

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ» РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК»
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. А.Н. БАХА

На правах рукописи

Осипов Евгений Михайлович

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

03.01.04. Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
член-корреспондент РАН
доктор химических наук, профессор
В.О. Попов

кандидат физико-математических наук
К.М. Поляков

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
1.1 ЛАККАЗЫ В ПРИРОДЕ.....	9
1.2 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАККАЗ	10
1.3 КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАККАЗ. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ	12
1.3.1 СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛАККАЗ.....	12
1.3.2 PH-ЗАВИСИМОСТЬ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛАККАЗ.....	14
1.3.3 ИНГИБИТОРЫ ЛАККАЗ.....	16
1.3.4 МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЛАККАЗ	17
1.3.5 ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕДЬ-СОДЕРЖАЩИХ ЦЕНТРОВ ЛАККАЗ.....	20
1.4 СТРУКТУРА ЛАККАЗ	22
1.4.1 ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ЛАККАЗ.....	22
1.4.2 ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАККАЗ МЕТОДОМ РЕНТГЕНОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА	23
1.4.3 ТРЕТИЧНАЯ СТРУКТУРА ЛАККАЗ. ДОМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ	26
1.4.4 ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА ЛАККАЗ.....	31
1.4.5 СТРОЕНИЕ T1 ЦЕНТРА ЛАККАЗ.....	33
1.4.6 ВЛИЯНИЕ ОКРУЖЕНИЯ T1 ЦЕНТРА НА РЕДОКС ПОТЕНЦИАЛ И КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАККАЗ	35
1.4.7 СТРОЕНИЕ ЦЕНТРА СВЯЗЫВАНИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СУБСТРАТОВ. СТРУКТУРЫ КОМПЛЕКСОВ ЛАККАЗА-ФЕНОЛЬНЫЙ СУБСТРАТ	39
1.4.8 СТРОЕНИЕ T2/T3 КЛАСТЕРА ЛАККАЗ	41
1.4.9 КАНАЛЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ T2/T3 КЛАСТЕР ЛАККАЗ С ПОВЕРХНОСТЬЮ БЕЛКА.....	43
1.4.10 T2-ДЕПЛЕЦИРОВАННЫЕ ФОРМЫ ЛАККАЗ.....	45
1.4.11 ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ЛАККАЗ	48
1.4.12 СТРУКТУРЫ МУТАНТНЫХ ФОРМ ЛАККАЗ	49
1.5 ЛАККАЗА ИЗ АСКОМИЦЕТА <i>BOTRYTIS ACLADA</i>	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	54
2.1 РЕАКТИВЫ	54
2.2 ПРЕПАРАТЫ ЛАККАЗЫ ИЗ АСКОМИЦЕТА <i>BOTRYTIS ACLADA</i> , ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ В РАБОТЕ (ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ).....	54
2.3 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАККАЗНОЙ АКТИВНОСТИ.....	55
2.4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА В РАСТВОРЕ.....	56
2.5 ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ	56
2.6 ОКРАШИВАНИЕ SDS-PAGE ГЕЛЕЙ ПО УГЛЕВОДНОЙ ЧАСТИ	57
2.7 КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i> МЕТОДОМ ДИФфуЗИИ ПАРА	57
2.8 ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСОВ ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i> МЕТОДОМ ВЫМАЧИВАНИЯ КРИСТАЛЛОВ. 58	
2.9 СБОР ДИФРАКЦИОННЫХ ДАННЫХ И РЕШЕНИЕ СТРУКТУР	58

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ:	62
3.1 МОЛЕКУЛЯРНЫЕ СВОЙСТВА ПРЕПАРАТОВ ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i> И ЕЁ МУТАНТА LEU499MET	62
3.2 СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i> И ЕЁ МУТАНТА LEU499MET	64
3.3 ПЕРВИЧНАЯ СТРУКТУРА ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i>	66
3.4 ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОЛИГОМЕРНОГО СОСТАВА ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i> МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ	69
3.5 КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i> И ЕЁ МУТАНТА LEU499MET	71
3.6 ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i>	73
3.7 ДИМЕРНАЯ СТРУКТУРА ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i>	75
3.8 ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЕ ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i>	77
3.9 СРАВНЕНИЕ СТРУКТУРЫ ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i> С ДРУГИМИ ЛАККАЗАМИ	80
3.10 АКТИВНЫЙ ЦЕНТР ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i>	82
3.11 СТРОЕНИЕ T1 ЦЕНТРА В ЛАККАЗЕ ИЗ <i>B. ACLADA</i> И ЕЁ МУТАНТЕ LEU499MET	86
3.12 СТРОЕНИЕ T2/T3 КЛАСТЕРА ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i>	89
3.13 ВСТРАИВАНИЕ ИОНА МЕДИ В T2 ЦЕНТР ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i>	90
3.14 ИНГИБИРОВАНИЕ ЛАККАЗЫ ИЗ <i>B. ACLADA</i> ГАЛОГЕНИД-ИОНАМИ. СТРУКТУРНЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ИНГИБИРОВАНИЕ	91
ЗАКЛЮЧЕНИЕ:	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:	96

Список сокращений

2,6-ДМФ – 2,6-диметоксифенол

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

ПЭГ – полиэтиленгликоль

T2Д – деплецированная по T2 центру форма лакказы

E – редокс-потенциал

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

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

BaL – лакказа из *Botrytis aclada*

ThL – лакказа из *Trametes hirsuta*

MaL – лакказа из *Melanocarpus albomyces*

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Лакказа (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 [1], что делает лакказу одним из старейших охарактеризованных ферментов.

Лакказы из различных источников подробно охарактеризованы с точки зрения физико-химических и кинетических свойств, электрохимических характеристик, 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 [2]. 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 Т1-центра, низкая стоимость препарата, широкая рабочая область рН и устойчивость к ингибиторам [3,4].

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 рН. Однако практическое применение бактериальных лакказ затруднено тем, что они имеют низкий потенциал Т1 центра. Большинство грибных лакказ имеет высокий или средний редокс потенциал и проявляет максимальную активность в кислых областях рН. 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 Т1 центра. Рекомбинантная форма лакказы из *B. aclada* была получена с высоким уровнем экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*. Для оценки влияния природы аксиального остатка Т1 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.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать физико-химические и каталитические свойства рекомбинантной BaL и мутантной формы L499M BaL, содержащей замену Leu499Met.
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 рекомбинатной 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 мутантой формы исключительно с введением в аксиальное положение T1 центра атома серы метионина.

Впервые были 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.

Связь с государственными программами.

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

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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Лакказы в природе

Впервые лакказы обнаружены в млечном соке лакового дерева *Rhus vernicifera*, принадлежащего семейству растений *Anacardiaceae* в 1883 году [1]. Лакказы были обнаружены в грибах, насекомых, бактериях и археях [5–11]. Лакказная активность описана только для одного представителя архей *Haloferax volcanii* [11].

Лакказная активность описана для многих растений и в том числе для семейства *Acer* (клён), *Pinus* (сосна), *Aesculus* (каштан), *Populus* (осина) [12–15]. В растениях фермент чаще всего локализован в ксилеме. Основной ролью лакказ в растениях является участие в процессах лигнификации и защиты от патогенных организмов.

Лакказная активность описана для фермента, выделенного из насекомых *Bombyx mori* [16], *Manduca sexta* [17] и *Anopheles gambiae* [17]. У насекомых неактивная форма лакказы экспрессируется в эпидермисе, активация фермента происходит в процессе линьки или сразу после него. Предположительная роль лакказ у насекомых - участие в склеротизации кутикулы [9,18].

Целенаправленный поиск лакказ в геномах бактерий показал, что ген лакказы содержится в геноме большого числа бактерий [19,20]. Первая из охарактеризованных бактериальных лакказ была выделена из *Azospirillum lipoferum* [21]. Одна из наиболее изученных бактериальных лакказ выделена из «сенной палочки» *Bacillus subtilis* [22]. У бактерий лакказы участвуют в процессах патогенеза, биосинтезе пигментов и образовании защитного покрытия спор, защищающего бактерии от действия пероксида водорода и УФ-излучения [7,23,24].

Подробно изучены лакказы из высших грибов. Лакказы встречаются в грибах, вызывающих различные типы гнили, во многих почвенных сапрофитных грибах, в патогенных грибах и агариковых. В грибах лакказа является частью комплекса делигнификации и патогенеза, участвует в процессах морфогенеза, защиты от стресса, образовании плодовых тел [8,25]. Наиболее распространенными и изученными продуцентами лакказ являются грибы, вызывающие белую гниль. Они отличаются высоким уровнем экспрессии лакказ. Большинство этих грибов относятся к базидиомицетным грибам политипных родов *Trametes*, *Cerrena*, *Coriolopsis*, *Pleurotis*, *Lentinus* [5,6,26]. Грибы-аскомицеты преимущественно относятся к бурой гнили, для которой характерен низкий уровень экспрессии лакказ [27]. Лакказы из аскомицетов описаны для меньшего числа видов и изучены менее подробно, чем лакказы базидиомицетов [5]. Описаны свойства и структура лакказ из аскомицетов родов *Botrytis* [28,3], *Melanocarpus*

[29], *Thielavia* [30]. Большинство грибных лакказ являются внеклеточными ферментами [31].

1.2 Физико-химические свойства лакказ

Молекулярная масса мономеров лакказ находится в интервале от ~38 [32] до ~100 кДа [3]. рI лакказ находится в диапазоне рН 3-9. рI грибных лакказ обычно находится в кислой области рН, рI лакказ из растений и насекомых расположены в щелочной области [5,10,33]. Ряд грибных лакказ является гликопротеинами. Содержание углеводной части зависит от организма-продуцента. В лакказах из базидиомицетов углеводная часть составляет до 20 % от массы белка [5,34]. В случае лакказ из аскомицетов содержание углеводной части может превышать 40 %. В лакказах из *Botrytis cinerea* (штамм 61-34) и *Botrytis aclada* углеводная часть составляет 49 % [28] и 45 % [3] от массы белка, соответственно.

УФ-оптический спектр окисленной формы лакказ содержит пик поглощения в области 610 нм и плечо на 330 нм (Рисунок 1). Пик на 610 нм обуславливает голубую окраску концентрированных растворов лакказ и их тривиальное название - «голубые» лакказы [6,35].

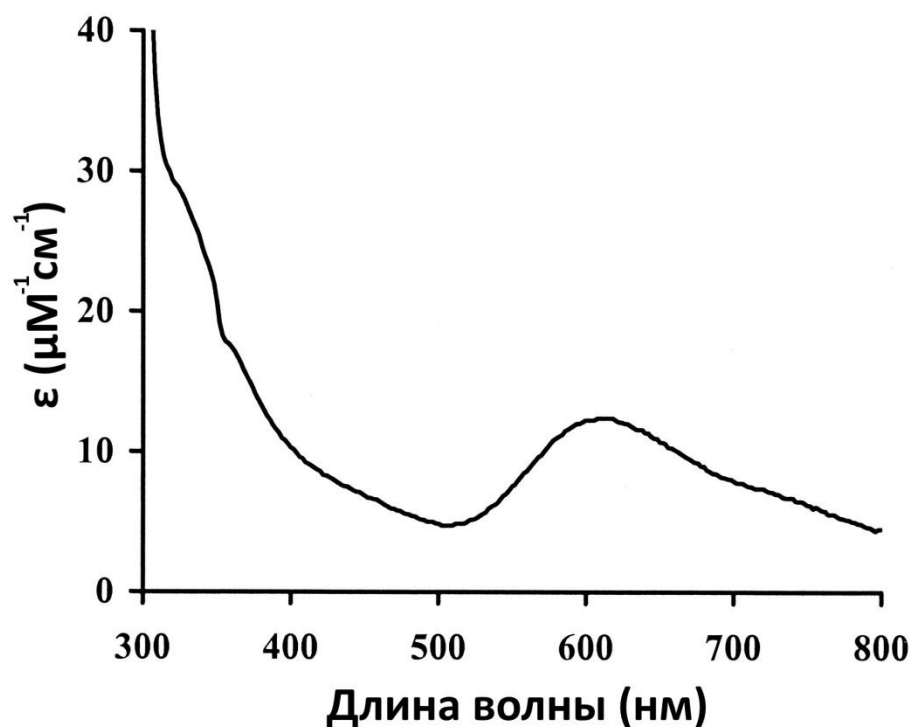


Рисунок 1. УФ-оптический спектр поглощения лакказы из *Corioloropsis rigida* [36].

Большинство лакказ являются мономерами, хотя известны лакказы, функциональной единицей которых являются димеры и тримеры [37]. Для лакказы из аскомицета *Monocillium indicum* методами гель-фильтрации и SDS-PAGE показано, что она является гетеротримером и состоит из трех субъединиц с массой 24, 56 и 72 кДа [38]. Малая субъединица этой лакказы

имеет уникальную последовательность, характерную только для малых субъединиц олигомерных лакказ. Активной формой бактериальных лакказ из метагенома, выделенного из осадка сточных вод коксовых печей [37,39], и *Streptomyces coelicolor* [40] является гомотример.

Ряд грибов экспрессирует нескольких изоформ лакказы, различающихся по своим свойствам. Так, для базидиомицета *Cerrena unicolor* описано две изоформы с молекулярной массой 57 и 64 кДа; и pI 3.7 и 3.6, соответственно [41]. Шесть из восьми изоформ лакказы, продуцируемых базидиомицетом *Pleurotus ostreatus*, имеют pI от 2.9 до 6.9 и молекулярную массу 59-61. Остальные две изоформы лакказы из *P. ostreatus* являются гетеродимерами с pI 4.1-4.3 и массой субъединиц 61 и 16-18 кДа [6].

Классификация медь-содержащих центров в лакказах

В биологических системах одной из самых распространенных редокс пар является $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ [42]. Медь-содержащие центры в белках исторически классифицируют на основании спектральных характеристик, отражающих их геометрию, электронную структуру и лигандное окружение [35]. Как геометрия, так и тип лигандов оказывают сильное влияние на свойства ионов меди. Активный центр медь-содержащих оксидаз содержит от четырех ионов меди в лакказе до шести в церулоплазмине [35]. В активном центре лакказ четыре иона меди локализованы в моноядерном T1 центре и трехъядерном T2/T3 кластере [35].

Медный центр типа 1 (T1) содержит один ион меди. Окисленный T1 центр содержит ион Cu^{2+} и характеризуется интенсивной полосой поглощения на ~610 нм ($\epsilon \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [43]. Восстановленный T1 центр содержит ион Cu^+ и не поглощает на 610 нм [44]. T1 центр лакказ характеризуется следующими параметрами ЭПР спектров: $g_{\parallel} = 2,186 - 2,3$; $A_{\parallel} = 39 - 95 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ [35]. Этот центр обнаружен в купредоксинах (малых белках-переносчиках электронов) и медь-содержащих оксидазах. T1 центр является первичным акцептором электронов от молекулы субстрата. Его основной характеристикой является редокс потенциал.

Медный центр типа 2 (T2) содержит один ион меди. T2 центр не детектируется на оптических спектрах, но обнаруживается по ЭПР сигналу, характерному для нормальных комплексов меди ($g_{\parallel} = 2,217 - 2,263$; $A_{\parallel} = 160 - 210 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$) [35]. Помимо лакказ T2 центр обнаружен в Cu/Zn-супероксиддисмутазе, галактозооксидазе, аминоксидазах.

Двухъядерный медный центр типа 3 (T3) содержит пару ионов меди, Cu_2Zn и Cu_2S [35]. Этот центр поглощает на ~330 нм ($\epsilon \sim 5000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) и не детектируется в ЭПР спектрах из-за сильного антиферромагнитного связывания пары ионов меди через общий кислородный лиганд [35]. Помимо медь-содержащих оксидаз этот центр также обнаружен в переносчике кислорода - гемоцианине и монооксигеназе - тирозиназе. Роль T3 центра состоит в связывании и активации

молекулярного кислорода. Различия в функции оксидаз, монооксигеназ и транспортных белков связаны с различиями в строении Т3 центра этих белков [35].

В лакказах Т2 и Т3 центры объединены в Т2/Т3 кластер, в котором протекает связывание и восстановление молекулы кислорода до воды [42].

1.3 Каталитические свойства лакказ. Механизм действия

1.3.1 Субстратная специфичность лакказ

Лакказа (КФ 1.10.3.2, бензолдиол : кислород оксидоредуктаза) – это фермент, катализирующий окисление фенольных субстратов с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. Лакказы имеют широкую субстратную специфичность и способны окислять *o*- и *n*- дифенолы, аминокфенолы, метоксизамещенные фенолы, бензилтиолы, полифенолы, полиамины, гидроксииндолы и ряд других ароматических соединений. Метоксизамещенные производные фенола, гваякол и 2,6-ДМФ, являются лучшими субстратами лакказ, чем простые дифенолы - гидрохинон и пирокатехин [5,6]. Цианокомплексы некоторых металлов с формулой $[\text{Me}(\text{CN})_x]^{y-}$, где Me – Fe, Mo, Ir, W, также являются субстратами для лакказ [6]. Лакказы способны окислять соединения Mn^{2+} до Mn^{3+} , в присутствии хелаторов - пирофосфата [45], малоната и оксалата [6,35,46].

