

*На правах рукописи*

**Лисова Зоя Александровна**

**ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОФОРМ ЛАККАЗЫ  
ГРИБА *CERRENA UNICOLOR***

03.01.04-биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Пушино - 2011**

Работа выполнена в Пушкинском государственном университете на базе лаборатории микробной энзимологии Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пушкино

Научный руководитель: доктор биологических наук  
А.А. Леонтьевский

Официальные оппоненты: доктор биологических наук  
Г.Д. Миронова  
доктор биологических наук  
И.Г. Моргунов

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита диссертации состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г. в \_\_ часов \_\_ мин. на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН по адресу: 142290, Московская обл., г. Пушкино, проспект Науки, д. 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

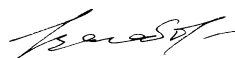
Автореферат размещен на сайте: <http://www/ibpm.ru/>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2011 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

доктор биол. наук



В.М.Вагабов

### Актуальность проблемы

Лакказа (К.Ф.1.10.3.2, пара-дифенол: кислород оксидоредуктаза) - медьсодержащий фермент - катализирует окисление широкого спектра субстратов кислородом, восстанавливая его до воды. Этот фермент обнаружен у бактерий, грибов, растений и насекомых. Лакказа участвует в процессах синтеза меланинов, пигментов, развитии спор, детоксикации опасных метаболитов, дегградации лигнина (Thurston, 1994; Leonowicz et al., 2001; Eggert et al., 1996a). Лакказы могут продуцироваться в виде единственной формы фермента, но чаще - в виде множественных форм. Наиболее изучены лакказы грибов-базидиомицетов, вызывающих белую гниль древесины.

Лакказа обладает особыми каталитическими свойствами: обладает высоким редокс-потенциалом ( $E^0$  лакказ базидиальных грибов достигает 790 мВ); лакказа неспецифична (способна окислять широкий набор субстратов, различающихся по строению и свойствам: моно-, ди-, полифенолы, amino- и метоксизамещенные фенолы, ароматические амины; неорганические ионы ( $[\text{Mo}(\text{CN})_8]^{4-}$ ,  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ,  $[\text{Os}(\text{CN})_6]^{4-}$ ,  $[\text{W}(\text{CN})_8]^{4-}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ); спектр субстратной специфичности может быть значительно расширен при участии в реакции низкомолекулярных соединений, так называемых редокс-медиаторов (пара лакказа/медиатор способна окислять субстраты с редокс-потенциалом, превышающим 1100 мВ); лакказы бактериального происхождения часто отличаются высокой термостабильностью (сохраняют каталитическую активность при 80-90°C) и катализируют реакции при нейтральных или щелочных значениях pH; для катализа не требуются кофакторы (фермент зависим лишь от наличия кислорода воздуха).

Эти качества сделали лакказу одним из наиболее распространенных инструментов в современной биотехнологии для разрушения ксенобиотиков, трансформации продуктов разложения лигнина, делигнификации и отбеливания растительного волокна, обесцвечивания красителей в стоках текстильного производства, при получении древесноволокнистых плит, древесных блоков и картона без применения токсичных связующих, в косметике, в пищевой промышленности, в органическом синтезе.

Несмотря на огромный потенциал использования лакказ в биотехнологии, примеров практического применения лакказ в промышленных масштабах немного: лакказы хорошо известны как компоненты красок для волос, препарат Deni Lite II (Novo Nordisk Co) используется для отбеливания хлопчатобумажных тканей в текстильной промышленности.

Причины такого несоответствия заключаются в том, что пока не удастся найти или сконструировать фермент, который сочетал бы в себе все перечисленные особенности лакказ разного происхождения. Например, лакказы бактерий имеют низкий редокс-потенциал ( $E^0 = 300 - 400$  мВ), лакказы базидиомицетов редко бывают термостабильными, еще реже – активными при нейтральных и щелочных значениях pH.

Поэтому поиск новых ферментов по-прежнему актуален, причем особенно востребованы ферменты с высоким редокс-потенциалом, термостабильные и активные в области pH, близкой к нейтральной. При этом, как правило, исследователи ориентированы на доминирующие формы в семействах множественных изоформ лакказ, так что минорные формы или трудноразделяемые формы лакказ остаются неизученными.

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение двух изоформ лакказы базидиомицета *Cerrena unicolor* ВКМ F-3196.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- 1) Провести скрининг продуцентов лакказы среди грибов-базидиомицетов для отбора наиболее эффективного продуцента.
- 2) Изучить условия продуцирования лакказы отобранным штаммом гриба *C. unicolor* ВКМ F-3196 и определить оптимальный индуктор.
- 3) Разработать схему очистки двух изоформ лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196 и получить их препараты в электрофоретически гомогенном состоянии.
- 4) Изучить физико-химические и каталитические свойства очищенных ферментов.
- 5) Определить нуклеотидные и аминокислотные последовательности двух изоформ лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196.
- 6) Изучить структурную организацию двух изоформ лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196.
- 7) Оценить возможность применения лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196 в биотехнологии.

### **Научная новизна**

Впервые выделены и охарактеризованы две изоформы гриба базидиомицета *C. unicolor* ВКМ F-3196. Разработана схема очистки, позволяющая надежно разделять и получать с большим выходом две изоформы лакказы. Детально изучены их физико-химические и каталитические свойства. Определены неполные нуклеотидные и аминокислотные последовательности. Доказано, что изоферментный состав лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196 связан с наличием разных генов в геноме базидиомицета. Впервые определена экзон-интронная структура фрагментов гена лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196. Смоделирована и охарактеризована трехмерная структура двух изоформ лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196.

### **Практическая значимость**

Показано, что одна из изоформ лакказы (LacC1) имеет высокую термостабильность, сохраняет активность при нейтральных значениях pH, обладает высокой каталитической активностью в отношении фенольных соединений, что определяет широкие возможности применения данного фермента в биотехнологических целях. На примере реакции фермента с высокотоксичным ксенобиотиком – пентахлорфенолом, показана возможность использования системы LacC1/1-гидроксibenзотриазол в качестве агентов первичной атаки при разработке технологических приемов очистки природных сред, загрязненных хлорфенолами. Показана возможность применения лакказы в синтезе лигниноподобных водорастворимых полимеров, обладающих противовирусной активностью. Впервые показана антивирусная активность препаратов, полученных в реакциях сополимеризации с участием лакказы.

### **Апробация работы и публикации**

Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: «Современная биотехнология – защите окружающей среды»

(Пушино, 2006), «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты» (Пушино, 2007); 12-й и 13-й Международных Пушинских школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука 21 века» (Пушино, 2008, 2009), 16-й международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2009), а также на ежегодных отчетных конференциях ИБФМ РАН (2006, 2010). По материалам диссертации опубликованы 3 статьи из списка, рекомендованного ВАК, патент RU № 2394912 С2 (17.06.2008.) и 4 тезиса.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, список литературы и приложение. Работа изложена на 193 страницах, содержит 47 рисунков, 13 таблиц. Библиографический указатель содержит 440 источников литературы.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объект исследования и условия культивирования.** В работе были использованы 23 штамма базидиомицетов из коллекции лаборатории микробной энзимологии ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН. Основным объектом являлся базидиомицет *Cerrena unicolor* ВКМ F-3196.

В работе были использованы следующие среды: среда для скрининга грибов на продукцию лакказы (среда А), в состав которой входили (г/л):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  - 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,2;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  - 0,02;  $\text{MgSO}_4$  - 0,12; мальт-экстракт - 20; агар - агар – 19; соево-глицериновая среда; пептон-глюкозная среда; среда Кирка («Basal-II medium» (Kirk et al., 1978; Fenn and Kirk, 1981)) с высокой концентрацией азота; среда Лурия-Бертани (LB); среда SOC.

**Скрининг грибов-продуцентов лакказы** проводили в два этапа. На первом этапе культивирование проводили на агаризованной среде А с одним из индукторов (гваякол, вератровый спирт,  $\text{CuSO}_4$  в концентрации 1 мМ). На девятые сутки роста с каждой чашки были вырезаны кусочки мицелия диаметром 6,85 мм и помещены на чашки с агаризованной средой А, содержащей 0,5 мМ АБТС (индикатор лакказной активности). Чашки с кусочками мицелия инкубировали в течение 22 ч при 29°C. Оценка лакказной активности проводилась по величине характерной темно-зеленой зоны, образовавшейся в результате катализируемого лакказой окисления АБТС. Количественно активность лакказы выражали с помощью коэффициента  $K_L$ , который равен отношению диаметра окрашенной зоны ( $D_{CZ}$ , мм) к диаметру колонии (кусочка мицелия) ( $D_C$ , мм) (Gochev and Krastanov, 2007).

На втором этапе скрининга отобранные в ходе первого этапа штаммы культивировали на минеральной среде Кирка с индуктором ( $\text{CuSO}_4$ , гваякол или вератровый спирт в концентрации 1 мМ).

**Очистка фермента.** Культуральную жидкость (КЖ) отделяли от мицелия фильтрацией, концентрировали ультрафильтрацией на полых волокнах (аппарат разделительный AP-0,2-15ПА) с последующим высаливанием до 90 % от насыщения  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Препараты лакказ получали в 5 стадий, включавших ионообменную

хроматографию на ДЭАЭ -Sephарose CL с линейным градиентом 0 - 1 М NaCl в 20 мМ Na - ацетатном буфере, рН 5,0 (буфер А), гидрофобную хроматографию на Phenyl-Sephарose с линейным градиентом 1 - 0 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в буфере А, анионообменную хроматографию на MonoQ5/50 GL с линейным градиентом 0 - 0,5 М NaCl в 5 мМ Na - ацетатном буфере, рН 5,0 (буфер В), препаративную изоэлектрофокусировку (ИЭФ) в слое гранулированного геля Sephadex IEF, гельфильтрацию на Superdex 200. Активные фракции объединяли, концентрировали с помощью микроконцентраторов Vivaspin 2 (Sartorius group, США). Ионообменную хроматографию на колонке MonoQ5/50 GL, гидрофобную хроматографию и гельфильтрацию проводили с помощью системы АСТА FPLC (General electric, США).

**Активность лакказы** определяли по скорости окисления АБТС со спектрофотометрической фиксацией окисленного продукта при 420 нм,  $\epsilon_{420}=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Heinfling et al., 1998). За единицу активности принимали количество фермента, образующего 1 мкмоль продукта за 1 мин.

