

РЕКОНСТРУКЦИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ИНУЛИНАЗЫ ИЗ *Kluyveromyces marxianus* ДЛЯ ПОИСКА ПУТЕЙ РЕГУЛИРОВАНИЯ ЕЕ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

© 2016 г. А.В. Абдуллатыпов, М.С. Кондратьев*, М.Г. Холявка**, В.Г. Артюхов**

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2;

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3;

**Воронежский государственный университет, 394006, Воронеж, Университетская пл., 1

E-mail: azatik888@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.05.16 г.

Методами высокопроизводительного компьютерного моделирования выполнена реконструкция пространственной структуры белка инулиназы (КФ 3.2.1.7) из *Kluyveromyces marxianus* – фермента, расщепляющего инулин и другие фруктосодержащие полимеры до фруктозы. В качестве модели близкого гомологичного белка, по которому была осуществлена реконструкция, была использована молекула инвертазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (PDB-ID: 4EQV). Реконструированная модель фермента будет в дальнейшем использоваться для компьютерных расчетов в целях оптимизации биотехнологического применения инулиназы.

Ключевые слова: компьютерное моделирование, реконструкция, гомология, инулиназа, банк белковых структур, молекулярный докинг.

В последние десятилетия определенную популярность набирают заменители сахара – это связано как с популяризацией здорового образа жизни, так и с ростом заболеваемости сахарным диабетом. Среди других заболеваний именно диабет занимает третье место по смертности (6%) после сердечно-сосудистых (51%) и онкологических (17%) заболеваний [1]. Больных сахарным диабетом в мире насчитывается более 50 млн, на территории стран бывшего СССР – более 3 млн. Ежегодно число больных сахарным диабетом возрастает на 5–10% [2,3]. Эти факты определили рост популярности фруктозы как важного компонента диетического питания больных сахарным диабетом. Фруктозу, как правило, получают из крахмала путем многостадийного процесса, включающего расщепление до глюкозы с последующей обработкой глюкозы глюкозоизомеразой и хроматографическим разделением фруктозы и глюкозы. Перспективным направлением является получение фруктозы из растительного инулинсодержащего сырья, в особенности топинамбура. В его клубнях содержание инулина достигает 20–25%, а получившийся в результате переработки сироп при этом содержит уже не менее 70% фруктозы [4,5].

Фермент инулиназа (2,1-β-D-фруктан-фруктаногидролаза, КФ 3.2.1.7) эффективно расще-

пляет инулин и другие фруктосодержащие полимеры до фруктозы [6]. Инулиназа чрезвычайно широко распространена среди высших растений и микроорганизмов и может применяться для промышленного получения фруктозы из растительного сырья. Однако массовое применение растворимых ферментов вообще и инулиназы в частности ограничены по меньшей мере двумя обстоятельствами.

Во-первых, природные ферменты неустойчивы при хранении и легко денатурируют при различных воздействиях – особенно легко они подвержены термоденатурации [7]. Во-вторых, многократное использование биокатализаторов затруднено из-за сложности их отделения от субстрата и продуктов реакции. К тому же достаточно проблематично однозначно прогнозировать поведение фермента и кинетику реакции в промышленных ферментерах. Подобные затруднения можно решить путем получения иммобилизованных ферментных препаратов, молекулы которых прочно закреплены на нерастворимых носителях [8–10].

Ранее рекомбинантную инулиназу из *Escherichia coli*/pMSiftOptR и *Escherichia coli*/pMSiftOptWT успешно сорбировали на анионообменных смолах Duolite A561, Duolite A568, Amberlite IRA67 и Amberlite IRA 94S. При этом выявлялся следующий уровень активности: 4,5,

20,6, 1,7 и 19,8% соответственно для фермента из *Escherichia coli/pMSiftOptR*. При сорбции энзима из *Escherichia coli/pMSiftOptWT* – 4,2, 19,3, 1,6 и 19,0% [11].

