

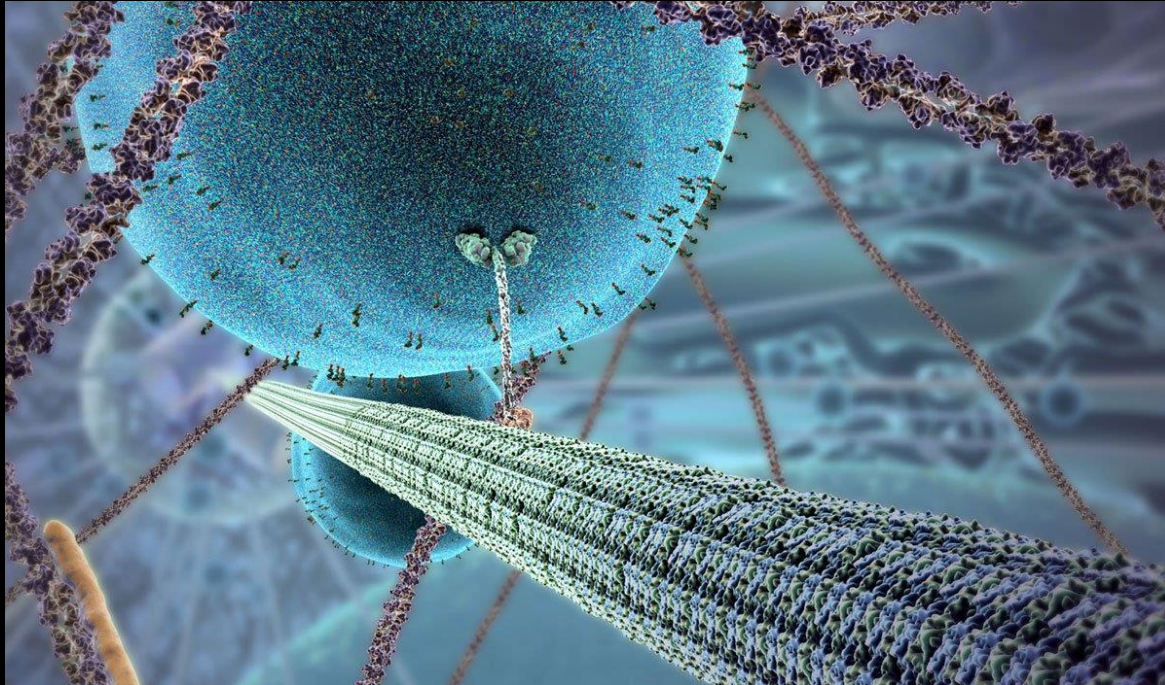
LOSCHMIDT
LABORATORIES

HotSpot Wizard 2.0: Automatický návrh aminokyselinových mutací a chytrých knihoven pro proteinové inženýrství

Jan Štourač, Jaroslav Bendl, Eva Šebestová, Ondřej Vávra, Miloš Musil,
Jan Brezovský a Jiří Damborský

Úvod

- Velmi **důležité biomolekuly** v živých organismech
 - Stavební prvky, katalýza reakcí, transport molekul, ...



Úvod

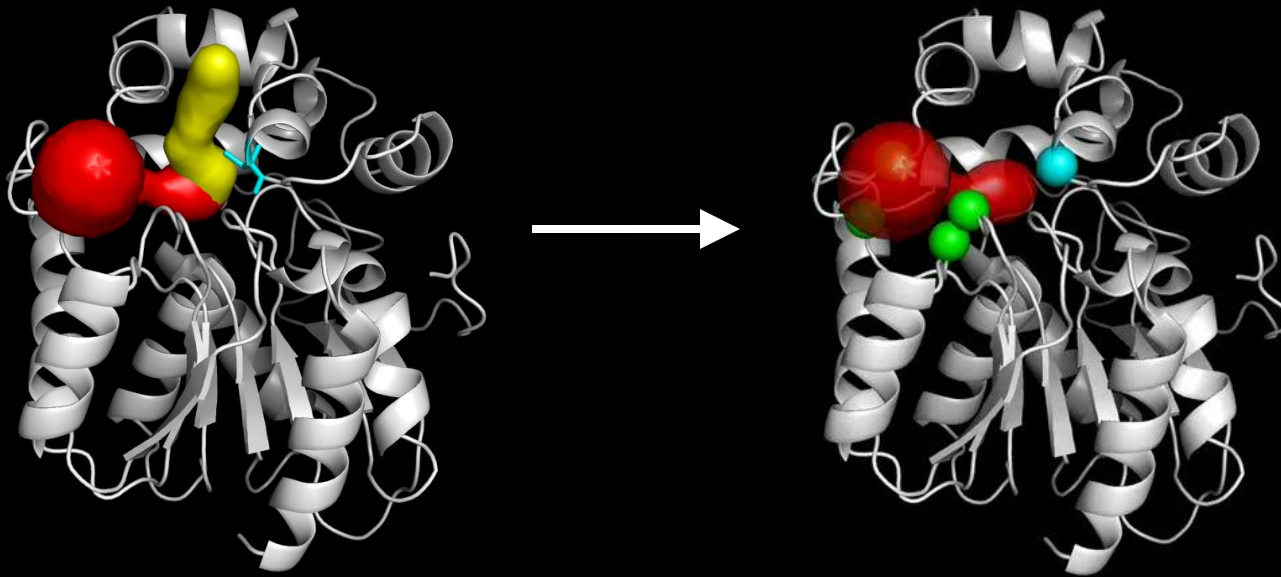
- Velmi důležité biomolekuly v živých organismech
 - Stavební prvky, katalýza reakcí, transport molekul, ...
- Uplatnění i v **biotechnologiích** a **biomedicině**
 - Procesy zpracování materiálů, likvidace odpadů a toxických látek, ...



- Velmi důležité biomolekuly v živých organismech
 - Stavební prvky, katalýza reakcí, transport molekul, ...
- Uplatnění i v biotechnologiích a biomedicině
 - Procesy zpracování materiálů, likvidace odpadů a toxických látek, ...
- Vlastnosti přirozených proteinů často **nevyhovují** 😞

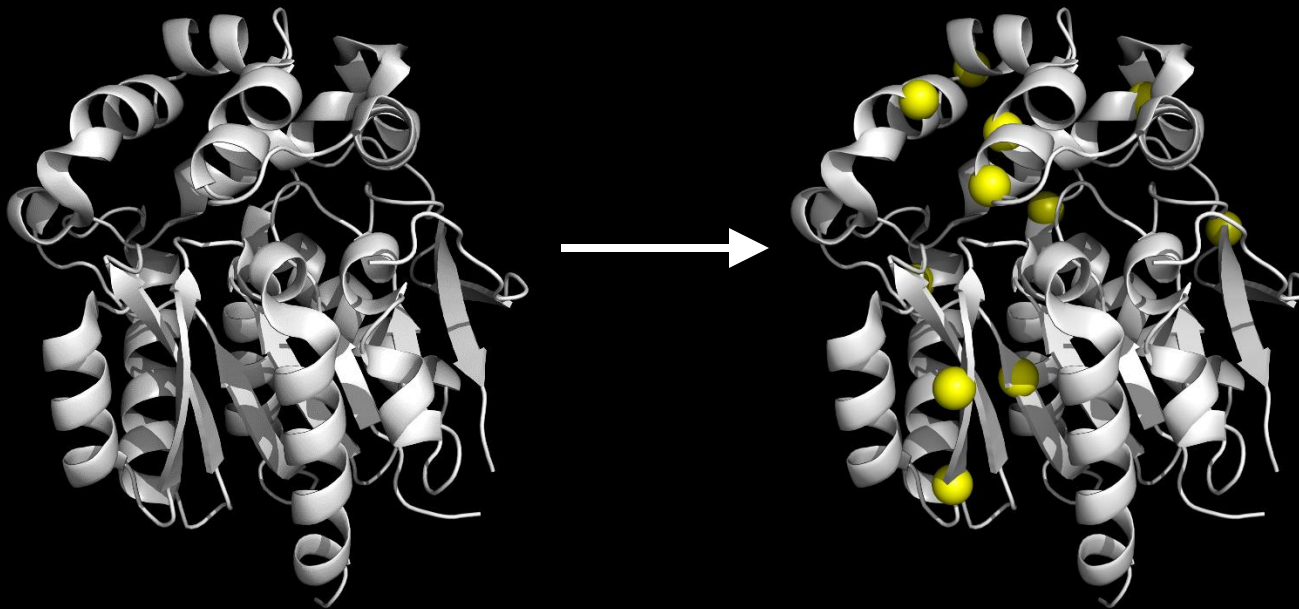
- Cíl: **konstrukce proteinů s upravenými vlastnostmi**
 - Vyšší/nížší aktivita, termostabilita, enantioselektivita, ...
 - Změněná substrátová specifita, reakční mechanismus, ...

- Cíl: **konstrukce proteinů s upravenými vlastnostmi**
 - **Vyšší/nížší aktivita**, termostabilita, enantioselektivita, ...
 - Změněná substrátová specifita, reakční mechanismus, ...



32x vyšší katalytická
aktivita

- Cíl: **konstrukce proteinů s upravenými vlastnostmi**
 - **Vyšší**/nižší aktivita, **termostabilita**, enantioselektivita, ...
 - Změněná substrátová specifita, reakční mechanismus, ...



zvýšená termostabilita
o 24° C

- **Jakým způsobem** ovlivnit požadované vlastnosti?