**Концентрацию белка** определяли методом Бредфорд (Bradford, 1976).

**Денатурирующий электрофорез** очищенных ферментов проводили по методу Леммли (Laemmli, 1970) с 0,1% додецилсульфатом Na (SDS) в 12% полиакриламидном геле (ПААГ). Белки в гелях окрашивали Coomassie Brilliant Blue R-250 по Fairbanks et al. (1971). Молекулярная масса денатурированного белка определялась с помощью маркеров (General Electric, США).

**Нативный электрофорез** фермента проводили в системе для кислых белков. Специфическое окрашивание лакказы в геле проводили 1 мМ гваяколом.

**Аналитическую ИЭФ** проводили в 5% ПААГ в градиенте рН 3,0 - 10,0 (Pharmalytes, Sigma). Изоэлектрические точки определяли с помощью набора маркеров Amersham Calibration Kits for pI Determinations using Isoelectric Focusing Broad range pI (рН 3 - 10) (GE Healthcare, США).

**Спектры поглощения лакказ** в УФ/видимой области регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV - 1650 РС в буфере А при комнатной температуре.

**Спектры кругового дихроизма (КД)** получали на спектрополяриметре JASCO - 600 (Япония) в диапазонах длин волн от 200 нм до 250 нм. Измерения проводились в 0,1 мм кювете при концентрации белков 1 мг/мл.

**Углеводный состав** лакказы определяли с помощью Carbohydrate Analyzer LC2000 BIOTRONIC (German). Препараты фермента гидролизовали в присутствии трифторуксусной кислоты в течение 4 ч при 100°C.

**Дегликозилирование лакказы** проводили с помощью трифторметансульфонової кислоты (ТФМС) (Edge A. et al., 1981), а также с использованием Enzymatic Protein Deglycosylation Kit и Native Protein Deglycosylation Kit (Sigma-Aldrich, США) согласно инструкции производителя.

**Определение рН оптимумов** окисления субстратов проводили в 0,1 М буфере Britton and Robinson в интервале рН 2,7 - 7,2.

**Температурный оптимум** определяли в диапазоне температур 25°C - 82°C для изоформы LacC1 и 25°C - 76°C для изоформы LacC2 по скорости окисления АБТС в буфере А.

**Термостабильность** лакказ определяли в буфере А. Для оценки стабильности лакказ фермент инкубировали при температуре 50°C, 60°C или 70°C в течение часа, измеряя остаточную активность через каждые 5 мин.

**Плавление белков** проводили, измеряя зависимость эллиптичности на длине волны 215 нм от температуры. Скорость нагрева составляла 1 °С/мин.

**Определение каталитических констант.** Значения  $K_m$  и  $V_{max}$  определяли с помощью линеаризации уравнения Михаэлиса-Ментен в двойных обратных координатах  $1/V$  и  $1/S$ . Значения  $pK$  ионогенных групп, участвующих в катализе, определяли построением зависимости  $\log V_{max}/K_m$  от величины  $pH$ .

**N-концевые аминокислотные последовательности** определяли с помощью фенилизотионатионатного метода Эдмана на белковом секвенаторе (модель 477A, Applied biosystems, США), оснащённом он-лайн анализатором (модель 120A, Applied biosystems, США) для автоматической идентификации фенилтиогидантионовых производных аминокислот.

**MALDI TOF MS анализ.** Масс-спектры белков были получены на тандемном MALDI-времяпролетно-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащённом УФ лазером (Nd). Масс-спектры получены в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона; точность измеренных моноизотопных масс в рефлекто-модели после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0,007%, точность измеренных масс фрагментов составляла 1 Да.

**Молекулярно-генетические методы.** Препарат общей ДНК получали по методике Aljanabi and Martinez (1997). Для амплификации гена лакказы с геномной ДНК использовали прямой праймер lccC1f (5'-ATCGGGCCTGTCGCTGACAT-3'), который был сконструирован на основании N-концевой аминокислотной последовательности лакказы LacC1, и обратный праймер lccCr (5'-GATGTGGCAGTGGAGGAACCA-3') (сконструирован на основании консервативной для базидиомицетных лакказ гистидинбогатой C-концевой последовательности четвертого медьсвязывающего сайта, расположенного в C-концевой области белка). Продукты ПЦР разделяли с помощью гель-электрофореза в 0,8% агарозном геле в присутствии этидиума бромида (1%) в однократном буфере TAE (50-кратный раствор TAE: 2М Трис-ацетат (pH 7,6), 0,05 М ЭДТА). Выделение и очистку ДНК из агарозного геля проводили с использованием коммерческого набора DNA Extraction (Fermentas, Литва). Очищенный ПЦР фрагмент был клонирован в *Escherichia coli* DH10B (Invitrogen, США) в составе векторной плазмиды pAL-TA (Евроген, Россия). Процедуры клонирования были выполнены в соответствии со стандартными методиками (Sambrook et al., 1989). Идентификация и отбор трансформантов *E.coli* со вставкой осуществлялись на основе «бело-голубой» селекции. Клоны анализировали на наличие вставки необходимого размера с помощью ПЦР с колоний с использованием специфических праймеров, а также с помощью ПЦР с препарата выделенной плазмиды. Плазмидную ДНК выделяли с использованием набора реактивов Plasmid Midiprep Kit (BioRad, США). Секвенирование выполнено на секвенаторе DNA Analysis System CEQ 2000 XL (Beckman Coulter, США) с использованием набора реактивов GenomeLab™ Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing и на секвенаторе Genetic Analyzer 3130XL (Applied Biosystems) с использованием набора реактивов Big dye sequencing kit ver. 3.1 согласно рекомендациям производителя.

Суммарную РНК получали с помощью реагента TRI REAGENT™ (Sigma, США). Для очистки РНК использовали набор RNeasy Mini (Qiagen, США). Качество РНК и ее концентрацию в препарате оценивали электрофоретически. Электрофорез РНК проводили в 1% агарозном геле и буфере того же состава, что и электрофорез

ДНК, но с добавлением формальдегида в качестве ингибитора РНКаз. В ТАЕ буфер и агарозный гель формальдегид добавляли в 50-кратном разведении, в краску для нанесения образцов - в 15-кратном. Препараты РНК хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Обратную транскрипцию проводили с использованием набора реагентов Revert Aid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Литва) (в качестве праймера использовали универсальный праймер Oligo(dT)<sub>18</sub>). Для амплификации гена лакказы с кДНК использовали прямой вырожденный праймер lccCf2 (5'-GCNATHGGYCCNGTNGC-3'), сконструированный на основании N-концевых аминокислотных последовательностей LacC1 и LacC2, и обратный праймер lccCr. ПЦР-амплификацию проводили с использованием набора Encyclo PCR (Евроген, Россия) в градиенте температур  $51^{\circ}\text{C}$  -  $67^{\circ}\text{C}$ . Продукты ПЦР разделяли с помощью гель-электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии этидиума бромиды (1%) в однократном буфере ТАЕ. Для выделения ДНК из агарозного геля использовали набор Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, США). Очищенный продукт использовали как матрицу для секвенирования. Секвенирование выполнено на секвенаторе Genetic Analyzer 3130XL (Applied Biosystems) с использованием набора реактивов Big dye sequencing kit ver.3.1. Анализ полученных последовательностей проводили с помощью программ Chromas и базы данных GenBank. Анализ нуклеотидных последовательностей, их трансляцию в аминокислотные последовательности осуществляли при помощи пакета программ Vector NTI Advance™ v. 10. Сравнительный анализ последовательностей ДНК и белков проводили с помощью программы BLAST (Altschul et al., 1997), доступной с сервера (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), а также с помощью пакета программ Vector NTI Advance™ v. 10, используя последовательности, депонированные в GenBank и Protein Data Bank. Предварительный поиск близких последовательностей проводили с использованием программы BLAST, расчет степени идентичности - с помощью программы Vector NTI Advance™ v. 10, используя гомологичные последовательности, найденные с помощью BLAST.

**Компьютерное моделирование.** Компьютерное моделирование структур лакказ проводили с помощью пакета программ SWISS-MODEL на основе имеющихся в Protein Data Bank рентгеноструктурных данных (<http://swissmodel.expasy.org>) (Arnold et al., 2006; Schwede et al., 2003; Guex and Peitsch, 1997). Модельные структуры лакказ визуализировали с помощью пакета программ «PyMol 0\_99».

**Реакция лакказы с пентахлорфенолом (ПХФ) и идентификация продуктов.** Реакцию проводили при  $30^{\circ}\text{C}$  в 20 мМ Na-тарtratном буфере, pH 5,0, содержащем 40% этанола и 2 мМ ПХФ. Объём реакционной смеси - 1 мл, количество фермента - 25 Ед. Концентрация медиатора - 1-гидроксибензотриазола, составляла 1 мМ. ПХФ и продукты его реакции с лакказой разделяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (хроматограф «LKB», Швеция), на колонке Nova-Пак C18 (3,9 x 150 мм, «Waters», США) в линейном градиенте: 1%-ная уксусная кислота - метанол, 0 - 60% метанола за 6 мин при скорости потока 1 мл/мин. Продукты трансформации ПХФ определяли по времени удерживания. Для идентификации разделяемых соединений, элюаты ВЭЖХ собирали и определяли методом масс-спектрометрии на приборе Finnigan Mat 8430 (Германия).



**Синтез лигниноподобных водорастворимых полимеров (ЛВП).** Сополимеризацию фенольных соединений с АБТС проводили в буфере А при 30°C. Реакцию начинали внесением лакказы в количестве 0,01 Ед/мл и проводили в течение суток. Затем реакционную смесь диализовали против дистиллированной воды в мешках для диализа с размером пор 10 кДа. Диализованный препарат концентрировали с помощью роторного вакуумного испарителя и высушивали в вакуум-эсикаторе. Сополимеризацию фенольных соединений с акриламидом проводили в аналогичных условиях, за исключением состава реакционной среды, которая включала акриламид, фенольное соединение и персульфат аммония. Реакцию также начинали внесением лакказы в количестве 0,01 Ед/мл. Выход определяли как выраженное в процентах отношение массы полученного препарата к массе исходных мономеров.

