

ОЦЕНКА РАВНОВЕСНОЙ КОНСТАНТЫ АГРЕГАЦИИ ИНУЛИНАЗЫ ПО ДАННЫМ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТИЦ ПО ГРУППАМ

Холявка М.Г., Пронозин А.Ю.

ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

ул. Университетская, 33, г. Севастополь, 299053, РФ

Аннотация. На основании данных динамического рассеяния света проведено исследование образования надмолекулярных комплексов ферментом инулиназой. Были получены значения радиусов частиц, находящихся в растворах инулиназы. Дана оценка равновесной константы агрегации инулиназы по данным распределения частиц по группам, которые соответствуют мономерным и димерным состояниям частицы. Сделан вывод о целесообразности проведения полученных данных в рамках простейшей модели равновесия мономер↔димер. В ходе расчетов получено значение константы димеризации. В целом полученная нами величина оценки K для инулиназы соответствует типичным значениям константы агрегации средномолекулярных белков и может считаться достоверной.

Ключевые слова: инулиназа, мономер, димер.

ANALYSIS OF EQUILIBRIUM CONSTANT OF THE INULINASE BY USING DATA OF PARTICLE DISTRIBUTION IN GROUP

Holyavka M.G., Pronozin A.U.

Sevastopol State University

Universitetskaya str., 33, Sevastopol, 299053, Russia

Summary. By using dynamic light scattering method was studied formation of supramolecular complexes with the enzyme inulinase. Obtained values of the radii of the particles inulinase in the fluid, value of the constant of dimerization. The equilibrium constant of aggregation of the inulinase satisfy to monomer and dimer state of the particles. The conclusion about the feasibility of the obtained data in the framework of the simplest model of equilibrium monomer↔dimer. The value of the constants of dimerization for inulinase, satisfy to the typical values of the aggregation constants of medium molecular proteins and can be considered reliable.

Key words: inulinase, monomer, dimer.

Введение. Физико-химические свойства гидролитических ферментов были изучены на ранних стадиях развития энзимологии. Применение гидролаз в пищевой, текстильной, бумажной, парфюмерной промышленности, при производстве моющих средств, в сельском хозяйстве и в медицине помогло существенно усовершенствовать многие существующие способы производства продуктов питания и лекарственных препаратов, а также разработать новые безотходные технологические линии.

Для понимания механизма действия инулиназ *in vivo* и внедрения ферментных препаратов в промышленное производство необходимо исследовать не только их физико-химические, но и структурно-функциональные свойства, особенности молекулярной и надмолекулярной организации, выявить оптимальные условия катализа.

Инулиназы - расщепляют инулин (см. рис. 1) и фруктоолигосахариды до фруктозы. Изучение физико-химических и структурно-функциональных свойств инулиназ в условиях различного микроокружения имеет высокое теоретическое и прикладное значение. Эти ферменты участвуют в углеводном метаболизме высших растений и микроорганизмов, являются важнейшими компонентами сигнальных путей системы коммуникации, играют одну из ключевых ролей в контроле процессов клеточной дифференцировки, роста и развития указанных организмов. Используются в циклах производства сахаров с различной степенью полимеризации, – неотъемлемых компонентов функционального питания, снижающих риск возникновения сахарного диабета, кариеса и ожирения [1].

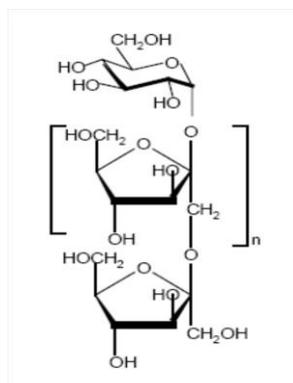


Рисунок 1 – Химическая структура инулина

Материалы и методы. Объектами исследования были инулиназы из *Kluyveromyces marxianus*, *Helianthus tuberosus* и *Aspergillus niger*. Гомогенные фракции инулиназы из *K. marxianus* и *H. tuberosus* получали в лаборатории кафедры биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета. Ферментный препарат инулиназы из *Aspergillus niger* фирмы «Sigma Aldrich» (Германия) подвергали дополнительной очистке. В качестве субстрата использовали инулин фирмы MP biomedical, выделенный из цикория (молекулярная масса порядка 5000 дальтон). В роли носителя для иммобилизации выступали матрицы хитозанов различной молекулярной массы и степени деацетилирования, синтезированные ЗАО «Биопрогресс».