Каталитические характеристики большинства лакказ определены с использованием четырех субстратов: АБТС, 2,6-ДМФ, гваякола и синингалдазина [6]. Причина этого – возможность фотометрического контроля за ходом реакции, поскольку в процессе окисления образуются окрашенные продукты, имеющие высокие коэффициенты экстинкции ϵ (гваякол $\epsilon_{470} = 26000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [47]; синингалдазин $\epsilon_{526} = 65000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [48]; 2,6-ДМФ $\epsilon_{468} = 14800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [49]; и АБТС $\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [49]). Использование синингалдазина в некоторых случаях приводит к завышенным результатам, так как он окисляется не только лакказами, но и марганец-зависимыми пероксидазами, которые могут присутствовать в препаратах лакказ в качестве примеси [5]. Поэтому при измерении лакказной активности с синингалдазином, дополнительно проверяют неспособность изучаемого препарата лакказы катализировать окисление тирозина [25], поскольку окисление тирозина является характерной реакцией Mn-зависимых пероксидаз.

К настоящему времени более 100 грибных лакказ были очищены до гомогенного состояния и определены их кинетические константы [5]. В работе [5] сделан обзор известных данных по субстратной специфичности грибных лакказ (Таблица 1). Интервал значений кинетических параметров и рН-оптимумы реакции окисления для четырех субстратов (АБТС,

2,6-ДМФ, гваякол и сингальдазин) очень широк. Видно, что величина K_m находится в диапазоне от десятков μM для АБТС до тысяч μM для гваякола и 2,6-ДМФ.

Таблица 1. Диапазон кинетических характеристик грибных лакказ [5]

Свойство	Минимум	Максимум
pH-оптимум		
АБТС	2.0	5.0
2,6-ДМФ	3.0	8.0
Гваякол	3.0	7.0
Сингальдазин	3.5	7.0
K_m (μM)		
АБТС	4	770
2,6-ДМФ	26	14720
Гваякол	4	30000
Сингальдазин	3	4307
k_{cat} (с^{-1})		
АБТС	198	350000
2,6-ДМФ	100	360000
Гваякол	90	10800
Сингальдазин	16800	28000

Каталитическая активность (k_{cat}) также покрывает диапазон в несколько порядков с^{-1} . В целом же, лакказы имеют более высокую аффинность к субстрату и каталитическую активность в реакциях с АБТС и сингальдазином, чем в реакциях с гваяколом и 2,6-ДМФ. Из других субстратов низкие величины K_m характерны для синаповой кислоты, гидрохинона, сиреновой кислоты. Высокие значения K_m характерны для таких *пара*- замещенных фенолов, как, например, ванилиновая кислота. Наихудшими субстратами как по аффинности, так и каталитической активности являются *мета*-замещенные фенолы [5].

Все лакказы имеют сходную аффинность по второму субстрату – молекулярному кислороду. Для лакказ из *Trametes villosa*, *Rhizoctonia solani*, *Myceliophthora thermophila*, *Scytalidium thermophilum* и *Coprinus cinereus* показано, что вне зависимости от используемого первого субстрата, АБТС или метилсирингалдазина, $K_M(O_2)$ находится в интервале 20-50 μM [50].

1.3.2 pH-зависимость каталитической активности лакказ

Лакказы проявляют активность в широком диапазоне pH. Пример pH-зависимости скорости окисления фенольных и нефенольных субстратов грибной лакказой приведен на рисунке Рисунок 2. Положение pH-оптимума, при котором достигается максимальная скорость реакции, зависит от лакказы и природы используемого субстрата. pH-оптимумы для грибных лакказ расположены в кислой и нейтральной области [5,6]. Для лакказ из архей, бактерий, растений и насекомых pH-оптимумы расположены в нейтральной и щелочной области [5,6,11,19,26,51,52]. pH-Оптимум реакции окисления сирингалдазина грибными лакказами из *Pycnoporus sanguineus* CS-2, *Marasmius quercophilus* и архейной лакказой из *H. volcanii* равен соответственно 4,6, 6,3 [53,54] и 8,5 [11]. Недавно открытая и охарактеризованная лакказа из экстремофильной бактерии *Thioalkalivibrio* sp ALRh имеет pH-оптимум окисления 2,6-ДМФ выше 9 [19]. Авторы отмечают, что точное определение pH-оптимума при щелочных значениях pH затруднено неферментативным разложением фенольного субстрата. Предполагается, что подобные различия в величине оптимального pH реакции обусловлены различиями в выполняемых этими лакказами функциях *in vivo* [26]. В этой же работе отмечается, что pH-оптимум катализируемой реакции зависит от используемого субстрата и, как правило, ниже для нефенольных субстратов, чем для фенольных. Например, для лакказы из гриба *Polyporus anisoporus* pH оптимум равен 3 при использовании АБТС и 5 при использовании 2,6-ДМФ [55].

Зависимость K_M и k_{cat} от pH исследована для лакказ из грибов *T. villosa* и *M. thermophila* [56]. Исследование проводили для фенольных (сирингальдегид, ацетосирингон, метилсирингат) и нефенольных (АБТС и $K_4[Fe(CN)_6]$) субстратов. При окислении лакказой из *T. villosa* фенольные субстраты показали наибольшую величину k_{cat} при pH 5. В случае *M. thermophila* максимум k_{cat} достигался при pH 7. Величина K_M для фенольных субстратов либо слабо зависела от pH (*M. thermophila*), либо снижалась с ростом pH (*T. villosa*). При окислении нефенольных субстратов обеими лакказами наблюдается устойчивое снижение величины k_{cat} с ростом pH. Явной зависимости K_M от pH при окислении нефенольных субстратов лакказой из *T. villosa* не наблюдается. В случае *M. thermophila* наблюдается небольшое снижение K_M с ростом pH.

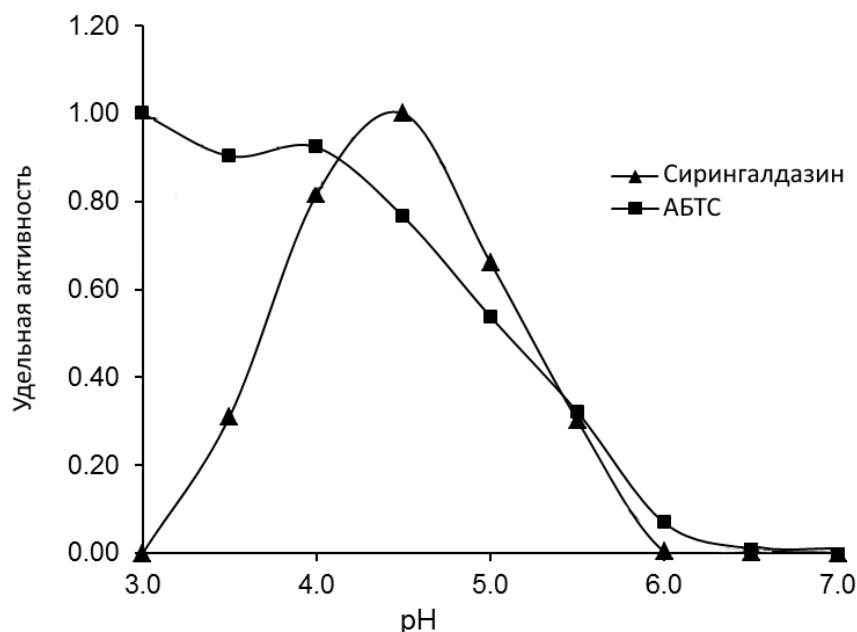


Рисунок 2. pH-зависимость каталитической активности грибной лакказы из *Ruynoporus sanguineus* CS-2 в окислении фенольного субстрата сиригальдазина и нефенольного субстрата АБТС [53].

Кривая pH-зависимости скорости окисления фенольных субстратов имеет форму колокола [6]. Форма кривой в основном обусловлена влиянием двух факторов. Во-первых, с ростом pH растет скорость ферментативной реакции, это связывается со снижением потенциала ионизации фенольных соединений за счет образования депротонированной формы фенольного соединения [57]. Во-вторых, уменьшение активности при нейтральных и щелочных значениях pH связано с ингибированием T2/T3 кластера лакказ гидроксид ионами [35,56]. Поскольку редокс потенциал нефенольных субстратов слабо зависит от pH, кривая pH-зависимости скорости окисления нефенольных субстратов имеет сигмоидную форму [5,58].

Мутации в активном центре оказывают влияние на положения оптимума pH [56,59]. Исходя из структуры комплекса лакказы из *T. versicolor* с 2,5-ксилидином [31], были получены мутанты этой лакказы по остатку Asp206, образующему водородную связь с 2,5-ксилидином: D206N, D206E, D206A [59]. Замена D206N привела к наиболее значительному смещению pH-оптимума на 1.4 единицы в область нейтральных pH. При этом каталитическая эффективность этого мутанта упала на 2 порядка. В работе [60] изучалось влияние мутаций в трипептиде, соединяющим консервативный мотив лакказ His-Cys-Hys с аксиальным остатком T1 центра на каталитические свойства фермента. pH-Оптимум фенол-оксидазной активности тройных мутантов лакказ из *R. solanii* (L466V, E467S, A468G) и *M. thermophila* (V509L, S510E, G511A) сместился соответственно на одну единицу ниже и выше относительно pH-оптимума нативных ферментов [60]. Полученный эффект авторы связали с влиянием мутаций на связывание

субстрата с лакказой и на внутримолекулярный электронный перенос.

1.3.3 Ингибиторы лакказ

Активность большинства лакказ ингибируется в присутствии азид- (N_3^-), цианид- (CN^-), галогенид- (F^- , Cl^- , Br^-) и гидроксил- (OH^-) ионов [6]. Для некоторых лакказ описано снижение активности в присутствии ионов Hg^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} ; цистеина, тиомочевины и дитиотреитола [5].

Ингибирование ионами CN^- , N_3^- происходит за счет их связывания в Т3 центре [18]. Исследование каталитических свойств лакказ показало, что в этом случае ингибирование является конкурентным по кислороду [61]. Методом рентгеноструктурного анализа установлено строение комплекса лакказ с азидом [62]. В этой работе показано, что азид связывается между парой ионов меди Т3 центра.

Значения I_{50} галогенид-ионов находятся в диапазоне от 0.02 до 1600 мМ ($I_{50}(\text{Br}^-) > I_{50}(\text{Cl}^-) > I_{50}(\text{F}^-)$ [56,58]). Фториды являются наиболее эффективными ингибиторами лакказ. Величина $I_{50}(\text{F}^-)$ находится в микромолярном диапазоне концентраций и слабо зависит от организма-источника лакказы. Величина $I_{50}(\text{Cl}^-)$ лежит в широком диапазоне и зависит от организма, из которого был выделен фермент. Для лакказ из базидиомицетов эта величина обычно не превышает 100 мМ, например, для лакказы из базидиомицета *T. villosa* $I_{50}(\text{Cl}^-)$ составляет 40 мМ [58]. В той же работе показано, что для лакказы из аскомицета *M. thermophila* эта величина в аналогичных условиях на порядок выше и составляет 600 мМ. Бромид-ион является наиболее слабым среди галогенид ионов ингибитором лакказ, $I_{50}(\text{Br}^-)$ находится в интервале 200-1600 мМ. Йодид-ион не является ингибитором лакказ, он взаимодействует с Т1 центром и является субстратом лакказ, что было показано на примере лакказы из *Trametes multicolor* [63]. В работе [58] высказано предположение, что такие различия в величинах I_{50} связаны с размером канала, ведущего к Т2/Т3 кластеру и размерами самих галогенид-ионов. Величина $I_{50}(\text{F}^-)$ растет с ростом рН [56]. Показано, что ионы F^- и OH^- снижают k_{cat} стадии восстановления O_2 , однако не оказывают влияния на связывание молекулы кислорода между парой ионов меди Т3 (величина $K_{\text{M}}(\text{O}_2)$ постоянна) и k_{cat} стадии окисления субстрата [50]. То есть ингибирование OH^- и галогенид-ионами является неконкурентным по кислороду. В ЭПР-спектре иона меди Т2 наблюдаются изменения после добавления ионов F^- к препарату лакказы [64]. Был сделан вывод, что галогенид-ионы связываются с ионом меди Т2. Установлена структура комплекса лакказы из *Melanocaprus albomyces* с ионом Cl^- с разрешением 1.2 Å [65]. В этой структуре ион Cl^- замещает консервативную молекулу воды – лиганд иона меди Т2.

Необратимыми ингибиторами лакказ являются соли Hg^{2+} и различные хелаторы меди. Ингибирование ионами ртути связано с замещением иона меди Т1 центра на ион ртути (Hg^{2+}).

производное или T1Hg форма лакказы), что приводит к потере редокс активности T1 центра [35]. Удаление ионов меди активного центра хелатирующими агентами, такими как ЭДТА (лиганд Cu^{2+}), диметилглиоксим или батocupроин (лиганды Cu^+) также приводит к потере активности за счет деплецирования (depletion) T2/T3 кластера по иону меди T2 (T2Д форма) [35,66].

Ранее к ингибиторам лакказ ошибочно причисляли различные тиоловые соединения, такие как дитиотреитол, тиогликолевая кислота и цистеин. Было показано [67], что эти соединения не являются истинными ингибиторами, а ранее описанный эффект ингибирования связан с восстановлением окисленного субстрата тиоловым соединением. Измерение потребления кислорода до и после добавления ингибитора показало, что добавление тиоловых соединений не ингибирует лакказную активность. Более того, добавление диэтилтиокарбамата повышает скорость потребления кислорода (Таблица 2). Из данных таблицы видно, что из всех протестированных соединений только азид являлся истинным ингибитором лакказной активности.

Таблица 2. Скорость потребления кислорода лакказой из *T. hirsuta* (0.017 ед мл^{-1}) в реакции окисления АБТС (5 мМ) в присутствии ингибиторов (1 мМ) [67]

Соединение	Скорость потребления кислорода ($\text{нмоль O}_2 \text{ мин}^{-1}$)	
	Перед добавлением соединения	После добавления соединения
Цистеин	9.45 ± 0.57	8.39 ± 0.56
Дитиотреитол	9.34 ± 0.62	9.94 ± 1.62
Диэтилтиокарбамат	10.45 ± 0.29	29.08 ± 6.12
Тиогликолевая кислота	10.84 ± 1.05	11.22 ± 1.56
NaN_3	9.19 ± 0.63	0.00 ± 0.15

1.3.4 Механизм действия лакказ

Катализируемая лакказами реакция протекает по механизму пинг-понг би-би через последовательное одноэлектронное окисление четырех молекул субстрата до соответствующих окисленных форм с сопутствующим восстановлением молекулы кислорода до воды (Рисунок 3). Связывание донора и акцептора электронов происходит в разных областях молекулы лакказы. Сайт связывания окисляемого субстрата расположен около T1 центра. Связывание второго субстрата, молекулы кислорода, происходит в T2/T3 кластере. Катализируемая реакция

проходит через следующие стадии:

1. Восстановление T1 центра субстратом
2. Внутримолекулярный перенос электрона с T1 на T2/T3 кластер
3. Восстановление молекулы кислорода до воды в T2/T3 кластере

Показано, что состав продуктов окисления может различаться в зависимости от окислительно-восстановительных свойств фермента (см например [68]). На основании сравнительного изучения окисления несколькими лакказами ряда фенолов выдвинуто предположение, что лимитирующей стадией процесса является перенос электрона с молекулы субстрата на T1 центр [58].

Механизму восстановления молекулы кислорода до воды в T2/T3 кластере посвящен подробный обзор [42]. С использованием различных спектральных методов (оптическая-УФ, ЭПР и магнитная спектроскопии) и рентгеноструктурного анализа установлено наличие у лакказ «отдыхающей» формы, пероксидного интермедиата, нативного интермедиата и полностью восстановленной формы [42]. Пространственное строение отдельных форм и интермедиатов установлено методом рентгеноструктурного анализа для медь-содержащей оксидазы CueO, лакказ из *M. albomyces* и *Lentinus tigrinus* [69–72]. На основании этой информации был предложен механизм реакции (Рисунок 4) [73]. В «отдыхающей» форме фермента все ионы меди окислены. Окисление четырех молекул субстрата полностью восстанавливает все медные центры. Восстановленная форма лакказы связывает молекулу кислорода между парой ионов меди T3 с образованием пероксидного интермедиата. Образование двух молекул воды при дальнейшем переходе от пероксидного интермедиата к нативному включает в себя слабо исследованные процессы переноса электронов и протонов.

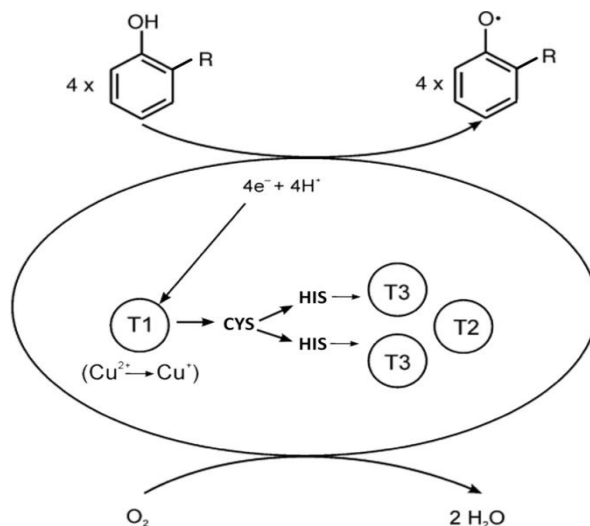
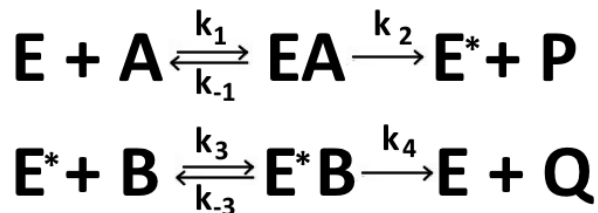


Рисунок 3. Верхняя панель: схема Келланда для механизма пинг-понг. E – окисленная форма фермента, E* - восстановленная форма фермента, A и B – последовательно связывающиеся субстраты, P и Q – продукты реакции. (k) – константы скоростей различных стадий, а (Km) - константы Михаэлиса различных стадий. Нижняя панель: Каталитический цикл лакказ из статьи [6].