**Определение токсичности ЛВП в отношении клеток.** Клетки почки хомяка линии ВНК-21 выращивали в 96-ти луночном планшете в среде DMEM. В каждую лунку засеивали 15 тыс. клеток. Культивировали в течение 24 ч при +37°C в инкубаторе с 10% концентрацией CO<sub>2</sub>. Клетки выращивали до полного монослоя. Препараты ЛВП разводили в ростовой среде DMEM. В лунки, содержащие клетки, вносили по 100 мкл препарата ЛВП, инкубировали 72 ч в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Анализировали визуально в течение четырех дней.

**Исследование антивирусной активности ЛВП.** Антивирусную активность ЛВП определяли в отношении альфагерпесвируса – вируса болезни Ауески PRV (Suid herpesvirus 1), штамм К. Вирус разводили до концентрации 1:100 в среде DMEM, содержащей препараты ЛВП с концентрациями 0,5 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,005 мг/мл. В качестве контроля использовали препарат вируса, приготовленный на ростовой среде DMEM, не содержащей ЛВП. Разведенными препаратами вирусов заражали клетки и культивировали их в течение 48 ч при +37°C в инкубаторе с 10% концентрацией CO<sub>2</sub>. Противовирусную активность определяли визуально по образованию вирусных бляшек через 48 ч культивирования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Скрининг грибов-продуцентов лакказы и отбор наиболее эффективного продуцента лакказы

Для отбора наиболее эффективного продуцента лакказы были исследованы 23 штамма базидиомицетов из коллекции лаборатории микробной энзимологии ИБФМ им. Г.К. Скрябина РАН. На первом этапе скрининга штаммы тестировали на чашках Петри со средой А, как индикатор лакказной активности использовали АБТС. Использование среды А обусловлено её универсальностью, среда содержит все необходимые элементы питания и подходит для роста большинства базидиальных грибов. В качестве индукторов лакказы в среду А вносили вещества, являющиеся обычными индукторами лакказы у грибов - базидиомицетов: вератровый спирт, гваякол, ионы Cu<sup>2+</sup>. Активность лакказы была обнаружена у 14 штаммов. Для второго этапа скрининга были отобраны штаммы, значение K<sub>L</sub> которых превышало 1,5 Ед (*Pleurotus cornucopiae* ВКМ F-1979, *Pl. eryngii* ВКМ F-2402, *Pl. ostreatus* ВКМ F-3468, *Fomes fomentarius* ВКМ F-3203, *Ganoderma applanatum* ВКМ F-3208,

*Trametes sp.*, *Lentinula edodes* ВКМ F-2001, *G. lucidum* FW-1125, *Agaricus bisporus* ВКМ F-1998, *Ag. bisporus* ВКМ F-1589, *Armillaria mellea* ВКМ F-1163, *G. applanatum* ВКМ F-717, *Cerrena unicolor* ВКМ F-3196). Субстраты сложного состава (мальт-экстракт, пептон) содержат ароматические соединения, которые могут быть индукторами лакказы. Поэтому для второго этапа скрининга грибы выращивали на синтетической среде Кирка. Инокулят для засева грибов на среду Кирка выращивали на соево-глицериновой среде в течение 5 суток. Пять штаммов (*A. mellea* ВКМ F-1163, *Ag. bisporus* ВКМ F-1998, *Ag. bisporus* ВКМ F-1589, *L. edodes* ВКМ F-2001, *G. lucidum* FW-1125) не росли на соево-глицериновой среде, поэтому для получения инокулята данные грибы выращивали на пептон-глюкозной среде в течение 8 суток. На втором этапе скрининга для каждого штамма использовали тот индуктор, который оказался более эффективным на первом этапе скрининга при выращивании на агаризованной среде. У пяти штаммов (*Ag. bisporus* ВКМ F-1589, *A. mellea* ВКМ F-1163, *G. applanatum* ВКМ F-717, *L. edodes* ВКМ F-2001, *G. lucidum* FW-1125) при росте на среде Кирка активности лакказы обнаружено не было. У шести штаммов (*Pl. cornucopiae* ВКМ F-1979, *Pl. eryngii* ВКМ F-2402, *Pl. ostreatus* ВКМ F-3468, *F. fomentarius* ВКМ F-3203, *G. applanatum* ВКМ F-3208, *Ag. bisporus* ВКМ F-1998) была обнаружена следовая активность лакказы (менее 0,02 Ед/мл). Только два штамма (*C. unicolor* ВКМ F-3196 и *Trametes sp.*) синтезировали лакказу в значительных количествах, при этом максимальная активность лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196 превышала таковую *Trametes sp.* почти в 2 раза и составляла 7,3 Ед/мл.

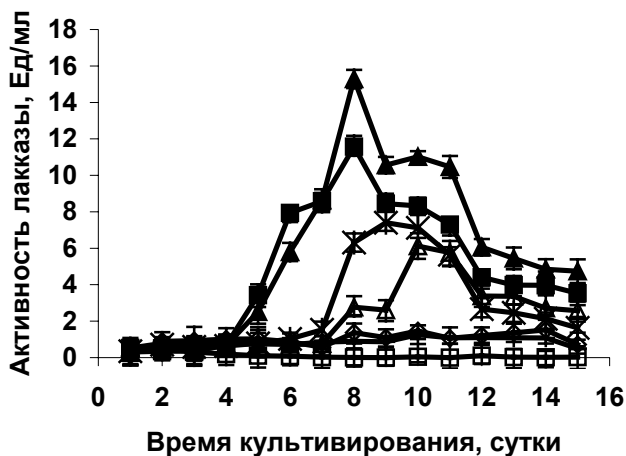
В результате проведенного скрининга в качестве объекта исследования был выбран штамм *C. unicolor* ВКМ F-3196.

## 2. Изучение индукции лакказы гриба *C. unicolor*

Лакказа гриба *C. unicolor* ВКМ F-3196 была индуцибельным ферментом, в отсутствие индуктора наблюдалась только следовая активность. Обычными индукторами лакказы являются ароматические соединения и неорганические ионы. Поэтому в качестве индукторов в первую очередь использовали ароматические соединения, которые разделили на две группы. Фенольные соединения - субстраты лакказы: 2,6-диметоксифенол (2,6-ДМФ), 2,6-диметилфенол, 3,4,5-тригидроксибензойная кислота (галловая кислота), 2-метоксифенол (гваякол), таниновая кислота. Нефенольные соединения: 2-метоксибензальдегид, 3-метоксибензальдегид, 4-метоксибензальдегид, бензиловый спирт, 2-метилбензиловый спирт, 3-метилбензиловый спирт, 4-метилбензиловый спирт, 4-метоксибензиловый спирт, 3,4-диметоксибензиловый спирт. Также в качестве индукторов использовали неорганические ионы:  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . Концентрация всех индукторов была 1 мМ, кроме таниновой кислоты, концентрация которой составляла 0,002%, поскольку это соединение не имеет определенной химической формулы. Все ароматические соединения были неэффективны в качестве индукторов. Незначительная активность лакказы наблюдалась только в присутствии 2-метоксифенола (0,18 Ед/мл) и 3,4-диметоксибензилового спирта (0,14 Ед/мл). Лучшим индуктором являлись ионы  $\text{Cu}^{2+}$ , в присутствии которых активность лакказы увеличивалась более чем в 2000 раз по сравнению с контролем и достигала 7,2 Ед/мл на восьмые сутки культивирования. Известно, что ионы  $\text{Cu}^{2+}$  регулируют транскрипцию генов лакказы (Collins and Dobson, 1997; Galhaup et al., 2002). О стимулирующем влиянии ионов меди на продукцию лакказы *C. unicolor* уже

сообщалось, однако эффективные концентрации ионов меди заметно варьировали, как для *C. unicolor*, так и в случае других грибов (Michniewicz et al., 2006; Степанова с сотр., 2003; Palmieri et al., 2000; Galhaup and Haltrich, 2001). В нашем случае при увеличении концентрации ионов меди выше 0,1 мМ активность лакказы падала, что может объясняться токсичным эффектом высоких концентраций ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . Известно, что совместное использование индукторов различной химической природы может приводить к увеличению продукции лакказы по сравнению с использованием каждого индуктора в отдельности (Collins and Dobson, 1997; De Souza et al., 2004). Было изучено два варианта совместного внесения различных индукторов в питательную среду ( $\text{Cu}^{2+}$  с 2-метоксифенолом и  $\text{Cu}^{2+}$  с 3,4-диметоксибензиловым спиртом). 2-Метоксифенол и 3,4-диметоксибензиловый спирт были выбраны на том основании, что из протестированных в качестве индукторов ароматических соединений незначительное повышение продукции лакказы отмечалось только в присутствии данных соединений. В обоих вариантах совместного внесения ионов меди и ароматического соединения кумулятивного эффекта на продукцию фермента не было обнаружено. Продукция лакказы в присутствии только  $\text{Cu}^{2+}$  была выше, чем при совместном использовании индукторов.

Для оптимизации условий получения лакказы было изучено влияние на продукцию фермента различных концентраций  $\text{Cu}^{2+}$ : 0,05 мМ; 0,1 мМ; 0,5 мМ; 1 мМ; 1,5 мМ, 2 мМ. Оптимальная концентрация  $\text{Cu}^{2+}$  составляла 0,1 мМ. Активность лакказы в присутствии такой концентрации меди составляла 15 Ед/мл на восьмые сутки культивирования (рис. 1).



**Рисунок 1.** Активность лакказы гриба *C. unicolor* ВКМ F-3196 в зависимости от различных концентраций ионов  $\text{Cu}^{2+}$ . (□ - 0 мМ; ■ - 0,05 мМ; ▲ - 0,1 мМ; Δ - 0,5 мМ; \* - 1,0 мМ; ◇ - 1,5 мМ; | - 2,0 мМ).

Увеличение продукции лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196 при культивировании на минеральной среде Кирка с 1 мМ  $\text{Cu}^{2+}$  более чем в 2000 раз (соответственно, при оптимальной концентрации  $\text{Cu}^{2+}$  0,1 мМ - почти в 5000 раз) по сравнению с контролем представляет показательный пример индукции и соответствует лучшим мировым результатам.

