

Predicción *in silico* de la estructura tridimensional de Glucocinasa-1 de *Phytophthora infestans*

Liara Villalobos-Piña, Ascanio Rojas y Héctor Acosta Oviedo

Universidad de Los Andes (ULA)
Enzimología de Parásitos
Laboratorio de Fisiología Animal
Centro Nacional de Cálculo Científico ULA (CeCaIULA)
Mérida, Venezuela
liaravipi@gmail.com



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
VENEZUELA

1. Introducción

Phytophthora infestans es el agente causal de la enfermedad del tizón tardío, el cual afecta los cultivos de papa y tomate en todo el mundo, causando importantes pérdidas económicas en la producción de estos cultivos [1], incluyendo a Chile, donde la papa es uno de los alimentos básicos para la población nacional.

Para los objetivos de este trabajo, nos enfocamos en una de las 7 glucoquinasas presentes en este fitopatógeno [2]. Esta glucoquinasa, conocida como *PiGlcK-1* es de suma importancia debido a su mayor grado de expresión justamente en los estadios infecciosos del fitopatógeno [3]. Adicionalmente, fue la primera de estas glucoquinasas en ser caracterizada bioquímicamente y, basándonos en su secuencia, esta pertenecería al grupo de las glucoquinasas A, de la familia hexokinasa [4].

Una mayor comprensión de la estructura terciaria de esta proteína, así como la descripción espacial de los posibles sitios de unión a los diversos ligandos podría contribuir en la búsqueda de posibles blancos para el diseño de inhibidores para esta enzima clave en el metabolismo de *P. infestans*.

La determinación experimental de las estructuras proteicas sigue siendo un desafío costoso que además requiere mucho tiempo. Frente a ello, las herramientas bioinformáticas permiten a través del modelado por homología, predecir estructuras proteicas 3D basándose en el uso de estructuras proteicas homólogas ya conocidas que se usan como template [5]. En la actualidad no existen estudios estructurales para ninguna de las enzimas de este fitopatógeno. En este trabajo presentaremos el primer modelo en ser obtenido mediante herramientas *in silico* de la estructura 3D de la *PiGlcK-1* [5, 12].

2. Metodología

La secuencia de la *PiGlcK-1* fue recuperada del portal web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y guardada en formato FASTA para su posterior análisis en los servidores LOMETS, I-TASSER y Phyre2 [6-8]. Para validar cada uno de estos modelos, se cargó en el servidor ModFOLD6 [9],

tanto la secuencia de la proteína como cada uno de los modelos PDB previamente obtenidos. Para el refinamiento del modelo se usó la herramienta informática Galaxy Refine [10], cuyos resultados fueron evaluados mediante un análisis por gráficos de Ramachandran a través del servidor SwissModel (<https://swissmodel.expasy.org/>). El análisis se hizo para el modelo obtenido, antes y después de ser refinado hasta 2 veces. Posteriormente se procedió a hacer el docking para los ligando glucosa y ATP, para lo cual se usó el portal web SwissDock (<https://swissdock.ch/docking>) y visualizado a través de la herramienta Chimera 1.15 [11].

3. Resultados y Discusión

El mejor modelo predicho se obtuvo por Phyre2 indicando que la estructura monomérica estaba compuesta por dos dominios, uno formado por 3 α -hélices y 4 láminas β plegadas, que incluyen los residuos de unión a ATP y otro dominio formado por 6 α -hélices, 5 láminas β plegadas y una región al azar que contiene los residuos de unión a glucosa, ambos dominios unidos por una bisagra.

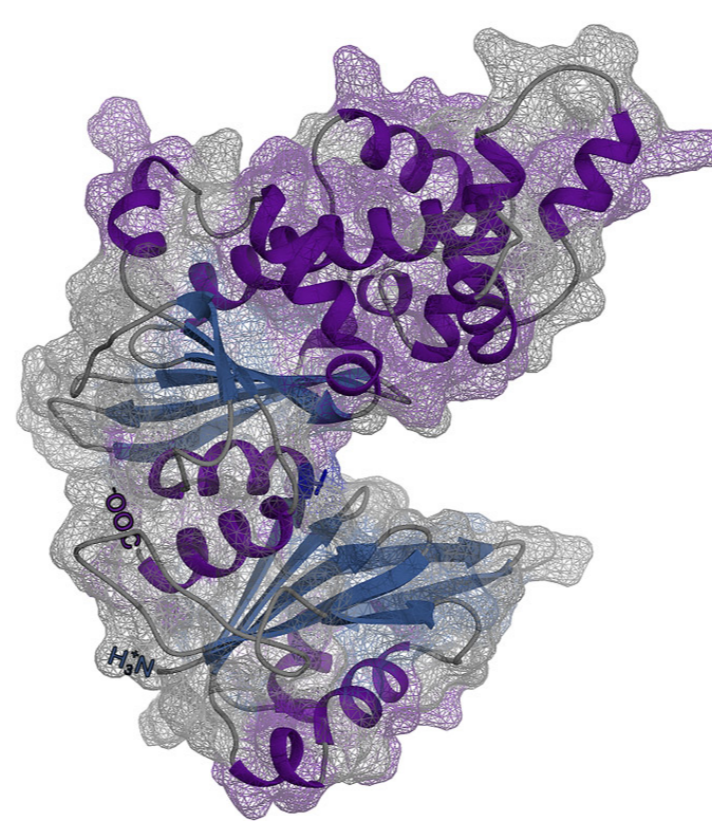


Figura 1: Estructura tridimensional de la *PiGlcK-1* obtenida por Phyre2 y visualizada con Chimera 1.15

