

УДК 577.15, 663.15

СВОЙСТВА И N-ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ЭНДОГЛЮКАНАЗЫ II

Penicillium verruculosum

А.С. Доценко, А.М. Рожкова, А.В. Гусаков

(кафедра химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; e-mail: ansdotsenko@gmail.com)*

Целлюлазы являются основными компонентами ферментных комплексов, используемых в процессах биотрансформации растительного сырья в коммерчески значимые продукты. Эндоглюканаза II (ЭГII) из гриба *Penicillium verruculosum* была клонирована в *Penicillium canescens*. Выделена рекомбинантная форма ЭГII в гомогенном состоянии и изучены ее свойства в сравнении с нативным ферментом. С помощью масс-спектрометрического анализа определены сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов. Рекомбинантная ЭГII по своим биохимическим и каталитическим свойствам, а также типу N-гликозилирования практически не отличается от нативного фермента. На двух потенциальных сайтах N-гликозилирования (N42 и N194) в обеих формах фермента обнаружены N-связанные высокоманнозные гликаны (либо продукты их ферментативного «тримминга»), согласно общей формуле $(\text{Man})_{1-9}(\text{GlcNAc})_2$. На третьем потенциальном сайте (N19) гликозилирования не обнаружено.

Ключевые слова: целлюлаза, эндоглюканаза, *Penicillium verruculosum*, клонирование, N-гликозилирование.

Путем биотехнологической переработки растительного лигноцеллюлозного сырья можно получать такие коммерчески значимые продукты, как органические спирты и кислоты, углеводороды, простые и сложные эфиры и т.д. Основной компонент лигноцеллюлозного сырья – целлюлоза, поэтому ключевым этапом его переработки является ферментативная конверсия целлюлозы в глюкозу [1]. Для эффективного гидролиза целлюлозы используют комплексные ферментные препараты целлюлаз, содержащие целлобиогидролазы, эндоглюканазы и β -глюкозидазы. Целлобиогидролазы катализируют гидролиз кристаллической формы целлюлозы, последовательно отщепляя целлобиозу от концов полисахаридной цепи; эндоглюканазы катализируют гидролиз аморфных участков целлюлозы, расщепляя гликозидные связи внутри цепи полимера и создавая новые сайты для действия целлобиогидролаз; β -глюкозидазы гидролизуют целлобиозу и другие олигосахариды до финального продукта – глюкозы [2]. При этом для создания эффективных комплексных ферментных препаратов часто требуется осуществить экспрессию целлюлаз, находящихся в составе секретируемого комплекса ферментов

другого микроорганизма. Таким образом, возникает вопрос соответствия биохимических и каталитических свойств нативной и рекомбинантной форм целлюлаз.

Грибы из рода *Penicillium* зарекомендовали себя как эффективные продуценты высокоактивных целлюлаз [3]. Эндоглюканаза II (ЭГII) является одним из ключевых ферментов целлюлолитического комплекса, секретируемого мицелиальным грибом *Penicillium verruculosum* [4, 5].

Недавно было обнаружено, что гликозилирование (в частности N-гликозилирование) целлюлаз может оказывать существенное влияние на их активность по отношению к различным видам целлюлозы за счет того, что N-связанные гликаны способны взаимодействовать с полисахаридным субстратом, в том числе и те из них, которые находятся на периферии белковой глобулы [6, 7]. Поэтому в последнее время возник значительный интерес к данному вопросу.

Цель данной работы – выделение рекомбинантной формы ЭГII *P. verruculosum*, экспрессированной в *Penicillium canescens*, изучение ее биохимических и каталитических свойств в сравнении с нативной ЭГII, а также выявление типа N-гликозилирования в указанных формах фермента.

* Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

Материалы и методы

Клонирование ЭГП

Из геномной ДНК *P. verruculosum* методом ПЦР выделен фрагмент, соответствующий гену ЭГП; для проведения ПЦР и выделения ПЦР-продуктов использованы наборы реактивов фирм «Fermentas» (Литва) и «Qiagen» (США). Ген ЭГП клонирован в шаттл-вектор, и полученная экспрессионная конструкция трансформирована в клетки *Escherichia coli* для наработки и анализа ДНК-материала. После подтверждения последовательности гена секвенированием экспрессионная конструкция трансформирована в *P. canescens*, который является лабораторным микроорганизмом для гетерологичной экспрессии белков [7]. В результате ЭГП из *P. verruculosum* была экспрессирована в *P. canescens* в составе комплекса ферментов, секретируемого данным грибом.

Выделение и очистка ферментов

Рекомбинантная и нативная формы ЭГП выделены и очищены методами анионообменной и гидрофобной хроматографии. Фракционирование и очистку ферментов проводили с помощью хроматографической системы АКТА UPC («GE Healthcare», США). Для проведения анионообменной хроматографии использовали колонку с носителем Source 15Q («GE Healthcare», США), уравновешенную 0,01 М Bis-tris/HCl буфером (pH 6,5); фракционирование осуществляли в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 0,4 М. Для проведения гидрофобной хроматографии использовали колонку с носителем Source 15 ISO («GE Healthcare», США) и 0,05 М Na-ацетатный буфер (pH 5,0); фракционирование осуществляли в линейно убывающем (от 1,7 до 0 М) градиенте $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Для обессоливания полученных фракций использовали колонку с носителем Bio-Gel P2 («Bio-Rad Laboratories», США) и 0,05 М Na-ацетатный буфер (pH 5,0).

Масс-спектрометрический анализ

Идентификацию очищенных ферментов и анализ N-связанных гликанов проводили методом времяпролетной МАЛДИ-масс-спектрометрии на масс-спектрометре «UltrafleXtreme» («Bruker Daltonik GmbH», Германия). Кусочки геля после электрофореза в присутствии ДДС-Na, вырезанные из соответствующих белковых полос, отмывали от красителя и обрабатывали химотрипсином или пепсином для секвенирования белков («Sigma», США), используя стандартный протокол [8]. Полученные пептиды экстрагировали с помощью 20%-го раствора ацетонитрила в воде,

содержащего 0,1% трифторуксусной кислоты, и подвергали МАЛДИ-масс-спектрометрическому анализу. Сайты N-гликозилирования и структуры N-связанных гликанов определяли по данным масс-спектрометрического анализа с использованием сервиса GlycoMod (<http://web.expasy.org/glycomod/>) [9, 10].

Исследование биохимических и каталитических свойств

Биохимические и каталитические свойства рекомбинантной формы ЭГП изучены в сравнении с нативным ферментом. Активность ферментов по отношению к полисахаридным субстратам (β -глюкан («Megazyme», Австралия), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), ксилан («Sigma», США)) определяли по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) методом Шомоди–Нельсона [11, 12]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС в 1 мин при концентрации субстрата 5 г/л. Активность по *n*-нитрофенильным производным сахаров («Sigma», США) определяли по начальной скорости образования *n*-нитрофенола [13]. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [14] с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта.

Результаты и их обсуждение

Основные свойства рекомбинантной формы ЭГП оказались похожими на таковые для нативной формы. Как рекомбинантный, так и нативный ферменты характеризовались практически одинаковым температурным профилем активности по β -глюкану с оптимумом действия при 70°C, схожей термостабильностью, а также pH-профилем активности с оптимумом действия при pH 4,5 (здесь эти данные подробно не приводятся, так как они практически совпадали с описанными ранее свойствами эндоглюканазы 39 кДа *P. verruculosum* [4]).

По субстратной специфичности и удельной активности по отношению к разным субстратам рекомбинантная форма ЭГП также практически не отличалась от нативного фермента (табл. 1). Обе формы проявляли наибольшую активность по отношению к КМЦ и β -глюкану, слабо гидролизировали МКЦ и не были активными по отношению к ксилану и *n*-нитрофенильным производным сахаров (*n*-нитрофенил- β -целлобиозиду, *n*-нитрофенил- β -лактозиду и *n*-нитрофенил- β -D-глюкопиранозиду).

