



ZBORNÍK PRÍSPEVKOV
3. KONFERENCIE
CENTRA EXCELENTNOSTI

Aplikácia OMICS nástrojov v štúdiu vzniku chorôb a ich
prevencie



Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, Bratislava

30. november 2022

Recenzent

RNDr. Jana Bellová, PhD.

chemjbel@savba.sk

Editor

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

chemsedm@savba.sk

Ing. Mária Kopáčová

chemmari@savba.sk

ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0

Porovnanie modelov glykozidtransglykozyláz vytvorených pomocou programov Modeller a AlphaFold

Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

Chemický ústav SAV, v. v. i., Dúbravská cesta 9, SK-845 38 Bratislava

Úvod

Homológne modelovanie proteínov je výpočtová metóda využívaná na vytvorenie trojdimenzionálneho (3D) modelu proteínu na základe znalosti jeho primárnej štruktúry a experimentálne stanovenej terciárnej štruktúry homológneho proteínu (templátu) [1]. Medzi najčastejšie používaný softvér na homológne modelovanie patrí Modeller [2]. Alternatívu k tomuto prístupu predstavuje napr. AlphaFold [3], ktorý je systémom umelej inteligencie a predikuje 3D štruktúru proteínov z ich aminokyselinovej sekvencie. V tejto práci porovnáme modely glykozidtransglykozyláz vytvorených týmito dvomi softvérmi.

Materiál a metódy

Ako vzorové glykozidtransglykozylázy boli použité dve formy xyloglukánendotransglykozylázy (XET), ktoré sú v databáze UniProtKB [4] uložené pod číslami P93671 a P93672. V tejto práci figurujú enzýmy pod skratkami HvXET3 a HvXET4. Ako templát pre homológne modelovanie bola použitá jediná známa kryštalografická štruktúra XET, 1UN1.pdb [5].

Na vytvorenie homológnych modelov sa použila verzia programov Modeller9v6 [6] a AlphaFold v2 (DeepMind) [3].

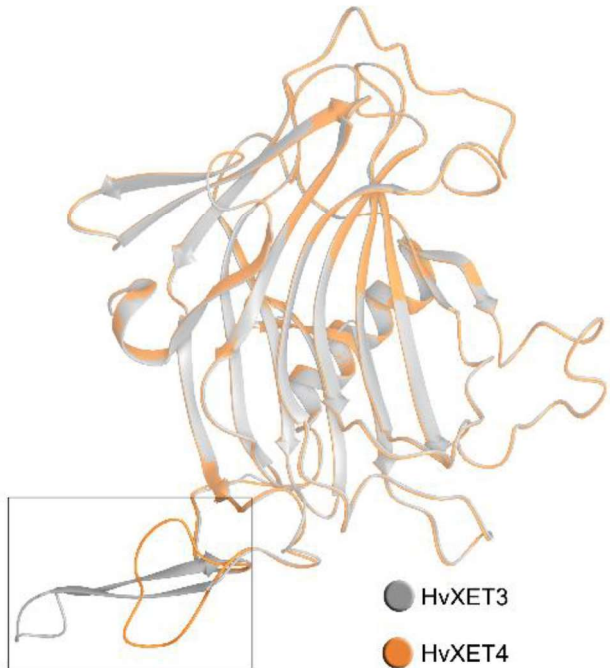
Výsledky a diskusia

Porovnanie primárnych štruktúr HvXET3 a HvXET4 s farebným vyznačením hydrofobicity aminokyselín ukázalo, že najvýraznejší rozdiel medzi týmito izoformami spočíva v rozdielnom počte aminokyselín tvoriacich ich štruktúru (Obr.1), pričom HvXET3 obsahuje viac hydrofóbných aminokyselín.

