Minimize Structure

V našem primeru lahko proteinsko strukturo poskusimo popraviti z minimizacijo energije. Ker trki predstavljajo visoko energijsko kazen, bodo v tem procesu zelo verjetno odpravljeni. Uporabimo ukaz **Tools>Structure Editing>Minimize Structure**. Za izvedbo te vaje v zmernem časovnem okvirju je izjemno pomembno, da izključimo konjugirani gradient (Conjugate Gradient steps: 0, slika 25). Program vas bo za tem vprašal še o želenih parametrih za določitev položaja vodikovih atomov in algoritmih ter knjižnicah za izračun naboja na posameznih atomih. V obeh primerih v skladu z doktrino »če nimaš tehtnega razloga, da spreminjaš prednastavljene vrednosti, jih pusti pri miru« nastavitve zgolj potrdite z OK. Že med samim potekom minimizacije energije boste lahko opazili, da se atomi v okolici R146 nekoliko premikajo. Ko bo postopek končan, ponovno preverite, koliko trkov je med R146 in ostalimi atomi. Če ste postopek izvedli pravilno, bo odgovor nič. To pomeni, da se je struktura proteina ustrezno prilagodila novi mutaciji.



Slika 25: Minimizacija energije proteinske strukture.

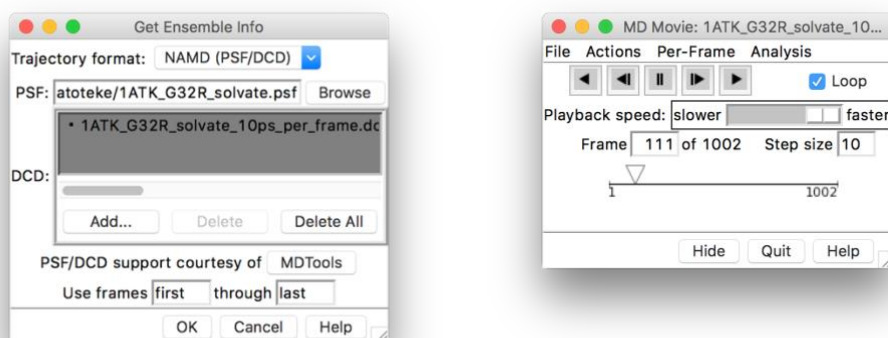
Mutacijo smo sicer uvedli, še vedno pa nimamo odgovora na naše vprašanje, kako mutacija G146R vpliva na strukturo oziroma na delovanje katepsina K. Strukturne spremembe, ki so bile potrebne za odsotnost trkov, so v predlaganem modelu namreč tako majhne, da bi težko bistveno vplivale na delovanje encima.

Tools>MD/Ensemble analysis>MD Movie

Vprašanje, ki si ga moramo zastaviti, je, ali je bila ta kratka optimizacija energije res zadosti dobra simulacija vpliva mutacije na strukturo proteina. Odgovor je seveda ne. Minimizacije energije je uporabna za odpravo očitnih nepravilnosti v modelu, nikakor pa ne ustreza za opazovanje dejanskih sprememb v strukturah proteinov. Za opazovanje teh moramo izvesti simulacijo molekulske dinamike. Slednja mora biti tudi dovolj dolga, da posledice mutacije sploh lahko pridejo do izraza. Izračun take simulacije je računalniško zelo zahteven in ga na vajah ni mogoče narediti. Zato smo simulacijo že predhodno izračunali z uporabo programa NAMD in polja sil CHARMM pri 310 K (polje sil je sistem parametrov, ki opisujejo energetske najugodnejša stanja vseh atomov v molekuli, ter sile, ki na njih delujejo). Rezultate simulacij molekulske dinamike si lahko ogledamo z ukazom **Tools>MD/Ensemble analysis>MD Movie**. Za ogled rezultatov potrebujemo dve datoteki (slika 26, levo):

1. PSF (protein structure file), ki vsebuje podatke o proteinski strukturi, ki so bili potrebni za samo izvedbo simulacije molekulske dinamike.
2. DCD, ki vsebuje dejanske podatke o premikih strukture (tirnice) med simulacijo.