### 3. Очистка изоформ лакказы

В ходе культивирования на среде Кирка с ионами  $\text{Cu}^{2+}$  в качестве индуктора базидиомицет *C. unicolor* ВКМ F-3196 продуцировал лакказу в виде двух изоформ, LacC1 и LacC2. У базидиальных грибов часто наблюдается наличие множественных изоформ лакказы. Изоферментный состав лакказы базидиомицета *C. unicolor* варьирует от штамма к штамму. Единственная изоформа лакказы *C. unicolor* была

обнаружена в культурах штаммов CFC- 120, T143, IBV 62, 0784 (Kim et al., 2002; Gianfreda et al., 1998; Беккер с сотр., 1990; Степанова с сотр., 2003). Из культуры *S. unicolor* 137 были выделены и очищены две изоформы лакказы (Michniewicz et al., 2006), у *S. unicolor* 059 обнаружили две доминирующие и одну минорную формы лакказы (Степанова с сотр., 2003).

Внеклеточная лакказа была выделена и очищена из культуральной жидкости (КЖ) *S. unicolor* ВКМ F-3196 в период максимальной активности, который наступал на восьмые сутки культивирования на модифицированной среде Кирка с 0,1 мМ  $\text{CuSO}_4$ .

Наибольшую сложность при очистке фермента представляло разделение двух изоформ, близких по молекулярной массе и заряду. В ходе исследования была разработана схема очистки, обеспечивающая надежное разделение двух изоформ с высоким выходом (33,5% для LacC1 и 31% для LacC2). Оптимизированная схема очистки включала следующие стадии.

Стадия 1. Получение исходного ферментного препарата. КЖ отделяли от мицелия фильтрованием, затем концентрировали ультрафильтрацией на полых волокнах с помощью аппарата разделительного AP-0,2-15ПА.

Стадия 2. Белки КЖ осаждали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  при 90% от насыщения. Осадок растворяли в буфере А, диализовали против буфера А.

Стадия 3. Анионообменная хроматография на ДЭАЭ-Sephарозе CL. Препарат наносили на колонку с ДЭАЭ-Sephарозе CL, уравновешенную буфером А. Элюировали белок градиентом 0 - 1М NaCl в буфере А, скорость элюции 1 мл/мин, фракции по 5 мл. Фракции с активностью лакказы объединяли, диализовали против 1 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в буфере А. Применение ДЭАЭ-Sephарозе CL позволило отделить фермент от пигмента, присутствие которого было нежелательно из-за его необратимой адсорбции на носителях при последующих стадиях хроматографии.

Стадия 4. Гидрофобная хроматография на Phenyl-Sephарозе. Диализованный препарат наносили на колонку с Phenyl-Sephарозе, уравновешенную 1 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в буфере А. Белки элюировали градиентом 1 - 0 М  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  в буфере А со скоростью 1 мл/мин, объем фракций 5 мл. Активные фракции объединяли, диализовали против буфера В.

Стадия 5. Анионообменная хроматография на MonoQ5/50 GL. Препарат наносили на колонку, предварительно уравновешенную буфером В. Скорость нанесения 0,5 мл/мин. Связавшиеся белки элюировали линейным градиентом 0 - 0,5 М NaCl в буфере В. Скорость элюции 0,5 мл/мин, объем фракций 1 мл.

Стадия 6. Разделение двух изоформ достигалось в ходе проведения препаративной ИЭФ в слое гранулированного геля Sephadex IEF. Две четкие зоны геля Sephadex, содержащие изоформы лакказы, собирали по отдельности. Sephadex из каждой зоны переносили в колонки 130 x 25 мм, суспендировали в буфере В, давали осесть гелю, а затем элюировали лакказу примерно четверть - пятью объемами буфера В по отношению к объему исходного геля Sephadex. Гомогенность каждого препарата проверяли с помощью нативного и SDS-электрофореза. Полученные препараты двух изоформ лакказы концентрировали по отдельности с помощью микроконцентраторов Vivaspin 2.

Стадия 7. Удаление амфолинов из препаратов фермента проводили в ходе гельфильтрации на Superdex 200, уравновешенной буфером В. Элюировали лакказу тем же буфером, скорость элюции 0,8 мл/мин, объем фракций 1 мл. Полученные

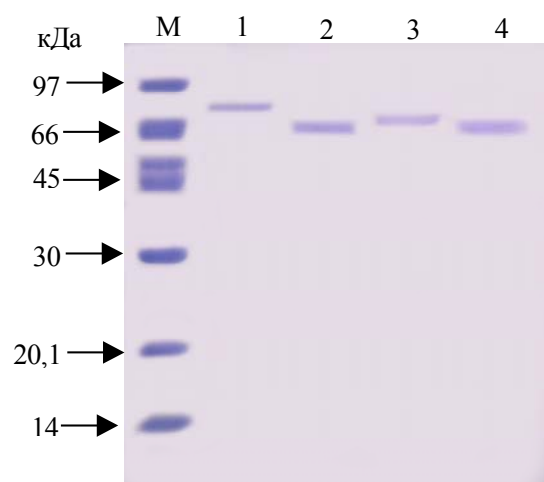
активные фракции объединяли, концентрировали с помощью микроконцентраторов Vivaspin 2. Гомогенность полученных препаратов была подтверждена электрофоретически, а также идентичностью N-концевых аминокислотных последовательностей очищенных белков.

#### 4. Характеристика лакказ

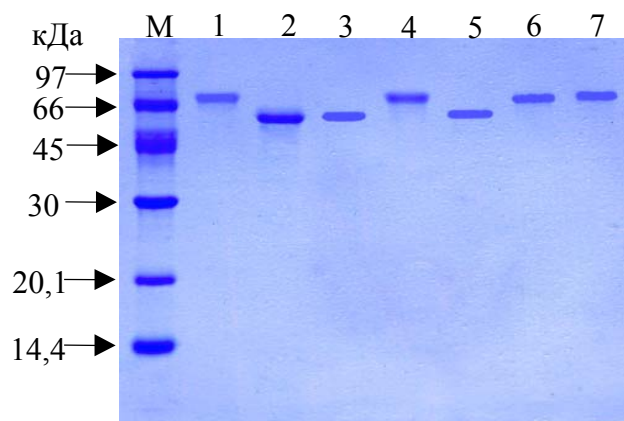
##### 4.1. Молекулярные свойства LacC1 и LacC2

Лакказа - гликопротеин. По данным SDS-ПААГ электрофореза молекулярные массы LacC1 и LacC2 составляли 75 кДа и 67 кДа, соответственно (рис. 2). Кажущиеся молекулярные массы лакказ, определенные методом гельфильтрации, были равны 75 кДа для LacC1 и 57 кДа для LacC2. Следовательно, исследованные лакказы имели односубъединичную структуру белковой части молекулы.

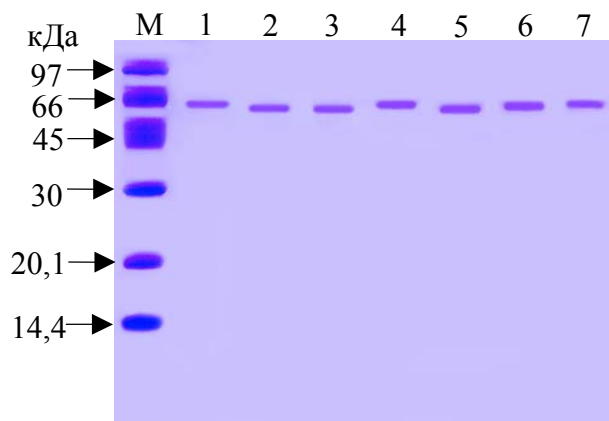
Дегликозилирование с помощью ТФМС, а также с использованием ферментов N-гликозидазы F и эндогликозидазы F1 позволило достоверно определить степень гликозилирования белков: 16% и 6% для LacC1 и LacC2, соответственно (молекулярная масса LacC1 снижалась с 75 до 63 кДа, LacC2 - с 67 до 63 кДа) (рис. 2, 3).



**Рисунок 2.** SDS-ПААГ электрофорез лакказ LacC1 и LacC2 после дегликозилирования ТФМС: М – белки-маркеры, 1 – LacC1, 2 – LacC1 после дегликозилирования, 3 – LacC2, 4 – LacC2 после дегликозилирования.



А

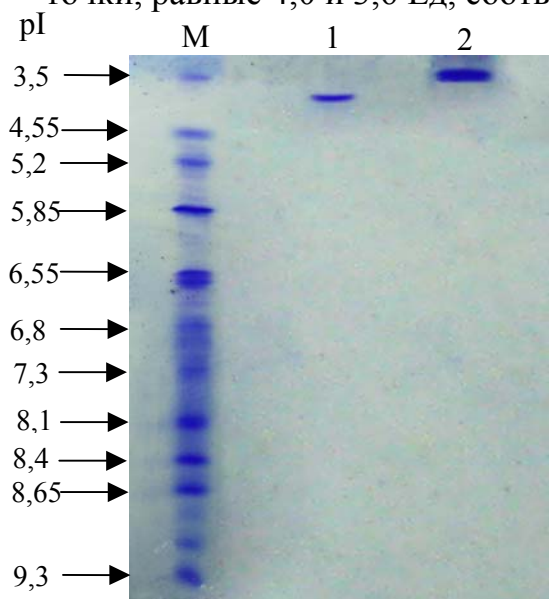


Б

**Рисунок 3.** SDS-ПААГ электрофорез лакказ LacC1 (А) и LacC2 (Б) после энзиматического дегликозилирования: М - белки-маркеры, 1 - лакказа, обработанная О - гликозидазой; 2 - лакказа, обработанная N-гликозидазой F; 3 - лакказа, обработанная О - гликозидазой + N-гликозидазой F; 4 - недегликозилированная лакказа; 5 - лакказа, обработанная эндогликозидазой F1; 6 - лакказа, обработанная эндогликозидазой F2; 7 - лакказа, обработанная эндогликозидазой F3.

Отсутствие эффекта при обработке LacC1 и LacC2 O-гликозидазой указывает на отсутствие углеводных цепей, связанных с белковой молекулой через остатки серина или треонина, т.е. O-тип гликозилирования не характерен для исследованных лакказ. В то же время, дегликозилирование лакказ N-гликозидазой F и эндогликозидазой F1 указывает на связь углеводных цепей через остатки аспарагина белковой цепи в сайтах Asn - X - Ser/Thr (N - X - S/T). Следовательно, для LacC1 и LacC2 характерен только N-тип гликозилирования (рис. 3). Отсутствие влияния эндогликозидаз F2 и F3 на молекулярные массы лакказ и положительное действие эндогликозидазы F1 позволило заключить, что в молекулах ферментов углеводная часть представлена олигоманнозными неразветвленными структурами. Последующий анализ углеводной части белков подтвердил правильность такого заключения.

