

На правах рукописи

Осипов Евгений Михайлович

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ХЛОРИД-РЕЗИСТЕНТНОЙ ЛАККАЗЫ ИЗ *BOTRYTIS ACLADA*.

03.01.04 Биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва 2016

Работа выполнена в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научные руководители:

член-корреспондент РАН,
доктор химических наук, профессор
Попов Владимир Олегович

кандидат физико-математических наук
Поляков Константин Михайлович

Официальные оппоненты:**Куранова Инна Петровна**

доктор химических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук», отдел рентгеновских методов анализа и синхротронного излучения, главный научный сотрудник

Леонтьевский Алексей Аркадьевич

доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, заведующий лабораторией микробной энзимологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Защита состоится «__»_____2017 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33 строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан «__»_____201__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Лакказы (КФ 1.10.3.2, бензолдиол : кислород оксидоредуктаза) – это фермент, катализирующий окисление широкого спектра фенольных субстратов и некоторых неорганических ионов с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. Лакказы широко распространены в природе. Они были обнаружены в грибах, насекомых, бактериях и археях. Название фермента – лакказа – произошло от названия японского лакового дерева *Rhus vernicifera*, из сока которого фермент впервые был выделен и описан в 1883 году, что делает лакказу одним из старейших охарактеризованных ферментов.

Охарактеризованы физико-химические и каталитические свойства лакказ из различных источников, методом рентгеноструктурного анализа установлено их пространственное строение. В настоящее время в банке данных белковых структур доступны структуры лакказ из 26 организмов.

Лакказы принадлежат семейству медь-содержащих оксидаз, к которому также относятся аскорбатоксидаза, билирубиноксидаза и церулоплазмин. Медь-содержащие оксидазы имеют сложно устроенный активный центр, содержащий от четырех до семи ионов меди. Лакказы являются простейшими представителями этого семейства. Они содержат четыре иона меди на молекулу и представляют интерес в качестве модельных белков при изучении медь-содержащих оксидаз. Строению и свойствам активного центра лакказ посвящено большое число исследований. Активный центр лакказ изучен методами оптической и ЭПР спектроскопии, рентгеноструктурного анализа.

Четыре иона меди активного центра лакказ образуют моноядерный T1 центр, вблизи которого происходит окисление первого субстрата, и трехядерный T2/T3 кластер, в котором происходит окисление молекулы кислорода до воды. Редокс потенциал T1 центра является важной характеристикой лакказ, которая определяет спектр окисляемых субстратов. В зависимости от величины редокс потенциала лакказы делятся на высоко- (>720 мВ), средне- (450-720 мВ) и низко- (<450 мВ) потенциальные. Во всех лакказах ион меди T1 центра имеет плоскую треугольную координацию двумя остатками гистидина и остатком цистеина. T1 центры лакказ различаются по типу остатка в аксиальном положении. Высоко- и среднепотенциальные лакказы в аксиальном положении T1 центра содержат остаток лейцина или фенилаланина, а низкопотенциальные содержат остаток метионина. К настоящему

времени нет единого мнения о том, как строение и ближнее окружение T1 центра влияют на его редокс потенциал.

Лакказы представляют интерес для биотехнологии. Одно из практических применений лакказ основано на их способности окислять ряд фенольных соединений, таких как азокрасители, инсектициды и гербициды. Биотехнология предъявляет к лакказам ряд требований: операционная стабильность, высокий редокс потенциал T1-центра, низкая стоимость препарата, широкая рабочая область pH и устойчивость к ингибиторам.

Лакказы в зависимости от организма-источника можно разделить на три большие группы: бактериальные, грибные и растительные. Бактериальные лакказы проявляют наибольшую активность в нейтральной и щелочной областях pH. Однако практическое применение бактериальных лакказ затруднено тем, что они имеют низкий потенциал T1 центра. Большинство грибных лакказ имеет высокий или средний редокс потенциал и проявляет максимальную активность в кислых областях pH. Большинство высокопотенциальных лакказ выделено из грибов-базидиомицетов. Однако их недостатком является высокая чувствительность к ингибированию хлоридами - заметное снижение активности лакказ наблюдается уже при миллимолярных концентрациях хлорид-ионов. Поиск устойчивых к ингибированию хлорид-ионами высокопотенциальных лакказ представляет практический интерес. Ряд лакказ из грибов-аскомицетов проявляет устойчивость к ингибированию хлорид-ионами. Факторы, определяющие различия в хлорид-резистентности, не установлены. Одним из подходов к исследованию этого механизма может быть сравнительный анализ структур лакказ из грибов-базидиомицетов и аскомицетов.

Нами для исследования была выбрана лакказа из гриба-аскомицета *Botrytis aclada* (далее BaL), которая устойчива к ингибированию хлорид-ионами и имеет высокий редокс потенциал T1 центра. Рекомбинантная форма лакказы из *B. aclada* была получена с высоким уровнем экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*. Для оценки влияния природы аксиального остатка T1 центра на свойства лакказы была получена мутантная форма с заменой Leu499Met. Мутантная форма отличалась от нативной каталитическими характеристиками и редокс потенциалом активного центра.

Цель исследования.

Целью данной работы являлось сравнительное структурно-функциональное исследование лакказы из *B. aclada* (BaL) и её мутанта Leu499Met (L499M BaL).

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать физико-химические и каталитические свойства рекомбинантной BaL и L499M BaL.

2. Получить монокристаллы BaL и L499M BaL, пригодные для рентгеноструктурного анализа.
3. Собрать наборы дифракционных данных высокого разрешения на синхротронном источнике для BaL и мутанта L499M BaL, а также для комплексов BaL с CuCl и CuSO₄.
4. Решить и кристаллографически уточнить структуры BaL, L499M BaL и комплексов BaL.
5. Провести сравнительный анализ структур BaL и L499M BaL для установления изменений в структуре, которые привели к изменению редокс потенциал фермента.
6. Провести сравнительный анализ структуры BaL, комплексов BaL и структур других лакказ.
7. Проанализировать возможные структурные причины хлорид-резистентности лакказ из аскомицетов.

Научная новизна и практическая значимость.

Методом рентгеноструктурного анализа впервые определена структура рекомбинантной BaL и мутанта L499M BaL с высоким разрешением. Сходство структур BaL и мутантной формы L499M BaL позволяет связать наблюдаемые изменения в редокс потенциале и кинетических характеристиках мутантной формы исключительно с введением в аксиальное положение T1 центра атома серы метионина.

Впервые была получена структура деплецированной (depleted) по иону меди T2 (T2Д) формы лакказы из аскомицетов. Впервые для лакказ из аскомицетов проведено встраивание ионов меди в T2 центр T2Д формы лакказы обработкой кристаллов солями Cu⁺. Показана возможность обратимого перестроения T2/T3 кластера при встраивании ионов меди.

Впервые проведен анализ структурных особенностей лакказ из аскомицетов, которые могут определять их устойчивость к ингибирующему действию хлорид-ионов.

Результаты работы могут быть полезны специалистам, занимающимся исследованиями лакказ и практическим применением этих ферментов.

Положения, выносимые на защиту.

1. Замена Leu499Met не вносит существенных изменений в структуру лакказы. Таким образом, снижение редокс потенциала может быть связано исключительно с введением в аксиальное положение T1 центра атома серы метионина.
2. Наблюдаемые различия в кинетических характеристиках мутантной формы и нативного фермента связаны с различиями их редокс-потенциалов.
3. Встраивание ионов меди в активный центр лакказ осуществляется только при использовании солей Cu⁺. Встраивание сопровождается перестроением

координирующих ионы меди остатков гистидина активного центра.

4. Наблюдаемая хлорид-резистентность лакказ из аскомицетов может быть связана с особенностями строения канала, соединяющего ион меди T2 с поверхностью фермента.

Личный вклад диссертанта.

Диссертантом выполнены очистка, исследование свойств и кристаллизация белковых препаратов, сбор наборов дифракционных данных, решение и анализ структур, подготовка материалов для публикации в научных журналах.

Методология и методы исследования.

В диссертации использованы классические биохимические методы очистки и характеристики белков; методы кристаллизации белков и метод рентгеноструктурного анализа.

Степень достоверности и апробация работы.