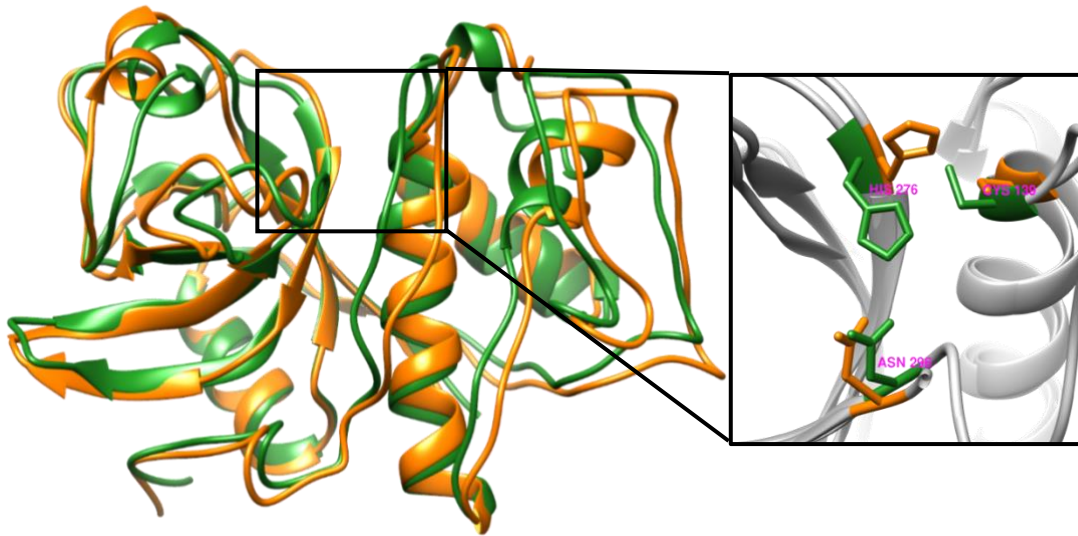
Če slučajno ni nastavljeno kot privzeto, izberite tudi ustrezn format tirnic (**Trajectory Format: NAMD (PSF/DCD)**).



Slika 26: Ogled rezultatov molekulske dinamike. Izbira datotek (levo) in ogled simulacije (desno).

Med simulacijo se molekula nekoliko premakne, zato moramo za primerjavo z začetnim stanjem izvesti še poravnavo za izhodiščno mutirano strukturo. Premaknite se na konec simulacije in izvedite poravnavo (ukaz **MatchMaker**, ki ga že poznamo). Iz rezultata (slika 27) lahko nazorno vidimo, da mutacija G146R nekoliko razmakne obe polovici proteina (na sliki vidimo, da so oranžne zanke v primerjavi z zelenimi zamaknjene stran od središča strukture). Razlika je očitna tudi v aktivnem mestu (C139, H276 in N296), še najbolj na primeru His ostanka, ki se je močno odmaknil od svoje izhodiščne lege. Ker morajo biti aminokislinski ostanki v aktivnem mestu na točno določenem položaju, da lahko katalizirajo reakcijo, tak odmik zagotovo močno vpliva na aktivnost encima. S tem smo uspešno odgovorili tudi na naše izhodiščno vprašanje. Mutacija G146R torej razrahlja strukturo katepsina K in spremeni položaj aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu, s čimer negativno vpliva na aktivnost encima. Pri tem ne smemo pozabiti, da smo do tega zaključka prišli na podlagi simulacije in moramo za dokončno potrditev

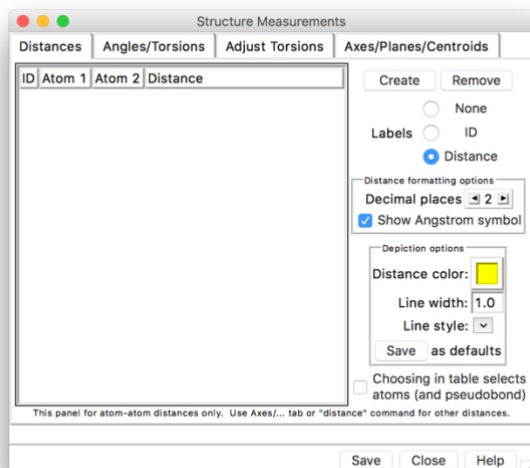
pridobiti tudi eksperimentalne strukturne podatke mutanta (npr. kristalno strukturo) ter razliko v aktivnosti pokazati še s testom encimske aktivnosti.



Slika 27: Vpliv mutacije G146R na strukturo katepsina K. Začetno stanje pred simulacijo molekulske dinamike je obarvano zeleno, končno stanje po njej pa oranžno.