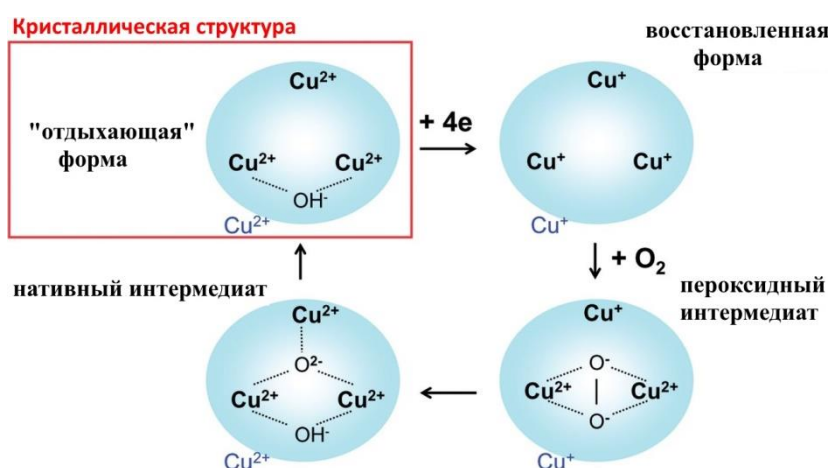


Рисунок 4. Предполагаемый механизм восстановления молекулы кислорода до воды в T2/T3 кластере [73]

1.3.5 Окислительно-восстановительный потенциал медь-содержащих центров лакказ

Окислительно-восстановительный (редокс) потенциал T1 центра (E_{T1}) является важнейшей характеристикой лакказ, поскольку именно он определяет спектр окисляемых субстратов и скорость протекания реакции. Сравнение скорости окисления лакказами ряда фенольных субстратов с различными заместителями показало, что $\lg(k_{cat}/K_M)$ прямо пропорционален разности редокс потенциалов T1 центра и субстрата [58].

Измеренные значения E_{T1} лакказ изменяются в широких пределах от 430 мВ в лакказе из *R. vernicifera* [74] до 740-790 мВ в лакказах рода *Trametes* [5,75] (Таблица 3). Если включить в рассмотрение другие медь-содержащие белки с T1 центром, то диапазон расширится от 240 мВ в нитритредуктазе до 1000 мВ у церулоплазмينا [76]. В соответствии с величиной редокс потенциала лакказы делятся на низко- ($E_{T1} < 450$ мВ), средне- (720 мВ $> E_{T1} > 450$ мВ) и высокопотенциальные ($E_{T1} > 720$ мВ) [6].

Величина E_{T1} зависит от строения T1 центра [77,78] и условий измерения: pH среды [56], типа и концентрации используемого редокс медиатора [74]. Следует отметить, что редокс потенциалы лакказ измерены в различных условиях разными исследователями, и сравнивать опубликованные величины нужно с осторожностью, так как даже для одного фермента данные могут различаться. Так, в двух работах для лакказы из *B. subtilis* в одинаковых условиях измерения были получены различающиеся величины для E_{T1} 455 и 525 мВ [77,78]. Для лакказы из *R. vernicifera* показана зависимость редокс потенциала медных центров от концентрации редокс-медиатора, использовавшегося для титрования T1 центра [79]. pH-зависимость редокс потенциала T1 центра была изучена для лакказ из *T. hirsuta*, *R. solanii* и *M. thermophila* [56]. В диапазоне pH 2-11 изменение редокс потенциала составило ~100 мВ. Для лакказ и билирубиноксидаз описан такой эффект как «щелочной переход»: снижение редокс потенциала при росте pH выше 7 [76]. Изменению редокс потенциала сопутствует гипсохромный сдвиг максимума поглощения T1 центра на ~10 нм [56,76]. Предполагается, что этот эффект связан с протонированием остатков His – лигандов иона меди или боковых заместителей кислотных остатков, связанных с лигандами T1 центра водородными связями [80].

Редокс потенциалы ионов меди T2/T3 кластера измерены к настоящему моменту только для трех лакказ (

Таблица 4). T2 центр не имеет выраженных пиков поглощения на УФ-оптических спектрах и для измерения его редокс потенциала требуется использование ЭПР-спектроскопии. Для билирубиноксидазы из *Myrothecium verrucaria* и лакказы из *T. hirsuta* величина редокс потенциала иона меди T2 находится в диапазоне 360-400 мВ [74,81,82]. Редокс потенциал пары

ионов меди ТЗ находится в интервале от 344 мВ для аскорбатоксидазы из *Cucurbita pepo medullosa* [83] до 782 мВ для лакказы из *Trametes versicolor* [74]. Для лакказы из *T. versicolor* показано, что присутствие избыточных по отношению к лакказе количеств медиаторов с формулой $[Me(CN)_n]^{x-}$ или избытка F^- приводит к снижению редокс потенциала пары ионов ТЗ центра с 782 до 570 мВ [74].

Таблица 3. Потенциалы Т1 центра ряда лакказ относительно стандартного водородного электрода [6]

Организм-продуцент	Редокс-потенциал Т1 (мВ)	Ссылка
Высокопотенциальные		
<i>Trametes trogii</i>	790	[84]
<i>Trametes ochracea</i>	790	[85]
<i>Trametes hirsuta</i>	780	[85]
<i>Trametes villosa</i>	780	[86]
<i>Trametes versicolor</i>	780	[74]
<i>Cerrena maxima</i>	750	[87]
<i>Trametes pubescens</i> LAC1	746	[88]
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXC	740	[84]
<i>Trametes pubescens</i> LAC1	738	[88]
<i>Basidiomycete</i> C30 Lac1	730	[89]
<i>Rigidoporus lignosus</i> B	730	[84]
Среднепотенциальные		
<i>Rhizoctonia solani</i>	710	[86]
<i>Rigidoporus lignosus</i> D	700	[84]
<i>Pleurotus ostreatus</i> POXA1b	650	[84]
<i>Basidiomycete</i> C30 Lac2	560	[89]
<i>Coprinus cinereus</i>	550	[90]
<i>Trichophyton rubrum</i>	540	[91]
<i>Basidiomycete</i> C30 Lac	530	[92]
<i>Scytalidium thermophilum</i>	510	[93]
<i>Myceliophthora thermophila</i>	470	[86]
Низкопотенциальные		
<i>Rhus vernicifera</i>	430	[74]

Таблица 4. Редокс потенциалы в T2/T3 кластере лакказ

	T2	T3	Ссылки
<i>T. hirsuta</i>	400	-	[81]
<i>R. vernicifera</i>	390	483	[79]
<i>T. versicolor</i>	-	782	[74]

1.4 Структура лакказ

1.4.1 Первичная структура лакказ

Идентичность аминокислотных последовательностей лакказ из растений, грибов и бактерий невысока. Так, идентичность последовательностей лакказ из бактерии *B. subtilis*, базидиомицета *T. hirsuta*, аскомицета *M. albomyces* и высшего растения *R. vernicifera* находится в интервале от 21 % (пара бактерия-высшее растение) до 32% (пара базидиомицет-аскомицет). Среди структурно охарактеризованных лакказ наименьшую длину в 279 а.к. остатков имеет лакказа, выделенная из бактерии *Amiclatopsis sp.* (штамм ATCC 39116 / 75iv2) [49], а наибольшую, в 623 остатка, имеет лакказа из *M. albomyces* [65,94].

В аминокислотной последовательности лакказ содержатся 10 консервативных гистидинов и один цистеин, организованных в четыре высококонсервативных медь-связывающих мотива (Таблица 5). В исследовании [95] были проанализированы аминокислотные последовательности 64 грибных и 40 растительных лакказ. На основании выравнивания аминокислотных последовательностей медь-связывающие мотивы были расширены до четырех непрерывных участков длиной в 8-24 аминокислотных остатка. Некоторыми авторами было выдвинуто предположение, что такая консервативность медь-связывающих мотивов отражает единый механизм, по которому протекает катализируемая реакция [96].

В первичной структуре лакказ из аскомицетов на С-конце имеется дополнительный фрагмент из 8 остатков, который отсутствует в лакказах из других организмов [97].

Таблица 5. Сравнение аминокислотных последовательностей четырех консервативных участков лакказ, содержащих лиганды ионов меди. Адаптировано из [6].

Организм	Код GenBank	Последовательность консервативных участков*			
Ab	AAA17035	80SIHWHGF ⁸⁶	125WYHSHLS ¹³¹	415GAHPFHLHGH ⁴²⁴	466WFLHCHIDWHLEA ⁴⁷⁸
Ap	AAB09228	79TIHWHGV ⁸⁵	123WWHAHSD ¹²⁹	560QNHMPMHLHGF ⁵⁶⁹	521WFLHCHFERHTTW ⁵³³
Cc	AAD30964	80SIHWHGL ⁸⁶	125WYHSHFG ¹³¹	412GPHPFHLHGH ⁴²¹	466WFFHCHIEFHLMN ⁴⁷⁸
Lt	AAB17191	80TVHWHGI ⁸⁶	125FWHAHFS ¹³¹	469ESHLLHLHGY ⁴⁷⁸	530WFMHCHFDVHLSW ⁵⁴²
Ma	CAE00180	141SIHWHGI ¹⁴⁷	186WYHSHFS ¹⁹²	479LPHPMHLHGH ⁴⁸⁸	549WLFHCHIAWHVSG ⁵⁶¹
Nt	AAC49536	78SIHWHGI ⁸⁴	123FWHAHIL ¹²⁹	455ENHPIHLHGF ⁴⁶⁴	517WFMHCHLEIHTTW ⁵²⁹
Pc	AAC39469	83SIHWHGF ⁸⁹	128WYHSHLS ¹³⁴	414TPHPFHLHGH ⁴²³	468WFLHCHIDFHLEA ⁴⁸¹
PM1	CAA78144	62SIHWHGF ⁶⁸	106WYHSHLS ¹¹²	391FPHPFHLHGH ⁴⁰⁰	446WFLHCHIDFHLEA ⁴⁵⁸
Po	CAA84357	96SIHWHGF ¹⁰²	151WYHSHLS ¹⁵⁷	425GPHPFHLHGH ⁴³⁴	480WFLHCHIDWHLEI ⁴⁹²
Rv	BAB63411	57TIHWHGV ⁶³	102WWHAHSD ¹⁰⁸	431TSHPMHLHGF ⁴⁴⁰	491WFLHCHFERHTTE ⁵⁰³
Th	AAA33103	83SIHWHGF ⁸⁹	128WYHSHLS ¹³⁴	514APHPFHLHGH ⁵²³	470WFLHCHIDFHLEA ⁴⁸²
Tl	AAC41686	83SIHWHGF ⁸⁹	128WYHSHLS ¹³⁴	413APHPFHLHGH ⁴²²	470WFLHCHIDFHLEA ⁴⁸²
Tt	CAC13040	83SIHWHGF ⁸⁹	128WYHSHLS ¹³⁴	413FPHPFHLHGH ⁴²²	467WFLHCHIDFHLEA ⁴⁷⁹
Tv	AAC49828	82SIHWHGF ⁸⁸	127WYHSHLS ¹³³	413APHPFHLHGH ⁴²²	469WFLHCHIDFHLEA ⁴⁸¹

Примечание: Остатки His и Cys, координирующие ионы меди T1 центра и T2/T3 кластера, покрашены голубым и серым цветом, соответственно. Ab, *A. bisporus*; Ap, *A. pseudoplatanus*; Cc, *C. cinereus*; Lt, *L. tulipifera*; Ma, *M. albomyces*; Nt, *N. tabacum*; Pc, *P. cinnabarinus*; PM1, *Basidiomycete* spp.; Po, *P. ostreatus*; Rv, *R. vernicifera*; Th, *T. hirsuta*; Tl, *T. villosa*; Tt, *T. trogii*; Tv, *T. versicolor*

1.4.2 Исследование лакказ методом рентгеноструктурного анализа

Все трехмерные структуры лакказ решены методом рентгеноструктурного анализа. Накопленная к настоящему времени информация по трехмерным структурам лакказ суммирована в обзоре [97]. Первой решенной структурой была структура лакказы из *Coprinus cinereus* [98]. В структуре отсутствовал ион меди T2 центра, таким образом решенная структура соответствовала неактивной форме фермента. Полученный результат авторы объясняли потерей меди при дегликозилировании фермента перед кристаллизацией. В 2002 году были решены структуры активных форм грибных лакказ из базидиомицета *T. versicolor* [75] и аскомицета *M. albomyces* [94] и структура комплекса лакказы из *T. versicolor* с ариламином [31]. Все эти структуры содержали полный набор ионов меди в активном центре, то есть

соответствовали каталитически активным, нативным формам фермента. Вслед за этим были получены структуры бактериальных лакказ из *B. subtilis* [52] и малой лакказы mgLac из метагенома осадка угольных заводов [37].

Рентгеноструктурный анализ, кроме изучения строения нативных форм лакказ, использовался для изучения влияния мутаций на структуру, процесса восстановления активного центра и строения комплексов лакказ с субстратами. Для лакказ решены:

1. структуры нативных и рекомбинантных форм
2. структуры мутантов, содержащих замены в области активного центра
3. структуры лакказ с различной поглощенной дозой рентгеновского излучения для изучения процесса восстановления медных центров
4. структуры различных производных лакказ, в том числе и T2Д формы

К настоящему моменту (2016 год) в Банк белковых структур (PDB) депонировано более 100 структур лакказ с разрешением от 0.95 до 3.44 Å. Коды PDB для структур лакказ приведены в таблице Таблица 6. Большинство структурно охарактеризованных лакказ были выделены из грибов-базидиомицетов и бактерий. Для лакказ из грибов-аскомицетов доступны структуры из двух организмов: *M. albomyces* [94] и *T. arenaria* [30]. Структура лакказ, выделенных из растений и насекомых, до настоящего времени остается неизвестной.

Таблица 6. Лакказы, структуры которых представлены в PDB [97]

Организм	Свободная форма	Структуры мутантных форм	Структуры комплексов с лигандами около T1 центра	Структуры с различными лигандами в T2/T3 кластере	Производные
Трехдоменные лакказы					
<i>Bacillus subtilis</i>	1GSK	2WSD, 4AKO, 4AKP, 4AKQ, 4A66, 4A67, 4A68	1OF0, 1W6W, 1W8E, 3ZDW	1W6L, 2BHF, 2X87, 2X88	
<i>Botrytis aclada</i>	3SQR	3V9E			
<i>Cerrena maxima</i>	2H5U, 3DIV				
<i>Coprinus cinereus</i>	1A65, 1HFU				
<i>Coriolopsis caperata</i>	4JHV				4JHU
<i>Coriolopsis gallica</i>				4A2D, 4A2E, 4A2F, 4A2G, 4A2H	
<i>Corolus zonatus</i>	2HZH				
<i>Lentinus tigrinus</i>	2QT6				
<i>Melanocaprus albomyces</i>	1GW0, 2Q9O	3DKH	3FU7, 3FU8, 3FU9	2IH8, 2IH9	3QPK
<i>Pycnoporus cinnabaris</i>	2XYB				
<i>Rigidoporus lignosis</i>	1V10				
<i>Steccherinum ochraceus</i>	3T6V			3T6W, 3T6X, 3T6Z, 3T71	

<i>Thielavia arenaria</i>	3PPS				
<i>Thermus thermophilus</i>	2XU9			2YAE,2YAF, 2YAH, 2YAM, 2YAO, 2YAP, 2YAQ, 2YAR	2XVB,2XUW, 4AI7
<i>Trametes hirsuta</i>	3PXL, 3FPX			3V9C	
<i>Trametes trogii</i>	2HRH		2HRG		
<i>Trametes versicolor</i>	1GYC		1KYA		
<i>Trametes sp AH28-2</i>	3KW7				
Двухдоменные лакказы					
<i>Amycolatopsis sp.75iv2</i>	3T9W		3TA4		
<i>Nitrosomona europaea</i>	3G5W				
<i>Streptomyces coelicolor</i>	3CG8	4GXF, 4GY4			3KW8
<i>Streptomyces sviveus</i>	4M3H				
<i>Streptomyces lividans</i>	4GYB			4NB7, 4NAJ	
<i>Streptomyces viridoporus</i>	3TAS, 3TBB		3TBC		
<i>Streptomyces viridochromogenes</i>	4N8U				
Метагеном	2ZWN			4E9V, 4E9W, 4E9X, 4E9Y	

1.4.3 Третичная структура лакказ. Доменная организация

Мономеры всех структурно охарактеризованных лакказ состоят из двух или трех доменов (I, II, III), преимущественно состоящих из β -листов (Рисунок 5) (см. например [52,99,100]).