Для решения поставленных задач использовались современные методы биохимии и рентгеноструктурного анализа с использованием синхротронного источника рентгеновского излучения. Материалы диссертации опубликованы в ведущих рецензируемых журналах, входящих в международные реферативные базы данных: Acta Crystallographica section D и Acta Crystallographica section F. Основные результаты работы представлены на следующих международных конференциях: Международной конференции по кристаллизации макромолекул ISBC 2011 (Гранада, Испания), Съезде Федерации Европейский Биохимических сообществ FEBS 2013 (С.-Петербург), конференции Биокатализ 2013 (Москва).

Связь с государственными программами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного фонда (проект № 14-24-00172) и программы У.М.Н.И.К.

Объем и структура диссертации.

Диссертация состоит из 108 страниц, содержит 35 рисунков и 19 таблиц. Диссертация содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение» и «Список литературы». В список литературы включено 159 источников.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение и характеристика препаратов лакказы из *B. aclada*

Препараты лакказы из аскомицета *B.aclada* (DSMZ 62081), ее мутанта, содержащего замену Leu499Met, и соответствующие им дегликозилированные формы были предоставлены проф. Роландом Людвигом из Института агрокультур ВОКУ (Вена, Австрия). Рекомбинантные формы ферментов были получены гетерологичной экспрессией в *Pichia pastoris*. Обе формы фермента были дегликозилированы с использованием эндогликозидазы Hf и α -маннозидазы. Препараты VaL, L499M VaL и дегликозилированных форм VaL и L499M VaL концентрировали до 20 мг/мл и транспортировали из Вены в Москву при +4 °С. Окислительно-восстановительные потенциалы T1 центра VaL (720 мВ) и L499M VaL (590 мВ) определены д.х.н. Шлеевым С.В.

Лакказа из *B. aclada* является гликопротеином с массой мономера около 100 кДа. Содержание углеводной части составляет 38 % масс. (Рисунок 1). Различие между рассчитанной из первичной структуры (62 кДа) и экспериментально определенной (70 кДа) массами дегликозилированной VaL объяснялось неполным удалением углеводных цепей, что было подтверждено окрашиванием гелей по углеводам. Содержание углеводной части в дегликозилированной VaL составило 11 % масс.

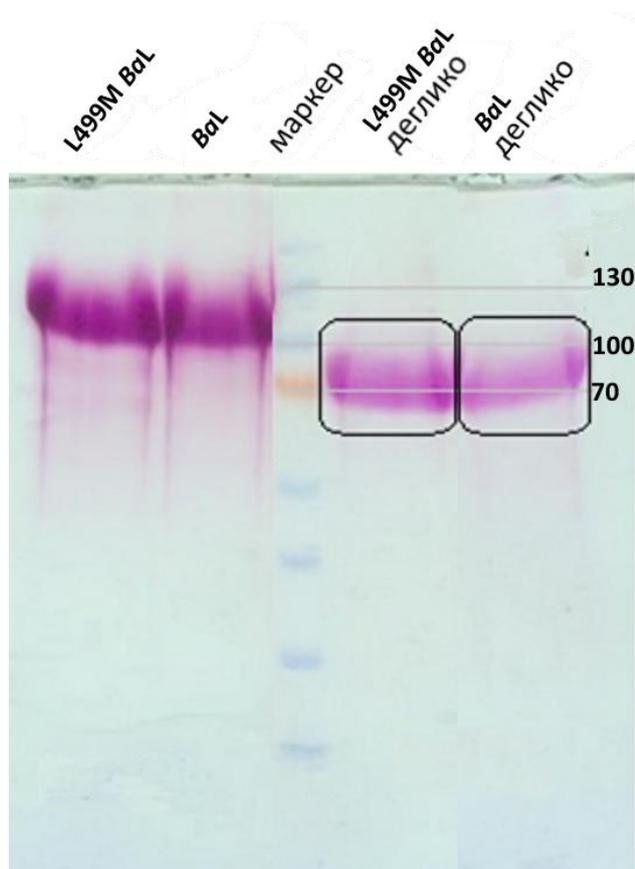


Рисунок 1. Полиакриламидный гель после SDS-PAGE, окрашенный по углеводам. Справа указаны массы маркеров.

Определение олигомерного состава лакказы из *B. aclada* методом гель-фильтрации

К белковым препаратам, используемым для кристаллизации, предъявляется ряд требований. В частности, препараты должны быть стабильными, гомогенными и монодисперсными. Полидисперсность белковых образцов считается фактором, затрудняющим кристаллизацию белков. Для проверки гомогенности и монодисперсности препарата VaL, помимо SDS-PAGE, был использован метод гель-фильтрации в двух буферах: цитратном и ацетатном, которые обычно используют для кристаллизации лакказ (Рисунок 3).

Проверка показала, что в зависимости от использованного буфера (цитрат или ацетат) и концентрации белка VaL могла существовать в растворе в виде либо мономера, либо димера, либо смеси димер-мономер (Рисунок 3). Для кристаллизации был выбран 25 мМ ацетатный буфер, pH 5.0, в котором VaL образует стабильный димер как в гликозилированной, так и дегликозилированной форме.

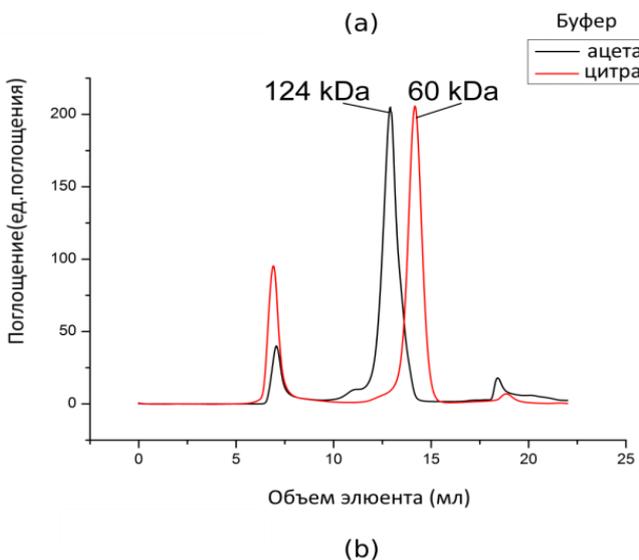
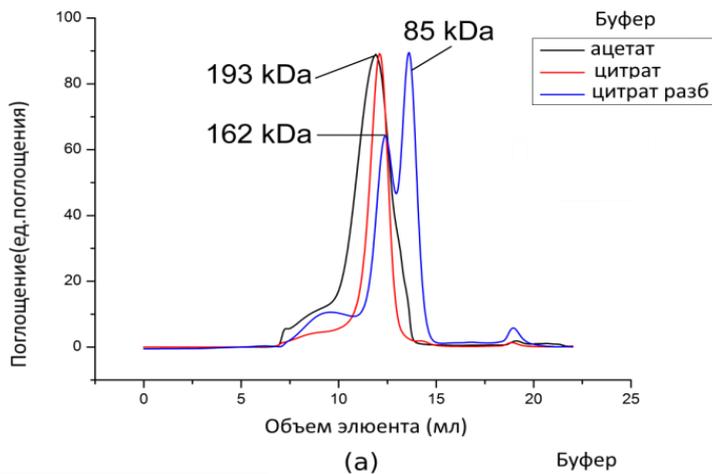


Рисунок 2. Гель-фильтрация VaL (20 мг/мл) на гель-фильтрационной колонке Superdex 200 10/300 GL, уравновешенной 25 мМ ацетатом натрия, pH 5.0 или 50 мМ цитратом натрия, pH 5.5. Цитрат разб – предварительно разбавленный цитратным буфером препарат VaL (концентрация 2 мг/мл). Верхняя панель: VaL; нижняя панель: дегликозилированная форма VaL. Молекулярные массы пиков рассчитаны из калибровочной кривой.