Tools>Structure Analysis>Distances

Kvalitativne (vidne) spremembe v strukturah proteinov je vedno dobro potrditi tudi s kvantitativnimi (številčnimi) podatki. V našem primeru lahko izmerimo razdalje med atomi stranskih skupin aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu. Razdalje merimo z ukazom **Tools>Structure Analysis>Distances** (slika 28). Razdalje je mogoče meriti le med posameznimi atomi in ne med celotnimi stranskimi skupinami. Za naš primer bomo zato izmerili razdalje med atomi SG v C139, CE1 v H276 in CG v N296. Označite zelene pare atomov tako, da prikažete atome stranskih skupin, nato z uporabo **Ctrl + Shift + levi gumb** označite atome. Ko imata atoma označena v podoknu za analizo razdalj, generirajte razdaljo z gumbom **Create**. Med nastavitvami lahko izberete tudi barvo, s katero bo razdalja prikazana, in njeno oznako (najbolj informativna je razdalja – Labels: Distance). Izmerite razdalje vseh parov v aktivnem mestu divjega tipa in mutanta (pred in po simulaciji) ter izpolnite spodnjo tabelo.



Atom	Razdalja	
	Divji tip	Mutant G146R
C139 (SG) - H276 (CE1)		
C139 (SG) - N296 (CG)		
H276 (CE1) - N296 (CG)		

Slika 28: Analiza razdalj

8. Naloga/vprašanje: Analizirajte strukturne spremembe v receptorju za epidermni rastni dejavnik (EGFR) ob vezavi liganda (EGF).

Biološko ozadje

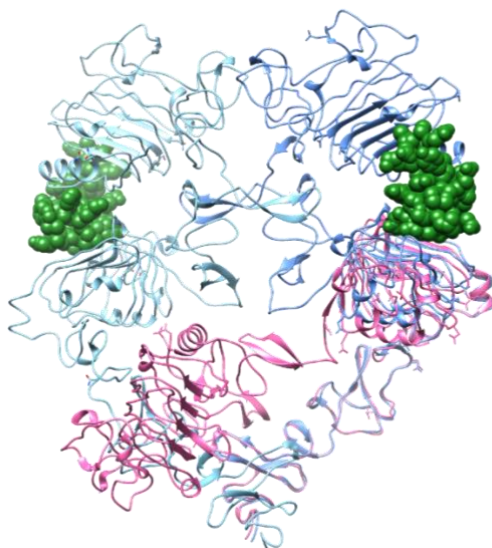
EGFR je zanimiva tarča za razvoj protitumorskih terapij, zato je tudi zelo dobro raziskan. Rešenih je več kristalnih struktur proteina v različnih pogojih (z ligandom, brez liganda ipd.). Receptor je zanimiv tudi zato, ker po vezavi liganda pride do znatnih konformacijskih sprememb, ki omogočijo tudi dimerizacijo dveh receptorjev. Prav dimerizacija ob vezavi liganda je signal za strukturne spremembe v znotrajceličnem delu proteina, ki aktivirajo njegovo signalno vlogo.

EGFR je sicer transmembranski protein tipa I (membrano prehaja z eno α -vijačnico), vendar rešene strukture predstavljajo zgolj zunaj- ali znotrajcelični del. Delo s transmembranskimi proteini je zaradi potrebe po stabilizaciji hidrofobne transmembranske regije zelo zahtevno in pogosto onemogoča pripravo zadostnih količin proteina za določitev tridimenzionalne strukture. Zlasti v primeru transmembranskih proteinov tipa I se raziskovalci zato pogosto odločijo za delo s skrajšanimi oblikami proteina, ki te transmembranske regije nimajo. Čeprav transmembranske regije pri opazovanju strukture ne vidimo, se je pri delu vseeno treba zavedati, da je protein na enem koncu zasidran v membrano. Kadar imamo na voljo strukturo začetnega in končnega stanja spremembe, ki nas zanima, lahko namesto kompleksnejše simulacije molekulske dinamike izvedemo zgolj simulacijo gibanja proteina, od enega stanja do drugega.

Navodila

Najprej odprite strukturo proteina brez EGF (PDB: 1YY9). V strukturi sta prisotna dva proteina (slika 29). Prepoznate katerega od njiju? Kateri del katerega proteina je še prisoten poleg EGFR? Zakaj mislite, da je tam?

Odstranite vse atome in molekule razen EGFR. Sedaj odprite še strukturo EGFR z vezanim ligandom (PDB: 3NJP). Ta struktura vsebuje dva proteina EGFR in dva liganda (EGF). Najprej tudi iz te strukture odstranite vse atome in molekule razen EGFR in EGF, nato poravnajte glede na del proteina, ki se nadaljuje v transmembransko regijo (recimo zadnjih 150). Poravnava proteina glede na del, ki je bližje membrani, je smiselna predvsem zato, ker se ta del v resnici ne more toliko premikati kot preostali del proteina, saj je na eni strani zasidran v celično membrano. Poravnavo izvedite tako, da za izhodišče vzamete verigo A v strukturi EGFR z vezanim ligandom in nanj prilegate strukturo brez njega.