- **Jakým způsobem** ovlivnit požadované vlastnosti?
- Absence univerzálních pravidel 😞
 - Sekvence ~~→~~ funkce/stabilita/enantiosektivita/...
 - Struktura ~~→~~ funkce/stabilita/enantiosektivita/...

- **Jakým způsobem** ovlivnit požadované vlastnosti?
- Absence univerzálních pravidel ☹
 - Sekvence ✕ funkce/stabilita/enantioselektivita/...
 - Struktura ✕ funkce/stabilita/enantioselektivita/...
- Nelze provést charakterizaci všech možných mutací ☹
 - $20^{62} \approx 4,6 \cdot 10^{80}$ možností

Motivace

RACIONÁLNÍ DESIGN

1. Počítačové modelování



2. Místně cílená mutagenese



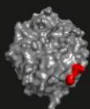
Samostatný mutovaný gen

3. Transformace

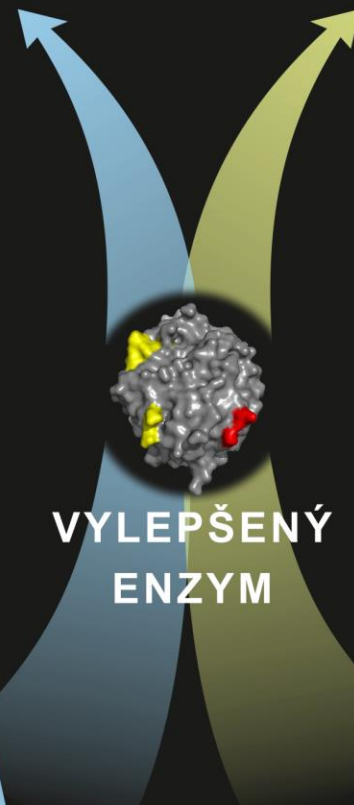
4. Expres proteinu

5. Purifikace proteinu

6. *není aplikován*



Zkonstruovaný mutantní enzym



7. Biochemické testování

ŘÍZENÁ EVOLUCE

1. *není aplikováno*

2. Náhodná mutagenese



Knihovna mutovaných genů
(>10,000 klonů)

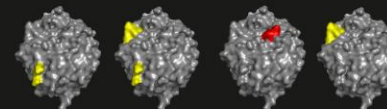
3. Transformace

4. Expres proteinu

5. *není aplikována*

6. Screening a výběr

- stabilita
- selektivita
- afinita
- aktivita



Vybrané mutantní enzymy

Motivace

- **Jak vybrat vhodná rezidua?**

- **Jak vybrat vhodná rezidua?**

- Kterou metodiku vybrat?

- **Jak vybrat vhodná rezidua?**

- Kterou metodiku vybrat?
- Které nástroje vybrat?

- **Jak vybrat vhodná rezidua?**

- Kterou metodiku vybrat?
- Které nástroje vybrat?
- Jaké zvolit nastavení?

■ **Jak vybrat vhodná rezidua?**

- Kterou metodiku vybrat?
- Které nástroje vybrat?
- Jaké zvolit nastavení?
- Jak interpretovat výsledky?

- **Jak vybrat vhodná rezidua?**
 - Kterou metodiku vybrat?
 - Které nástroje vybrat?
 - Jaké zvolit nastavení?
 - Jak interpretovat výsledky?
- Správné rozhodnutí vyžaduje **bioinformatické znalosti a zkušenosti**

Automatická identifikace **reziduí vhodných k mutagenezi** a návrh „**chytrých knihoven**“ pro proteinové inženýrství.



HotSpot Wizard 2.0

- 20 výpočetních nástrojů a 3 databáze

HotSpot Wizard 2.0

- 20 výpočetních nástrojů a 3 databáze
- 4 strategie proteinového inženýrství

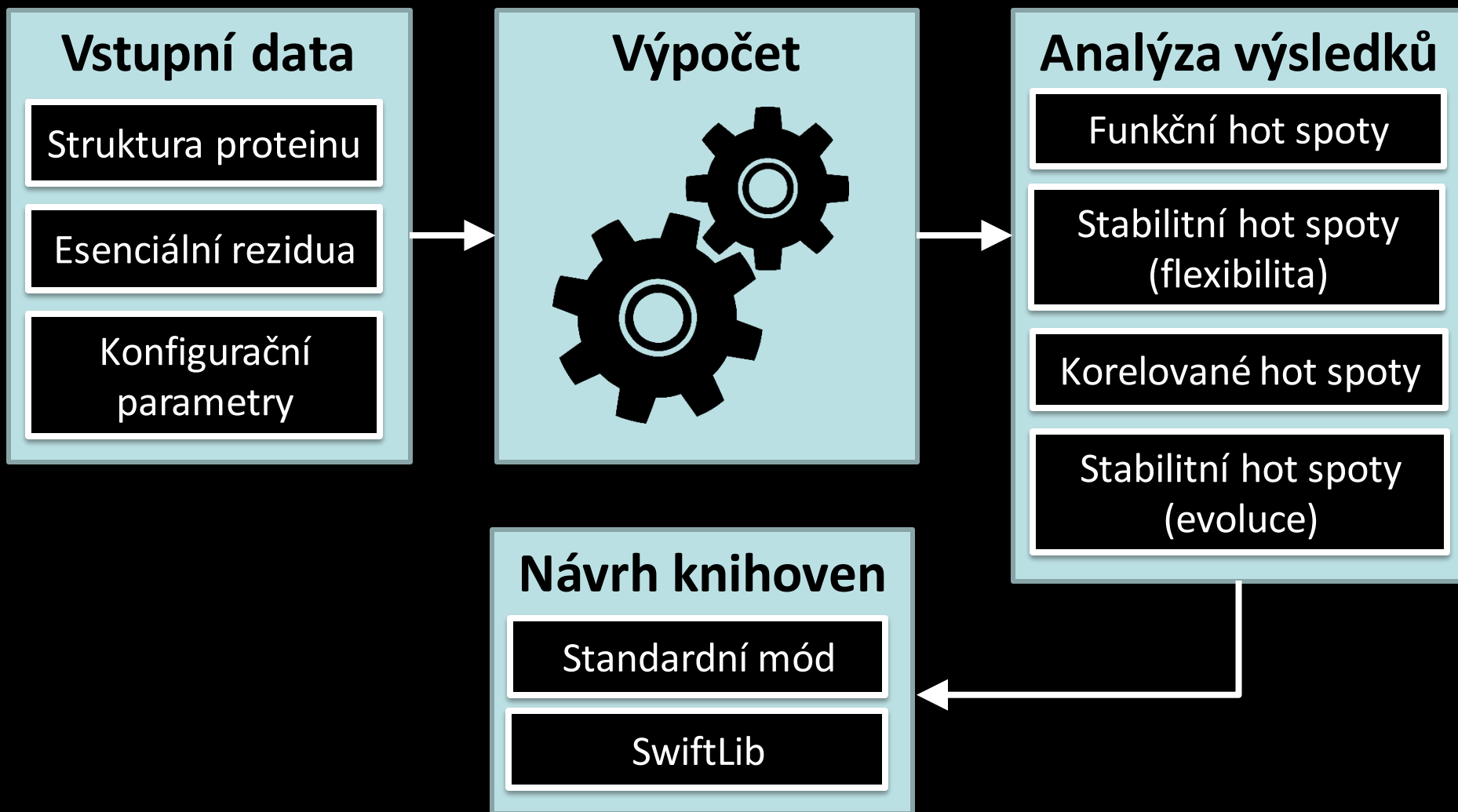
HotSpot Wizard 2.0

- 20 výpočetních nástrojů a 3 databáze
- 4 strategie proteinového inženýrství
- Interaktivní **webové** rozhraní

