

НАДМОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ИНУЛИНАЗ ИЗ *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum* И *Kluyveromyces marxianus*: СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АСПЕКТ

© 2018 г. М.Г. Холявка, С.М. Макин, М.С. Кондратьев*, А.В. Абдуллатыпов**,
Т.А. Ковалева, В.Г. Аргюхов

Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1

E-mail: holyavka@rambler.ru

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

E-mail: ma-ko@bk.ru

**Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 2

E-mail: azatik888@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.01.18 г.

После доработки 24.03.18 г.

Созданы компьютерные модели димеров инулиназ из *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum*, *Kluyveromyces marxianus*. Изучены механизмы процессов димеризации инулиназ из различных продуцентов и аминокислотный состав контактных участков (сайтов связывания) между мономерами в составе димера. Димеры экзоинулиназ более сходны по своей структуре, чем димер эндоинулиназы. В процессе димеризации инулиназы при образовании контактов между мономерными формами фермента как из плесневых грибов, так и из дрожжей определяющая роль принадлежит неполярным аминокислотным остаткам.

Ключевые слова: инулиназа, димер, контактные области, надмолекулярная организация, докинг.

DOI: 10.1134/S0006302918060042

Инулиназы участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития. Существуют экзо- (КФ 3.2.1.80) и эндоинулиназы (КФ 3.2.1.7). Эндоинулиназы расщепляют молекулу инулина вдали от концевых остатков фруктозы, продуктами гидролиза являются олигосахариды. Экзоинулиназы отщепляют концевые остатки фруктозы от молекул инулина, сахарозы и раффинозы [1–3].

Инулиназы свойственны растениям и некоторым микроорганизмам. Среди микромицетов хорошо известны такие их продуценты, как *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Chrysosporium pannorum* и *Penicillium purpurogenum*; среди дрожжей – *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr*, *Debaryomyces cantarellii* и *Pichia polymorpha*. Дрожжи продуцируют только экзоинулиназу, плесневые грибы – ее эндо- и экзо-форму [4–11].

Для понимания механизма действия инулиназ *in vivo* необходимо исследовать их структурно-функциональные свойства, особенности молекулярной и надмолекулярной организации, поэтому работы, посвященные описанию молекулярных особенностей инулиназ в условиях различного микроокружения, имеют значительный теоретический и прикладной потенциал.

В литературе имеются противоречивые данные относительно надмолекулярной организации инулиназ. Это характерно не только для ферментов, полученных из различных видов одного рода (в качестве примера могут послужить роды *Kluyveromyces*, *Aspergillus* и *Arthro bacter*), но даже для энзимов, выделенных из штаммов одного и того же вида микроорганизма. Одни авторы утверждают, что инулиназа представлена только в мономерной форме, другие показывают наличие четвертичной структуры в виде димера или даже тетрамера. Для инулиназ из *Aspergillus awamori* ВКМФ-2250, *Aspergillus niger*, *Arthro bacter* sp. S37 и *Kluyveromyces marxianus* было зафиксировано влияние процесса олигомеризации на способность фер-

мента расщеплять инулин: мономерная форма белка обладала меньшей способностью к ферментативному катализу, чем димер [5,12–23].

Имеется мало опубликованных данных о структурных особенностях инулиназы и родственных ей ферментов из группы гликозидгидролаз (GH32). В работе [24] на основе данных рентгеноструктурного анализа была построена пространственная модель экзоинулиназы, выделенной из *Aspergillus awamori*. Было показано, что фермент состоит из двух доменов, которые объединены короткими полипептидными линкерами, а пространственная ориентация доменов стабилизируется многочисленными водородными связями и гидрофобными взаимодействиями.

Авторы работы [25] получили первые кристаллы эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* и далее ее пространственную модель, согласно которой фермент состоит из двух доменов: N-концевой (каталитический) домен представлен пятилопастным β -пропеллером, C-концевой домен является β -сэндвичем [25].

Несмотря на широкое обсуждение проблемы пространственной организации ферментных систем, отсутствуют исчерпывающие данные, касающиеся изучения фермент-ферментных взаимодействий, взаимосвязи физико-химических характеристик белков с их способностью образовывать надмолекулярные комплексы. Кроме того, возможность процессов ассоциации-диссоциации молекул фермента необходимо учитывать при создании гетерогенных (иммобилизованных) ферментных препаратов, биосенсоров и биочипов для промышленности и медицины.

По этой причине целью нашей работы было создать компьютерные модели димеров инулиназы из плесневых грибов *Aspergillus* и дрожжей *Kluyveromyces*, выявив особенности их надмолекулярной организации и типы контактов между мономерами экзо- и эндо-форм фермента.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объектов исследования выступали экзоинулиназа из *Aspergillus awamori* (PDB ID: 1Y4W) [24], эндоинулиназа из *Aspergillus ficuum* (PDB ID: 3SC7) [25] и экзоинулиназа из *Kluyveromyces marxianus*, которая была получена путем реконструкции методами высокопроизводительного компьютерного моделирования на основе молекулы инвертазы из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (PDB ID: 4EQV) [26].

Степень идентичности (identities) и степень (процент) перекрытия (query coverage) ами-

нокислотных последовательностей инулиназ определяли с помощью программы BLAST. Моделирование белковых комплексов осуществляли в программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock. Эти пять программ имеют несколько различающиеся алгоритмы расчетов моделей с минимальным значением общей энергии системы. Так как в нашем эксперименте все программы дали приблизительно одинаковый численный результат, мы считаем, что расчет проведен адекватно, а полученные нами данные корректны.