Также в структуре лакказ содержится небольшое число 3_{10} - и α -спиралей (Рисунок 5). Каждый домен содержит 100-200 аминокислотных остатков и имеет сходную β -сандвичевую укладку, впервые обнаруженную в пластоцианине [101]. Подобная укладка называется купредоксин-подобной [97]. Все структурно охарактеризованные грибные лакказы относятся к трехдоменным лакказам. Отдельную группу образуют бактериальные двухдоменные лакказы [37]. Мономеры этих лакказ состоят из двух β -сандвичевых доменов. Кроме двухдоменных лакказ из бактерий выделены и охарактеризованы трехдоменные лакказы [52].

Функциональной единицей двухдоменных лакказ является гомотример [37]. Укладка полипептидной цепи и расположение субъединиц такого тримера повторяет строение другой медь-содержащей оксидоредуктазы, нитритредуктазы. Двухдоменные лакказы обнаружены при изучении лакказ из бактерий и метагенома сточных вод угольных заводов [37,40]. Предполагается, что лакказы и остальные белки, содержащие купредоксин-подобные домены, имеют общего предка и образовались в результате мультипликации гена медь-содержащего белка [43]. В работе [37] выдвинуто предположение, что двухдоменные лакказы являются связующим эволюционным звеном между трехдоменными лакказами, нитритредуктазами и однодоменными белками-переносчиками электронов.

Трехдоменные лакказы - это глобулярные белки с размерами порядка $70 \times 50 \times 50$ Å [31]. Укладка β -листов купредоксин-подобных доменов лакказ подробно описана на примере лакказы из *T. hirsuta* (Рисунок 6) [100]. В лакказе из *T. hirsuta* домены I (Ala1-Asp128), II (Pro129-Leu308) и III (Val309-Gln499) состоят из двух β -листов, один из которых содержит антипараллельные β -тяжи, а второй лист относится к смешанному типу, то есть содержит как антипараллельно, так и параллельно уложенные β -тяжи.

С-концевая α -спираль длиной в 12 остатков Gln481-Ala493 является характерной особенностью грибных лакказ. В структуре бактериальных трехдоменных лакказ из *B. subtilis* [52] и *T. thermophilus* [102] эта спираль отсутствует. Дисульфидная связь Cys85-Cys488 связывает эту α -спираль из домена III с доменом I и стабилизирует её положение. Другая дисульфидная связь Cys117-Cys205 связывает домены I и II [100]. Аскомицетные лакказы содержат дополнительный дисульфидный мост внутри домена I [94].

AVGPVADLTITDAAVSPDGF SRQAVVNGVTPGPLVAGNIGDRFQLNVIDNLTNHTMLKS
 TSIHWHGFFQHGTNWADGPAFINQCPISPGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGL
 RGPVVYDPNDPHASRYDVDNDDTVITLADWYHTAAKLGPRFPGGADATLINGKGRAPSD
 SVAELSVIKVTKGKRYRFRLLVSLSCNPNTHTFSIDGHNLTIIIEVDSVNSQPLEVDSIQIFA
 AQRYSFVLDANQAVDNYWIRANPNFGNVGFDGGINSAILRYDGAPAVEPTTNQTTSVKPL
 NEVDLHPLVSTPVPGPSSSGGVDKAINMAFNFNNGSNFFINGASFVPPTVPVLLQILSGAQ
 TAQDLLPSGSVYVLPNASIEISFPATAAAPGAPHPFHLHGHTFAVVR SAGSTVYNYDNP
 IFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFDTNPGPWFLHCHIDFHLEGGFAVVMAEDTPDVKAVNPV
 PQAWS DLCPTYDALDPNDQ

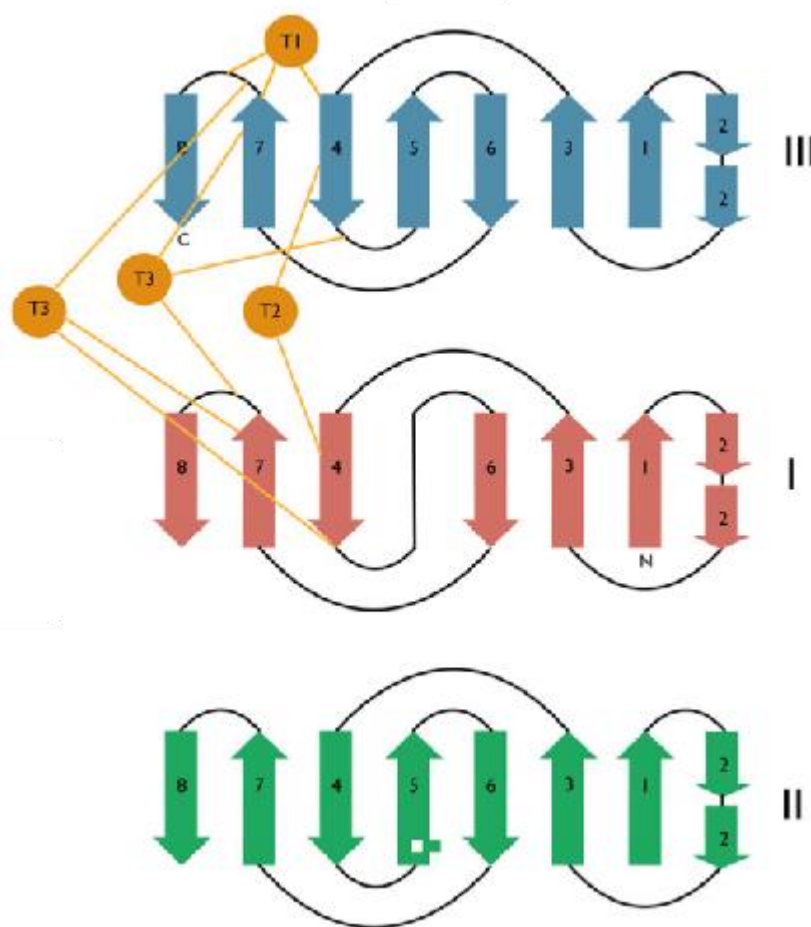


Рисунок 5. Верхняя панель: вторичная структура лакказы из *T. hirsuta* [100] α α-спираль; β β Z_{10} -спираль; β β β-лист. Нижняя панель: топологическая схема купредоксин-подобных доменов лакказы из *M. albomyces* [97]. Указано расположение остатков, координирующих ионы меди.



Рисунок 6. Структура лакказы из *T. hirsuta* [100]. Домены I, II и III окрашены в фиолетовый, зеленый и синий цвета, соответственно. Ионы меди показаны сферами оранжевого цвета. Атомы серы цистеинов показаны сферами желтого цвета. Углеводные остатки показаны стержневой моделью красного цвета.

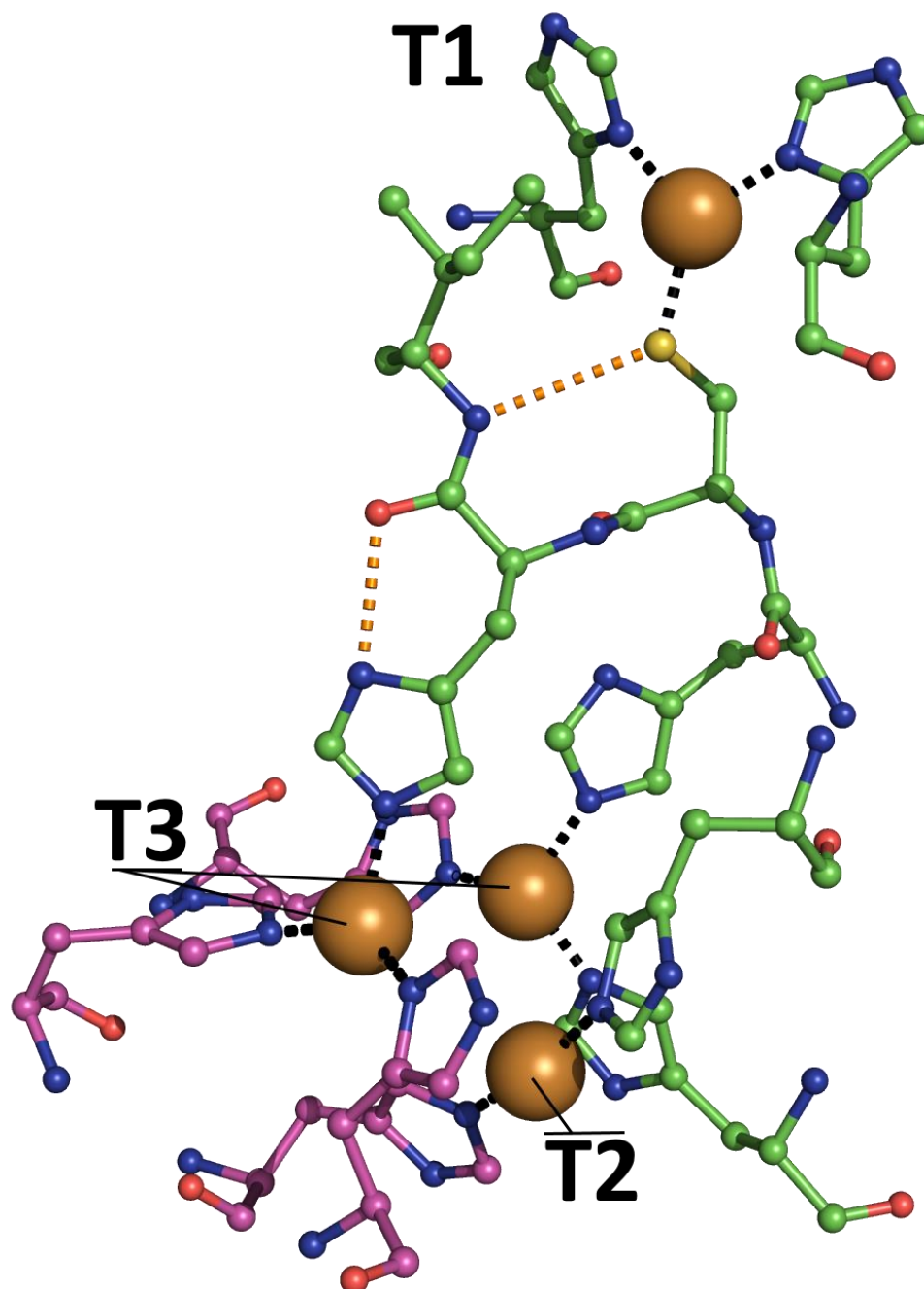


Рисунок 7. Связь между T1 центром и T2/T3 кластером в структуре лакказы из *M. albomyces* [65]. Ионы меди показаны сферами оранжевого цвета. Аминокислотные остатки показаны шаростержневой моделью фиолетового (домен I) и зеленого (домен III) цветов. Координационные связи ионов меди показаны штриховыми линиями черного цвета. Водородные связи, входящие в предполагаемую цепь передачи электронов, показаны штриховыми линиями оранжевого цвета. Не показан кислородный лиганд между ионами меди T3.

Активный центр лакказ состоит из центра T1, расположенного в домене III, и кластера

T2/T3, расположенного в полости между доменами I и III (Рисунок 7). Лигандами T2/T3 кластера являются остатки гистидина из доменов I и III. Расстояние между центрами T1 и T2/T3 составляет около 12 Å. В ходе реакции электрон передается от T1 центра в T2/T3 кластер. Механизм переноса электрона от T1 центра в T2/T3 кластер точно не установлен [103]. Можно предполагать, что наиболее вероятным путем переноса электрона от T1 центра к T2/T3 кластеру является цепь из двух водородных и пептидной связей, соединяющих T1 центр с остатком гистидина, координирующим ион меди T3 (Рисунок 7).

В структуре лакказ два канала ведут от поверхности белка в направлении ионов меди T2 и T3. Каналы сформированы аминокислотными остатками из доменов I и III. В лакказах из аскомицетов канал, ведущий к T3 центру, заблокирован С-концевым тетрапептидом [94].

1.4.4 Четвертичная структура лакказ.

Структурно охарактеризованные трехдоменные лакказы из базидиомицетов и бактерий являются мономерными белками [6]. Двухдоменные бактериальные лакказы образуют функциональные гомотримеры [37]. Известно, что лакказы из грибов-аскомицетов [30,94] и насекомых [16] могут образовывать гомодимеры. Эти гомодимеры были обнаружены в структурах лакказ из грибов *M. albomyces* и *T. arenaria* (Рисунок 8) [30,94].

Лакказы из аскомицетов *M. albomyces* (MaL) и *T. arenaria* (TaL) образуют димер, связанный некристаллографической поворотной осью второго порядка (Рисунок 8) [30,94], при этом сайты связывания фенольного субстрата обеих субъединиц оказываются внутри димерного контакта. Анализ контактов с использованием программы PISA [104] дает следующие параметры междимерного интерфейса для MaL: $S=797 \text{ Å}^2$, $\Delta G = -12 \text{ ккал моль}^{-1}$, для TaL: $S=677 \text{ Å}^2$, $\Delta G = -11 \text{ ккал моль}^{-1}$, где S – площадь межузельного интерфейса и ΔG – свободная энергия образования комплекса.

Взаимодействие субъединиц осуществляется в основном за счет гидрофобных взаимодействий и шести водородных связей. В MaL одним из ключевых остатков, участвующих в образовании димерного контакта, является Phe427, расположенный на краю субстрат-связывающего кармана [94]. В TaL взаимодействие обеспечивается остатками Phe427 и Val428. В TaL петля, содержащая эти остатки, длиннее чем в MaL, она создает стерические затруднения для плотной упаковки.

Лакказы из аскомицетов были закристаллизованы в трех различных пространственных группах симметрии. Кристаллы MaL имели группу P1 [94] и C2 [65], а кристаллы TaL - P2₁ [30]. Во всех случаях упаковка димера происходит сходным образом за счет контакта субстрат-связывающих областей. Исходя из сходства упаковки, выдвинуто предположение о

функциональной значимости димеризации лакказ из аскомицетов *in vivo* [30].

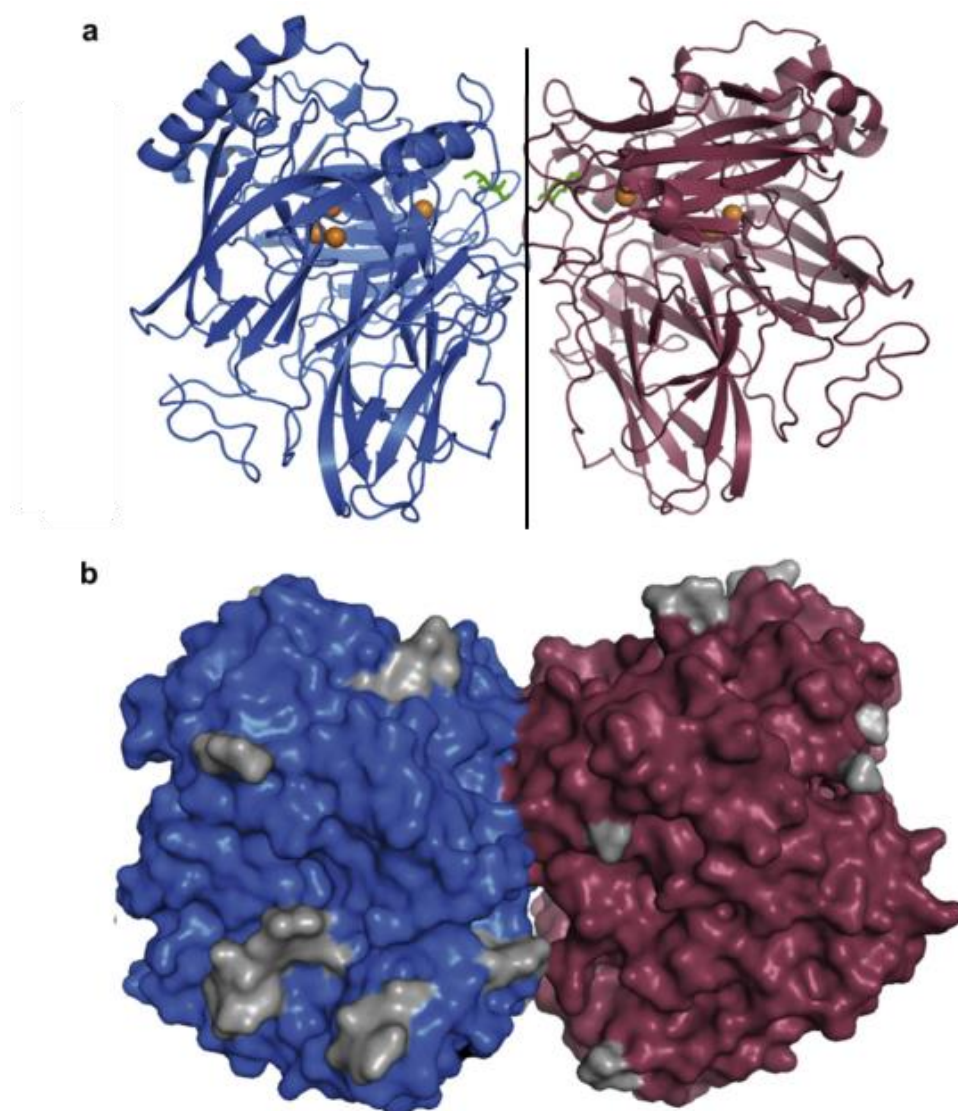


Рисунок 8. Димер лакказы из *M. albomyces* в кристалле [94] а) Ленточная модель; б) Поверхность димера. Полипептидные цепи А и В покрашены пурпурным и синим, соответственно. Серым покрашены углеводные остатки. Ионы меди показаны оранжевыми сферами. Глицерин показан стержневой моделью зеленого цвета. Положение некристаллографической поворотной оси второго порядка показано отрезком черного цвета.

