

На правах рукописи

ТРУБИЦИНА ЛЮБОВЬ ИГОРЕВНА

**ДВУХДОМЕННЫЕ ЛАККАЗЫ БАКТЕРИЙ РОДА *STREPTOMYCES*:
КЛОНИРОВАНИЕ, ЭКСПРЕССИЯ, ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ**

Специальность: 03.01.04 – Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пущино 2017

Работа выполнена в лаборатории микробной энзимологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина
Российской академии наук (ИБФМ РАН)

Научный руководитель: **Леонтьевский Алексей Аркадьевич,**
доктор биологических наук, заместитель директора
по научной работе, Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт биохимии
и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина
Российской академии наук

Официальные оппоненты: **Новосёлова Елена Григорьевна,**
доктор биологических наук, профессор, главный
научный сотрудник, Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт биофизики
клетки Российской академии наук

Васина Дарья Владимировна,
кандидат биологических наук, научный сотрудник,
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук» Институт биохимии им.
А.Н. Баха

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии и
физиологии растений и микроорганизмов
Российской академии наук

Защита состоится «22» июня 2017 г. в 13 часов 00 минут на заседании
Диссертационного совета Д 002.121.01 при ИБФМ РАН по адресу: 142290
Московская область, г. Пущино, проспект Науки, д.5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН. Автореферат
размещен на сайтах <http://vak.ed.gov.ru> и <http://www.ibpm.ru>. Автореферат разослан
«___» апреля 2017 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Кулаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Лакказа (К.Ф.1.10.3.2, *para*-дифенол: кислород оксидоредуктаза) – фермент, относящийся к семейству т.н. «голубых» оксидаз, содержащих в активном центре по четыре атома меди, организованные в одноядерный монокластер (Т1-металлоцентр, один атом меди) и трёхядерный кластер, состоящий из Т2-металлоцентра (один атом меди) и Т3-металлоцентра (два атома меди). Лакказа катализирует окисление широкого спектра фенольных и нефенольных субстратов. Конечным акцептором электронов в данных реакциях является кислород, который восстанавливается до воды. Лакказы обнаружены у грибов, бактерий, растений и насекомых.

Наиболее изученными считаются лакказы грибов-базидиомицетов. Молекулярная масса (ММ) грибных лакказ составляет 60-70 кДа. Они являются гликопротеинами (Rivera-Hoyos *et al.*, 2013). Типичные грибные лакказы – мономеры, известны отдельные сообщения о димерных лакказах (Wahleithner *et al.*, 1996; Min *et al.*, 2001). Единый полипептид мономера лакказы содержит три домена. Грибные лакказы более стабильны при нейтральных значениях рН, но более активны в диапазоне рН 4,5-5,0, имеют температурный оптимум 40-60°C и широкий разброс характеристик термостабильности (Baldrian, 2006; Kunamneni *et al.*, 2007). Все лакказы принято разделять на группы низко- (350-450 мВ), средне- (450-550 мВ) и высоко-редокспотенциальных (550-850 мВ) ферментов (Mot and Silaghi-Dumitrescu, 2012). Высоко-редокспотенциальные лакказы встречаются, обычно, у базидиальных грибов. Относительно высокий окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) лакказ в сочетании с низкой субстратной специфичностью объясняет способность лакказ окислять широкий спектр устойчивых субстратов как природного, так и не природного происхождения (Kunamneni *et al.*, 2007).

Бактериальные лакказы были открыты сравнительно недавно. Впервые лакказная активность была обнаружена у бактерии *Azospirillum lipoferum* (Givaudan *et al.*, 1993). В дальнейшем, ферменты были охарактеризованы у представителей родов *Bacillus*, *Streptomyces*, *Thermus* и др. (Santhanam *et al.*, 2011). При этом были обнаружены как аналоги грибных лакказ, имеющие три домена в структуре мономера, так и новые необычные формы лакказ, мономеры которых состоят только из двух доменов.

Большинство двухдоменных (2д) лакказ были выделены из бактерий рода *Streptomyces*. В настоящее время охарактеризованы всего семь 2д лакказ: оксидаза из *Nitrosomonas europaea* (DiSpirito *et al.*, 1985), EpoA из *S. griseus* (Endo *et al.*, 2003), SilA из *S. ipomoea* (Molina-Guijarro *et al.*, 2009), SLAC из *S. coelicolor* (Machczynski *et al.*, 2004), Ssl1 из *S. sviveus* (Gunne and Urlacher, 2012), LMCO из *S. pristinaespiralis* (Ihssen *et al.*, 2015) и MCO из *S. griseorubens* (Feng *et al.*, 2015). У 2д лакказ ММ составляет 32-44 кДа, сведений о наличии углеводных компонентов нет. Белки стабильны при нейтральных-щелочных значениях рН, температурный оптимум 40-60°C. Наиболее термостабильным, до публикации наших работ, считался фермент MCO, сохранявший 52% активности при 70°C в течение 2 ч (Feng *et al.*, 2015). ОВП 2д лакказ был определён у двух ферментов и составлял 0,43-0,5 В в случае SLAC (Machczynski *et al.*, 2004; Gallaway *et al.*, 2008) и 0,375 В у Ssl1 (Gunne *et al.*, 2014).

Лакказам находят практическое применение в различных отраслях промышленности: пищевой, текстильной, целлюлозно-бумажной (Couto and Herrera, 2006), а также в целях биоремедиации (Duran and Esposito, 2000), для химического синтеза лекарственных препаратов (Kunamneni *et al.*, 2008a), в составе моющих и косметических средств (Pezzella *et al.*, 2015). При этом используют такие их преимущества, как высокий ОВП, широкую субстратную специфичность, термостабильность, устойчивость к азидам и фторидам, сохранение активности в нейтральном и щелочном диапазонах рН, отсутствие необходимости использования дорогих кофакторов. В наибольшей степени такой набор свойств характерен для 2д бактериальных лакказ, которые проигрывают трёхдоменным (3д) грибным лакказам только по величине ОВП. Но и этот недостаток может быть скомпенсирован применением правильно подобранных редокс-медиаторов.

В связи с вышесказанным, поиск и характеристика новых 2д бактериальных лакказ весьма актуальны, так как пока известны неполные характеристики всего семи 2д лакказ бактерий. Исследование новых 2д лакказ позволит обнаружить ферменты, обладающие свойствами, которые будут более точно соответствовать требованиям промышленности.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы было получение и характеристика бактериальных двухдоменных лакказ из бактерий – представителей рода *Streptomyces*.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Выбор штаммов бактерий рода *Streptomyces* – носителей генов двухдоменных лакказ и клонирование генов 2д лакказ стрептомицетов.
2. Создание штаммов с повышенной экспрессией целевых генов и разработка схемы очистки полученных рекомбинантных ферментов.
3. Исследование физико-химических свойств, определение каталитических характеристик ферментов.
4. Подбор условий кристаллизации двухдоменных лакказ стрептомицетов.
5. Анализ моделей трёхмерных структур 2д лакказ стрептомицетов в сравнении с пространственными моделями классических трёхдоменных лакказ грибов.
6. Изучение причин устойчивости 2д лакказ к действию ингибитора азида натрия
7. Изучение возможности повышения окислительно-восстановительного потенциала двухдоменных лакказ при использовании подходящего медиатора.

Научная новизна.

Из двух штаммов бактерий рода *Streptomyces* были клонированы гены двухдоменных бактериальных лакказ. Получены, охарактеризованы и закристаллизованы две новые бактериальные лакказы. Впервые обнаружена и охарактеризована термостабильная бактериальная 2д лакказа, способная сохранять высокую активность после кипячения в течение часа. Обнаружена устойчивость 2д лакказ к азиду и фториду натрия как в щелочных, так и кислых условиях, а также способность сохранять активность при нейтральном значении рН. Для этих ферментов была обнаружена низкая активность по отношению к фенолам, ароматическим карбоновым кислотам. Установлено, что для формирования крупных

кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа у разных 2д лакказ имеет значение как наличие, так и отсутствие сигнального пептида в аминокислотной последовательности рекомбинантного белка. Также впервые обнаружена причина низкой чувствительности 2д лакказ к ингибитору азиду натрия: его связывание в необычном участке активного центра и невозможность проникновения по субстратному каналу к T2/T3-центру из-за наличия отрицательно заряженных и полярных аминокислот, формирующих стенки канала.

Научно-практическая значимость.

У охарактеризованных 2д лакказ обнаружено сочетание высокой термостабильности, низкой субстратной специфичности, способности работать при нейтральном и щелочном значениях рН и устойчивости к ингибиторам (азиду и фториду). Совокупность этих свойств делает 2д лакказы бактерий весьма привлекательными инструментами в биотехнологических процессах.

