

Практикум 4. Работа с Colabfold

Задание А. Amyloids

Это задание позволяет нам изучить, как AlphaFold2 справляется с предсказанием структур белков, которые могут существовать в нескольких формах, в зависимости от условий.

Особый интерес представляет поведение амилоидных белков. Амилоиды - это белковые агрегаты, образованные из множества молекул, свернутых в β -слои. В отличие от большинства белков, амилоиды могут переходить из своей нормальной структуры в более нестабильную форму, которую мы называем "не-нативной" формой, при изменении условий среды (например, температура, pH). Самое важное (и вредное) свойство амилоидов — это их способность "заражать" другие молекулы белка, переводя их в не-нативную форму. Это приводит к образованию длинных фибрилл, которые могут вызывать различные заболевания, включая нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера и Паркинсона [1].

В первую очередь посмотрим на структуры в PDB, для этого заблаstim последовательность (A5: SNFLNCYVSGFHPSDIEVDLLK). По результатам выдачи со 100% Identity я решила выбрать β -2-микроглобулин β 2M. Бета-2-микроглобулин — это белок с низкой молекулярной массой, имеющий сходство в последовательности с иммуноглобулинами. Являясь частью комплекса HLA, он выполняет важную роль в структуре клеточной поверхности. В нормальных условиях бета-2-микроглобулин синтезируется и выделяется многими клетками, особенно лимфоцитами, и обнаруживается в крови здоровых людей. Благодаря своим небольшим размерам, он свободно фильтруется в клубочках почек и катаболизируется клетками проксимальных канальцев. Нарушение функции почек и гиперпродукция бета-2-микроглобулина связаны с повышенным уровнем белка в сыворотке крови. Предполагается, что бета-2-микроглобулин может модулировать поверхностные структуры лимфоцитов и, возможно, регулировать иммунную систему [2]. У пациентов, проходящих хронический гемодиализ, часто наблюдается нарушение катаболизма β 2M, что приводит к его накоплению. Этот белок может откладываться в суставных тканях, прикрепляясь к коллагеновым фибриллам. В кислых условиях (pH 2-3) β 2M сам по себе может формировать амилоидные фибриллы, однако в физиологических условиях нуклеацию способны промотировать протео- и гликозаминогликаны соединительной ткани и коллаген 1 типа.

Сначала я проверила работу ColabFold на β 2-микроглобулине (β 2M), используя его полную последовательность. Учитывая малый размер молекулы (всего 22 аминокислоты), я ожидала, что прогноз вторичной структуры может быть неточным. И действительно, ни одна из пяти структур, полученных ColabFold, не

продемонстрировала присутствие каких-либо вторичных структурных элементов (рис. 1).

Чтобы оценить точность прогноза конфигурации остова β 2M в составе МНС-I, я использовала структуру β 2M из банка PDB (2D4F). Из пяти моделей, полученных ColabFold, модель 3 (с рангом 1) продемонстрировала наиболее близкую геометрию остова к нативной структуре (рис. 1). Модель 3 воспроизводит характерный изгиб, наблюдаемый в нативном белке. Структура полноразмерного белка также подтверждает отсутствие β -слоя в выдаче ColabFold, так как участвующие в формировании части белка были “обрезаны” для задания.

