

УДК 577.150.2

## КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ВТОРИЧНЫХ СТРУКТУР ГЛЮКОАМИЛАЗ ИЗ *ASPERGILLUS AWAMORI* И *SACCHAROMYCOPSIS FIBULIGERA*

<sup>1</sup>Кожокина О.М., <sup>2</sup>Ковалева Т.А.<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко» Минздравсоцразвития России;<sup>2</sup>ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж, e-mail: makarova7809@mail.ru

С помощью программы компьютерного моделирования MolScript на базе данных рентгеноструктурного анализа (РСА) осуществлено сравнение вторичных структур глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* и *Saccharomycopsis fibuligera*. Получены данные о типах вторичной структуры, количественном соотношении, топологии упорядоченных и нерегулярных участков.

**Ключевые слова:** глюкоамилаза, вторичная структура, сравнительный анализ,  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -структура,  $\beta$ -изгибы, неупорядоченные участки

## COMPUTER ANALYSIS THE PARTICULARITIES OF SECONDARY STRUCTURES OF GLUCOAMYLASES FROM *ASPERGILLUS AWAMORI* AND *SACCHAROMYCOPSIS FIBULIGERA*

<sup>1</sup>Kozhokina O.M., <sup>2</sup>Kovaleva T.A.<sup>1</sup>Voronezh State Medical Academy;<sup>2</sup>Voronezh State University, Voronezh, -mail: makarova7809@mail.ru

The comparative analysis of secondary structures of glucoamylases from *Aspergillus awamori* and *Saccharomycopsis fibuligera* was carried out with use of the computer programme of simulating MolScript on basis of X-ray structural analysis. The data have been obtained on types of secondary structure, quantitative relationship, topology regular and irregular sites.

**Keywords:** glucoamylase, secondary structure, comparative analysis,  $\alpha$ -spiral,  $\beta$ -sheet,  $\beta$ -bend, unordered sites

Особенности расположения  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -слоев и неупорядоченных участков являются одной из основных характеристик третичной структуры, исследование которой вызывает глубокий интерес при изучении структурно-функциональных свойств ферментов, так как именно данный уровень организации белковой макромолекулы ответствен за осуществление реакции катализа.

Использование метода компьютерного моделирования позволяет не только уточнить информацию о количестве и протяженности элементов вторичной структуры белковой молекулы, но и выявить их пространственную локализацию.

Из данных литературы следует, что в глобулярных белках, трехмерные структуры которых определены методом РСА, обычно около 60% остатков аминокислот участвуют в формировании вторичной структуры [1-6]. Показано, что содержание  $\alpha$ -спиралей в среднем составляет 35%,  $\beta$ -слоев – 15%, реверсивных поворотов – 20-25%. Так как  $\alpha$ -спираль является наиболее часто встречающимся в белках типом вторичной структуры, можно сделать предположение о ее высокой конформационной стабильности. С этим хорошо согласуется

информация о расположении  $\alpha$ -спирали в центре разрешенной области на карте Рамачандрана, а также тот факт, что диполи ее водородных связей имеют линейное расположение, отвечающее минимуму энергии. Кроме того, радиус спирали благоприятствует дисперсионному притяжению между остатками, расположенными по разные стороны от оси спирали.

Особенностью  $\beta$ -структуры является направление цепей. Складчатые листы с обоими направлениями цепей встречаются часто, хотя структуры, состоящие из параллельных или антипараллельных слоев, более предпочтительны.

На основе данных литературы можно заключить, что реверсивные повороты сконцентрированы на поверхности белковой глобулы, в связи с чем содержат преимущественно гидрофильные остатки [1-6]. Предполагается, что в процессе свертывания полипептидной цепи повороты играют пассивную роль, образуя участки наименьшего сопротивления невалентным силам, стремящимся изогнуть цепь. Подтверждением служит большое разнообразие наблюдаемых поворотов, ни один из которых не имеет стабильной конформации.