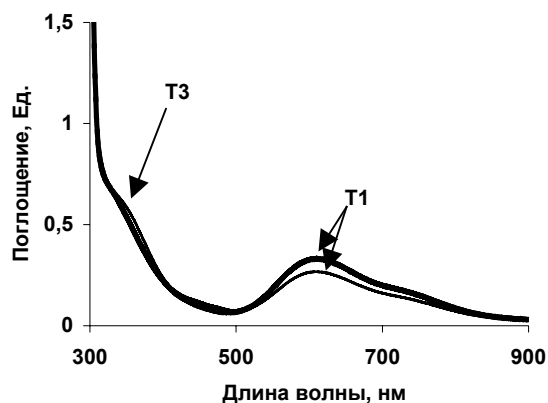
Аналитическая ИЭФ показала, что LacC1 и LacC2 имели изоэлектрические точки, равные 4,0 и 3,6 Ед, соответственно (рис. 4).



**Рисунок 4.** ИЭФ LacC1 (1) и LacC2 (2), М - белковые маркеры.

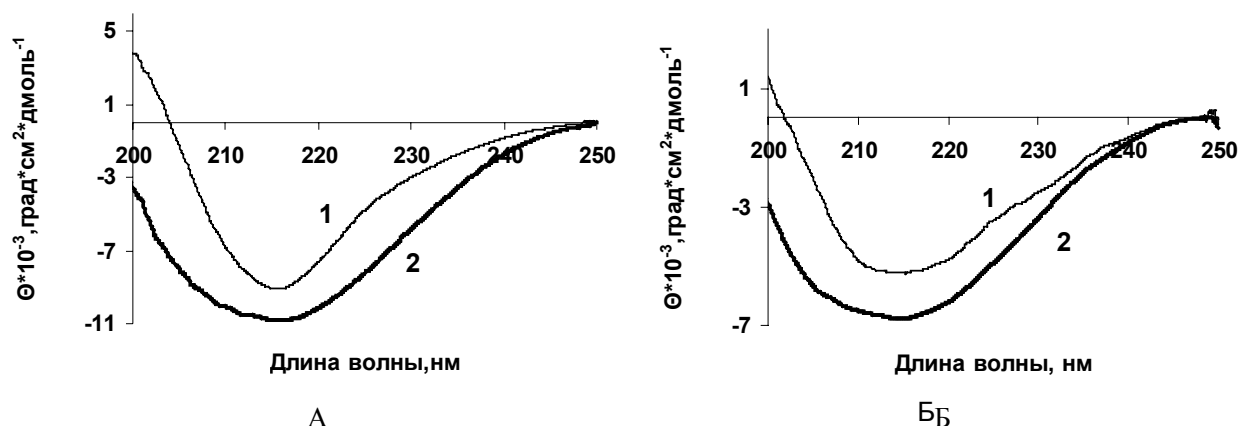
#### 4.2. Спектральные свойства LacC1 и LacC2

Концентрированные препараты LacC1 и LacC2 были интенсивного синего цвета. Спектры поглощения лакказ являлись типичными спектрами «голубых» медьсодержащих оксидаз (рис. 5) с характерным максимумом поглощения при 610 нм, что указывает на наличие в молекуле фермента атома меди первого типа. Плечо при 330 нм, характеризующее наличие медьсвязывающего центра Т3, определялось в спектрах обеих лакказ.



**Рисунок 5.** Спектр поглощения LacC1 (жирная линия) и LacC2 (тонкая линия) в УФ/видимом спектре.

Исследование фермента с помощью спектроскопии КД выявило преобладание  $\beta$ -структур в молекулах обеих изоформ (рис. 6А, Б). Плавление LacC1 и LacC2 в диапазоне температур 20 - 97°C обнаружило, что полного разрушения  $\beta$ -слоев не происходило.



**Рисунок 6.** КД спектр лакказ *C. unicolor* ВКМ F-3196 до (1) и после (2) плавления (А - LacC1, Б - LacC2).

### 4.3. Каталитические свойства LacC1 и LacC2

Температурный оптимум составлял 50°C для LacC2 и 55°C для LacC1. Обе изоформы характеризуются широкими температурными оптимумами, сохраняя более 60% активности в диапазоне температур 25 - 80°C.

LacC1 и LacC2 обладали различной термостабильностью. При 70°C время полуинактивации LacC1 составляло 30 мин. Время полуинактивации LacC2 при такой же температуре составляло 3 мин. Более высокая термостабильность LacC1 была подтверждена плавлением белков с фиксацией конформационного состояния молекулы с помощью КД спектроскопии. Денатурация LacC1 происходила при более высокой температуре. Температура полуплавления LacC1 составляла 77°C, в то время как у LacC2 она равнялась 69°C. Одним из факторов, определяющих стабильность лакказы, является гликозилирование белковой молекулы (Ko et al, 2001; Yoshitake et al., 1993; Slomczynski et al, 1995;). Поэтому можно полагать, что более высокое содержание углеводов в молекуле LacC1 и объясняет большую термостабильность данной изоформы.

После обработки эндогликозидазой F термостабильность обеих изоформ снизилась: при 70°C активность LacC1 через 30 мин снижалась до 16% от исходной величины, в то время как активность негликозилированного фермента при 70°C через 30 мин снижалась до 50%; активность LacC2 при этой же температуре через 5 мин снижалась до 6%, в то время как активность негликозилированной формы LacC2 через 5 мин снижалась до 22%.

Полученные данные позволили заключить, что гликозилирование не является единственным фактором, определяющим термостабильность белка. По-видимому, существуют и другие факторы, определяющие термостабильность молекулы фермента. Среди таких факторов отмечали повышенное содержание дисульфидных связей в молекуле белка, а также повышенное число гидрофобных или заряженных остатков в белковой молекуле (Chernykh et al., 2008).

Зависимость скорости окисления АБТС от рН была одинаковой для LacC1 и LacC2. Оптимальное значение рН было ниже 2,7 Ед рН. С увеличением рН скорость реакции уменьшалась. Однако рН оптимум окисления 2,6-ДМФ у LacC1 и LacC2 был разным. Максимальная активность LacC1 была при рН 4,4, а LacC2 - при рН 3,8. При этом пик активности LacC1 был более широкий, чем у LacC2. LacC1 сохраняла более 50% активности в диапазоне рН 3,4 - 6,3, в то время как LacC2 теряла до 50% активности уже при рН 4,9. Сдвиг оптимума рН окисления АБТС в кислую область для обеих изоформ подтверждает общие положения о реакциях, происходящих при окислении субстратов-доноров электрона. Профиль зависимости окисления 2,6-ДМФ от величины рН согласуется с радикальным механизмом реакций окисления фенольных субстратов с участием лакказы (Ху, 1997).

Для выяснения причины различия рН оптимума окисления 2,6-ДМФ у обеих изоформ были определены значения рК ионогенных групп активного центра, задействованных в катализе. Установлено, что за катализ отвечала одна ионогенная группа. Значения рК этой группы для LacC1 составляло 5,5, а для LacC2 - 3,8. Это указывает на участие в катализе одной аминокислоты, способной присоединять протоны. В молекулах разных изоформ лакказы такой аминокислотой могут быть разные аминокислоты. Возможно также, что в обеих изоформах это одна и та же аминокислота, но разное микроокружение в разных белках меняет ее способность присоединять протоны. Из литературных данных известно об участии протонируемых аминокислот в катализе лакказы. Было показано участие протонированной аминокислоты Asp206 в формировании рН оптимума окисления 2,6-ДМФ лакказой *T. versicolor* (Madzak et al., 2006). Выравнивание аминокислотных последовательностей фрагментов лакказ LacC1 и LacC2 с последовательностью лакказы *T. versicolor* показало, что в молекулах обеих исследованных лакказ в положении 206 также находится Asp. Следовательно, можно предположить, что разные значения рК обусловлены различным микроокружением Asp206. По-видимому, более низкое значение рК ионогенной группы в случае LacC2 обуславливает более кислый диапазон оптимума рН для изоформы LacC2.

Были определены кинетические константы для нескольких типичных субстратов лакказ - замещенных фенолов, доноров электронов и протонов, и АБТС, донора только электронов. Сравнение каталитических параметров лакказ LacC1 и LacC2 показало, что константы Михаэлиса для LacC1 превышают таковые для LacC2, что свидетельствует о более низком сродстве LacC1 к типичным субстратам. Однако эффективность катализа (величина  $V_{max}/K_m$ ) окисления фенольных соединений была выше у LacC1. Нефенольный субстрат - АБТС, напротив, более эффективно окислялся в присутствии LacC2 (табл.1).



Таблица 1.