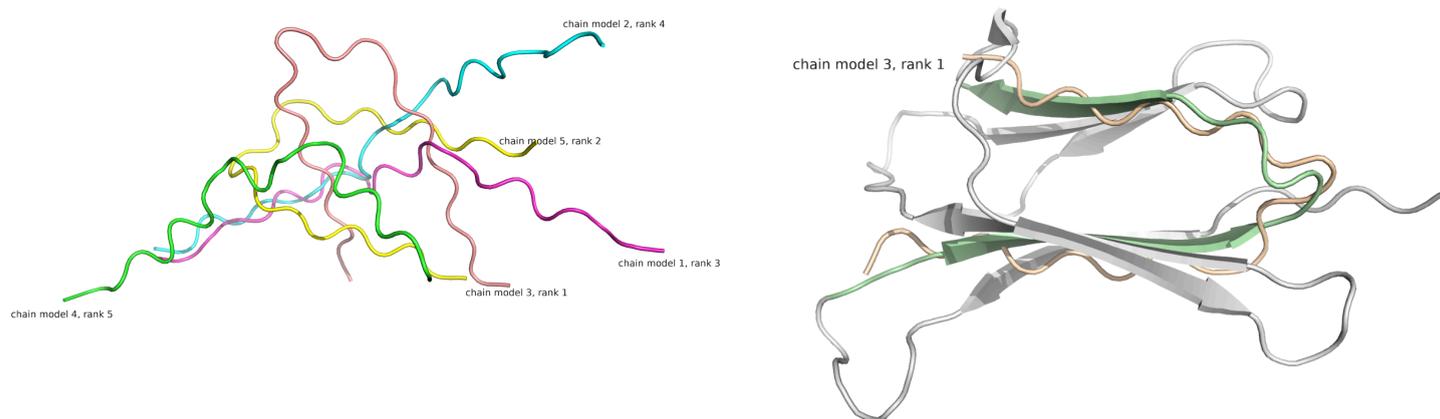


Рисунок 1. Слева предсказанные ColabFold структуры для мономера фрагмента β 2M (“спагетти!”); справа наложение предсказанной структуры 3 с полученной из PCA структурой β 2M в комплексе МНС-I.

Затем я проверила, как ColabFold предсказывает структуру β 2M при формировании амилоидных фибрилл, используя 5 и 10 молекул белка. Я предполагала, что взаимодействие между молекулами β 2M может стимулировать образование β -слоев, характерных для амилоидов. Результаты подтвердили мои предположения. В структуре, предсказанной AlphaFold2 для 5 молекул β 2M, с рангом 1 начали появляться β -слои, формируемые взаимодействующими молекулами. Однако более регулярная укладка β -слоев наблюдалась в структуре с рангом 2 (рис. 2, справа).

При увеличении количества молекул β 2M до 10 почти все молекулы в структуре сформировали регулярные β -слои (рис. 3). Это указывает на то, что AlphaFold2 улавливает тенденцию β 2M к формированию амилоидных структур при олигомеризации. Однако укладка мономеров по данным AlphaFold не совпадает с данными рентгеноструктурного анализа для β -амилоидов, где мономеры представляют собой последовательную цепь (рис. 4).

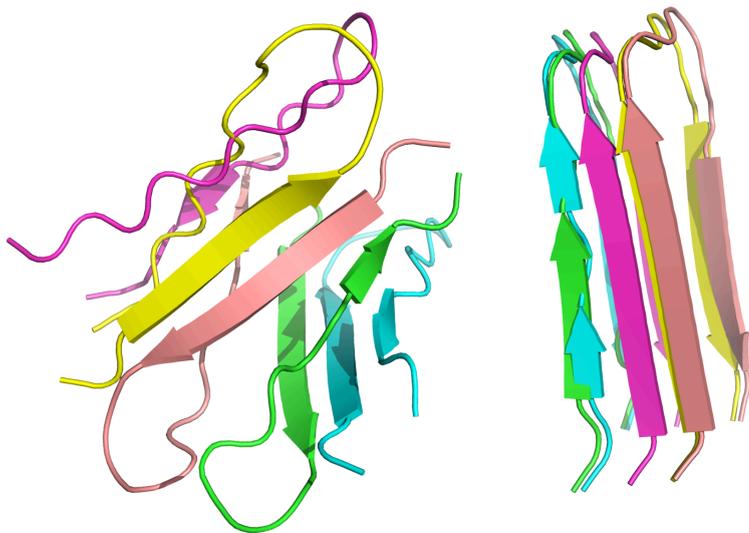


Рисунок 2. Предсказание структуры пентамера с помощью ColabFold, приведены 2 наилучших предсказания