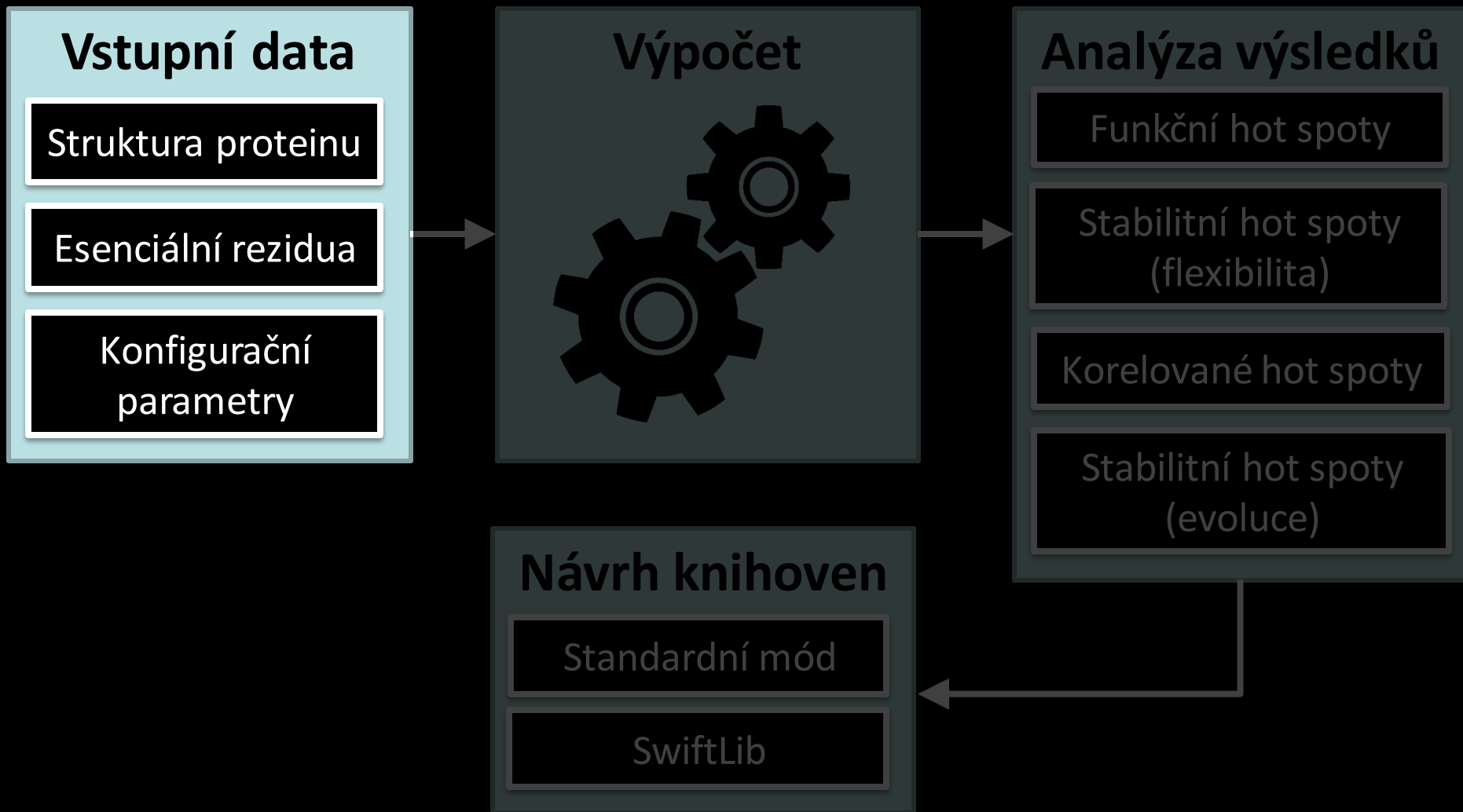
HotSpot Wizard 2.0

- 20 výpočetních nástrojů a 3 databáze
- 4 strategie proteinového inženýrství
- Interaktivní webové rozhraní
- **Snadné použití**
 - Není vyžadovaná žádná apriorní bioinformatická znalost
 - Není nutné detailně znát studovaný systém

HotSpot Wizard 2.0



Vstupní data



Vstupní data

- Jediný **povinný** vstup: **struktura proteinu**
 - Stažení struktury z PDB databáze nebo vlastní soubor

Vstupní data

- Jediný povinný vstup: struktura proteinu
 - Stažení struktury z PDB databáze nebo vlastní soubor
- Snaha o **univerzální** výchozí parametry
 - Možnost jejich manuální změny
 - Základní a pokročilý mód

Vstupní data



Design of mutations and smart libraries in protein engineering



[Submit new job](#) [Help](#) [Example](#) [Use cases](#) [Acknowledgement](#)

Job ID:

[Find job](#)

INPUT STRUCTURE

[Load example](#)

Source: ☒ Enter PDB code

☐ Upload PDB file

PDB ID:

[Process structure](#)



Biological unit:

☐ molecule

☐ chains

☐ quaternary structure

☒ 1

☐ A

☐ Monomeric

☐ Specify chains manually

JOB INFORMATION

Job title (optional):

E-mail (optional):

[Previous](#)



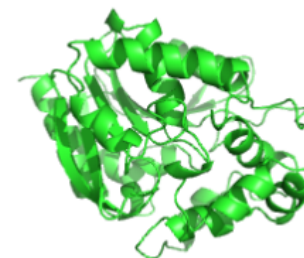
Looking for HotSpot Wizard 1.7?

This version is now deprecated, but existing jobs are available [here](#).

Details about biological unit 0

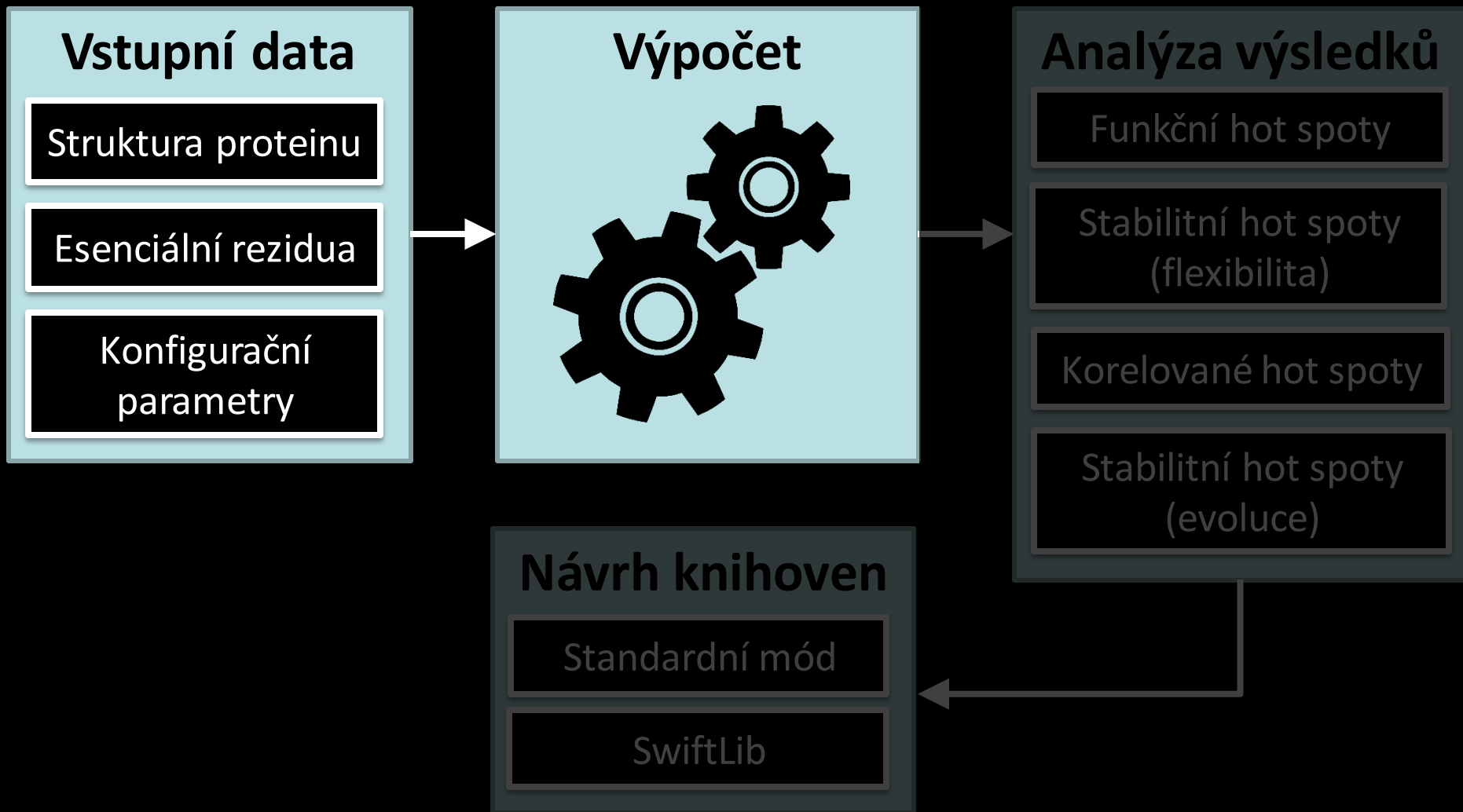
Biomolecule:	1
Burried surface area [$\text{\AA}^2$]:	-
Surface area [$\text{\AA}^2$]:	-
Change in solvent free energy [kcal/mol]:	-

chain	original chain	residues	atoms
A	A	4 - 1449	1 - 2750



c4Sys

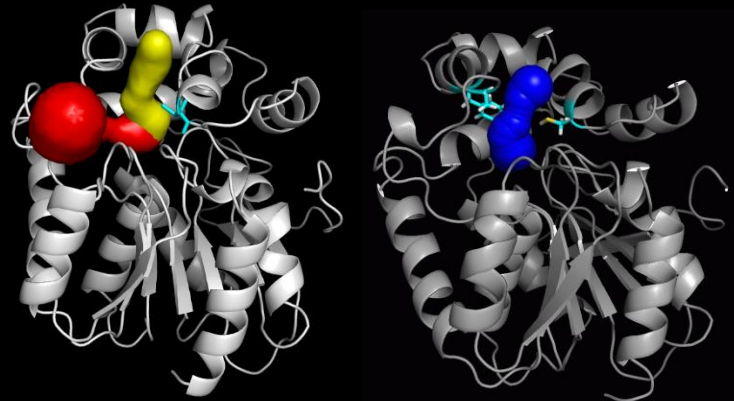
Výpočet



- **Strukturní a sekvenční analýzy**

- Identifikace kapes a tunelů, analýza B-faktorů, výpočet ASA
- Konstrukce mnohonásobného zarovnání, výpočet konzervovanosti, identifikace evolučních mutací, hledání korelovaných párů, predikce škodlivosti mutací a sekundárních struktur

- **Strukturní a sekvenční analýzy**
 - **Identifikace** kapes a **tunelů**, analýza B-faktorů, výpočet ASA
 - Konstrukce mnohonásobného zarovnání, výpočet konzervovanosti, identifikace evolučních mutací, hledání korelovaných párů, predikce škodlivosti mutací a sekundárních struktur