Была осуществлена адсорбция инулиназы из *Kluveromyces marxianus* NRRL Y-7571 на анионите Streamline DEAE [12]. Авторы работы [13] иммобилизовали клетки *Kluveromyces marxianus* CDBB-L-278, обладающие инулиновой активностью, на альгинате бария, обработанном глутаровым альдегидом. После пяти циклов гидролиза инулина иммобилизованные клетки сохраняли 85% активности [13]. В работе [14] была исследована адсорбция инулиназы из *Kluveromyces marxianus* NRRL Y-7571 на катионообменной смоле Streamline SP.

Авторы работы [15] связывали молекулы инулиназы из *Kluveromyces marxianus* YS-1 с Duolite A568 через основания Шиффа между карбонильными группами активированного носителя и свободными аминогруппами белка. Для активирования носителя использовали глутаровый альдегид. Иммобилизованный препарат снижал на 10% свою активность при использовании его в течение четырех циклов, на 20% – после семи циклов и на 50% – по окончании 55 циклов.

На кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета были разработаны адсорбционный и ковалентный способы иммобилизации инулиназы на ряде синтетических катионитов и анионитов, позволяющие сохранить до 80–85% активности нативного фермента [16,17].

В лаборатории структуры и динамики биомолекулярных систем Института биофизики клетки РАН (г. Пущино Московской области) были изучены возможные молекулярные механизмы связывания инулиназы из *Aspergillus ficuum* с известными агентами для иммобилизации, на основе чего были предложены новые способы создания сшивок этого фермента с подложкой [18,19].

С экспериментальной точки зрения не меньший интерес представляет моделирование и компьютерное исследование связывания имеющегося набора лигандов (субстратов, ингибиторов, компонентов матриц для иммобилизации, перспективных агентов для сшивок) с инулиназой из другого продуцента – *Kluveromyces marxianus* [20].

Несмотря на то, что существует ряд работ по исследованию структуры инулиназ из продуцентов рода *Kluveromyces* [21–23], пространственная модель этого фермента отсутствует в банке белковых структур, поэтому ее следует

реконструировать по гомологии. В литературе описано достаточно много ферментов, структуры которых были изучены не на основе рентгеноструктурных данных, а на основе сравнительного моделирования [24–29].

Наша работа была выполнена с целью получения полноатомной модели фермента инулиназы из продуцента *Kluveromyces marxianus*. Компьютерная реконструкция модели этого белка важна для будущего эффективного поиска путей регулирования каталитической активности данного фермента, в том числе для более адекватного сравнения рассчитываемых констант с полученными экспериментально результатами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для моделирования использовали последовательность инулиназы *Kluveromyces marxianus*, депонированную в базе данных NCBI Protein: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA48500.1>, GenBank ID: CAA48500.1 [30].

Шаблоны для моделирования искали с помощью программы BLAST [31] в базе данных Protein Data Bank (www.rcsb.org) [32].

Основным инструментом для реконструкции фермента с известной аминокислотной последовательностью (инулиназа из *Kluveromyces marxianus*) по гомологу с известной аминокислотной последовательностью и пространственной структурой (дрожжевая инвертаза *Saccharomyces cerevisiae*) был выбран расчетный пакет MODELLER 9.14 [26].

MODELLER – это программа, позволяющая строить трехмерную структуру на базе выравнивания последовательности модели и шаблона с учетом пространственных ограничений, взятых из шаблона.

Входными файлами для программы MODELLER являются файл с выравниванием моделируемой последовательности и последовательностей шаблонов в формате PIR, имеющий расширение .ali и файл (файлы) с координатами атомов шаблона (или нескольких шаблонов) с расширением .pdb.

Исполняемый файл для программы MODELLER имеет синтаксис, сходный с синтаксисом языка программирования Python, и имеет такое же расширение – .py. Он запускается из командной строки. Для запуска программы MODELLER необходимо иметь установленный язык Python версий 2.6 или 2.7.

В исполняемом файле присутствуют строки с указанием используемого файла выравнивания, координатных файлов, количества генери-

руемых моделей и используемых методов оценки моделей.

Для уточнения моделей применяли минимизацию энергии методом сопряженных градиентов (VTM-optimization, 300 шагов) и методом молекулярной динамики (опция md_refine = slow), также проведенную в MODELLER. MODELLER использует силовое поле CHARMM21 [33] и динамику белка в вакууме в этом поле. Выбранный режим молекулярной динамики включал в себя серию 600-шаговых симуляций (2 фс на шаг) при температурах 1000, 600, 500, 400, 300K (600 шагов по 2 фс при каждой температуре).