HvXET3	-	S	F	D	K	E	F	D	V	T	W	G	D	G	R	G	K	I	L	N	N	G	Q	L	L	T	L	G	L	D	K	V	S	G	S	G	F	Q	S	K	39	
HvXET4	G	N	F	F	Q	D	S	E	M	S	W	G	D	G	R	G	K	V	V	D	G	G	R	G	L	D	L	T	L	D	K	T	S	G	S	G	F	Q	S	K	40	
HvXET3	H	E	Y	L	F	G	K	I	D	M	Q	L	K	L	V	P	G	N	S	A	G	T	V	T	A	Y	Y	L	S	S	Q	G	P	T	H	D	E	I	D	F	79	
HvXET4	S	E	Y	L	F	G	K	I	D	M	Q	I	K	L	V	P	G	N	S	A	G	T	V	T	T	F	Y	L	S	S	Q	G	T	A	H	D	E	I	D	F	80	
HvXET3	E	F	L	G	N	V	T	G	E	P	Y	T	L	H	T	N	V	F	T	Q	G	Q	G	Q	R	E	Q	Q	F	R	L	W	F	D	P	T	N	D	F	H	119	
HvXET4	E	F	L	G	N	V	T	G	E	P	Y	T	L	H	T	N	V	F	A	O	G	Q	G	Q	R	E	Q	Q	F	R	L	W	F	D	P	T	K	A	F	H	120	
HvXET3	T	Y	S	I	L	W	N	P	K	H	I	I	F	M	V	D	M	P	I	R	D	F	K	N	L	E	G	K	G	I	A	F	P	K	N	Q	P	M	R	159		
HvXET4	T	Y	S	I	I	W	N	P	Q	H	V	I	F	A	V	D	G	T	A	I	R	D	F	K	N	H	E	A	R	G	V	S	F	P	K	S	Q	P	M	R	160	
HvXET3	L	Y	S	S	L	W	N	A	D	D	W	A	T	Q	G	A	R	V	K	T	D	W	S	H	A	P	F	S	A	S	Y	R	G	F	K	A	D	A	C	V	199	
HvXET4	L	Y	A	S	L	W	N	A	D	D	W	A	T	Q	G	G	R	V	K	T	D	W	S	K	A	P	F	V	A	S	F	R	N	F	N	A	D	A	C	V	200	
HvXET3	V	T	A	G	G	R	P	R	C	G	A	S	M	G	T	E	A	A	P	G	T	G	A	S	G	A	A	G	E	W	Y	N	Q	E	L	D	L	T	L	Q	239	
HvXET4	M	S	G	G	-	A	Q	R	C	P	A	G	T	M	E	A	-	-	-	-	-	-	-	-	S	A	A	G	G	G	S	W	N	Q	E	L	S	G	M	G	Y	233
HvXET3	Q	R	M	R	W	V	Q	S	N	Y	M	I	Y	N	Y	C	T	D	P	K	R	V	A	K	G	V	P	A	E	C	S	M	-	-	-	-	-	-	-	-	271	
HvXET4	R	R	M	R	W	V	Q	R	K	F	M	I	Y	N	Y	C	T	D	P	K	R	V	A	Q	G	V	P	A	E	C	K	L	R	-	-	-	-	-	-	-	-	266

Obr.1: Zarovnanie primárnych štruktúr HvXET3 a HvXET4 s vizualizáciou hydrofobicity jednotlivých aminokyselín. Hydrofobicita aminokyselín klesá od červenej cez ružovú a fialovú po modrú.

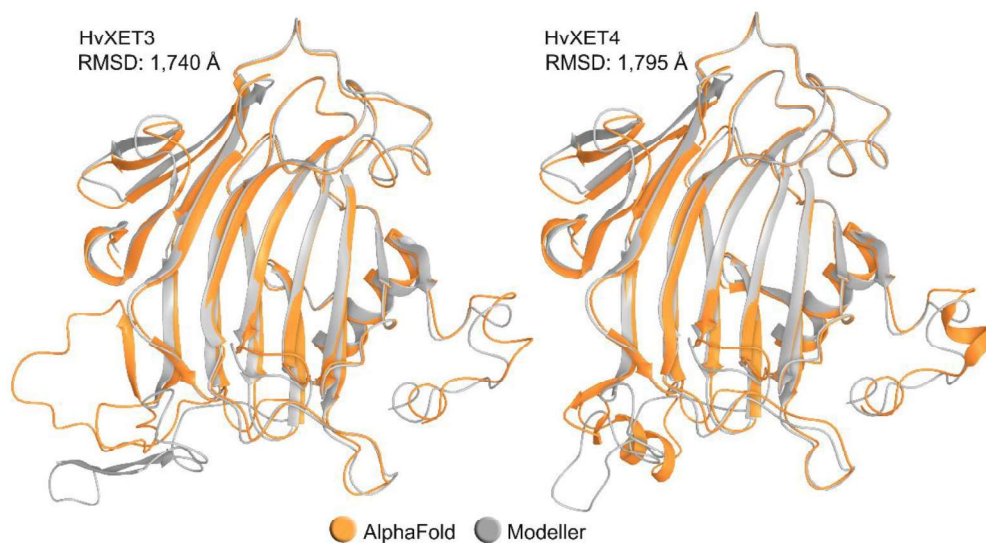
Prekrytie modelov terciálnych štruktúr vytvorených programom Modeller ukázalo, že tento rozdiel by nemal ovplyvňovať štruktúru aktívneho miesta enzýmov, keďže sa nachádza v periférnej oblasti, ktorá je od neho dostatočne vzdialená (Obr.2). Vzhľadom na prítomnosť β -listov v HvXET3 v mieste, kde je HvXET4 skrátaná, by sa mohol do určitej miery prejavíť v stabilite molekúl vystavených rôznym podmienkam.



