ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И. П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ

УТВЕРЖДЕНО
на заседании кафедры
общей и биоорганической химии
«07» июня 2023 г., протокол № 5
заведующий кафедрой
д. х. н., доцент К. Н. Семёнов

Методические указания для преподавателя

по **Избранным главам биофизики**
(наименование дисциплины)

По теме **Молекулярная биофизика**
(наименование темы занятия)

для специальности/ **06.04.01 Биология**

(наименование и код специальности)

Факультет/ **Фундаментальной медицины**

(наименование факультета)

Кафедра **Общей и биоорганической химии**
(наименование кафедры)

1. **ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ИЗУЧЕНИЯ ТЕМЫ**

составляет 24 часа из них

2. **ЦЕЛИ**

Магистрант после освоения темы должен знать:

- Основы молекулярного моделирования: принципы организации биополимеров
- 3D-структуры белка: методы определения, предсказания, визуализации, базы данных понятия водородного и гидроксильного показателей;
- Принципы моделирования в молекулярной динамике

Магистрант после освоения темы должен уметь:

- Анализировать пространственную организацию белков
- Применять основные базы данных белков и программы для анализа первичной, вторичной и третичной структуры
- Применять методы предсказания пространственной структуры белков
- Визуализировать пространственные модели белков в программе PyMol, редактировать модели
- Проводить молекулярную динамику белков в программе Gromacs
- Анализировать результаты молекулярной динамики

3. ПЛАН ЗАНЯТИЯ №1

N п/п	Этап занятия	Форма контроля усвоения	Примерное время
	Вводная часть - Организационный момент - Цели занятия	–	5 минут
	Контроль исходного уровня знаний и усвоения лекционного материала	Устный опрос	15 минут
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Основы молекулярного моделирования и структурной биоинформатики. Принципы организации структуры белков, пептидная связь. Карта Рамачандрана.	25 минут
	Перерыв		**5 минут**
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Типы внутримолекулярных взаимодействий в белковых макромолекулах	45 минут
	Перерыв		**10 минут**
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Конформационные превращения и фолдинг белков. Структурные особенности белков: мотив, фолд, домен. Программы для предсказания вторичной структуры белков.	45 минут
	Перерыв		**5 минут**
	Основная часть занятия	Экспериментальные методы	45 минут

	Формирование новых знаний и практических навыков по теме	определения структуры белков. Базы данных белков. Формат и содержание файла PDB. Методы предсказания 3D-структуры белка	
	Перерыв		**60 минут**
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Практическая работа.	180 минут

4. СОДЕРЖАТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ 1

1. Анализ первичной последовательности белов, множественное выравнивание.
2. Предсказание вторичной структуры белков.
3. Использование базы данных белков по классификации, поиску мотивов, третичной структуры
4. Предсказание третичной структуры белков по гомологии.
5. Визуализация белков в программе PyMol.

5. ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

1). Даны три последовательности белка DHFR в формате .fasta разных организмов: человека, кабана, бактерии.

>sp|P00374|DYR_HUMAN Dihydrofolate reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHFR PE=1 SV=2

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKT
WFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGI
KYKFEVYEKND

>sp|P00377|DYR_PIG Dihydrofolate reductase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=DHFR PE=1 SV=1

VRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEYKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGRKTWF
SIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPQGAHFLAKSLDDALKLTEQPELKDKVDMVWIVGGS
SVYKEAMNKPGHIRLFVTRIMKEFESDTFFPEIDLEKYKLLSECSGVPSDVQEEKGIKYKF
EVYEKNN

>sp|P0ABQ4|DYR_ECOLI Dihydrofolate reductase OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=folA PE=1 SV=1

MISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRK
NIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAE
VEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR

Проделайте следующие шаги, чтобы выбрать правильный вариант теста:

1. Используя MPI Bioinformatics Toolkit сделайте множественное выравнивание трех белков с помощью алгоритма MAFFT -> скачайте результат

2. Далее в MPI Bioinformatics Toolkit с помощью инструмента Ali2D сделайте выравнивание предсказанных вторичных структур -> скачайте результат

3. С помощью сервера 2dSS визуализируйте выровненные последовательности и соответствующие вторичные структуры трех белков (как input используйте результирующие файлы MAFFT и Ali2D) -> сохраните полученную картинку.