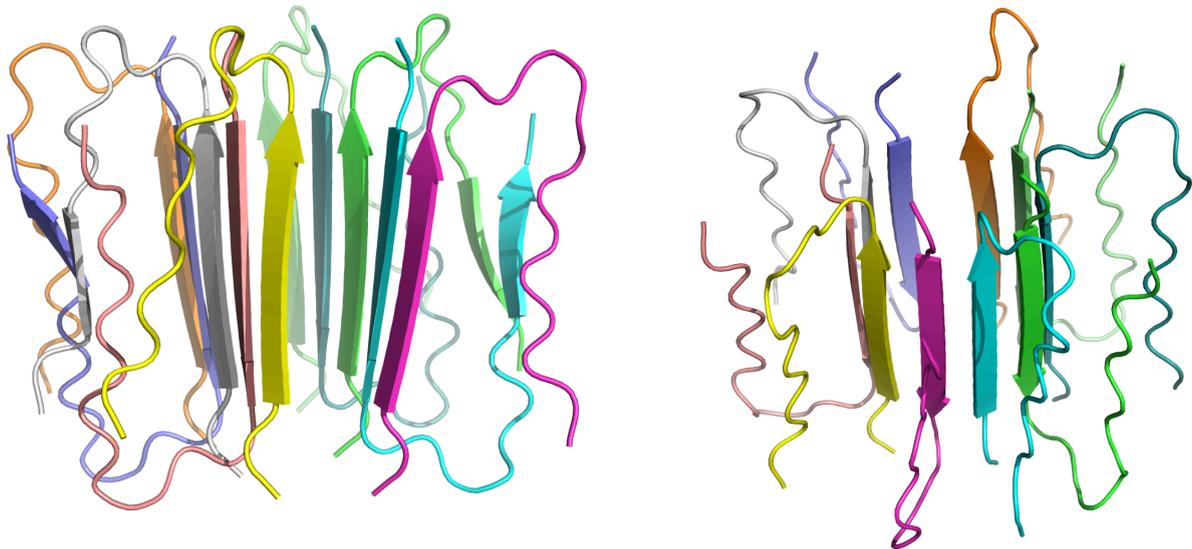


Рисунок 3. Предсказание структуры олигомера с помощью ColabFold, приведены 2 наилучших предсказания.

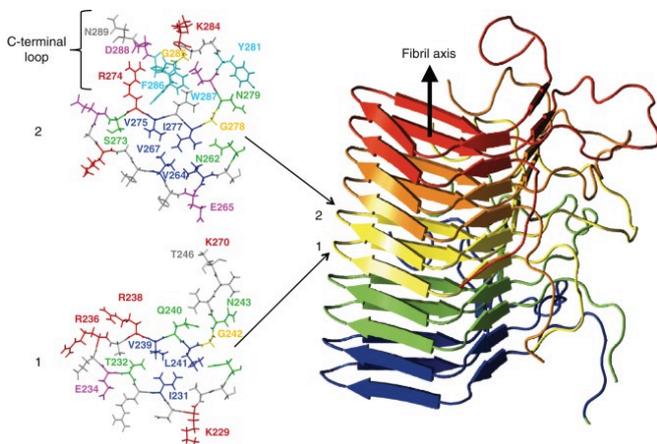


Рисунок 4. Структура β -амилоида из [3].

Задание С. **Proteases**

Папаин — цистеиновая протеаза, имеющая каталитическую триаду в активном центре, включающую в себя остатки цистеина (нуклеофил), гистидина (отбирает протон у цистеина для его активации) и аспарагина (выступает в качестве общего основания, стабилизирует положительный заряд на гистидине). Общепринятый механизм приведен на рисунке 5. Как и у многих протеаз, папаин синтезируется в неактивной форме, называемой зимогеном. Активный центр зимогена заблокирован N-концевым фрагментом. Чтобы активировать протеазу, этот N-концевой фрагмент удаляется, освобождая место для связывания субстрата [4].