- **Strukturní a sekvenční analýzy**

- Identifikace kapes a tunelů, analýza B-faktorů, výpočet ASA

- **Konstrukce mnohonásobného zarovnání**, výpočet

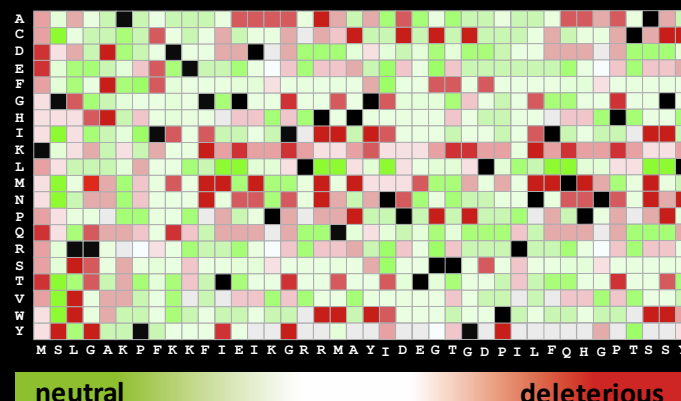
konzervovanosti, identifikace evolučních mutací, hledání korelovaných párů, predikce škodlivosti mutací a

sekundárních struktur

```
YLEAFVDEINLPAPVTLVSHDWGSALA
YLDAWFDALGVQE-AVLVGHDWGGALA
YLEAFIDALALDEPVTLVVHWDWGSFLG
YLDAFLAKAGISS-AFVIAQDWGTALA
YLDAFIAASGVET-ATLVAQDWGTALA
YLDGFIEALGLDR-VTIVCHDWGSFFG
```

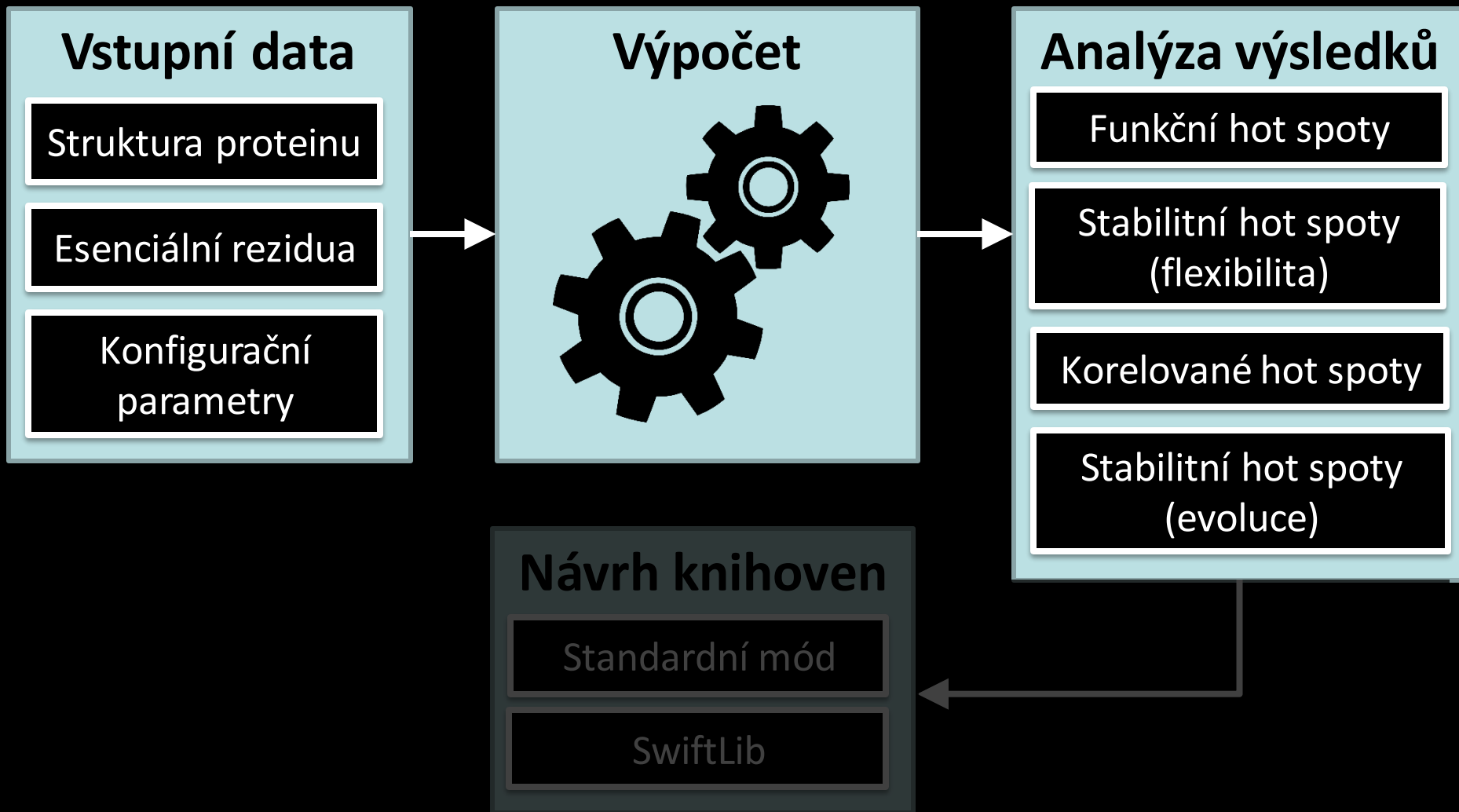
■ Strukturní a sekvenční analýzy

- Identifikace kapes a tunelů, analýza B-faktorů, výpočet ASA
- Konstrukce mnohonásobného zarovnání, výpočet konzervovanosti, identifikace evolučních mutací, hledání korelovaných párů, **predikce škodlivosti mutací** a sekundárních struktur



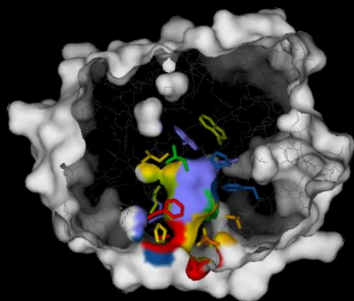
- Strukturní a sekvenční analýzy
 - Identifikace kapes a tunelů, analýza B-faktorů, výpočet ASA
 - Konstrukce mnohonásobného zarovnání, výpočet konzervovanosti, identifikace evolučních mutací, hledání korelovaných párů, predikce škodlivosti mutací a sekundárních struktur
- **Kombinace dílčích výsledků** do finálního rozhodnutí

Analýza výsledků

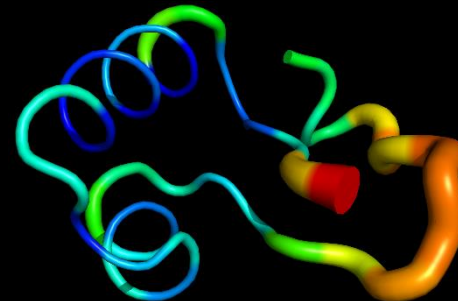


Analýza výsledků

Funkční hot spoty



Stabilitní hot spoty (flexibilita)



Stabilitní hot spoty (evoluce)

T	S	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	W	L	W	R	N	I	M	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L

Y ⇒ R

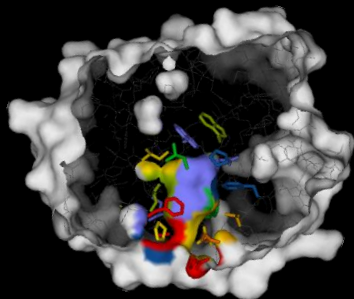
Korelované hot spoty

T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	R	L	W	R	N	I	D	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L

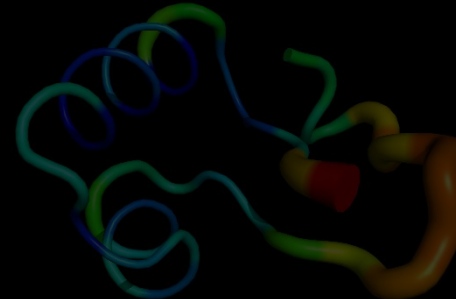
Yellow arrows point from the 'W' in the 10th row to the 'R' in the 3rd row and the 'V' in the 10th row.

Analýza výsledků

Funkční hot spoty



Stabilitní hot spoty (flexibilita)



Stabilitní hot spoty (evoluce)

T	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	L	W	R	N	I	M	-	-	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L

Y ⇒ R

Korelované hot spoty

T	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
-	-	R	L	W	R	N	I	D	-	-	H	C	A	G	L
T	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
T	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L
T	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L

Yellow arrows point to the 'R' in the second column and the 'V' in the ninth column of the last two rows.