Выберите правильные варианты (Правильные ответы подчеркнуты):

1. Сайт связывания NADP+ [117-124 aa] GGSSVYKE (human seq) - у всех трех белков имеет вторичную структуру в виде α-спирали.
2. Сайт связывания NADP+ [16-22 aa] GIGKNGD (human seq) - у обоих белков человека и кабана имеет одинаковую последовательность и вторичную структуру в виде α-спирали.
3. Сайт связывания NADP+ [16-22 aa] GIGKNGD (human seq) - у всех трех белков имеет одинаковую последовательность и вторичную структуру.
4. Сайт связывания NADP+ [16-22 aa] GIGKNGD (human seq) - петля E.coli содержит β-лист.
5. Сайт связывания NADP+ [117-124 aa] GGSSVYKE (human seq) - у всех трех белков имеет одинаковую последовательность и вторичную структуру.
6. Сайт связывания NADP+ [16-22 aa] GIGKNGD (human seq) - у обоих белков человека и кабана имеет одинаковую последовательность и представлен петлей.
7. Сайт связывания NADP+ [117-124 aa] GGSSVYKE (human seq) - у всех трех белков имеет вторичную структуру в виде петли, но аминокислотная последовательность E.coli отличается (GGRVYEQ).

2) В программе PyMOL проделайте следующие шаги:

1. визуализируйте DHFR бактерии - PDB ID 1DRE
2. уберите воду из модели
3. покрасьте белок в белый цвет
4. сделайте поверхность белка, прозрачность = 40%
5. покрасьте лиганд METHOTREXATE (MTX) в красный цвет
6. покрасьте лиганд NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE (NAD) в синий цвет
7. обозначьте область 5Å вокруг каждого лиганда и подпишите аминокислотные остатки
8. покрасьте выделенный binding pocket - для MTX в цвет salmon, для NAD - в lightblue
9. найдите полярные контакты между лигандами и белком
10. сделайте мутагенез - Ile51 замените на His51

11. покрасьте His51 в зеленый цвет и представьте в виде dots

Пришлите фото полученной структуры белкового комплекса и визуализированного сиквенса в PyMOL на проверку.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ №2

N п/п	Этап занятия	Форма контроля усвоения	Примерное время
	Вводная часть - Организационный момент - Цели занятия	–	5 минут
	Контроль знаний прошлого занятия и усвоения лекционного материала, разбор вопросов	Устный опрос	15 минут
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Принципы классической молекулярной динамики.	25 минут
	Перерыв		**5 минут**
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Понятия силового поля, ансамбля, термостаты и баростаты, периодичные условия.	45 минут
	Перерыв		**10 минут**
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Методы молекулярной динамики	45 минут
	Перерыв		**5 минут**
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Основной алгоритм проведения моделирования белков в молекулярной динамике в программе Gromacs	Лабораторная работа.
	Перерыв		**60 минут**
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Практическая работа.	180 минут

СОДЕРЖАТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ 2

1. Практика в программе Gromacs: проведение этапов моделирования и анализ траекторий.

6. ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Задание 1

Молекулярная динамика выполняется путем интегрирования определенного количества структурных обновлений с использованием метода Верле. Предполагая, что для возникновения моделируемого явления требуется 200 fs и что используется временной интервал в 0,1 fs, сколько временных интервалов необходимо?

1. 10
2. 2000
3. 200
4. 4000

Задание 2

Моделирование биомолекул с использованием методов молекулярной динамики или по методу Монте-Карло в настоящее время является одной из основных областей вычислительной науки. Какое из следующих утверждений верно?

1) Белки моделируются с использованием специальных силовых полей, описывающих элементы вторичной структуры, такие как α-спирали, вместо атомов, составляющих белок.
2) Используя самые современные вычислительные мощности, можно проводить моделирование систем, содержащих многие миллионы атомов.
3) Моделирование белков сложнее, чем моделирование более простых систем, таких как жидкая вода, поскольку обычный метод молекулярной динамики не может быть применен к биомолекулам.
4) Можно моделировать только небольшие белки, такие как крамбин, учитывая огромное количество растворителей и белковых атомов, присутствующих в более крупных белках.

Задание 3

Подходы молекулярной динамики используют классическую механику в форме решения уравнения движения Ньютона, поскольку:

1) Учитывая относительно высокую массу атомов, часто приемлемым приближением является пренебрежение квантово-механическими эффектами при описании их движения.
2) Квантовая механика применима только к легким частицам, таким как электроны.
3) Частоты колебаний белков настолько невероятно малы, что было бы опасно пытаться их квантово-механически описать.
4) Ученые пока не разработали никаких методов, способных описать движение атомов с помощью квантовой механики.