Известно, что 2д бактериальные лакказы обладают низким ОВП. Для повышения ОВП 2д лакказ в составе пары лакказа/медиатор нами был проведен поиск подходящего медиатора из числа известных медиаторов 3д лакказ грибов. На примере реакций обесцвечивания трифенилметановых красителей в качестве наиболее эффективного медиатора был отобран 2,2'-азинобис(3-этилбензотиазолин сульфоновая кислота) (АБТС), повышающий ОВП до 0,7 В. Новая лакказа *Streptomyces griseoflavus* Ас-993 была защищена патентом (Юревич Л.И. и др., 2015).

Личный вклад диссертанта. Диссертантом выполнены: поиск генов 2д лакказ, клонирование и экспрессия генов 2д лакказ; очистка и характеристика ферментов; участие в поиске условий для кристаллизации лакказ, анализ трёхмерных структур лакказ; подготовка материалов для публикации в научных журналах.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на шести конференциях: 15-я, 16-я и 19-я Международная Пушчинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука 21-го века» (Пушино, 2011; 2012, 2015), VIII Молодёжная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 2012), Международная научная конференция: «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Беларусь, Минск, 2013), II Пушчинская школа-конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов" (Пушино, 2015).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 работ, из них три статьи в рецензируемых изданиях, входящих в список рекомендованных ВАК, и один патент.

Структура и объём диссертации. Диссертация состоит из восьми разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список литературы. Работа изложена на 147 страницах, содержит 22 таблицы и 41 рисунок. Библиографический указатель содержит 328 источников литературы.

Место проведения работы и благодарности. Работа выполнена в лаборатории микробной энзимологии ФГБУН Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН). Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю д.б.н. Леонтьевскому А.А. и всему коллективу лаборатории микробной энзимологии за практическую помощь, ценные советы и поддержку при написании диссертации. Отдельную благодарность выражаю с.н.с., к.б.н. Лисову А.В. за помощь в овладении методами исследования ферментов и активное обсуждение результатов и с.н.с., к.б.н. Захаровой М.В. за помощь в проведении молекулярно-биологических работ; коллективу лаборатории молекулярной микробиологии и лаборатории радиоактивных изотопов за предоставленную материальную базу для проведения части работы; сотрудникам лаборатории структурных исследований аппарата трансляции ФГБУН Института белка Российской академии наук (ИБ РАН) д.б.н. Тищенко С.В. и к.ф.-м.н. Габдулхакову А.Г. за работу по кристаллизации ферментов и решение пространственной структуры белков. Особую благодарность выражаю своим близким – мужу, Трубищину И.В., детям, Трубищину Е.И. и А.И., и родителям за внимание, поддержку и помощь.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были пять бактерий рода *Streptomyces*: *S. viridochromogenes* Ac-629, *S. griseoflavus* Ac-993, *S. hygroscopicus* Ac-831, *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235, *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ, <http://www.vkm.ru>).

Состав сред и условия культивирования. Бактерии культивировали 5 сут на пептонно-дрожжевой среде (г/л): пептон – 5, дрожжевой экстракт – 3, KH_2PO_4 – 0,2, глюкоза – 5, агар – 20, при 28°C и постоянном перемешивании (180-200 об/мин).

Программы и интернет-ресурсы. Геномы стрептомицетов, проанализированные в работе, находились в открытом доступе в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Детекцию аминокислотных (а.к.) последовательностей лакказ проводили с помощью программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Программу Clustal Omega использовали для выравнивания а.к. последовательностей лакказ, а также последовательностей генов лакказ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Пространственные структуры белков были определены методом молекулярного замещения в программе Phaser и визуализированы в программе PyMOL (<http://www.pymol.org>) сотрудником лаборатории структурных исследований аппарата трансляции к.ф.-м.н. Габдулхаковым А.Г. (ИБ РАН) (Tishchenko *et al.*, 2015; Trubitsina *et al.*, 2015).

Выделение геномной ДНК производили с использованием набора Genomic DNA Purification Kit (Fermentas, Литва). Предварительно биомассу разрушали в жидком азоте. Качество геномной ДНК определяли электрофоретически в 0,8 % агарозном геле.

ПЦР амплификацию ДНК проводили в смесях для ПЦР с добавлением олигонуклеотидов (по 2,5 мкМ), дезоксинуклеотидов (250 мкМ), MgCl₂ (1,25-1,5 мМ) и матрицы ДНК (2,5 мкг/мл) на амплификаторе MJ Mini (Bio-Rad, США).

Очистку ПЦР-фрагментов производили с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле с бромистым этидием (0,05 %). Выделение ДНК из геля проводили с использованием набора DNA Extraction Kit (Fermentas, Литва). Концентрацию полученных фрагментов ДНК анализировали электрофоретически.

Клонирование генов лакказ для определения нуклеотидной последовательности проводили в вектор pAL-TA (Евроген, Россия) согласно рекомендациям производителя, для экспрессии – в вектор pQE-30 (Qiagen, США). Фрагменты ДНК и вектор pQE-30, обработанные эндонуклеазами рестрикции BamHI и HindIII, использовали для постановки реакции лигирования. Лигазной смесью трансформировали клетки *Escherichia coli* M15 (pRep4).

Экспрессия генов 2д лакказ проводилась в штамме *E. coli* M15(Rep4). Конечная концентрация индуктора ИПТГ составляла 1 мМ для лакказы *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 (рост 4 ч при 37°C), и 0,1 мМ для лакказ *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 (рост 17 ч при 18°C). Во всех случаях в среду добавляли 0,25 мМ CuSO₄. Затем биомассу осаждали центрифугированием, разрушали ультразвуком, супернатант фильтровали (Whatman GD/X, диаметр пор 0,2 мкм).

Очистку рекомбинантных белков из бесклеточного экстракта проводили с использованием 5-мл колонки с Ni-сефарозой (GE Healthcare, США). Колонку уравнивали пятью объемами буфера 1 (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 1 мМ имидазол, рН 7,4). После нанесения экстракта колонку промывали пятью объемами буфера 1. Элюцию лакказы проводили ступенчатым градиентом имидазола (буфер 2 (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 10 мМ имидазол, рН 7,4), буфер 3 (20 мМ натрий-фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, 500 мМ имидазол, рН 7,4)), скорость элюции 1 мл/мин. Активные фракции объединяли и использовали для нанесения на колонку 26/60 HiLoad Superdex 200 (GE Healthcare, США). Колонку уравнивали буфером 4 (20 мМ натрий-ацетатный буфер, 0,1 М NaCl, рН 5,0), в качестве элюента использовали тот же буфер. Скорость потока составляла 1 мл/мин. Фракции с рекомбинантным белком объединяли, диализовали в буфере 4 без 0,1 М NaCl и хранили при -20°C.

Четвертичную структуру нативного фермента определяли по результатам нативного электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с градиентом концентрации 5-12%. Белковые полосы проявляли по Fairbanks *et al.* (1971) с модификациями, с использованием Кумасси R-250, а также проявляли на активность с 2 мМ АБТС. Субъединичный состав определяли денатурирующим электрофорезом в 12 % ПААГ по Laemmli (1970) с 0,1 % додецилсульфатом натрия (ДДС-Na). Белковые полосы проявляли по Fairbanks.

Концентрацию белка определяли с использованием реактива Брэдфорд (Sigma, США), а также спектрофотометрически. Коэффициенты экстинкции для каждого из ферментов определяли при помощи программы Vector NTI (Life Technologies, США).

Активность лакказ определяли спектрофотометрически по скорости окисления АБТС. Метод основан на определении продуктов окисления АБТС при 420 нм, $\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Heinfling *et al.*, 1998). За единицу активности принимали количество фермента, образующего 1 мкМ продукта за 1 минуту.

Определение рН-оптимумов проводили спектрофотометрически по скорости окисления АБТС (1 мМ) и 2,6-диметоксифенола (2,6-ДМФ, 1 мМ) ($\lambda_{\text{макс}} 469 \text{ нм}$, $\epsilon_{469} = 49600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) в 50 мМ Na-ацетатном буфере или 50 мМ буфере Britton and Robinson (Britton and Robinson, 1931), **температурных оптимумов и термостабильности** – по скорости окисления АБТС (1 мМ) в аналогичных буферах.

Значения K_m и V_{max} определяли с помощью графика зависимости активности фермента от концентрации субстрата. Расчёты проводили с использованием программы SigmaPlot (SSI, США).

Субстратную специфичность лакказ определяли по изменению спектра поглощения реакционной смеси в отношении 1 мМ феруловой, ванильной, гентизиновой, сиреневой кислоты, 4-метоксифенола, L-тирозина, гидрохинона, катехола, пирогаллола и октацианомолибдата калия в буфере Britton and Robinson, рН 8,5.