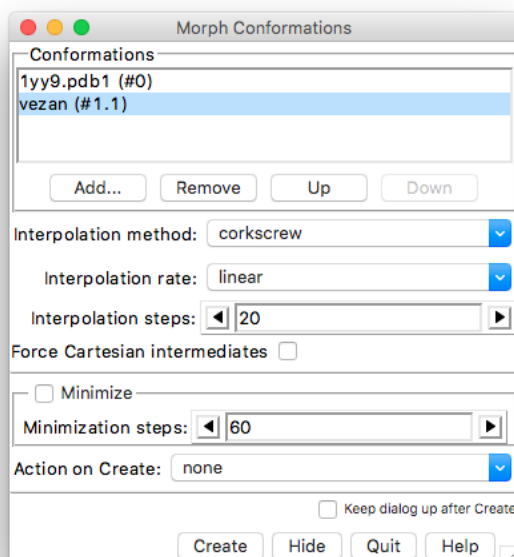


Slika 29: Poravnava struktur EGFR z in brez vezanega liganda. Struktura z vezanim ligandom je obarvana modro, struktura brez vezanega liganda roza, ligand (EGFR) je prikazan kot zelene kroglice.

Za potrebe nadaljnega dela vse štiri komponente strukture z vezanim ligandom razdelite na ločene podmodele (namig: split connected). Identificirajte podmodel, ki predstavlja podenoto, na katero se prilega EGFR brez liganda in ga preimenujte v »vezan«.

Tools>Structure Comparison>Morph Conformations

Gibanje strukture od ene do druge točke lahko simuliramo z ukazom **Tools>Structure Comparison>Morph Conformations**. Z ukazom Add ... najprej dodajte strukturo EGFR brez liganda, nato še strukturo EGFR z njim (slika 30). Simulacijo izvedemo z ukazom Create, rezultate si ogledamo na enak način kot pri analizi simulacije molekulske dinamike (6. naloga/vprašanje).



Slika 30: Simulacija gibanja strukture proteina med dvema stanjema.

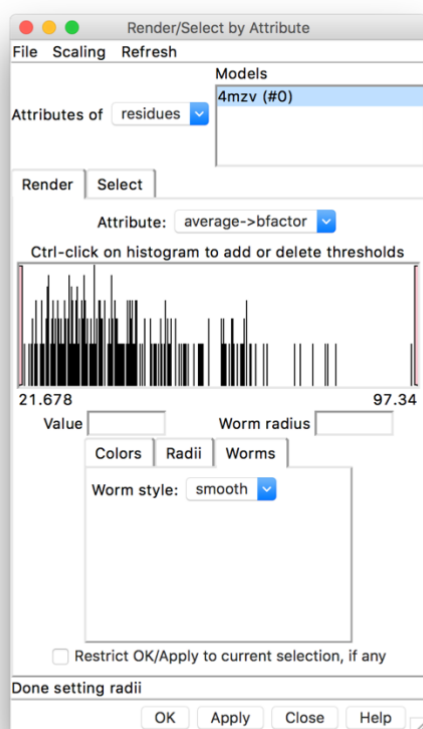
9. Naloga/vprašanje: Poiščite fleksibilne dele v kristalni strukturi človeškega proteina EpCAM (PDB: 4MZV).

Tools>Structure Analysis>Render by Attribute

Najprej naložite strukturo proteina, izbrišite vse neproteinske molekule in skrijte vse stranske verige. Za obe nalogi bomo strukturo proteina označili/obarvali na osnovi nekih lastnosti, zato odprite **Tools>Structure Analysis>Render by Attribute**. V tem meniju lahko izbiramo različne lastnosti, na osnovi katerih spreminjamo prikaz ali obarvanje proteinske strukture. Te lastnosti so lahko vezane na atome, aminokislinske ostanke, dele struktur ali celotno strukturo. Za ugotavljanje fleksibilnih delov v kristalni strukturi lahko uporabimo temperaturni faktor oz. **B-faktor**, ki opisuje razpršenost elektronske gostote. Ta odraža statičnost oz. mobilnost atomov na določenem mestu, lahko pa je tudi posledica napak v modelu.

Za prikaz te vrednosti imamo na voljo dva načina: prikaz z različnimi barvami oz. različno debelino cevi (angl. worm); v našem primeru bomo uporabili oba.