Задание 4

Метод Монте-Карло - это альтернативный подход к молекулярной динамике для моделирования поведения больших скоплений атомов. Какое из следующих утверждений верно?

1) Методы Монте-Карло всегда предпочтительнее, поскольку случайность используемых перемещений необходима для моделирования сложного движения атомов.
2) Методы Монте-Карло имеют то преимущество, что они обычно не требуют расчетов градиента энергии относительно положения атомов.
3) В своем первоначальном виде алгоритм Монте-Карло требовал использования колеса рулетки для генерации случайных ходов.

4) Переход к структуре с более высокой потенциальной энергией невозможен при моделировании методом Монте-Карло, поэтому при этом, как правило, отбираются только области с низкой энергией.

Задание 5

Проведено моделирование молекулярной динамики для системы, содержащей воду в качестве растворителя и белок, который имеет на своей поверхности, среди других групп, остаток изолейцина (содержащий боковую цепь а -$CH(CH_3)CH_2CH_3$) и остаток лизина (содержащий боковую цепь а -$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_3$+). Какое из следующих утверждений верно?

1) Образование водородных связей приведет к частым наблюдениям коротких N-O расстояний между атомом N в дистальной группе NH3+ и атомами O молекул воды.
2) Заряженная группа остатка лизина будет стремиться "зарыться" под поверхность белка, чтобы избежать контакта с молекулами воды.
3) Молекулы воды будут стремиться сильнее приблизиться к остаткам изолейцина из-за гидрофобных взаимодействий.
4) Изолейцин - это аминокислота, а аминокислоты растворимы в воде, поэтому моделирование покажет, что этот остаток отделяется от белка и переходит в растворитель.

Задание 6

Какая из следующих проблем **наиболее сильно потребовала** бы использования условий *NPT* при моделировании в молекулярной динамике (или Монте-Карло)?

1) Моделирование гибкости области петли в белке, сольватированном в большом контейнере молекул воды.
2) Моделирование функции радиального распределения жидкой воды.
3) Моделирование структуры предпочтительных структур жидкого кристалла.
4) Определение предпочтительной плотности сверхкритической жидкости (состояние вещества, при котором исчезает различие между жидкой и газовой фазой: любое вещество, находящееся при температуре и давлении выше критической точки, является сверхкритической жидкостью) в зависимости от температуры.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ №3

N п/п	Этап занятия	Форма контроля усвоения	Примерное время
	Вводная часть - Организационный момент - Цели занятия	–	5 минут
	Контроль уровня знаний и усвоения лекционного материала, разбор вопросов	Устный опрос	15 минут
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Самостоятельная работа	25 минут
	Перерыв		**5 минут**
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических	Самостоятельная работа	45 минут

	навыков по теме		
	Перерыв		**10 минут**
	Основная часть занятия Формирование новых знаний и практических навыков по теме	Самостоятельная работа	90 минут
	Перерыв		**60 минут**
	Заключительная часть - Подведение итогов - Зачет по самостоятельной работе	Самостоятельная работа	180 минут

СОДЕРЖАТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ 3

1. Анализ мутантной формы белка в молекулярной динамике и сравнение функционально-структурных свойств с белком дикого типа

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Задание 1

1. возьмите модель белка RBD (файл RBD.pdb)
2. качество исходной модели проверьте с помощью сервера PRAS https://www.protein-science.com/
3. проведите молекулярную динамику исходного комплекса дикого типа (Wt) в Gromacs на 50 нс (сделали на практической работе занятия)
4. проанализируйте поведение дикого типа белка при симуляции (RMSD, RMSF, количество водородных связей, количество связей, образованных аминокислотой в позиции интереса, и т.д.)
5. на основе исходной модели белка сделайте мутантную форму - замените аминокислоты на НЕСКОЛЬКО ОДНОВРЕМЕННО мутантных с помощью сервера MutationExplorer (https://mutationexplorer.vda-group.de/mutation_explorer/submit) (можно основываться на таблицу ниже со штаммами – сгенерировать определенный штамм или «смесь» штаммов):

Таблица штаммов SARS-CoV-2 с соответсвующими мутация в RBD S-protein.

