

ИССЛЕДОВАНИЕ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ИНУЛИНАЗ ИЗ ПРОДУЦЕНТОВ РОДА *Aspergillus* С ПОМОЩЬЮ НЕКОТОРЫХ ЧИСЛЕННЫХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МЕТОДОВ

© 2015 г. М.Г. Холявка, В.Г. Аргюхов, С.М. Макин

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

E-mail: holyavka@rambler.ru

Поступила в редакцию 21.01.15 г.

После доработки 30.03.15 г.

Созданы компьютерные модели димера инулиназы из *Aspergillus ficuum*. Экспериментально исследована надмолекулярная организация инулиназы из *Aspergillus niger*. Обсуждается вопрос о роли различных форм инулиназ в проявлении их функциональной активности. Показано, что в процессе димеризации инулиназы при образовании контактов между мономерными формами фермента определяющая роль принадлежит неполярным аминокислотным остаткам.

Ключевые слова: инулиназа, димер, контактные области, структурно-функциональные свойства, надмолекулярная организация.

Инулиназы (инулазы, 2,1- β -D-фруктан-фруктаногидролазы, КФ 3.2.1.7) участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей, играют важную роль в контроле процессов клеточной дифференцировки и развития. Эти ферменты гидролизуют инулин и фруктоолигосахариды до фруктозы, разрушая гликозидные связи их молекул.

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 ферментов, 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 [1–8].

Целью нашей работы было изучение надмолекулярной организации инулиназ из проду-

центов рода *Aspergillus* расчетными и экспериментальными методами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования была инулиназа из *Aspergillus niger*. Ферментный препарат инулиназы из *A. niger* фирмы («Sigma aldrich», Германия) мы подвергали дополнительной очистке. Для разрушения димера и получения субъединиц фермента применяли раствор Na-ДДС в концентрации $3,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л [9].

В качестве субстрата использовали инулин фирмы МР Biomedicals (Германия) из корней цикория с молекулярной массой 5000 Да. Содержание белка определяли методом Лоури, каталитическую активность фермента – резорциновым методом, измеряя оптическую плотность при 540 нм на фотоэлектроколориметре КФК-3 (Россия) [10]. За единицу каталитической активности инулиназы принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкМ фруктозы за 1 мин.

Молекулярную массу фермента определяли при электрофорезе в ПААГ модифицированным методом Дэвиса [11]. По окончании электрофореза белковые полосы окрашивали нитратом серебра по методу М.В. Нестеренко [12].

Изображение поверхности молекулы инулиназы и ее субъединиц получали на сканирующем зондовом микроскопе SOLVER P47PRO («НТ-МДТ», Россия) в Лаборатории наноскопии и нанотехнологии Центра коллективного

Таблица 1. Размеры, молекулярная масса и активность инулиназы и ее субъединиц из *Aspergillus niger*

Фракция	Размеры, нм		Молекулярная масса, кДа	Удельная активность, ед./мг белка
	R, нм*	нм**		
Нативная молекула	12,6 ± 2,4	6,4 ± 1,1	102 ± 4	34,7 ± 2,7
Субъединица 1	5,1 ± 1,1	3,4 ± 0,2	62 ± 3	29,8 ± 4,1
Субъединица 2	1,7 ± 0,4	2,2 ± 0,1	37 ± 4	25,2 ± 5,4

Примечание. * – Радиус молекулы, определенный методом динамического светорассеяния на приборе Photocor complex (ООО «Фотокор», Россия); ** – высота молекулы, определенная методом атомно-силовой микроскопии на приборе SOLVER P47PRO («НТ-МДТ», Россия).

пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета.

Размеры инулиназы и ее субъединиц определяли методом динамического светорассеяния на приборе Photocor complex (ООО «Фотокор», Россия) ($\lambda = 647$ нм, гелий–неоновый лазер). Полученные данные обрабатывали в программе DynaLS.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости 5%.