Кинетические параметры изоформ лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196

Субстрат	LacC1			LacC2		
	V <sub>max</sub> , Ед/мг	K <sub>m</sub> , мкМ	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>	V <sub>max</sub> , Ед/мг	K <sub>m</sub> , мкМ	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub>
2-Метоксифенол (Гваякол)	29,15	0,71	41	4,5	0,19	23,5
4-Метоксифенол	17,4	0,76	22,8	7,75	0,7	11,15
2,6-ДМФ	86,2	0,3	291,8	7,98	0,17	46,9
3,4-Диметоксифенол	47,4	0,47	99,5	6,4	0,1	58,7
Гидрохинон	86,9	1,1	80,2	14,8	0,53	27,8
АБТС	138,9	35	4	92,6	10	9,3

### 5. MALDI TOF MS анализ и определение N-концевых аминокислотных последовательностей лакказ LacC1 и LacC2

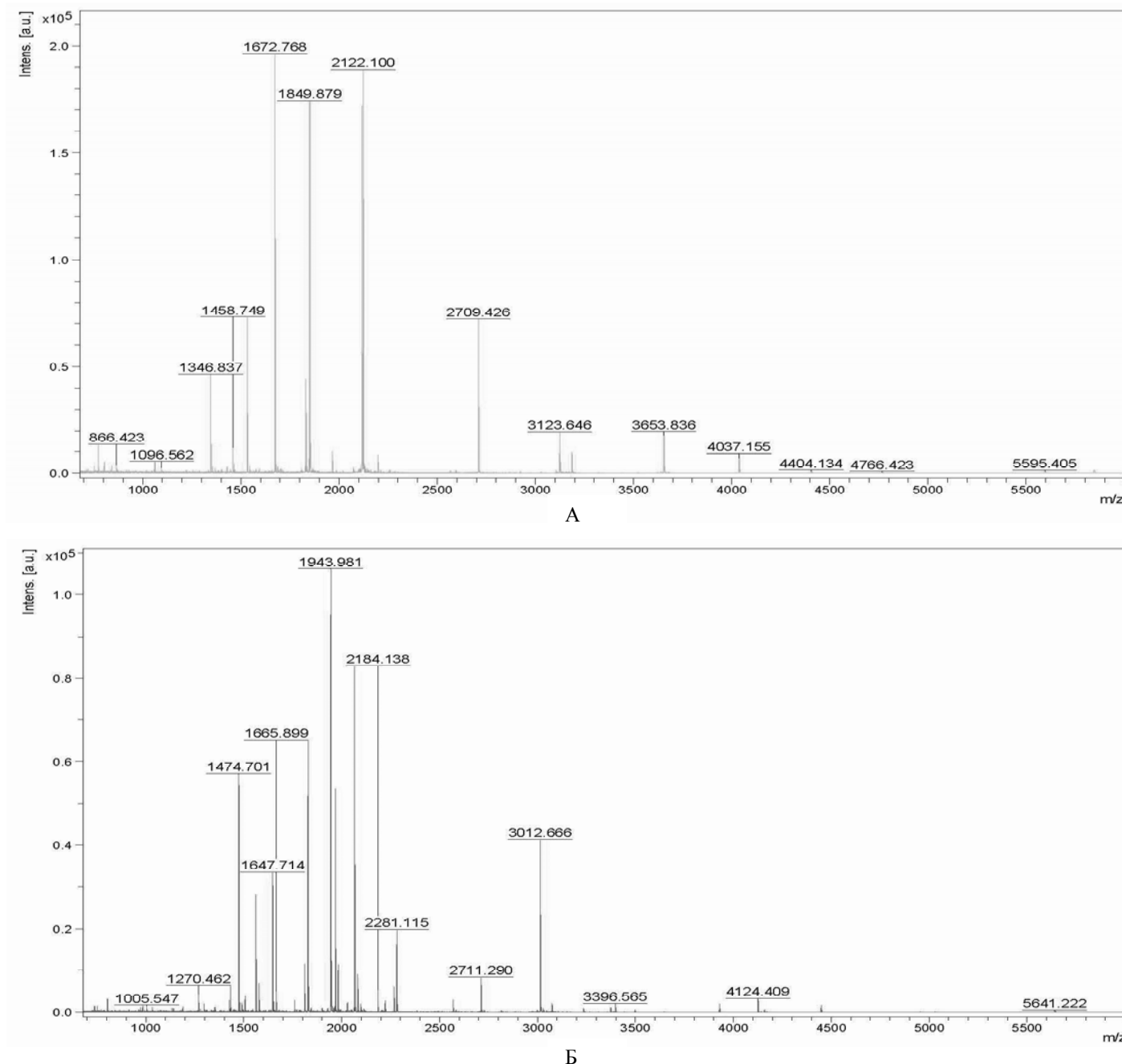
Различия молекулярных и каталитических свойств LacC1 и LacC2 вызывали вопрос о причине этих различий: являются ли LacC1 и LacC2 продуктами разных генов или же различия в свойствах вызваны посттрансляционной модификацией общего предшественника?

Явление множественности изоформ с разными молекулярными и биохимическими характеристиками очень распространено среди продуцентов лакказы (Koroleva et al., 2002; Yaver et al., 1996; Hoegger et al., 2004; Wahleithner et al., 1996; Soden and Dobson, 2001; Palmieri et al., 2003; Larrondo et al., 2003; Kilaru et al., 2006). Среди причин множественности изоформ известны посттрансляционные модификации, например, гликозилирование, продукта одного и того же гена (Larrondo et al., 2003), либо наличие множественных генов лакказы в грибных геномах (Yaver et al., 1996; Hoegger et al., 2004; Wahleithner et al., 1996; Palmieri et al., 2003; Kilaru et al., 2006).

Пептидные карты для LacC1 и LacC2, полученные с помощью MALDI TOF MS анализа продуктов трипсинолиза в геле препаратов обоих белков, были разными (рис. 7). Это позволило предположить, что аминокислотные последовательности LacC1 и LacC2 различаются между собой.

N-концевые аминокислотные последовательности лакказ LacC1 и LacC2 имели высокую гомологию (90%). Для LacC1 была определена аминокислотная последовательность: A I G P V A D I N I, для LacC2 - A I G P V A D L N I (эти последовательности внесены в базу данных UniProt Knowledgebase (UniProtKB) под номерами P86328 и P86327, соответственно). Отличие наблюдалось в позиции восемь, где у LacC1 присутствовал изолейцин, а у LacC2 - лейцин.

Таким образом, на основании результатов MALDI TOF MS анализа и анализа N-концевых аминокислотных последовательностей лакказ LacC1 и LacC2, можно сделать предположение о том, что данные белки являются продуктами разных генов.



**Рисунок 7.** Пептидные карты лакказ LacC1 (А) и LacC2 (Б), полученные с помощью MALDI TOF MS.

### **6. Анализ нуклеотидных последовательностей генов лакказ LacC1 и LacC2 и определение аминокислотных последовательностей лакказ**

Для однозначного ответа на вопрос о причине множественности изоформ лакказы *S.unicolor* ВКМ F-3196 были определены нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные последовательности лакказ.

Последовательность гена лакказы LacC1 была получена с геномной ДНК с использованием прямого праймера lccC1f и обратного праймера lccCr. По результатам секвенирования длина фрагмента гена лакказы LacC1 с некодирующими участками составляла 1930 п.н.

Последовательность части зрелого гена лакказы LacC2 получили с кДНК с использованием прямого вырожденного праймера lccCf2 и обратного праймера

lccSr. Длина фрагмента части зрелого гена лакказы по результатам секвенирования составляла 1308 п.н.

Поскольку обратный праймер был сконструирован на основании внутренней С-концевой аминокислотной последовательности, полученные в результате исследования нуклеотидные последовательности представляют собой не полные гены лакказ, а их фрагменты, составляющие примерно 90% полной последовательности гена. Сравнение последовательности фрагмента гена лакказы LacC1, содержащей некодирующие участки, и последовательности фрагмента зрелого гена лакказы LacC2 выявило наличие во фрагменте гена лакказы LacC1 11 экзонов и 10 интронов. Размер интронов колебался от 51 до 65 п.н. и являлся типичным для большинства грибных геномов (Gurr et al., 1987).

Кодирующие участки нуклеотидных последовательностей фрагментов двух генов лакказ различались по 135 п.н. из 1308 п.н., т. е. на 10,3%. В результате компьютерной трансляции нуклеотидных последовательностей фрагментов генов в программе Vector NTI Advance™ v. 10 были получены аминокислотные последовательности фрагментов лакказ LacC1 и LacC2, содержащие 451 и 436 аминокислотных остатков, соответственно (рис. 8).

Аминокислотные последовательности двух лакказ различались между собой на 13 аминокислотных остатков, что в совокупности с различиями на уровне нуклеотидных последовательностей подтверждает, что LacC1 и LacC2 - продукты двух разных генов.

Аминокислотные последовательности фрагментов обеих лакказ содержат структурные гистидиновые мотивы (HXH) в трех консервативных участках, характерных для всех лакказ:  $^{64}\text{HWN}^{66}$ ;  $^{107}\text{WYNSH}^{111}$ ;  $^{393}\text{HPFHLH}^{398}$ . Четвертый консервативный участок  $^{445}\text{WFLHCH}^{450}$  присутствует только в последовательности LacC1. В последовательности LacC2 данный участок отсутствует (рис. 8).

В обоих фрагментах лакказ были обнаружены потенциальные сайты N-гликозилирования (N-X-T/S). В последовательности LacC2 присутствует один сайт N-гликозилирования ( $\text{Asn}_{432}$ ), который обнаружен и во фрагменте лакказы LacC1. В последовательности LacC1 присутствует еще один сайт N-гликозилирования ( $\text{Asn}_{249}$ ) (рис. 8). Большое число потенциальных сайтов N-гликозилирования у LacC1 может обуславливать более высокую степень гликозилирования данной изоформы в сравнении с LacC2.

Таким образом, данные фрагменты лакказ содержат необходимые для формирования активного центра аминокислотные остатки, и, следовательно, полученные в ходе исследования нуклеотидные последовательности являются фрагментами генов, потенциально кодирующих функционально активные ферменты.

Аминокислотные последовательности фрагментов лакказ LacC1 и LacC2 демонстрировали между собой высокую степень гомологии (степень идентичности 97%).

Сравнение аминокислотных последовательностей фрагментов лакказ LacC1 и LacC2 с соответствующими фрагментами 14 других базидиомицетных лакказ показало высокую степень идентичности (57 - 90%), в то время как с аскомицетной лакказой *M. albomyces* степень идентичности LacC1 и LacC2 была низкой (32% и 31%, соответственно).