Иммобилизацию инулиназы осуществляли путем адсорбции. 5 г носителя оставляли на 12 часов при комнатной температуре в 50 мл рабочего буфера. К суспензии носителя добавляли 5 мл раствора фермента и перемешивали в колбе с помощью электрической мешалки в течение 1.5 часов при 25 °С. Центрифугировали 5 мин при 1500 g. Осадок промывали буфером до отсутствия в промывных водах белка. Контроль осуществляли при $\lambda = 280$ нм.

Размеры инулиназы и ее субъединиц определяли методом динамического светорассеяния на приборе Photocor complex (ООО «Фотокор», Россия) ($\lambda = 647$ нм). Форма белковой глобулы принималась за идеальную сферическую.

Результаты и обсуждение. Методы динамического светорассеяния позволяют определить время жизни флуктуации, одной из разновидностей ДРС является метод фотонной корреляционной спектроскопии. В данном методе изучается корреляция (во времени) количества фотонов, рассеянных образцом в заданном направлении. В качестве источника излучения используется лазер. Электромагнитные волны, рассеянные соседними частицами, интерферируют друг с другом. Возникающие при этом временные флуктуации интенсивности рассеянного света формируют на фотодетекторе сигнал $I(t)$. Такого рода флуктуирующие сигналы анализируются устройством, называемым коррелятором, который строит автокорреляционную функцию сигнала $I(t)$. Автокорреляционная функция показывает корреляцию значений сигнала (в данном случае – интенсивности рассеянного света) измеренных через промежуток времени τ :

$$g_2(\tau) = \langle I(t) * I(t+\tau) \rangle. \quad (1)$$

По результатам аппроксимации автокорреляционной функции интенсивности рассеянного света, можно определить коэффициент диффузии частиц. Далее, исходя из него, размер частиц может быть найден из формулы Стокса–Эйнштейна:

$$D = \frac{k_s T}{6\pi\eta R}, \quad (2)$$

где η – вязкость жидкости, k_s – константа Больцмана, T – абсолютная температура. Фигурирующий в формуле размер частицы R называется гидродинамическим радиусом [2,3].

Методом динамического светорассеяния были получены значения радиусов частиц, находящихся в растворах инулиназы в диапазоне концентраций 10^{-7} - $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. С помощью кластерного анализа эти значения были разделены на 8 групп:

1 группа – 0.459-1.176,

2 группа – 0.123-4.177,

3 группа – 4.278-8.221,

4 группа – 9.24-21.49,

5 группа – 23.77-48.65,

6 группа – 49.98-83.67,

7 группа – 87.87-141.7,

8 группа – 148.1-199.0 нм.

1 (0.459-1.176 нм) и 2 (0.123-4.177 нм) группы соответствуют по размеру малой (8.4 кДа) и большой (54.8 кДа) субъединицам инулиназы, 3 группа (4.278-8.221 нм) – димерной форме фермента (63 кДа), 4 – тетрамеру, пятая и последующие – более крупным агрегатам (см. рис. 2) [4].