Variants	Position	W/M	Side-chain polarity
Alpha	484	E	AP
		K	BP
	494	S	P
		P	NP
	501	N	P
		Y	P
Beta	417	K	BP
		N	P
	484	E	AP
		K	BP

Variants	Position	W/M	Side-chain polarity
	501	N	P
		Y	P
Gamma	417	K	BP
		T	P
	484	E	AP
		K	BP
	501	N	P
		Y	P
Delta	417	K	BP
		N	P
	452	L	NP
		R	BP
	478	T	P
		K	BP
Lambda	452	L	NP
		Q	P
	490	F	NP
		S	P
Omicron	417	K	BP
		N	P
	440	N	P
		K	BP
	446	G	NP
		S	P
	477	S	P
		N	P
	478	T	P
		K	BP
	484	E	AP
		A	NP
	493	Q	P
		R	BP
	496	G	NP
		S	P
	498	Q	P
		R	BP
	501	N	P
		Y	P
	505	Y	P

Variants	Position	W/M	Side-chain polarity
		H	BP
		R	BP

Таблица штаммов SARS-CoV-2 с соответсвующими мутация в RBD S-protein.
Abbreviations: Ap, acidic polar; Bp, basic polar; M, mutant; N, neutral; Np, nonpolar; P, polar; W, wild type (PDB code: 6M0J)

6. проведите молекулярную динамику мутантного белка в Gromacs на 50 нс
7. сравните результаты молекулярной динамики белков дикого типа и мутанта, сделайте выводы о стабильности и поведении белков
8. оцените разницу в связях, вторичных структурах, RMSF, RMSD, Rgyr, SASA, H-bonds, PCA, и т.д.

Задание 2
Изучите влияние мутаций в RBD S-protein на связываемость с рецептором ACE2
1. Сделайте комплекс ACE2 с мутантным RBD на основе исходной модели PDB ID 6M0J (сделайте мутагенез в PyMol)
2. Предскажите и визуализируйте интерфейс взаимодействия между двумя белками с помощью сервера PDBsum - https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html - проанализируйте интерфейс взаимодействия в белке дикого типа и мутантной формы (вкладка Prot-prot) как изменились/перераспределились связи между в интерфейсе взаимодействия комплекса
3. помощью сервера DDMut-PPI (https://biosig.lab.uq.edu.au/ddmut_ppi/mm_prediction), проанализируйте как меняется аффинность ACE2 к RBD при внесении ваших мутаций, как меняются связи (сделать на основе PDB ID 6m0j)
Сделайте отчет и презентацию по всем полученным результатам.

ЛИТЕРАТУРА, РЕКОМЕНДУЕМАЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ
ОСНОВНАЯ
1. Финкельштейн, А.В.; Птицын, О.Б. Физика белка. Курс лекций
Издательство: М.: Книжный дом Университет; Издание 3-е, испр. и доп. 2005 г. ISBN: 5-98227-065-2
2. Медведев, Н. Н. Молекулярная динамика. Получение моделей : учебное пособие для вузов / Н. Н. Медведев. — Москва : Издательство Юрайт, 2024 ; Новосибирск : ИПЦ НГУ. — 168 с. — (Высшее образование). — ISBN 978-5-534-18821-9

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ
1. Руководство по использованию программы Gromacs https://manual.gromacs.org/

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И. П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ

УТВЕРЖДЕНО
на заседании кафедры
общей и биоорганической химии
«07» июня 2023 г., протокол № 5
заведующий кафедрой
д. х. н., доцент К. Н. Семёнов

Методические указания для преподавателя

по **Избранным главам биофизики**
(наименование дисциплины)

По теме **Молекулярная биофизика**
(наименование темы занятия)

для специальности/ **06.04.01 Биология**

(наименование и код специальности)

Факультет/ **Фундаментальной медицины**

(наименование факультета)

Кафедра **Общей и биоорганической химии**
(наименование кафедры)

ЦЕЛИ

Магистрант после освоения темы **должен знать**:

- Основы молекулярного моделирования: принципы организации биополимеров

- 3D-структуры белка: методы определения, предсказания, визуализации, базы данных понятия водородного и гидроксильного показателей;
- Принципы моделирования в молекулярной динамике

Магистрант после освоения темы **должен уметь**:

– Анализировать пространственную организацию белков

– Применять основные базы данных белков и программы для анализа первичной, вторичной и третичной структуры

– Применять методы предсказания пространственной структуры белков

– Визуализировать пространственные модели белков в программе PyMol, редактировать модели

– Проводить молекулярную динамику белков в программе Gromacs

– Анализировать результаты молекулярной динамики

ЗАНЯТИЕ №1
Растворы электролитов и неэлектролитов. Количественные и качественные характеристики растворов. Коллигативные свойства растворов.

СОДЕРЖАТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ 1

1. Анализ первичной последовательности белов, множественное выравнивание.
2. Предсказание вторичной структуры белков.
3. Использование базы данных белков по классификации, поиску мотивов, третичной структуры
4. Предсказание третичной структуры белков по гомологии.
5. Визуализация белков в программе PyMol.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Даны три последовательности белка DHFR в формате .fasta разных организмов: человека, кабана, бактерии.

>sp|P00374|DYR_HUMAN Dihydrofolate reductase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DHFR PE=1 SV=2

MVGSLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEFRYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGKKT
WFSIPEKNRPLKGRINLVLSRELKEPPQGAHFLSRSLDDALKLTEQPELANKVDMVWIV
GGSSVYKEAMNHPGHLKLFVTRIMQDFESDTFFPEIDLEKYKLLPEYPGVLSDVQEEKGI
KYKFEVYEKND

>sp|P00377|DYR_PIG Dihydrofolate reductase OS=Sus scrofa OX=9823 GN=DHFR PE=1 SV=1

VRPLNCIVAVSQNMGIGKNGDLPWPPLRNEYKYFQRMTTTSSVEGKQNLVIMGRKTWF
SIPEKNRPLKDRINIVLSRELKEPPQGAHFLAKSLDDALKLTEQPELKDKVDMVWIVGGS
SVYKEAMNKPGHIRLFVTRIMKEFESDTFFPEIDLEKYKLLSECSGVPSDVQEEKGIKYKF
EVYEKNN

>sp|P0ABQ4|DYR_ECOLI Dihydrofolate reductase OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=folA PE=1 SV=1

MISLIAALAVDRVIGMENAMPWNLPADLAWFKRNTLNKPVIMGRHTWESIGRPLPGRK
NIILSSQPGTDDRVTWVKSVDEAIAACGDVPEIMVIGGGRVYEQFLPKAQKLYLTHIDAE
VEGDTHFPDYEPDDWESVFSEFHDADAQNSHSYCFEILERR

Проделайте следующие шаги, чтобы выбрать правильный вариант теста:

1. Используя MPI Bioinformatics Toolkit сделайте множественное выравнивание трех белков с помощью алгоритма MAFFT - скачайте результат

2. Далее в MPI Bioinformatics Toolkit с помощью инструмента Ali2D сделайте выравнивание предсказанных вторичных структур - скачайте результат

3. С помощью сервера 2dSS визуализируйте выровненные последовательности и соответствующие вторичные структуры трех белков (как input используйте результирующие файлы MAFFT и Ali2D) - сохраните полученную картинку.

Выберите правильные варианты:

1) Сайт связывания NADP+ [117-124 aa] GGSSVYKE (human seq) - у всех трех белков имеет вторичную структуру в виде α-спирали.
2) Сайт связывания NADP+ [16-22 aa] GIGKNGD (human seq) - у обоих белков человека и кабана имеет одинаковую последовательность и вторичную структуру в виде α-спирали.
3) Сайт связывания NADP+ [16-22 aa] GIGKNGD (human seq) - у всех трех белков имеет одинаковую последовательность и вторичную структуру.
4) Сайт связывания NADP+ [16-22 aa] GIGKNGD (human seq) - петля E.coli содержит β-лист.
5) Сайт связывания NADP+ [117-124 aa] GGSSVYKE (human seq) - у всех трех белков имеет одинаковую последовательность и вторичную структуру.
6) Сайт связывания NADP+ [16-22 aa] GIGKNGD (human seq) - у обоих белков человека и кабана имеет одинаковую последовательность и представлен петлей.
7) Сайт связывания NADP+ [117-124 aa] GGSSVYKE (human seq) - у всех трех белков имеет вторичную структуру в виде петли, но аминокислотная последовательность E.coli отличается (GGRVYEQ).