Моделирование белковых комплексов осуществляли в программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock. В качестве модели фермента, ставшей мишенью для докинга, в банке данных Protein Data Bank (PDB) нами была выбрана структура инулиназы из *Aspergillus ficuum* (код молекулы: 3SC7), которая была получена методом рентгеновской дифракции с разрешением 1,5 Å [13]. Из структуры 3SC7 были предварительно удалены низкомолекулярные соединения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что инулиназа из *A. niger* образует гетеродимеры. Путем сочетания методов атомно-силовой микроскопии, динамического светорассеяния и электрофореза были определены размеры и молекулярные массы инулиназы и ее субъединиц (табл. 1). Наши результаты согласуются с данными литературы: размер молекулы инулиназы из *A. awamori* составлял 6,5 × 8,2 × 13,6 нм [14].

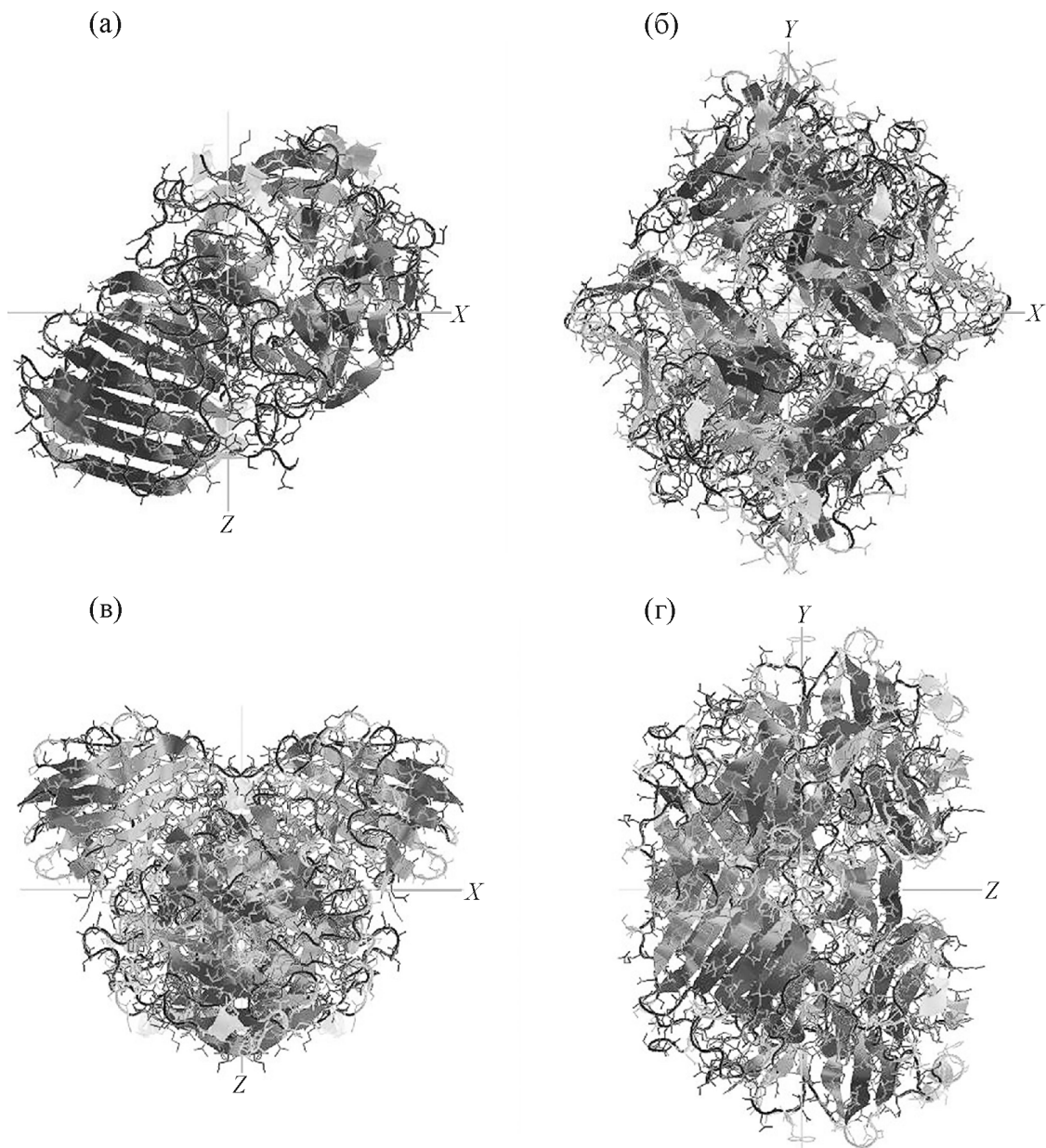
Далее мы попытались выявить роль процесса диссоциации молекулы фермента на субъединицы в проявлении функциональной активности инулиназ. Из табл. 1 видно, что активность инулиназы в димерной форме ниже, чем суммарная активность ее субъединиц. Вероятно, это связано с тем, что активные центры субъединиц белкового димера становятся стерически менее доступными для высокомолекулярного субстрата – инулина.