Сравнительная характеристика кинетических свойств лакказы из *B. aclada* и её мутанта Leu499Met

Исследована pH-зависимость активности VaL (E_{T1} 720 мВ) и L499M VaL (E_{T1} 580 мВ) в реакциях окисления АБТС и 2,6-ДМФ. pH-оптимум активности VaL в реакции с обоими субстратами сдвинут в область кислых значений pH. В случае L499M VaL pH-оптимум активности в реакции с АБТС также расположен в кислой области (pH около 4.0) (Рисунок 2). Во всем исследованном интервале pH скорость окисления АБТС для VaL выше скорости для L499M VaL. Этот результат согласуется с более высоким редокс потенциалом T1 центра VaL.

Иная картина наблюдается для реакции окисления 2,6-ДМФ, скорость которой для L499M VaL практически постоянна в интервале pH 2.5–6.5. В результате при pH выше 5.0 каталитическая активность L499M VaL в реакции окисления 2,6-ДМФ оказывается выше, чем у VaL.

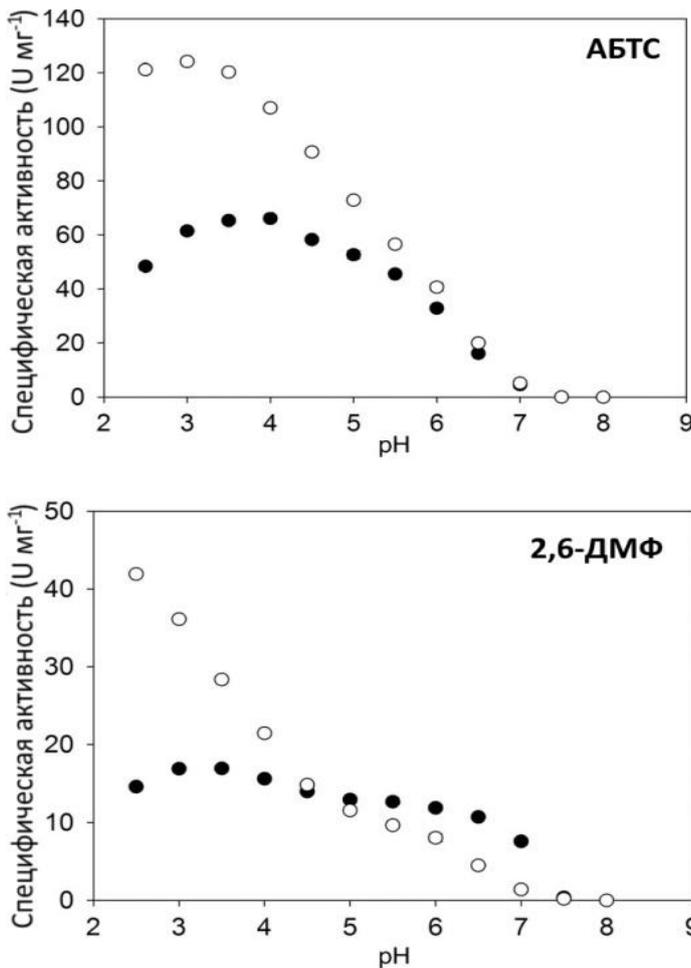


Рисунок 3. Профиль pH-зависимости специфической активности VaL (○) и L499M VaL (●) при использовании АБТС и 2,6-ДМФ. Условия эксперимента: 100 мМ цитрат-фосфатный буфер, pH 2.5 – 8.0, концентрация АБТС 2 мМ, 2,6-ДМФ – 1 мМ, 30 °С.

Для *BaL* и *L499M BaL* определены кинетические константы в интервале рабочих значений pH 3–6 (Таблица 1). Константы Михаэлиса (K_m) для АБТС и 2,6-ДМФ изменяются с ростом pH в противоположных направлениях. Аналогичная зависимость описана для других лакказ. pH-Зависимость K_m обычно объясняют влиянием pH на редокс свойства окисляемого субстрата. Кроме того, окисление лакказой нефенольных субстратов (АБТС) не подразумевает протонирования субстрата или продукта, в случае фенольных субстратов окисление может включать pH-зависимую стадию протонирования субстрата или образующегося продукта. Мутация в T1 центре повлияла на K_m . Большие величины K_m , полученные для *L499M BaL* вероятно связаны со снижением редокс потенциала его T1 центра.

Расчет величины k_{cat} для препаратов лакказ возможен только при наличии 4 ионов Cu/ молекулу фермента в растворе. В предоставленных препаратах содержалось 2.3-2.8 ионов Cu/ молекулу фермента, поэтому в качестве характеристики фермента представлена максимальная скорость катализируемой реакции. Максимальная скорость зависит от pH практически также, как и удельная активность, поскольку во всей области pH стандартные концентрации субстратов, использованные для определения удельной активности, значительно превышают K_m .

Таблица 1. Кинетические константы *BaL* и *L499M BaL* для АБТС и 2,6-ДМФ при различных pH

Субстрат	АБТС						
Фермент		<i>BaL</i>			<i>L499M BaL</i>		
	pH	$K_m, \mu M$	$V_{max}, U \text{ мг}^{-1}$	$(V_{max}/K_m) U \mu M^{-1} \text{ мг}^{-1}$	$K_m, \mu M$	$V_{max}, U \text{ мг}^{-1}$	$(V_{max}/K_m) U \mu M^{-1} \text{ мг}^{-1}$
	3.0	5.3±0.7	160.4±4.2	30.3	8.8±0.5	82.5±1.2	9.4
	4.0	14.0±1.0	126.9±2.6	9.1	19.3±1.0	74.2±1.1	3.8
	5.0	45.1±1.1	81.5±0.6	1.8	84±4	61.6±1.0	0.73
	6.0	148±4	41.8±0.5	0.28	500±19	40.4±0.6	0.081
Субстрат	2,6-ДМФ						
Фермент		<i>BaL</i>			<i>L499M BaL</i>		
	3.0	41.8±2.7	52.4±1.0	1.3	420±18	27.1±0.4	0.064
	4.0	8.3±0.7	37.4±0.7	4.5	80.8±2.7	23.6±0.2	0.29
	5.0	2.2±0.3	25.0±0.4	11.4	35.1±1.4	23.0±0.2	0.65
	6.0	1.8±0.2	17.8±0.2	9.9	34.7±1.1	22.8±0.2	0.65

Первичная структура лакказы из *B. aclada*

Для анализа первичной структуры VaL использовалась последовательность H8ZRU2 из базы данных UNIPROT. Поиск в BLAST показал, что среди лакказ с известными структурами VaL имеет наибольшую идентичность в 42 % с лакказой из аскомицета *Melanocaprus albomyces* (MaL). Наиболее идентичными VaL лакказами из базидимицетов и бактерий являются лакказа из *Trametes hirsuta* (36 %) и *Bacillus subtilis* (28 %).

В аминокислотной последовательности VaL можно выделить следующие характерные особенности:

- четыре консервативных для всех лакказ медь-связывающих мотива;
- в позициях, соответствующих аксиальным положениям T1 центра у гомологичных белков, расположены остатки Leu499 (вариабельный) и Ile491 (консервативный);
- С-концевой пептид Asp-Ser-Gly-Ile, гомологичный С-концевому пептиду Asp-Ser-Gly-Leu в MaL. Этот пептид присутствует в большинстве лакказ из аскомицетов и отсутствует у лакказ из других источников;
- 9 потенциальных сайтов N-гликозилирования Asn-Xxx-Ser/Thr

Получение кристаллов лакказы из *B. aclada*, её мутанта Leu499Met, комплексов с ионами меди

Пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы дегликозилированной формы VaL были получены при использовании в качестве противораствора 1.8 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в воде. Дегликозилированная форма L499M VaL в этих условиях выпадала в виде аморфного осадка. Монокристаллы L499M VaL были получены с использованием в качестве противораствора 1.0 М Li_2SO_4 , 0.5 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в 0.1 М цитрате натрия, pH 5.5. Комплексы VaL с Cu^+ и Cu^{2+} были получены путем вымачивания кристаллов VaL в противорастворе, дополнительно содержащем 0.6 мМ (насыщ.) CuCl (комплекс VaLCu^+) или 10 мМ CuSO_4 (комплекс VaLCu^{2+}).



Рисунок 4. Кристаллы VaL, выращенные в 2 М сульфате аммония с добавкой 5% об. изопропанола.