Влияние ингибиторов на активность лакказ определяли по изменению скорости окисления 1 мМ субстратов (АБТС и 2,6-ДМФ). В качестве ингибиторов использовали азид натрия, фторид натрия, ЭДТА и 1,10-фенантролин в концентрациях 1, 10 и 100 мМ. Все измерения проводили в 50 мМ буфере Britton and Robinson (в кислом и щелочном диапазоне рН). Влияние ионов металлов на активность лакказ определяли по изменению скорости окисления 1 мМ АБТС в присутствии солей: MgSO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 , CoCl_2 , ZnSO_4 , FeCl_3 , CuSO_4 , NaCl . Измерения проводили в 50 мМ буфере Britton and Robinson (в кислом диапазоне рН).

Кристаллизацию лакказ проводила сотрудник лаборатории структурных исследований аппарата трансляции д.б.н. Тищенко С.В. (ИБ РАН) (Tishchenko *et al.*, 2015; Trubitsina *et al.*, 2015). Для кристаллизации был использован метод диффузии паров в его модификации «висящая капля». Для получения кристаллов лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629 (0,03×0,05×0,6 мм) использовали раствор № 2.41 в наборе MemGold (Molecular Dimensions, Англия) с добавлением 1,3% натриевой соли полиакриловой кислоты 5100. Для получения кристаллов лакказы *S. griseoflavus* Ac-993 (0,05×0,1×0,7 мм) использовали раствор № 1.5 в наборе MemGold. Для получения кристаллов лакказы *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 (0,07×0,07×0,07 мм) использовали раствор № 46 в наборе Crystal Screen 2 (Hampton Research, США). Кристаллы лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629 отражали рентгеновские лучи с пределом разрешения 2,4 Å, лакказы *S. griseoflavus* Ac-993 – 2,0 Å, лакказы *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, после вымачивания в криорастворе, содержащем 10мМ NaN_3 в течение 20 минут, отражали с пределом разрешения 2,4 Å. Координаты и структурные факторы лакказ были помещены в базу данных Protein Data Bank: PDB ID: 4N8U (Ac-629); PDB ID: 4GYB, 4NAJ, 4NB7 (Ac-1709) и PDB ID: 5LHL (Ac-993).

Обесцвечивание красителей бриллиантового зелёного, малахитового зелёного и фуксина (50 мкМ в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5,0) проводили как в отсутствии, так и в присутствии медиатора АБТС (50 мкМ) в реакционной смеси в течение суток при комнатной температуре. Об обесцвечивании судили по изменению спектра поглощения красителей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выбор объектов исследования

В качестве объектов исследования были выбраны бактерии рода *Streptomyces*. Идентификацию генов 2д лакказ проводили на основе анализа транскрибируемой а.к. последовательности на наличие консервативных медь-связывающих аминокислот: -NH₂-NH₂-NH₂-NH₂-NH₂-NH₂-, а также на основе отсутствия одного из трёх доменов в структуре белка. Всего было проверено 16 геномов стрептомицетов. 2д Лакказы были обнаружены в геномах 10 бактерий: *S. clavuligerus* ATCC 27064; *S. flavogriseus* ATCC33331; *S. griseoflavus* Tu4000; *S. hygroscopicus* ATCC 53653; *S. lividans* TK24; *S. pristinaespiralis* ATCC 25486; *S. scabiei* 87.22; *S. svicensis* ATCC 29083; *S. violaceusniger* Tu4113; *S. viridochromogenes* DSM 40736. Для дальнейшей работы были выбраны штаммы с идентифицированными генами 2д лакказ: *S. griseoflavus* Ac-993; *S. hygroscopicus* Ac-831; *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709; *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235 и *S. viridochromogenes* Ac-629.

2. Клонирование генов 2д лакказ

Штаммы-носители генов 2д лакказ были культивированы на пептонно-дрожжевой среде для получения биомассы. Из биомассы была выделена геномная ДНК и использована в качестве матрицы для постановки ПЦР. К генам 2д лакказ, идентифицированных нами в геномах стрептомицетов различных видов, были написаны праймеры (табл. 1).

Таблица 1.

Олигодезоксирибонуклеотиды для клонирования генов 2д лакказ.

Штамм	Название	Нуклеотидная последовательность (направление 5' – 3')
<i>Streptomyces</i> sp. (<i>lividans</i>) Ac-235, Ac-1709	S.livF S.livR	ATGGACAGGCGAGGCTTCAA TCAGTGCTCGTGTTCGTGTG
<i>S. viridochromogenes</i> Ac-629	S.virF S.virR	ATGGACAGACGCAGCTTCAA CGTCAGTGCTCGTGGCC
<i>S. hygroscopicus</i> Ac-831	S.hrF S.hrR	ATGCCACAGACGCGGCTTCAG GCGCACGAGCTATGACCC
<i>S. griseoflavus</i> Ac-993	S.gfF S.gfR	ATGGACAGACGCGGTTTCAA TCAGTGCGCGTGTCTCCTGGC

Продукты ПЦР-амплификации, полученные с геномных ДНК штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629, *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-235, *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, *S. griseoflavus* Ac-993 с разработанными видоспецифичными праймерами (табл. 1), были лигированы в плазмиду pAL-TA и секвенированы. Для штаммов Ac-235 и Ac-1709 полученные а.к. последовательности были полностью идентичны, а также идентичны последовательности 2д лакказы из штамма *S. lividans* TK24 (EFD65350.1). А.к. последовательности лакказ из штаммов Ac-629 и Ac-993

отличались от последовательностей целевых белков: последовательности обоих белков были короче в сравнении с таковыми для лакказ из *S. viridochromogenes* DSM 40736 (WP_003994334.1) и *S. griseoflavus* Tu 4000 (WP_004922484.1) (Ac-629 – 313 п.о. против 325 п.о. и Ac-993 – 322 п.о. против 328 п.о.), и характеризовались делециями на С-концевом участке и небольшими инсерциями в последовательности сигнального пептида. Консервативные медь-связывающие остатки присутствовали во всех а.к. последовательностях (рис. 1).

```

629  MDRRSFNRRVLLGGATVATSLSLTSVPEVAGAAAPARTAPAGGEVRRHLKLYIEKLADGQL
DSM  MDRRSFNRRVLLGGAAVATSLSV--APEAISADGPAKTAPAGGEVKRIKLYAEKLPDGM
*****:*****: .** . * .**:*:*****:::*** ** * **:
629  GYGFEKGRATIPGPLIELNEGDTAHIEVENTLDVPASLHVHGLDYEITSDGTKLNRSVD
DSM  GYGLEKKGASIPGPLIELNEGDTLHVEFENTMDVAVSLHVHGLDYEITSDGTKLNRSV
***:*:***:*:*****:***:* .***:* .*****:*****:***
629  PGGTRTYTWRTHAPGRRADGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRKGLYGPVVRK
DSM  PGGTRTYTWRTHAPGRRKDGTRAGSAGYWHYHDHVVGTEHGTQGLQKGLYGPVIVR
***** ***** ***** *.:*****:*****
629  DVLDPDATHTIVFNDMLINQPAHSGPNFEATVGDRVEFVMI THGEYYHTFHMHGHRWADN
DSM  DVLDPDRTHTVFNDMRINRPPHSGPDFEATVGDRVEFVVI THGEFYHTFHMHGHRWADN
***** ***:***** ***: * *****:*****:*****:*****:*****
629  RTGLLTGPDDPSQVIDNKIVGPADSFQVIAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMGMVGLFL
DSM  RTGMLTGPDDPSQVIDNKITGPADSFQVIAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMGMVGLFL
***:*****:*****.*****:*****:*****:*****:*****
629  VKKKDGTIPGHEH-----
DSM  VKKPDGTIPGYDPHEHGEQPPAGGHEH A
*** *****:
993  MDRRGFNRRVLLGGVAATTSLSLIAPEAVSAPESAGTAAAGAAPAGGEVRRVTMYAERLA
Tu   MDRRGFNRRVLLGGAAVATSLSLIAPEAVSAARP-----AKTAPAGGEVRRVKMYAERLD
*****:*****.*.:***** ***** * :*****:*****
993  GGQMGYGLEKKGASIPGPLIELNEGDTLHVEFENTMDVPVSLHVHGLDYEISSDGTKQNK
Tu   GGRMGYGFEEKGASVPGPLIELNEGDTLHIELENTMDVPASLHVHGLDYEISSDGTKQNN
*.:***:***:*****:*****:*****:*****:*****:*****:
993  SHVEPGGTRTYTWRTHPEGRRADGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTEHGTGGIRNGLYGPVIV
Tu   SHVEPGATRTTYTWRTHKPGRRSDGTWRAGSAGYWHYHDHVVGTVHGTGGIRNGLYGPVV
*****.*****:***:*****:***** *****:
993  RRKGDVLPDATHTIVFNDMTINRPAHTGPNFEATVGDRVEIVMI THGEYYHTFHMHGHR
Tu   RRKDDVLPDATHTIVFNDMSINRPAHTGPDFEATVGDRVEIVMI THGEYYHTFHMHGHR
***.*****:*****:*****:*****:*****:*****
993  WADNRTGMLTGPDDPSQVIDNKICGPADSFQVIAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMGMV
Tu   WADNRTGMLTGPDDPSQVIDNKICGPADSFQVIAGEGVGAGAWMYHCHVQSHSDMGMV
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
993  GLFLVKKPDGTIPGYDPQENAN-----
Tu   GLFLVKKPDGTIPGYDPHENANGAAAKEGQENAN B
*****:*****

```

Рисунок 1. Результаты выравнивания а.к. последовательностей 2д лакказ. Лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 (А) и *S. griseoflavus* Ac-993 (Б) выровнены с последовательностями медьсодержащих оксидаз из *S. viridochromogenes* DSM 40736 и *S. griseoflavus* Tu4000. Гомологичные а.к. выделены точками, идентичные – звёздочками. Консервативные участки выделены серым цветом и подчёркиванием.