Для инулиназ из *Aspergillus awamori* ВКМФ-2250 и *Arthrobacter* sp. S37 также зафиксировано влияние процесса олигомеризации на способность фермента расщеплять инулин: мономерная форма белка обладала меньшей способностью к ферментативному катализу, чем димер [4].

Опубликовано мало данных о структурных особенностях инулиназы и родственных ей ферментов из группы гликозидгидролаз (GH32) [13–17]. В работе [16] на основе данных рентгеноструктурного анализа была построена пространственная модель инулиназы, выделенной из *Aspergillus awamori*. Авторы показали, что фермент состоит из двух доменов, которые объединены короткими полипептидными линкерами. Ориентация доменов стабилизируется многочисленными водородными и гидрофобными взаимодействиями [16].

В настоящее время широко обсуждается проблема пространственной организации ферментных систем. Вместе с тем отсутствуют исчерпывающие данные, касающиеся изучения фермент–ферментных взаимодействий, взаимосвязи физико-химических характеристик белков с их способностью образовывать надмолекулярные комплексы. Кроме того, схемы надмолекулярной организации компонентов метаболических систем требуют экспериментальных доказательств. По этой причине мы попытались создать компьютерные модели димеров инулиназы, выявив типы контактов между мономерными формами фермента. На рисунке представлена одна из полученных нами в программе Zdock моделей, расчетные линейные размеры которой были максимально приближены к данным динамического светорассеяния, представленным в табл. 1.

При использовании программ BioEdit и UGENE мы установили, что инулиназа из *A. ficuum* на 99% идентична по аминокислотной последовательности инулиназе из *A. niger*, поэтому экспериментальные данные, полученные для инулиназы из *A. niger*, корректно сравни-



Пространственные модели инулиназы: (а) – мономер, (б–г) – различные ракурсы димера.

вать с результатами расчетов для инулиназы из *A. ficum*.

В табл. 2 представлены аминокислотные остатки, входящие в состав контактных площадок при образовании димера инулиназы. Приведенные результаты представляют собой анализ расчетов по всем моделям, полученным в программах Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock. Численные показатели означают частоту встречаемости (в процентах) аминокислотного остатка в контактной области соединения мономеров среди всех моделей про-

грамм Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock.

Из расчетов следует, что количество неполярных и полярных незаряженных аминокислотных остатков, которые встречаются в составе контактных площадок при формировании димера инулиназы, значительно выше (по 38,28% для каждой группы), чем количество остатков, заряженных отрицательно и положительно (14,19 и 9,25% соответственно). В процессе димеризации инулиназы ключевая роль, вероятно, принадлежит неполярным аминокислотным остаткам, что хорошо согласуется с

Таблица 2. Частота встречаемости (%) аминокислотного остатка в контактной области соединения мономеров среди всех моделей программ Zdock, ClusPro, GRAMM_X, HEX, SwarmDock