Перед проведением численных расчетов центры молекул инулиназы и параметры бокса («ячейки») мы задавали вручную, добиваясь того, чтобы обе молекулы фермента полностью находились внутри расчетной области пространства. Каждый из лигандов в расчетах докинга имел максимальную конформационную свободу: допускалось вращение функциональных групп вокруг всех одинарных связей. Применяли так называемый «слепой» докинг. В программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock существует ранжирование по энергии комплекса: мы отбирали 10 «лучших» (с минимальной энергией) позиций лиганда (один мономер инулиназы), связанного с рецептором (второй мономер фермента). Результаты эксперимента мы считали корректными, если три «лучшие» позиции лиганда связывались в одной и той же области.

Из полученных каждой программой данных мы рассчитывали средние значения количества неполярных, полярных незаряженных, заряженных отрицательно и заряженных положительно аминокислотных остатков. Из структур 1Y4W и 3SC7 были предварительно удалены низкомолекулярные соединения [27]. Визуализацию молекулярных структур осуществляли в программах Jmol и Swis PDB Viewer.

Расчет параметров пор, туннелей и полостей осуществляли в программном обеспечении Mole. Под «полостью» понимали свободное замкнутое пространство внутри глобулы фермента, не сообщающееся с поверхностью молекулы. Под «порой» – свободное пространство внутри глобулы, сообщающееся с ее поверхностью только через одно отверстие, т.е. углубление на поверхности или в толще молекулы. Под «туннелем» мы подразумевали сквозное отверстие в белковой глобуле, т.е. свободное пространство внутри молекулы, сообщающееся с ее поверхностью через два и более отверстий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Степень идентичности между аминокислотными последовательностями инулиназ из *Aspergillus awamori* и *Aspergillus ficuum* равна 35%, степень перекрытия последовательностей составила 98%; для ферментов из *Aspergillus awamori* и *Kluyveromyces marxianus* степень идентичности – 33%, степень перекрытия – 94%; для инулиназ из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* степень идентичности – 31%, степень перекрытия – 64%. Несмотря на отличия в первичной структуре дрожжевой инулиназы по сравнению с двумя ферментами из плесневого гриба, пространственные структуры мономеров инулиназ из *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* сходны между собой (рис. 1).

Локализация гидрофобных и заряженных аминокислотных остатков на поверхности молекулы мономеров более сходна у экзоинулиназ из *Aspergillus awamori* и *Kluyveromyces marxianus*, чем у двух инулиназ из плесневого гриба (рис. 2, 3). Расположение внутренних полостей, пор и туннелей в молекулах инулиназ существенно отличается у всех трех ферментов, несмотря на внешнее сходство пространственной структуры их глобул (рис. 4–6). Стоит отметить, что как в молекуле мономера, так и в молекуле димера инулиназы из *Aspergillus awamori* отсутствуют поры. У инулиназы из *Aspergillus ficuum* наибольшее из трех ферментов количество внутренних полостей, но при этом только одна пора и три туннеля.

Пространственная организация димеров более сходна у двух экзоинулиназ, чем у инулиназ из продуцентов одного рода *Aspergillus* (рис. 1). Расположение внутренних полостей, пор и туннелей в молекулах инулиназ по-прежнему существенно отличается у всех трех ферментов (рис. 4–6). У инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* после димеризации снизилось количество внутренних полостей.

Для энзима из *Aspergillus awamori* можно констатировать следующее: семь из десяти туннелей в молекуле мономера полностью сохранили свою организацию в субъединицах димера, кроме того, после процесса димеризации образовались три новых симметричных туннеля в обеих субъединицах фермента. Поскольку эти туннели – самые крупные из всех наблюдаемых нами и в мономере, и в димере, вероятно, они образовались из близлежащих туннелей мономера путем их слияния и последующей перегруппировки молекулы фермента в ходе формирования димера.

Единственная пора мономера инулиназы из *Aspergillus ficuum* без изменения структуры перешла в субъединицы димера. Кроме нее, при димеризации образовались четыре новые поры, непарные и общие для обеих субъединиц. Два из трех туннелей фермента из *Aspergillus ficuum* перешли в субъединицы димера с сохранением своей структуры. При димеризации образовались еще по два новых симметричных туннеля в каждой субъединице.

Из шестнадцати пор молекулы мономера инулиназы из *Kluyveromyces marxianus* только две перешли в состав димера без изменения их организации. Кроме них, в структуре димера зафиксировано наличие еще трех парных и 27 непарных пор. Девять из двенадцати туннелей без изменения структуры перешли в димер при слиянии мономеров. Кроме того, в димере сформировались еще шесть парных и три непарных туннеля.

В процессе димеризации экзоинулиназы из *Aspergillus awamori*, согласно рассчитанной нами модели молекулы с минимальной полной энергией системы, с поверхности мономера в область контакта субъединиц в состав димера перешли следующие аминокислотные остатки: неполярные – Phe20, Pro85, Val86, Leu89, Phe93, Leu157, Leu161 и Trp536; полярные незаряженные – Asn21, Gln35, Ser95 и Thr162; заряженные отрицательно – Glu82, Glu83 и Asp158; заряженные положительно – Lys36 и Lys118, причем Leu161 и Thr162 по-прежнему выходят на поверхность одной из полипептидных цепей димера, а Lys118 – минимум на 20% просматривается на поверхности обеих субъединиц. На поверхности димера появляются остатки, не характерные для поверхности мономера – Leu210 и Asn67. Некоторые аминокислотные остатки, вероятно, уходят вглубь белковой глобулы при димеризации, так как присутствуют на поверхности мономера, но отсутствуют в области контакта субъединиц и на поверхности димера (Val477, Gly494) или наблюдаются на поверхности только одной из субъединиц (Asn112, Ser198, Glu404, Lys364).