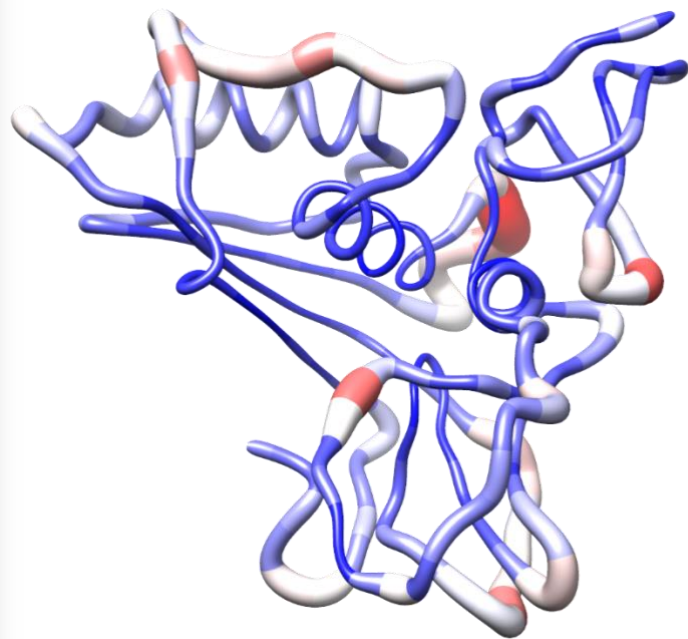
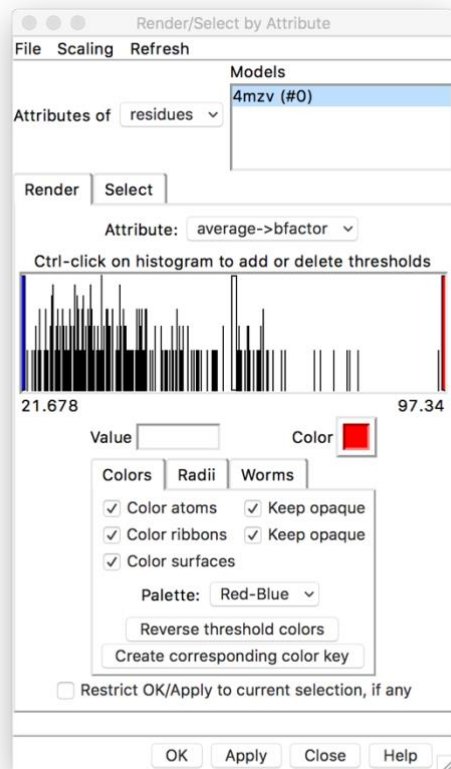
Prikažite povprečno vrednost β -faktorja za posamezen aminokislinski ostanek kot gladko cev (**Attributes of residues**, **Attribute:** average->bfactor, **Worm style:** smooth, slika 31).



Slika 31: Prikaz temperaturnega faktorja s cevmi. Nastavitve v meniju (levo) in rezultat prikaza (desno).

Debelina cevi v tem primeru odgovarja višji vrednosti β -faktorja. Na enak način bi sicer lahko predstavili tudi npr. hidrofobnost posameznega aminokislinskega ostanka, vendar moramo pri izbiri prikaza razmisliti, kaj bo za bralca najbolj informativno. β -faktor odgovarja večjemu prostoru, v katerem se lahko določen aminokislinski ostanek nahaja, zato je prikaz z različno debelino cevi smiseln. V nasprotju s tem je hidrofobnost lastnost proteina, ki jo pogosteje predstavimo z barvami.

Da se naučite še barvanja na osnovi lastnosti, strukturo pobarvajte še na osnovi β -faktorja, od modre proti rdeči, pri čemer naj bodo višje vrednosti rdeče (slika 32).