Funkční hot spoty

- **Podmínka 1:** evolučně variabilní pozice

prot01 YLEAFVDELNLPAPVTLVSHDWGSALA

Funkční hot spoty

- **Podmínka 1:** evolučně variabilní pozice

prot01	Y	E	A	F	V	D	E	L	N	L	P	A	P	V	T	L	V	S	H	D	W	G	S	A	L	A	
prot02	Y	L	D	A	W	F	D	A	L	G	V	Q	E	-	A	V	L	V	G	H	D	W	G	G	A	L	A
prot03	Y	E	A	F	I	D	A	L	A	L	D	E	P	V	T	L	V	V	H	D	W	G	S	F	L	G	
prot04	Y	L	D	A	F	L	A	K	A	G	I	S	S	-	A	F	V	I	A	Q	D	W	G	T	A	L	A
prot05	Y	L	D	A	F	I	A	A	S	G	V	E	T	-	A	T	L	V	A	Q	D	W	G	T	A	L	A
prot06	Y	L	D	G	F	I	E	A	L	G	L	D	R	-	V	T	I	V	C	H	D	W	G	S	F	F	G
prot07	Y	F	D	A	F	L	H	S	L	A	L	N	Q	P	V	V	L	V	G	H	D	W	G	G	V	L	A
prot08	F	L	D	A	W	F	D	A	V	A	P	A	E	P	V	V	L	A	V	H	D	W	G	S	A	L	G

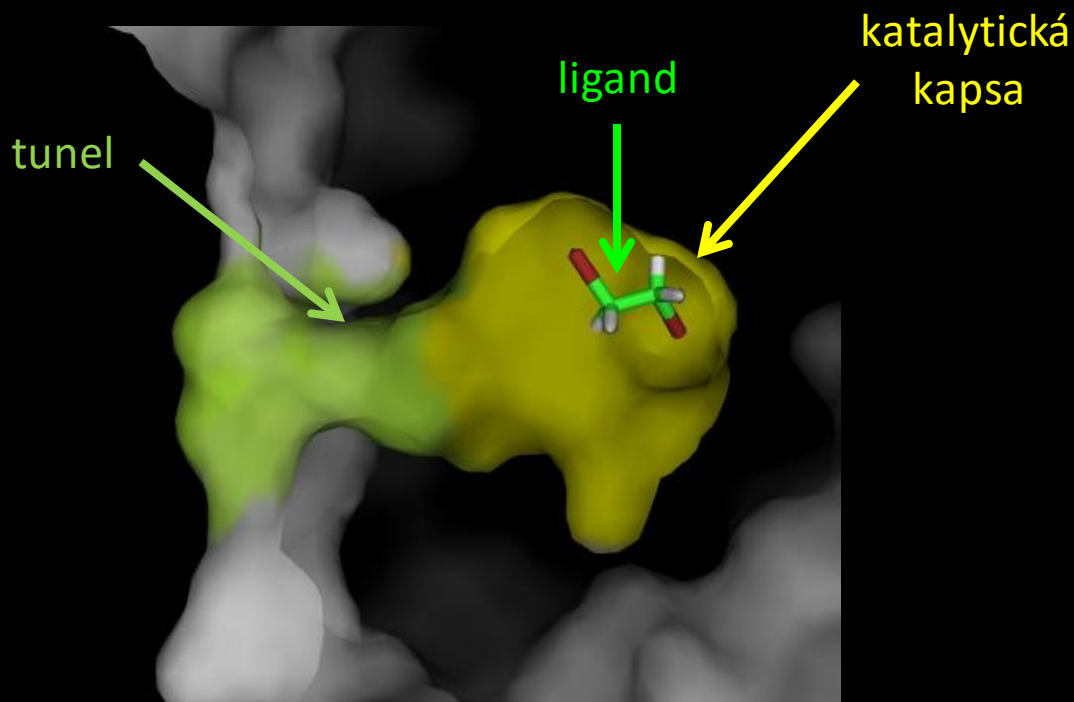
Funkční hot spoty

- **Podmínka 1:** evolučně variabilní pozice

prot01	Y	L	E	A	F	V	D	E	L	N	L	P	A	P	V	T	L	V	S	H	D	W	G	S	A	L	A
prot02	Y	L	D	A	W	F	D	A	L	G	V	Q	E	-	A	V	L	V	G	H	D	W	G	G	A	L	A
prot03	Y	L	E	A	F	I	D	A	L	A	L	D	E	P	V	T	L	V	V	H	D	W	G	S	F	L	G
prot04	Y	L	D	A	F	L	A	K	A	G	I	S	S	-	A	F	V	I	A	Q	D	W	G	T	A	L	A
prot05	Y	L	D	A	F	I	A	A	S	G	V	E	T	-	A	T	L	V	A	Q	D	W	G	T	A	L	A
prot06	Y	L	D	G	F	I	E	A	L	G	L	D	R	-	V	T	I	V	C	H	D	W	G	S	F	F	G
prot07	Y	F	D	A	F	L	H	S	L	A	L	N	Q	P	V	V	L	V	G	H	D	W	G	G	V	L	A
prot08	F	L	D	A	W	F	D	A	V	A	P	A	E	P	V	V	L	A	V	H	D	W	G	S	A	L	G

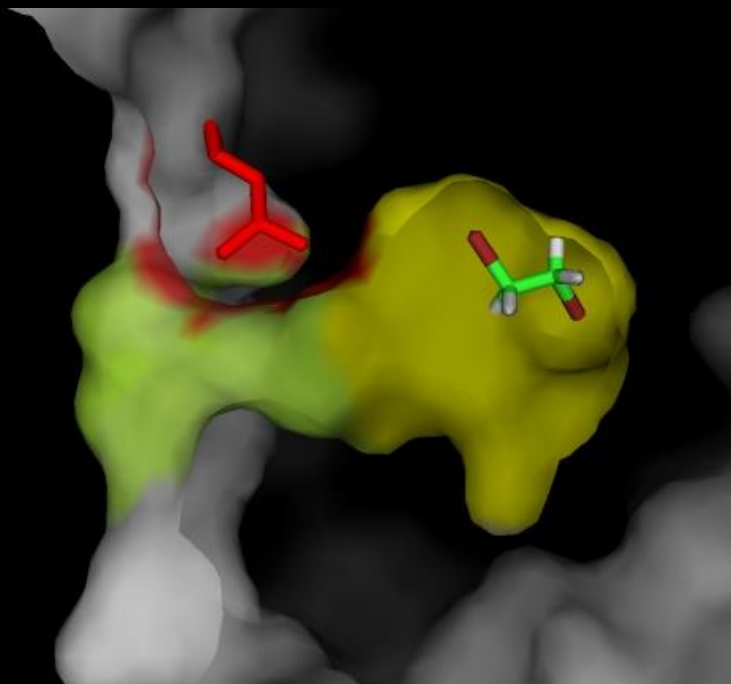
Funkční hot spoty

- **Podmínka 2:** umístění v relevantních přístupových tunelech nebo katalytických kapsách



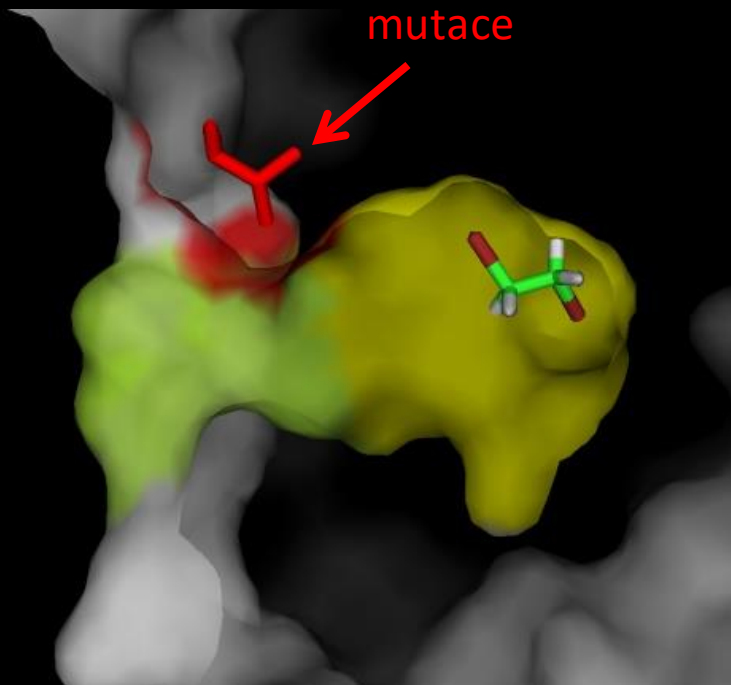
Funkční hot spoty

- **Podmínka 2:** umístění v relevantních přístupových tunelech nebo katalytických kapsách



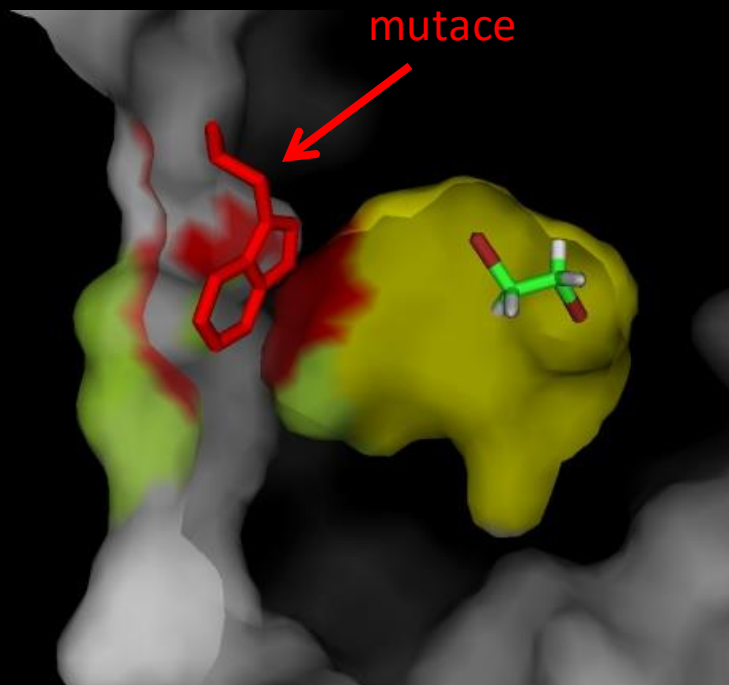
Funkční hot spoty

- **Podmínka 2:** umístění v relevantních přístupových tunelech nebo katalytických kapsách