LacC1	(1)	AIGPVADLHITDDTIAPDGFSR	A	AVLAGG	T	FPGPLITGN	M	GDAFKLNVID
LacC2	(1)	AIGPVADLHITDDTIAPDGFSR	P	AVLAGG	G	FPGPLITGN	K	GDAFKLNVID
LacC1	(51)	ELTDASMLKSTSIHWH	G	FFQKGTNWADGPAFVNQCPIT	T	GNSFLYDFQVP		
LacC2	(51)	ELTDASMLKSTSIHWH	G	FFQKGTNWADGPAFVNQCPIT	T	GNSFLYDFQVP		
LacC1	(101)	DQAGTYWYHSHLSTQYCDGLRGA	F	VVYDPSDPHKDLYDV	D	DESTVITLAD		
LacC2	(101)	DQAGTYWYHSHLSTQYCDGLRGA	F	VVYDPSDPHKDLYDV	D	DESTVITLAD		
LacC1	(151)	WYHTLARQIVGVAISDTTLINGLGR	N	D	GPADAALAVIN	V	E	AGKRYRFRL
LacC2	(151)	WYHTLARQIVGVAISDTTLINGLGR	N	D	GPADAALAVIN	V	D	AGKRYRFRL
								*
LacC1	(201)	VSISCDPNWVFSIDNHDFTVIEVDG	V	NSQPLNVDSVQIFAGQRYSLV	L	NA		
LacC2	(201)	VSISCDPNWVFSIDNHDFTVIEVDG	V	NSQPLNVDSVQIFAGQRYSLV	L	NA		
LacC1	(251)	SQPVDNYWIRADPNLGTTFAGGINS	A	ILRYKGA	AAVEPTTSQTTSTKPL			
LacC2	(251)	NQPVDNYWIRANPNLGTTFAGGINS	A	ILRYN	GA	AAVEPTTSQTTSTKPL		
LacC1	(301)	LETDLHPLVSTPVPGLPQPGGTDV	V	QNLILGFNAGQFTINGAS	F	VP	T	VP
LacC2	(301)	LETDLHPLVSTPVPGLPQPGGTDV	V	QNLILGFNAGQFTINGAS	F	PP	S	VP
LacC1	(351)	VLLQILSGTTNAQDLLPSGSVFEL	P	L	GKTVELTLAGV	LG	PH	FHLHGH
LacC2	(351)	VLLQILSGTTNAQDLLPSGSVFEL	P	L	GKTVELTLAGV	LG	PH	FHLHGH
								*
LacC1	(401)	NFHVVRSAGQDTPNYDDPIVRD	V	ST	GAS	G	D	NVTIR
LacC2	(401)	NFHVVRSAGQDTPNYDDPIVRD	V	NP	GAT	G	D	NVTIR
								FTTDNPGPWFLHCH
LacC1	(451)	I						
LacC2	(437)	-						

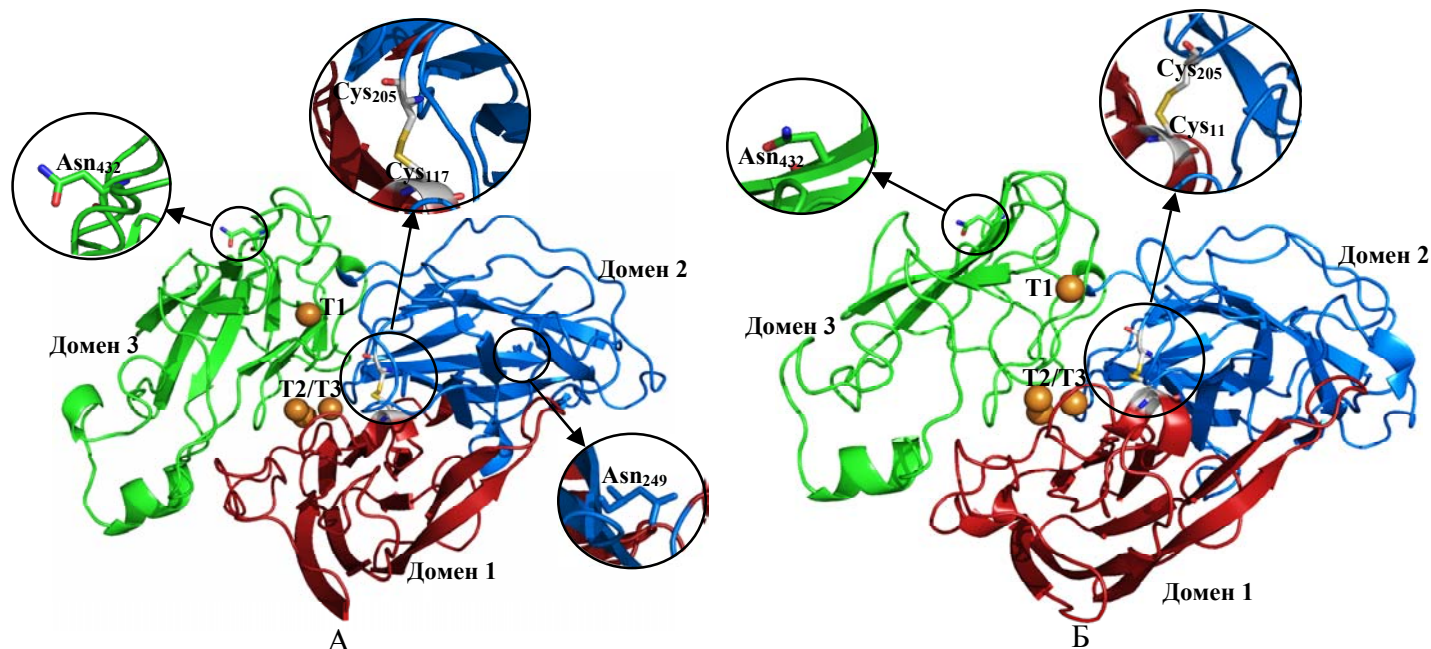
**Рисунок 8.** Сравнение транслированных аминокислотных последовательностей фрагментов лакказ LacC1 и LacC2. Сайты N-гликозилирования подчеркнуты, в сайтах гликозилирования звездочкой отмечены остатки Asn, к которым присоединяется углеводная цепь; рамками выделены четыре консервативных участка с гистиридиновыми мотивами; цифрами 1, 2, 3 обозначены лиганды T1, T2 и T3 медьсвязывающих центров, соответственно. Красным на желтом фоне выделены консенсусные остатки, совпадающие в данной позиции во всех последовательностях; черным на зеленом фоне - консервативные замены; черным на белом фоне - неидентичные остатки.

## 7. Изучение структурной организации лакказ

Моделирование трехмерных структур исследованных лакказ по гомологии со структурой лакказы *T. versicolor*, полученной с разрешением 1,9 Å (Piontek et al., 2002), подтвердило принадлежность LacC1 и LacC2 к типичным трехдоменным лакказам грибов. В структурных моделях LacC1 и LacC2 преобладали β-складчатые структуры, что типично для лакказ и согласуется с КД - спектрами обоих исследованных ферментов (рис. 9).

Структуры обоих ферментов стабилизировались дисульфидным мостиком Cys117- Cys205, связывающим первый и второй домены. Сравнение трехмерных моделей LacC1 и LacC2 с референтной структурой IgсA обнаружило возможность

наличия углеводных остатков в потенциальных сайтах гликозилирования ( $N_{249}$  и  $N_{432}$  у LacC1 и  $N_{432}$  у LacC2) ввиду их расположения на поверхности белковой молекулы. Наличие двух сайтов гликозилирования в молекуле LacC1 возможно объясняет большую степень гликозилирования этой изоформы по сравнению с LacC2 (рис. 9).

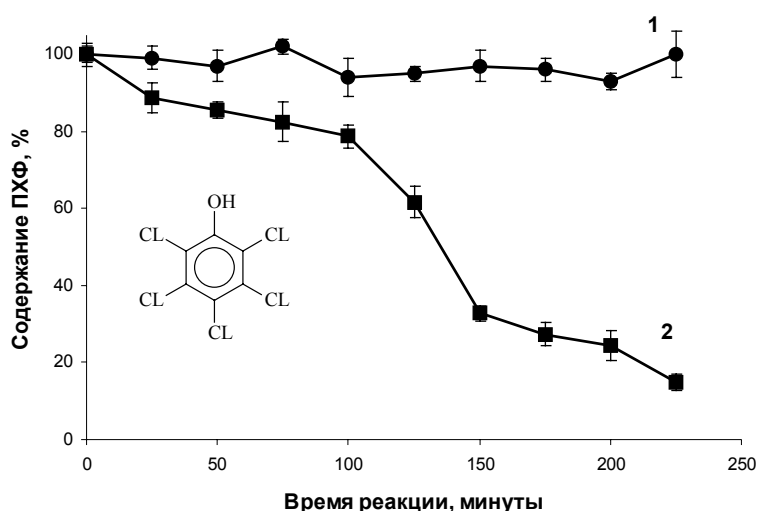


**Рисунок 9.** Третичная структура молекул лакказ LacC1 (А) и LacC2 (Б). Домен 1 изображен красным цветом, домен 2 – синим, домен 3 – зеленым. Структура стабилизируется дисульфидным мостиком Cys<sub>117</sub>-Cys<sub>205</sub> (показан крупным планом), соединяющим первый и второй домены. Крупным планом показаны сайты N-гликозилирования ( $N_{249}$ ,  $N_{432}$  у LacC1,  $N_{432}$  у LacC2).

### 8. Трансформация пентахлорфенола лакказой LacC1

Из двух изученных изоформ лакказы *C. unicolor* LacC1 обладала более высокой термостабильностью, сохраняла активность в более широком диапазоне рН при окислении фенольных субстратов, особенно, в области рН, близкой к нейтральной, и более эффективно окисляла фенольные соединения. Поэтому изучение возможности практического применения проводили на примере этой изоформы. Мы изучили реакции фермента с высокотоксичным ксенобиотиком - пентахлорфенолом (ПХФ). Реакцию проводили в присутствии 1-гидроксибензотриазола (1-ГБТ) как медиатора и без него. При участии медиаторов лакказы приобретают способность окислять субстраты с более высоким редокс-потенциалом. ПХФ не окислялся лакказой LacC1 в течение 3 ч реакции без 1-ГБТ (рис. 10). В присутствии 1-ГБТ содержание ПХФ снижалось в течение 3 ч на 85%. В реакционной смеси обнаруживались три продукта реакции со временем удерживания 10,37; 10,77 и 11,48 мин. Методом масс-спектрометрии было установлено, что продукты со временем удерживания 10,37 и 10,77 мин являлись конъюгатами продуктов разложения двух молекул ПХФ, содержащими пять

молекул хлора на два ароматических кольца. Это указывает на то, что происходило дегалогенирование молекул ПХФ в ходе окисления лакказой с участием 1-ГБТ. Дегалогенирование хлорфенолов и их производных открывает возможность последующего раскрытия ароматического кольца другими ферментами (например, оксигеназами), что определяет значительное снижение токсичности такого поллютанта. Полученные результаты указывают на возможность использования системы LacC1/1-ГБТ в качестве агентов первичной атаки при разработке технологических приемов очистки природных сред, загрязненных хлорфенолами.