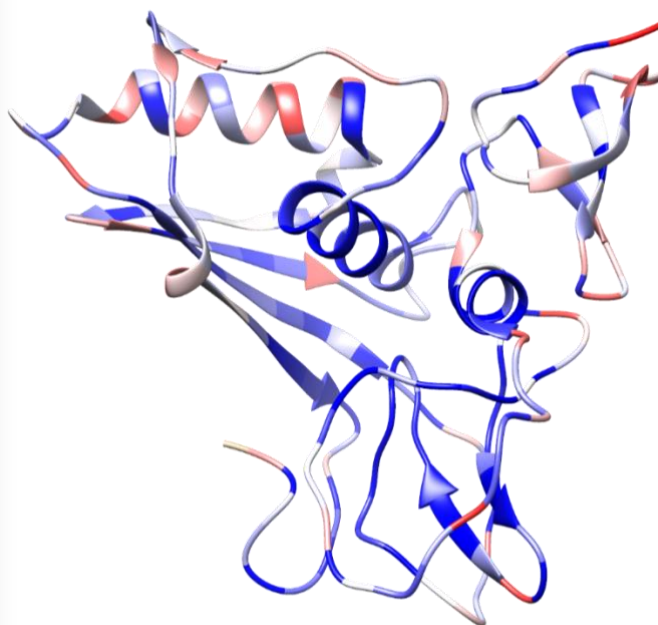
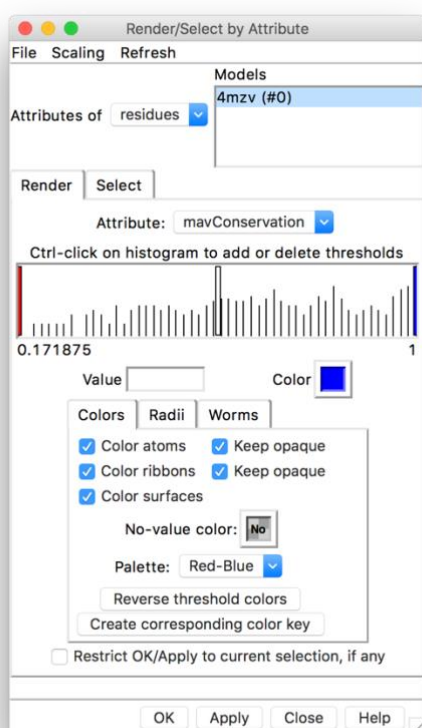
Slika 32: Prikaz temperaturnega faktorja z barvo. Nastavitve v meniju (levo) in rezultat prikaza (desno).

Kateri deli strukture so torej bolj in kateri manj statični? Je to v skladu z vašimi pričakovanji?

10. Naloga/vprašanje: Prikažite evolucijsko najmanj ohranjene aminokislinske ostanke v proteinu EpCAM.

Tools>Sequence>Multalign View

Izvedba te naloge se navezuje na prejšnjo, saj bomo uporabili isti meni. Da se izognete nejasnosti, predlagamo, da na tej točki sejo zaprete in strukturo EpCAM-a naložite znova. Za ugotavljanje evolucijske ohranjenosti je treba najprej pripraviti poravnavo aminokislinskih zaporedij čim večjega števila homologov. To poravnavo imate že pripravljeno v datoteki EpCAM_alignment.aln. Naložite jo z ukazom **Tools>Sequence>Multalign View** in ponovno odprite **Tools>Structure Analysis>Render by Attribute**. V oknu se vam pod Attribute ponudita dve novi možnosti (če ju ni, v zgornjem meniju uporabite Refresh>Menus). Obarvajte strukturi na osnovi ohranjenosti aminokislinskih ostankov (Attribute: mavConservation, slika 33).



Slika 33: Prikaz ohranjenosti aminokislinskega zaporedja z barvo. Nastavitve v meniju (levo) in rezultat prikaza (desno).

Kateri deli strukture so najbolj ohranjeni? Kaj je razlog tako izrazitega kontrasta v ohranjenosti znotraj N-končne domene (aminokislinski ostanke 25–61)?

Dodatna naloga/vprašanje: Oglejte si Molecules of the Month in na teh primerih ponovite ukaze v programu UCSF Chimera, ki smo jih do sedaj spoznali.

Protein Data Bank vsak mesec izbere najbolj zanimivo in pomembno strukturo, ki je razglašena za [Molecule of the Month](#).

Oglejte si nekaj primerov, odprite strukture in preizkusite analize, ki smo jih spoznali do sedaj:

1. analiza interakcij,
2. poravnava struktur,
3. identifikacija aktivnega mesta,
4. uvedba mutacije,
5. ...

Vajo lahko alternativno nadaljujete v svoji seminarski nalogi, seveda znotraj programa UCSF Chimera.

Eksperimentalni vaji

Pridobivanje eksperimentalnih podatkov, kakršne smo uporabljali pri računalniških vajah, je zelo kompleksno in zahteva dostop do specializirane opreme. V sklopu teh vaj tega tako ni mogoče izvesti, zato se bomo osredotočili na dve preprostejši analizi proteinske strukture, poudarek bo tudi na pridobivanju laboratorijskih spretnosti.

Izvedli bomo analizo oligomernega stanja proteinov in sestave proteinskih kompleksov z uporabo prečnih povezovalcev in fragmentacijo človeškega imunoglobulina G. Eksperimentalni del je sicer predolg za en sam termin vaj, vendar obe vaji vključujeta analizo s poliakrilamidno elektroforezo (PAGE), ki jo lahko izvedemo hkrati.

Prvi teden bomo pripravili vse vzorce za obe vaji, naslednji teden bosta sledili elektroforeza ter analiza rezultatov.