Содержание элементов вторичной структуры в молекулах глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* и *Saccharomycopsis fibuligera*

Конформация	Глюкоамилаза из <i>Aspergillus awamori</i>		Глюкоамилаза из <i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	
	Номера остатков в составе структуры	Содержание структуры, %	Номера остатков в составе структуры	Содержание структуры, %
α-спирали	1: 1...20 2: 54...68 3: 72...89 4: 126...144 5: 148...168 6: 186...205 7: 211...227 8: 245...254 9: 272...285 10: 318...338 11: 345...354 12: 368...391 13: 416...429	27,1	1: 18...35 2: 69...84 3: 89...107 4: 146...163 5: 182...200 6: 218...237 7: 240...258 8: 290...298 9: 314...330 10: 364...383 11: 393...400 12: 424...447 13: 472...489	24,5
β-структура	1: 21...23 2: 49...53 3: 107...109 4: 114...116 5: 173...175 6: 181...183 7: 235...237 8: 339...344 9: 360...363 10: 398...403 11: 407...415	22,9	1: 36...39 2: 50...55 3: 63...68 4: 126...129 5: 205...208 6: 210...217 7: 264...277 8: 350...357 9: 360...363 10: 385...391 11: 415...421 12: 454...459 13: 464...470	24,5
β-изгибы	1: 20...21 2: 53...54 3: 338...339 4: 344...345 5: 415...416	10,4	1: 35...36 2: 68...69 3: 217...218 4: 363...364	7,6
Неупорядоченные участки	1: 23...49 2: 68...72 3: 89...107 4: 109...114 5: 116...126 6: 144...148 7: 168...173 8: 175...181 9: 183...186 10: 205...211 11: 227...235 12: 237...245 13: 254...272 14: 285...318 15: 354...360 16: 363...368 17: 391...398 18: 403...407 19: 429...471	39,6	1: 1...18 2: 39...50 3: 55...63 4: 84...89 5: 107...126 6: 129...146 7: 163...182 8: 200...205 9: 208...210 10: 237...240 11: 258...264 12: 277...290 13: 298...314 14: 330...350 15: 357...360 16: 383...385 17: 391...393 18: 400...415 19: 421...424 20: 447...454 21: 459...464 22: 470...472 23: 489...492	43,4

На основе данных PCA с помощью программы MolScript [8] нами были построены трехмерные изображения α-спиралей, β-структур, неупорядоченных участков глю-

коамилаз различного происхождения. Модели элементов вторичной структуры фермента из плесневого микромицета были созданы на основе результатов PCA А. Aleshin et. al. для

глюкоамилазы-II из *Aspergillus awamori* X100, представляющей собой комплекс каталитического домена и N-терминального участка O-гликозилированного сайта глюкоамилазы-I [7]. Для построения трехмерного изображения молекулы глюкоамилазы дрожжевого происхождения мы использовали данные PCA A. Solovicova et. al. для энзима из *Saccharomycopsis fibuligera* [9]. Результаты PCA для обоих ферментов получены из Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory.

Анализ топологии и соотношения различных типов вторичной структуры показал, что для фрагмента субъединицы молекулы глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* характерна плотная упаковка ядра в виде 13  $\alpha$ -спиралей, 11  $\beta$ -слоев и 19 неупорядоченных участков. Расположение  $\alpha$ -спиральных участков в структуре фермента обозначено цифрами 1-13 в порядке очередности их локализации в макромолекуле белка. Аналогичным образом представлены  $\beta$ -слои,  $\beta$ -изгибы и неупорядоченные участки (таблица).

Установлено, что  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слои не имеют четко выраженной тенденции располагаться в каких-то определенных местах третичной структуры (например, внутри или на поверхности глобулы, в области N-или C-конца и т.д.). Обнаружено, что среди элементов вторичной структуры отсутствуют полипролиновые спирали,  $\pi$ -спирали, и, очевидно,  $3_{10}$ -спирали. Наличие пяти  $\beta$ -изгибов позволяет молекуле поддерживать компактность, так как с их помощью полипептидная цепь в  $\beta$ -слое может поворачиваться назад, и поэтому такая структура менее склонна выходить за пределы глобулы.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что вторичная структура глюкоамилазы из *Aspergillus awamori* является упорядоченной.

Сравнение характеров свертывания полипептидных цепей в пространстве позволяет устанавливать родственные связи между белками, выделенными из различных продуцентов. Поэтому аналогичный анализ особенностей вторичной структуры был осуществлен для глюкоамилазы из *Saccharomycopsis fibuligera*. Показано, что полипептидная цепь образует 13  $\alpha$ -спиралей, 13  $\beta$ -слоев, 4  $\beta$ -изгиба и 23 неупорядоченных участка (таблица). Установлено, что в целом топология вторичной структуры для глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* и *Saccharomycopsis fibuligera* очень схожа. Увеличение количества  $\beta$ -слоев и аморфных участков в ферменте дрожжевого происхождения объясняется, вероятно, большей протяженностью полипептидной

цепи. Удлинение цепи предусматривает наличие дополнительных факторов компактизации глобулы.

Количество  $\beta$ -изгибов (4) является явно недостаточным для компактности молекулы, в связи с чем глобула глюкоамилазы из *Saccharomycopsis fibuligera* имеет больший объем по сравнению с ферментом из *Aspergillus awamori*. Из таблицы видно, что протяженности  $\alpha$ -спиралей анализируемых белковых структур весьма сходны, равно как и  $\beta$ -слоев.

В  $\beta$ -структуре глюкоамилазы из *Saccharomycopsis fibuligera* лишь седьмой слой является, вероятно, параллельным, остальные двенадцать имеют антипараллельную направленность цепей. Из таблицы следует, что вторичная структура фермента дрожжевого происхождения обладает высокой степенью упорядоченности, равно как и энзим из *Aspergillus awamori*.

Таким образом, нами обнаружено, что в состав вторичной структуры молекул глюкоамилаз плесневого и дрожжевого происхождения входят все основные элементы:  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -слои,  $\beta$ -изгибы и неупорядоченные фрагменты полипептидной цепи. При этом  $\beta$ -структура анализируемых ферментов характеризуется наличием антипараллельных цепей. Выявлено, что заниженное по сравнению со среднестатистическим содержание  $\alpha$ -спиралей компенсируется за счет увеличения количества  $\beta$ -слоев. Показано, что примерно 66% аминокислотных остатков полипептидных цепей глюкоамилаз из *Aspergillus awamori* и *Saccharomycopsis fibuligera* задействованы в образовании упорядоченных элементов вторичной структуры. Топология  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -структур и неупорядоченных участков в молекулах анализируемых белков свидетельствует об их эволюционной близости. Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными литературы о пространственной организации белковых молекул [1-6].

#### Список литературы

1. Кантор Ч. Биофизическая химия. – М.: Мир, 1984. – Т. 1. – 336 с.
2. Мурзин А.Г., Финкельштейн А.В. // Биофизика. – 1983. – Т. 28, № 5. – С. 905.
3. Попов Е.М. Структурно-функциональная организация белков. – М.: Наука, 1992. – 358 с.
4. Степанов В.М. Молекулярная биология. Структура и функции белков. – М.: Высш. шк., 1996. – 335 с.
5. Шерман С.А. Конформационный анализ и установление пространственной структуры белковых молекул. – Минск: Наука и техника, 1989. – 240 с.
6. Шульц Г. Принципы структурной организации белков. – М.: Мир, 1982. – 360 с.
7. Aleshin A.E., Hoffmann C., Firsov L.M. et al. // J. Mol. Biol. – 1994. – Vol. 238, № 6. – P. 575.
8. Kraulis P. // J. Appl. Crystallogr. – 1991. Vol. 24. – P. 946.
9. Solovicova A., Christensen T., Hostinova E. et al. // Eur. J. Biochem. – 1999. – Vol. 264, № 8. – P. 756.