При формировании димера эндоинулиназы из *Aspergillus ficuum* (была взята модель с минимальным значением общей энергии системы) с поверхности мономера в область контакта мономеров в составе димера перешли следующие аминокислотные остатки: неполярные – Val66, Ile168, Leu172, Ile437 и Pro441; полярные незаряженные – Thr432 и Ser438; заряженный отрицательно – Glu258. На поверхность только одной из полипептидных цепей димера из них выходят Val66 и Ile168. Положительно заряженных аминокислотных остатков в зоне кон-

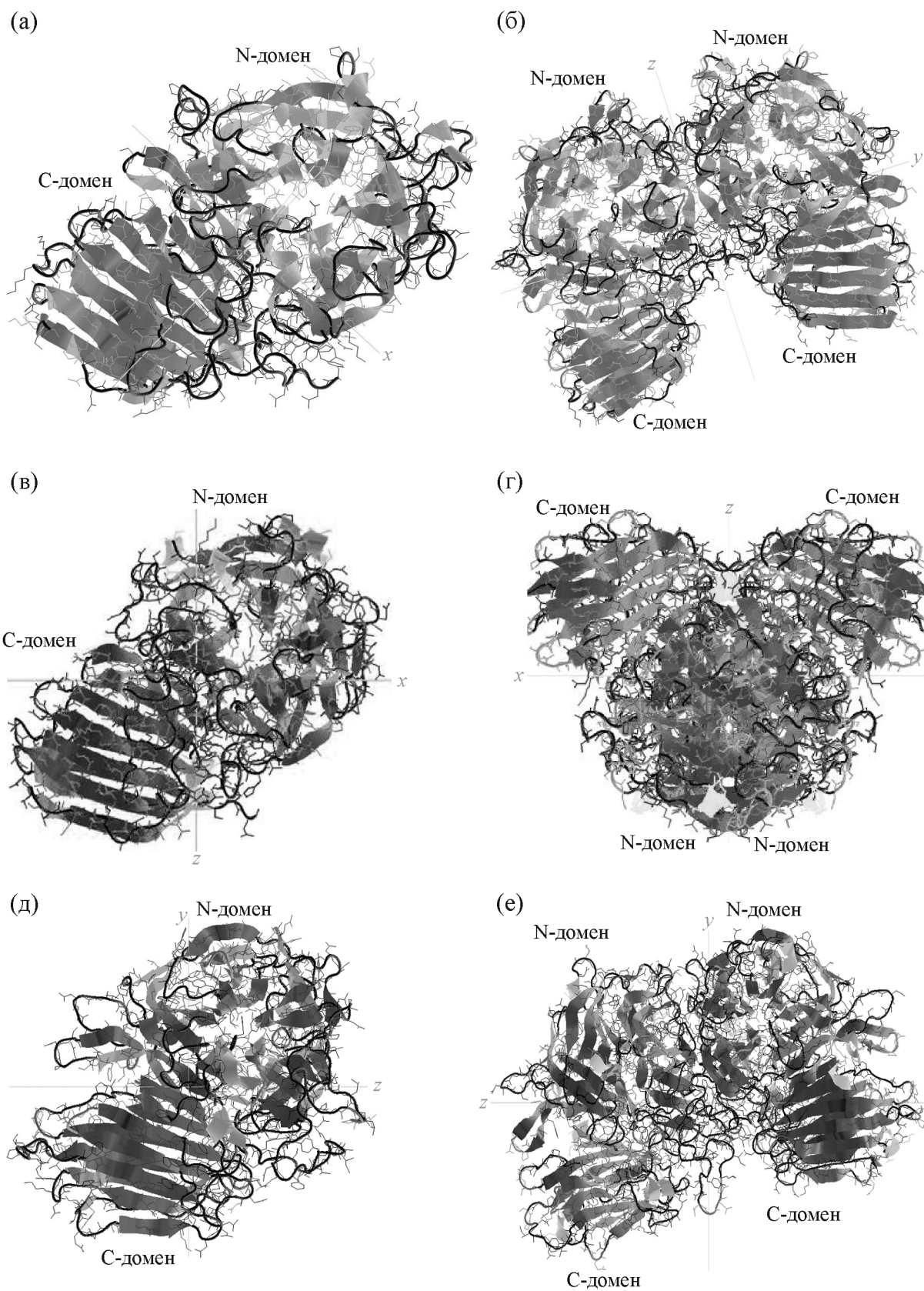


Рис. 1. Структуры мономеров (левый столбец) и димеров (правый столбец) инулиназ. Представлены экзоинулиназа *Aspergillus awamori* (а, б), эндоинулиназа *Aspergillus ficuum* (в, г) и экзоинулиназа *Kluyveromyces marxianus* (д, е).