Analiza oligomernega stanja proteinov in sestave proteinskih kompleksov z uporabo prečnih povezovalcev

Namen

Z uporabo dveh prečnih povezovalcev (specifičnega in nespecifičnega) prečno povežite različne vzorce čistih proteinov in na osnovi analize z NaDS-PAGE sklepajte o oligomernem stanju posameznega proteina oz. o njegovih sestavnih delih.

Materiali

Založne raztopine proteinov (2 mg/ml) v PBS:

- hemoglobin (64 kDa),
- goveji serumski albumin – BSA (66 kDa),
- sojin tripsinski inhibitor – STI (20 kDa),
- fibrinogen (340 kDa).

Prečna povezovalca:

- 250 mM raztopina BS3 (bis[sulfosukcinimidil] suberat) v DMSO,
- 5% raztopina (v/v) formaldehida.

Pufri:

- PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4),
- 2 M Tris/HCl, pH 8.

Izvedba vaje – prvi teden

Ker imamo 7–8 parov študentov, 4 proteine in 2 prečna povezovalca, bo vsak par izvedel analizo za en protein in en prečni povezovalec.

1. Pripravite izračune za reakcijske mešanice za prečno povezovanje, tako da bodo vsebovale 0,5 mg/ml proteina in 2,5 mM koncentracijo BS3 oz. 0,1 % formaldehida. Končni skupni volumen naj bo 20 µl.
2. Pripravite dva vzorca. V enega boste dodali prečni povezovalec, v drugega enako količino pufra, ki vam bo služil kot negativna kontrola.
 - **BS3 in formaldehid morate dodajati in redčiti tik pred začetkom reakcije, saj v vodi hidrolizirata!**
 - **BS3** najprej redčite do 25 mM koncentracije v PBS, nato takoj dodajte ustrezno količino v reakcijsko mešanico.
 - **Formaldehid** najprej redčite do 1% raztopine, z njim obvezno delajte v digestoriju, ker je strupen!
3. Reakcijske mešanice postavite v inkubator, kjer naj se 30 minut stresajo s 700 obrati na minuto pri 37 °C.
4. Reakcijo prekinite z dodatkom prebitka snovi s primarnimi aminskimi skupinami – pufra Tris/HCl do končne koncentracije 250 mM in še 10 minut inkubirajte pri istih pogojih.
5. Kontrolni vzorec ločite na dva dela po 10 µl in v enega dodajte 3 µl nanašalnega pufra z reducentom, v drugega 3 µl nanašalnega pufra brez njega.
6. K vzorcu s prečnim povezovalcem dodajte 6 µl nanašalnega pufra z reducentom.
7. Vzorce kuhajte 10 minut in shranite pri –20 °C do analize z NaDS-PAGE na drugi vaji.

Izvedba vaje – drugi teden

Priprava 12,5 % poliakrilamidnih gelov

Vsaka skupina bo vtila 4 poliakrilamidne gele za NaDS-PAGE, ki jih bo skupina za njo uporabila za analizo rezultatov prejšnje vaje. Navodila za vlivanje gelov se nekoliko razlikujejo glede na to, katero opremo za vlivanje gelov uporabljate, tako da jih boste dobili na vaji.

Analiza z NaDS-PAGE

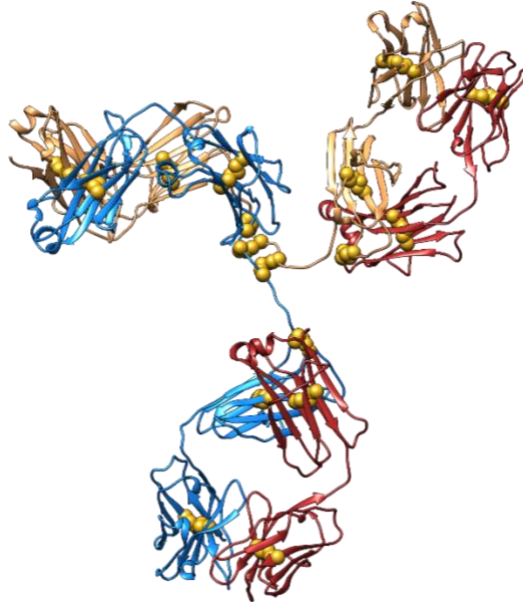
Vse svoje vzorce, tako od prečnega povezovanja kot proteolitične razgradnje IgG, boste analizirali na NaDS-PAGE in pobarvali z barvilom Coomassie brilliant Blue po »hitrem postopku«.