1.4.5 Строение T1 центра лакказ

Ион меди T1 центра лакказ является первичным акцептором электронов от окисляемого субстрата и участвует во внутримолекулярном переносе электронов [35]. Отмечается значительное сходство в строении T1 центра всех лакказ [97]. Ион меди T1 центра у всех лакказ координирован атомами N δ двух гистидинов и атомом S γ цистеина, расположенными примерно в одной плоскости с ионом меди (His431, His508 и Cys503, Рисунок 9) [35]. Методом рентгеноструктурного анализа показано, что в аксиальном положении от плоскости лигандов T1 центра может располагаться остаток лейцина (см. например [30,105]), фенилаланина (см. например [31,75,100]) или метионина [35,52,106] (Рисунок 9). С противоположной стороны от плоскости расположена боковая цепь консервативного остатка изолейцина (Ile505 на рисунке 9), которая завершает первую координационную сферу иона меди T1 центра.

В структуре всех бактериальных лакказ неконсервативное аксиальное положение занято остатком метионина. В структуре лакказ из аскомицетов *M. albomyces* [65] и *T. arenaria* [30] в аксиальном положении обнаружен остаток лейцина (Leu513 на рисунке 9). В структурах лакказ из базидиомицетов в аксиальном положении встречаются как остаток лейцина (лакказа из *S. cinereus* [98]), так и остаток фенилаланина (лакказа из *T. hirsuta* [100]).

Аксиальный остаток изолейцина высококонсервативен: он обнаружен во всех структурах лакказ из базидиомицетов [98], аскомицетов [94] и большинства бактерий [52]. Исключением являются некоторые бактериальные двухдоменные лакказы, содержащие в этом положении остаток валина [37].

Координация иона меди T1 центра описывается как плоская тригональная или как искаженная тетраэдрическая при наличии аксиального остатка метионина [97]. Различия в геометрии T1 центра с аксиальным метионином обусловлены слабой донорно-акцепторной связью между атомом S δ остатка метионина и ионом меди T1 центра. Грибные лакказы вместо метионина в аксиальном положении T1 центра содержат остаток лейцина или фенилаланина, которые подобной связи не образуют [35]. Различия в координации можно обнаружить по различиям в ЭПР-спектрах T1 центра [107].

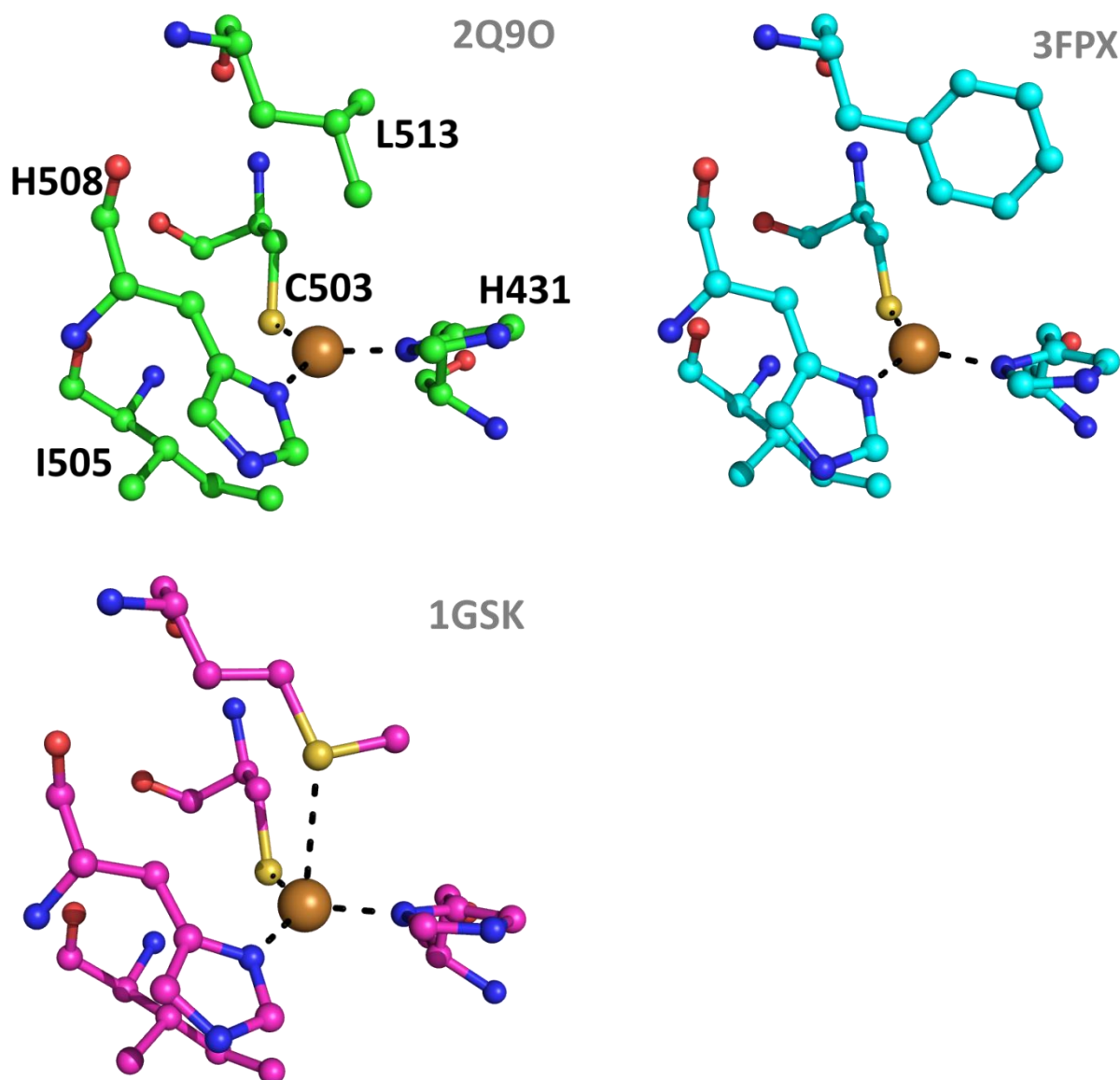


Рисунок 9. Строение T1 центра в лакказах из аскомицета *M. albomyces* (вверху слева), базидиомицета *T. hirsuta* (вверху справа) и бактерии *B. subtilis* (внизу слева). Ион меди показан сферой оранжевого цвета. Лиганды иона меди и аксиальные остатки показаны шаростержневыми моделями. Атомы N, O, S показаны сферами синего, красного и желтого цвета. Координационные связи показаны черным пунктиром. Правый верхний угол каждой панели содержит код PDB использованной структуры.

1.4.6 Влияние окружения T1 центра на редокс потенциал и каталитические свойства лакказ

Все лакказы имеют примерно одинаково устроенную первую координационную сферу иона меди T1 центра и отличаются одним остатком в аксиальном положении. В первой координационной сфере T1 центра лакказ расположены два гистидина, остаток цистеина и два аксиальных остатка: консервативный остаток (изолейцин) и переменный остаток (фенилаланин/лейцин/метионин). Наблюдается корреляция между типом переменного аксиального остатка и редокс потенциалом T1 центра [77]. В T1 центре белков-переносчиков электронов с самым низким редокс потенциалом аксиальное положение занято остатком глутамина, как в случае стеллацианина (E_{T1} 184 мВ) [108]. Бактериальные и растительные лакказы часто содержат аксиальный метионин и редокс потенциал их T1 центра обычно не превышает 500 мВ [108]. Редокс потенциал грибных лакказ выше, чем у растительных и бактериальных лакказ [58]. Большинство грибных лакказ относится к средне- и высокопотенциальным, их потенциал варьируется от ~465 мВ для лакказы из *M. thermophila* [109] до ~790 мВ (грибы рода *Trametes*) [6]. Среднепотенциальные лакказы, преимущественно обнаруженные в грибах-аскомицетах и небольшом числе базидиомицетов, часто содержат аксиальный лейцин и их редокс потенциал не превышает 700 мВ. Наиболее высокопотенциальные лакказы из базидиомицетов в аксиальном положении преимущественно содержат остаток фенилаланина [108].

Например, лакказа из бактерии *Campylobacter jejuni* содержит в T1 центре остаток метионина и имеет $E_{T1} = 420$ мВ [110]; лакказы из *C. cinereus* (гриб-базидиомицет, $E_{T1} = 550$ мВ [98,111]) и *M. albomyces* (гриб-аскомицет, $E_{T1} = 470$ мВ [94]) содержат остаток лейцина. Лакказы из *Trametes spp.* ($E_{T1} = 790$ мВ [81]) и *T. hirsuta* ($E_{T1} = 780$ мВ [85]) содержат в аксиальном положении остаток фенилаланина [100]. Особо отмечается сходство ЭПР параметров T1 центра грибных лакказ, содержащих аксиальный лейцин или фенилаланин ($A_{||} = 80-92 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$), что указывает на сходство геометрии T1 центра и отсутствие взаимодействия между аксиальным остатком лейцина/фенилаланина с ионом меди T1 центра [35].

Влияние строения T1 центра на редокс потенциал изучали с помощью мутантов лакказ и других белков, содержащих T1 центр. Замена аксиального метионина на лейцин изучено на примере азурина [112] и растицианина [113]. В обоих случаях замена привела к росту редокс потенциала T1 центра на ~100 мВ. Также в работе [113] проанализирована замена в растицианине аксиального метионина на глутамин. Эта замена привела к снижению потенциала на 100 мВ. В билирубиноксидазе замена аксиального метионина на глутамин, который в медьсодержащих оксидазах не встречается, приводит к снижению редокс потенциала на ~200 мВ и значительному снижению активности [76,108].

Для лакказы из *B. subtilis* были получены мутанты, содержавшие различные замены в области T1 центра, и определены их кинетические и электрохимические свойства (Таблица 7) [77,78]. В работе [77] изучено влияние замены остатка Met502 на редокс потенциал и каталитические свойства лакказы из *B. subtilis*. В работе проводится сравнение структур нативной формы и мутантов, при этом связанные с этой публикацией структуры в PDB отсутствуют. Строение T1 центра в мутантах Met502Leu и Met502Phe лакказы из *B. subtilis* было похоже на строение T1 центра нативной формы, при этом физико-химические свойства мутантов значительно изменились. Мутации привели к росту редокс потенциала на ~50-100 мВ и к ухудшению каталитических свойств мутантных форм. Мутант Met502Leu показал 2-4 кратное снижение величины k_{cat} по всем субстратам; мутант Met502Phe показал еще большее снижение, сохранив 0.15-0.05 % и 10 % от активности нативного фермента по нефенольным и фенольным субстратам [77]. Таким образом, рост редокс потенциала не приводит к ожидаемому увеличению каталитической активности [60]. В данном случае снижение активности мутантов связывается с нарушением внутримолекулярного электронного переноса между T1 центром и T2/T3 кластером [60,76].

На примере лакказ из *R. solanii* (E_{T1} 710 мВ), *M. thermophila* (E_{T1} 470 мВ) изучены мутанты, содержавшие в аксиальном положении замену лейцина на фенилаланин [60]. Замена незначительно повлияла на редокс потенциал (изменение составило менее 20 мВ) и каталитические свойства ферментов (Таблица 7). В этой же работе [60] изучены тройные мутанты с заменами в трипептиде, расположенным вблизи от T1 центра, но за пределом его первой координационной сферы. В этом случае замены также незначительно повлияли на потенциал T1 центра (изменение составило менее 20 мВ), однако каталитические свойства мутантов заметно ухудшились [60]. Имеется недоказанное предположение, что в этом случае спад активности был связан не с T1 центром, а с изменениями в строении субстрат-связывающего кармана [108]. Сходная ситуация наблюдалась в случае лакказы из *T. villosa*: замена аксиального фенилаланина на лейцин также незначительно повлияла на свойства фермента [107]. Замена фенилаланина на метионин в той же лакказе оказала заметное влияние на редокс потенциал (E_{T1} снизился на 100 мВ), каталитические свойства фермента, pH оптимум и ЭПР спектр фермента [107].

Другая работа по структуре мутантов лакказы из *B. subtilis* посвящена изучению вклада гидрофобных остатков Phe494 и Leu386 в окружении T1 центра на величину его редокс потенциала [78]. Остаток Phe494, консервативный среди всех трехдоменных лакказ, расположен в аксиальном положении T1 центра; Leu386 – неконсервативный гидрофобный остаток в окружении T1 центра. Замена Phe494Ala в лакказе из *B. subtilis* привела к снижению потенциала T1 центра на 150 мВ [78] и практически полной утрате ферментативной активности за счет 10-

кратного роста K_m и 50-кратного падения k_{cat} . Рентгеноструктурный анализ этого мутанта с разрешением 1.6 Å показал, что в аксиальном положении вместо изолейцина T1 центра находится молекула воды, образующая с ионом меди координационную связь. Авторы связали снижение потенциала и падение активности с ростом энергии реорганизации T1 центра и доступностью T1 центра растворителю. Мутация Leu386Ala в лакказе из *B. subtilis* привела к снижению редокс потенциала на 60 мВ и заметному спаду величины k_{cat} . Структура мутанта Leu386Ala решена с разрешением 2.9 Å и в PDB не депонировалась. Таким образом в работе [78] показано, что гидрофобность окружения T1 центра имеет ограниченное влияние на его редокс потенциал ($\Delta E_{T1} \sim 100$ мВ), однако может значительно влиять на каталитические характеристики фермента.

Одним из факторов, влияющих на редокс потенциал, предположительно является длина связи Nδ His-Cu в T1 центре [75]. Предполагается, что длина этой связи зависит от водородных связей, образованных аминокислотными остатками в окружении T1 центра. Однако, учитывая типичную энергию водородных связей (около 5 ккал моль⁻¹) и координационных связей Cu-N (более 50 ккал моль⁻¹ [114]), изменение длины координационной связи в зависимости от водородных связей должно быть незначительным [108].

Таблица 7. Редокс потенциалы, кинетические параметры лакказ и их мутантов с заменами в области T1 центра

Организм/мутация	АБТС			Сирингалдазин		Ссылка
	E_{T1} (мВ)	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	k_{cat} (s^{-1})	
<i>B. subtilis</i>	455	87±10	22.4±0.9	10±1	18.4±0.4	[77]
	525±10	124±17	322±20	18±3	80±4	[78]
<i>B. subtilis</i> /M502L	548	89±5	10.6±0.2	9±1	7.4±2.2	[77]
<i>B. subtilis</i> /M502F	515	49±4	0.26±0.003	8±1	0.01±0.003	
<i>B. subtilis</i> /L386A	466±6	145±3	52±1	33±1	13.0±0.2	[78]
<i>B. subtilis</i> /I494A	429±27	2027±193	7.2±0.5	52±1	9.0±0.1	
<i>R. solani</i>	730±20	52±6	41.7±1.7	28±4	9.1±0.6	[60]
<i>R. solani</i> /L470F	720±20	75±13	12.7±0.5	35±4	4.3±0.2	
<i>R. solani</i> / L466V,E467S,A468 G	740±20	60±4	0.3±0.02	3.9±0.3	0.02±0.002	
<i>M. thermophila</i>	480±10	110±20	63.3±5.0	1.4±0.2	75.0±3.3	
<i>M. thermophila</i> /L513F	500±20	43±3	30.0±1.7	1.8±0.2	50.0±1.7	
<i>M. thermophila</i> / V509L,S510E,G511 A	470±20	11±2	8.8±0.3	0.9±0.1	6.0±0.3	
<i>T. villosa</i>	790±10	58±8	60±2	3.9±0.1	50±2	[107]
<i>T. villosa</i> F463L	740±10	66±7	58±4	4.6±0.8	65±4	
<i>T. villosa</i> F463M	680±20	2200±200	78±4	19±4	88±4	

1.4.7 Строение центра связывания фенольных субстратов. Структуры комплексов лакказы-фенольный субстрат

Поскольку T1 центр является первичным акцептором электронов от субстрата донора электронов, то сайт связывания субстрата должен располагаться в непосредственной близости от T1 центра. Расположение и строение этого сайта в различных лакказах было установлено непосредственно из структуры лакказы-субстратных комплексов (Таблица 8).

Таблица 8. Структуры комплексов лакказ с фенольными субстратами [97].

PDB код	Организм	Субстрат	Разрешение (Å)	В-факторы (субстрат/белок)	Ссылка
1KYA	<i>T. versicolor</i>	2,5-ксилидин	2.4	51/38	[31]
3ZDW	<i>B. subtilis</i>	АБТС	2.4	55/23	[115]
2HRG	<i>T. trogl</i>	<i>n</i> -толуиловая кислота	1.6	34/18	Нет публикации
3FU7	<i>M. albomyces</i>	2,6-ДМФ	1.7	27/15	[116]
3FU8	<i>M. albomyces</i>	2,6-ДМФ	1.8	44/18	
3FU9	<i>M. albomyces</i>	2,6-ДМФ	2.0	13/14	
3TBC	<i>S. viridosporis</i>	Ацетованилон	2.3	53/46	[49]
3TA4	<i>Amycolatopsis</i>	LM-OMe	2.4	35/30	
4Q8B	<i>B. subtilis</i>	Синаповая кислота	1.9	36/26	Нет публикации

LM-OMe - 1-(3,4-диметоксифенил)-2-(2-метоксифеноксид)-1,3-дигидроксипропан.