2) В программе PyMOL проделайте следующие шаги:

1) визуализируйте DHFR бактерии - PDB ID 1DRE
2) уберите воду из модели
3) покрасьте белок в белый цвет
4) сделайте поверхность белка, прозрачность = 40%
5) покрасьте лиганд METHOTREXATE (MTX) в красный цвет
6) покрасьте лиганд NICOTINAMIDE ADENINE DINUCLEOTIDE PHOSPHATE (NAD) в синий цвет
7) обозначьте область 5Å вокруг каждого лиганда и подпишите аминокислотные остатки
8) покрасьте выделенный binding pocket - для MTX в цвет salmon, для NAD - в lightblue

9) найдите полярные контакты между лигандами и белком
10) сделайте мутагенез - Ile51 замените на His51
11) покрасьте His51 в зеленый цвет и представьте в виде dots

Пришлите фото полученной структуры белкового комплекса и визуализированного сиквенса в PyMOL на проверку.

ЗАНЯТИЕ №2

Основы молекулярного моделирования. Молекулярное моделирование белков в программе Gromacs

СОДЕРЖАТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ 2

1. Практика в программе Gromacs: проведение этапов моделирования и анализ траекторий.

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Задание 1

Молекулярная динамика выполняется путем интегрирования определенного количества структурных обновлений с использованием метода Верле. Предполагая, что для возникновения моделируемого явления требуется 200 fs и что используется временной интервал в 0,1 fs, сколько временных интервалов необходимо?

12) 10
13) 2000
14) 200
15) 4000

Задание 2

Моделирование биомолекул с использованием методов молекулярной динамики или по методу Монте-Карло в настоящее время является одной из основных областей вычислительной науки. Какое из следующих утверждений верно?

2. Белки моделируются с использованием специальных силовых полей, описывающих элементы вторичной структуры, такие как α-спирали, вместо атомов, составляющих белок.
3. Используя самые современные вычислительные мощности, можно проводить моделирование систем, содержащих многие миллионы атомов.
4. Моделирование белков сложнее, чем моделирование более простых систем, таких как жидкая вода, поскольку обычный метод молекулярной динамики не может быть применен к биомолекулам.
5. Можно моделировать только небольшие белки, такие как крамбин, учитывая огромное количество растворителей и белковых атомов, присутствующих в более крупных белках.

Задание 3

Подходы молекулярной динамики используют классическую механику в форме решения уравнения движения Ньютона, поскольку:

1) Учитывая относительно высокую массу атомов, часто приемлемым приближением является пренебрежение квантово-механическими эффектами при описании их движения.

2) Квантовая механика применима только к легким частицам, таким как электроны.
3) Частоты колебаний белков настолько невероятно малы, что было бы опасно пытаться их квантово-механически описать.
4) Ученые пока не разработали никаких методов, способных описать движение атомов с помощью квантовой механики.

Задание 4

Метод Монте-Карло - это альтернативный подход к молекулярной динамике для моделирования поведения больших скоплений атомов. Какое из следующих утверждений верно?

1) Методы Монте-Карло всегда предпочтительнее, поскольку случайность используемых перемещений необходима для моделирования сложного движения атомов.
2) Методы Монте-Карло имеют то преимущество, что они обычно не требуют расчетов градиента энергии относительно положения атомов.
3) В своем первоначальном виде алгоритм Монте-Карло требовал использования колеса рулетки для генерации случайных ходов.
4) Переход к структуре с более высокой потенциальной энергией невозможен при моделировании методом Монте-Карло, поэтому при этом, как правило, отбираются только области с низкой энергией.

Задание 5

Проведено моделирование молекулярной динамики для системы, содержащей воду в качестве растворителя и белок, который имеет на своей поверхности, среди других групп, остаток изолейцина (содержащий боковую цепь а -$CH(CH_3)CH_2CH_3$) и остаток лизина (содержащий боковую цепь а -$CH_2CH_2CH_2CH_2NH_3$+). Какое из следующих утверждений верно?

1) Образование водородных связей приведет к частым наблюдениям коротких N-O расстояний между атомом N в дистальной группе NH3+ и атомами O молекул воды.
2) Заряженная группа остатка лизина будет стремиться "зарыться" под поверхность белка, чтобы избежать контакта с молекулами воды.
3) Молекулы воды будут стремиться сильнее приблизиться к остаткам изолейцина из-за гидрофобных взаимодействий.
4) Изолейцин - это аминокислота, а аминокислоты растворимы в воде, поэтому моделирование покажет, что этот остаток отделяется от белка и переходит в растворитель.