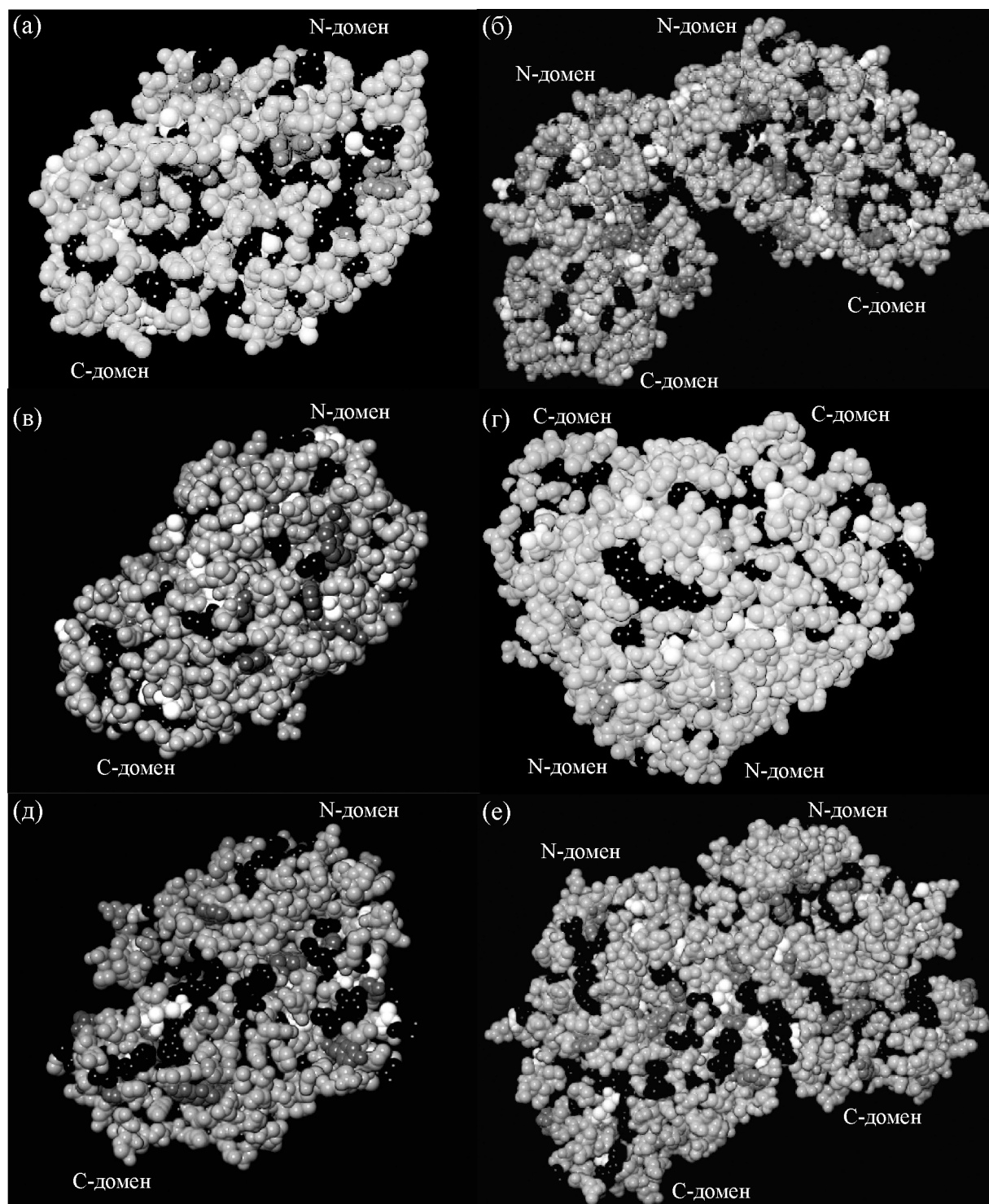


Рис. 2. Гидрофобные аминокислотные остатки на поверхности молекул мономеров (левый столбец) и димеров (правый столбец) инулиназ (цветами в ряду «черный → темно-серый → белый» выделены гидрофобные аминокислотные остатки в порядке уменьшения гидрофобности). Представлены экзоинулиназа *Aspergillus awamori* (а, б), эндоинулиназа *Aspergillus ficuum* (в, г) и экзоинулиназа *Kluyveromyces marxianus* (д, е).

такта субъединиц обнаружено не было. Некоторые аминокислотные остатки мигрируют внутрь молекулы после образования димера,

так как присутствуют на поверхности мономера, но отсутствуют в области контакта субъединиц и на поверхности димера (Gly196, Pro327,