Анализ структур комплексов лакказ с субстратами приведен в работе [97]. Из таблицы 8 видно, что данных о строении комплексов лакказ с субстратами мало и в большинстве случаев они обладают плохим качеством (низкое разрешение и высокие значения температурных факторов для атомов лиганда). Для комплекса лакказы из *T. versicolor* с 2,5-ксилидином, который является аналогом фенольного субстрата лакказ, в PDB депонированы только координаты без структурных факторов [31], поэтому подтвердить или опровергнуть образование комплекса субстрата с лакказой затруднительно. Карта 2Fo-Fc для комплекса лакказы из *B. subtilis* с АБТС (код PDB 3ZDW) [115] не очень хорошо описывает молекулу АБТС и содержит остаточную электронную плотность в субстрат-связывающем кармане [97]. Аналогичная ситуация наблюдается в структурах комплексов лакказы из *M. albomyces* с 2,6-

ДМФ [116]. Кристаллы лакказы из *M. albomyces* были вымочены в криозащитном растворе, содержащем 2,6-ДМФ, и с кристаллов был собран набор дифракционных данных. В активном центре комплекса лакказы из *M. albomyces* с 2,6-ДМФ в случае «omit»-синтеза наблюдаются положительные пики на карте электронной плотности $F_o - F_c$, однако однозначно приписать их 2,6-ДМФ или продуктам его окисления затруднительно. В случае комплексов лакказ из *B. subtilis* с АБТС (код PDB 4Q8B, нет публикации), *Amiclatopsis* с 1-(3,4-диметоксифенил)-2-(2-метоксифеноксид)-1,3-дигидроксипропаном (код PDB 3TA4) [49] и *Trametes trogii* с *n*-толуиловой кислотой (код PDB 2HRG, нет публикации) синтезы электронной плотности подтверждают существование комплексов. Таким образом, нужно рассматривать депонированные структуры комплексов с осторожностью из-за большой вариативности в качестве структур и принимать во внимание разрешение, качество экспериментальных данных и/или каталитическую активность [97].

Сайт связывания фенольных субстратов представляет собой неглубокий карман (5-8 Å), форма и состав которого значительно различается между лакказами. На рисунке Рисунок 10 показано строение субстрат-связывающего сайта в лакказах из *M. albomyces* и *T. arenaria* [30]. Идентичность аминокислотных последовательностей этих лакказ составляет 76 %. Форма субстрат-связывающего сайта сильно различается даже у лакказ, обладающих высокой степенью идентичности. Карман содержит преимущественно гидрофобные алифатические и ароматические аминокислотные остатки [115,116], то есть связывание окисляемого субстрата в основном осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий. Строение и аминокислотный состав этого кармана оказывают значительное влияние на каталитические свойства лакказ [108]. Это влияние подтверждается исследованиями окисления лакказами фенолов с различными боковыми заместителями [58]. В качестве примера можно привести данные по окислению 4-ацетил-2,6-метокси-фенола ($K_m = 1200 \mu\text{M}$ и $k_{cat} = 20 \text{ c}^{-1}$) и 4-ацетил-2-метокси-фенола ($K_m = 120 \mu\text{M}$ и $k_{cat} = 30 \text{ c}^{-1}$).

За ориентацию субстрата в субстрат-связывающем кармане разных лакказ могут отвечать разные остатки. В структуре комплекса лакказы из *T. trogii* с *n*-толуиловой кислотой (код PDB 2HRG, нет публикации) ориентация субстрата осуществляется за счет водородной связи между субстратом и остатком His455 – лигандом иона меди T1 центра. В структуре комплекса лакказы из *B. subtilis* и синаповой кислоты (код PDB 4Q8B, нет публикации) ориентация субстрата в кармане около T1 центра происходит за счет водородной связи с атомом Oγ Thr415. Вторая водородная связь атома Oγ Thr415 связывает его с остатком His419 – лигандом иона меди T1 центра.

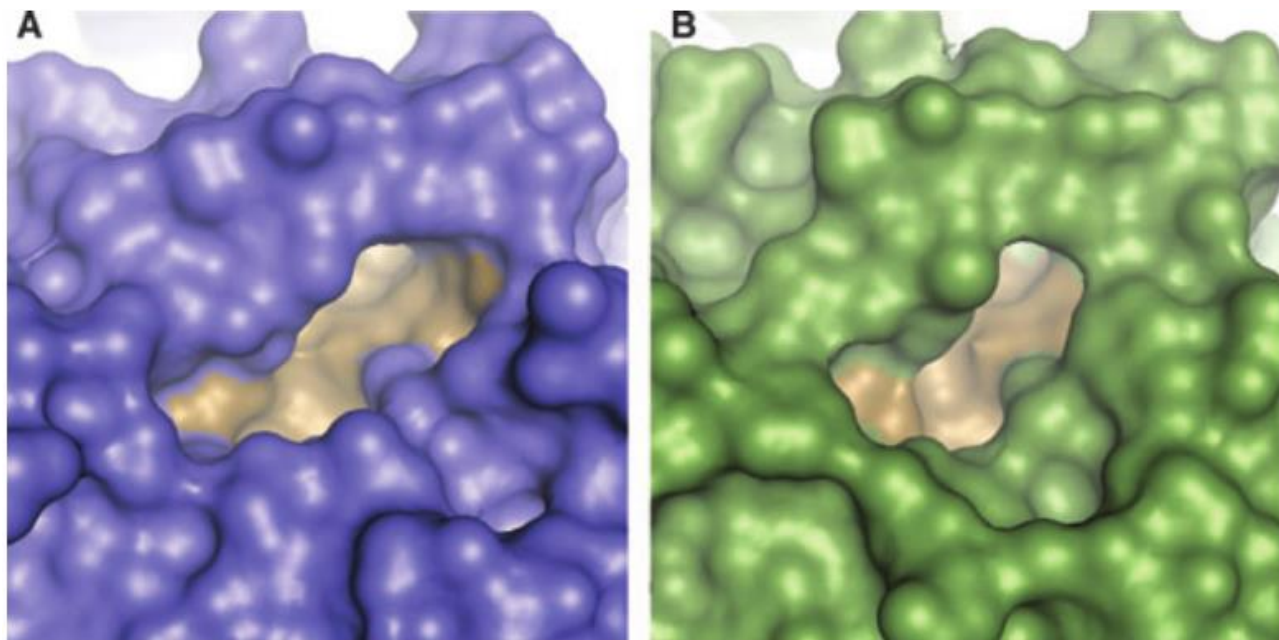


Рисунок 10. Область связывания субстрата в кристаллической структуре лакказ из *M. albomyces* (слева) и *T. arenaria* (справа) [30].

Димерная упаковка лакказ из аскомицетов в кристаллах, при которой субстрат-связывающий сайт оказывается в межсубъединичном интерфейсе, создает стерические затруднения для связывания окисляемого субстрата [94]. Предполагается, что образование димера используется для регуляции активности фермента *in vivo* [65].

1.4.8 Строение T2/T3 кластера лакказ

Связывание и восстановление молекулярного кислорода происходит в T2/T3 кластере [35]. Из данных рентгеноструктурного анализа известно, что все лакказы имеют сходное строение T2/T3 кластера [97].

Строение T2/T3 кластера для лакказы из *C. caperata* приведено на рисунке 11 [117]. В лакказе из *C. caperata* ион меди T2 центра находится в плоскости, образованной его лигандами: Nε атомами His64 и His397 и молекулой воды W2. На расстоянии около 4 Å от иона меди T2 центра расположены ионы меди T3 центра.

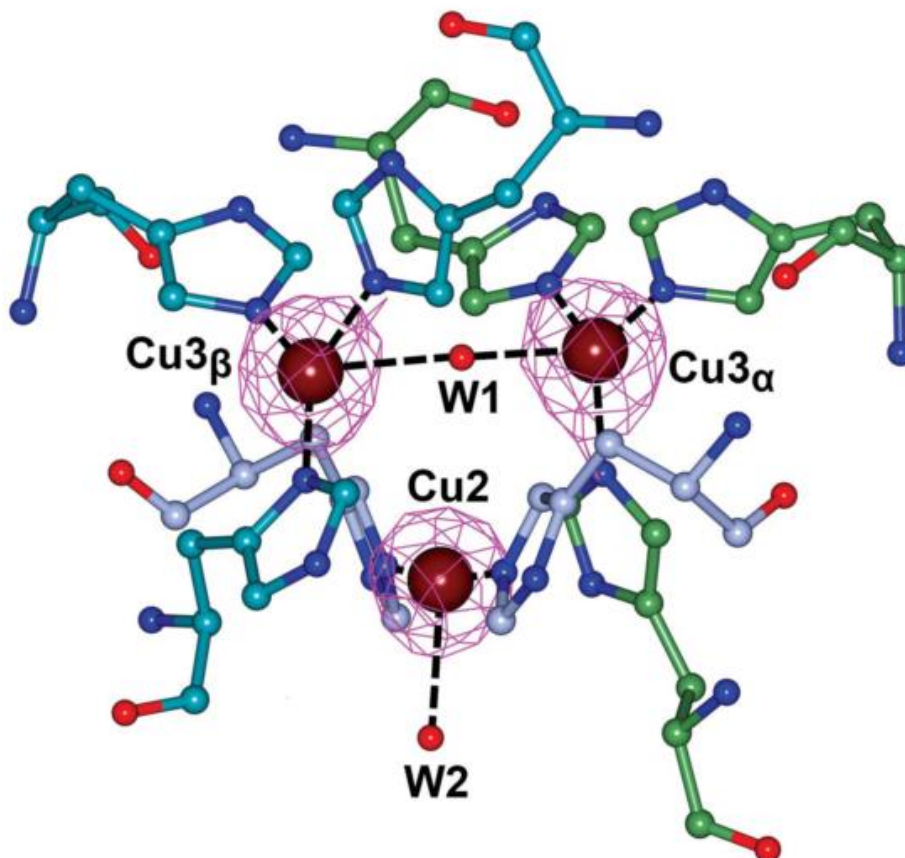


Рисунок 11. Строение T2/T3 кластера в лакказе из *C. caperata* [117]. Атомы углерода лигандов ионов Cu2 и пары Cu3α и Cu3β окрашены, соответственно, в голубой, зеленый и бирюзовый цвета, соответственно. Ионы меди, атомы кислорода и азота показаны в виде коричневых, красных и синих сфер, соответственно.

Оба иона меди типа 3 имеют искаженную тетраэдрическую координацию тремя остатками гистидинов и кислородным лигандом W1, расположенным между ними. Ионы меди типа 3 неравнозначны по координации гистидинами: один ион (Cu3α) координирован тремя Nε атомами, а другой (Cu3β) координируется двумя Nε и одним Nδ атомом остатков гистидинов.

В известных структурах лакказ между ионами меди T3 обнаружены как одноатомные (H_2O , OH^- , O^{2-}), так и двухатомные (H_2O_2 , O_2) кислородные лиганды [97]. Обнаружение какого-либо из лигандов в T2/T3 кластере связано с условиями рентгеноструктурного эксперимента.

При неупругом рассеянии рентгеновского излучения образуются свободные электроны способные восстанавливать активный центр лакказ [70,71]. В процессе сбора дифракционных данных с монокристалла лакказы происходит восстановление всех медных центров с последующим восстановлением молекулы O_2 в T2/T3 кластере [70,71,118]. Методом рентгеноструктурного анализа изучено влияние поглощенной дозы рентгеновского излучения

на строение T2/T3 кластера [70,118]. В работе [70] для двухдоменной лакказы показано, как с ростом поглощенной дозы изменяется строение T2/T3 кластера: исчезает электронная плотность, соответствующая молекуле O₂, и растет расстояние между Cu3 α и Cu3 β , что, по-видимому, связано с постепенным восстановлением ионов меди активного центра и переходом T2/T3 кластера в полностью восстановленную форму. В работе [71] для кристалла лакказы показано, что при росте поглощенной дозы двухатомный кислородный лиганд между Cu3 α и Cu3 β превращается в одноатомный, что можно связать с восстановлением молекулы O₂ до OH⁻.

Двухдоменные лакказы слегка отличаются от трехдоменных по строению T2/T3 кластера [40]. Во-первых, в двухдоменных лакказах ионы меди T3 центра координированы не пятью N ϵ и одним N δ , а шестью N ϵ атомами остатков гистидинов. Во-вторых, в канале со стороны T2 центра расположен остаток тирозина - донора электронов в двухдоменных лакказах. В структуре трехдоменных лакказ на месте OH-группы этого остатка расположена молекула воды [40].

На двухдоменной лакказе из *S. coelicolor* было проведено структурно-функциональное исследование мутантных форм, содержащих замены остатка предполагаемого донора электронов - Tyr108 на Phe и Ala [40]. Остаток Tyr108 расположен в непосредственной близости от T2/T3 кластера и предположительно является донором электронов в процессе восстановления кислорода. При окислении Tyr108 предположительно происходит образование тирозил-радикала, который детектируется на ЭПР спектрах. Мутации Y108F и Y108A дали сходный эффект на каталитические свойства фермента: трехкратное снижение K_m и k_{cat} по фенольному субстрату (N,N,N',N' – тетраметил – *n*- фенилендиамин) и O₂. Структуры мутантов Y108F и Y108A решены с разрешением 2.7 Å и были использованы для подтверждения мутации и сравнения укладки полипептидной цепи [40].

1.4.9 Каналы, связывающие T2/T3 кластер лакказ с поверхностью белка

В структуре всех лакказ ионы меди T2 и пара ионов меди T3 соединены каналами с поверхностью белка (Рисунок 12). Строение каналов у бактериальных и грибных лакказ различается.

Исследований, посвященных роли канала со стороны T2 центра, нет. В схеме, предложенной Соломоном, канал со стороны T2 центра отвечает за транспорт протонов к активному центру [43]. Также по этому каналу к T2/T3 кластеру могут поступать галогенид-ионы, ингибирующие активность лакказ.

Предположительно роль канала, ведущего к ионам меди T3, заключается в транспорте молекулярного кислорода к активному центру (Поляков, личное общение). Кроме того,

расположенная в канале карбоксильная группа белка может отвечать за протонирование молекулы кислорода [30,119,120]. В качестве такой группы могут выступать боковые цепи остатков Asp [30], Glu [119] или С-концевая карбоксильная группа белка [30].

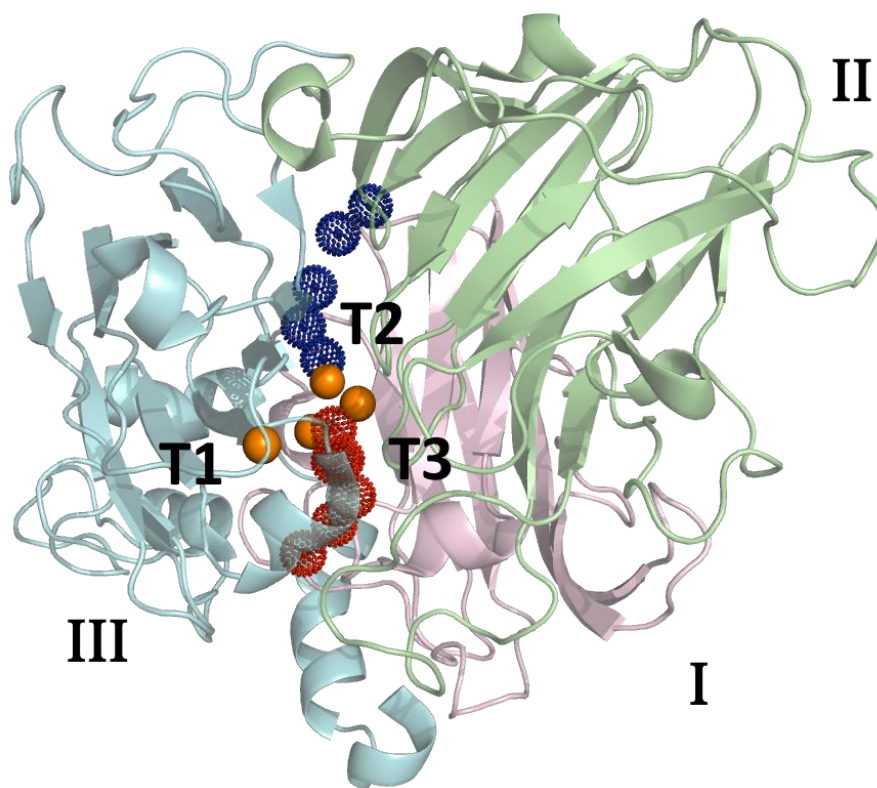


Рисунок 12. Каналы связывающие ионы меди T2 и T3 с поверхностью белка в лакказе из *T. hirsuta* (код PDB 3FPX). Ионы меди показаны сферами оранжевого цвета. Молекулы воды в каналах показаны сферами синего (со стороны T2) и красного (со стороны T3) цвета. Полипептидная цепь окрашена в соответствии с доменами.