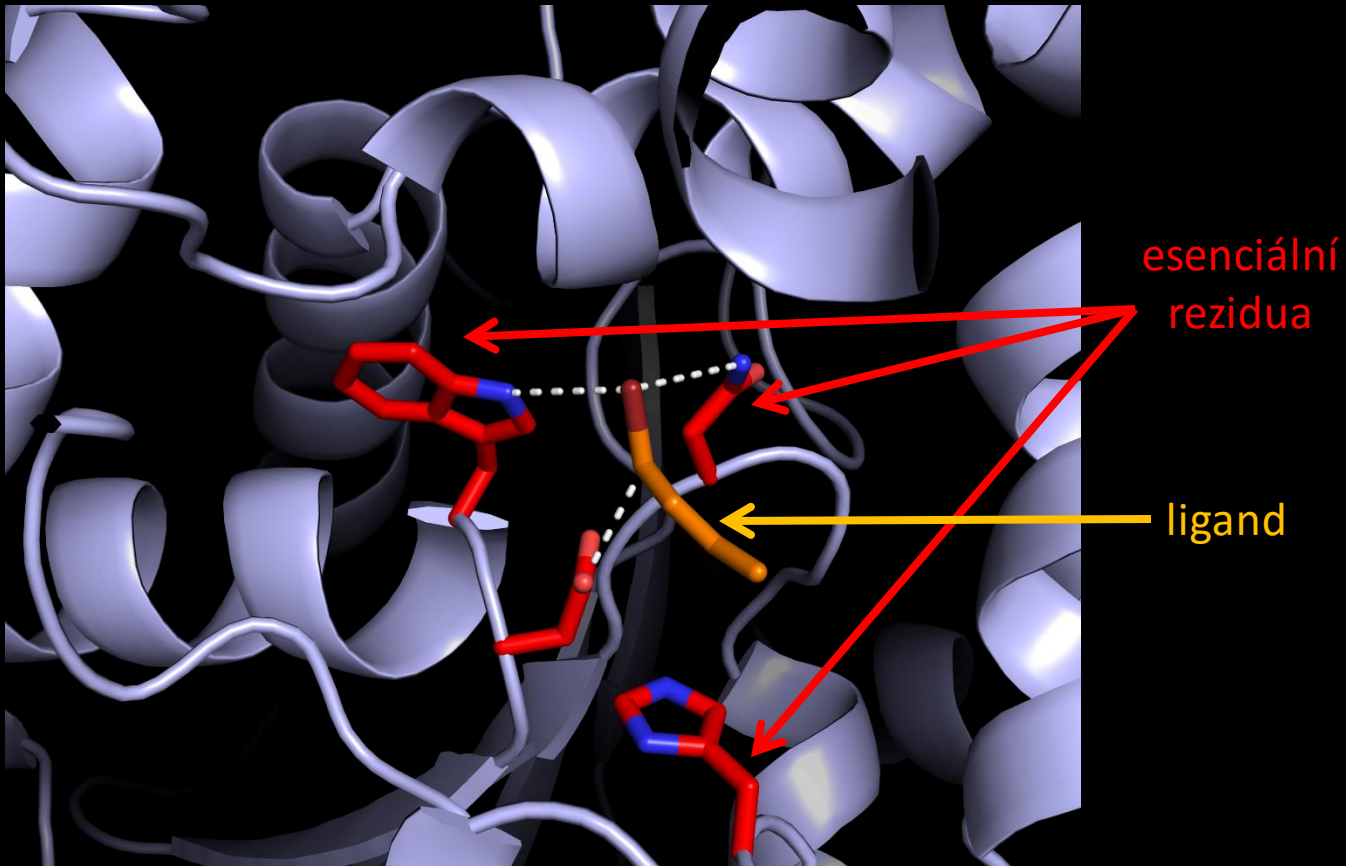
Funkční hot spoty

- **Podmínka 2:** umístění v relevantních přístupových tunelech nebo katalytických kapsách



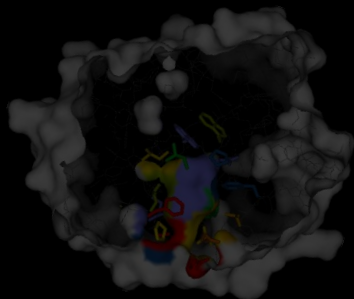
Funkční hot spoty

- **Podmínka 3:** reziduum nesmí být esenciální pro funkci

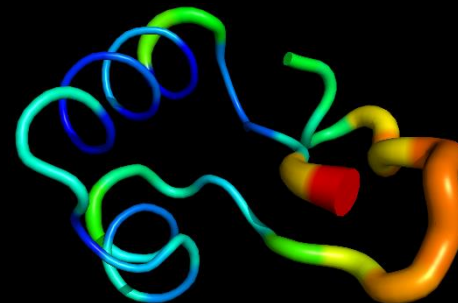


Analýza výsledků

Funkční hot spoty



Stabilitní hot spoty (flexibilita)



Stabilitní hot spoty (evoluce)

T	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	L	W	R	N	I	M	-	-	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L

Y ⇒ R

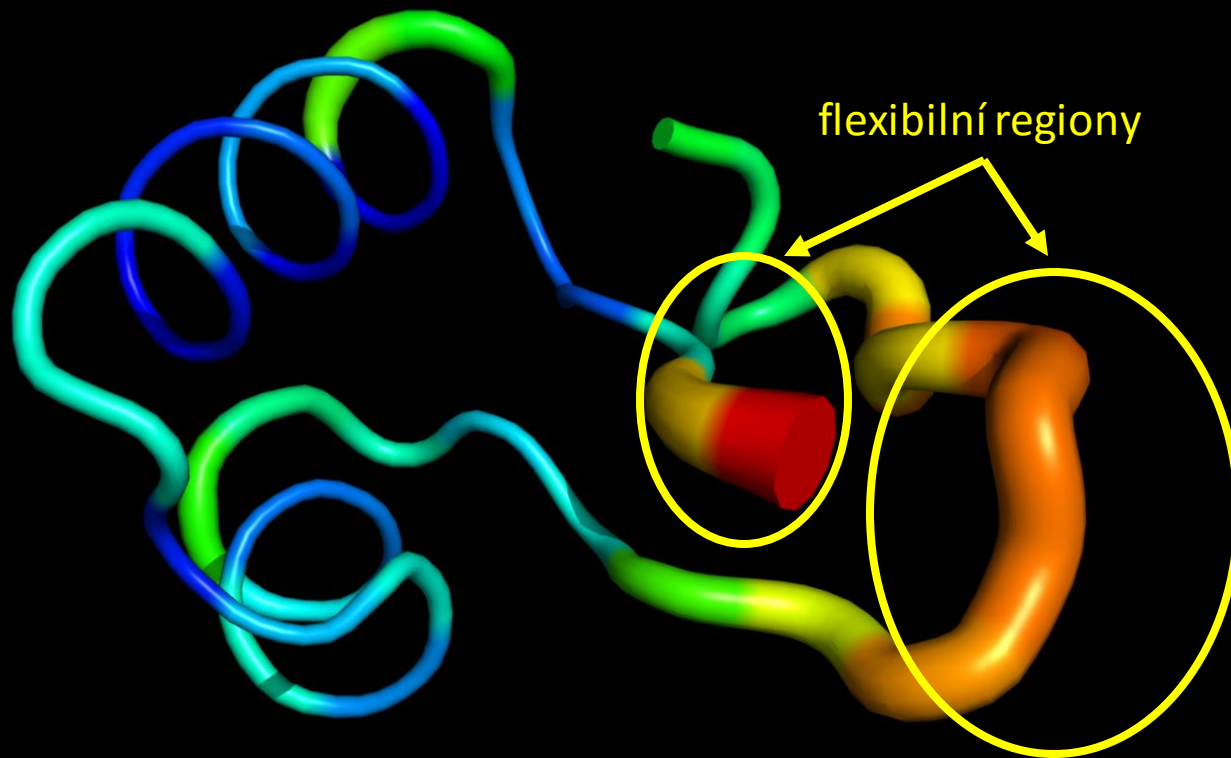
Korelované hot spoty

T	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
-	-	R	L	W	Y	N	I	D	-	-	H	C	A	G	L
T	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
T	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	W	L	W	Y	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L
T	S	W	L	W	Y	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L

