

**IN SILICO АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
МОЛЕКУЛ ЦЕЛЛЮЛАЗ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ****Холявка М.Г.^{1,2}, Ковалева И.Ю.², Бруева М.С.², Богомолов Д.Ю.², Панкова С.М.^{2,3},
Королева В.А.^{2,3}, Артюхов В.Г.²**¹ Севастопольский государственный университет

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ; e-mail: holyavka@rambler.ru

² Воронежский государственный университет

Университетская пл., 1, г. Воронеж, 394018, РФ; e-mail: holyavka@rambler.ru

³ Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

ул. Студенческая, 10, г. Воронеж, 394006, РФ; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Поступила в редакцию 27.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0495

Аннотация. Пространственная структура фермента во многом определяет механизм его функционирования. В частности, изменение количества, структуры и локализации внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле энзима могут менять его термостабильность, механизм диффузии субстрата к активному центру, а также особенности взаимодействия с микроокружением. Исследованы состав, локализация и структура внутренних полостей, туннелей и пор в молекулах целлюлаз из *Thermotoga maritima*, связанных с различными лигандами и имеющих аминокислотные замены. Расчет параметров пор, туннелей и полостей осуществляли в программном обеспечении Mole. Выдвинуто предположение о влиянии данных модификаций на изменение структуры представленных в работе ферментов. Проанализированные в работе данные имеют значительную ценность для понимания процессов конформационных перестроек в молекулах целлюлаз из *Thermotoga maritima* при их связывании с различными лигандами и при наличии точечных мутаций, что может быть полезным при проектировании на основе данных белков промышленных катализаторов и изучении их физиологической роли внутри организма-производителя.

Ключевые слова: *in silico* анализ, целлюлазы, молекулярный комплекс, туннели, полости, поры, изменение конформации.

Целлюлоза является одним из самых распространенных органических материалов в мире, и использование отходов целлюлозной промышленности в качестве сырья для производства этанола является многообещающим подходом к устойчивому удовлетворению текущих и будущих потребностей в энергии [1]. Ферментативный гидролиз целлюлозы является наиболее эффективным путем ее промышленной переработки, поскольку биокатализаторы обладают высокой специфичностью и активностью. Кроме того, среди продуктов реакции в данном случае практически отсутствуют токсичные соединения, что приводит к снижению экологической нагрузки производственного процесса, а также затрат на утилизацию отходов.

Целлюлазы продуцируются различными организмами: грибами, бактериями, актиномицетами, простейшими животными, растениями. Все целлюлазы катализируют гидролиз β -1,4-гликозидных связей. Однако существует множество топологий фермента, начиная от белков, состоящих полностью из β -листов, до β/α -белков и заканчивая полностью α -спиральным белком [2].

Известно, что пространственная структура фермента во многом определяет механизм его функционирования. Так, изменения количества, структуры и локализации внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле энзима могут менять его термостабильность, механизм диффузии субстрата к активному центру, а также взаимодействия с микроокружением [3].

Значительный вклад в изменение конформации биокатализатора вносит его связывание с соединениями различной природы. В качестве таковых могут выступать активаторы, ингибиторы, остатки сахаров, компоненты биомембран и т.д. Изучение изменений пространственной структуры белка при его взаимодействии с различными лигандами дает понимание того, как может варьировать механизм его функционирования в различных условиях [4].

Существенные изменения структуры белковой молекулы наблюдаются также при внесении направленных мутаций. Такие модификации энзимов призваны скорректировать их физико-химические свойства с целью дальнейшего применения либо более детального изучения особенностей биокатализатора. При внесении направленных мутаций также необходимо исследование пространственной структуры белка для более глубокого понимания того, как будет функционировать новая конформация фермента и каким образом она изменилась в результате модификации.

Целью настоящей работы было изучение состава, локализации и структуры внутренних полостей, туннелей и пор в молекулах целлюлаз из *Thermotoga maritima* при связывании с различными лигандами и наличии направленных мутаций.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве объекта исследования выступили целлюлазы из *Thermotoga maritima* (3AMM, 3AMN, 3AMQ, 3VHO и 3VHN) (табл. 1).

Таблица 1. Лиганды, связанные с молекулой целлюлазы из *Thermotoga maritima* в различных моделях

Модель	Лиганды
3AMM	Олигомер 4 молекул β -D-глюкозы
3AMN	4-O- β -D-глюкопиранозил- α -D-глюкопираноза
	Целлобиоза
3AMQ	β -D-глюкоза
3VHN	Целлобиоза
3VHO	Лиганды отсутствуют

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 ИССЛЕДОВАНИЯ

Состав и структура внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле целлюлазы из *Thermotoga maritima*, связанной с различными лигандами.

В составе модели 3AMM обнаружено 5 внутренних полостей с суммарным объемом 748,24 Å³. В 3AMN обнаружено 4 полости с общим объемом 566,17 Å³. Наибольшее количество полостей (6) с наибольшим суммарным объемом (822,11 Å³) наблюдается в составе модели 3AMQ, что, вероятно, может указывать на наибольшую декомпактизацию целлюлазы из *Thermotoga maritima* при связывании с β -D-глюкозой. (рис. 1, табл. 2).

В составе модели 3AMM обнаружены 2 туннеля, сообщающиеся общей пустотой, у молекулы 3AMN – 2 туннеля, находящиеся в разных областях молекулы, в целлюлазе 3AMQ – 3 туннеля, два из которых находятся в одной области молекулы и сообщаются общей пустотой (рис. 2, табл. 3). Профили туннелей представлены на рисунках 3-5.

Установлено, что в данных моделях имеется один общий туннель, аминокислотный состав которого не меняется в зависимости от связанного с целлюлазой лиганда. Это может свидетельствовать о высокой консервативности участка молекулы, в котором находится данный туннель, и, вероятно, о его значительной роли в функционировании фермента. На это также указывает идентичная структура данного туннеля во всех трех моделях целлюлазы из *Thermotoga maritima*.

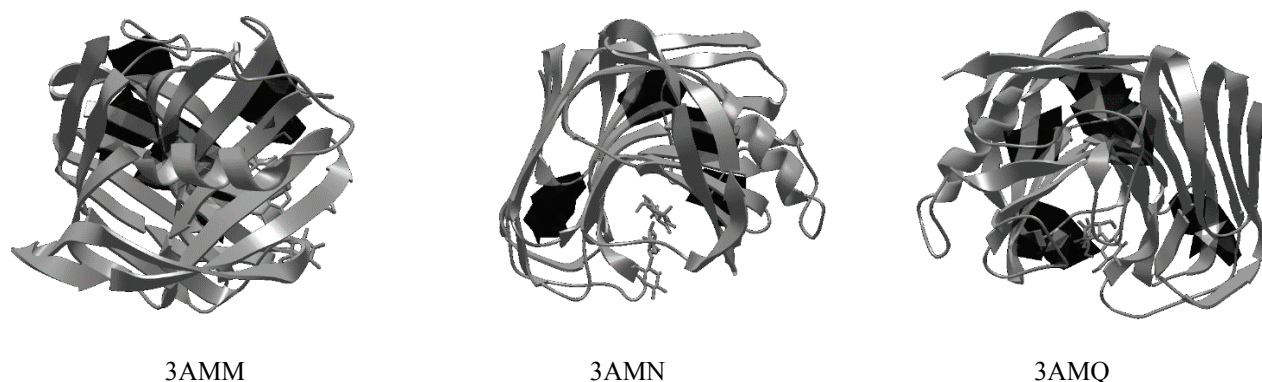


Рисунок 1. Локализация внутренних полостей в различных моделях целлюлазы из *Thermotoga maritima*

Таблица 2. Параметры внутренних полостей в составе моделей пространственной структуры целлюлазы из *Thermotoga maritima*

3AMM			3AMN			3AMQ		
Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)	Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)	Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)
1. Leu19, Phe68, Tyr69, Tyr70, Phe95, Val97, Val99, Trp226, Ile228, Phe249, Ile251	11	169,7	1. Leu19, Phe68, Tyr69, Tyr70, Phe95, Val97, Trp226, Ile228, Phe249, Ile251	10	153,24	1. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Gln125, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Trp178	12	164,7
2. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Gln125, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Glu134, Trp178	13	161,22	2. Thr117, Ile135, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Phe223, Trp226	9	151,62	2. Thr117, Ile135, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Phe223, Trp226	9	148,51
3. Leu23, Asn24, Leu25, Ile28, Tyr31, Val35, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Ala240, Phe242	13	159,53	3. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Trp178	10	138,06	3. Leu19, Phe68, Tyr69, Tyr70, Phe95, Val97, Val99, Trp226, Ile228, Phe249, Ile251	11	146,29
4. Thr117, Ile135, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Phe223, Trp226	9	150,97	4. Leu25, Ile28, Tyr31, Val35, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Phe242	10	123,25	4. Leu25, Ile28, Tyr31, Val35, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Ala240, Phe242	11	143,74
5. Pro18, Leu19, Ser20, Tyr69, Tyr70, Gly71, Thr79, Ala80, Ser83	9	107,05				5. Pro18, Leu19, Ser20, Tyr69, Tyr70, Gly71, Thr79, Ala80, Glu81, Ser83	10	120,98
						6. Val97, Val99, Met115, Phe139, Phe158, Val194, Lys195, Phe196	8	94,98
Общий объем		748,24			566,17			822,11

Таблица 3. Туннели в составе моделей пространственной структуры целлюлазы из *Thermotoga maritima*

3AMM	3AMN	3AMQ
1. Ile156, Pro157, Phe158, Trp169, Phe201, Phe196, Asp197, His200	1. Ile28, Leu53, Ser54, Leu63, Thr237, Pro55, Pro235, Lys238	1. Phe101, Leu160, Arg193, Val194, Val189, Phe139, Phe158, Leu185, Asp187
2. Phe139, Trp169, Phe201, Phe196, Phe158, Pro157, Ile156, Asp197, His200	2. Phe139, Trp169, Phe201, Phe196, Phe158, Pro157, Ile156, Asp197, His200	2. Phe139, Trp169, Phe201, Phe196, Phe158, Pro157, Ile156, Asp197, His200
		3. Leu85, Met92, Phe95, Phe223, Leu253, Tyr70, Ile251

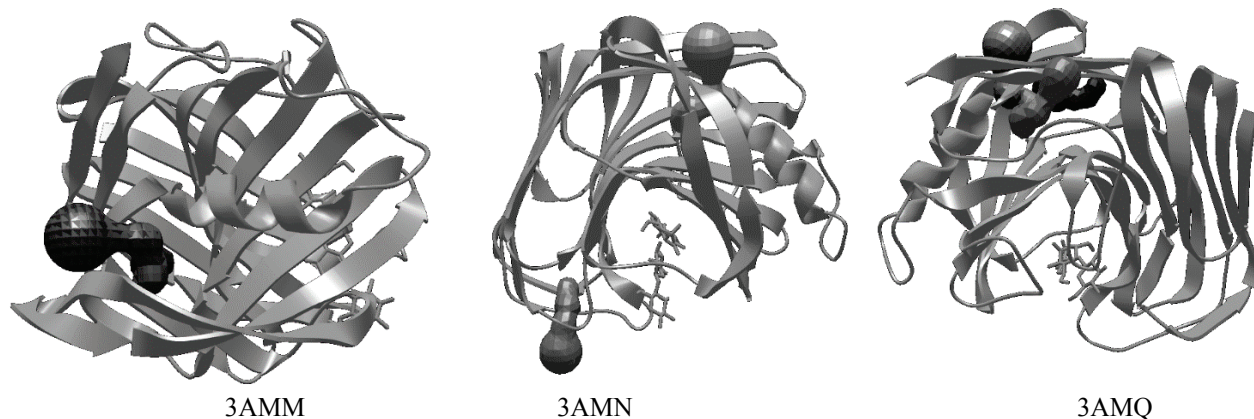


Рисунок 2. Локализация туннелей в различных моделях целлюлазы из *Thermotoga maritima*

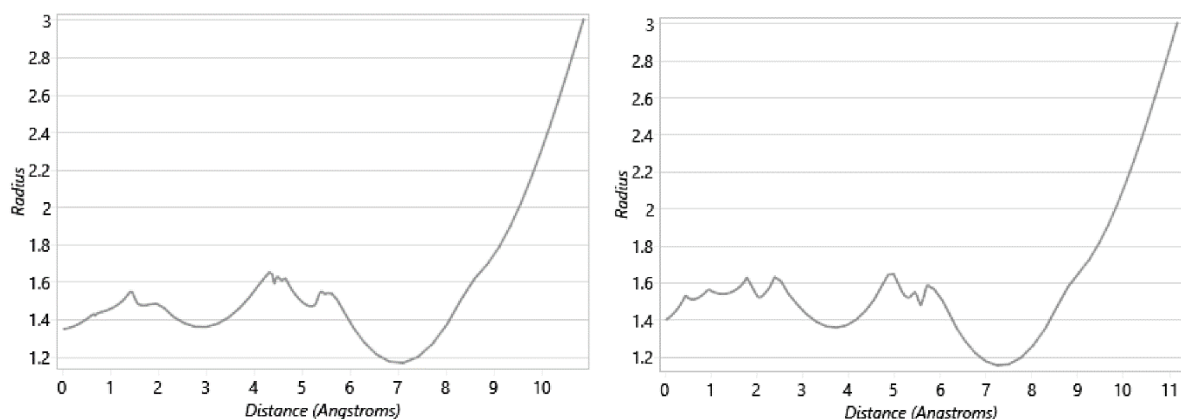


Рисунок 3. Профили туннелей в модели 3AMM

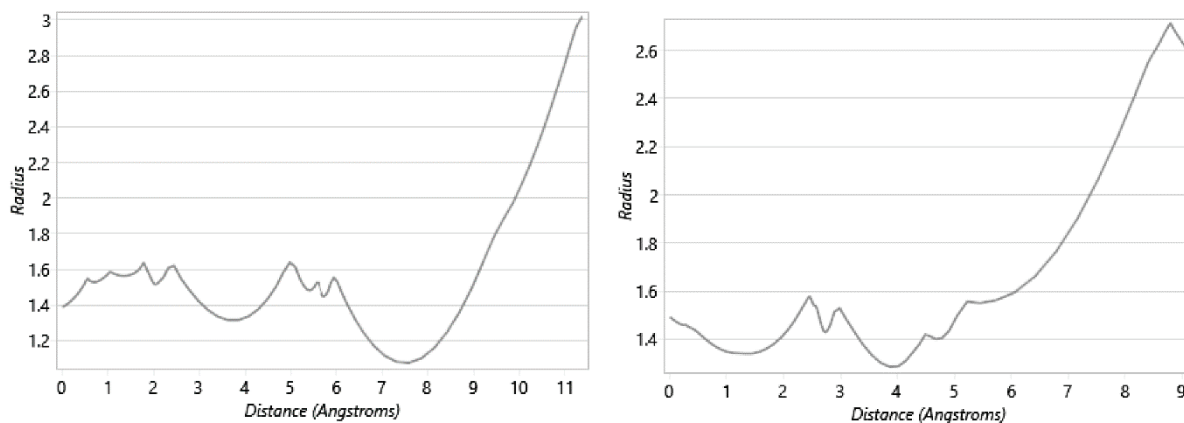


Рисунок 4. Профили туннелей в модели 3AMN

Наибольшее количество туннелей было обнаружено в составе модели 3AMQ, что, вероятно, как и в случае с внутренними полостями, может указывать на наиболее значительное декомпактизирующее действие β -D-глюкозы на целлюлазу из *Thermotoga maritima*. Поры не были обнаружены ни на одной из рассмотренных моделей.

Состав и структура внутренних полостей, туннелей и пор в молекуле целлюлазы из *Thermotoga maritima* с заменой аминокислот Arg60 и Tyr61. Для исследования были выбраны модели 3VHO и 3VHN с заменами в аминокислотах Arg60 и Tyr61. Кроме того, в модели 3VHN присутствует лиганд целлобиоза. В данных моделях обнаружено 3 и 4 полости общим объемом 414,02 и 660,18 Å³ соответственно (табл. 4). Большее количество полостей и их объем в модели 3VHN, вероятно, обусловлено декомпактизирующим действием лиганда. Для туннелей наблюдается обратная картина – в модели 3VHO обнаружено пять туннелей. В то же время, в модели 3VHN выявлено три туннеля (рис. 6-9, табл. 5). В обоих изученных нами моделях было обнаружено по одной поре (рис. 10, 11).

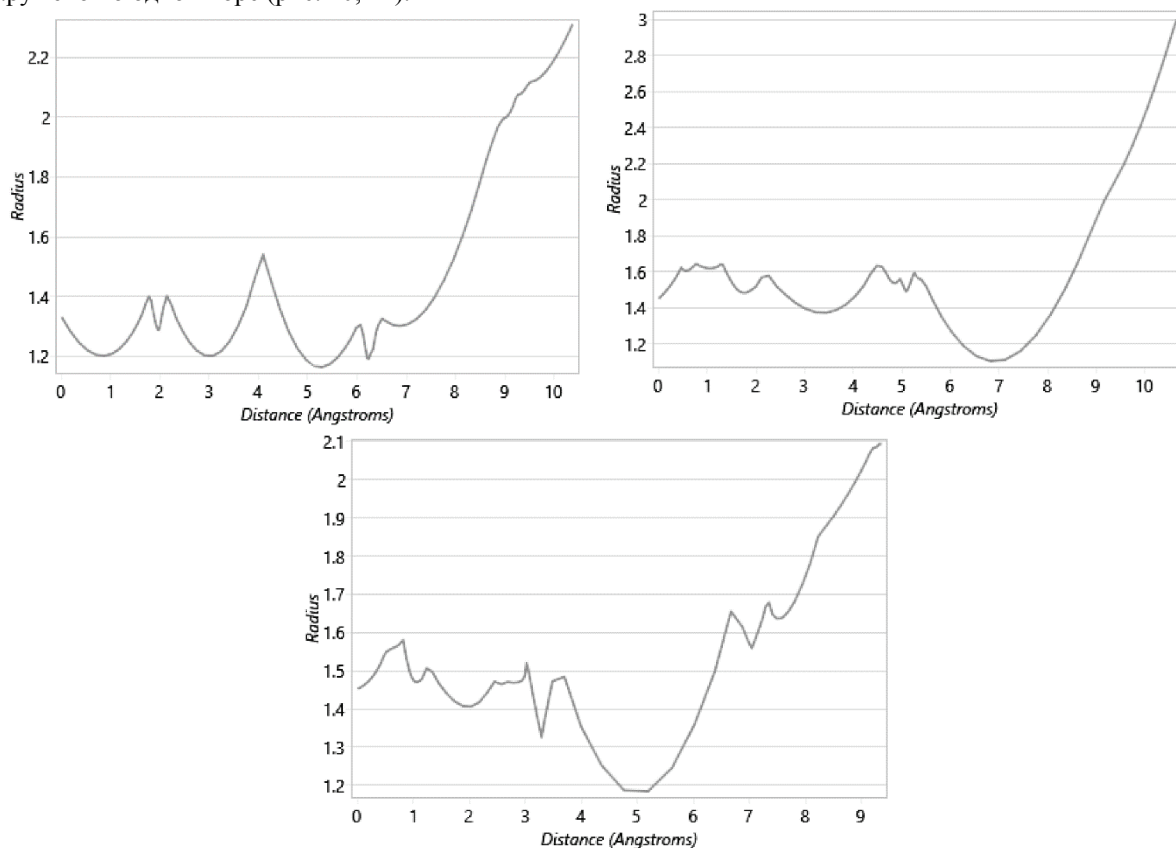


Рисунок 5. Профили туннелей в модели 3AMQ

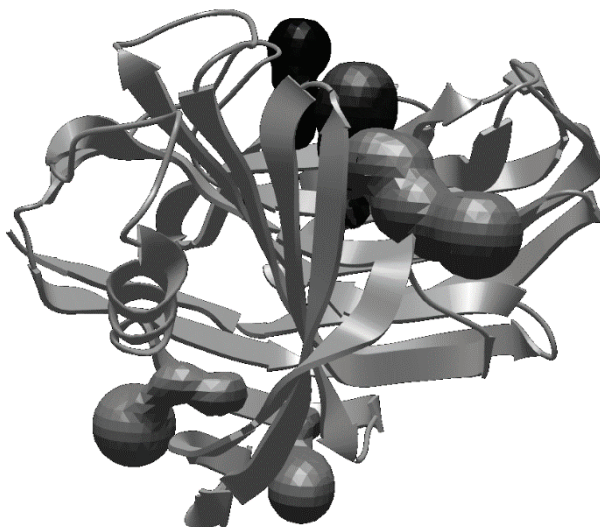


Рисунок 6. Локализация туннелей в модели 3VHO

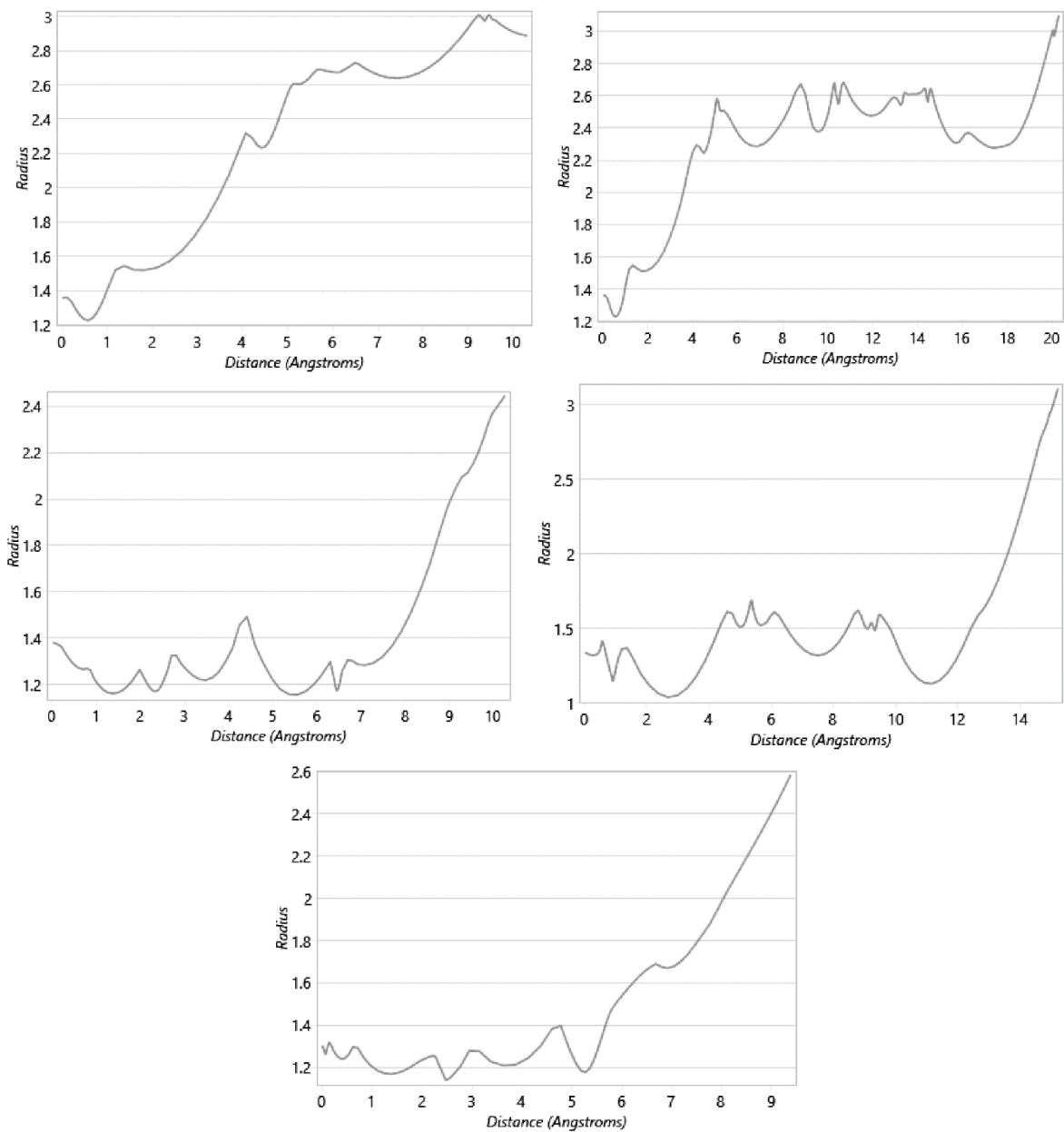


Рисунок 7. Профили туннелей в модели 3VHO

Таблица 4. Параметры внутренних полостей в составе моделей пространственной структуры мутантных целлюлаз из *Thermotoga maritima*

3VHO			3VHN		
Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)	Аминокислоты в составе полости	Количество аминокислот	Объем полости (Å ³)
1. Thr117, Ile135, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Trp226	8	144,20	1. Met115, Glu116, Thr117, Ile135, Met136, Val137, Phe196, Val198, Phe201, Leu202, Trp226	11	176,20
2. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Trp178	10	135,83	2. Leu19, Phe68, Tyr69, Tyr70, Phe95, Val97, Val99, Trp226, Ile228, Phe249, Ile251	11	175,57
3. Leu23, Asn24, Leu25, Val35, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Phe242	10	133,99	3. Glu22, Leu23, Asn24, Leu25, Ile28, Tyr31, Val35, Met37, Phe46, Ala48, Ile50, Pro66, Phe232, Phe242	14	171,12
			4. Pro74, Trp75, Trp118, Leu119, Thr120, Glu127, Ala128, Asp132, Val133, Trp178	10	137,29
Общий объем		414,02			660,18

Таблица 5. Туннели в составе моделей пространственной структуры мутантных целлюлаз из *Thermotoga maritima*

3VHO	3VHN
1. Trp26, Tyr65, Glu116, Trp118, Met136, Glu134, Glu231	1. Tyr65, Trp75, Met136, Glu231, Glu116, Trp26, Glu134, Trp118,
2. Trp26, Tyr65, Val62, Gly61, Glu116, Met136, Glu134, Gly147, Thr145, Pro146, Trp176, Tyr180, Glu231	2. Tyr65, Met136, Glu231, Glu116, Trp26, Glu134, Arg60, Tyr180, Trp176, Arg60, Val62, Gly147, Thr145, Gly61
3. Phe139, Phe158, Pro157, Ile156, Trp169, Val194, Lys195, Phe196, Asp197, Phe201, His200	3. Ile156, Pro157, Phe158, Trp169, Phe201, Phe196, Asp197, His200
4. Phe101, Phe139, Phe158, Leu160, Val189, Leu185, Asp187, Gly192, Arg193, Val194	
5. Thr9, Ser20, Met21, Glu22, Tyr69, Glu76, His78	

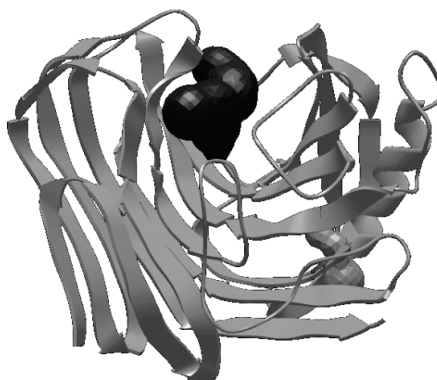


Рисунок 8. Локализация туннелей в модели 3VHN

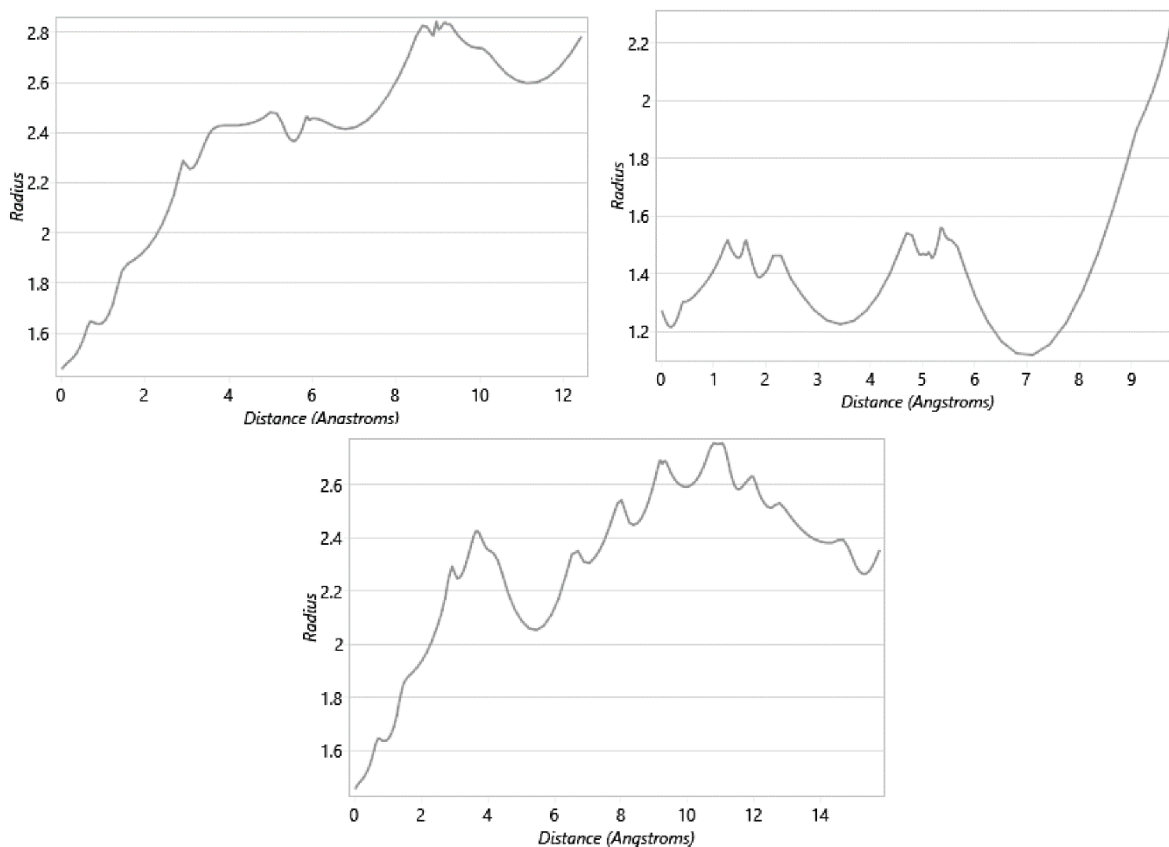
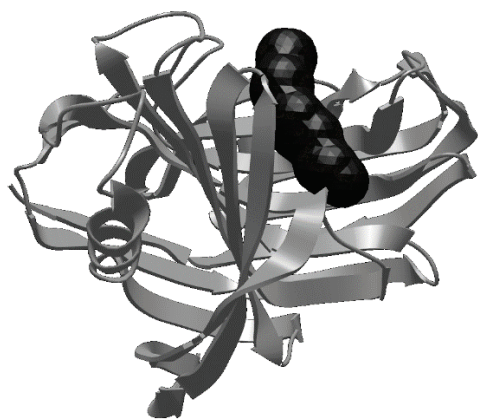
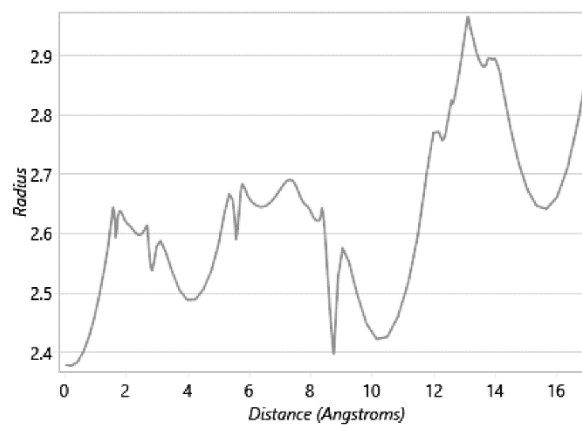


Рисунок 9. Профили туннелей в модели 3VHN

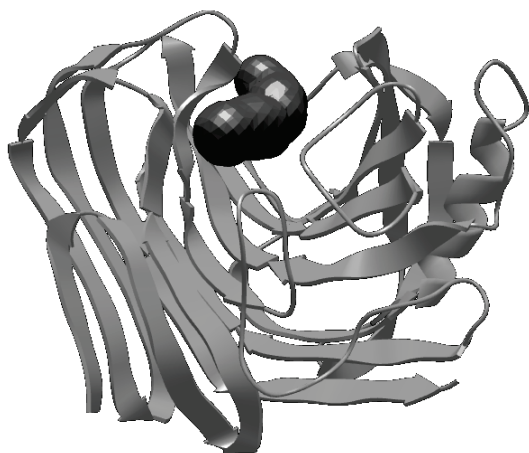


Расположение



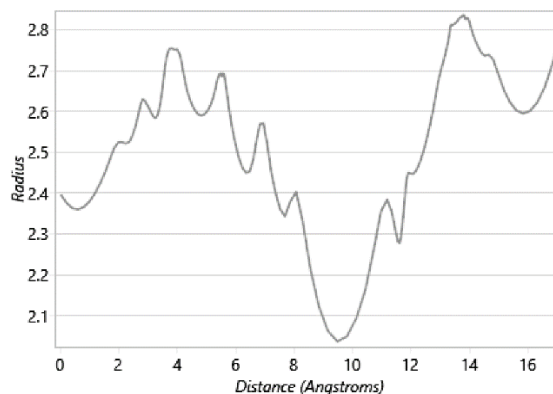
Профиль поры

Рисунок 10. Локализация и профиль поры в модели 3VNO



Расположение

Рисунок 11. Локализация и профиль поры в модели 3VHN



Профиль поры

ВЫВОДЫ

1. В составе модели 3AMM целлюлазы из *Thermotoga maritima* обнаружено 5 внутренних полостей с суммарным объемом 748,24 Å³. В молекуле 3AMN выявлено 4 полости с общим объемом 566,17 Å³. 6 полостей с суммарным объемом 822,11 Å³ наблюдалось в составе модели 3AMQ.
2. В моделях 3AMM и 3AMN обнаружено по два туннеля, в 3AMQ модели их было выявлено три. Показано наличие общего для всех трёх моделей туннеля.
3. Поры в составе моделей 3AMM, 3AMN и 3AMQ отсутствуют.
4. В моделях 3VHO и 3VHN обнаружено 3 и 4 полости общим объемом 414,02 и 660,18 Å³, 5 и 3 туннеля соответственно, а также по одной поре.

Представленные в работе данные имеют значительную ценность для понимания процессов конформационных перестроек в молекулах целлюлаз из *Thermotoga maritima* при их связывании с различными лигандами и при наличии точечных мутаций, что может быть полезным при проектировании на основе данных белков промышленных катализаторов и изучении их физиологической роли внутри организма-продуцента.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект №21-74-20053

Список литературы / References:

1. Saxena A., Ragauskas A.J. Water transmission barrier properties of biodegradable films based on cellulose whiskers and xylan. *Carbohydrate polymers*, 2009, vol. 78, no. 2, pp. 357-360.
2. Dashiban M., Schraft H., Syed T.A., Qin W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *International journal of biochemistry and molecular biology*, 2010, vol. 1, no. 1, p. 36.
3. Богомолов Д.Ю., Сакибаев Ф.А., Холявка М.Г., Артюхов В.Г., Селеменев В.Ф. Изучение *in silico* структурных особенностей липаз из различных продуцентов. *Сорбционные и хроматографические процессы*, 2021, т. 21, № 4, с. 555-567. [Bogomolov D.Yu., Sakibaev F.A., Holyavka M.G., Artyukhov V.G., Selemenev V.F. *In silico* study of the structural features of lipases from various producers. *Sorbtsionnye i Khromatograficheskie Protsessy*, 2021, vol. 21, no. 4, pp. 555-567. (In Russ.)]
4. Холявка М.Г., Артюхов В.Г. *Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение (учебное пособие)*. Воронежский государственный университет. Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017, 261 с. [Holyavka M.G., Artyukhov V.G. *Immobilized biological systems: biophysical aspects and practical application (textbook)*. Voronezh State University. Voronezh: VSU Publishing House, 2017, 261 p. (In Russ.)]

IN SILICO ANALYSIS OF THE FEATURES OF THE SPATIAL ORGANIZATION OF CELLULASE MOLECULES FROM DIFFERENT PRODUCERS**Holyavka M.G.^{1,2}, Kovaleva I.Yu.², Brueva M.S.², Bogomolov D.Yu.², Pankova S.M.^{2,3}, Koroleva V.A.^{2,3}, Artyukhov V.G.²**¹Sevastopol State University

Universitetskaya st., 33, Sevastopol, 299053, Russia; e-mail: holyavka@rambler.ru

²Voronezh State University

Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia; e-mail: holyavka@rambler.ru

³Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

Studencheskaya st., 10, Voronezh, 394006, Russia; e-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Received 27.06.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0495

Abstract. The spatial structure of the enzyme largely determines the mechanism of its functioning. In particular, changes in the number, structure, and localization of internal cavities, tunnels, and pores in an enzyme molecule can change its thermal stability, the mechanism of substrate diffusion to the active site, and the features of interaction with the microenvironment. The composition, localization, and structure of internal cavities, tunnels, and pores in *Thermotoga maritima* cellulases associated with various ligands and having amino acid substitutions have been studied. The parameters of pores, tunnels, and cavities were calculated using the Mole software. An assumption was put forward about the effect of these modifications on the change in the structure of the enzymes presented in the work. The data analyzed in this work are of significant value for understanding the processes of conformational rearrangements in the molecules of cellulases from *Thermotoga maritima* when they are bound to various ligands and in the presence of point mutations, which can be useful in designing industrial catalysts based on these proteins and studying their physiological role within the producer organism.

Key words: *in silico analysis, cellulases, molecular complex, tunnels, cavities, pores, conformational change.*