Решение структур лакказы из *B. aclada*

С кристаллов VaL, VaLCu²⁺, VaLCu⁺ и L499M VaL были собраны наборы дифракционных данных. Все кристаллы принадлежат пространственной группе симметрии C2 со сходными параметрами элементарной ячейки (Таблица 2). Структуры VaL и L499M VaL, VaLCu²⁺, и VaLCu⁺ были решены с разрешением 1.67, 1.7, 1.8 и 2.3 Å, соответственно.

Все структуры похожи на структуру VaL и могут быть совмещены с ней по координатам всех Ca атомов с отклонением 0.10 – 0.20 Å. Во всех структурах все аминокислотные остатки находились в разрешенных областях на карте Рамачандрана. Структуры депонированы в PDB с кодами 3SQR для VaL; 3V9E для L499M VaL и 4X4K для VaLCu⁺. Структура VaLCu²⁺ ничем не отличалась от структуры VaL, поэтому в PDB не депонировалась.

Структура лакказы из *B. aclada*

Структура VaL содержит три купредоксин-подобных домена: I (Ser1-Pro151), II (Ala152-Leu343) и III (Ala344-Ile543). Каждый домен имеет сходную β-сандвичевую укладку полипептидной цепи. Ход полипептидной цепи VaL аналогичен другим трехдоменным лакказам и аскорбатоксидазе. В структуре VaL локализовано три атома меди: один расположен в T1 центре и два в T3 центре. Таким образом, была получена структура T2-деплецированной формы VaL. К T2/T3 кластеру от поверхности белка ведут два канала. Каналы образованы остатками, принадлежащими доменам I и III. Как и в структурах других лакказ из аскомицетов канал со стороны T3 ионов меди прикрыт C-концевым тетрапептидом. На картах электронной плотности были локализованы девять остатков N-ацетилглюкозамина (NAG) и шесть остатков маннозы (MAN).

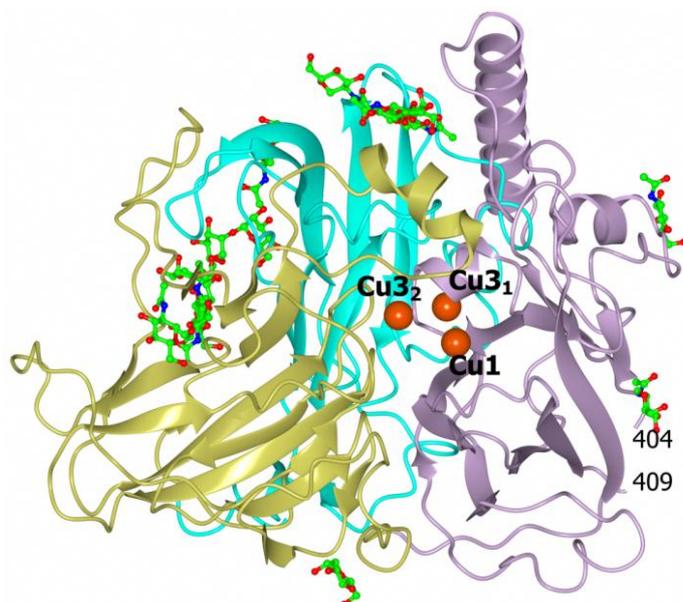


Рисунок 5. Ленточная модель структуры VaL. Домены I, II и III окрашены бирюзовым, золотым и фиолетовым цветом. Ионы меди показаны сферами оранжевого цвета. Углеводные остатки показаны шаростержневыми моделями с окраской по типу атомов. Указаны номера остатков, ограничивающих нелокализованную на картах электронной плотности петлю.

Таблица 2. Статистические характеристики наборов дифракционных данных и уточнения структур. В скобках указаны величины для слоя с наивысшим разрешением

	<i>BaL</i>	L499M <i>BaL</i>	BaLCu ⁺	BaLCu ²⁺
Код PDB	3SQR	3V9E	4X4K	----
Пространственная группа	C2	C2	C2	C2
Параметры элементарной ячейки (Å; °)	a=69.7, b=113.5, c=79.9; β=108.8	a=69.7, b=113.6, c=80.0; β=108.7	a=69.4, b=113.1, c=79.6; β=109.0	a=70.1, b=113.9, c=80.0; β=108.8
Разрешение (Å)	30–1.67 (1.77–1.67)	30–1.70 (1.80–1.70)	30–2.30 (2.44–2.30)	30–1.83 (1.94–1.83)
I/σ	16.1 (2.1)	16.1 (2.8)	16.3 (2.3)	20.8 (5.1)
Полнота набора (%)	96.3 (90.6)	97.4 (95.2)	96.7 (94.6)	96.1 (90.5)
Общее число отражений	181887 (24180)	199830 (31000)	81583 (12203)	124585 (16545)
Число уник. отражений	65731 (9904)	62839 (9875)	25106 (3913)	50252 (7615)
Избыточность данных	2.8 (2.4)	3.2 (3.1)	3.3 (3.1)	2.5 (2.2)
R _{meas} (%)	4.7(53.1)	6.5(54.0)	7.1(60.0)	3.9 (23.0)
Уточнение (%)				
R _{cryst}	16.6(28.0)	16.5(24.5)	18.1 (27.8)	16.2 (24.1)
R _{free}	19.1(29.0)	20.0(28.2)	23.3 (34.7)	20.4 (30.2)
Отклонение от идеальных значений				
Длины связей (Å)	0.021	0.017	0.011	0.016
Углы между связями(°)	1.91	1.97	1.62	1.92
Число атомов				
Белок	4206	4187	4087	4208
Cu	3	3	5	3
вода	445	305	155	429
остальное	197	164	197	197
График Рамачандрана (%)				
Наиболее благоприятная область	96.8	96.8	96.2	96.8
Разрешенная область	3.2	3.2	3.6	3.2
Температурные факторы (Å²)				
белок	28.3	23.4	38.6	23.3
Cu	26.7	24.6	38.3	21.2
вода	34.7	28.1	35.8	29.8
остальное	39.0	35.3	58.9	37.7

Димерная структура лакказы из *B. aclada*

В кристаллической упаковке VaL можно выделить один межмолекулярный контакт. Этот контакт образован субстрат-связывающими областями двух молекул фермента и имеет наибольшую энергию диссоциации среди всех внутримолекулярных контактов. Димер со сходной структурой был найден в структурах лакказ из аскомицетов *M. albomyces* (MaL) и *T. arenaria* (TaL). Димерный контакт в VaL отличается от MaL и TaL большей энергией сольватации и числом остатков в интерфейсе (Таблица 3). В структуре VaL две субъединицы димера связаны кристаллографической осью, а в структурах димеров MaL и TaL – некристаллографической. Предположительно такой же димер VaL существует в растворе.

Димер VaL сформирован за счет гидрофобных взаимодействий, π - π взаимодействия и двух водородных связей. Остаток Phe422, предположительно участвующий в связывании субстрата, образует сильное π - π взаимодействие с Phe422 соседней молекулы. Расстояние между плоскостями их бензольных колец составляет 3.7 Å. Плоскости бензольных колец остатков Phe422 копланарны и расстояние между нормальными, проходящими через центр бензольного кольца, составляет 1.3 Å. Из-за различий в упаковке димеров расстояние между ионами меди T1 центров в димере VaL составляет 20 Å, а в димерах MaL и TaL 27 Å.

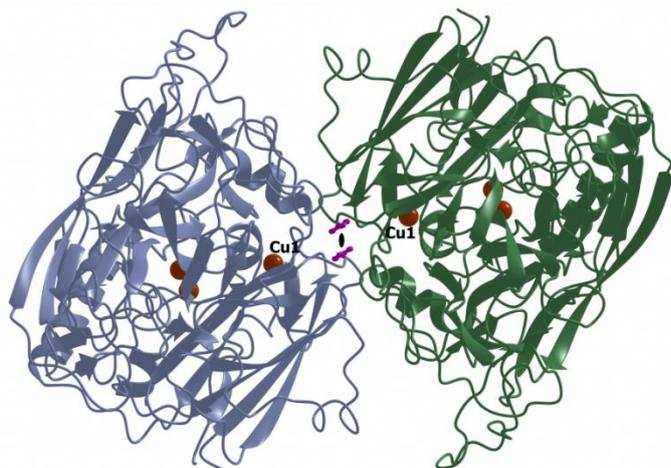


Рисунок 6. Димер VaL в кристалле. Боковые цепи остатков Phe422 в обеих субъединицах показаны шаро-стержневой моделью фиолетового цвета, ионы меди показаны сферами оранжевого цвета. Кристаллографическая поворотная ось 2-го порядка перпендикулярна плоскости рисунка и показана в виде черной линзы.