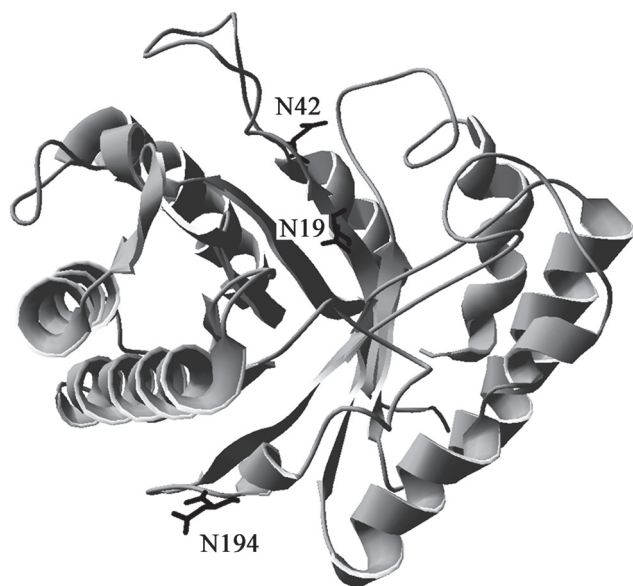
Т а б л и ц а 1

Удельная активность (Ед/мг) рекомбинантной и нативной форм ЭГП *P. verruculosum* по отношению к различным субстратам*

Субстрат	Рекомбинантная ЭГП	Нативная ЭГП
β-Глюкан	60±6	61±6
КМЦ	58±6	50±5
МКЦ	~0,008	~0,008
Ксилан	н.д.	н.д.
<i>n</i> -Нитрофенил-β-целлобиозид	н.д.	н.д.
<i>n</i> -Нитрофенил-β-лактозид	н.д.	н.д.
<i>n</i> -Нитрофенил-β-D-глюкопиранозид	н.д.	н.д.

* н.д. – активность не детектировалась.

В аминокислотной последовательности ЭГП были обнаружены три потенциальных сайта N-гликозилирования, содержащих мотив N–X–S/T, необходимый для осуществления такого типа посттрансляционной модификации белка [15]: N19, N42 и N194 (нумерация аминокислотных остатков приведена для зрелого фермента). На рисунке приведена структура ЭГП, где показаны потенциальные сайты N-гликозилирования (кристаллическая структура фермента получена в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН (г. Пущино) и любезно предоставлена канд. биол. наук В.А. Немашкаловым). Остаток N19 расположен на дне «ущелья» активного центра фермента, тогда как остатки N42 и N194 – по бокам белковой глобулы на входе и выходе из «ущелья».



Структура ЭГП из *P. verruculosum*. Черным цветом отмечены потенциальные сайты N-гликозилирования

Для идентификации возможных N-связанных гликанов использовали метод масс-спектрометрического картирования пептидов, полученных после обработки фермента специфичной протеазой, с последующим анализом данных с помощью онлайн-сервиса GlycoMod (<http://web.expasy.org/glycomod/>) [9, 10]. Предварительный теоретический анализ аминокислотной последовательности ЭГП показал, что в случае обработки фермента трипсином (наиболее часто используемой протеазой при такого рода анализах) пептиды, содержащие потенциальные сайты N-гликозилирования, имели бы весьма высокую массу (более 5000 Да), что затруднило бы их идентификацию при масс-спектрометрическом анализе, учитывая дополнительную массу N-связанных гликанов. Поэтому протеолиз рекомбинантной и нативной форм ЭГП проводили, используя химотрипсин или пепсин, действие которых, как показал теоретический анализ, должно приводить к образованию более коротких пептидов.

