

Практикум 7. ColabFold

Задание 1. Proteases

Катепсин К (CatK) – протеаза, относящаяся к лизосомальным цистеиновым протеазам. Активный центр представляет собой V-образную щель из двух бета-листов, включающую в себя каталитическую триаду Cys-Asn-His. CatK синтезируется в теле человека в остеокластах, контролирующим количество костной ткани посредством разрушения коллагена и других матричных белков катепсином К, что делает фермент важной мишенью для лечения остеопороза [1].

CatK – белок длиной в 329 аминокислот, включающих в себя 15 аминокислот N-концевой сигнальной последовательности, пропептид длиной в 99 аминокислот и каталитический фрагмент (215 аминокислот). Сигнальный пептид, вместе с пропептидом, блокируют активность фермента до его полного созревания, после чего отрезаются (по аналогии с папаином) [2]. Таким образом, каталитически активный CatK представляет из себя белок из 215 аминокислот с V-образной щелью.

Попробуем предсказать структуру CatK с субстратом (CRLAKAAF) при помощи сервиса AlphaFold2-multimer. Сначала я подала программе на вход полную последовательность CatK с сигнальным пептидом и пропептидом. При таком предсказании структуры фермент-субстратного комплекса, субстрат располагался в районе пропептида далеко от активного центра фермента (рис. 1). При этом сама форма субстрата абсолютно неправильная. Если же на вход подать каталитически активный CatK (без сигнального пептида и пропептида) – положение субстрата предсказывается каталитически верно, в V-образной щели вблизи каталитической триады (рис. 2). Для подтверждения «правильности» положения субстрата я сравнила полученную структуру со структурой CatK с другим субстратом, полученной методом рентгено-структурного анализа (PDB ID: 2FTD). После выравнивания структур видно, что предсказанное положение субстрата действительно находится в V-образной щели (рис. 3).

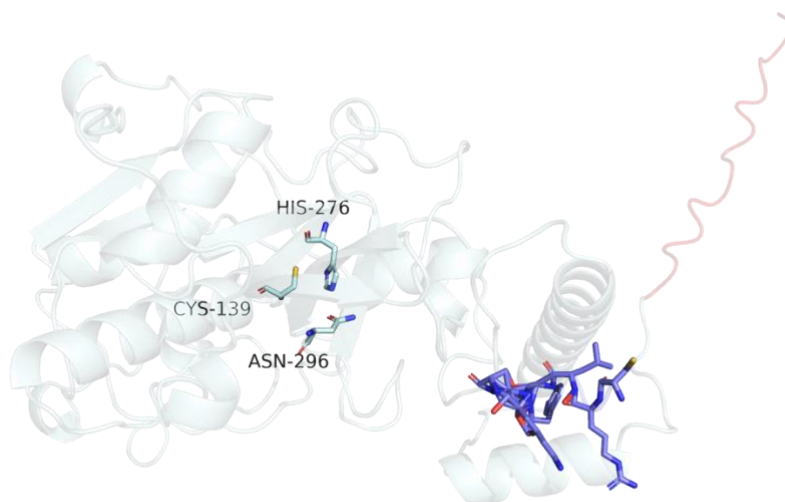


Рис. 1 Предсказание структуры комплекса фермент-субстрат при незрелой форме фермента. Синим цветом выделен субстрат, расположенный в районе пропептида. Красным цветом выделен N-концевой сигнальный пептид