Аминокислотные остатки			
Неполярные, %	Полярные незаряженные, %	Заряженные отрицательно, %	Заряженные положительно, %
Ala64 – 1,96	Asn42 – 6,86	Asp27 – 4,9	Arg29 – 3,92
Ala84 – 1,96	Asn61 – 1,96	Asp37 – 2,94	Arg138 – 1,96
Ala91 – 2,94	Asn65 – 10,78	Asp79 – 1,96	Arg175 – 7,84
Ala117 – 11,76	Asn69 – 10,78	Asp92 – 0,98	Arg183 – 23,53
Ala147 – 5,88	Asn94 – 2,94	Asp106 – 1,96	Arg295 – 10,78
Ala206 – 6,86	Asn108 – 15,69	Asp115 – 7,84	Arg312 – 14,71
Ala257 – 5,88	Asn109 – 2,94	Asp136 – 0,98	Arg313 – 1,96
Ala262 – 4,9	Asn118 – 5,88	Asp144 – 5,88	Arg386 – 0,98
Ala281 – 0,98	Asn145 – 11,76	Asp176 – 1,96	Arg393 – 0,98
Ala286 – 4,9	Asn155 – 1,96	Asp198 – 9,8	Arg511 – 1,96
Ala308 – 17,65	Asn187 – 0,98	Asp207 – 4,9	His82 – 1,96
Ala371 – 1,96	Asn210 – 2,94	Asp216 – 1,96	His85 – 0,98
Ala395 – 0,98	Asn223 – 2,94	Asp228 – 13,73	His166 – 0,98
Ala400 – 1,96	Asn26 – 2,94	Asp275 – 1,96	His182 – 1,96
Ala425 – 0,98	Asn265 – 4,9	Asp282 – 2,94	His194 – 2,94
Ala442 – 1,96	Asn293 – 3,92	Asp285 – 4,9	His351 – 1,96
Ala449 – 1,96	Asn305 – 6,86	Asp296 – 0,98	His447 – 5,88
Gly51 – 9,8	Asn325 – 20,59	Asp310 – 19,61	Lys49 – 0,98
Gly68 – 3,92	Asn372 – 4,9	Asp361 – 4,9	Lys86 – 2,94
Gly95 – 0,98	Gln38 – 4,9	Asp424 – 11,76	Lys151 – 0,98
Gly112 – 3,92	Gln133 – 14,71	Asp430 – 2,94	Lys178 – 0,98
Gly114 – 2,94	Gln135 – 5,88	Asp436 – 7,84	Lys218 – 1,96
Gly154 – 0,98	Gln153 – 3,92	Asp440 – 13,73	Lys277 – 2,94
Gly170 – 2,94	Gln162 – 2,94	Asp454 – 2,94	Lys332 – 5,88
Gly171 – 0,98	Gln184 – 10,78	Asp489 – 2,94	Lys344 – 2,94
Gly186 – 6,86	Gln197 – 4,9	Asp492 – 0,98	Lys345 – 10,78
Gly195 – 4,9	Gln214 – 0,98	Asp509 – 0,98	Lys419 – 5,88
Gly196 – 12,75	Gln24 – 2,94	Glu43 – 3,92	Lys450 – 6,86
Gly224 – 4,9	Gln349 – 1,96	Glu93 – 2,94	
Gly231 – 7,84	Gln350 – 7,84	Glu97 – 3,92	
Gly244 – 15,69	Gln355 – 0,98	Glu173 – 13,73	
Gly259 – 4,9	Gln368 – 2,94	Glu233 – 6,86	
Gly263 – 9,8	Gln373 – 4,9	Glu239 – 12,75	
Gly264 – 5,88	Gln379 – 1,96	Glu243 – 11,76	
Gly266 – 0,98	Gln422 – 1,96	Glu246 – 20,59	
Gly272 – 0,98	Gln476 – 2,94	Glu247 – 10,78	
Gly311 – 5,88	Gln506 – 2,94	Glu258 – 19,61	
Gly323 – 5,88	Ser52 – 6,86	Glu359 – 7,84	
Gly333 – 0,98	Ser111 – 2,94	Glu414 – 4,9	
Gly347 – 4,9	Ser116 – 12,75	Glu433 – 2,94	
Gly378 – 0,98	Ser131 – 10,78	Glu452 – 2,94	
Gly387 – 0,98	Ser132 – 2,94	Glu497 – 0,98	