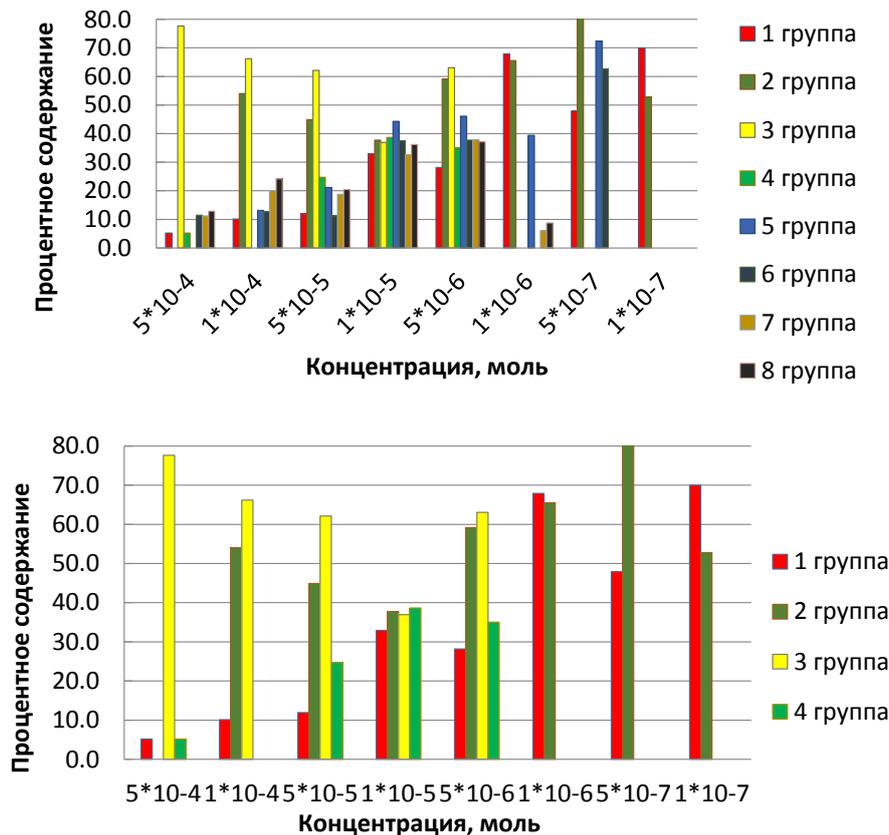


Рисунок 2 – Процентное содержание частиц различных радиусов при варьировании концентрации инулиназы в растворе

Исходные данные по группам 1-4 были скорректированы следующим образом: для каждой конкретной концентрации были просуммированы проценты по всем группам и получившееся значение было принято за относительную единицу; далее по отношению к этому значению были пересчитаны значения мольных долей групп (см. табл. 1).

Таблица 1 – Значения мольных долей различных комплексов в зависимости от концентрации

Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4	Все	C, моль
0.056818	0	0.886364	0.056818	1	5*10 ⁻⁴
0.076923	0.423077	0.5	0	1	1*10 ⁻⁴
0.083333	0.3125	0.430556	0.173611	1	5*10 ⁻⁵
0.210191	0.305732	0.235669	0.248408	1	1*10 ⁻⁵
0.151351	0.318919	0.340541	0.189189	1	5*10 ⁻⁶
0.511278	0.488722	0	0	1	1*10 ⁻⁶
0.375	0.625	0	0	1	5*10 ⁻⁷
0.57377	0.42623	0	0	1	1*10 ⁻⁷

Согласно базовой интерпретации физического смысла частиц в группах 1-4, предположительно Группа 1 и Группа 2 соответствуют большой и малой субъединицам белка, Группа 3 – димер, Группа 4 – некий агрегат белка. Агрегация белка должна подчиняться вполне естественному условию: по мере увеличения концентрации доля неагрегированных форм должна уменьшаться, а агрегированных – увеличиваться. Для групп 1 (мономер) и 3 (димер) эта тенденция однозначно прослеживается; для группы 2 разброс точек очень велик, а для группы 4 зависимость носит характер роста в пределах 20 % с последующим падением до нуля при высоких концентрациях (см. рис. 3). Полученные данные по группам 2 и 4 не представляются надежными и не отражают ожидаемые закономерности агрегации. В связи с этим в последующем численном анализе данные по этим группам не использовались. Таким образом, использование полученных данных целесообразно проводить в рамках простейшей модели равновесия мономер↔димер для групп 1 и 3 с равновесной константой агрегации K (3):



