



**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](mailto:chemjbel@savba.sk)

**Editor**

Mgr. Mária Šedivá, PhD.

[chemsedm@savba.sk](mailto:chemsedm@savba.sk)

Ing. Mária Kopáčová

[chemmari@savba.sk](mailto:chemmari@savba.sk)

**ISBN 978 – 80 – 971665 – 4 - 0**

# **Teoretická stabilita komplexu enzým-substrát a experimentálne stanovenie enzýmovej aktivity**

Barbora Stratilová, Stanislav Kozmon, Kristína Vadinová, Eva Stratilová

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

## **Úvod**

Glykozidtransglykozylázy podrodiny GH 16\_20 [1] katalyzujú štiepenie vysokomolekulárneho sacharidového substrátu, pričom následne prenášajú fragment s pôvodným neredukujúcim koncom (donorový substrát) na iný poly- alebo oligosacharid (akceptorový substrát). Enzýmy sa odlišujú rôznou donorovou a akceptorovou špecificitou, napr. pre enzým TmXET6.3 bola experimentálne stanovená široká akceptorová špecificita pre neutrálne oligosacharidy [2], kým pre štruktúrne najlepšie charakterizovaný enzým z tejto skupiny, PttXET16A [3], bola stanovená striktná špecificita aj pre donor aj pre akceptor. Simulácie stability komplexov enzým-donor-akceptor [4] ukázali, že kým komplexy TmXET6.3 boli stabilné so všetkými akceptormi, stabilita PttXET16A vyžadovala špecifickú 1,3- alebo 1,4-väzbu medzi výlučne glukózovými jednotkami. V tejto práci sme testovali, či takto získané teoretické výsledky zodpovedajú experimentálnym aj v prípade vzácnjej skupiny enzýmov, ktorá operuje aj na akceptoroch s nábojom [5].