Таблица 3. Аналогичные межмолекулярные контакты в кристаллах лакказ из аскомицетов

Лакказа (код PDB)	Площадь контакта, Å ²	Энергия Гиббса образования димера, ккал/моль	Число остатков в интерфейсе	Число водородных связей
VaL(3sqr)	1007	-13.1	70	2
MaL(2q9o)	800	-12.2	54	7
TaL(3pps)	673	-10.7	55	6

Гликозилирование лакказы из *B. aclada*

В структуре дегликозилированной формы лакказы семь из девяти потенциальных сайтов гликозилирования содержали углеводную цепь, связанную посредством N-гликозидной связи с остатками Asn. Эти цепи состояли из остатков маннозы (MAN) и N-ацетилглюкозамина (NAG). К пяти остаткам Asn (39, 55, 305, 370, 389) прикреплено по одному остатку NAG. Углеводная цепь при Asn194 содержит два NAG и четыре MAN (Рисунок 6). Структуры BaL и L499M BaL различались по составу углеводной цепи у остатка Asn194: в структуре L499M BaL эта углеводная цепь короче на три остатка MAN. Углеводная цепь при Asn82 содержит три углеводных остатка: два NAG и MAN. Остаток Ser338 содержал остаток MAN связанный посредством O-гликозидной связи. Для лакказ O-гликозилирование нехарактерно и ранее в литературе не описывалось. O-гликозилирование, возможно, связано с использованием в качестве экспрессионной системы дрожжей *P. pastoris*. Присутствие неудаленных цепей объясняется стерическими затруднениями, создаваемыми белковой глобулой, и стабилизацией положения цепи водородными связями между углеводными остатками и белком. Водородные связи некоторых углеводных остатков стабилизируют кристалл за счет образования межмолекулярных водородных связей.

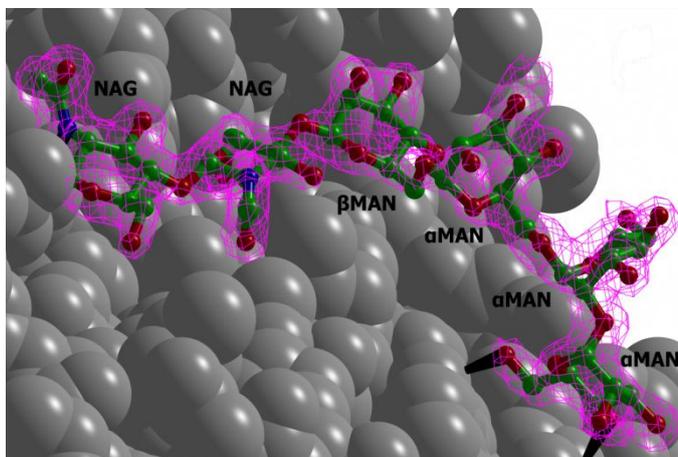


Рисунок 6. Углеводная цепь, прикрепленная к Asn194. Углеводы показаны шаростержневой моделью. Поверхность белка показана шаровой моделью серого цвета. Карта электронной плотности $2F_o - F_c$ (на уровне 1σ) окрашена фиолетовым. Водородные связи показаны черными конусами.

Сравнение структуры лакказы из *B. aclada* с другими лакказами

Структуры BaL и структуры лакказ из аскомицета *M. albomyces* (MaL) и базидиомицета *T. hirsuta* (ThL) очень похожи (

Рисунок 7). Наибольшие различия между структурами наблюдаются в строении петель на поверхности белковой глобулы, часть из которых расположена в субстрат-связывающей области. В структуре BaL, как и в структуре MaL, N- и C- концевые пептиды прикрывают доступ к каналам, ведущим к T2/T3 кластеру.

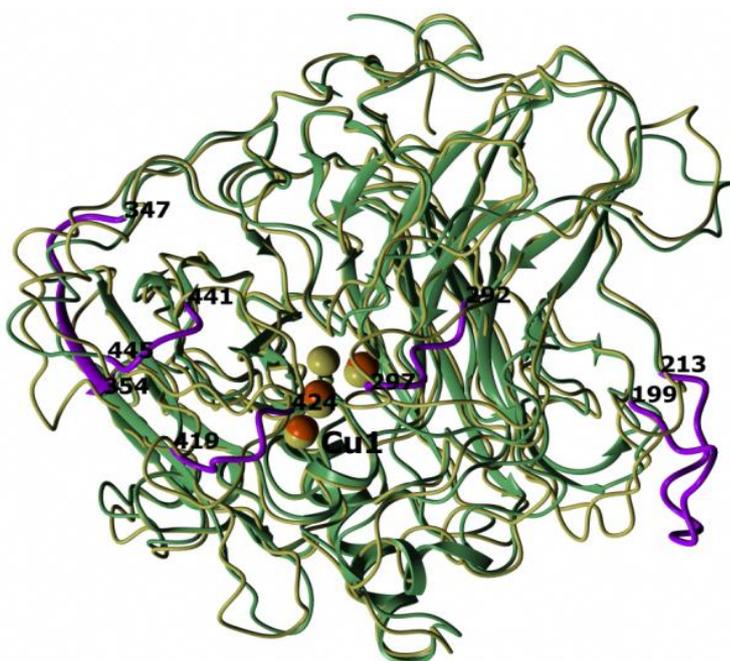


Рисунок 7. Структура MaL (золотая) совмещенная со структурой BaL (зеленая) по координатам эквивалентных Ca-атомов. Ионы меди показаны в виде оранжевых (BaL) и золотых (MaL) сфер. N- и C- концевые участки, а также наиболее отличающиеся петли окрашены фиолетовым. Указаны номера остатков, ограничивающие эти петли.

Активный центр лакказы из *B. aclada*

Активный центр BaL состоит из T1 центра и T2/T3 кластера. T1 центр расположен в домене III. T2/T3 кластер расположен на границе доменов I и III. В координации ионов меди активного центра участвуют 10 остатков гистидина и один цистеин из доменов I и III. Длины координационных связей ионов меди во всех структурах одинаковы. T1 центр и T2/T3 кластер связаны через консервативный мотив His-Cys-His.

В структурах BaL и L499M BaL пара ионов меди T3 центра уточнена с заселенностью 0.8, а ион меди T2 отсутствует. В структуре BaLCu⁺, полученной после настаивания кристаллов BaL с ионами Cu(I), присутствуют все ионы меди. В этой структуре заселенность ионов меди T2 и T3 равняется 0.7 и 0.8. Во всех структурах ион меди T1 центра имел полную заселенность.

Строение T1 центра в лакказе из *B. aclada* и мутанта Leu499Met

В структуре BaL ион меди T1 центра координирован атомами N δ His426, N δ His494 и S γ Cys489 (Рисунок 8). Ион меди T1 центра BaL имеет плоскую тригональную координацию. С одной стороны от плоскости расположен консервативный Pe491. С другой стороны от плоскости в структуре BaL расположен остаток Leu499, а в структуре мутанта - Met499. Структуры BaL и L499M BaL отличаются только в области T1 центра и совмещаются по координатам всех эквивалентных атомов с отклонением 0.11 Å.