3. Экспрессия генов, очистка рекомбинантных белков.

Для продукции белков в гетерологичной системе, лакказы гены, лигированные с плазмидой pQE-30, были трансформированы в штамм *E. coli* M15(pRep4). Использование вектора pQE-30 позволяет получать рекомбинантный белок с шестью гистидинами на N-конце. Общая схема получения лакказ представлена на рисунке 2.

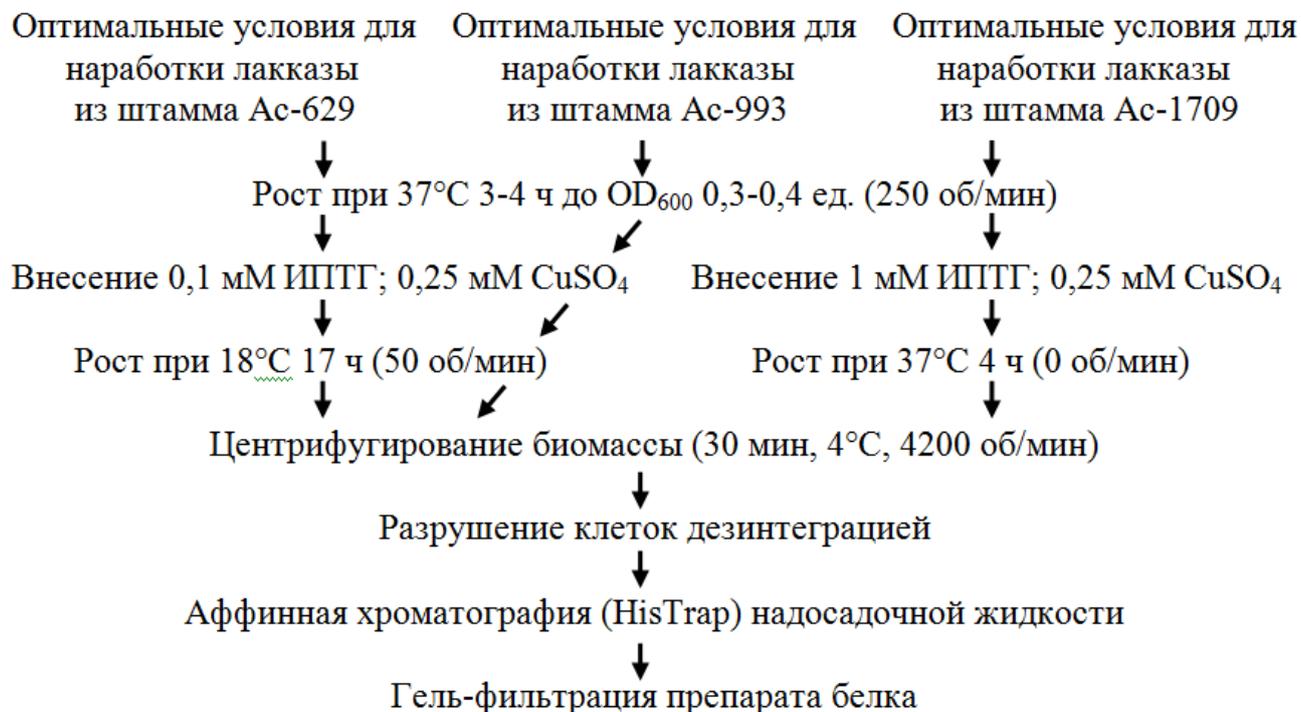


Рисунок 2. Схема получения рекомбинантных белков.

Т.к. 2д лакказы являются медьсодержащими белками, для формирования активной формы фермента необходимо наличие ионов меди. Поэтому в процессе индукции одновременно с внесением индуктора ИПТГ проводилось внесение в культуральную среду ионов меди в концентрации 0,25 мМ. Было установлено, что лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 в процессе индукции 1 мМ ИПТГ при 37°C агрегировали. Снижение концентрации индуктора до 0,1 мМ а также снижение температуры до 18°C во время индукции устраняли эффект агрегирования. Весь белок был идентифицирован в растворимой фракции после дезинтеграции. Наличие шести гистидинов на N-конце у рекомбинантных лакказ позволило провести очистку препаратов при помощи аффинной хроматографии на Ni-сефарозе. Препарат наносили на колонку, уравновешенную буфером 1. Промывали пятью объемами буфера 1, затем буфера 2. После чего элюировали специфически-связавшийся белок буфером 3. Фракции с лакказой, имеющие характерный синий цвет, объединяли и проводили гель-фильтрацию препарата на колонке с носителем Superdex 200 (предварительно уравновешенной буфером 4). Гель-фильтрация препарата была необходима для получения гомогенного препарата белка (устранения незначительных белковых примесей), а также для перевода белка в буфер 4. Полученные фракции с лакказой объединялись, были диализованы против буфера 4 без соли, и хранились при -20°C.

4. Характеристика рекомбинантных лакказ

4.1. Молекулярные свойства белков

По данным ПААГ с ДДС-На молекулярные массы рекомбинантных белков из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629, *S. griseoflavus* Ac-993 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 были равны 41,5, 37,3 и 40,5 кДа, соответственно (рис. 3 А). Теоретически рассчитанная ММ рекомбинантных белков была равной 35,3, 36,1 и 38,3 кДа для вышеуказанных штаммов, соответственно. Молекулярные массы очищенных ферментов, определенные с помощью нативного электрофореза, составили 110, 106 и 120 кДа для препаратов из штаммов Ac-629, Ac-993 и Ac-1709, соответственно. Все три рекомбинантных белка представляли собой гомотримеры. Все ферменты обладали активностью в форме гомотримера (рис. 3 Б).

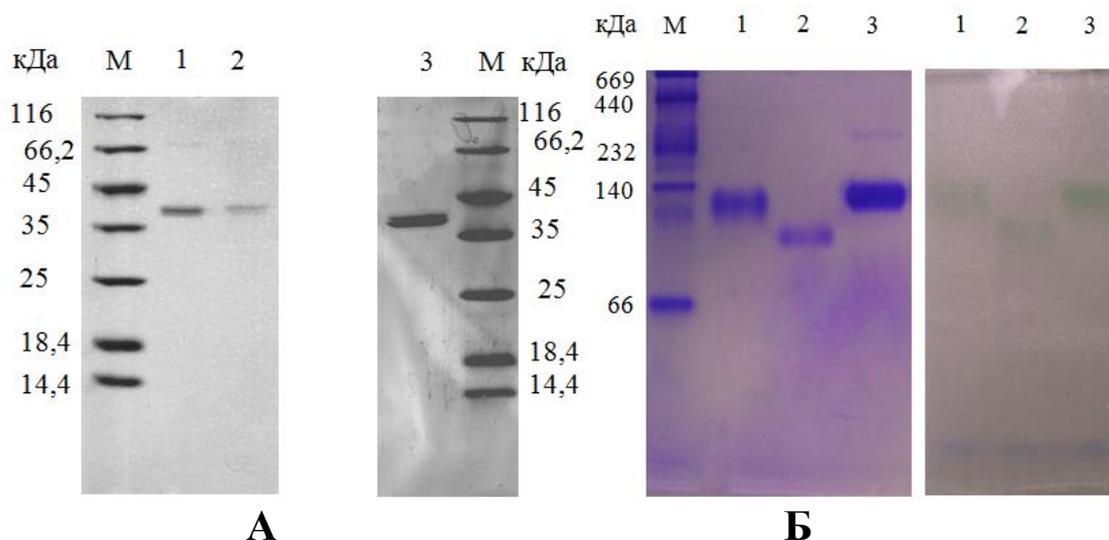


Рисунок 3. Электрофореграммы очищенных рекомбинантных лакказ из трёх бактерий рода *Streptomyces*. А. ПААГ с ДДС-На. Б. Нативный ПААГ с градиентом концентрации 5-12%. 1. Лакказа *S. viridochromogenes* Ac-629, 2. Лакказа *S. griseoflavus* Ac-993. 3. Лакказа *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709. М – маркеры Unstained Protein MW Marker (Thermo Fisher Scientific, США), High MW Native Marker Kit (GE Healthcare, США).