Было построено 300 моделей, для которых проводили оценку следующих параметров [26,34]:

– molpdf (objective function, объективная функция) – статистический потенциал, основанный на функциях плотности вероятности межатомных расстояний, углов между связями и двугранных углов вращения. Эта функция всегда положительна, причем меньшее значение отражает большую стабильность белковой молекулы.

– DOPE – дискретно оптимизированная энергия белка, представляющая собой статистический потенциал, основанный на функции плотности вероятности межатомных расстояний [34]; отрицательная величина, меньшее значение которой отражает большую стабильность белковой молекулы.

– Z-оценка дискретно оптимизированной энергии белка (Z-DOPE), определение которой позволило использовать формулу для уровня достоверности модели (P) как доли возможных конформаций белка, обладающих большим, чем данная модель, значением DOPE [29]: $P = (1 - \text{normsdist}(Z)) \cdot 100\%$, где Z – Z-оценка DOPE, normsdist – функция нормального распределе-

ния с $\mu = 0$ и $\sigma^2 = 1$. Например, при $Z = 0$ имеем $P = 50\%$, при $Z = -1$ имеем $P = 84\%$

– GA341 [35,36] – потенциал значением от 0 до 1, комбинирующий степень идентичности последовательностей, степень компактности модели (отношение объема всех аминокислотных остатков к объему сферы, диаметр которой равен наибольшему линейному размеру модели) и Z-оценку дистанционного статистического потенциала [36].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходными данными для наших расчетов были выбраны трехмерная структура инвертазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (PDB-ID: 4EQV) [37] и аминокислотный сиквенс инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* из базы данных NCBI Protein: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA48500.1>, GenBank ID: CAA48500.1 [30].

Важно отметить, что идентичность аминокислотных последовательностей двух ферментов составляла 52%, тогда как процент перекрытия последовательностей (query coverage) составил 92%.

Для 35 N-концевых аминокислотных остатков, не имеющих гомологичной области в шаблоне 4EQV, были найдены два дополнительных шаблона: дипептидилпептидаза человека (PDB ID: 3FVY, идентичность 41%) [37] и флавоцитохром *c*-сульфид-оксидоредуктаза бактерии *Chromatium vinosum* (PDB ID: 1FCD, идентичность 37%) [39].