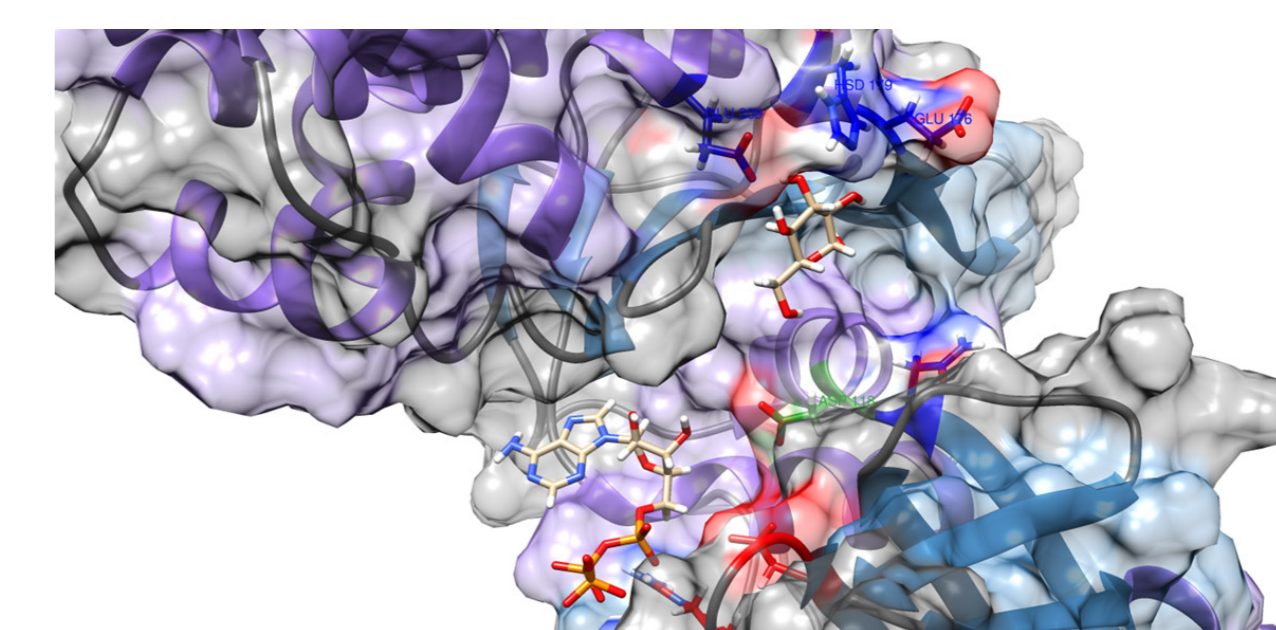


Figura 2: Docking de Glucosa y ATP a *PiGlcK-1* obtenido por SwissDock y visualizado en Chimera 1.15. Se resalta los aminoácidos involucrados en la unión a Glucosa (azul) y ATP (rojo) y el aspartato catalítico (verde).

4. Conclusiones

Las herramientas bioinformáticas para modelar estructuras de proteínas que no han sido cristalizadas constituyen una herramienta poderosa. Este modelo 3D contribuye en proporcionar información sobre la estructura de la proteína *PiGlcK-1* que apuntan hacia una mejor comprensión de la función de esta proteína y la interacción con sus sustratos, lo que puede ayudar en el diseño de estrategias verdaderamente efectivas frente a la amenaza que representa el tizón tardío.

Referencias

1. Kamoun S, Furzer O, Jones JGD, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, et al. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*. 2015;16(4):413-434
2. Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE, Cano LM, et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*. 2009;461(7262):393-398.
3. Judelson HS. Metabolic Diversity and Novelities in the Oomycetes. *Annu Rev Microbiol*. 2017;71(1):21-39.
4. Villalobos-Piña L, Balza H, Acosta H, Andrade-Alvarez D, Rojas A, Avilan L, et al. Characterization of Glucokinase-1 from *Phytophthora infestans*, a versatile enzyme. *Fungal Genom Biol*. 2020;10(100001): 1-9.
5. Petrey D y Honig B. Protein structure prediction: inroads to biology. *Mol. Cell*. 2005; 20(6):811-819.
6. Wu, S. y Zhang, Y. (2007). LOMETS: a local meta-threading-server for protein structure prediction. *Nucleic Acids Res*. 35(10): 3375-3382. *Nature Protocols*. 2015; 12(1):1-5.
7. Jianyi Y, Renxiang Y, Ambrish R, Dong X, Jonathan P y Yang Z. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat Methods*. 2015; 12(1):1-5.
8. Lawrence AK, Stefans M, Christopher MY, Nark N y Michael JES. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protocols*. 2015; 10(6):845-858.
9. Maghrabi AHA, McGuffin LJ. ModFOLD6: an accurate web server for the global and local quality estimation of 3D models of proteins. *Nucleic Acids Res*. 2017; 45:W416-W421.
10. Lim H, Hahnbeom P y Chaok S. GalaxyRefine: protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Res*. 2013; 41(W384-W388).
11. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem*. 2004; 25:1605-1612.