4.2. Физико-химические свойства ферментов

Для определения рН-оптимумов ферментов использовали два тестовых субстрата лакказ – АБТС и 2,6-ДМФ. Рекомбинантные лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629, *S. griseoflavus* Ac-993 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 окисляли АБТС при оптимальных значениях рН, равных 4,5, 4,2 и 4,0, соответственно. Оптимумы рН при окислении 2,6-ДМФ составляли 8,4, 9,2 и 8,5 для ферментов Ac-629, Ac-993 и Ac-1709, соответственно. Разные рН-оптимумы окисления 2д лакказами фенольных и нефенольных соединений были показаны при характеристике ранее описанных 2д лакказ. Стабильность препаратов ферментов при различных значениях рН определялась при инкубировании при комнатной температуре в течение семи суток. Так же, как и описанные ранее 2д лакказы, ферменты из штаммов Ac-629 и Ac-1709 были более стабильны при щелочных значениях рН. Ферменты при рН 11,0 сохраняли более 80% начальной активности (рис. 4 А, В).

Лакказа из штамма Ас-993 была более стабильна при значениях рН 7,0 и 9,0. Остаточная активность фермента при данных значениях составляла 73% и 71%, соответственно (рис. 4 Б).

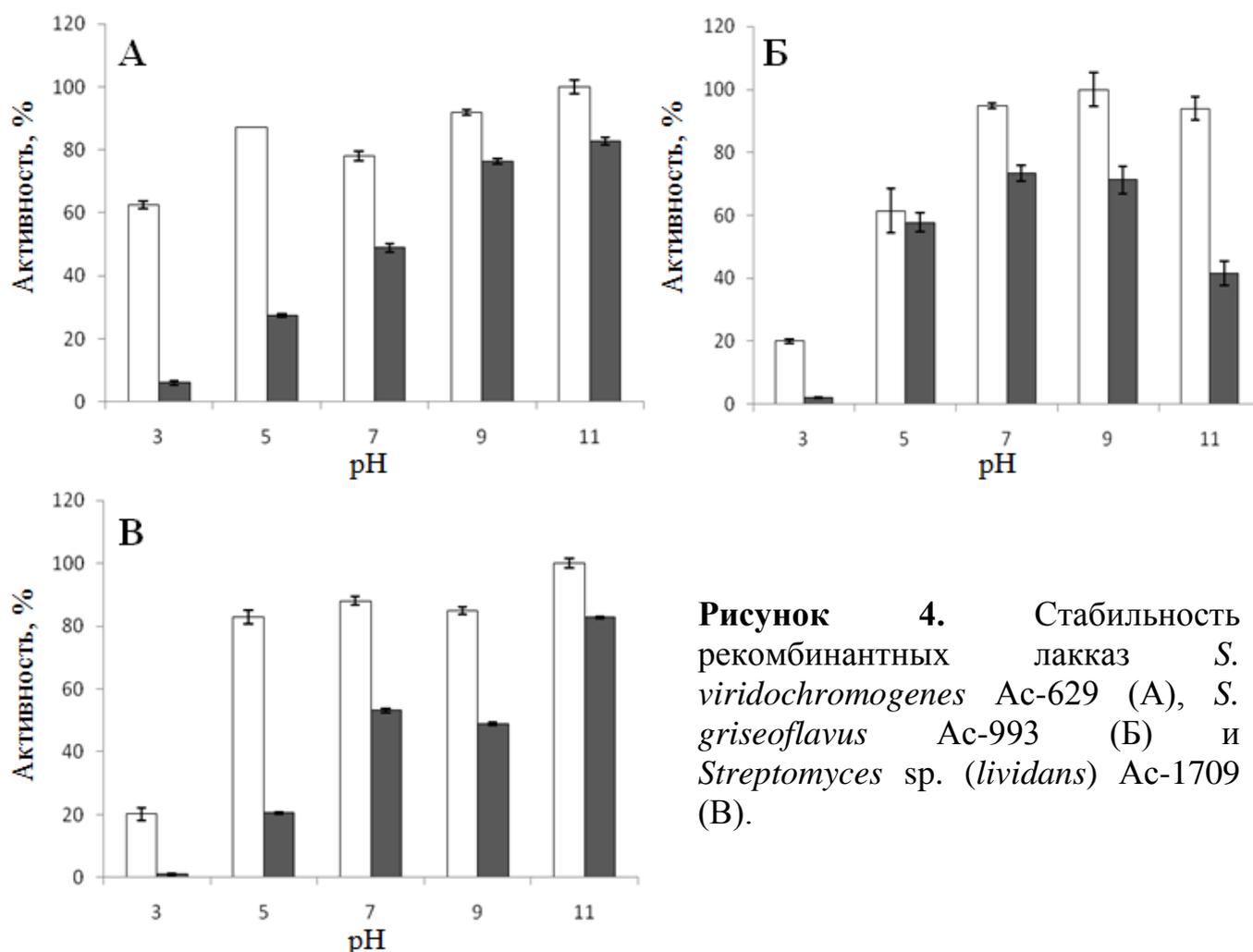


Рисунок 4. Стабильность рекомбинантных лакказ *S. viridochromogenes* Ас-629 (А), *S. griseoflavus* Ас-993 (Б) и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709 (В).

Температурные оптимумы лакказ были заметно выше значений, известных для представителей группы 2д лакказ, и составляли 65°C, 75°C и 90°C. Наименее термостабильным был фермент *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709 со временем полуинактивации при 60°C, равным 1 ч (табл. 2).

Таблица 2.
Термостабильность лакказ.

Лакказа	Температура, °С	Время инкубирования					
		10 мин	20 мин	30 мин	40 мин	50 мин	60 мин
Из Ас-629	80	79,75	81,05	69,57	60,53	58,02	53,48
	90	81,11	76,85	69,62	64,83	53,42	54,61
	98	92,68	70,50	64,17	42,09	40,51	37,55
Из Ас-993	80	91,20	91,51	87,90	79,75	74,70	66,96
	90	96,38	87,69	89,46	74,98	57,54	36,31
	98	80,51	42,88	22,06	13,25	8,00	6,11
Из Ас-1709	60	99,97	86,23	70,19	60,16	52,37	45,00
	70	95,57	68,16	46,45	31,29	24,51	17,95
	80	66,21	49,63	27,50	19,15	16,62	12,57

* - остаточная активность, %

Более термостабильными были лакказы *S. griseoflavus* Ас-993 и *S. viridochromogenes* Ас-629. Лакказа Ас-993 сохраняла более 65% начальной активности при инкубировании в течение часа при 80°C. Лакказа Ас-629 сохраняла 55% начальной активности при инкубировании в течение часа при 90°C (табл. 2). Лакказы Ас-993 и Ас-629 сохраняли активность при инкубировании в течение часа даже при 98°C (10% и 40% начальной активности, соответственно). Лакказа *S. viridochromogenes* Ас-629 является самой термостабильной 2д лакказой, охарактеризованной в настоящее время.

4.3. Спектральные свойства ферментов

Все препараты 2д лакказ были голубого цвета. В спектрах поглощения присутствовали максимум поглощения при 590 нм, указывающий на наличие Т1-центра, а также плечо при 330 нм, указывающее на наличие Т3-медного центра (рис. 5). Это является характерной особенностью спектров поглощения всех 2д лакказ.

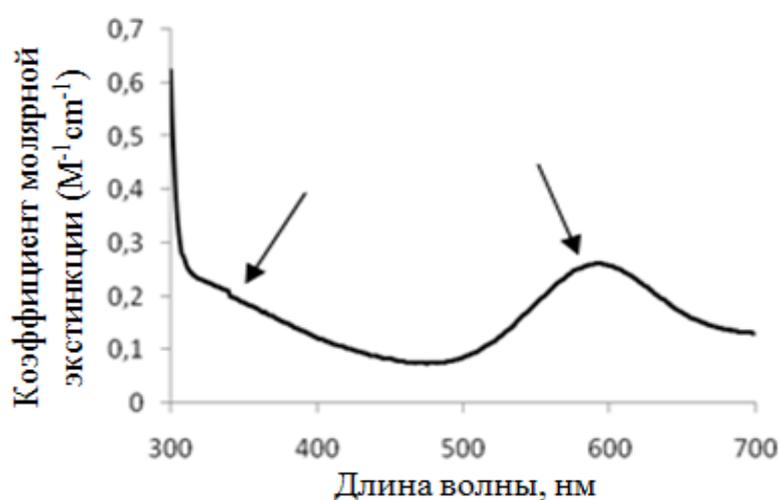


Рисунок 5. Спектр поглощения рекомбинантных лакказ на примере 2д лакказы *S. viridochromogenes* Ас-629. Максимум поглощения при 590 нм и плечо при 330 нм указаны стрелками.

