

REŠEVANJE - Analiza hidrofobnih lastnosti

Iskanje podobnih proteinov psihrofila z BLASTp – za tri proteine psihrofilne bakterije, poiščemo podobne proteine v *Haemophilus influenzae*, ki jo nastavimo kot dodaten filter. Poleg tega iščemo v nr bazi. Po iskanju z BLASTp, kopiramo aminokislinska zaporedja izhodiščnega proteina in najdenega proteina mezofilne bakterije v ProtParam, ki nam izračuna GRAVY.

PAR	<i>Desulfotalea psychrophila</i>	GRAVY - DP	<i>Haemophilus influenzae</i>	GRAVY - HI
1.	CTP synthase (Q6AQ78)	-0.301	glutamine hydrolyzing CTP synthase	-0.199
2.	Bifunctional protein GlnU (Q6AMF9)	-0.183	bifunctional UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase GlnU	-0.149
3.	Ribose-phosphate pyrophosphokinase (Q6AJL7)	0.006	ribose-phosphate pyrophosphokinase	0.173

Izračunamo povprečja (po stolpcu) - povprečni vrednosti (za izbrane primere):

$$\text{GRAVY}_{\text{DP}} = -0,159 \quad \text{GRAVY}_{\text{HI}} = -0,583$$

Odgovori na vprašanja:

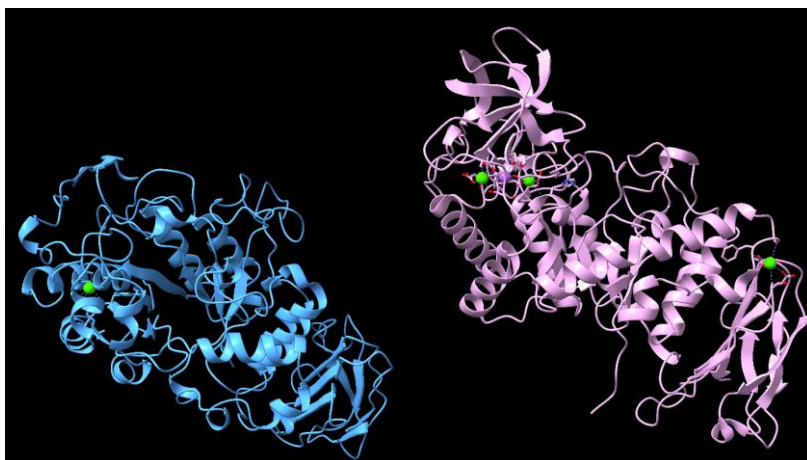
1. Kot je razvidno iz rezultata je $\text{GRAVY}_{\text{DP}} < \text{GRAVY}_{\text{HI}}$. To pomeni, da je v proteinoih psihrofilnih bakterij več hidrofobnih aminokislinskih ostankov.
2. V proteinih termofilnih bakterij je GRAVY višji kot pri mezofilih, kar pomeni da je tam delež hidrofobnih ostankov večji.

REŠEVANJE - Strukturne razlike

V PDB je treba poiskati strukturi alfa-amilaze za oba organizma:

- *geobacillus stearothermophilus* ~ 1HVX
- *Pseudoalteromonas haloplanktis* ~ 1AQH

Oba modela odpremo v ChimeriX in ju primerjamo.



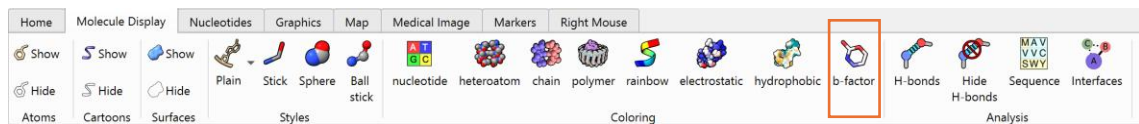
Slika 1- primarjava alfa-amilaze psihrofila in termofila

Odgovori na vprašanja:

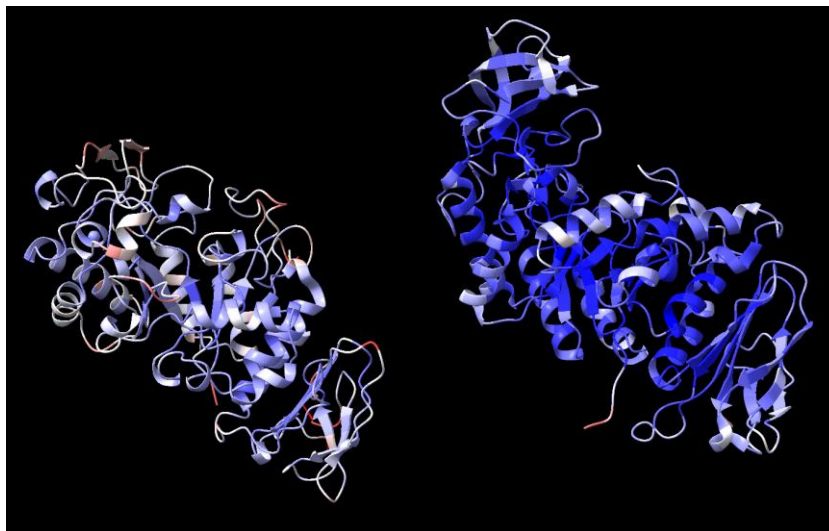
1. Takoj izstopa število koordiniranih ionov, ki jih je v encimu termofila opaznih 4 medtem ko je v termofilu samo 1.
2. Dodatne koordinacija ionov pripomore k stabilizaciji.

Barvanje po B faktorju lahko izvedemo na različne načine:

- Molecule display → b-factor



- Ukazna vrstica:
 - a) color bfactor
 - b) color bfactor palette blue:white:red ali color bfactor palette blue:white:red range 10,40



Slika 2 - na levi alfa-amilaza psihirofila na desni pa termofila

Pri psihirofilu je bistveno več nestabilnih regij (belo-rdeči odtenki – zmeren do visok B faktor) medtem ko je alfa-amilaza v celoti prikazana kot bolj kompaktna in stabilna (več temnomodrih odtenkov – nizek B faktor). To pomeni, da ima protein encim termofila bistveno manj fleksibilnih regij, kar je tudi potrebno, saj visoka temperatura lahko destabilizira molekulo.

REŠEVANJE – Izražanje proteinov

Iskanje kateri protein kodira dani zapis – uporaba BLASTp (iskanje v nr/nt, s filtrom More dissimilar sequences). Program najde zapis s 100 % podobnostjo, kar je izhodiščno zaporedje. Zdaj preko GenBank ali neposredno iz rezultata ugotovimo, za kateri protein gre in v kateri bakteriji ga najdemo (»**Thermus thermophilus isolate KNOUC114 beta-galactosidase gene, complete cds**«)

Informacije o encimu pridobimo na UniProt – napredno iskanje: organism - **Thermus thermophilus** in protein name – **beta galactosidase**. Izberemo dobro anotiran protein ali z ID (vidna v GenBank - O69315).

The screenshot shows the UniProtKB search interface. At the top, the search query is "(organism_id:274) AND (protein_name:"beta galactosidase")". Below the search bar, there is a warning about the unreviewed UniProtKB/TrEMBL database being reduced in size in release 2026_02. The main results section is titled "UniProtKB 6 results" and displays a table with the following columns: Entry, Entry Name, Protein Names, Gene Names, Organism, and Length. The first entry, O69315, is highlighted in orange and corresponds to the protein BGAL_THETH with a length of 645 AA.

Entry	Entry Name	Protein Names	Gene Names	Organism	Length
O69315	BGAL_THETH	Beta-galactosidase[...]		Thermus thermophilus	645 AA
Q0GA06	Q0GA06_THETH	Beta-galactosidase[...]		Thermus thermophilus	645 AA
Q0GA08	Q0GA08_THETH	Beta-galactosidase[...]		Thermus thermophilus	645 AA
ADA7R7TFT4	ADA7R7TFT4_THETH	Beta-galactosidase	TthHB5018_b20940	Thermus thermophilus	575 AA
ABWAD1	ABWAD1_THETH	Beta-galactosidase	b-gal	Thermus thermophilus	574 AA
ADA7R7YJ75	ADA7R7YJ75_THETH	Beta-galactosidase	TthHB5018_b20960	Thermus thermophilus	574 AA

Odgovori na vprašanja:

- Gre za DNA encima beta galaktozidase, kot ekspresijski sistem lahko uporabimo bakterijo Thermus thermophilus, ki jo gojimo v vročem okolju – specifično za ta encim najbolj ugodno pri 70 °C oz. med 65 in 80 °C (različne informacije v literaturi) v primeru da upoštevamo najbolj ugodno temperaturo za bakterijo.

Temperature Dependence¹

Optimum temperature is 70 degrees Celsius. It retains more than 75% of activity after incubation at 85 degrees Celsius and the half-life at 90 degrees Celsius is 1 hour. Thermostable. 1 Publication

- Za funkcionalnost najbolj pomemben Zn²⁺ (vidno v features)
- Inhibiramo ga lahko z dodatkom Cu²⁺ in Fe²⁺, poleg tega pa lahko mutiramo aktivno mesto – E141 ali E312 v A ali pa z znižanjem temperature