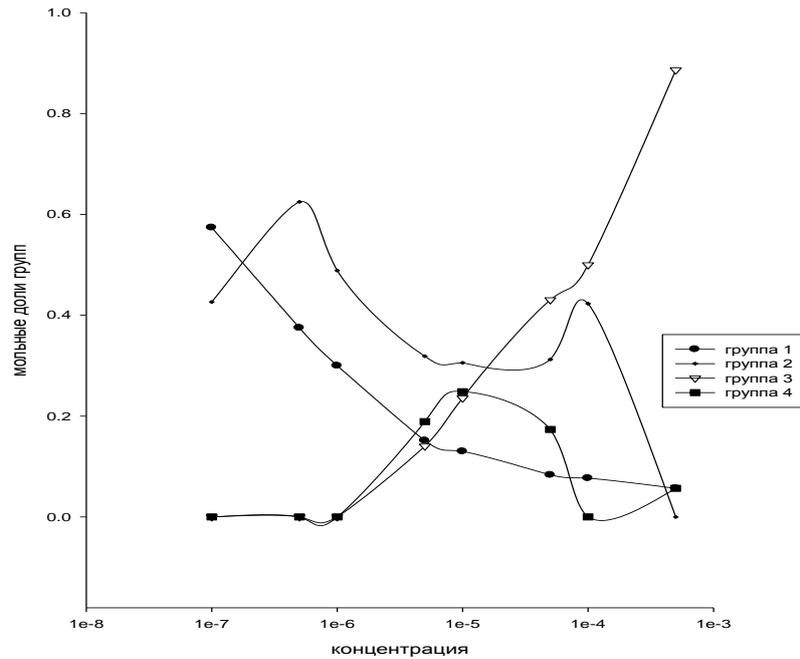


Рисунок 3 – Графики по пронормированным экспериментальным данным

Для такой реакции связь мольной доли f_3 димера с мольной долей f_1 мономера подчиняется закону действия масс:

$$f_3 = K \cdot f_1^2 \cdot x_0, \quad (4)$$

где f_1 , f_3 – мольные доли групп 1 и 3 (см. табл. 1), x_0 – концентрация инулиназы.

Далее по уравнению (4) производилась минимизация квадратичного отклонения (невязки) расчетного значения f_3 от экспериментального в таблице путем варьирования параметра K в пакете SigmaPlot. Получено значение константы димеризации: $K = 617000 \text{ M}^{-1}$ при достоверности аппроксимации $R^2 = 0.87$.

Нами была проведена дополнительная верификация полученного значения K путем проверки двух допущений:

- 1) мономер из группы 2 формируют димер из группы 3 ($f_3 = K \cdot f_2^2 \cdot x_0$);
- 2) сумма мономеров из группы 1 и группы 2 ($f_3 = K \cdot (f_1 + f_2)^2 \cdot x_0$), формируют димер из группы 3.

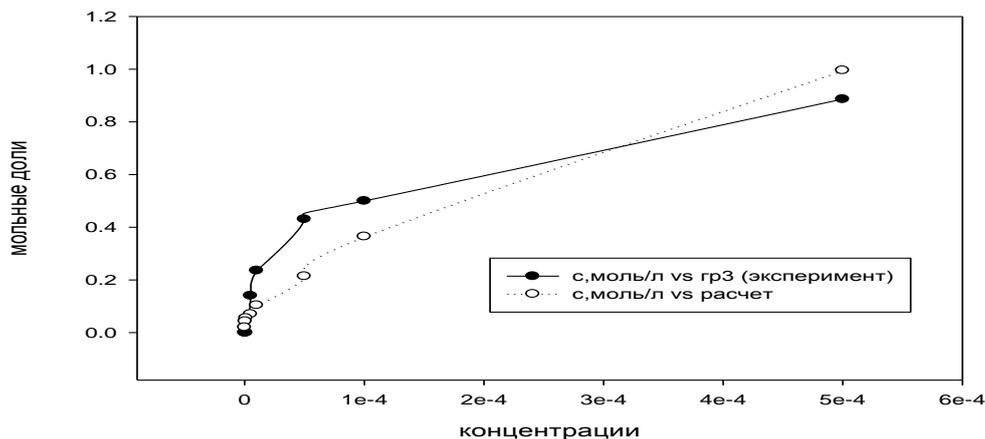


Рисунок 4 – Концентрационные зависимости

Соответствующий вычислительный эксперимент показал значительно худшее качество аппроксимации данных эксперимента, указывающее на то, что предложенный вариант по формуле (4) наиболее адекватен данным эксперимента.

В целом полученная нами величина оценки K для инулиназы соответствует типичным значениям константы агрегации средномолекулярных белков и может считаться достоверной. Соответствующее наложение расчета и экспериментальной кривых в логарифмическом масштабе представлено на рисунке 4, и подтверждает хорошее качество соответствия теории и эксперимента.

Список литературы / References:

1. Холявка М.Г. *Исследование структурно-функциональных свойств гомогенных и гетерогенных биокатализаторов на основе инулиназы*. Воронеж, 2010, 178 с.
2. Бочаров К.В., Марукович Н.И., Куксин А.Ю. *Методы статистического и динамического рассеяния света для исследования наночастиц и макромолекул в растворе*. М.: МФТИ, 2016, 40 с.
3. Schroer M.A, Roseker W. *Dynamic Light Scattering Employing One- and Two-Dimensional Detectors and Different Time-Correlation Approaches*. Ralf Klemt University of Heidelberg Germany, 2015, pp. 5-11.
4. Albert A. *Selective toxicity. 2nd ed.* L.: Chapman and Hall, 1973, 630 p.