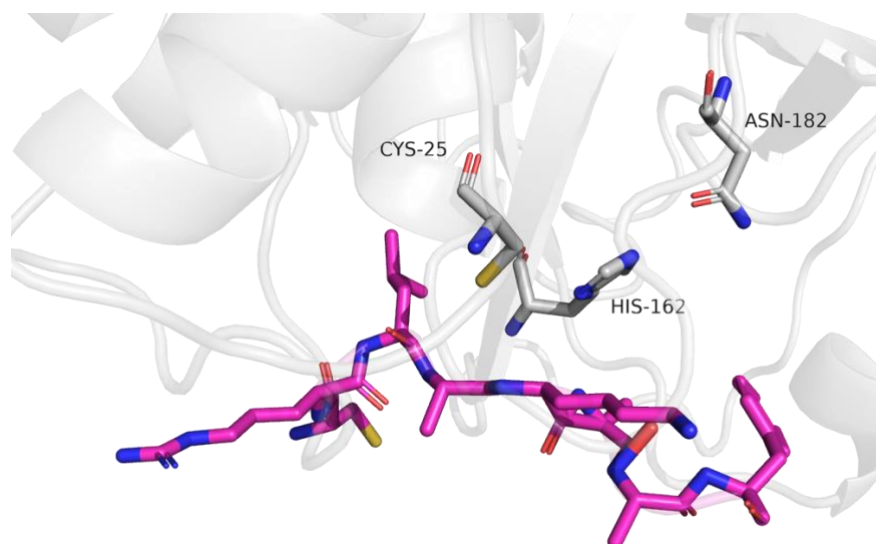


Рис. 2 Предсказание структуры комплекса фермент-субстрат. В случае правильного зрелого *SatK* субстрат (розовый) располагается вблизи активного центра (аминокислоты каталитической триады подписаны)

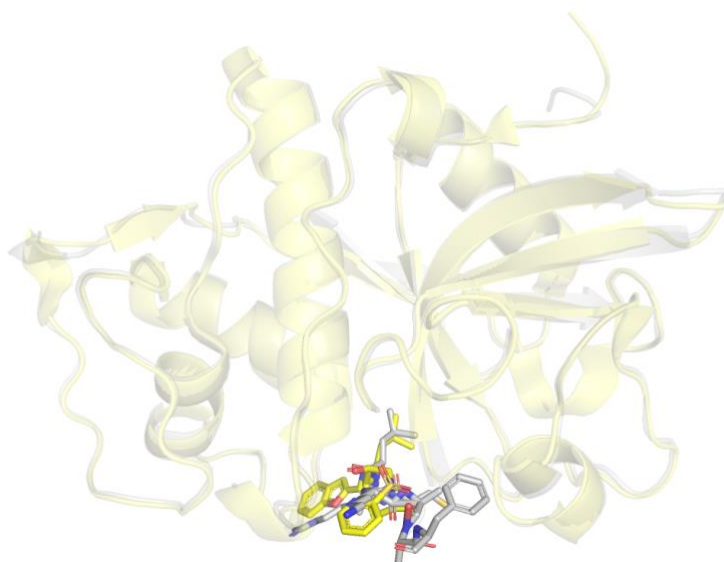


Рис. 3 Сравнение предсказанной структуры с комплексом, расшифрованным методом PCA. Структура 2FTD – желтый, предсказанная структура – серый. В обоих случаях субстраты расположены в активном центре

Таким образом, возможности AlphaFold позволяют предсказывать релевантный фермент-субстратный комплекс при правильной подаче входной последовательности. Важно учитывать, что многие белки претерпевают различные изменения в ходе их созревания. AlphaFold можно использовать для предсказания комплексов протеаз с субстратами, но в случае, если посттрансляционные модификации фермента не до конца изучены, предсказанию доверять нельзя. В качестве контроля предсказания можно использовать уже разрешенные структуры фермента с субстратами (как я делала тут). Также для новых ферментов имеет смысл предсказать структуру с субстратом, который точно не связывается ферментом, чтобы подтвердить универсальность и специфичность полученного предсказания.

PyMol-сессия: https://kodomo.fbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr7/pr7_Burmistrova.pse

Задание 4. Deletion

Попробуем посмотреть эффективность предсказания вторичной структуры AlphaFold после удаления N-концевого фрагмента белка.

Выданный мне белок – D-допахром-декарбоксилаза (таутомераза), лиаза, осуществляющая расщепление D-допахрома. Эта декарбоксилаза является гомологом фактора, ингибирующего миграцию макрофагов и являющегося важным цитокином для активации Т-лимфоцитов [3].

На N-конце таутомеразы расположен высоко консервативный остаток пролина, который важен для каталитического механизма фермента [3]. Посмотрим, что произойдет при удалении 8 N-концевых аминокислот на основе предсказания вторичной структуры с помощью AlphaFold.