4.4. Каталитические свойства ферментов

Были исследованы кинетические характеристики 2д лакказ в отношении субстратов – доноров только электрона (АБТС и ферроцианида калия), а также субстрата – донора и протона, и электрона (2,6-ДМФ) (табл. 3).

Таблица 3.

Кинетические характеристики рекомбинантных лакказ.

Фермент	Субстрат	K_m , мМ	V_{max} , Ед/мг	$k_{кат}$, с ⁻¹
Лакказа <i>S. viridochromogenes</i> Ас-629	АБТС	0,79	20,6	11,6
	Ферроцианид	0,13	52,18	29,5
	2,6-ДМФ	1,68	0,89	0,5
Лакказа <i>S. griseoflavus</i> Ас-993	АБТС	0,178	21,81	12,6
	Ферроцианид	0,053	34,4	19,9
	2,6-ДМФ	0,44	0,158	0,09
Лакказа <i>Streptomyces</i> sp. (<i>lividans</i>) Ас-1709	АБТС	0,52	21,1	12,9
	Ферроцианид	0,099	52,15	32,03
	2,6-ДМФ	3,73	1,61	0,98

Если сравнивать известные значения каталитической активности 2д лакказ с полученными нами результатами, то лакказа *S. griseoflavus* Ас-993 окисляла 2,6-ДМФ с более низкой скоростью (0,09 с⁻¹), чем известные 2д лакказы (0,32-4,2 с⁻¹),

однако имела более высокое сродство к субстрату, чем известные лакказы (0,89-4,27 мМ). Остальные лакказы попадали в известный диапазон значений. Касательно АБТС, K_m охарактеризованных лакказ попадала в диапазон известных значений (0,36-2,9 мМ), кроме лакказы *S. griseoflavus* Ас-993 (0,178 мМ), однако все ферменты окисляли данный субстрат с более высокой скоростью, чем известные 2д лакказы ($k_{cat} = 7,38-9,99 \text{ с}^{-1}$). Относительно ферроцианида калия, все описанные 2д лакказы имели высокое сродство и высокую скорость окисления данного субстрата (выше, чем для АБТС). Данных по кинетике окисления данного субстрата другими 2д лакказами нет.

Исследование субстратной специфичности 2д лакказ в отношении ряда соединений показало, что ферменты катализировали окисление фенольных субстратов с одной и двумя ОН- группами в *o*-положении (катехол, пирогаллол) и не окисляли фенолы с ОН- группой в *n*-положении (гидрохинон). Кроме того, лакказы катализировали окисление фенольных соединений с метокси-группой в *o*- (2,6-ДМФ), *m*- (феруловая кислота (кроме лакказы из Ас-1709), ванильная кислота) и *n*- (4-метоксифенол) положениях, окисляли ароматическую карбоновую кислоту (гентиизиновая кислота) и не окисляли тирозин, сиреневую кислоту, октацианомолибдат калия. Сравнивая полученные нами данные с существующей информацией, помимо «универсальных» субстратов (АБТС и 2,6-ДМФ), все 2д лакказы были способны окислять большое разнообразие соединений фенольной и нефенольной природы.

Изучение влияния ингибиторов 3д лакказ показало, что в щелочных условиях 1,10-фенантролин и ЭДТА ингибировали активность 2д лакказ (табл. 4). В кислых условиях 1,10-фенантролин оказался эффективным ингибиторами всех трёх лакказ, ЭДТА снижал активность лакказ *S. viridochromogenes* Ас-629 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709 (табл. 4). Известно, что азид натрия является сильным ингибитором 3д грибных лакказ. Концентрация азид натрия до 0,1 мМ полностью ингибирует активность грибных лакказ. Бактериальные 3д лакказы ингибируются азидом натрия в меньшей степени. Полное ингибирование может вызвать концентрация азид до 10-20 мМ. В кислых условиях азид натрия и фторид натрия ингибировали активность всех изученных нами лакказ, однако даже при концентрации ингибитора 100 мМ наблюдалась остаточная активность (<10%) (табл. 4). В щелочных условиях азид и фторид натрия не снижали активность лакказ, а немного её повышали. Этот эффект был впервые продемонстрирован в данной работе.

Ионы металлов по-разному влияли на активность исследованных нами лакказ. Наибольший ингибирующий эффект оказывали ионы Fe^{3+} (активность лакказ Ас-629 и Ас-993 при 10 мМ концентрации отсутствовала, лакказы Ас-1709 составляла 3,4%) и Cu^{2+} (активность лакказ Ас-629 и Ас-993 при 10 мМ концентрации составляла 59,5 и 25,6%, соответственно), что согласуется с данными по влиянию ионов металлов на активность лакказы SilA из *S. ipomoea* (Molina-Guijarro *et al.*, 2009). Исключение – лакказа из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ас-1709, которая, подобно 2д лакказе МСО из *S. griseorubens*, активировалась ионами Cu^{2+} в концентрации 1мМ (до 112% от начальной активности) (Feng *et al.*, 2015). Лакказа МСО также

ингибировалась ионами железа, правда в меньшей степени. Разные ионы по-разному влияют на активность 2д лакказ (оказывают в разной степени ингибирующий, активирующий эффект или не оказывают эффекта). Отдельно стоит отметить, что исследованные лакказы, подобно SilA, являлись галотолерантными ферментами и сохраняли остаточную активность при 1 М NaCl (Molina-Guijarro *et al.*, 2009).

Таблица 4.

Влияние ингибиторов на активность рекомбинантных лакказ.

Белок	Концентрация	Кислые значения pH (4,0-4,5)				Щелочные значения pH (8,0-9,0)			
		NaN ₃	NaF	1,10-Ф	ЭДТА	NaN ₃	NaF	1,10-Ф	ЭДТА
629	1 мМ	81,6*	92,5	70,9	85,52	105,6	100,2	59,8	78,2
	10 мМ	37,4	75	17,2	15,38	113,6	99,1	37,3	84
	100 мМ	5,8	13,2	-	-	137,1	118,8	-	1
993	1 мМ	86,9	102,4	102,5	96	98	92,9	84,4	90,6
	10 мМ	51,9	124,6	30,9	142	105,1	100,6	54,9	9,6
	100 мМ	7,2	27,6	5,9	142,7	123,2	115,5	18,3	0
1709	1 мМ	81,4	95,2	73,4	97	-	109,8	33,2	35,9
	10 мМ	39,2	65,8	21,1	84,9	109,7	116,8	21,2	48,2
	100 мМ	5,35	20	2,1	46,4	109	154,2	6	72,5

* – остаточная активность ферментов в %; 1,10-Ф – 1,10-фенантролин

4.5. Кристаллизация рекомбинантных лакказ

С препаратами лакказ *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993, клонированных с сигнальным пептидом, были получены микрокристаллы, непригодные для рентгеноструктурного анализа. При кристаллизации лакказы *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 с сигнальным пептидом были получены крупные кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа. Удаление сигнального пептида у лакказ из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 способствовало формированию крупных кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа. Рентгеноструктурный анализ полученных кристаллов лакказ Ac-629 и Ac-993 показал, что оба белка представляют собой гомотримеры (рис. 6 А, Б).

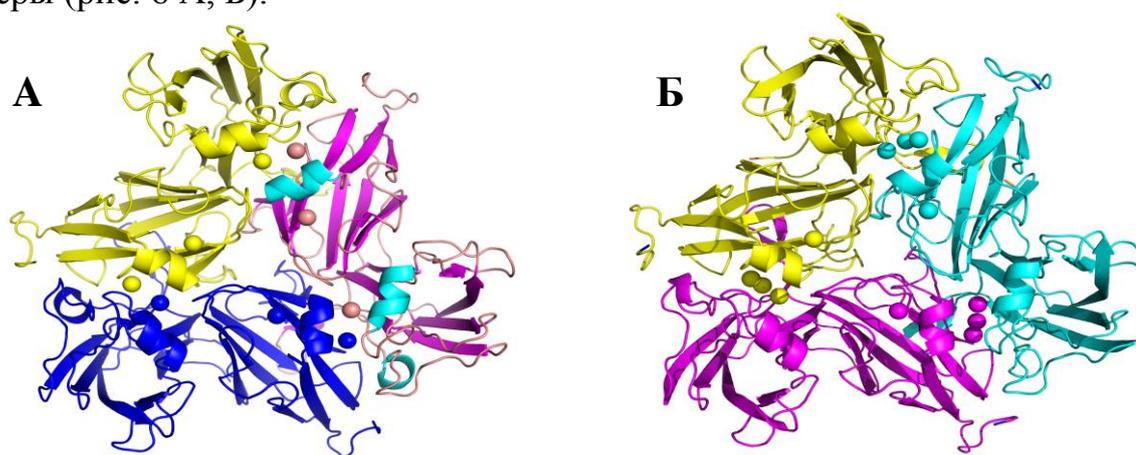


Рисунок 6. Структуры лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 (А) и *S. griseoflavus* Ac-993 (Б). Мономеры в структуре тримера выделены разными цветами. Окрашенные сферы – атомы меди. Стрелки и спирали – β -складчатости и α -спирали в структуре белков.