Файл выравнивания в формате .pig представлен ниже (в реальности каждая последовательность записывается в одну строчку, но из соображений удобства печати последовательности модели и главного шаблона разбиты на строки):

```
>P1; 4EQV
structureX:4EQV:4: A:512: A :invertase: Saccharomyces cerevisiae: 3.40:0.14
-----ETSDRPLVHFTPNKGWMNDPGLWYDEKDAKWHLYFYQYNPNDTVWGTPLFWGHATS
>P1; 3FVY
structureX:3FVY:91: A:117: A :dipeptidyl peptidase: Homo sapiens: 2.40:0.14
----AFLVYAAGVYSNMGNYSFGDTKFPVN-*
>P1; 1FCD
structureX:1FCD:334: A:362: A :Flavocytochrome C Sulfide Dehydrogenase: Chromatium
Vinosum: 2.50:0.14
LNTCYSILAPAYGISVAAI-YRPNADGSAI-*
>P1; 5klu
sequence:5klu:1 :A:560:A:inulinase:Kluyveromyces marxianus:-1.00:-1.00
MKLAYSLLLPLAGVSASVINYKRDGSKAITNTTFLNRPVHFTPSHGWMDPGLWYDAKEEDWHLYYQYNPAATIWGTPLYWGHAVS
```

```

>P1; 4EQV
structureX:4EQV:4: A:512: A :invertase: Saccharomyces cerevisiae: 3.40:0.14
DDLTNWEDQPIAIAIPKRNDGAFSGSMVVDYMNNTSGFFNDTIDPRQRCVAIWYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQF
>P1; 5klu
sequence:5klu:1 :A:560:A:inulinase:Kluyveromyces marxianus:-1.00:-1.00
KDLTSWTDYGASLPGSDDAGAFSGSMVIDYNNTSGFFNNSVDPRQRAVAVWTLKSGPSQAQHISYSLDGGYTFQHYSDNAVLDINSSNF
>P1; 4EQV
structureX:4EQV:4: A:512: A :invertase: Saccharomyces cerevisiae: 3.40:0.14
RDPKVFWEYEQS----KWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPLIEVP-----TEQDPSKSYWVMFI
>P1; 5klu
sequence:5klu:1 :A:560:A:inulinase:Kluyveromyces marxianus:-1.00:-1.00
RDPKVFWEHENGEDGRWIMAVAESQVFSVLFYSSPNLKNWTLSENFTHHGWTGTQYECPLVKVPYDSVADSSSNSSDPSAWVLFV
>P1; 4EQV
structureX:4EQV:4: A:512: A :invertase: Saccharomyces cerevisiae: 3.40:0.14
SINPGAPAGGSFNQYFVGSFNTHFEAFDNQSRVDFGKDYALQTFNTDPTYGSAWASNWEYSFVPTNPWRSSMSLVRKFSLN
>P1; 5klu
sequence:5klu:1 :A:560:A:inulinase:Kluyveromyces marxianus:-1.00:-1.00
SINPGGPLGGSVTQYFVGFNGTHFTPIDDQTRFLDMGKDYALQTFNT--PNEKDVIYGIWASNWQYAAQAPTPWRSSMSLVRQFTLK
>P1; 4EQV
structureX:4EQV:4: A:512: A :invertase: Saccharomyces cerevisiae: 3.40:0.14
TEYQANPETELINLKAEPILNI---SNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFKGLEDP
>P1; 5klu
sequence:5klu:1 :A:560:A:inulinase:Kluyveromyces marxianus:-1.00:-1.00
-DFSTNPNSADVVLNSQPVLNYDALRKNGTYS-ITNYTVTSENGKKIKLDNPSGSLEFHLEYVFNQSPDIKSNVFADLSLYFKGNDD
>P1; 4EQV
structureX:4EQV:4: A:512: A :invertase: Saccharomyces cerevisiae: 3.40:0.14
EEYLRMGFVVSASSFFLDRGNSKVKFVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYKQVGLLDQNIILELYFNDGDVSTNTYFMTTGNALGSV
>P1; 5klu
sequence:5klu:1 :A:560:A:inulinase:Kluyveromyces marxianus:-1.00:-1.00
NEYLRLGYETNGGAFFLDRGHTKIPFVKENLFFNHQLAVTNP--VSNYTTNVFDVYGVIDKNIIELYFDNGNVSTNTFFFSTNNVIGEI
>P1; 4EQV
structureX:4EQV:4: A:512: A :invertase: Saccharomyces cerevisiae: 3.40:0.14
NMTTGVNLFYIDKQVREVK-*
>P1; 5klu
sequence:5klu:1 :A:560:A:inulinase:Kluyveromyces marxianus:-1.00:-1.00
DIKSPYDKAYTINSFNVTQFNV*

```

В этом файле три верхние последовательности соответствуют шаблонам. В верхней строке после обязательного поля P1 через точку с запятой приводится четырехбуквенное имя координатного файла, используемого в качестве шаблона; вторая строка, в которой разделителем служит двоеточие, содержит обязательное поле structureX (означает, что это структура, полученная экспериментально методом дифракции рентгеновских лучей), имя файла шаблона, номер начальной аминокислоты файла шаблона, используемый для получения пространственных ограничений, имя цепи шаблона, номер

конечной аминокислоты файла шаблона, используемый для получения пространственных ограничений, имя цепи шаблона, дальнейшие поля можно заполнять произвольно или оставить пустыми (название белка, название организма, разрешение, R-фактор).

Моделируемая последовательность в данном файле содержит: в первой строке – имя последовательности, во второй строке – обязательное поле sequence, четырехбуквенное имя для координатных файлов моделей, номер начальной аминокислоты последовательности для

включения в модель, имя цепи, номер конечной аминокислоты последовательности для включения в модель, имя цепи, название белка, название организма, два произвольно заполняемых поля (разрешение и R -фактор, которые в случае моделируемой последовательности не имеют физического смысла).