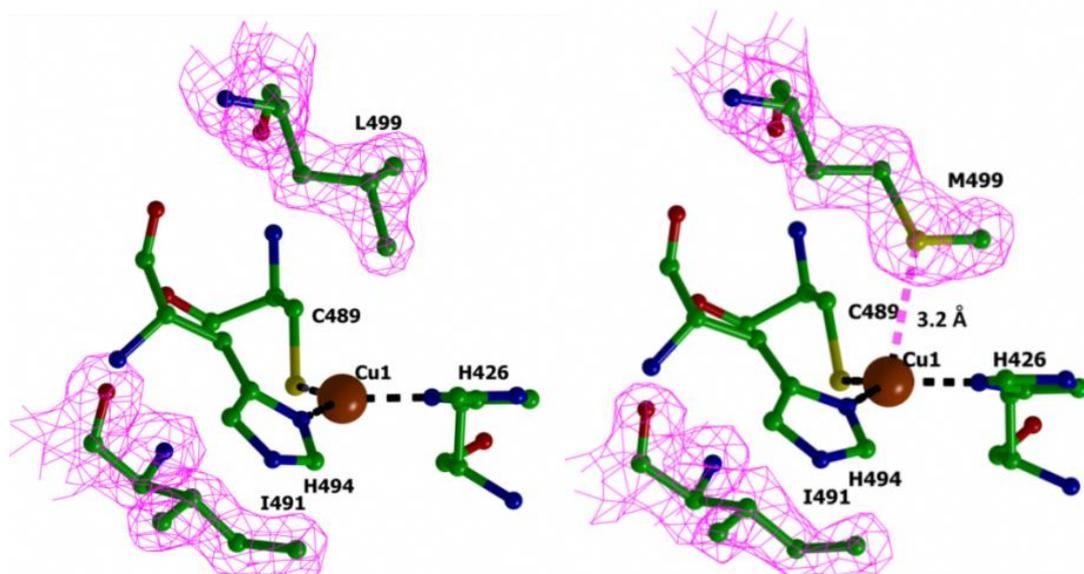


Рисунок 8. Строение T1 центра в BaL (слева) и L499M BaL (справа). Карта 2Fo-Fc для аксиальных остатков Leu499/Met499 и Ile491 показана на уровне 1σ . Ионы меди показаны в виде оранжевых сфер. Координационные связи иона меди T1 центра (Cu1) показаны пунктирными линиями. Слабая координационная связь между Cu1 и S δ Met499 показана розовой пунктирной линией.

В BaL ион меди T1 центра находится в плоскости, образованной его лигандами. В L499M BaL замена аксиального Leu499 на остаток метионина приводит к смещению этого иона меди в направлении S δ Met499 на 0.17 \AA от плоскости координирующих его атомов азота и серы. При этом длины координационных связей иона меди T1 центра не изменяются. Величина ошибки в координатах атомов по Крушанку для данной модели составляет 0.1 \AA , таким образом смещение превышает ошибку и рассматривается как значимое.

Выход иона меди T1 центра из плоскости, образованной тремя атомами координирующих его остатков His и Cys, в направлении атома серы аксиального метионина наблюдается в структурах других лакказ с аксиальным метионином и аскорбатоксидазы из *Zicchini*. В L499M BaL и указанных лакказах наблюдается только одна конформация боковой цепи аксиального метионина, расстояние между S δ аксиального метионина и ионом меди находится в диапазоне $2.8\text{-}3.3 \text{ \AA}$, что свидетельствует о наличии слабой координационной связи. В структуре L499M BaL расстояние между ионом меди T1 центра и S δ Met499 составляет 3.2 \AA , что может быть описано как слабая координационная связь. Неизменность структуры при замене Leu499Met позволяет утверждать, что снижение потенциала T1 центра BaL связано с введением в аксиальное положение атома серы метионина.

Аксиальные остатки - не единственный фактор, влияющий на редокс потенциал T1 центра. Значительные различия в редокс потенциалах лакказ из аскомицетов с одинаковыми аксиальными остатками T1 центра (BaL: 720 мВ, MaL: 470 мВ и TaL: 510 мВ) могут быть связаны с дальним окружением T1 центра (второй координационной сферой). Эти лакказы имеют сходную укладку полипептидной цепи и одинаково устроенный T1 центр. Различия в величине редокс потенциала T1 центра между лакказами BaL, MaL и TaL могут быть связаны со строением петель 292-297, 419-424 и 441-445. Петли 292-297 и 419-424 в структуре BaL отличаются по конформации от соответствующих им петель в структурах MaL и TaL. Петля 441-445 в структуре BaL короче, чем в структурах MaL и TaL на восемь аминокислотных остатков.

Таким образом, из сравнительного анализа структур BaL, L499M BaL, MaL и TaL можно сделать вывод, что:

- Sδ Met499 в структуре L499M BaL образует слабую координационную связь с ионом меди T1 центра. Это приводит к изменению геометрии комплекса иона меди T1 центра с плоской тригональной на искаженную тетраэдрическую;
- Снижение редокс потенциала T1 центра L499M BaL на 140 мВ связано исключительно с заменой лейцина в аксиальном положении на метионин

Строение T2/T3 кластера лакказы из *B. aclada*

Строение T2/T3 кластера BaL и BaLCu⁺ приведено на рисунке 9. В структурах BaL и L499M BaL отсутствовал ион меди T2 центра (T2Д-форма). Координация каждого из ионов меди T3 центра может быть описана как искаженный тетраэдр. Три вершины тетраэдра занимают атомы азота гистидинов, четвертая позиция занята общей молекулой воды W1 (Рисунок 9). Ион Cu3α координирован Nε атомами His133, His431 и His488 и молекулой воды W1. Ион Cu3β координирован Nε атомами His131, His490 и Nδ атомом His89 и молекулой воды W1. Молекула воды W1 расположена ближе к Cu3α, чем к Cu3β. В структуре BaLCu⁺ с полным набором ионов меди в T2/T3 кластере лигандами иона меди T2 центра являются Nε атомы His89 и His429 и молекула воды (W2 Рисунок 9). В отсутствие иона меди T2 остаток His429 в структуре BaL развернут вокруг связи Cβ-Cγ на 180°. Развернутый остаток His429 координирует ион меди Cu3α через Nε атом и образует водородную связь с молекулой воды W2.

Известны структуры двух лакказ (*Coprinus cinereus* и *Thermus thermophilus*) с полностью удаленным ионом меди T2 центра. В этих структурах гистидин T2 центра, соответствующий His429 в структуре BaL, имеет два альтернативных положения. В одном из

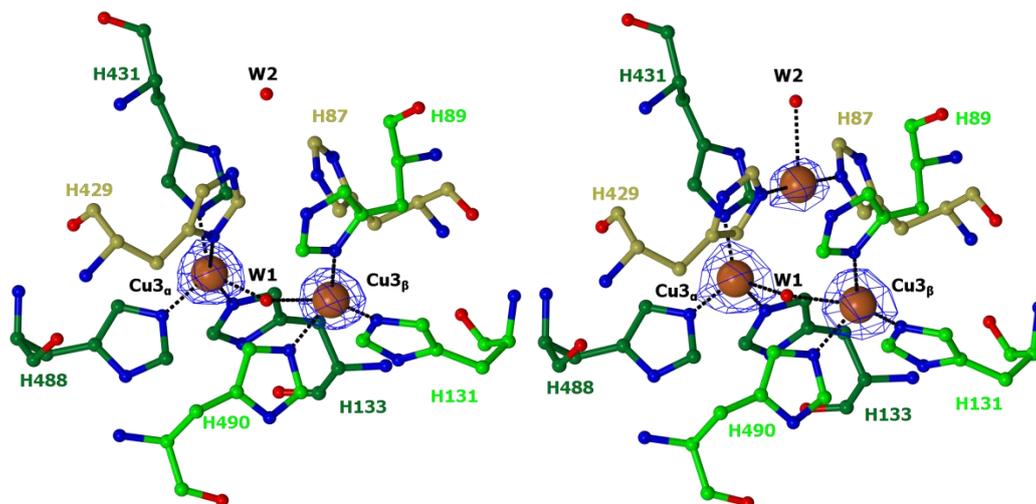


Рисунок 9. Строение T2/T3 медного кластера. Левая панель: BaL. Правая панель: BaLCu⁺. Атомы углерода остатков His, координирующих ионы Cu3 α , Cu3 β и Cu2, окрашены темно-зеленым, светло-зеленым и желтым, соответственно. Ионы меди показаны оранжевыми сферами. Кислородные лиганды показаны шаростержневой моделью красного цвета. Карты электронной плотности 2Fo-Fc (на уровне 5 σ) окрашены синим. Координационные связи ионов меди показаны пунктирными линиями.