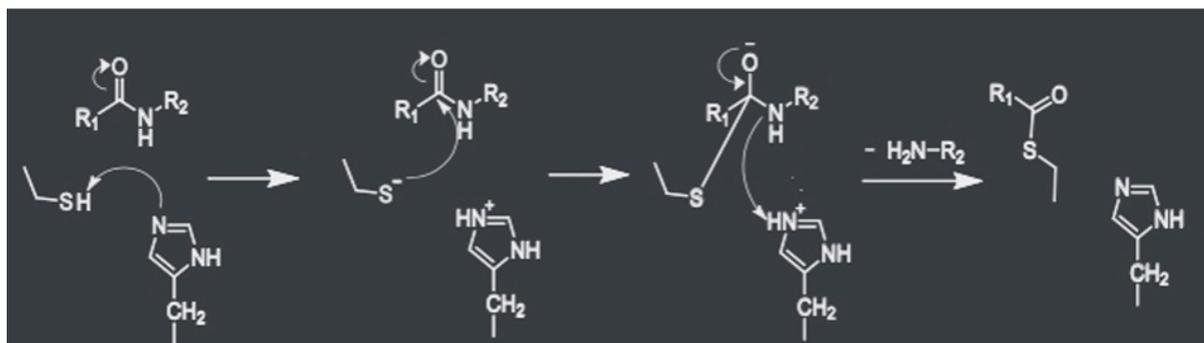


Рисунок 5. Механизм 1 стадии реакции папаина

По идентификатору Uniprot P00784 была найдена и скачена последовательность папаина. В качестве последовательности субстрата был взят пептид TMTRSSKV из базы данных MEROPS. После была предсказана последовательность комплекса. Структура белка была сравнена с имеющейся X-ray структурой (1PIP). Результаты оказались не впечатляющие, так как субстрат присоединился к сайту, отличному от активного центра. По всей видимости, виной тому мог стать кусок последовательности, который отрезается при созревании фермента (рис. 6).

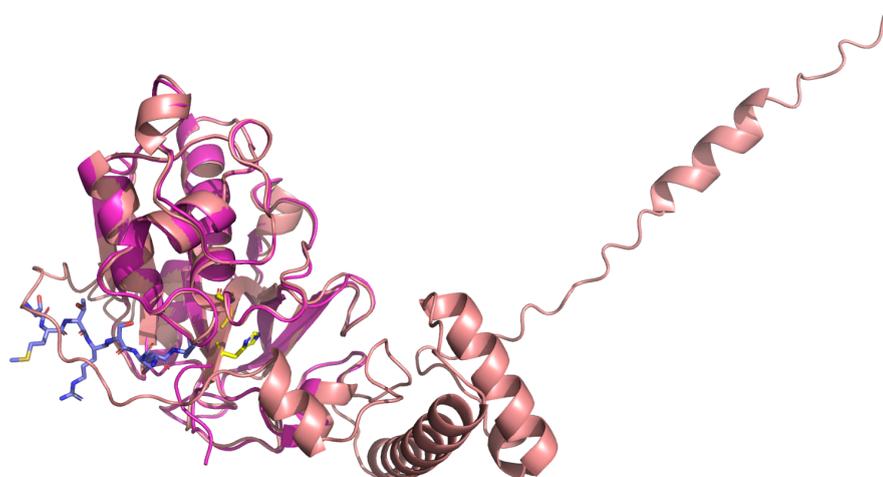


Рисунок 6. Выравнивание структуры 1PIP (ярко-розовый) с предсказанной структурой (светло-розовый). Субстрат показан синим, сайт активного центра - желтым.