Следует отметить, что нумерация остатков шаблонов должна соответствовать их нумерации в файлах .pdb, а нумерация остатков модели – их нумерации в моделируемой последовательности.

Исполняемый файл выглядел следующим образом:

```
# Homology modeling with multiple templates
from modeller import * # Load standard Modeller classes
from modeller.automodel import * # Load the automodel class

log.verbose() # request verbose output
env = environ() # create a new MODELLER environment to build this model in

# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ['.', '../atom_files']

a = automodel(env,
              alnfile = 'klu5.ali', # alignment filename
               knowns = ('4EQV', '3FVY', '1FCD'), # codes of the templates
               sequence = '5klu',
               assess_methods=(assess.DOPE, assess.normalized_dope, assess.DOPEHR,
                               assess.GA341)) # code of the target
a.very_fast() # prepare for extremely fast optimization

a.starting_model = 6
a.ending_model = 305
# Very thorough VTFM optimization:
a.library_schedule = autosched.slow
a.max_var_iterations = 300

# Thorough MD optimization:
a.md_level = refine.slow

a.make() # do the actual homology modelling
```

В этом файле стоит обратить внимание на следующее: седьмая строка содержит указание подкаталога `atom_files` каталога `automodel`, в котором находятся координатные файлы шаблонов; девятая строка содержит обращение к файлу выравнивания, десятая – обращение к координатным файлам шаблонов, которые должны иметь имена, идентичные их именам в файле выравнивания, одиннадцатая – имя моделируемой последовательности, двенадцатая – методы оценки модели (в файле перечислены все оцененные статистические потенциалы, но реальный смысл для сортировки модели имел потенциал DOPE и его Z -оценка (`normalized_dope`)). Далее идут: 1) быстрая оптимизация

методом сопряженных градиентов; 2) медленная оптимизация методом сопряженных градиентов в течение 300 итераций; 3) медленная оптимизация методом молекулярной динамики в вакууме (`refine.slow`) при температурах 1000, 600, 500, 400, 300K (600 шагов по 2 фс при каждой температуре).

Стоит упомянуть, что траектории молекулярной динамики не сохраняются, сохраняется только конечный результат динамики в виде координатного файла модели.

Было построено 300 моделей, которые отбирали на основании дискретно-оптимизированной энергии (DOPE) и ее Z -оценки [34].

Реконструкция фермента
из *Kluyveromyces marxianus*

4EQV

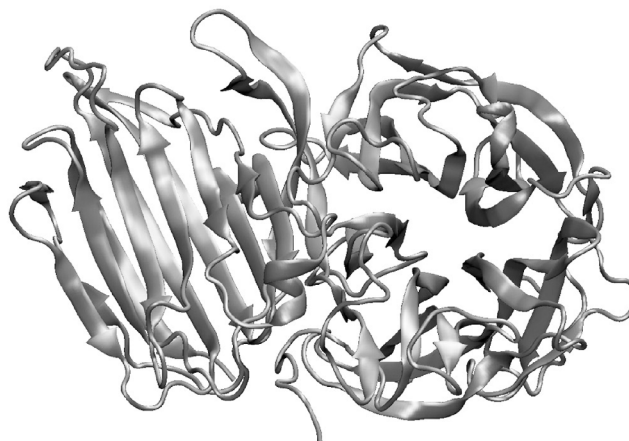


Рис. 1. (а) – Модель инулиназы *Kluyveromyces marxianus*; (б) – структура инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*, использованная в качестве основного шаблона.