В гидролизате рекомбинантной формы ЭГП, полученном под действием химотрипсина, обнаружены гликопептиды, содержащие N-связанные гликаны на сайтах гликозилирования N42 и N194. Они представляют собой высокоманнозные олигосахариды (либо продукты их так называемого «тримминга» под действием α-маннозидазы [16]) с числом маннозных остатков от 1 до 8, согласно общей формуле $(\text{Man})_{1-8}(\text{GlcNAc})_2$. Некоторые из пиков, отмеченные звездочкой, также присутствовали в масс-спектре химотрипсинового гидролизата нативной ЭГП (табл. 2). Подобные же высокоманнозные олигосахариды с числом маннозных остатков от 6 до 9, также связанные с сайтами гликозилирования N42 и N194, обнаружены и в смеси

Т а б л и ц а 2

Сайты N-гликозилирования в рекомбинантной и нативной ЭГП *P. verruculosum* и структуры N-связанных гликанов, определенные с использованием сервиса GlycoMod

Фермент/протеаза	Сайт N-гликозилирования	Пептид	Величина <i>m/z</i>		Структура гликана
			экспериментальная	теоретическая	
Рекомбинантная ЭГП/химотрипсин	Asn42	Thr39-Phe61 (3MC)	3957,9*	3957,8	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Gly17-Leu49 (2MC)	5046,4*	5046,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂
	Asn194	Asn189-Tyr204 (3MC)	2334,0*	2334,1	(Man) ₁ (GlcNAc) ₂
			2658,2	2658,2	(Man) ₃ (GlcNAc) ₂
			2982,3	2982,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
		Asn189-Tyr204 (3MC, MSO)	2998,2*	2998,3	(Man) ₅ (GlcNAc) ₂
Нативная ЭГП/пепсин	Asn42	Gly35-Gln47 (3MC)	2807,4	2807,1	(Man) ₆ (GlcNAc) ₂
		Pro41-Leu49 (2MC)	2835,2	2835,2	(Man) ₉ (GlcNAc) ₂
	Asn194	Met192-Leu201 (1MC)	2807,4	2807,1	(Man) ₈ (GlcNAc) ₂

Обозначения. MC – нерасщепленные связи (missed cleavages), MSO – окисленный метионин.

*Такие же пики обнаружены в смеси пептидов, полученной в результате обработки нативной ЭГП химотрипсином.

пептидов, полученной в результате обработки нативной ЭГП пепсином. В то же время, по данным масс-спектрометрии, на третьем потенциальном сайте N-гликозилирования (N19) N-связанных гликанов не обнаружено.

Таким образом, и нативная ЭГП *P. verruculosum*, и ее рекомбинантная форма, экспрессированная в *P. canescens*, проявляли схожий тип N-гликозилирования, при котором как минимум два потенциальных сайта N-гликозилирования из трех были модифицированы высокоманнозными олигосахаридами. Следует отметить, что ранее подобные высокоманнозные N-связанные гликаны

(а также продукты их ферментативного «тримминга») были обнаружены и в других нативных или рекомбинантных ферментах, секретируемых грибом *P. canescens* [7, 16].

Резюмируя данные, представленные выше, можно констатировать, что рекомбинантная ЭГП *P. verruculosum*, экспрессированная в *P. canescens*, по своим биохимическим и каталитическим свойствам, а также по типу N-гликозилирования практически не отличается от нативного фермента. Требуется дополнительные исследования, чтобы выяснить, как гликозилирование фермента влияет на его активность и другие свойства.

Работа выполнена при финансовой поддержке МОН РФ по результатам исследований на базе ЦКП «Промышленные биотехнологии» ИНБИ РАН – Уникальный идентификатор работ: RFMEFI62114X0002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kumar R., Singh S., Singh O.V. // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 35. N 5. P. 377.
2. Teeri T.T. // Trends Biotechnol. 1997. Vol. 15. N 5. P. 160.
3. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P. // Biofuels. 2012. Vol. 3. N 4. P. 463.
4. Morozova V.V., Gusakov A.V., Andrianov R.M., Pravitnikov A.G., Osipov D.O., Sinitsyn A.P. // Biotechnol. J. 2010. Vol. 5. N 8. P. 871.