Задание 6

Какая из следующих проблем **наиболее сильно потребовала** бы использования условий *NPT* при моделировании в молекулярной динамике (или Монте-Карло)?

1) Моделирование гибкости области петли в белке, сольватированном в большом контейнере молекул воды.
2) Моделирование функции радиального распределения жидкой воды.
3) Моделирование структуры предпочтительных структур жидкого кристалла.
4) Определение предпочтительной плотности сверхкритической жидкости (состояние вещества, при котором исчезает различие между жидкой и газовой фазой: любое вещество, находящееся при температуре и давлении выше критической точки, является сверхкритической жидкостью) в зависимости от температуры.

СОДЕРЖАТЕЛЬНАЯ ЧАСТЬ ПРАКТИЧЕСКОГО ЗАНЯТИЯ 3

1. Анализ мутантной формы белка в молекулярной динамике и сравнение функционально-структурных свойств с белком дикого типа

ЗАДАНИЯ ДЛЯ САМОПОДГОТОВКИ

Задание 1

1. возьмите модель белка RBD (файл .pdb)
2. качество исходной модели проверьте с помощью сервера PRAS https://www.protein-science.com/
3. проведите молекулярную динамику исходного комплекса дикого типа (Wt) в Gromacs на 50 нс (сделали на семинаре)
4. проанализируйте поведение дикого типа белка при симуляции (RMSD, RMSF, количество водородных связей, количество связей, образованных аминокислотой в позиции интереса, и т.д.)
5. на основе исходной модели белка сделайте мутантную форму - замените аминокислоты на НЕСКОЛЬКО ОДНОВРЕМЕННО мутантных с помощью сервера MutationExplorer (https://mutationexplorer.vda-group.de/mutation_explorer/submit) (можно основываться на таблицу ниже со штаммами – сгенерировать определенный штамм или «смесь» штаммов):

Таблица штаммов SARS-CoV-2 с соответсвующими мутация в RBD S-protein.

Variants	Position	W/M	Side-chain polarity
Alpha	484	E	AP
		K	BP
	494	S	P
		P	NP
	501	N	P
		Y	P
Beta	417	K	BP
		N	P
	484	E	AP
		K	BP
	501	N	P
		Y	P
Gamma	417	K	BP
		T	P
	484	E	AP
		K	BP
	501	N	P
		Y	P
Delta	417	K	BP

Variants	Position	W/M	Side-chain polarity
		N	P
	452	L	NP
		R	BP
	478	T	P
		K	BP
Lambda	452	L	NP
		Q	P
	490	F	NP
		S	P
Omicron	417	K	BP
		N	P
	440	N	P
		K	BP
	446	G	NP
		S	P
	477	S	P
		N	P
	478	T	P
		K	BP
	484	E	AP
		A	NP
	493	Q	P
		R	BP
	496	G	NP
		S	P
	498	Q	P
		R	BP
	501	N	P
		Y	P
	505	Y	P
		H	BP
		R	BP

Таблица штаммов SARS-CoV-2 с соответсвующими мутация в RBD S-protein. Abbreviations: Ap, acidic polar; Bp, basic polar; M, mutant; N, neutral; Np, nonpolar; P, polar; W, wild type (PDB code: 6M0J)

6. проведите молекулярную динамику мутантного белка в Gromacs на 50 нс
7. сравните результаты молекулярной динамики белков дикого типа и мутанта, сделайте выводы о стабильности и поведении белков

8. оцените разницу в связях, вторичных структурах, RMSF, RMSD, Rgyr, SASA, H-bonds, PCA, и т.д.

Задание 2
Изучите влияние мутаций в RBD S-protein на связываемость с рецептором ACE2
1. Сделайте комплекс ACE2 с мутантным RBD на основе исходной модели PDB ID 6M0J (сделайте мутагенез в PyMol)
2. Предскажите и визуализируйте интерфейс взаимодействия между двумя белками с помощью сервера PDBsum - https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/Generate.html - проанализируйте интерфейс взаимодействия в белке дикого типа и мутантной формы (вкладка Prot-prot) как изменились/перераспределились связи между в интерфейсе взаимодействия комплекса
3. помощью сервера DDMut-PPI (https://biosig.lab.uq.edu.au/ddmut_ppi/mm_prediction), проанализируйте как меняется аффинность ACE2 к RBD при внесении ваших мутаций, как меняются связи (сделать на основе PDB ID 6m0j)

Сделайте отчет и презентацию по всем полученным результатам.