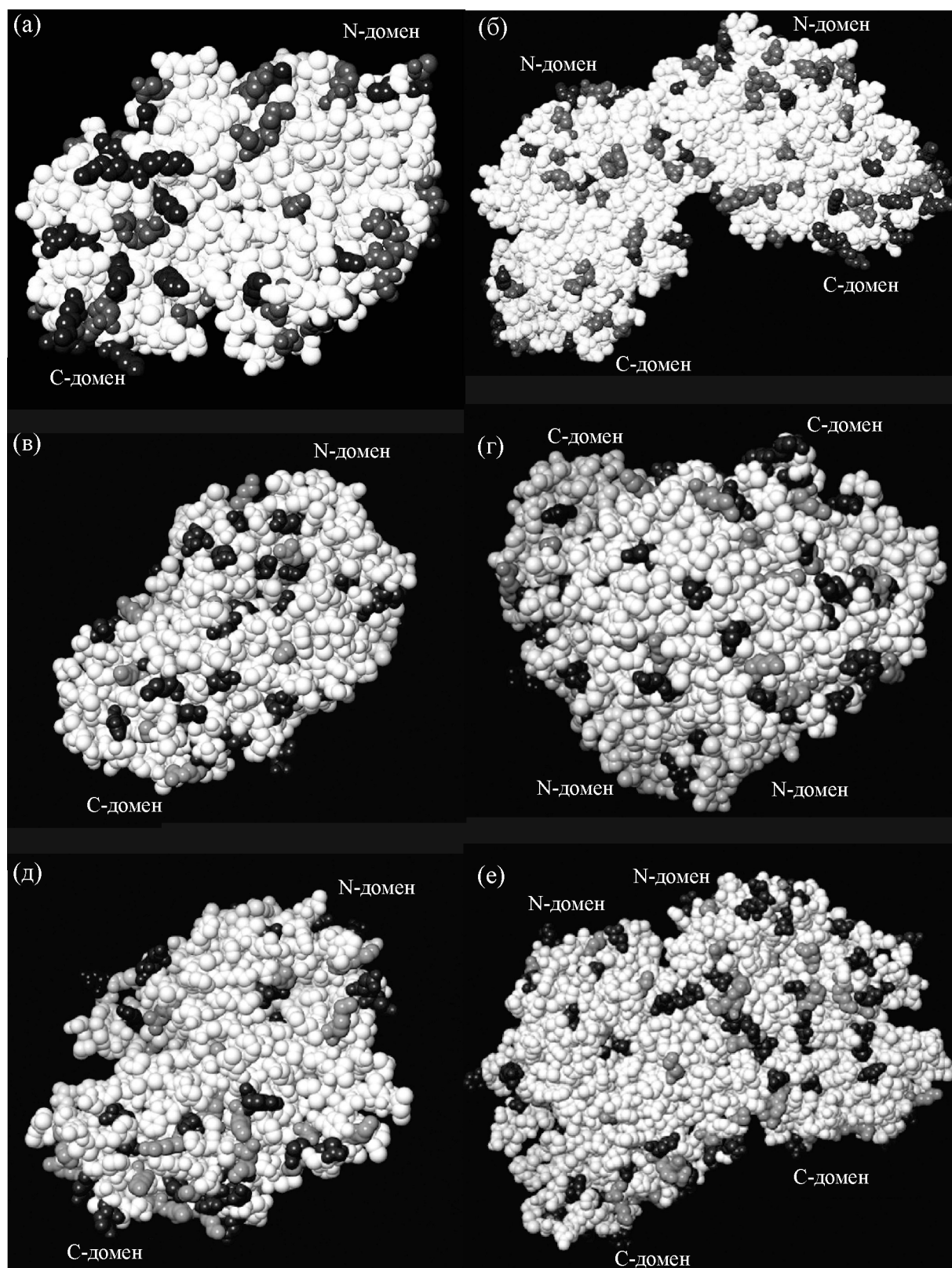


Рис. 3. Заряженные аминокислотные остатки на поверхности молекул мономеров (левый столбец) и димеров (правый столбец) инулиназ (темно-серым цветом выделены остатки, заряженные положительно, серым – заряженные отрицательно). Представлены экзоинулиназа *Aspergillus awamori* (а, б), эндоинулиназа *Aspergillus ficium* (в, г) и экзоинулиназа *Kluyveromyces marxianus* (д, е).

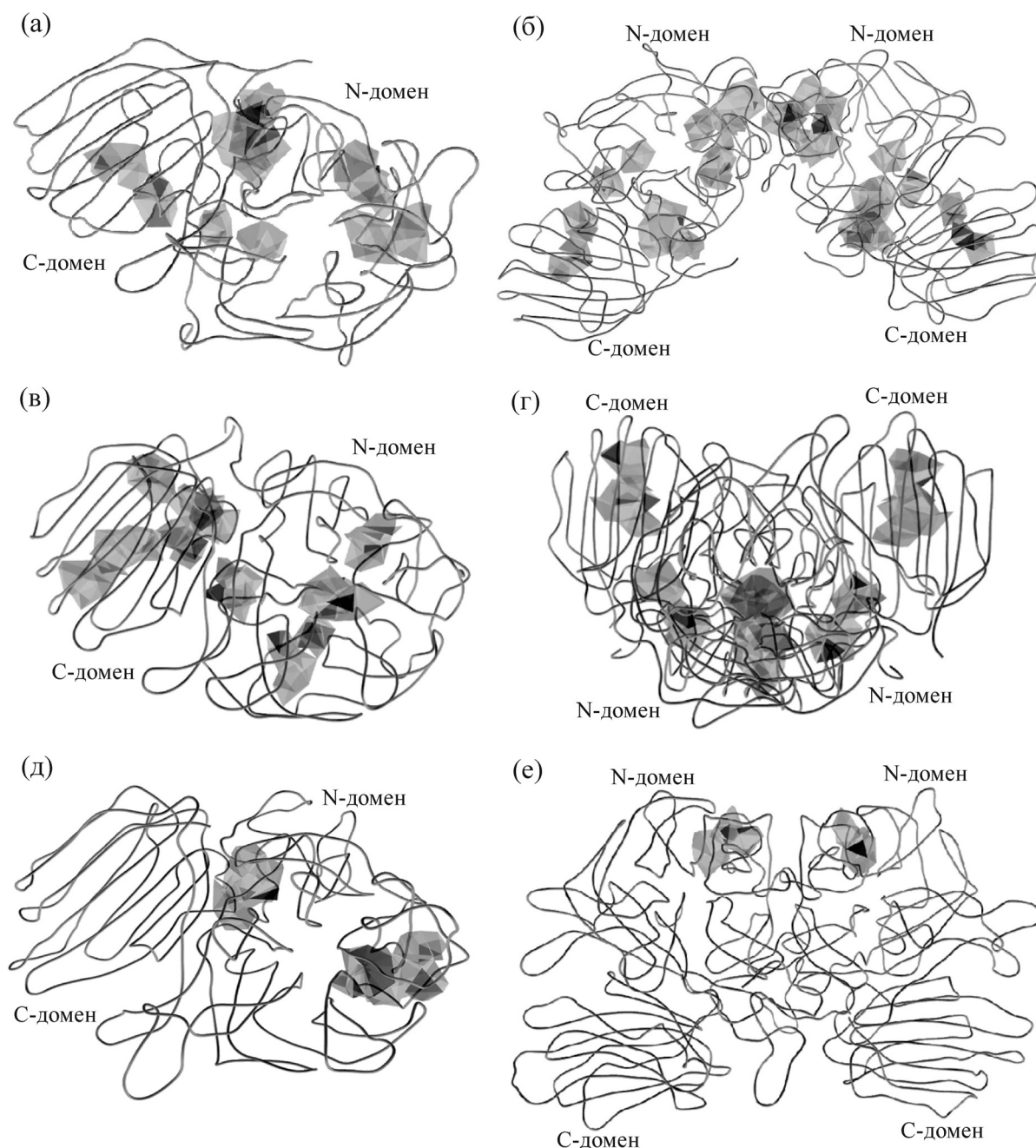


Рис. 4. Внутренние полости в молекулах мономеров (левый столбец) и димеров (правый столбец) инулиназ. Представлены экзоинулиназа *Aspergillus awamori* (а, б), эндоинулиназа *Aspergillus ficuum* (в, г) и экзоинулиназа *Kluyveromyces marxianus* (д, е).