Полноценный белок представляет из себя структуру из 4 бета-листов, которые попарно параллельны друг другу и соединены через петли и 2 альфа-спирали (рис. 4, слева). После удаления 8 аминокислот наблюдаются значительные изменения во вторичной структуре (рис. 4, справа). Интересно, что помимо бета-листа, включающего в себя удаленные аминокислоты (красный), пропадает параллельный ему бета-лист (салатовый). Такие изменения вполне логичны: при удалении параллельного бета-листа пропадают взаимодействия, которые он формировал. Вторичная структура не поддерживается водородными взаимодействиями и теряет свою форму => бета-лист не наблюдается. Однако сама форма молекулы при этом практически не изменяется, хотя, как мне кажется, в реальности изменения были бы намного более критичны: скорее всего, салатовый участок поменял свое положение в пространстве и образовал новые взаимодействия с окружающими его петлями.

В целом, предсказание AlphaFold меня не удивило, ведь оно строится на основе выравнивания с уже существующими структурами, а так как положение всех 4 бета-листов очень консервативно и, скорее всего, критически важно для функционирования белка, структуры, попавшие в выравнивание имели именно такое положение салатового участка.

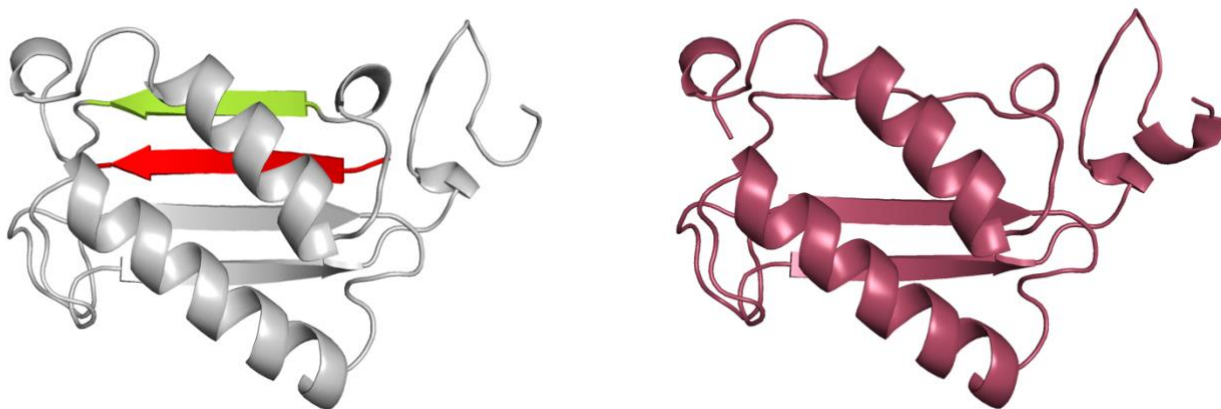


Рис. 4. Предсказание структуры полноценного белка (слева) и белка с N-концевой делецией (справа). Красным цветом обозначен удаляемый участок, салатовым – параллельный ему пропадающий бета-лист
PyMol-сецция: https://kodomofbb.msu.ru/~nr.burmistrova/term7/pr7/pr7_del_Burmistrova.pse

Литература:

- 1) Dai R, Wu Z, Chu HY, Lu J, Lyu A, Liu J, Zhang G. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jun 4;8:433. doi: 10.3389/fcell.2020.00433. PMID: 32582709; PMCID: PMC7287012.
- 2) Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta.* 2012 Jan;1824(1):68-88. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.10.002. Epub 2011 Oct 12. PMID: 22024571; PMCID: PMC7105208.
- 3) Nishihira, J., Fujinaga, M., Kuriyama, T., Suzuki, M., Sugimoto, H., Nakagawa, A., ... Sakai, M. (1998). Molecular Cloning of Humand-Dopachrome Tautomerase cDNA: N-terminal Proline Is Essential for Enzyme Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(2), 538–544. doi:10.1006/bbrc.1998.8123