положений указанный остаток His способен координировать ион меди T2 центра, а в другом положении образует слабую координационную связь с Cu3 α через свой N ϵ атом. Известны структуры с частичной заселенностью иона меди T2 центра (заселенность 0.2) (код PDB 3V9C, 3PXL), в которых остаток, соответствующий His429 в структуре BaL, также имеет два альтернативных положения. В этих структурах указанный остаток His T2 центра в одном из положений координирует ион меди T2, а в другом он образует слабую координационную связь с Cu3 α через N δ атом. В структуре лакказы из *Corioloropsis caperata* (код PDB 4 JHV, разрешение 1.6 Å) ион меди имеет заселенность 0.1, а остаток His397 имеет одно положение, в котором он способен координировать только ион меди T2-центра.

Также стоит отметить, что в структуре BaL геометрия ионов меди T3 центра слегка различается. Расстояние от Cu3 α до плоскости, образованной N ϵ атомами His133, His431 и His488, равно 0.6 Å; для Cu3 β расстояние до плоскости, образованной N ϵ атомами His131, His490 и N δ атомом His89, составляет 0.2 Å (левая панель, Рисунок 9). Указанные расстояния превышают величину ошибки по Крушанку (0.1 Å), поэтому отличия рассматриваются как значимые. Можно предположить, что различие в координации ионов меди T3 центра связано с образованием дополнительной координационной связи между Cu3 α и атомом N δ His429.

Встраивание иона меди в T2 центр лакказы из *B. aclada*

Для изучения процесса встраивания иона меди в T2 центр кристаллы T2D формы BaL вымачивались в солях Cu(I) и Cu(II). Вымачивание кристалла T2D BaL в присутствии CuSO₄ не привело к встраиванию иона меди в T2 центр. Вымачиванием кристалла T2D BaL в кристаллизационном противорастворе, насыщенном CuCl, был получен комплекс BaLCu⁺. Структура BaLCu⁺ была решена с разрешением 2.3 Å. Снижение предела дифракции по сравнению с BaL (разрешение 1.67 Å) сопровождалось ростом мозаичности (0.38⁰ для кристаллов BaLCu⁺ против 0.25⁰ для кристаллов BaL). В T2 центре структуры комплекса BaLCu⁺ был локализован ион меди. Следовательно встраивание иона меди в T2 центр T2D формы BaL происходит только при использовании солей Cu⁺.

Структуры BaLCu⁺ и BaL могут быть совмещены по координатам 525 эквивалентных Ca атомов с отклонением 0.16 Å. На картах электронной плотности BaLCu⁺ не удалось локализовать не только остатки 405-408, которые не были локализованы также в структуре BaL, но и остатки 1-14 (нумерация приведена по структуре BaL). Основные отличия структур BaLCu⁺ и BaL связаны с присутствием иона меди в T2 центре и разворотом боковой цепи His429 от иона меди T3 центра к иону меди T2 центра (Рисунок 9).

На картах электронной плотности комплекса BaLCu⁺, в районе остатка His81 был обнаружен пик на расстоянии 2.1 Å от его Ne атома. Этот пик был интерпретирован как ион меди с заселенностью 0.2.

В литературе описано встраивание иона меди в T2 центр лакказы из базидиомицета *S. caperata*, которое также происходит только при использовании солей Cu⁺. Это хорошо согласуется с кинетическими данными по встраиванию ионов Cu⁺ в T2 центры препаратов T2-деплецированных лакказ. Тем не менее в литературе приводятся данные по встраиванию в препараты бактериальной лакказы из *B. subtilis* как ионов меди Cu⁺, так и Cu²⁺. Сравнение кинетических данных, полученных для обработанных Cu⁺ и Cu²⁺ препаратов этой лакказы, показывает, что активность выше при использовании солей Cu⁺.

Ингибирование лакказы из *B. aclada* галогенид-ионами. Структурные факторы, влияющие на ингибирование

Центром связывания галогенид-ионов является ион меди T2. Значения I50 для галогенид-ионов находятся в диапазоне концентраций от 0.02 до >1500 мМ: I50(Br⁻) > I50(Cl⁻) > I50(F⁻). Фториды являются наиболее эффективными ингибиторами лакказ, величина I50 для F⁻ находится в микромолярном диапазоне концентраций. В случае хлорид-ионов величина I50 лежит в широком диапазоне и зависит от организма, из которого был выделен фермент. Для лакказ из базидиомицетов эта величина обычно не превышает 100 мМ, для

лакказы из базидиомицета *Trametes villosa* $I50(Cl^-) = 40$ мМ. Для лакказ из аскомицетов эта величина на порядок выше и составляет 500 – 2000 мМ, например, для лакказы из аскомицета *M. thermophila* $I50(Cl^-) = 600$ мМ.

Нами было изучено ингибирование VaL ионами F^- и Cl^- в области рН, в которой фермент проявляет каталитическую активность (рН 3.0, 4.5, 6.0) (Таблица 4).

Показано, что подобно другим лакказам из аскомицетов, VaL устойчива к ингибированию хлорид-ионами. При рН выше 4.5 ионы Cl^- практически не влияют на активность фермента. С ростом рН $I50(F^-)$ и $I50(Cl^-)$ растут для обеих форм фермента.

Для объяснения различий в эффективности ингибирования лакказ из аскомицетов и базидиомицетов мы привлекли структурные данные. Методами ЭПР спектроскопии и рентгеноструктурного анализа на примере лакказ из *R. vernicifera* и *M. albomyces* показано, что фторид- и хлорид- ионы могут связываться с ионом меди Т2 центра, замещая молекулу воды (W1, Рисунок 10).

Таблица 4. $I50$ для ингибирования VaL и L499M фторидом и хлоридом, измеренные при разных рН

Фермент	$I50(F^-)$, μM				$I50(Cl^-)$, мМ			
	VaL		L499M VaL		VaL		L499M VaL	
Субстрат рН	АБТС	2,6-ДМФ	АБТС	2,6-ДМФ	АБТС	2,6-ДМФ	АБТС	2,6-ДМФ
3	0.5	0.07	9	9	251	131	95	28
4.5	50	189	169	120	>1000	>1000	508	1207
6	1085	257	371	293	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.

н.и. – не ингибирует

В структуре всех лакказ есть канал, ведущий к Т2 центру, который заполнен цепью связанных водородными связями молекул воды (Рисунок 10). Различия в строении и аминокислотном составе канала, связывающего Т2 центр с поверхностью молекулы, могли бы объяснять наблюдаемые различия между величинами $I50(Cl^-)$ для лакказ из аскомицетов и базидиомицетов. Область канала, содержащая молекулы воды w1-w2, имеет одинаковое строение у всех трехдоменных лакказ.

Отличия наблюдаются в типе остатка, образующего водородную связь с молекулой воды w3. Во всех известных структурах лакказ из аскомицетов водородную связь с молекулой воды w3 образует остаток аспарагиновой кислоты (Asp434 в VaL). В структуре

лакказ из базидиомицетов и бактерий наблюдается большее разнообразие: молекула воды w3 связана либо с остатком серина (код PDB 1GSK, Ser427, бактерия *B. subtilis*) или остатком треонина (код PDB 3FPX, Thr403, базидиомицет *T. hirsuta*). В ряде случаев положение остатка Asp434 занимает гидрофобный остаток, например, в лакказе из *C. gallica* это Ile401 (код PDB 5A7E). Можно предположить, что депротонирование остатка Asp434 и возникающее вследствие него электростатическое отталкивание между этим остатком и отрицательно заряженными ионами может объяснять хлорид-резистентность лакказ из аскомицетов.

Вторым фактором, который может влиять на высокую хлорид-резистентность лакказ из аскомицетов, может являться N-концевой пептид (Рисунок 11). В BaL N-концевая часть на 27 аминокислотных остатков длиннее, чем в лакказах базидиомицетов. В структуре всех лакказ из аскомицетов N-концевая часть расположена в непосредственной близости от входа в канал, ведущий к T2 центру. В результате такой упаковки канал, ведущий к T2 центру в лакказах из аскомицетов, длиннее, что накладывает дополнительные ограничения на прохождение по каналу отрицательно заряженных ионов.