В бактериальной лакказе из *B. subtilis* предполагаемый донор протонов в реакции восстановления молекулы кислорода - остаток Glu498 [119]. Замены этого остатка Glu498Thr и Glu498Leu привели к потере 99 % активности [119]. В той же работе описана замена Glu498Asp, которая привела к снижению активности на 90 %. Для всех трех мутантов решены структуры с разрешением от 1.7 до 2.1 Å. В структуре всех мутантов отсутствует молекула воды, образующая водородную связь с кислородным лигандом пары ионов меди T3. В лакказах из базидиомицетов соответствующую роль донора протонов может выполнять консервативный остаток аспарагиновой кислоты, например, Asp474 в лакказе из *Corioloropsis gallica* [118] или Asp456 в лакказе из *T. versicolor* [30]. В окружении T2/T3 кластера лакказ из аскомицетов отсутствует кислотный остаток, соответствующий остаткам Glu498 или Asp474.

Предполагается, что его роль может выполнять С-концевая карбоксильная группа белка [121]. Для изучения роли С-концевого остатка в лакказах из аскомицетов были получены мутанты delDSGL⁵⁵⁹, с удаленным С-концевым тетрапептидом, и Leu559Ala лакказы из *M. albomyces* [121]. Мутант delDSGL⁵⁵⁹ был практически неактивным и кинетические характеристики для него не опубликованы. Для мутанта Leu559Ala решена структура с разрешением 2.4 Å [121]. В мутанте Leu559Ala лакказы из *M. albomyces* атом Nδ остатка His140, координирующего ион меди Т3, образует водородную связь не с С-концевой карбоксильной группой белка, а с молекулой воды, которая отсутствует в структуре нативного фермента. Замена Leu559Ala привела к снижению каталитической активности по отношению к АБТС в 10 раз за счет двухкратного роста Км и четырехкратного падения k_{cat} . При этом мутация Leu559Ala почти не повлияла на каталитическую эффективность по отношению к фенольному субстрату 2,6-ДМФ. Авторы объясняли полученные данные ролью С-концевого остатка в переносе протонов к Т2/Т3 кластеру [121].

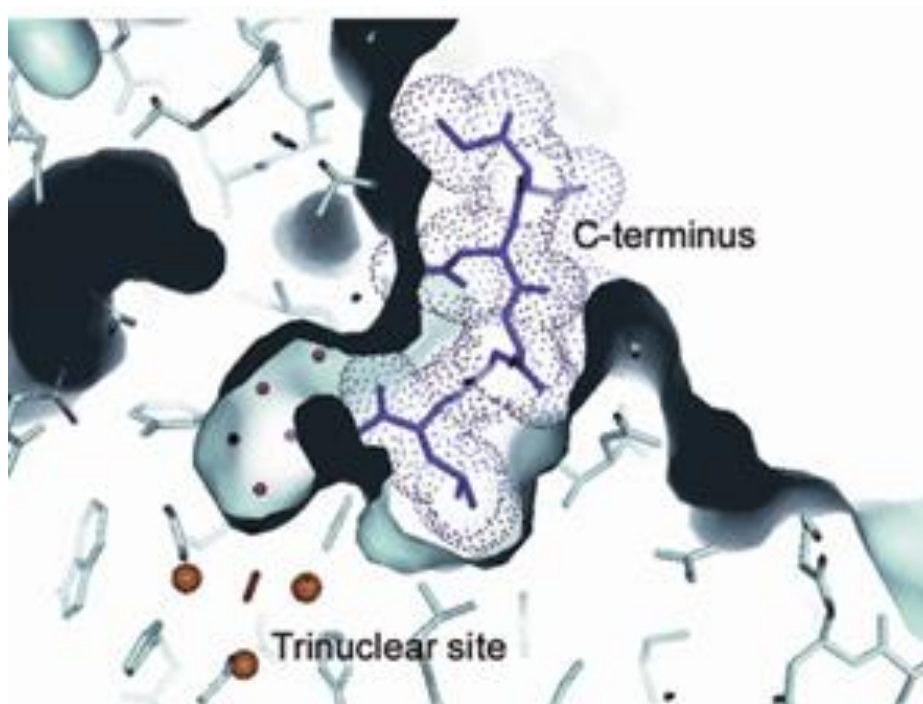


Рисунок 13. С-концевой тетрапептид лакказы из *M. albomyces* [121]. Ионы меди, молекулы воды и кислорода показаны в виде сфер оранжевого цвета, сфер красного цвета и стержнем красного цвета.

1.4.10 Т2-деплецированные формы лакказ

Активность препаратов лакказ зависит от содержания ионов меди в молекуле [66,122–

124]. Одним из способов исследования лакказ является изучение свойств фермента с удаленными ионами меди или производного, содержащего вместо меди ионы других металлов. Из четырех ионов меди активного центра лакказ наиболее лабильным ионом является ион меди T2 [123]. Этот ион можно селективно удалить из активного центра лакказы без потери остальных ионов меди [125]. При этом получается T2-деплецированная форма фермента (T2Д). Разработаны методики получения T2Д форм фермента с помощью обработки препаратов фермента комплексами на ион Cu^+ (диметилглиоксим, диэтилдитиокарбамат, батocupроин) в присутствии восстановителей [44,66,123,126–128]. Для лакказы из *T. versicolor* селективное удаление иона меди T2 центра осуществляли диализом против раствора цианида при pH 7.0 [123]. Аналогичная методика в случае лакказы из *R. vernicifera* приводит к удалению всех ионов меди [66]. Для селективного удаления иона меди T2 центра из лакказы *R. vernicifera* проводили диализ против раствора, содержащего диметилглиоксим и ферроцианид [126]. Также в качестве комплексонов используют диэтилдитиокарбамат, ЭДТА и батocupроин [123,127,129]. Сравнительная характеристика методов удаления ионов меди из активного центра лакказ показала, что наиболее полное удаление ионов меди T2 центра достигается при обработке препаратов лакказ батocupпроином в присутствии восстановителя лакказ [66]. Препараты T2Д лакказ содержат три иона меди на молекулу фермента и в их ЭПР спектрах отсутствуют характеристические пики ионов меди T2 центра.

При выделении генноинженерных лакказ обычно получают препараты ферментов, содержащих менее четырех ионов меди на молекулу лакказы [128,130]. Методом рентгеноструктурного анализа решены структуры лакказ, для которых целенаправленное деплецирование не проводилось, при этом в структурах ион меди T2 центра либо отсутствовал, либо имел неполную заселенность [98,117].

Препараты T2Д форм лакказ могут обладать остаточной активностью [123]. Это может быть связано с наличием в препарате лакказы небольших количеств активной формы фермента, содержащей в активном центре все четыре иона меди.

Встраивание иона меди в активный центр T2Д формы лакказы с одновременным восстановлением активности проводят обработкой препаратов фермента солями ионов меди. Было показано, что ион меди встраивается в T2 центр грибных, растительных и бактериальных лакказ при использовании ионов Cu^+ [44,66,125] или смеси соли Cu^{2+} с аскорбиновой кислотой [66]. Для T2Д формы грибной лакказы из *S. caperata* методом рентгеноструктурного анализа было установлено, что встраивание иона меди в активный центр кристаллов лакказ происходит только при использовании ионов Cu^+ и не происходит при использовании ионов Cu^{2+} [117].

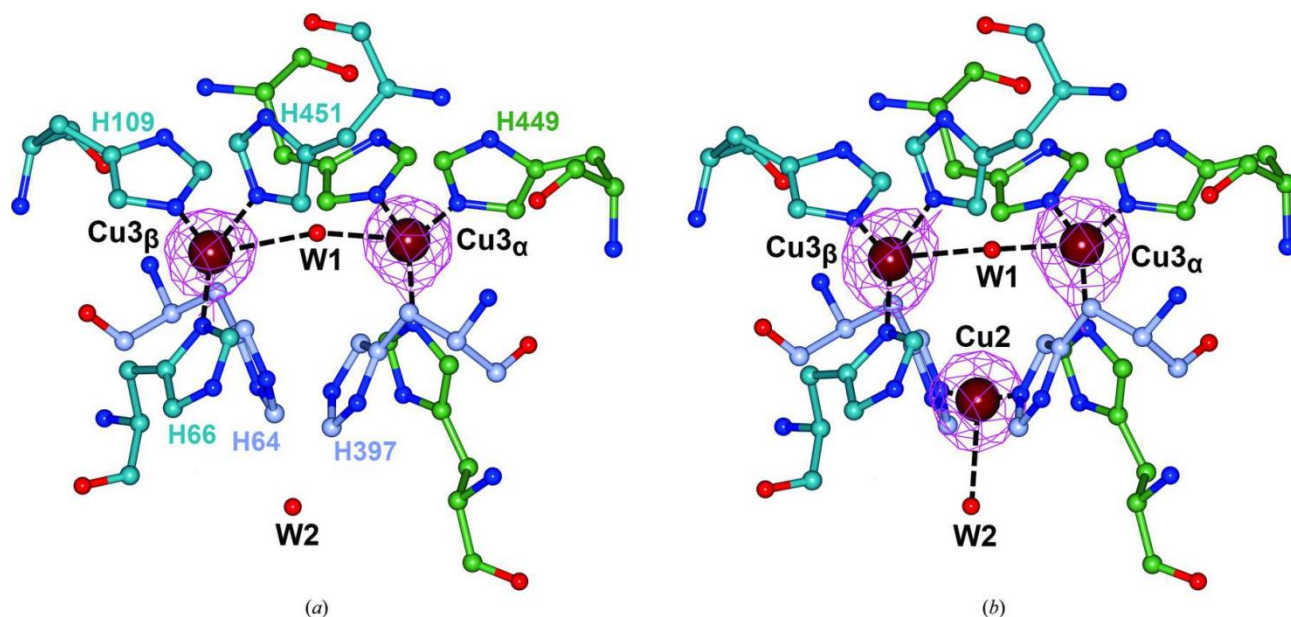


Рисунок 14. Шаростержневая модель T2/T3 кластера лакказы из *C. caperata* [117]. А) T2 деплецированная структура б) T2 в присутствии Cu^+ . Атомы углерода остатков His, координирующие Cu2, Cu3α и Cu3β, окрашены голубым, светло-зеленым и бирюзовым цветом, соответственно. Карта электронной плотности 2Fo-Fc для ионов меди показана на уровне 1σ .

В банк данных белковых структур депонированы структуры T2Д форм лакказ из *C. cinereus* [98,99], *C. caperata* [117] и *T. thermophilus* [118]. В этих структурах отсутствие иона меди T2 никак не влияет на положение лигандов T2 центра. В работе [117] проведено сравнение структур нативной и T2Д форм фермента лакказы из *C. caperata*. Обе формы имели одинаковых ход полипептидной цепи (r.m.s.d. по Ca 0.24 Å) и их структуры отличались в области T2/T3 кластера локализацией иона меди между остатками His64 и His397 для нативного фермента (Рисунок 14).

Известны структуры лакказ с неполной заселенностью иона меди в T2 центре. В структуре лакказы из *T. hirsuta* (код PDB 3PXL, нет публикации) ион меди T2 центра имеет заселенность 0.2, а остаток His398 – лиганд этого иона, занимает два альтернативных положения. Остаток His398 в одном положении координирует ион меди T2, а во втором – Cu3α через Nδ атом, при этом Nε His398 образует водородную связь с консервативной молекулой воды вблизи позиции иона меди T2. Структура этой лакказы была решена с высоким разрешением 1.2 Å, что позволило уточнить два положения для иона Cu3α с заселенностями 0.75 и 0.15.

T2Д формы лакказ лучше кристаллизуются и их кристаллы дают лучшее разрешение, чем формы с полным набором ионов меди [117]. Кристаллизация деплецированной формы мутанта

Leu386Ala лакказы из *B. subtilis* дала улучшение разрешения с 2.9 Å до 2.4 Å [78]. Кристаллизация деплецированной формы лакказы из *T. hirsuta* позволила собрать набор данных до 1.2 Å (код PDB 3PXL), а кристаллы той же лакказы с полным набором ионов меди позволили собрать данные до 1.8 Å [100].

1.4.11 Гликозилирование лакказ

Многие грибные лакказы являются гликопротеинами. Углеводная часть может составлять до 49 % от массы лакказы [28]. Углеводные цепи прикреплены посредством N-гликозидной связи к остатку Asn, расположенному в мотиве Asn-X-Ser/Thr, где X- любая аминокислота кроме Pro [5,36,131]. В аминокислотной последовательности грибных лакказ обычно обнаруживают 3-7 сайтов N-гликозилирования, но не все из них содержат связанную углеводную цепь [98,100,106]. Например, в аминокислотной последовательности лакказы из *T. hirsuta* содержится восемь предполагаемых сайтов N-гликозилирования. В структуре этого фермента, определенной методом рентгеноструктурного анализа, четыре из восьми сайтов N-гликозилирования содержали связанную углеводную цепь [100]. Методами рентгеноструктурного анализа и масс-спектрометрии для лакказы из *Rigidoporus lignosis* было показано, что из пяти предполагаемых сайтов N-гликозилирования (Asn90, Asn184, Asn267, Asn337, Asn435) только Asn337 и Asn435 содержали связанные углеводные цепи [105]. Наибольшее число сайтов N-гликозилирования, семь, обнаружено в структуре лакказы из *M. albomyces* [65].

Во всех известных структурах лакказ локализованные углеводные цепи имеют сходный углеводный состав, но различаются по длине. Короткие углеводные цепи состоят из одного-двух остатков NAG, а длинные состоят из двух остатков NAG и четырех-пяти остатков MAN. [65,100]. Строение углеводных цепей в лакказе из гриба семейства *Lentinus* приведено на рисунке 15.

Структурная и функциональная роль гликозилирования в грибных лакказах исследована на примере лакказы из *Lentinus* sp. [132]. Для гликозилированной формы лакказы была решена структура с разрешением 1.8 Å. В структуре фермента обнаружено три сайта N-гликозилирования (Asn75, Asn238 и Asn458): углеводные цепи, прикрепленные к Asn75 и Asn458, имели формулу NAG₂MAN₅; углеводная цепь при Asn238 состояла из одного остатка NAG. Углеводные цепи образуют сеть водородных связей, связывающих домены II и III между собой и стабилизирующих положение поверхностных петель (Рисунок 15). Дегликозилирование в присутствии эндогликозидазы Н, расщепляющей связи между двумя остатками NAG, не повлияло на активность. Одиночные мутации сайтов гликозилирования

Asn75Asp, Asn238Asp и Asn458Asp привели к потере ферментативной активности. Авторами работы выдвинуто предположение, что потеря активности мутантов целиком обусловлена утратой остатков NAG с MAN и образуемых ими водородных связей, связывающих домены II и III [47,132].

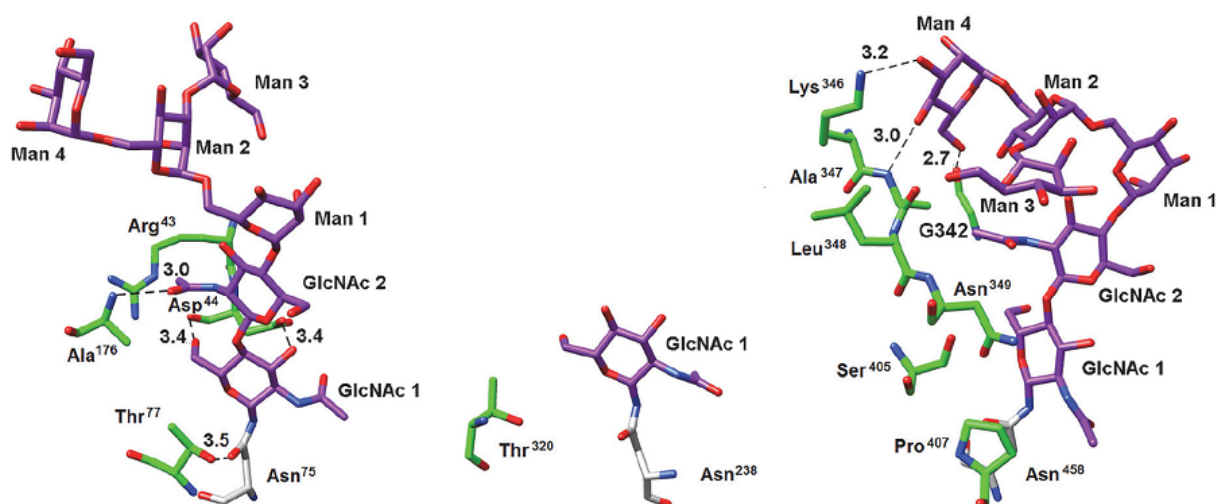


Рисунок 15. Углеводные остатки (фиолетовые), связанные N-гликозидной связью с остатками Asn75, Asn238 и Asn458 (белые), и контактирующие с ними аминокислотные остатки (зеленые) показаны стержневой моделью. Водородные связи показаны пунктирной линией [132].

Для лакказы из *T. versicolor* исследована роль углеводной части в защите от протеолитических ферментов [133]. Лакказа из *T. versicolor* с удаленными углеводными цепями показала меньшую термостабильность, а также легче инактивировалась в присутствии различных протеаз.