В конфигурации каждой лакказы можно выделить два купредоксиновых домена, построенных на основе восьми консервативных β -структур. Каждый мономер в структуре тримера несёт по 4 атома меди в активном центре. T2/T3-медный кластер был локализован между вторым доменом одного мономера, несущего T1-медный центра, и первым доменом другого мономера, не несущего T1-медный центр.

В нашей работе было установлено, что 2д лакказы слабо ингибировались азидом натрия при кислых значениях pH, а при щелочных ингибирующий эффект отсутствовал. Для объяснения данного эффекта кристаллы 2д лакказы из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 были выдержаны в криорастворе с азидом натрия в щелочных условиях (pH 9,0). Известно, что азид натрия связывается с T2/T3-центром 3д лакказы, препятствуя передаче электронов и, таким образом, ингибирует активность фермента. Поэтому даже при низкой концентрации азид натрия (1 мМ) наблюдается отсутствие ферментативной активности 3д лакказ. Анализ кристаллов 2д лакказы с азидом натрия показал, что азид не связывается с T2/T3-центром, а локализован на расстоянии 5,5 Å от T1-центра лакказы (рис. 7).

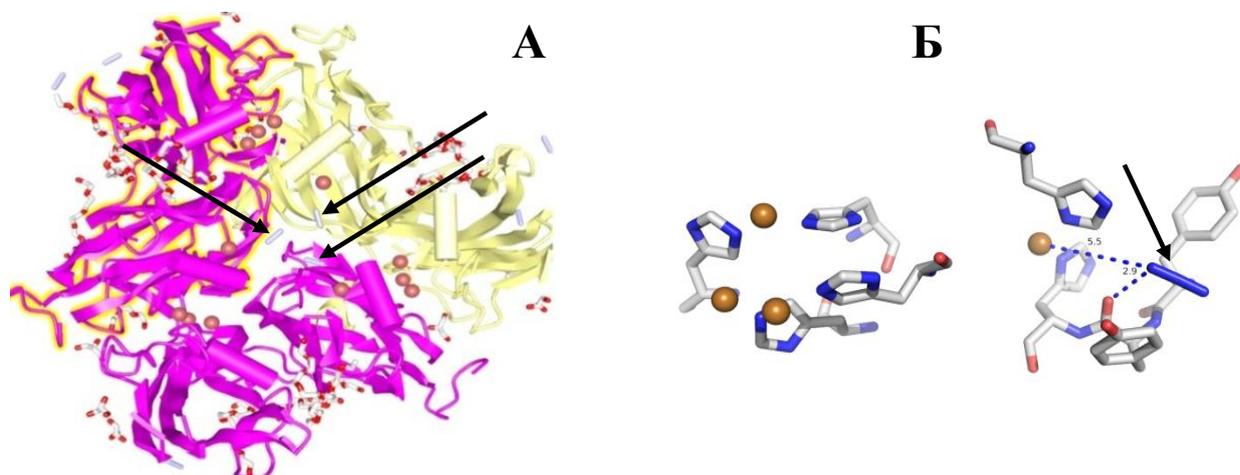


Рисунок 7. Структура лакказ *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 (А). Локализация азид натрия относительно металлоцентров (Б). Оранжевые сферы – атомы меди. Азид натрия указан стрелками.

Причина такой необычной локализации азид не установлена, однако невозможность связывания ингибитора с T2/T3-центром фермента в щелочных условиях, как мы предполагаем, связана с характером аминокислот субстратного канала 2д лакказ.

Анализ структуры субстратного канала лакказы бактерии *S. viridochromogenes* Ac-629 в сравнении с субстратным каналом лакказы гриба *Trametes versicolor* указывает на значительные различия в их строении (рис. 8). В нашей работе впервые обнаружено, что у 2д лакказы субстратный канал заметно уже, чем у 3д лакказ грибов. К тому же, аминокислоты, формирующие стенки канала у 3д лакказ грибов на примере фермента *T. versicolor*, представлены неполярными остатками (лейцин 459, пролин 346, фенилаланин 344), а у 2д лакказы бактерии Ac-629 полярными (треонин 163, глутамин 288). Две аминокислоты, расположенные у входа в канал – аспартат 194 и глутамат 225, в щелочной среде вероятно приобретают

отрицательный заряд, и препятствуют проникновению азид- и фторид- ионов к T2/T3 кластеру. И у 3д, и у 2д лакказы микроокружение T2/T3-кластера составляют восемь гистидинов. У 2д лакказы – His 99, 101, 153, 155, 231, 233, 284, 286, у 3д лакказы – His 64, 66, 109, 111, 398, 400, 452, 454. Помимо восьми остатков гистидина, 2д лакказа имеет три дополнительных остатка гистидина (151, 161 и 223) из микроокружения T2/T3-кластера, которые, вероятно, также депротонируются, внося вклад в формирование отрицательного заряда субстратного канала при щелочных значениях pH. Эти различия могли быть причиной отсутствия ингибирующего эффекта азидата натрия на активность 2д лакказ в щелочных условиях.

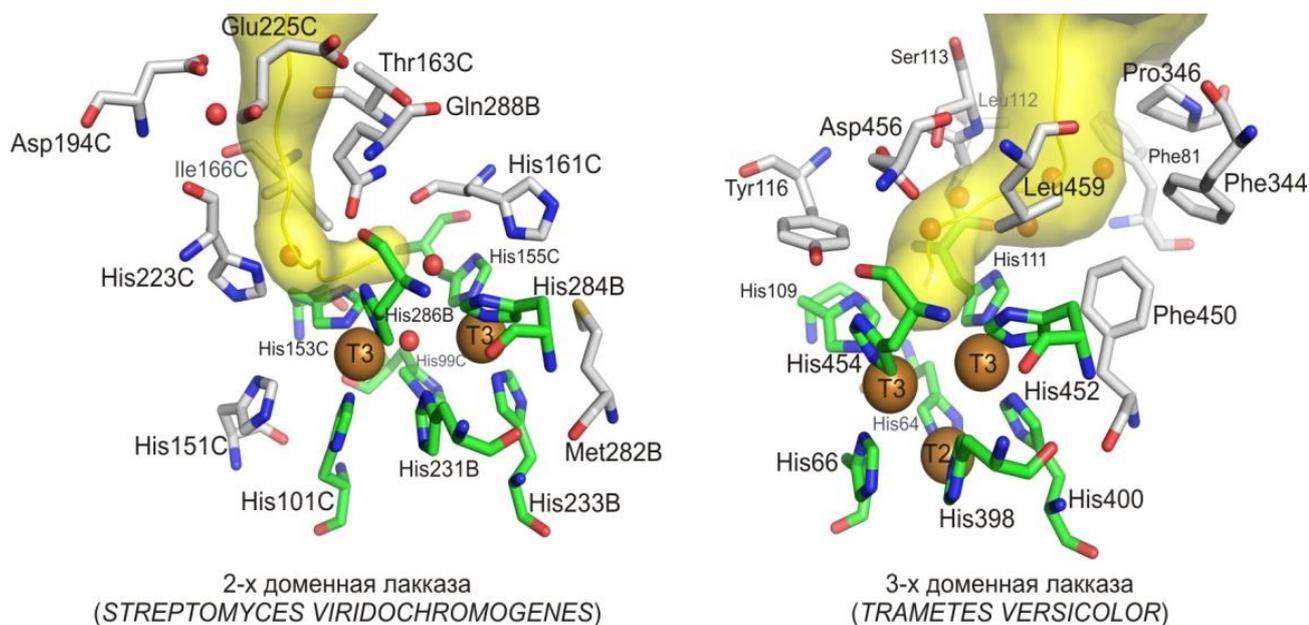


Рисунок 8. Структура T2/T3 металлоцентров и субстратных каналов двухдоменной лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629 (PDB ID: 4n8u) и трёхдоменной лакказы гриба *Trametes versicolor* (PDB ID: 1kya). Траектория субстратных каналов выделена жёлтым цветом, медь-связывающие гистидины выделены зелёным цветом, ионы меди – коричневые сферы.

4.6. Обесцвечивание трифенилметановых красителей

В данной работе была продемонстрирована способность окисления 2д лакказами трифенилметановых красителей: бриллиантового зелёного, малахитового зелёного и фуксина (рис. 9). Ферменты без медиатора были неспособны окислять эти красители. А в присутствии медиатора АБТС 2д лакказы эффективно обесцвечивали данные красители.

Ранее возможность использования АБТС в качестве медиатора для 2д лакказ не была изучена. В проведенных экспериментах мы показали возможность увеличения ОВП пары лакказа/медиатор до 0,7 В.