**Рисунок 10.** Окисление ПХФ лакказой LacC1 *C. unicolor* ВКМ F-3196 ● – без 1-ГБТ; ■ - в присутствии 1-ГБТ.

### 9. Синтез лигниноподобных водорастворимых полимеров (ЛВП) с участием лакказы и исследование их антивирусной активности

Антивирусная активность природного лигнина известна из литературы (Suzuki et al., 1990). Однако у препаратов природного происхождения имеются существенные недостатки: неопределенный состав и низкая растворимость в воде. Решением этих проблем может быть синтез искусственных лигниноподобных полимеров из фенольных мономеров. Учитывая природную способность лакказы полимеризовать фенолы, мы использовали LacC1 *C. unicolor* для проведения подобных реакций.

В качестве фенольных мономеров при синтезе ЛВП использовали три фенольные соединения, которые являются обычными продуктами разложения лигнина: 2-метоксифенол, 2,5-дигидроксibenзойная кислота и 1,2,3-тригидроксibenзол. Эти соединения содержали различные заместители в ароматическом кольце. При полимеризации таких фенолов под действием лакказы образовывались водонерастворимые полимеры. Для получения водорастворимых полимеров была проведена сополимеризация фенольных мономеров с молекулами, увеличивающими водорастворимость лигниноподобных полимеров. Ранее было показано, что в ходе синтеза полимеров из фенольных соединений с помощью лакказы, возможна их сополимеризация с молекулами АБТС и производными акрилата, в результате чего водорастворимость конечных продуктов увеличивалась (Rittstieg et al., 2003; Mai et al., 2003). Поэтому для сополимеризации с фенольными

мономерами и мы выбрали АБТС и акриламид. Фенольные соединения окисляются лакказой до феноксирадикалов, которые далее подвергаются спонтанной полимеризации (Сарканен, 1975). АБТС окисляется лакказой до катионрадикала, который способен сополимеризоваться с радикалами фенольных мономеров, также образующихся под воздействием лакказы. Акриламид не окисляется лакказой, поэтому для получения радикалов акриламида в реакционную смесь вносили персульфат аммония.

В ходе синтеза были получены препараты ЛВП с различным выходом конечного продукта (табл. 2). Большой выход наблюдался для ЛВП на основе сополимеров фенольных соединений и АБТС. Были исследованы токсичность полученных препаратов в отношении клеточных культур и их антивирусная активность в отношении вируса болезни Ауески PRV. Как видно из табл. 3, ЛВП на основе акриламида оказывали токсический эффект на клетки и обладали низкой антивирусной активностью. При этом ЛВП на основе акриламида и 1,2,3-тригидроксибензола обладал более высокой антивирусной активностью по сравнению с другими ЛВП на основе акриламида. Сополимеры на основе АБТС не обладали токсическим эффектом в отношении клеток и проявляли высокую антивирусную активность. Необходимо отметить, что ЛВП на основе АБТС и 1,2,3-тригидроксибензола ингибировал развитие вируса уже при концентрации 0,005 мг/мл.

**Таблица 2**  
Выходы препаратов ЛВП

Препарат ЛВП	Выход
Сополимер акриламида с 2-метоксифенолом	1,5%
Сополимер акриламида с 2,5-дигидроксибензойной кислотой	1%
Сополимер акриламида с 1,2,3-тригидроксибензолом	1,9%/
Сополимер АБТС с 2-метоксифенолом	10%
Сополимер АБТС с 2,5-дигидроксибензойной кислотой	15%
Сополимер АБТС с 1,2,3-тригидроксибензолом	10%

**Таблица 3**  
Токсичность и противовирусная активность препаратов ЛВП

Препарат ЛВП	Цитотоксический эффект на сформированный монослой клеток ВНК-21 (концентрация лигнинов 1 мг/мл)	Ингибирование пролиферации клеток ВНК-21 (концентрация лигнинов 1 мг/мл)	Кратность ингибирования развития вируса болезни Ауески при разных концентрациях препаратов лигнина		
			0,5 мг/мл	0,05 мг/мл	0,005 мг/мл
Сополимер акриламида с 2-метоксифенолом	+*	+	—**	—	—
Сополимер акриламида с 2,5-дигидроксибензойной кислотой	+	+	100	—	—
Сополимер акриламида с 1,2,3-тригидроксибензолом	+	+	300	—	—
Сополимер АБТС с 2-метоксифенолом	—	—	>1000	—	—
Сополимер АБТС с 2,5-дигидроксибензойной кислотой	—	—	>1000	>300	—
Сополимер АБТС с 1,2,3-тригидроксибензолом	—	—	>1000	>300	5

\* + - отмечается; \*\* — - отсутствует.

Таким образом, в нашей работе впервые показана противовирусная активность препаратов, полученных в реакциях сополимеризации с участием лакказы.



## ВЫВОДЫ

1. Проведен скрининг продуцентов лакказы среди 23 штаммов базидиомицетов. В качестве эффективного продуцента лакказы был отобран штамм *C. unicolor* ВКМ F-3196.

2. Изучен эффект индукторов различной химической природы на продукцию лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196. Лучшим индуктором оказались ионы  $\text{Cu}^{2+}$  в концентрации 0,1 мМ, обеспечивающие почти 5000-кратное увеличение продукции лакказы.

3. Установлено, что при глубинном культивировании на среде Кирка с  $\text{Cu}^{2+}$  в качестве индуктора лакказа *C. unicolor* ВКМ F-3196 продуцировалась в виде двух изоформ - LacC1 и LacC2. Разработана схема очистки, позволяющая надежно разделять две изоформы лакказы с высоким выходом (33,5% для LacC1 и 31% для LacC2).

4. Впервые охарактеризованы физико-химические и каталитические свойства двух изоформ лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196. Показано, что изоформа LacC1 обладает более высокой термостабильностью и эффективностью окисления субстратов, а также проявляет активность в более широком диапазоне pH.

5. Впервые определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов двух изоформ лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196. Впервые определена экзон-интронная структура фрагмента гена лакказы *C. unicolor* ВКМ F-3196. На основе анализа нуклеотидных последовательностей фрагментов генов лакказ LacC1 и LacC2 и соответствующих им аминокислотных последовательностей доказано, что LacC1 и LacC2 - продукты разных генов.

6. Анализ трехмерных моделей LacC1 и LacC2 подтвердил их принадлежность к типичным трехдоменным лакказам грибов.

7. Показана возможность практического применения LacC1 на примерах окисления пентахлорфенола системой лакказа/медиатор и синтеза лигниноподобных водорастворимых полимеров с антивирусной активностью.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность к.ф.-м.н. Б.С. Мельнику (лаборатория физики белка, УРАН Институт белка РАН) за определение КД-спектров и плавление белков; н.с. В.Я. Лысанской (отдел «Всероссийская коллекция микроорганизмов», УРАН ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН) за определение углеводного состава лакказ; к.б.н. Т.А. Мурановой (УРАН ФИБХ РАН) за определение N-концевых аминокислотных последовательностей белков; к.б.н. Ж.И. Будариной и к.б.н. Ж.И. Ковалевской (лаборатория молекулярной микробиологии, УРАН ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН) за помощь в определении нуклеотидной последовательности фрагмента гена лакказы LacC2 с кДНК; к.ф.-м.н. А.А. Лашкову (УРАН Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, Москва) за помощь в компьютерном моделировании трехмерной структуры белков; к.х.н. Б.П. Баскунову (лаборатория масс-спектрометрии, УРАН ИБФМ им. Г.К.Скрябина РАН) за масс-спектрометрический анализ; лаборатории культур клеток и клеточной инженерии под руководством Моренкова О.С. (УРАН Институт биофизики клетки РАН) за определение токсичности и антивирусной активности препаратов лигниноподобных водорастворимых полимеров.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

## Статьи

1. Ребриков Д.Н., Степанова Е.В., Королева О.В., Бударина Ж.И., Захарова М.В., Юркова Т.В., Солонин А.С., Белова О.В., Пожидаева (Лисова) З.А., Леонтьевский А.А. Лакказа лигнинолитического гриба *Trametes hirsuta*: очистка и характеристика фермента, клонирование и первичная структура гена. - Прикладная биохимия и микробиология, 2006, т. 42, с. 645-653.
2. Лисов А.В., Пожидаева (Лисова) З.А., Степанова Е.В., Королева О.В., Леонтьевский А.А. Трансформация полихлорированных фенолов лакказами с участием 1-гидроксибензотриазола как медиатора. - Прикладная биохимия и микробиология, 2007, т. 43, с. 691-694.
3. Королева О.В., Степанова Е.В., Федорова Т.В., Логинов Д.С., Черкашин Е.А., Беневоленский С.В., Вавилова Е.А., Чулкин А.М., Абянова А.Р., Бударина Ж.И., Юркова Т.В., Захарова М.В., Леонтьевский А.А., Солонин А.С., Пожидаева (Лисова) З.А. Рекомбинантная лакказа лигнинолитического гриба *Trametes sp.* и способ ее получения. Патент RU № 2394912 С2, 17.06.2008.
4. Lisoza Z.A., Lisov A.V., Leontievsky A.A. Two laccase isoforms of the basidiomycete *Cerrena unicolor* VKM F-3196. Induction, isolation and properties. - J Bas Microbiol, 2010, v. 50, p. 72-82.

## Тезисы

1. Пожидаева (Лисова) З.А. Разработка среды для получения высокого выхода лакказы при культивировании гриба *Cerrena unicolor* VKM F-3196. Материалы 1-ой Всероссийской научно-практической конференции «Питательные среды и методы культивирования клеток для биологии, медицины и биоиндустрии: фундаментальные и прикладные аспекты» - Пущино, 24-25 мая 2007, с. 55.
2. Лисова З.А., Леонтьевский А.А. Характеристика изоформ лакказы базидиомицета *Cerrena unicolor* VKM F-3196. - Сб. тезисов 12-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века». - Пущино, 10-14 ноября 2008, с. 90.
3. Лисова З.А. Изоформы лакказы базидиомицета *Cerrena unicolor* VKM F-3196. – Тез. докладов 16-ой Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2009», Москва, 13-18 апреля 2009, с. 54.
4. Лисова З.А., Леонтьевский А.А. Свойства лакказ *Cerrena unicolor* VKM F-3196. – Сб. тезисов 13-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология - наука 21 века». - Пущино, 28 сентября - 2 октября 2009, с. 73-74.