Продолжение

Аминокислотные остатки			
Неполярные, %	Полярные незаряженные, %	Заряженные отрицательно, %	Заряженные положительно, %
Gly401 – 2,94	Ser142 – 1,96	Glu516 – 3,92	
Gly435 – 6,86	Ser159 – 0,98		
Gly444 – 3,92	Ser161 – 1,96		
Gly445 – 9,8	Ser185 – 0,98		
Gly455 – 3,92	Ser219 – 3,92		
Gly457 – 3,92	Ser221 – 1,96		
Gly477 – 3,92	Ser226 – 11,76		
Gly500 – 0,98	Ser227 – 7,84		
Ile50 – 5,88	Ser25 – 3,92		
Ile70 – 1,96	Ser260 – 5,88		
Ile168 – 12,75	Ser273 – 0,98		
Ile209 – 0,98	Ser287 – 4,9		
Ile222 – 5,88	Ser309 – 26,47		
Ile229 – 1,96	Ser321 – 2,94		
Ile357 – 0,98	Ser324 – 9,8		
Ile363 – 6,86	Ser342 – 10,78		
Ile369 – 3,92	Ser364 – 3,92		
Ile385 – 0,98	Ser366 – 1,96		
Ile437 – 13,73	Ser383 – 0,98		
Ile461 – 2,94	Ser384 – 1,96		
Leu113 – 5,88	Ser413 – 1,96		
Leu172 – 18,63	Ser423 – 7,84		
Leu217 – 0,98	Ser428 – 1,96		
Leu225 – 1,96	Ser438 – 12,75		
Leu341 – 4,9	Ser488 – 4,9		
Leu343 – 6,86	Ser491 – 1,96		
Leu367 – 7,84	Ser507 – 2,94		
Leu382 – 0,98	Ser512 – 4,9		
Leu451 – 1,96	Ser514 – 1,96		
Leu458 – 0,98	Thr53 – 2,94		
Leu515 – 1,96	Thr63 – 10,78		
Met237 – 7,84	Thr76 – 0,98		
Phe99 – 4,9	Thr78 – 4,9		
Phe141 – 4,9	Thr88 – 1,96		
Phe152 – 1,96	Thr110 – 4,9		
Phe180 – 7,84	Thr130 – 5,88		
Phe181 – 14,71	Thr134 – 0,98		
Phe238 – 3,92	Thr148 – 3,92		
Phe274 – 0,98	Thr160 – 3,92		
Phe279 – 0,98	Thr169 – 10,78		
Pro62 – 2,94	Thr212 – 1,96		
Pro107 – 5,88	Thr220 – 4,9		
Pro119 – 8,82	Thr230 – 3,92		

Аминокислотные остатки			
Неполярные, %	Полярные незаряженные, %	Заряженные отрицательно, %	Заряженные положительно, %
Pro156 – 1,96	Thr245 – 9,8		
Pro165 – 0,98	Thr248 – 13,73		
Pro261 – 9,8	Thr249 – 0,98		
Pro283 – 2,94	Thr271 – 1,96		
Pro307 – 12,75	Thr280 – 0,98		
Pro326 – 0,98	Thr288 – 1,96		
Pro327 – 3,92	Thr328 – 5,88		
Pro356 – 0,98	Thr329 – 5,88		
Pro377 – 0,98	Thr330 – 3,92		
Pro398 – 2,94	Thr340 – 6,86		
Pro441 – 19,61	Thr348 – 4,9		
Trp40 – 5,88	Thr358 – 6,86		
Trp54 – 0,98	Thr362 – 10,78		
Trp67 – 25,49	Thr365 – 6,86		
Trp149 – 0,98	Thr374 – 0,98		
Trp188 – 0,98	Thr380 – 1,96		
Trp211 – 0,98	Thr421 – 2,94		
Trp213 – 1,96	Thr426 – 6,86		
Trp232 – 1,96	Thr432 – 10,78		
Trp250 – 4,9	Thr448 – 8,82		
Val66 – 21,57	Thr456 – 5,88		
Val143 – 5,88	Thr499 – 4,9		
Val242 – 6,86	Tyr39 – 1,96		
Val284 – 1,96	Tyr104 – 14,71		
Val306 – 5,88	Tyr105 – 14,71		
Val346 – 2,94	Tyr121 – 10,78		
Val353 – 1,96	Tyr128 – 8,82		
Val394 – 0,98	Tyr28 – 1,96		
Val446 – 16,67	Tyr322 – 5,88		
Val508 – 2,94	Tyr397 – 4,9		
Val510 – 0,98	Tyr439 – 4,9		

результатами ИК-спектроскопии, изложенными в работе [18].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представлено очень мало экспериментальных (литературных) данных о структурных особенностях инулиназы и родственных ей ферментов, относящихся к группе гликозидгидролаз (GH32). Вопрос о существовании у них надмолекулярной организации до сих пор окончательно не решен, до конца не установлены родственные и эволюционные связи не только

среди всех гликозидгидролаз, но и внутри группы инулиназ, выделенных из различных продуцентов.