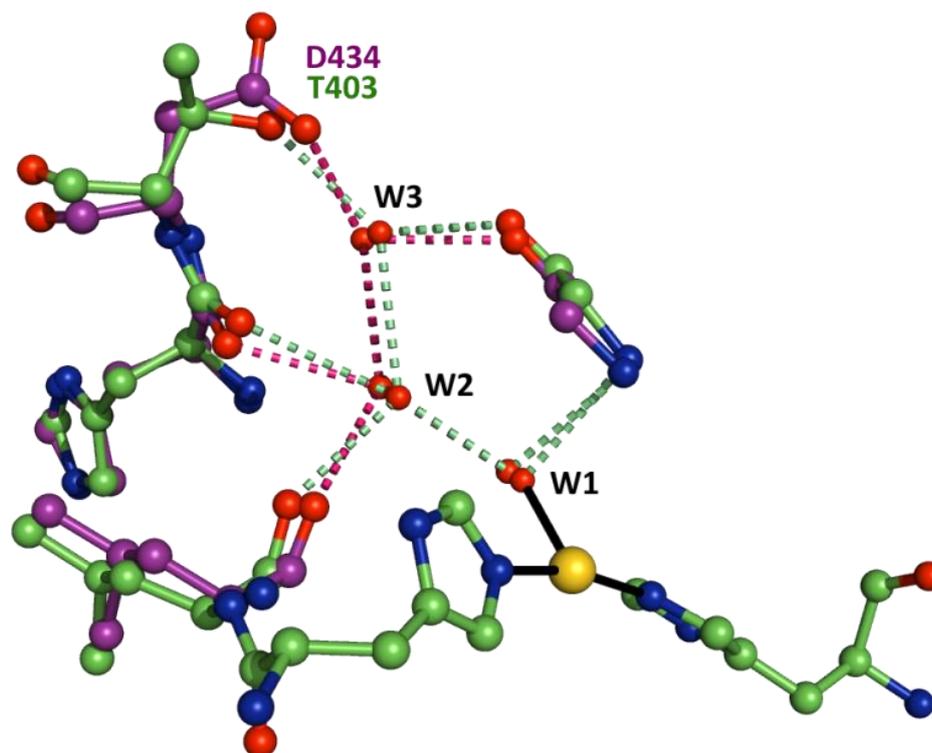


Рисунок 10. Строение консервативной части канала, соединяющего ион меди T2 с поверхностью, в структуре лакказ из аскомицета *V. aclada* (фиолетовая) и базидиомицета *T. hirsuta* (зеленая). Водородные связи молекул воды W показаны пунктиром фиолетового (BaL) и зеленого (ThL) цвета. Координационные связи иона меди T2 центра показаны черными линиями. Атомы Cu, O и N показаны сферами желтого, красного и синего цвета соответственно.

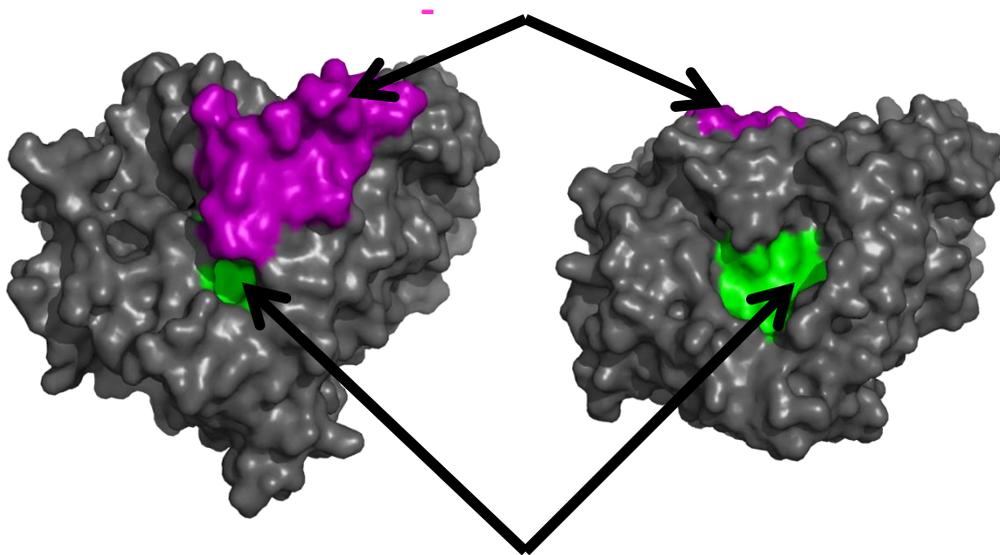


Рисунок 11. Вход в канал в структуре VaL и ThL, ведущий к иону меди T2 и прикрытый N-концевым пептидом Ser1-Thr27 (фиолетовый).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

1. Структуры лакказы из *Botrytis aclada* (BaL) , мутанта L499M BaL, комплексов BaL с CuCl и CuSO₄ решены и уточнены с разрешением 1.67, 1.7, 2.3 и 1.8 Å. Структуры лакказы BaL и мутанта L499M BaL не содержат меди в центре T2. Встраивание иона меди в T2 центр деплецированной формы BaL происходит только при использовании солей Cu⁺.
2. Структуры BaL и L499M BaL различаются исключительно строением T1 центра, в связи с чем снижение редокс потенциала T1 центра на 140 мВ можно связать с заменой аксиального остатка Leu499 на метионин.
3. Изучены каталитические свойства BaL и ее L499M мутанта. Мутант L499M BaL менее активен чем BaL, что коррелирует с более низким значением редокс потенциала T1 центра мутанта.
4. Особенности строения канала, ведущего от поверхности к иону меди T2 у лакказ из аскомицетов, позволяют объяснить их хлорид-резистентность. Присутствие в канале консервативного для лакказ из аскомицетов остатка аспарагиновой кислоты препятствует проникновению хлорид-ионов в канал за счет электростатического отталкивания. Наличие у лакказ из аскомицетов N-концевого фрагмента, прикрывающего вход в канал, дополнительно затрудняет проникновение хлорид-ионов в канал.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Osipov E. M., Polyakov K. M., Kittl R., Shleev S. V., Dorovatovskii P. V., Tikhonova T. V., Hann, S., Ludwig R., Popov V. O. Effect of the L499M mutation of the ascomycetous *Botrytis aclada* laccase on redox potential and catalytic properties // Acta Cryst. Section D 2014 Vol. 70 № 11 P.2913-2923
2. Osipov E. M., Polyakov K. M., Tikhonova T. V., Kittl R., Dorovatovskii P. V., Shleev S. V., Popov V. O., Ludwig R. Incorporation of copper ions into crystals of T2 copper-depleted laccase from *Botrytis aclada* // Acta Cryst. Section F 2015 P. 1465-1469

Материалы научных конференций, конгрессов и симпозиумов:

1. Osipov E. M., Kittl R., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Shleev S.V., Popov V.O., Ludwig R. Laccase from ascomycete *Botrytis aclada*: effect of mutation near the T1 site on the structure and properties of the enzyme // FEBS Journal 2013 Vol. 280 № 95
2. Osipov E.M., Tikhonova T.V., Polyakov K.M., Popov V.O. Crystallization and preliminary analysis of laccase from *B. aclada* // International School on Biological Crystallization, Granada, 2011
3. Osipov E.M., Polyakov K.M., Tikhonova T.V., Shleev S.V., Kittl R., Ludwig R., Popov V.O. Reconstitution of T2-copper ion in T2-depleted laccase from ascomycete *Botrytis aclada* in crystal // 8-я международная конференция «Биокатализ», Москва, 2-5 июля 2013

Список сокращений

2,6-ДМФ – 2,6-диметоксифенол;

АБТС – 2,2`-азинобис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота);

T2Д – деплецированная по T2 центру форма лакказы;

масс. – массовая доля;

BaL – лакказа из *Botrytis aclada*;

E – редокс-потенциал;

I50 – концентрация ингибитора, при которой активность уменьшается до 50 % от исходной;

MaL – лакказа из *Melanocarpus albomyces*;

MAN – манноза;

NAG – N-ацетилглюкозамин;

PDB - Банк данных белковых структур www.rcsb.org;

SDS – додецилсульфат натрия;

SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле по методу Лэммли;

ThL – лакказа из *Trametes hirsuta*

Для заметок