Val446, Asn65, Thr169, Ser324) или наблюдаются только на поверхности одной из субъединиц (Ala91, Tyr104, Ser159, Ser221, Asp228).

В процессе димеризации экзоинулиназы из *Kluyveromyces marxianus* (модель с минимальной полной энергией системы) с поверхности мономера в область контакта полипептидных цепей в составе димера перешли следующие аминокислотные остатки: неполярные – Leu7, Leu8

и Leu383; полярные незаряженные – Thr31, Ser95 и Thr97; заряженные отрицательно – Asp98, Asp108 и Asp159; заряженные положительно – His48 и Lys91, причем Asp108 выходит на поверхность одной из субъединиц димера, Leu7 минимум на 20% просматривается на поверхности обеих субъединиц. На поверхности димера появляется Asp169, не характерный для поверхности мономера. Некоторые аминокис-

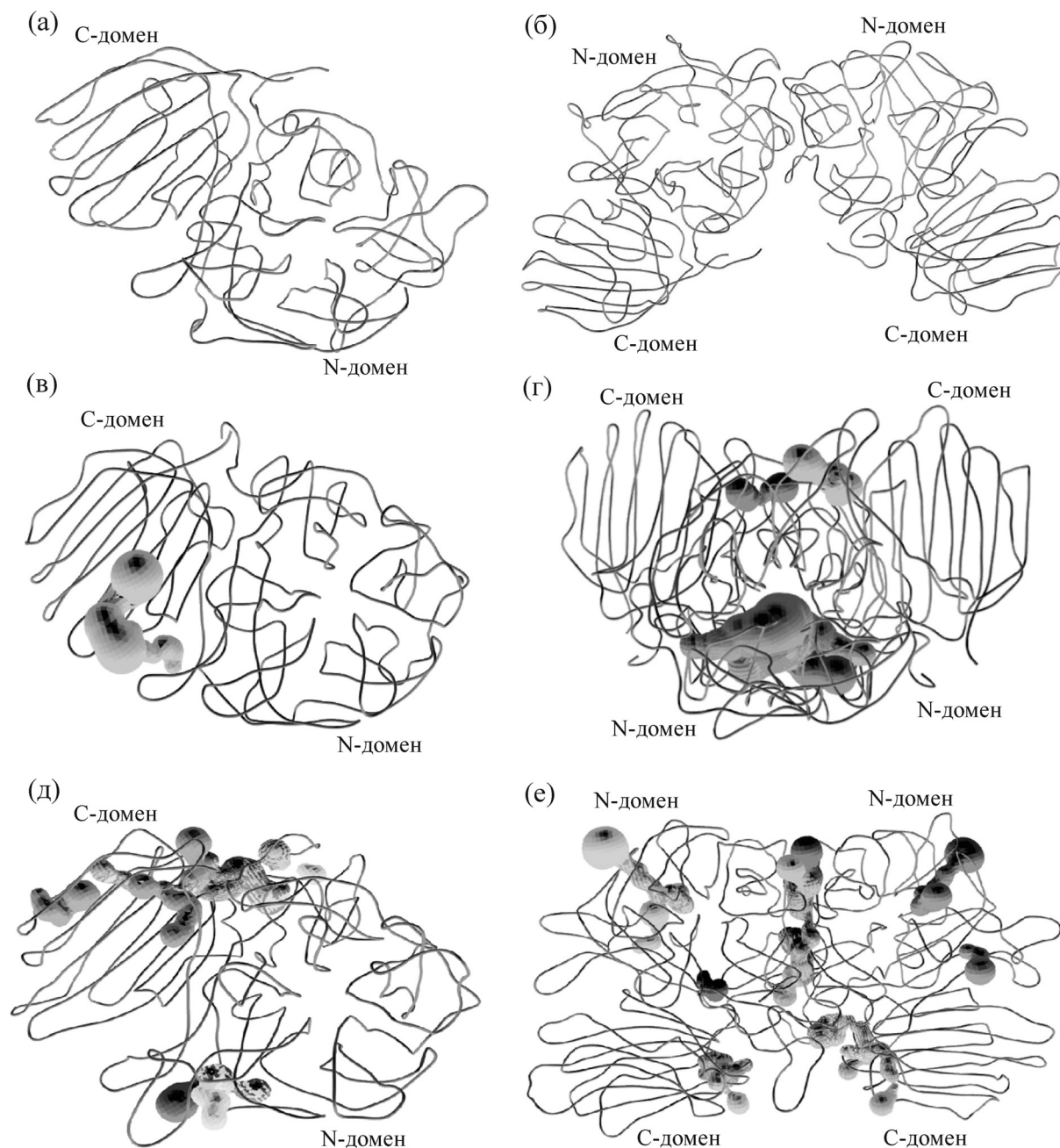


Рис. 5. Поры в молекулах мономеров (левый столбец) и димеров (правый столбец) инулиназ. Представлены экзоинулиназа *Aspergillus awamori* (а, б), эндоинулиназа *Aspergillus ficium* (в, г) и экзоинулиназа *Kluyveromyces marxianus* (д, е).