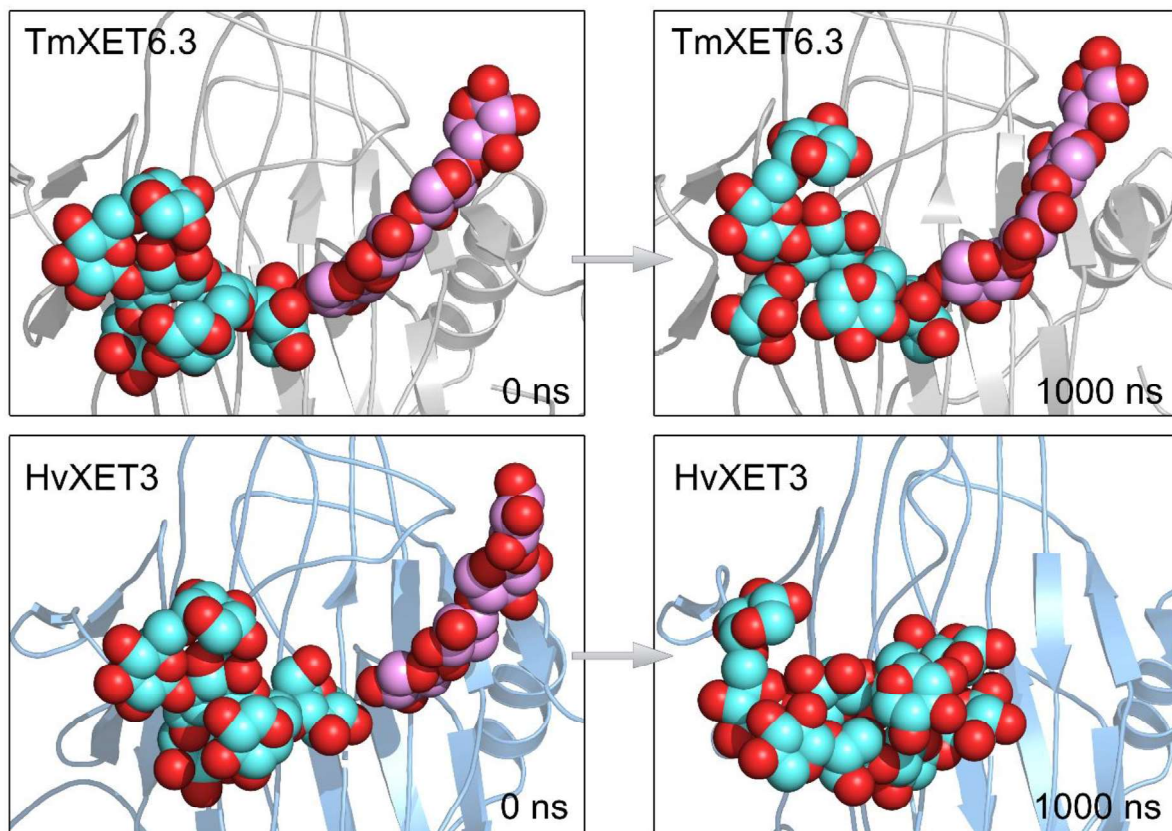
## **Materiál a metódy**

Homológne modely TmXET6.3, jej dvojitého mutanta TmXET6.3\_W75H/Y110R a HvXET3 boli zostrojené na základe koordinátov získaných z kryštalografickej štruktúry PttXET16A (templát) [3]. Homológne modely boli generované v Modeller9v6 [6]. Ako donor slúžil xyloglukán heptaoligosacharid (XG-OS7), ktorý bol dokovaný podľa koordinát pre xyloglukán nonasacharid po odstránení dvoch terminálnych galaktózových rezíduí [7]. Ako akceptor slúžili neutrálne oligosacharidy [4], v tejto práci konkrétne xylotetrasacharid (Xyl-OS4). Jeho štruktúra bola pripravená pomocou GLYCAM-web serveru [8] a upravená pre dokovanie v LigPrep tool [9]. Proteínové štruktúry boli pripravené pre dokovanie v Protein Preparation Wizard [10]. Samotné dokovanie bolo robené v programe Glide [11] a redokované pomocou Induced Fit Docking Protocol [12]. Pre simulácie molekulovou dynamikou sa štruktúry komplexov enzým-donor-akceptor pripravili v *tleap*, ktorý je súčasťou programového balíka Amber16 [13], aplikovali sa parametre silového poľa Amber ff99SB na proteíny a parametre GLYCAM06 pre sacharidy, solvatovalo sa molekulami vody TIP3P [14]. Potom boli štruktúry ekvilibrované a použité pre simulácie molekulovou dynamikou [4].

### Výsledky a diskusia

Glykozidtransglykozylázy TmXET6.3, TmXET6.3\_W75H/Y110R a HvXET3 sa vyznačujú nezvyklo širokou akceptorovou špecificitou, t.j. sú schopné prenášať fragmenty donora na celé spektrum štrukturálne odlišných neutrálnych poly- alebo oligosacharidov [2,5]. HvXET3 sa od TmXET6.3 líši schopnosťou využívať ako akceptor aj nabité oligosacharidy [5]. Dvojbodová mutácia TmXET6.3, TmXET6.3\_W75H/Y110R viedla k získaniu schopnosti katalyzovať prenos na nabité substráty rovnako, ako tomu bolo v prípade skupiny enzýmov štrukturálne podobných s HvXET3 [5].

Pokus o simuláciu pomocou molekulovej dynamiky komplexu enzým-XG-OS7-Xyl-OS4, ktorý sa osvedčil v prípade TmXET3 a PttXET16A [4], viedol napriek experimentálne stanovenej aktivite na tento akceptor k postupnému uvoľňovaniu akceptora z väzobného miesta, pričom v čase ukončenia simulácie sa akceptor nachádzal mimo aktívneho miesta enzýmu (**Obr. 1**). Rovnaký výsledok ukázala simulácia s dvojitým mutantom TmXET6.3\_W75H/Y110R, ktorý je tiež na tento akceptor aktívny.



**Obr.1:** Simulácia molekulovej dynamiky stability komplexov enzým (TmXET6.3, sivá alebo HvXET3, modrá) – donor (XG-OS7, tyrkysová) – akceptor (Xyl-OS4, ružová) na počiatku simulácie (0 ns) a na jej konci (1000 ns).

## **Záver**

Z výsledkov vyplýva, že v prípade enzýmov podrodiny GH 16\_20, ktoré sú schopné využívať okrem širokého spektra neutrálnych oligosacharidov ako akceptory aj nabité poly- a oligosacharidy, nie je medzi experimentálne stanovenými aktivitami a výsledkami štúdií stability komplexov enzým-donor-akceptor zhoda, ako tomu bolo v prípade špecifických enzýmov alebo enzýmov operujúcich na neutrálnych poly- a oligosacharidoch. Predpokladáme, že chyba môže byť v pozmenenej 3D štruktúre aktívneho miesta enzýmov s mutáciami, ktoré im umožňujú viazať v aktívnom mieste aj substráty s nábojom, v porovnaní s použitým templátom a/alebo s tým súvisiacim dokovaním. V dôsledku tohto môžu byť potom východzie modely enzým-donor-akceptor pre túto skupinu enzýmov chybné. Preto považujeme za nutné uskutočniť kryštalografické štúdie aj enzýmov podrodiny GH 16\_20, ktoré vykazujú schopnosť transferu na nabité substráty.

## **PodĎakovanie**

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] Viborg A.H., Terrapon N., Lombard V. a kol. (2019) *J. Biol. Chem.* 294, p. 15973.
- [2] Stratilová B., Firáková Z., Klaudivy J. a kol. (2019) *Plant Mol. Biol.* 100, p. 181.
- [3] Johansson, P.; Brumer, H.; Baumann, M.J. a kol. (2004) *Plant Cell* 16, p. 874.
- [4] Stratilová B., Stratilová E., Hrmova M., Kozmon S. (2022) *Int. J. Mol. Sci.* 23, 11838.
- [5] Stratilová B., Šesták S., Mravec J. a kol. (2020) *Plant J.* 104, p. 752.
- [6] Šali A., Blundell T. (1993) *J. Mol. Biol.* 234, p. 779.
- [7] Mark P., Baumann M.J., Eklöf J.M. a kol. (2009) *Proteins* 75, p. 820.
- [8] <http://legacy.glycam.org> (accessed on 17 July 2022)
- [9] Schrödinger Release 2015-2: LigPrep, Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.
- [10] Schrödinger Release 2015-2: Protein Preparation Wizard, Epik; Schrödinger LLC: New York, NY, USA, 2015.
- [11] Friesner R.A., Murphy R.B., Repasky M.P. a kol. (2006) *J. Med. Chem.* 49, p. 6177.
- [12] Sherman W., Day T., Jacobson M.P. a kol. (2006) *J. Med. Chem.* 49, p. 534.
- [13] Case D.A., Betz R.M., Cerutti D.S. et al. Amber 16, University of California: San Francisco, CA, USA, 2016.
- [14] Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D. a kol. (1983) *J. Chem. Phys.* 79, p. 926.