↑ ↑

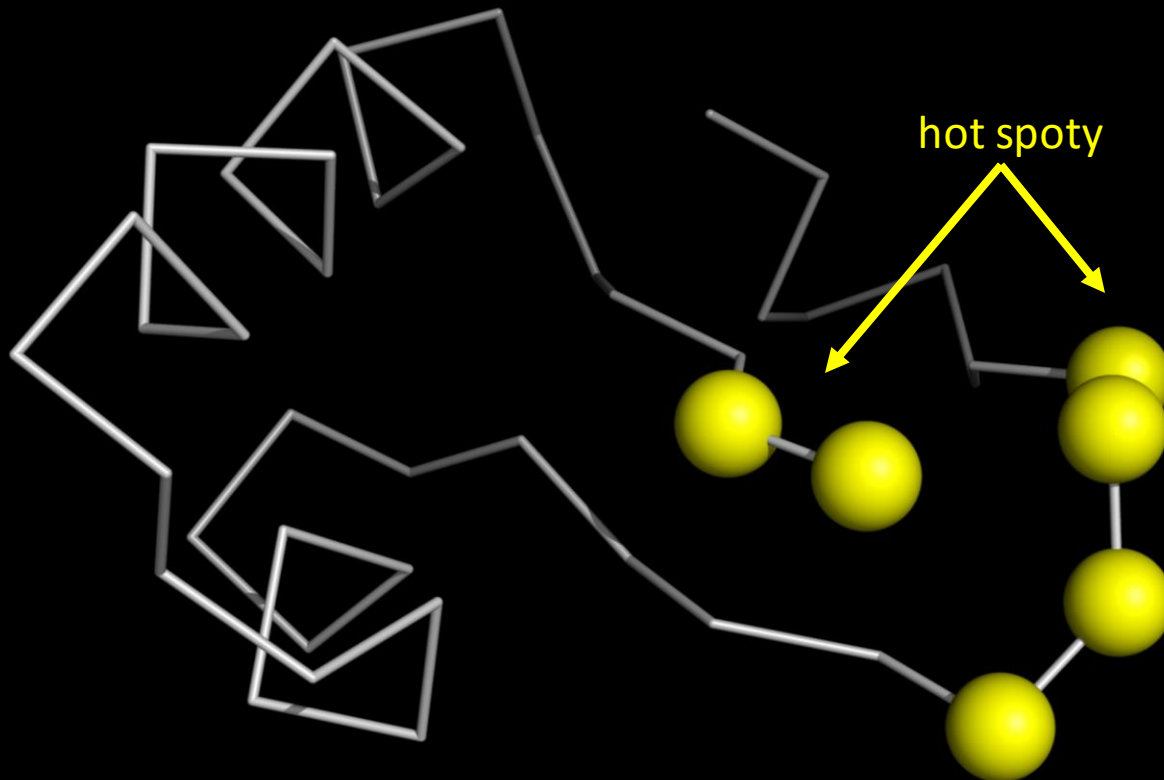
Stabilitní hot spoty (flexibilita)

- **Podmínka:** rezidua nacházející se ve strukturně flexibilním regionu



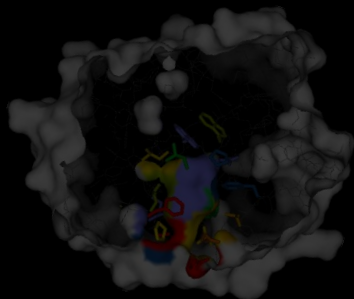
Stabilitní hot spoty (flexibilita)

- **Podmínka:** rezidua nacházející se ve strukturně flexibilním regionu

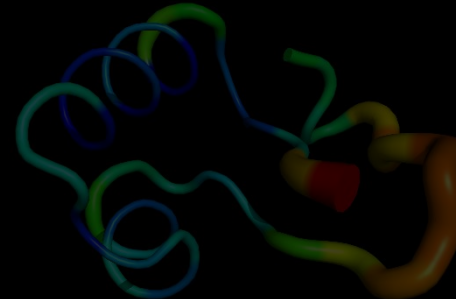


Analýza výsledků

Funkční hot spoty



Stabilitní hot spoty (flexibilita)



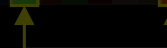
Stabilitní hot spoty (evoluce)

T	S	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	W	L	W	R	N	I	M	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L

Y ⇒ R

Korelované hot spoty

T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	R	L	W	Y	N	I	D	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	Y	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	Y	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L



Stabilitní hot spoty (evoluce)

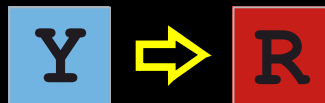
- **Podmínka:** pozice, které jsou v zarovnání častěji zastoupeny jinou aminokyselinou

T	S	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	W	L	W	R	N	I	M	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L

Stabilitní hot spoty (evoluce)

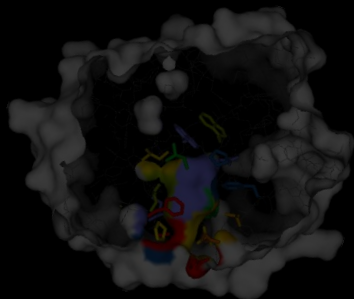
- **Podmínka:** pozice, které jsou v zarovnání častěji zastoupeny jinou aminokyselinou

T	S	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	W	L	W	R	N	I	M	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L

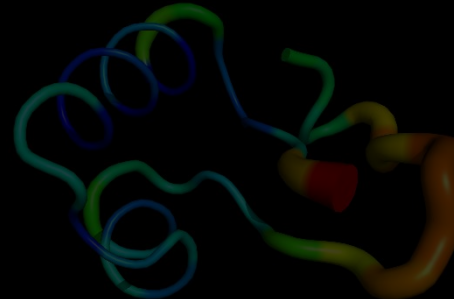


Analýza výsledků

Funkční hot spoty



Stabilitní hot spoty (flexibilita)



Stabilitní hot spoty (evoluce)

T	S	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	W	L	W	R	N	I	M	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	Y	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	Y	L	W	R	N	I	M	P	N	H	C	A	G	L

Y ⇒ R

Korelované hot spoty

T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	R	L	W	Y	N	I	D	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	Y	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	Y	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	Y	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L

Yellow arrows point to the 'R' in the 3rd column and the 'V' in the 10th column of the 9th row.

Korelované hot spoty

- **Podmínka:** pár reziduí musí být korelovaný

T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	R	L	W	R	N	I	D	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L

Korelované hot spoty

- **Podmínka:** pár reziduí musí být korelovaný

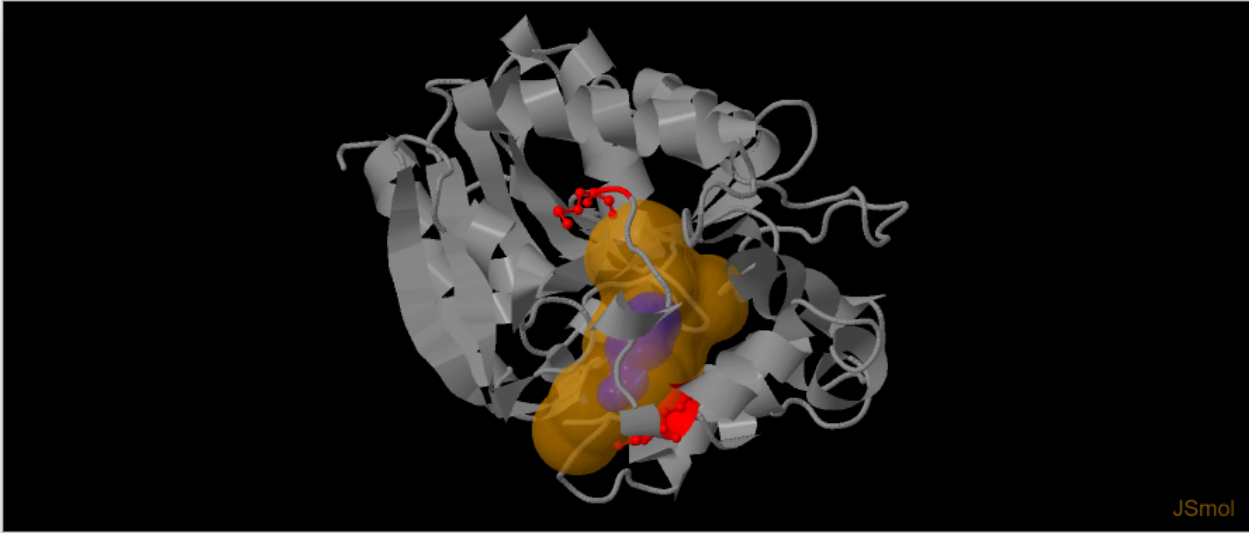
The image shows a 12x14 grid of amino acid residues. The first three columns (T, S, S) are dark blue. The fourth column (R, R, R, K, K, K, K, K, W, W, W) is highlighted with a yellow border. The fifth column (L, L, L, L, L, L, L, L, L, L, L) is dark green. The sixth column (W, W, W, R, R, R, R, R, W, W, W) is dark red. The seventh column (Y, N, I, E, E, E, E, E, I, I, I) is dark grey. The eighth column (D, D, D, E, E, E, E, E, V, V, V) is highlighted with a yellow border. The ninth column (P, P, P, P, P, P, P, P, P, P, P) is dark blue. The tenth column (N, N, N, N, N, N, N, N, N, N, N) is dark grey. The eleventh column (H, H, H, H, H, H, H, H, H, H, H) is dark grey. The twelfth column (C, C, C, C, C, C, C, C, C, C, C) is dark red. The thirteenth column (A, A, A, A, A, A, A, A, A, A, A) is dark green. The fourteenth column (G, G, G, G, G, G, G, G, G, G, G) is dark green. A yellow arrow points from the bottom of the fourth column to the bottom of the eighth column, indicating a correlation between the residues in these two columns.