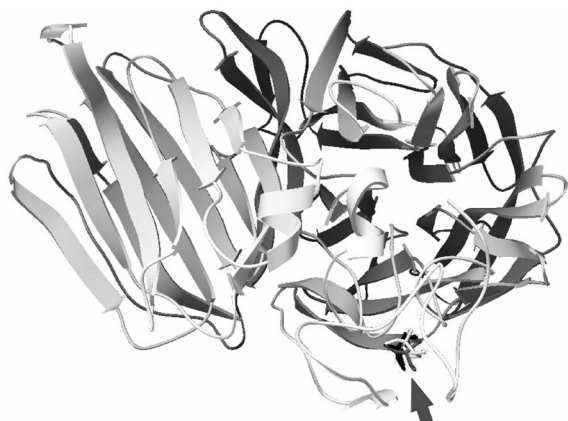


Рис. 2. (а) – Модель инулиназы *Kluyveromyces marxianus* в комплексе с D-маннозой; (б) – структура инулиназы *Aspergillus ficuum* (код PDB: 3SC7) в комплексе с D-маннозой. Молекулы маннозы указаны стрелками.

Значения Z-оценок DOPE варьировали от $-0,71$ до $-0,91$, что соответствовало уровням достоверности от 76,11 до 81,86%. Модель с максимальным уровнем достоверности использовали в дальнейшем для докинга.

Сравнение структур модели и шаблона показано на рис. 1.

Важно отметить, что изученная нами ранее инулиназа из *Aspergillus ficuum* (код PDB ID: 3SC7) была кристаллизована вместе с некоторыми органическими лигандами, в том числе с D-маннозой, которая является активатором фермента [40,41]. Известное местоположение этого сахара на поверхности фермента дало нам возможность прокалибровать выбранный пакет для докинга [42] путем воспроизведения комплекса маннозы и инулиназы в ходе предварительного расчета. Геометрия маннозы и ее