5. Чекушина А.В., Доценко Г.С., Кондратьева Е.Г., Симицын А.П. // Биотехнология. 2013. № 3. С. 69.
6. Adney W.S., Jeoh T., Beckham G.T., Chou Y.C., Baker J.O., Michener W., Brunecky R., Himmel M.E. // Cellulose. 2009. Vol. 16. N 4. P. 699.
7. Dotsenko A.S., Gusakov A.V., Volkov P.V., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Biotechnol. Bioeng. 2015. Published online 04.09.2015, DOI: 10.1002/bit.25812.
8. Smith B.E. // Protein sequencing protocols. Totowa, 1997.
9. Cooper C.A., Gasteiger E., Packer N. // Proteomics. 2001. Vol. 1. N 2. P. 340.
10. Gusakov A.V., Semenova M.V., Sinitsyn A.P. // J. Anal. Chem. 2010. Vol. 65. N 14. P. 1446.
11. Nelson N.A. // J. Biol. Chem. 1944. Vol. 153. P. 375.
12. Симицына О.А., Бухтояров Ф.Е., Гусаков А.В., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Винецкий Ю.П., Симицын А.П. // Биохимия. 2003. Т. 68. № 11. С. 1494.
13. Gusakov A.V., Sinitsyn A.P., Salanovich T.N., Bukhtojarov F.E., Markov A.V., Ustinov B.B., Zeijl C. van, Punt P., Burlingame R. // Enzyme Microb. Technol. 2005. Vol. 36. N 1. P. 57.
14. Peterson G.L. // Anal. Biochem. 1979. Vol. 100. N 2. P. 201.
15. Dwek R.A., Edge C.J., Harvey D.J., Wormald M.R., Parekh R.B. // Annu. Rev. Biochem. 1993. Vol. 62. P. 65.
16. Gusakov A.V., Sinitsyna O.A., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. // Carbohydr. Res. 2013. Vol. 382. P. 71.

Поступила в редакцию 01.08.15

PROPERTIES AND N-GLYCOSYLATION OF RECOMBINANT ENDOGLUCANASE II FROM *Penicillium verruculosum*

A.S. Dotsenko, A.M. Rozhkova, A.V. Gusakov

(Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University)

Cellulose is the major component of plant cell walls and the main substrate in processes of biotransformation of lignocellulosic materials into sugars and then into commercially valid organic compounds. Thus cellulases are the major components of enzyme complexes used to hydrolyze cellulose into sugars. Endoglucanase II (EGII) from *Penicillium verruculosum* was cloned into *Penicillium canescens*. The recombinant EGII was isolated in homogeneous form, and its properties were studied in comparison with a native enzyme. Mass-spectrometry analysis was used to identify the N-glycosylation sites and the structures of N-linked glycans. Both the native and recombinant forms of EGII demonstrated similar biochemical and catalytic properties as well as N-glycosylation patterns. N-linked high-mannose glycans and the products of their enzymatic trimming, according to the formula (Man)₁₋₉(GlcNAc)₂, were found at two N-glycosylation sites (N42 and N194) of both EGII forms. Glycosylation at the third potential site (N19) was not detected.

Key words: cellulase, endoglucanase, *Penicillium verruculosum*, cloning, N-glycosylation.

Сведения об авторах: Доценко Анна Сергеевна – аспирант кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ (ansdotsenko@gmail.com); Рожкова Александра Михайловна – ст. науч. сотр. лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН и кафедры химической энзимологии МГУ, канд. хим. наук (amrojtkova@yahoo.com); Гусаков Александр Васильевич – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии МГУ и лаборатории биотехнологии ферментов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, докт. хим. наук, профессор (avgusakov@enzyme.chem.msu.ru).