T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
-	-	S	R	L	W	R	N	I	D	-	-	H	C	A	G	L
T	S	S	R	L	W	Y	N	I	D	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	P	P	P	A	G	L
T	S	S	K	L	W	R	N	I	E	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L
T	S	S	W	L	W	R	N	I	V	P	N	H	C	A	G	L

Analýza výsledků

Functional hot spots of 1CV2

Viewer



JSmol

Residue features

☐ Exclude correlated positions ☐ Exclude catalytic pockets ☐ Exclude tunnels ☐ Exclude α -helices and β -sheets

☐ Exclude buried residues ☐ Include residues with moderate mutability

Show all residues

	chain	position	residue	mutable	non-essential	in tunnel	in catalytic pocket	HotSpot
Chain A								
☒	A	146	Gln	✓	✓	✓	✓	✓
☒	A	136	Met	✓	✓	✗	✓	✓
☒	A	147	Asp	✓	✓	✓	✓	✓
☐ +	A	271	Ala	✓	✓	✓	✓	✓
☐ +	A	138	Ile	✓	✓	✗	✓	✓
☐ +	A	247	Ala	✓	✓	✓	✓	✓
☐ +	A	248	Leu	✓	✓	✓	✓	✓
☐ +	A	249	Thr	✓	✓	✓	✗	✓
☐ +	A	253	Met	✓	✓	✗	✓	✓

Visualization settings

Tunnels

	id	length (Å)	bottleneck radius (Å)
☒	1	7.7	1.5

Pockets

	id	chain(s)	relevance (%)	volume (Å ³)
☒	1	A	100	576
☐	2	A	82	883
☐	3	A	62	275
☐	4	A	28	753
☐	5	A	25	183
☐	6	A	19	119
☐	7	A	19	632

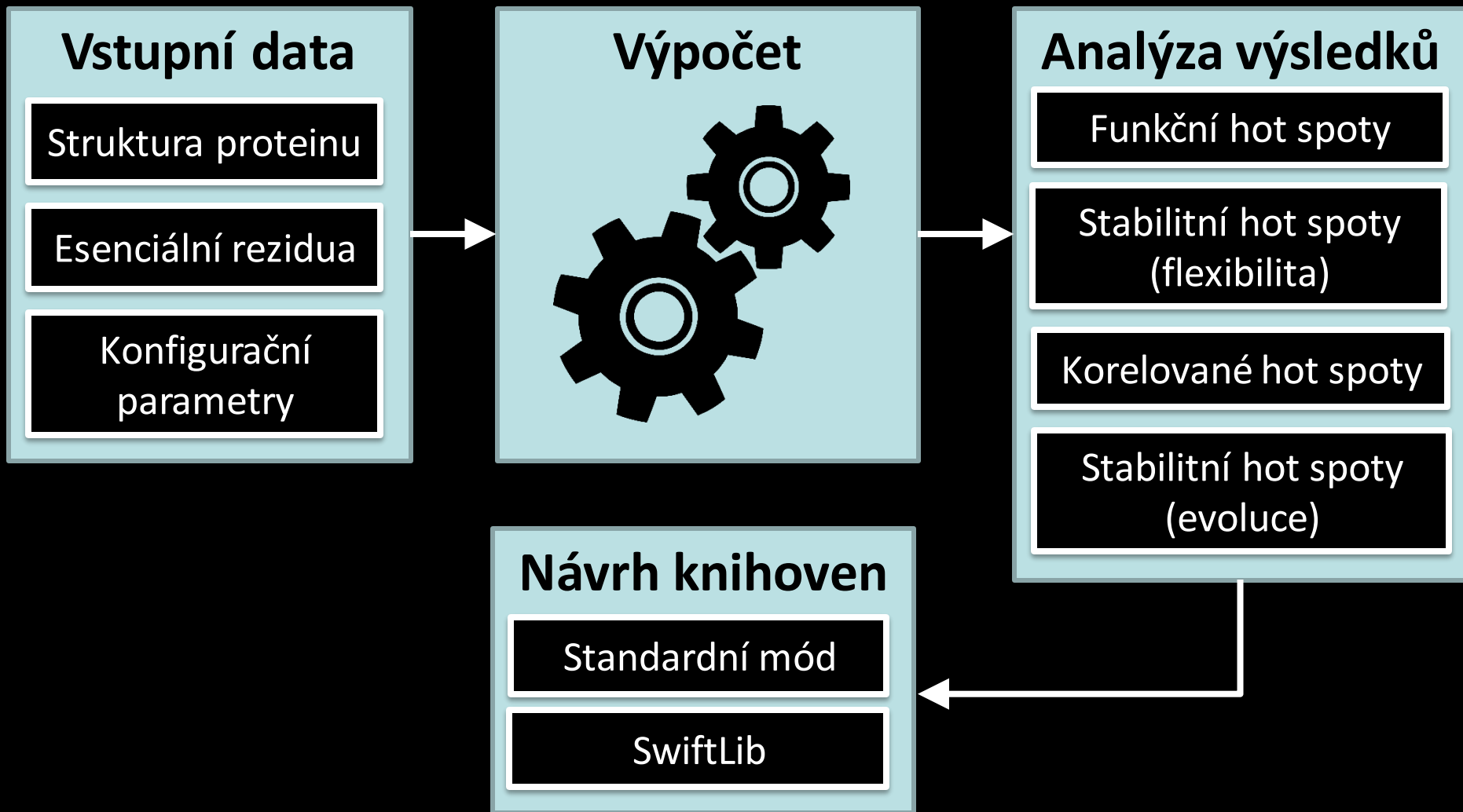
Residues selected for mutagenesis

Zoom residues

Design library

	chain	position	residue	HotSpot
☒	A	146	Gln	✓
☒	A	136	Met	✓
☒	A	147	Asp	✓

Návrh knihoven



Návrh knihoven

- 2 přístupy k návrhu knihoven
 - Omezení aminokyselin vs. omezení velikosti knihovny

Návrh knihoven

- 2 přístupy k návrhu knihoven
 - Omezení aminokyselin vs. omezení velikosti knihovny
- Automatický výběr **cílových aminokyselin**
 - Frekvence v MSA, škodlivost mutací, ...

- 2 přístupy k návrhu knihoven
 - Omezení aminokyselin vs. omezení velikosti knihovny
- Automatický výběr cílových aminokyselin
 - Frekvence v MSA, škodlivost mutací, ...
- Výpočet parametrů knihovny

Návrh knihoven

Library design

Standard SwiftLib

AAs selection mode : Amino acid frequency **Minimal frequency (%) :** 5 **Include wild-type** **Exclude wild-type**

☒	chain	position	residue	desired amino acids	codon	desired ratio (%)	stop ratio (%)
☒	A	136	Met	Ala, Lys, Pro, Gln, Arg, Thr	VVR	77.8	0.0
☒	A	146	Gln	Ala, Asp, Glu, Gly, Pro, Gln, Ser	BVV	63.0	11.1
☒	A	147	Asp	Ala, Phe, Gly, Leu, Met, Thr, Val	DBS	61.1	0.0

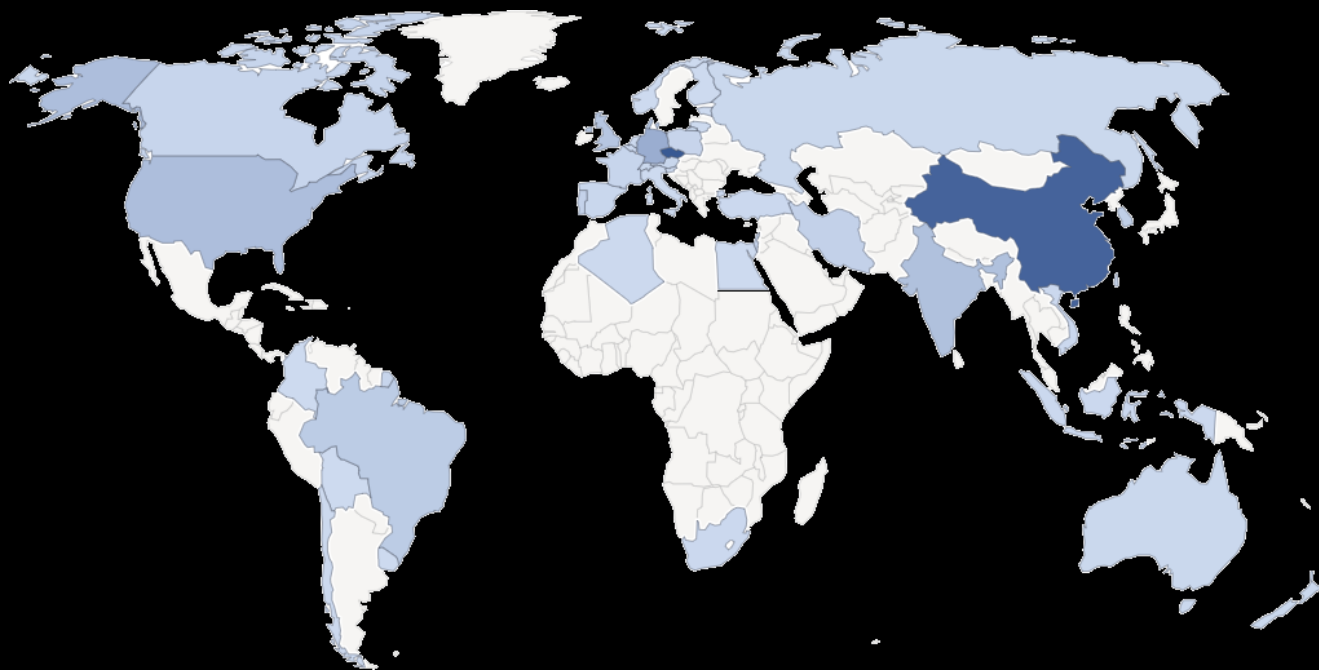
Library size : 7315 **Codon usage :** Escherichia coli K12

Expected coverage : 0.95 **Generate report**

Probability of full coverage : 0

Shrnutí

Bendl et al. **HotSpot Wizard 2.0: Automated Design of Site-Specific Mutations and Smart Libraries in Protein Engineering**. Nucleic Acids Research (in press). 2016. doi: 10.1093/nar/gkw416



> **300** návštěvníků

> **120** uživatelů

> **250** úloh



MetaCentrum

<http://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard>