

Моделирование пространственной структуры N-концевого фрагмента α -амилазы *Leptinotarsa decemlineata*

В. О. Цветков*, Р. П. Груденко

Башкирский государственный университет

Россия, Республика Башкортостан, 450076 г. Уфа, улица Заки Валиди, 32.

*Email: zv347@yandex.ru

Методом моделирования по гомологии получена пространственная структура фрагмента α -амилазы колорадского жука. Амилазы колорадского жука и мучного хрущака имеют сходную конформацию активного центра и существенные различия физико-химических свойств образующих его аминокислотных остатков.

Ключевые слова: структура белка, моделирование по гомологии, колорадский жук, амилаза.

Гидролитические ферменты являются важным компонентом взаимодействия фитофагов с растениями. Получение новых данных об их структуре и функциях способствует раскрытию молекулярных механизмов взаимодействий в экосистеме и развитию экологически-безопасных подходов к сельскому хозяйству. Одним из опасных вредителей сельскохозяйственных культур является колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say.). К настоящему времени накоплено значительное количество информации о структуре и свойствах его пищеварительных гидролаз, главным образом, протеаз; в то же время знания о многих ферментах, играющих роль во взаимодействии этого вредителя с растениями, остаются ограниченными. Целью данной работы было построение трехмерной структуры молекулы амилазы колорадского жука.

Анализ биологических банков данных с помощью сервиса NCBI показал, что в настоящее время для α -амилазы *L. decemlineata* известна последовательность N-концевого фрагмента длиной 300 аминокислотных остатков, содержащего все функционально-важные участки, такие как центр связывания с субстратом и реакционный центр. Информация о пространственной структуре данного фермента в биологических банках данных отсутствует.

Поиск похожих последовательностей с помощью сервиса NCBI BLAST показал, что наиболее близким гомологом с известной структурой является α -амилаза мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Следует также отметить, что это единственная амилаза с известной пространственной структурой среди насекомых отряда Жесткокрылые.

Амилаза *T. molitor* содержит 471 аминокислотный остаток. Локальное выравнивание с амилазой *L. decemlineata* показывает 69% идентичности аминокислотных остатков и содержит лишь один разрыв в области нерегулярной вторичной структуры (рис. 1).

Chain A, Tenebrio Molitor Alpha-amylase-inhibitor Complex

Sequence ID: [1VIW_A](#) Length: 471 Number of Matches: 1

Range 1: 36 to 334		GenPept	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
417 bits(1073)	3e-142	Compositional matrix adjust.	205/300(68%)	230/300(76%)	1/300(0%)
Query 1	GFAGVQMISPPSENAVIGDRPWERYQPVSIIITRSGNEGELADMIRRCNAVGVRIYVD				60
Sbjct 36	GF GVQ ISPP+E V RPWERYQPVSII+ TRSGNE DM RRCN GVRIYVD				94
Query 61	LLMNDMAAQGGSGTAGSTCDPGSKYFPAIPYNSDDFHPTCTVNNYNDAAANVRNCELVGLP				120
Sbjct 95	AVINHMTGMNGVGTSGSSADHDGMNYPVAVPYGSGDFHSPCEVNNYQDADNVRNCELVGLR				154
Query 121	DLDQSKDGVVRQKLVAYIDHLIDLGVAGFRVDAAKHMWPAADLAAIYGMANKLNTDHGFAEG				180
Sbjct 155	DL+ D VR L+ Y++H+IDLGVAGFRVDAAKHM P DL+ I+ KNLNTD+GFA+G				214
Query 181	SRPFFFQEVIDLGGGEAISKKEYIGFGTVLEFKFVLELGNFQGHNAHLKNNKNGPWGGLL				240
Sbjct 215	+RPF +QEVIDLGGEAISK EY GFG VLEF+FGV LGNAFQG N L L NNGP WGLL				274
Query 241	ESGDAVVFIDNHDNQRGDDNRILTYKNPKPYKAAIAYMLAHPPLYTTRIMSSSDFDNAHQG				300
Sbjct 275	E DAVVF+DNHDNQR ++ILTYKNPKPYK AIA+MLAHP TTRIMSSSDF +DQG				334

Рис. 1. Парное выравнивание амилаз *L. decemlineata* и *T. molitor*, полученное в NCBI BLAST.

Одним из широко используемых методов моделирования пространственной структуры белков является метод сравнительного моделирования, или моделирования по гомологии. Данный метод позволяет предсказать пространственную структуру белка с известной последовательностью, опираясь на известную структуру гомологичного белка (т.е. белка с похожей последовательностью) [1, 2]. Нами были использованы два различных сервиса моделирования по гомологии – IntFOLD [3] и Modeller.

В результате работы сервиса IntFOLD было получено 100 возможных моделей структуры. Для последующего анализа были отобраны четыре модели, обладающие наивысшими и при этом практически одинаковыми показателями качества ($p=10^{-5}$). Сравнение структур с помощью сервиса JSmol показало, что данные структуры практически не отличаются друг от друга: наибольшее расхождение в положении C_{α} -атомов составляет 1 Å. Поэтому для дальнейшей работы была использована одна, самая первая, модель.

В результате работы сервиса MODELLER была получена единственная структура со значимым показателем качества модели (z -DOPE = -0.73).

В качестве шаблонной структуры в сервисе IntFOLD нами была задана структура амилазы *T. molitor* (PDB ID 1VIW), выбранная нами исходя из таксономической близости и сходства последовательностей. Сервис Modeller не позволяет задать произвольную структуру в качестве шаблона, поэтому в нем была использована другая структура, хотя и принадлежащая тому же организму (PDB ID 1JAE). Сравнение моделей с шаблонными структурами показало значительно более точное совпадение структур в случае сервиса IntFOLD (RMSD C_{α} -атомов 0.36 Å против 3.29 Å у Modeller).

Для оптимизации полученных структур использовали программу Gromacs. В результате оптимизации моделей, полученных с помощью сервисов IntFOLD и Modeller, были получены две структуры с приблизительно одинаковыми значениями свободной энергии, отличающиеся положением C_{α} -атомов на величину, сравнимую с разрешением шаблонных структур, как от исходных молекул, так и между собой.

В то же время полученные структуры существенно различались по взаимному расположению остатков каталитического центра. При этом расположение остатков в структуре, полученной с помощью сервиса Modeller, значительно точнее совпадало с их расположением в шаблонной структуре – амилазе *T. molitor* (RMSD 1.76 Å против 4.49 Å у IntFOLD), поэтому для дальнейшего анализа использовали именно ее.

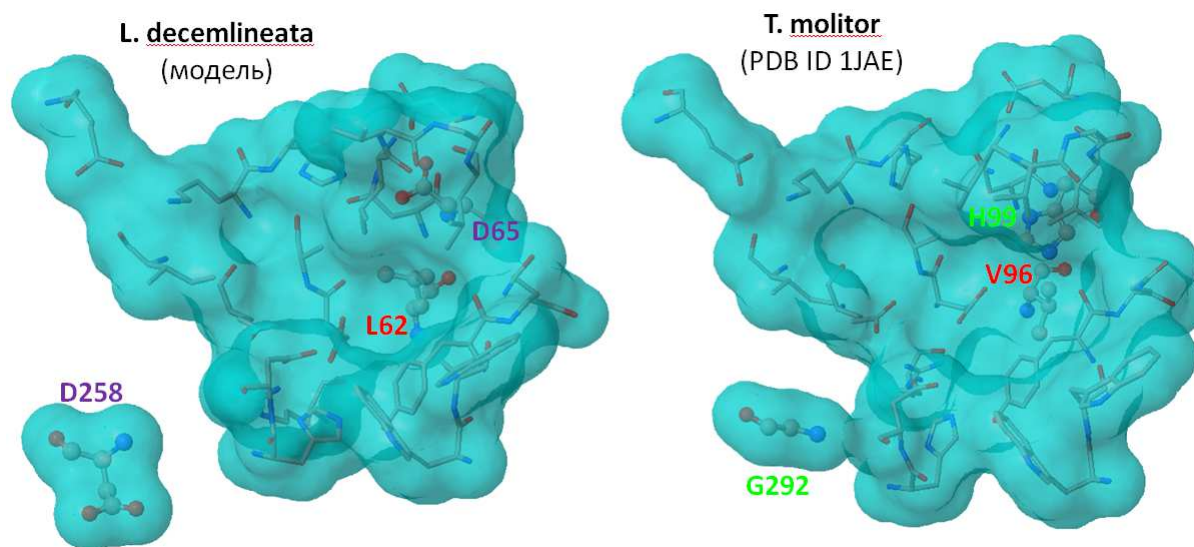


Рис. 2. Аминокислотные остатки активного центра амилазы *L. decemlineata* и *T. molitor*. Различающиеся остатки показаны в шаростержневой модели и подписаны.

Расположение аминокислотных остатков и молекулярная поверхность активного центра в модели и шаблонной структуре были в целом одинаковыми. Тем не менее, выявлены различия в составе аминокислотных остатков, формирующих функциональный центр амилаз *L. decemlineata* и *T. molitor*: так, остатки V96, H99 и G292 (нейтральные боковые цепи) амилазы мучного хрущака у колорадского жука оказываются заменены соответственно на L62, D65 и D258 (отрицательно заряженные боковые цепи). Данный факт, очевидно, должен приводить к различиям в функциональной активности и субстратной и ингибиторной специфичности ферментов, а также, предположительно, различиям в их регуляции.

Литература

1. Абдуллатыпов А. В., Цыганков А. А. Моделирование пространственной структуры гидрогеназы HydSL пурпурной серной бактерии *Thiocapsa roseopersicina* BBS // Компьютерные

- исследования и моделирование. 2013. Т. 5. №4. С. 737–747.
2. Зарубина С. А., Упоров И. В., Федорчук Е. А., Федорчук В. В., Скляренко А. В., Яроцкий С. В., Тишков В. И. Моделирование трехмерной структуры гидролазы эфиров альфа-аминокислот из *Xanthomonas rubrilineans* // Acta Naturae. 2013. Т. 5. №4(19). С. 68–77.
 3. Daniel B. Roche, Maria T. Buenavista, Stuart J. Tetchner, Liam J. McGuffin. The IntFOLD server: an integrated web resource for protein fold recognition, 3D model quality assessment, intrinsic disorder prediction, domain prediction and ligand binding site prediction // Nucleic Acids Research. 2011. V. 39. No. suppl_2. P. W171–W176.

Статья рекомендована к печати кафедрой биохимии и биотехнологии Башкирского Государственного университета (д-р. биол. наук, проф. Р. Г. Фархутдинов)

Modeling the spatial structure of the N-terminal fragment of *Leptinotarsa decemlineata* α -amylase

V. O. Tsvetkov*, R. P. Grudenko

Bashkir State University

32 Zaki Validi Street, 450076 Ufa, Republic of Bashkortostan, Russia.

**Email: zv347@yandex.ru*

The spatial structure of the Colorado potato beetle α -amylase fragment was obtained by homology modeling. Amylase of Colorado potato beetle and flour castaneum have similar conformation of the active site and essential differences of physico-chemical properties of its constituent amino acid residues.

Keywords: protein structure, homology modeling, Colorado potato beetle, amylase.