Обобщая результаты приведенных в литературе работ и собственных экспериментов, можно заключить, что молекулы инулиназы функционально активны как в мономерной, так и в других (преимущественно димерных) формах. В процессе димеризации инулиназы при формировании контактных площадок ключевая роль, вероятно, принадлежит неполярным аминокислотным остаткам, также возможно уча-

стие электростатических взаимодействий между мономерами молекул фермента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (ФЦП ИР14-20) мероприятие 3.1.2. «Поддержка и развитие центров коллективного пользования научным оборудованием» Соглашение № 14.593.21.0001, идентификатор проекта RFME-FI59314X0001

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. Pessa and M. Vitolo, *Biotechnol. Techniq.* **11** (6), 421 (1997).
2. R. T. Kushi, R. Monti, and J. Contiero, *J. Indust. Microbiol. Biotechnol.* **25** (2), 63 (2000).
3. R. J. Rouwenhorst, M. Hensing, J. Verbakel, et al., *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (11), 3337 (1990).
4. K. Y. Kim, S. Rhee, and S. I. Kim, *J. Biochem.* **138** (1), 27 (2005).
5. P. K. Gill, R. K. Manhas, J. Singh, and P. Singh, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **117** (1), 19 (2004).
6. M. Kawamura, S. Takahashi, and T. Uchiyama, *Agric. Biol. Chem.* **52** (12), 3209 (1988).
7. A. Yokota, K. Enomoto, and F. Tomita, *Ferment. Bioeng.* **72** (4), 262 (1991).
8. K. Haraguchi, M. Kishimoto, K. Seki, et al., *Agric. Biol. Chem.* **52** (1), 291 (1988).
9. M. G. Holyavka, T. A. Kovaleva, M. V. Grechkina, et al., *Appl. Biochem. Microbiol.* **50** (1), 10 (2014).
10. А. И. Ермаков, В. В. Арасимович и Н. П. Ярош, *Методы биохимического исследования растений* (Агропромиздат, Л., 1987).
11. Л. А. Остерман, *Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование* (Наука, М., 1981).
12. M. V. Nesterenko, M. Tilley, and S. J. Upton, *J. Biochem. Biol.* **28** (3), 239 (1994).
13. J. Pouyez, A. Mayard, A. M. Vandamme, et al., *Biochimie.* **94**, 2423 (2012).
14. M. Arand, A. M. Golubev, J. R. Neto, et al., *Biochem. J.* **362** (1), 131 (2002).
15. F. Alberto, E. Jordi, B. Henrissat, and M. Czjzek, *Biochem. J.* **395** (3), 457 (2006).
16. R. A. Nagem, A. L. Rojas, A. M. Golubev, et al., *J. Mol. Biol.* **344** (11), 471 (2004).
17. M. Verhaest, W. V. Ende, K. L. Roy, et al., *Plant J.* **41** (3), 400 (2005).
18. V. G. Artyukhov, T. A. Kovaleva, M. G. Kholyavka, et al., *Biophysics* **54** (6), 675 (2009).

Investigation of Inulinase Permolecular Organization from Producers of the Genus *Aspergillus* by Means of Some Computing and Experimental Methods

M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov, and S.M. Makin

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

The computer model for a dimer of inulinase from *Aspergillus ficuum* is designed. The permolecular organization of inulinase from *Aspergillus niger* is experimentally investigated. The question about the role of various inulinase forms in manifestation of their functional activity is discussed. It is shown, that in the process of inulinase dimerization when contacts between monomeric forms of the enzyme are formed, a key role belongs to the nonpolar amino acid residues.

Key words: inulinase, dimer, contact areas, structural and functional properties, permolecular organization