СВОЙСТВА ИОН-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО БЕЛКА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫСЫТаланов Е.Ю.¹, Мосенцов А.А.², Миронова Г.Д.¹¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ

e-mail: evg-talanov@yandex.ru

²Харьковский национальный университет им. В.Н.Каразина

пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61077, Украина

Аннотация. В настоящей работе с помощью метода водно-этанольной экстракции из микросом печени крысы выделен и очищен ион-транспортующий белок-канал. Изучены его электрофизиологические и регуляторные свойства. Показано, что минимальная величина канала составляет 10pS. При реконструкции в БЛМ данного белка, формируются каналы с многоуровневой проводимостью. Проводимость данного белка может распадаться на различные уровни. Величина проводимости кластеров кратна величине проводимости одиночного белка - канала. Вольтамперная характеристика (ВАХ) полученная в диапазоне напряжения от -100 mV до 100 mV свидетельствует о потенциал - чувствительности обнаруженного микросомального белка-канала. Полученные данные свидетельствуют о том, что белок выделенный из микросом не является селективным по K⁺, что возможно связано с местом его локализации и его участия в процессах опосредованных не только транспортом калия но и других одновалентных ионов. Обнаруженные эффекты АТФ и АДФ на выделенный из микросом гепатоцитов крысы канал, позволяют относить его к семейству АТФ- чувствительных белков. Ингибирование изучаемого белка-канала 5-ГД, указывает на то, что mitoK_{АТФ} подобные белки, помимо митохондрий могут быть локализованы и в эндоплазматическом ретикулуме.

Ключевые слова: митохондрии, микросомы, БЛМ, K_{АТФ}-каналы, 5- ГД.**PROPERTIES OF THE ION TRANSPORTING PROTEIN ISOLATED FROM RAT LIVER MICROSOMES**Talanov E.Yu.¹, Mosentsov A.A.², Mironova G.D.¹¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences

Institutskaya st., 3, Pushchino, 142290, Russian Federation

e-mail: evg-talanov@yandex.ru

²V.N. Karazin Kharkiv National University

Svobody sq., 4, Kharkiv, 61077, Ukraine

Abstract. In this work, an ion transporting channel protein has been isolated and purified from the rat liver microsomes by using the water-ethanol extraction method. The electrophysiological and regulatory properties of the protein were studied. It was shown that the minimum conductance value of the channel is 10pS. When reconstructed into the BLM, the protein formed ion channels with a multilevel conductance. The conductance of this channel protein is divided into different levels. The conductance value of clusters is a multiple of that of the single protein channel. Volt-ampere characteristics (VAC) recorded in the voltage range from -100mV to 100mV indicates the potential-sensitivity of the microsomal channel protein. The data obtained suggest that the protein isolated from microsomes is not selective for K⁺ ions, which may be due to its localization and its participation in processes mediated by transport of not only potassium, but also other monovalent ions. The observed effects of ATP and ADP on activity of the channel isolated from microsomes of rat hepatocytes make it possible to classify it as a member of ATP-sensitive protein family. The inhibitory effect of 5-hydroxydecanoate on the studied channel protein indicates that mitoK_{АТФ} like proteins, in addition to mitochondria, can also be localized in the endoplasmic reticulum.

Key words: mitochondria, microsomes, black lipid membranes, ATP-dependent potassium channels, 5-hydroxydecanoate.

Среди всего разнообразия ион-транспортующих белков, особое место занимают АТФ-зависимые калиевые каналы, играющие важную роль при сердечно сосудистых заболеваниях [1]. В зависимости от типа ткани, типов клеток, K_{АТФ} каналы обладают различными биофизическими и регуляторными свойствами, а так же имеют различия в молекулярной композиции канала [2-6]. Известно, что данные каналы локализованы в плазматической мембране, ядре, во внутренней мембране митохондрий. В эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) локализуется ряд известных каналов и обменников, которые могут участвовать в транспорте калия через мембрану ретикулума. К ним относятся