Obr.2: Prekryv homológnych modelov HvXET3 a HvXET4 vytvorených programom Modeller. V rámciku je vizualizovaná oblasť s najväčšími štruktúrnymi rozdielmi. Aktívne miesto enzýmov je tvorené β -listami, ktorých usporiadanie umožňuje viazanie donorových a akceptorových substrátov.

V ďalšom kroku boli vytvorené modely HvXET3 a HvXET4 programom AlphaFold. RMSD (root means square deviation) medzi týmito modelmi a modelmi vytvorenými pomocou programu Modeller (Obr. 3) bolo približne rovnaké pre HvXET3 (1,740 Å) aj HvXET4 (1,795 Å). Takáto nízka hodnota reprezentuje vysokú podobnosť oboch modelov, pričom vizuálne môžeme sledovať hlavný rozdiel opäť v oblasti s rôznym počtom aminokyselín zvýrazneným na Obr. 2. V prípade HvXET3, kde Modeller naznačil v tejto oblasti určité usporiadanie do β -listov, nechal AlphaFold štruktúru v tejto oblasti neusporiadanú, pokým v prípade HvXET4, v ktorej podľa Modelleru bola táto oblasť neusporiadaná, sa podľa AlphaFoldu objavila α -helikálna štruktúra (Obr. 3). Ďalší skrátaný α -hélix sa objavil v C-terminálvej štruktúre napriek tomu, že v HvXET3 sa takéto usporiadanie neobjavilo.

Experimentálna charakterizácia týchto enzýmov [7] ukázala, že napriek vysokej podobnosti štruktúr (Obr. 1) a biochemických vlastností (identické teplotné a pH optimum) je HvXET3 v porovnaní s HvXET4 menej odolná voči náhlym zmenám teplôt a má o niečo nižšiu pH stabilitu. Toto by mohlo byť zapríčinené práve zamenou neusporiadanej časti štruktúry za α -helikálnu, ktorú navrhol AlphaFold pre HvXET4. Na druhej strane bola HvXET3 o niečo odolnejšia voči vysokým teplotám, čo by sa dalo skôr pripísať jej mierne vyššej hydrofobicite (Obr. 1).



Obr. 3 Prekrytie homológnych modelov HvXET izoformi vytvorených programami AlphaFold a Modeller.

Záver

Program AlphaFold vytvoril v prípade izoformy HvXET4 α -helikálnu štruktúru, ktorá by mohla prispievať k vyššej stabilite tohto enzýmu voči náhlym zmenám teplôt a k jeho vyššej pH stabilite v porovnaní s HvXET3. Tieto výsledky môžu naznačovať vyššiu presnosť modelov vytvorených AlphaFoldom ako Modellerom. Rozdiely v modeloch sa prejavili výlučne v neusporiadaných oblastiach štruktúr, oblasť aktívneho miesta tvorená sendvičovou štruktúrou zloženou z β -listov a ukončená α -hélixom bola daná kryštalografickou štruktúrou templátu, na základe ktorého pracujú algoritmy oboch programov.

Pod'akovanie

Tento príspevok vznikol vďaka podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: Štúdium štruktúrnych zmien komplexných glykokonjugátov v procese dedičných metabolických a civilizačných ochorení, ITMS: 313021Y920, spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- [1] Krieger E., Nabuurs S.B., Vriend G. (2003) *Methods Biochem. Anal.* 44, 509-523.
- [2] Šali A., Blundell T. (1993) *J. Mol. Biol.* 234, 779-815.
- [3] Jumper J., Evans R., Pritzel A. a kol. (2021) *Nature* 596, 583-589.
- [4] The UniProt Consortium (2021) *Nucleic Acids Res.* 49:D1.
- [5] Johansson P., Brumer H., Baumann M.J. a kol. (2004) *Plant Cell* 16, 874-886.
- [6] Šali A., Webb B., Madhusudhan M. S. a kol. (2009) *Modeller*, release 9v6, r6593.
- [7] Stratilová B., Šesták S., Mravec J. a kol. (2020) *Plant J.* 104,752-767.