По данным Uniprot я определила, что при созревании папаина от него отрезается 1-133 а.к. остаток. Следующим запросом к AlphaFold2 я получила структуру комплекса с лигандом для такого “обрезанного” папаина. В результате получилась более удачная структура, как можно видеть на рисунке 7, карбонильный углерод находится уже в 3.6 ангстремах от серы, что уже является достаточно небольшим расстоянием для атаки.

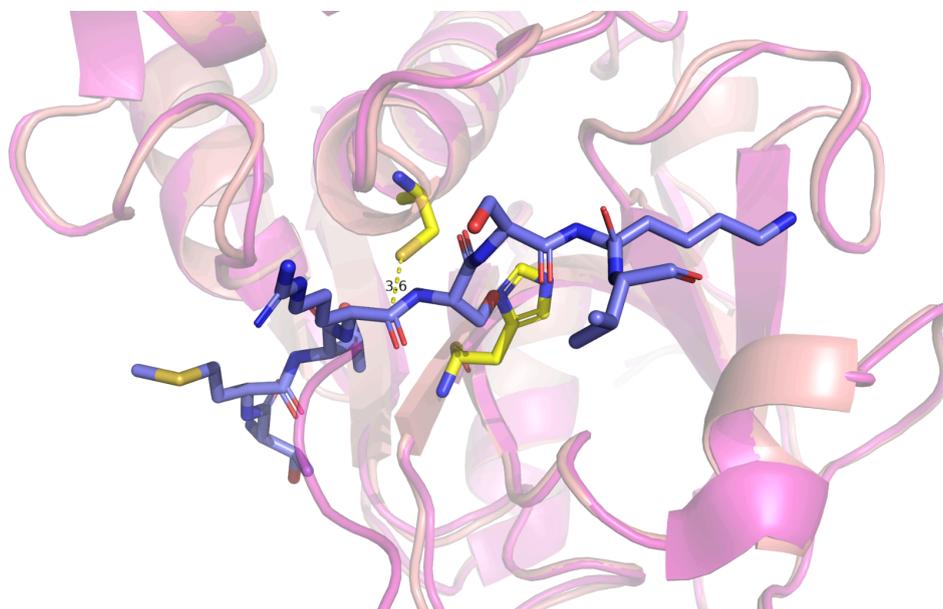


Рисунок 7. Выравнивание структуры 1PIР (ярко-розовый) с предсказанной обрезанной структурой папаина (светло-розовый). Субстрат показан синим, сайт активного центра - желтым.

В целом, можно сказать, что альфафолд способен в некоторых случаях предсказывать фермент-субстратные комплексы протеаз, однако стоит понимать, что AF2 в любом случае выдаст какой-то результат, который на самом деле не обязательно будет правильный/ реальный (как это случилось в первом случае).

Сессии PyMol доступны по [ссылке](#)

Список литературы

- [1] R. K. Norrild, N. Vettore, A. Coden, W.-F. Xue, and A. K. Buell, “Thermodynamics of amyloid fibril formation from non-equilibrium experiments of growth and dissociation,” *Biophys. Chem.*, vol. 271, p. 106549, Apr. 2021, doi: 10.1016/j.bpc.2021.106549.
- [2] G. M. Bernier, “beta 2-Microglobulin: structure, function and significance,” *Vox Sang.*, vol. 38, no. 6, pp. 323–327, Jun. 1980, doi: 10.1111/j.1423-0410.1980.tb04500.x.
- [3] R. Riek, “The Three-Dimensional Structures of Amyloids,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 9, no. 2, p. a023572, Feb. 2017, doi: 10.1101/cshperspect.a023572.
- [4] M. Novinec and B. Lenarčič, “Papain-like peptidases: structure, function, and evolution,” *Biomol. Concepts*, vol. 4, no. 3, pp. 287–308, Jun. 2013, doi: 10.1515/bmc-2012-0054.