локализация на мишени, полученная в ходе расчета пакетом Autodock VINA, продемонстрировала хорошее соответствие структуре гомологичного фермента, которая является экспериментально известной из рентгеноструктурного анализа [40]. Результаты докинга обеих инулиназ с маннозой показаны на рис. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполнена реконструкция пространственной полноатомной структуры промышленно значимого для получения фруктозы из растительного сырья фермента – инулиназы из дрожжей *Kluyveromyces marxianus*. Приведена детализация методики получения модели, которая может быть использована как в научных, так и в образовательных целях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. П. Дж. Уоткинс, *Сахарный диабет* (Бином, М., 2006).
2. Е. П. Камышева и Г. М. Покалев, *Сахарный диабет. Современное представление, клинические симптомы, синдромы, врачебная тактика* (НГМА, Нижний Новгород, 1999).
3. И. В. Брусенская, *Все о диабете* (Феникс, Ростов-на-Дону, 1999).
4. О. С. Корнеева, *Карбогидразы: препаративное получение, структура и механизм действия на олиго- и полисахариды* (Изд-во Воронеж. ун-та, Воронеж, 2001).
5. М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева, С. А. Волкова и В. Г. Артюхов, *Вестн. ВГУ. Сер. «Химия. Биология. Фармация»* **3**, 86 (2014).
6. K. Ohta, H. Akimoto and S. Moriyama. *J. Appl. Glycosci.* **51**, 247 (2004).
7. V. G. Artyukhov, T. A. Kovaleva, M. G. Kholiyavka, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **46** (4), 385 (2010).
8. T. A. Kovaleva, M. G. Holiyavka, and V. G. Artyukhov, *Biotechnology in Russia* **1**, 43 (2012).
9. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка и А. С. Таха. Сорбционные и хроматографические процессы **7** (5), 804 (2007).
10. В. Г. Артюхов, М. Г. Холявка и Т. А. Ковалева, *Биофизика* **58** (4), 635 (2013).
11. D. Letca, C. Hemmerling, M. Walter, et al., *Roum. Biotechnol. Lett.* **9** (5), 1879 (2004).
12. Y. Makino, P. S. C. Lima, F. M. Filho, and M. I. Rodrigues, *Brazil. J. Chem. Eng.* **22** (4), 539 (2005).
13. E. Barranco-Florido, M. Garcés-Garibay, L. Gomez-Ruiz, and A. Azaola. *Process Biochem.* **37**, 513 (2001).
14. S. J. Kalil, F. Maugeri, and M. I. Rodrigues, *Process Biochem.* **40**, 581 (2005).
15. R. S. Singh, R. Dhaliwal, and M. Puri, *J. Microbiol. Biotechnol.* **17** (5), 733 (2007).
16. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка и А. С. Таха, *Биотехнология* **2**, 55 (2009).
17. Т.А.Ковалева, М.Г. Холявка и С. С. Богданова. *Бюл. эксперим. биологии и медицины* **7**, 49 (2009).
18. M. S. Kondratyev, M. G. Kholiyavka, A. V. Kabanov, et al., *J. Biomol. Struct. Dynamics* **33** (Suppl. 1), 128 (2015).
19. M. G. Holiyavka, M. S. Kondratyev, A. A. Samchenko, et al., *Computers in Biology and Medicine* **71**, 198 (2016).
20. М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева, С. И. Карпов и др., *Биофизика* **59** (2), 274 (2014). 2014.
21. В. Г. Артюхов, Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка и др., *Биофизика* **54** (6), 1005 (2009).
22. Т.А. Ковалева и М. Г. Холявка, *Вопр. биол., мед. и фармацевтич. химии* **1**, 3 (2011).
23. М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева, М. В. Гречкина и др., *Прикладная биохимия и микробиология* **50** (1), 17 (2014).
24. M. A. Marti-Renom, A. Stuart, A. Fiser, et al., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**, 291 (2000).
25. B. Webb and A. Sali, in: *Current Protocols in Bioinformatics* (John Wiley & Sons, Inc., 2014), pp. 5.6.1–5.6.32.
26. A. Sali and T. L. Blundell. *J. Mol. Biol.* **234**, 779 (1993).
27. А. В. Абдуллатыпов, Н. А. Зорин и А. А. Цыганков, *Биохимия* **79**, 1009 (2014).
28. A. V. Abdullatypov and A. A. Tsygankov, *Photosynth. Res.* **125**, 341 (2015).
29. А. В. Абдуллатыпов и А. А. Цыганков, *Компьютерные исследования и моделирование* **5**, 737 (2013).
30. R. J. Bergkamp, T. C. Bootsman, H. Y. Toschka, et al., *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40** (2–3), 309 (1993).
31. S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, et al., *J. Mol. Biol.* **215** (3), 403 (1990).
32. H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, et al., *Nucl. Acids Res.* **28**, 235 (2000).
33. A. D. MacKerell Jr., D. Bashford, M. Bellott, et al., *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586 (1998).
34. M. Shen and A. Sali, *Prot. Sci.* **15**, 2507 (2006).
35. B. John and A. Sali, *Nucl. Acids Res.* **31** (14), 3982 (2003).
36. F. Melo, R. Sónchez, and A. Sali, *Prot. Sci.* **11** (2), 430 (2002).
37. M. A. Sainz-Polo, M. Ramirez-Escudero, A. Lafraya, et al., *J. Biol. Chem.* **288**, 9755 (2013).
38. G. A. Bezerra, E. Dobrovetsky, R. Viertlmayr, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 6525 (2012).
39. Z. W. Chen, M. Koh, G. Van Driessche, et al., *Science* **266**, 430 (1994).
40. J. Pouyez, A. Mayard, A. M. Vandamme, et al., *Biochimie* **94**, 2423 (2012).
41. Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка, М. И. Калашникова и Д. А. Сливкин, *Технологии живых систем* **1**, 60 (2011).
42. O. Trott and A. J. Olson. *J. Comput. Chem.* **31**, 455 (2010).

Reconstruction of Spatial Structure of Inulinase from *Kluyveromyces marxianus* for Finding Regulation Pathways of Its Catalytic Activity

A.V. Abdullatypov*, M.S. Kondratyev, M.G. Kholyavka***, and V.G. Artyukhov*****

**Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

****Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394006 Russia*

Reconstruction of the spatial structure of inulinase (EC 3.2.1.7) from *Kluyveromyces marxianus* (an enzyme hydrolyzing inulin and other fructose-based polymers to fructose) was carried out by high-throughput computational modeling. A structural model of closely related homologous protein, invertase from yeast *Saccharomyces cerevisiae* (PDB-ID: 4EQV), was used as a template. The reconstructed model will find an application in computer calculations for optimizing biotechnological feasibility of inulinase.

Key words: computer modeling, reconstruction, homology, inulinase, protein structure database, molecular docking