лотные остатки, по-видимому, уходят вглубь глобулы при димеризации, так как присутствуют на поверхности мономера, но отсутствуют в области контакта субъединиц и на поверхности димера (Ala75, Trp79, Ala101, Thr33, Ser47, Tyr99, Tyr162, Thr163) или наблюдаются на поверхности только одной из субъединиц (Leu9, Ala12, Ser149, Asn423, Asp445, Lys505).

В таблице представлены типы аминокислотных остатков в составе контактных площадок при образовании димера инулиназы. Из расчетов следует, что количество неполярных и полярных незаряженных аминокислотных остатков, которые встречаются в составе контактных площадок (сайтов связывания) при формировании димера инулиназы, значительно выше, чем количество остатков, заряженных отрица-

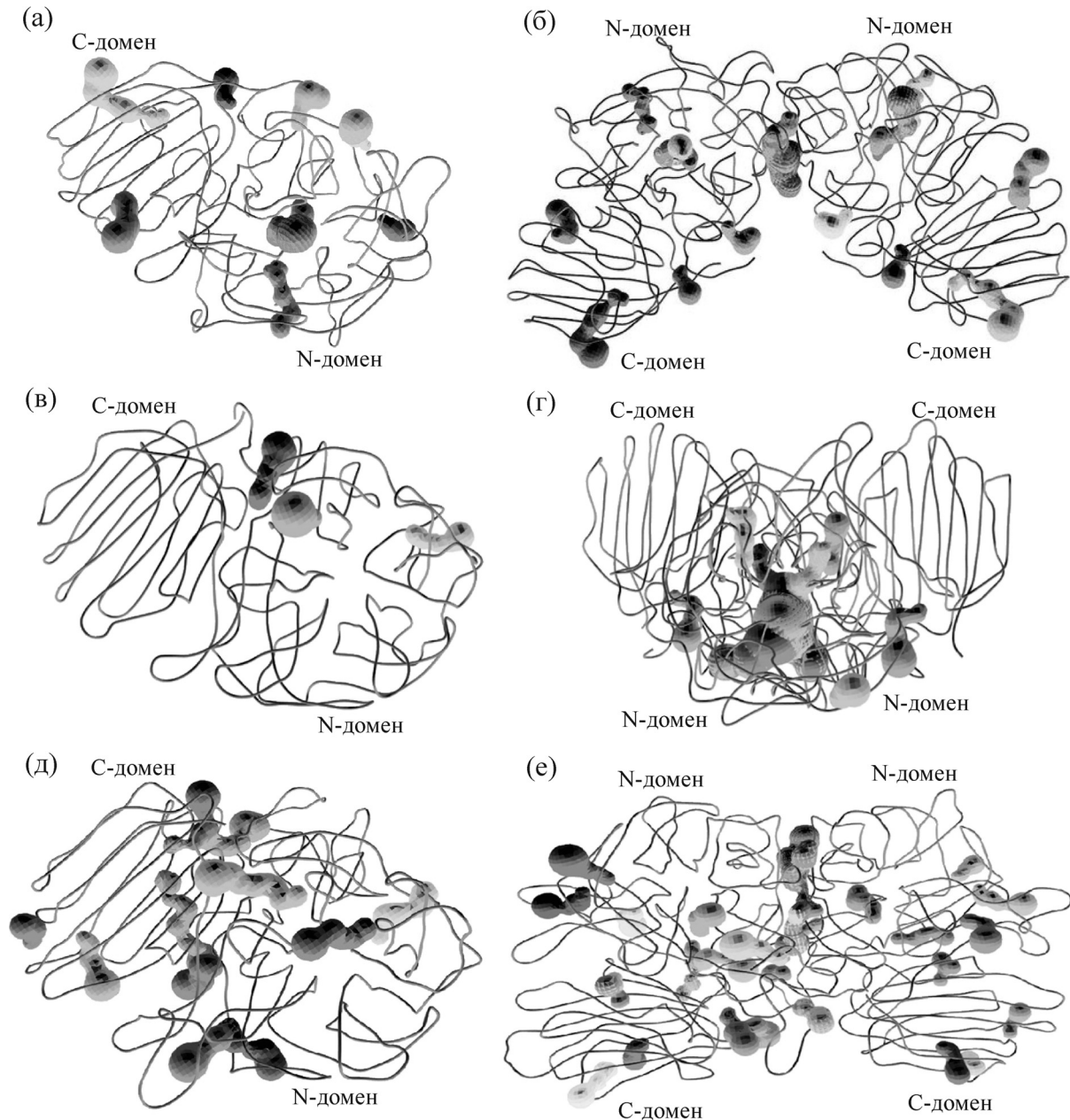


Рис. 6. Туннели в молекулах мономеров (левый столбец) и димеров (правый столбец) инулиназ. Представлены экзоинулиназа *Aspergillus awamori* (а, б), эндоинулиназа *Aspergillus ficuum* (в, г) и экзоинулиназа *Kluyveromyces marxianus* (д, е).

тельно и положительно. (Приведенные результаты представляют собой анализ расчетов (среднее значение) по всем моделям, полученным в программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock.) В процессе димеризации инулиназы ключевая роль, вероятно, принадлежит неполярным аминокислотным остаткам, что хорошо согласуется с результатами ИК-спектроскопии, изложенными в нашей работе [19].