Рисунок 9. Обесцвечивание 50 мкМ красителей рекомбинантными лакказами. «- АБТС» – раствор красителя без АБТС, «+АБТС» – краситель с внесением АБТС, «+629» – краситель с внесением белка *S. viridochromogenes* Ac-629, «+993» – краситель с внесением белка *S. griseoflavus* Ac-993, «+1709» – краситель с внесением белка *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из трёх штаммов стрептомицетов нами были клонированы и экспрессированы три гена двухдоменных лакказ. Две новые 2д лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993, а также ранее известный белок SLAC из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, были экспрессированы в гетерологичной системе (в штамме *E. coli*) и очищены до гомогенного состояния. Показано, что охарактеризованные 2д лакказы, имели два структурно-функциональных домена, были активны в форме тримеров, и не проявляли активность в форме димеров. Установлено, что в отличие от 3д лакказ, 2д бактериальные лакказы были более стабильны при щелочных значениях pH (9-11), имели оптимум окисления нефенольных субстратов при кислых значениях pH (4,0-4,5), а фенольных субстратов при щелочных значениях pH (8,5-9,2), были более стабильны к температурной денатурации. 2д Лакказы более эффективно окисляли нефенольные соединения. В данной работе охарактеризована самая термостабильная 2д лакказа (из *S. viridochromogenes* Ac-629) из описанных ранее. Фермент сохранял около 40% начальной активности после кипячения в течение часа. Исследовано влияние ингибиторов и ионов металлов на активность лакказ. Установлено, что 2д лакказы не ингибировались азидом и фторидом натрия в щелочных условиях.

Новые 2д лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 и *S. griseoflavus* Ac-993 были закристаллизованы без сигнального пептида. Белки представляли собой гомотримеры, несущие 4 атома меди на 1 молекулу белка. Каждый мономер построен из восьми бета-структур. Анализ структуры субстратных каналов 2д лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629 впервые показал, что он заметно уже, чем у 3д грибных, что имеет принципиальное значение для понимания каталитических особенностей 2д лакказ. Кроме того, нами было предложено объяснение устойчивости 2д лакказ бактерий к типичным ингибиторам 3д лакказ грибов. Так, аминокислоты, формирующие стенки субстратного канала у 3д лакказ,

обычно представлены неполярными остатками (лейцин, пролин, фенилаланин), а у 2д лакказ полярными (треонин, глутамин). В щелочной среде полярные остатки, по-видимому, приобретают отрицательный заряд и препятствуют проникновению азид- и фторид- ионов к Т2/Т3-центром фермента. Этим можно объяснить отсутствие связывания азид натрия с Т2/Т3-центром, его необычную локализацию в микроокружении Т1-центра, и, как следствие, отсутствие ингибирующего эффекта азид натрия на активность 2д лакказ в щелочных условиях.

Впервые была продемонстрирована способность 2д лакказ обесцвечивать трифенилметановые красители в паре с медиатором – АБТС, что указывает на возможность повышения ОВП пары 2д лакказа/медиатор до 0,7 В при использовании подходящего медиатора.

ВЫВОДЫ

1. Для работы выбраны 5 штаммов стрептомицетов, из которых клонированы два ранее неизвестных гена новых бактериальных 2д лакказ *Streptomyces viridochromogenes* Ac-629 и *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 (нуклеотидные последовательности зарегистрированы в базе данных NCBI под номерами JX393082.1 и KP941125), а также ранее известный ген SLAC (EFD65350.1) *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 с сигнальным пептидом.

2. 2д Лакказы *S. viridochromogenes* Ac-629, *S. griseoflavus* Ac-993 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709 были экспрессированы в *E. coli* M15 (pRep4) и получены в электрофоретически гомогенном состоянии.

3. Исследованы физико-химические характеристики ферментов (рН-оптимум и рН-стабильность, температурный оптимум и термостабильность, получен спектр поглощения ферментов с максимумами при 590 нм и плечами при 330 нм, исследовано влияние ингибиторов и ионов металлов на активность), определены кинетические параметры (K_m , k_{cat}) в отношении субстратов 2,2'-азинобис (3-этилбензотиазолин сульфоновой кислоты), 2,6-диметоксифенола и ферроцианида калия.

4. Подобраны условия и получены кристаллы термостабильных лакказ из штаммов *S. viridochromogenes* Ac-629, *S. griseoflavus* Ac-993 и *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, пригодные для проведения рентгеноструктурного анализа.

5. С помощью рентгеноструктурного анализа доказано, что, в отличие от классических 3д лакказ, у 2д лакказ ширина субстратного канала существенно уже; аминокислоты, формирующие стенки субстратного канала, представлены полярными аминокислотами (треонин, глутамин); помимо восьми гистидинов, составляющих координационную сферу Т2/Т3-кластера, имеются три дополнительных остатка гистидина.

6. Впервые обнаружено, что азид натрия в щелочных условиях не связывался с Т2/Т3-центром лакказы из *Streptomyces* sp. (*lividans*) Ac-1709, а был локализован в микроокружении Т1-центра.

7. На примере реакций окисления трифенилметановых красителей 2д лакказами установлено, что использование эффективного медиатора позволяет повысить ОВП пары фермент/медиатор до 0,7 В.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в изданиях, входящих в список рекомендованных ВАК:

1. Юревич Л.И., Лисов А.В., Леонтьевский А.А. Двухдоменная лакказа бактерии *Streptomyces lividans* Ac-1709 – термостабильный биокатализатор, активный при щелочных значениях рН // Научно-технический вестник Поволжья. – 2012. – №5. – С. 64-68.

2. Trubitsina L.I., Tishchenko S.V., Gabdulkhakov A.G., Lisov A.V., Zakharova M.V., Leontievsky A.A. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes* // Biochimie. – 2015. – V. 112. – P. 151-159.

3. Tishchenko S., Gabdulkhakov A., Trubitsina L., Lisov A., Zakharova M., Leontievsky A. Crystallization and X-ray diffraction studies of a two-domain laccase from *Streptomyces griseoflavus* // Acta Crystallographica Section F, Structural Biology Communications. – 2015. – V. 71. – Pt 9. – P. 1200-1204.

Патенты:

1. Юревич Л.И., Лисов А.В., Леонтьевский А.А. 2015. Патент РФ № 2539780. Рекомбинантная двухдоменная лакказа бактерии *Streptomyces griseoflavus* Ac-993, обладающая высокой термостабильностью и щелочным оптимумом рН окисления фенольных соединений; фрагмент ДНК, кодирующий двухдоменную лакказу бактерии *Streptomyces griseoflavus* Ac-993; способ получения двухдоменной лакказы бактерии *Streptomyces griseoflavus* Ac-993.

Статья в сборнике трудов конференции:

1. Трубицина Л.И., Лисов А.В., Захарова М.В., Тищенко С.В., Габдулхаков А.Г., Гарбер М.Б., Леонтьевский А.А. Новые двухдоменные лакказы бактерий рода *Streptomyces* // Международная научная конференция: «Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты». Сборник научных трудов. Беларусь, Минск, 2013. – С. 191-200.

Тезисы:

1. Юревич Л.И., Леонтьевский А.А. Распространённость медьсодержащих оксидаз среди бактерий – представителей рода *Streptomyces* // 15-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука 21 века» (18-22 апреля 2011 г., Пущино). Сборник тезисов. Пущино, 2011. С. 49.

2. Юревич Л.И., Захарова М.В., Лисов А.В., Леонтьевский А.А. Бактериальные лакказы – клонирование, экспрессия и характеристика ферментов // 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука 21 века» (16-21 апреля 2012 г., Пущино). Сборник тезисов. Пущино, 2012. С. 203

3. Юревич Л.И., Захарова М.В., Лисов А.В., Леонтьевский А.А. Новые бактериальные лакказы – двухдоменные ферменты с высокой термостабильностью // VIII Молодёжная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (29-31 октября 2012 г., Москва). Сборник тезисов. Москва, 2012. С. 48-50.

4. **Трубицина Л.И.**, Лисов А.В., Леонтьевский А.А. Двухдоменные бактериальные лакказы из штаммов *Streptomyces viridochromogenes* Ac-629 и *Streptomyces lividans* Ac-1709: физико-химические свойства и кинетические характеристики // 19-я Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука 21 века» (20–24 апреля 2015 г., Пушино). Сборник тезисов. Пушино, 2015. – С. 144.

5. **Трубицина Л.И.**, Лисов А.В., Захарова М.В., Леонтьевский А.А. Двухдоменные лакказы из бактерий рода *Streptomyces*: исследование структуры и свойств ферментов // II Пушинская школа-конференция "Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов". Сборник тезисов. Пушино, 2015. – С. 83-84.

6. Костарева О.С., **Трубицина Л.И.**, Габдулхаков А.Г., Лисов А.В., Гарбер М.Б., Тищенко С.В. Предварительные данные рентгеноструктурного анализа кристаллов лакказы из *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 // 19-я Международная Пушинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука 21 века» (20–24 апреля 2015 г., Пушино). Сборник тезисов. Пушино, 2015. – С. 242.