1. Vzorce nanesete na gel v zaporedju:
 - a. proteinski standard,
 - b. kontrola brez reducenta,
 - c. kontrola z reducentom,
 - d. prečno povezan vzorec,
 - e. razgradnja IgG (navodila za pripravo so v naslednji vaji).
2. Ločitev izvajamo pri konstantnem toku 35 mA, dokler fronta ne doseže roba gela. V vmesnem času pripravite in označite petrijevko, v kateri zmešate 25 ml dH₂O, 25 ml raztopine B (5% etanol, 7% očetna kislina) in 650 µl raztopine A (10% očetna kislina, 60% metanol, 2,5 g/l barvila Coomassie). Raztopino dobro premešajte, da bo popolnoma homogena.
3. Vsak gel razdelimo na dva dela, tako da vsak par dobi svoj del.
4. Gel dajte v raztopino in zavrite v mikrovalovki, dokler se ne pojavijo mehurčki (običajno 30–60 sekund).
5. Petrijevko pri sobni temperaturi stresajte 5 minut.
6. Odlijte barvilo, gel sperite z vodo in v petrijevko dolijte toliko vode, da bo gel plaval.
7. Ponovno zavrite v mikrovalovki, dokler se ne pojavijo mehurčki (čas je odvisen od količine vode).
8. Stresajte pri sobni temperaturi, dokler se gel ne razbarva, po potrebi menjajte vodo.
9. Analizirajte rezultate.

Fragmentacija človeškega imunoglobulina G (IgG)

Namen

Strukturo človeškega IgG bomo analizirali s cepitvijo z dvema proteazama, pepsinom in papainom, ter rezultate analizirali z NaDS-PAGE, v prisotnosti oz. odsotnosti reducenta.



Slika 34: Struktura IgG. Težki verigi sta obarvani z modro oziroma rdečo, lahki z oranžno. Disulfidni mostički so prikazani z zlatimi kroglicami.

Materiali

Založna raztopina človeškega IgG (20 mg/ml) v PBS

Proteinazi (1 mg/ml):

- papain v pufru P,
- pepsin v pufru B.

Inhibicija proteinaz:

- inhibitor papaina E-64 (1 mM),
- 2 M Tris/HCl, pH 8 za inhibicijo pepsina.

Pufri:

- pufer A (PBS z enako sestavo kot pri prejšnji vaji),
- pufer B (0,2 M Na-acetat, pH 4,0),
- pufer P (PBS, 0,02 M cistein, 0,02 M EDTA).

Izvedba vaje – prvi teden

Ker imamo 2 proteazi, za vsako cepitev pa izvedemo analizo pri 2 različnih pogojih (z in brez reducenta), in za vsakega od teh pogojev potrebujemo tudi kontrolo brez encima, imamo skupaj 8 različnih vzorcev:

1. IgG + papain neg. kontrola (brez reducenta),
2. IgG + papain neg. kontrola (z reducentom),
3. IgG + papain (brez reducenta),
4. IgG + papain (z reducentom),
5. IgG + pepsin neg. kontrola (brez reducenta),
6. IgG + pepsin neg. kontrola (z reducentom),
7. IgG + pepsin (brez reducenta),
8. IgG + pepsin (z reducentom).

Zaradi časovnih razlogov vsak par pripravi in izvede le eno od osmih reakcij.

Cepitev s papainom

1. V mikrocentrifugirko odpipetirajte 10 μ l raztopine IgG in dodajte 27 μ l pufra A.
2. Dodajte 5 μ l založne raztopine papaina oz. dodatnih 5 μ l pufra A, če izvajate kontrolni eksperiment.
3. Inkubirajte 1 uro pri temperaturi 37 °C.
4. Po 1 uri reakcijo prekinite z dodatkom 1 μ l raztopine inhibitorja papaina E-64.

Cepitev s pepsinom

1. V mikrocentrifugirko odpipetirajte 10 μ l raztopine IgG in dodajte 27 μ l pufra B.
2. Dodajte 5 μ l založne raztopine pepsina oz. dodatnih 5 μ l pufra B, če izvajate kontrolni eksperiment.
3. Inkubirajte 1 uro pri temperaturi 37 °C.
4. Po 1 uri reakcijo prekinite z dvigom pH tako, da dodate 1 μ l 2 M Tris/HCl, pH8.

Izvedba vaje – drugi teden

Produkte proteolitične razgradnje bomo analizirali z NaDS-PAGE. Za analizo v celotnih 43 μ l vzorca dodajte 11 μ l ustreznega nanašalnega pufra (z ali brez reducenta), nato od tega na gel nanesite le 15 μ l.

Ostala navodila za izvedbo so opisana pri prejšnji vaji.