Коэффициент корреляции между количеством различных типов аминокислотных остатков в составе контактных площадок при образовании димера инулиназы из *Aspergillus awamori* и *Aspergillus ficuum* составляет 0,957, из *Aspergillus awamori* и *Kluyveromyces marxianus* – 0,999, из *Aspergillus ficuum* и *Kluyveromyces marxianus* – 0,965. Экзоинулиназа из *Aspergillus awamori* и эндоинулиназа из *Aspergillus ficuum* имеют более схожие первичные структуры, однако механизм

Аминокислотные остатки в составе контактных площадок при образовании димера инулиназы

Аминокислотные остатки	Экзоинулиназа <i>Aspergillus awamori</i>	Эндоинулиназа <i>Aspergillus ficuum</i>	Экзоинулиназа <i>Kluyveromyces marxianus</i>
Неполярные	42,23%	38,28%	43,51%
Полярные незаряженные	33,05%	38,28%	35,10%
Заряженные отрицательно	12,16%	14,19%	10,32%
Заряженные положительно	12,56%	9,25%	11,07%

формирования димеров у них отличается в большей степени по сравнению с двумя экзоинулиназами.

Обобщая результаты приведенных в литературе работ и собственных экспериментов, можно заключить, что молекулы инулиназы встречаются как в мономерной, так и в других (преимущественно димерных) формах. В процессе димеризации инулиназы при формировании контактных площадок ключевая роль, по нашим данным, принадлежит неполярным аминокислотным остаткам, также возможно участие электростатических взаимодействий между мономерами молекул фермента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Onodera and N. Shiomi, *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2569 (1988).
2. K. Ohta, N. Suetsugu, and T. Nakamura, *J. Biosci. Bioengineer.* **94** (1), 78 (2002).
3. A. Basso, P. Spizzo, V. Ferrario, et al., *Biotechnol. Prog.* **26** (2), 397 (2010).
4. I. Beluche, J. P. Guiraud., P. Galzy, *Folia Microbiol.* **25** (1), 32 (1980).
5. R. J. Rouwenhorst, M. Hensing, J. Verbakel, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (11), 3337 (1990).
6. G. G. Sokolenko and N. A. Karpechenko, *Biotechnology in Russia* **6**, 18 (2013).
7. G. G. Sokolenko and N. A. Karpechenko, *Microbiology (Mikrobiologiya)* **84** (1), 23 (2015).
8. M. Arand, A. M. Golubev, J. R. B. Neto, et al., *Biochem. J.* **362** (1), 131 (2002).
9. A. A. Kulminskaya, E. V. Eneyskaya, D. R. Ivanen, et al., *Biochim. Biophys. Acta – Proteins and Proteomics* **1650** (1–2), 22 (2003).
10. Т. Р. Рутковская, Г. П. Шуваева и О. С. Корнеева, *Фундаментальные исследования* **10**, 17 (2010).
11. О. С. Корнеева, Н. А. Жеребцов, Г. П. Шуваева и др., *Биотехнология* **7**, 31 (1993).
12. A. Pessoa and M. Vitolo, *Biotechnol. Tech.* **11** (6), 421 (1997).
13. R. T. Kushi, R. Monti, and J. Contiero, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **25** (2), 63 (2000).
14. K. Y. Kim, S. Rhee, and S. I. Kim, *J. Biochem.* **138** (1), 27 (2005).
15. P. K. Gill, R. K. Manhas, and P. Singh, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **117** (1), 19 (2004).
16. M. Kawamura, S. Takahashi, and T. Uchiyama, *Agric. Biol. Chem.* **52** (12), 3209 (1988).
17. A. Yokota, K. Enomoto, and F. Tomita, *Ferment. Bioeng.* **72** (4), 262 (1991).
18. K. Haraguchi, M. Kishimoto, K. Seki, et al., *Agric. Biol. Chem.* **52** (1), 291 (1988).
19. V. G. Artyukhov, T. A. Kovaleva, M. G. Kholyavka, et al., *Biophysics* **54** (6), 675 (2009).
20. Т. А. Ковалева и М. Г. Холявка, *Вопр. биологич., мед. и фармацевтич. химии* **1**, 3 (2001).
21. V. G. Artyukhov, M. G. Holyavka, and T. A. Kovaleva, *Biophysics* **58** (4), 493 (2013).
22. М. Г. Холявка, Т. А. Ковалева и В. Г. Артюхов, *Вопр. биологич., мед. и фармацевтич. химии* **7**, 37 (2013).
23. М. Г. Holyavka, Т. А. Kovaleva, M. V. Grechkina, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **50** (1), 10 (2014).
24. R. A. Nagem, A. L. Rojas, A. M. Golubev, et al., *J. Mol. Biol.* **344** (11), 471 (2004).
25. J. Pouyez, A. Mayard, A. M. Vandamme, et al., *Biochimie* **94** (11), 2423 (2012).
26. A. V. Abdullatypov, M. S. Kondratyev, M. G. Kholyavka, and V. G. Artyukhov, *Biophysics* **61** (4), 565 (2016).
27. M. G. Holyavka, V. G. Artyukhov, and S. M. Makin, *Biophysics* **60** (4), 522 (2015).

**Supramolecular Organization of Inulinases from *Aspergillus awamori*,
Aspergillus ficuum and *Kluyveromyces marxianus*:
A Comparative Aspect**

M.G. Holyavka*, S.M. Makin*, M.S. Kondratyev, A.V. Abdullatypov***,
T.A. Kovaleva*, and V.G. Artyukhov***

**Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia*

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

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

Computer models for the dimers of inulinases from *Aspergillus awamori*, *Aspergillus ficuum*, *Kluyveromyces marxianus* are now developed. Mechanisms of the processes of dimerization of inulinases from various producers and the amino acid composition of the binding sites between the monomers in-dimer structure are studied. Dimers of exoinulinases have more similarities in structure, than endoinulinase dimer does. Non-polar amino acids play a pivotal role in the process of inulinase dimerization during the formation of the bond between the monomer forms of the enzyme both from molds and yeast.

Keywords: inulinase, dimer, contact areas, supramolecular organization, docking