Длинные углеводные цепи затрудняют кристаллизацию белков из-за гетерогенности в их строении и неструктурированности их свободных концов [72]. Поэтому в некоторых случаях перед кристаллизацией проводится дегликозилирование фермента. Однако такая обработка может привести к изменениям в активном центре. В работе [98] описана структура T2Д дегликозилированной формы лакказы из *C. cinereus*. Авторами было выдвинуто предположение, что деплецирование произошло вследствие дегликозилирующей обработки.

1.4.12 Структуры мутантных форм лакказ

Точечная мутация определенного остатка, выбранного на основе известной структуры, с последующей функциональной характеристикой полученного мутанта является широко

распространенным методом изучения ферментов. Ряд подобных исследований проведен и для лакказ. Известные структуры мутантных форм лакказ перечислены в таблице (Таблица 9). Все структурные работы по мутантным формам лакказ посвящены структурно-функциональным исследованиям мутантов с заменами в области T1 центра и T2/T3 кластера.

Для лакказы из *B.subtilis* было исследовано влияние ряда мутаций в области T1 центра и T2/T3 кластера на каталитические свойства фермента и его структуру. Замена аксиального остатка T1 центра Met502Leu, Met502Phe в этой лакказе использовалась для изучения влияния аксиального остатка на строение и редокс потенциал лакказы [77]. Замену консервативного для всех лакказ аксиального остатка изолейцина (Ile494Ala) и замену гидрофобного остатка лейцина вблизи T1 центра (Leu386Ala) использовали для изучения влияния гидрофобного окружения на редокс потенциал лакказы [78]. Для лакказы из *B. subtilis* исследовано влияние на кинетические свойства и структуру замен двух кислотных остатков Glu489 и Asp116, расположенных в канале от T2 и T3 центров к поверхности [119,134]:

Для лакказы из *M. albomyces* с помощью мутации остатка Leu559 исследовали роль C-концевого тетрапептида в катализируемой реакции [121]. Для двухдоменной лакказы из *S. coelicolor* исследовано влияние замены остатка Tyr108 в T2/T3 кластере [40]; для двухдоменной лакказы *Streptomyces sviveus* получена структура мутанта Met295Leu (код PDB 4WTQ, нет публикации) и мутантов His99Asn, His99Gln, His99Tyr.

1.5 Лакказа из аскомицета *Botrytis aclada*

Одним из желательных для биотехнологии свойств лакказ является устойчивость к высоким концентрациям Cl⁻. Большинство изученных лакказ из бактерий и базидиомицетов при концентрации Cl⁻ более 100 мМ практически полностью теряет свою активность [3]. В работе [3] отмечается негативное влияние хлоридов на эффективность лакказных биотопливных ячеек. Причины высокой хлорид резистентности лакказ неизвестна и требует, в частности, сравнительного структурного анализа резистентных и нерезистентных к хлорид-ионам лакказ.

Среди аскомицетных патогенных грибов был проведен поиск лакказ, устойчивых к ингибированию Cl⁻. В результате была отобрана наиболее устойчивая к ингибированию Cl⁻ лакказа из *Botrytis aclada* (BaL) [3]. Рекомбинантная форма лакказы из *B. aclada* была получена с высоким уровнем экспрессии в дрожжах *Pichia pastoris*, очищена и охарактеризована.

Таблица 9. Мутантные формы лакказ в PDB [97]

Организм	Мутация	Разрешение (Å)	PDB код	Ссылка
----------	---------	----------------	---------	--------

<i>B. subtilis</i>	Ile494Ala	1.6	2WSD	[78]
	Asp116Ala	2.0	4A66	[134]
	Asp116Glu	2.1	4A67	
	Asp116Asn	2.0	4A68	
	Glu498Asp	2.1	4AKQ	[119]
	Glu498Leu	1.7	4AKO	
	Glu498Thr	2.0	4AKP	
<i>M. albomyces</i>	Leu559Ala	2.4	3DKH	[121]
<i>S. coelicolor</i>	Tyr108Phe	2.7	4GXF	[40]
	Tyr108Ala	2.7	4GY4	
<i>Streptomyces sviveus</i>	His99Asn	1.7	4UAH	Нет публикации
	His99Gln	1.80	4UAN	
	His99Tyr	1.6	4W1T	
	Met295Leu	1.8	4WTQ	Нет публикации

BaL является внеклеточным белком с молекулярной массой около 100 кДа. Изоэлектрофокусирование очищенного препарата показало наличие одной полосы с pI около 2.4. Концентрированные препараты имели характерную для лакказ голубую окраску. Коэффициент экстинкции на 610 нм равен $3012 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Для BaL была изучена pH зависимость активности (Рисунок 16) и кинетические константы (Таблица 10) для АБТС и нескольких фенольных субстратов. Кривая pH-зависимости имеет сигмоидную форму для АБТС и 2,6-ДМФ и колоколообразную – для остальных фенольных субстратов. Кинетические константы для всех субстратов измерены при оптимальном pH.

В 100 mM цитрате натрия, pH 4.0, BaL сохраняет 60 % от исходной активности при концентрации NaCl более 1 M. Как и все остальные лакказы BaL заметно ингибируется уже при микромолярных концентрациях NaF. В присутствии 2.6 μM фторида активность фермента снижается до 50 % от исходной.

BaL относится к высокопотенциальным лакказам ($E_{T1} > 700 \text{ mV}$) [3].

BaL имеет среднюю термостабильность. В 100 мМ цитрате натрия, рН 4.5, и при 4 °С время полуинактивации фермента составляет 220 часов. При росте температуры инактивация фермента становится заметной при меньшем времени: 23.4 (t = 45 °С), 7.0 (t = 55 °С) и 1.1 (t = 65 °С) минуты. В присутствии хлорид-ионов стабильность заметно растет. При 37 °С в присутствии 125 мМ NaCl или KCl время инактивации увеличивается примерно в 15 раз.

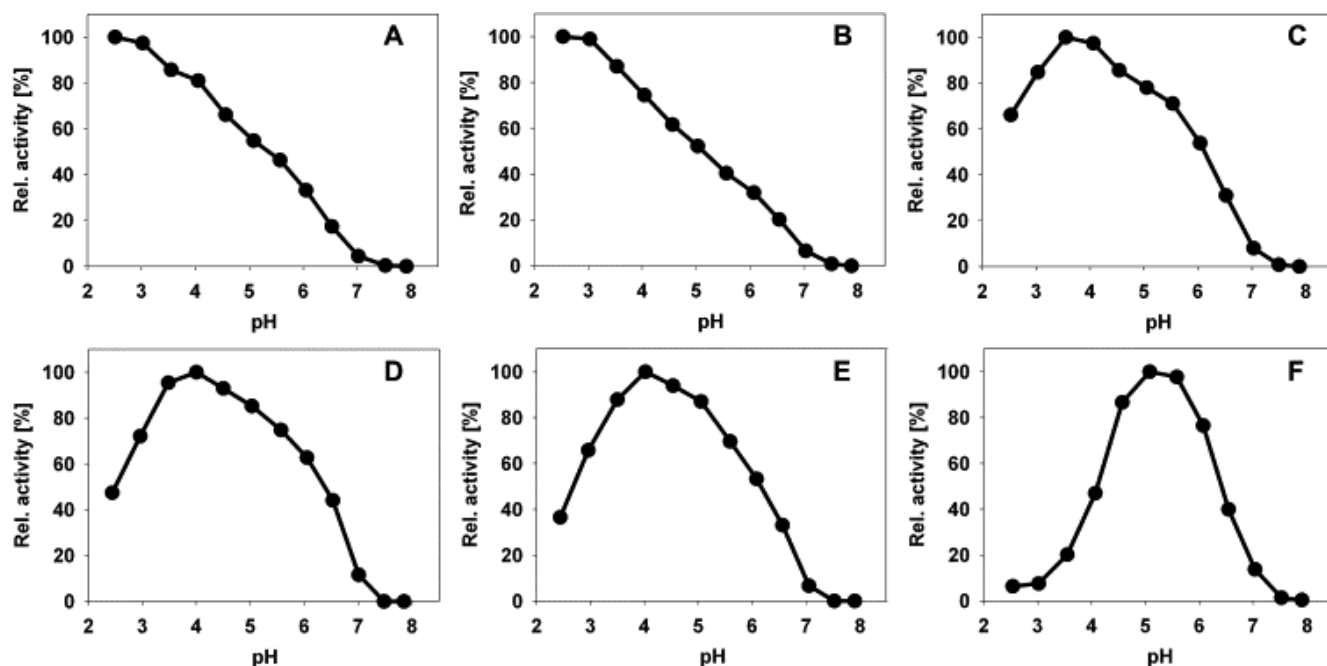


Рисунок 16. pH-зависимость скорости окисления АБТС(А), 2,6-ДМФ(Б), гваякола (С), пирокатехина (D), гидрохинона (Е) и *n*-анизидина (F), катализируемого BaL.

Таблица 10. Кинетические константы реакций окисления фенольных и нефенольных субстратов, катализируемых лакказой из *B. aclada* при оптимальном pH [3]

Субстрат	рН оптимум окисления субстрата	К _м (μМ)	k _{cat} (с ⁻¹)	k _{cat} /К _м (10 ⁶ М ⁻¹ с ⁻¹)
АБТС	3.0	2.9±0.4	108±9	37.2

2,6-ДМФ	3.0	19.2±1.6	45.6±1.4	2.4
Гваякол	4.0	73.3±3.3	29.4±1.7	0.40
Пирокатехин	4.0	139.1±8.6	59.3±4.9	0.43
Гидрохинон	4.0	90.8±6.5	39.5±1.0	0.44
<i>n</i> -Анизидин	5.0	592±36.7	112±2.1	0.19

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы

В работе использовались следующие реактивы: глицин Electrophoresis grade (MP Biomedicals Inc., США), глицерин (Sigma, США), персульфат аммония (ICN Biomedicals, США), хлорид натрия (Sigma, США), АБТС (Sigma, США), 2,6-ДМФ (Sigma, США), фторид натрия (MP Biomedicals, США), ЭДТА (Sigma, США), додецилсульфат натрия (GER-BU Traiding GmbH, Германия), сульфат аммония (ICN Biomedicals, США), полиэтиленгликоли различных молекулярных масс (Hampton Research, США), этанол (Химмед, Россия), ортофосфорная кислота (Химмед, Россия), маркеры молекулярных весов PageRuler Unstained Protein Ruler (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, США), краситель для идентификации белковых кристаллов Izit Dye (Hampton Research, США), красители Кумасси бриллиантовый синий R-250 и Кумасси синий G-250 (ICN Biomedicals, США), другие соли отечественного и зарубежного производства квалификации о.с.ч.(ХимМед, Россия) и Ultrapure (Sigma, США).

Все реагенты имели чистоту «для молекулярной биологии» либо не менее 99.0 %, если не указано другое.

2.2 Препараты лакказы из аскомицета *Botrytis aclada*, использованные в работе (объект исследования)

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 BOKU (Вена, Австрия). В его лаборатории были осуществлены гетерологическая экспрессия BaL и L499M BaL в дрожжах *Pichia pastoris*, хроматографическая очистка и дегликозилирование полученных ферментов.

Очистка препаратов BaL и L499M BaL проводилась по методике [3] в четыре стадии:

1. Высаживание лакказы из клеточного супернатанта сульфатом аммония
2. Очистка на гидрофобном сорбенте Phenyl sepharose
3. Очистка на гидрофобном сорбенте Phenyl source
4. Очистка на гель-фильтрационной колонке Superdex 75

В полученных препаратах лакказ было измерено содержание ионов меди масс-спектрометрически по соотношению Cu⁺/S согласно методике, разработанной в работе [135] (Таблица 11).

Для кристаллизации обе формы фермента были дегликозилированы с использованием эндогликозидазы Hf (New England BioLabs, США) и α -маннозидазы (Sigma, США) в соответствии с рекомендациями производителей. Очищенные препараты лакказ смешивали со смесью гликозидаз в соотношении 20 к 1 и инкубировали три часа при комнатной температуре. Очистку дегликозилированных форм от гликозидаз и гликозилированных форм фермента осуществляли на гель-фильтрационной колонке Superdex75. Фракции, содержавшие дегликозилированную форму лакказы, объединяли и концентрировали до ~20 мг/мл (Таблица 11). Концентрация измерялась по методу Брэдфорд.

Подготовленные таким образом препараты BaL, L499M BaL и дегликозилированных форм BaL и L499M BaL транспортировали из Вены в Москву при +4 °С в буфере: 100 мМ цитрат натрия pH 5.6, 100 мМ хлорид натрия, 100 мМ сульфат аммония, 500 мМ бетаин и 10 % об. глицерин.

Для препаратов BaL и L499M BaL д.х.н. С.В. Шлеевым (ИНБИ РАН) были измерены потенциалы T1 центра методом медиаторного спектроэлектрохимического редокс титрования в анаэробных условиях [136]. Потенциалы равны 720 и 580 мВ для BaL и L499M BaL, соответственно. Данные также приведены в таблице 11.

Таблица 11. Стартовые характеристики препаратов лакказ, использованных в работе

Название препарата	Концентрация белка, мг/ мл	Содержание ионов меди, моль Cu/ моль фермента	Редокс потенциал T1-центра
BaL	20	2.6	720
L499M BaL	20	2.5	580
BaL Дегликозилированная	20	не определяли	не определяли
L499M BaL Дегликозилированная	19	не определяли	не определяли

2.3 Определение лакказной активности

Активность лакказы измерялась спектрофотометрически в термостатируемой ячейке спектрофотометра Cary 100 (Varian, США) при 30°C по окислению 2 мМ АБТС ($\epsilon_{420}=36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) либо 1 мМ 2,6-ДМФ ($\epsilon_{469}=49600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) в 100 мМ цитратном буфере, pH 4.0 [137,138]. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, необходимое для получения 1 $\mu\text{моль}$ продукта в минуту.

pH-Профили активности были определены для обоих субстратов в диапазоне pH 2 - 8 в 100 mM цитрат-фосфатном буфере.

Кинетические константы были определены в 100 mM цитрат-фосфатном буфере при pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0. Концентрации субстратов варьировали в диапазоне 2 - 80 μ M для АБТС и 2 - 200 μ M для 2,6-ДМФ. Все измерения проводили в трех повторностях. Полученные кривые были аппроксимированы с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен методом нелинейной регрессии в Origin 8.0 (OriginLab, США).

Концентрации ингибиторов варьировали в диапазоне 1 – 1000 μ M для фторида натрия и 10 – 1000 mM для хлорида натрия. Величины I50 определяли как концентрации ингибиторов, при которых сохранялось 50 % исходной активности. Ингибирование проверяли в стандартных условиях (см. выше «Определение активности»).

2.4 Определение концентрации белка в растворе

Концентрацию гомогенных препаратов фермента в растворе определяли по поглощению на 280 нм с использованием рассчитанного из аминокислотного состава в программе ProtParam [139] коэффициента молярной экстинкции ($\epsilon_{280} \text{ BaL} = 125290 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Нативная форма и мутант имели одинаковый коэффициент экстинкции.

Независимо и непосредственно перед кристаллизацией измеряли концентрацию фермента по методу Брэдфорд [140]. Для каждого белкового образца измерение выполняли в трех повторах. Концентрацию фермента рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по бычьему сывороточному альбумину.

2.5 Гель-фильтрация ферментов

Дополнительную очистку белков перед кристаллизацией проводили методом гель-фильтрационной хроматографии на колонке Superdex200 10/300 с использованием хроматографической системы АСТА FPLC (GE Healthcare, США). Гель-фильтрацию проводили на предварительно уравновешенной буфером колонке со скоростью элюирования 0.5 мл/мин. Для определения влияния буфера на олигомерное состояние лакказ колонку уравнивали 25 mM ацетатом натрия, pH 5.0 или 50 mM цитратом натрия, pH 5.5. Помимо очистки гель-фильтрация использовалась для определения молекулярной массы лакказ в растворе.

Молекулярную массу олигомерных форм фермента рассчитывали из величины объема удерживания целевого белка по калибровочной кривой зависимости логарифма молекулярной массы от коэффициента распределения K_{av} . Величина K_{av} – характеризует долю сорбента с размером пор больше размеров белка [141]. Коэффициенты калибровочной кривой $\lg(M_m) = A \times K_{av} + B$, где M_m – молекулярная масса белка, рассчитаны из экспериментальных данных,

полученных для белков с известной молекулярной массой. Зависимость величины K_{av} от объема элюции имеет вид:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o},$$

где V_e - объема элюента, на котором вышел белок, V_t – полный объем колонки и V_o – объем элюента, на котором выходит голубой декстран (молекулярная масса > 2 МДа). В качестве стандартов при построении калибровочной кривой был использован набор белков для калибровки гель-фильтрационных колонок (GE Healthcare, США): ферритин (440 кДа), альдолаза (158 кДа), кональбумин (75 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоангидраза (29 кДа), рибонуклеаза (13.7 кДа).

2.6 Окрашивание SDS-PAGE гелей по углеводной части

Гомогенность препаратов лакказы контролировали методом денатурирующего электрофореза в 12.5 % полиакриламидном геле по Лэммли [142]. Для детекции белковых полос полиакриламидный гель окрашивался в растворе Кумасси R-250 в 7 % уксусной кислоте.

Для детекции гликопротеинов полиакриламидный гель, после завершения разделения, был окрашен с использованием набора для окрашивания гликопротеинов «Pierce glycoprotein staining kit» (Thermo scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя:

1. Гель отмыли 30 минут в 50 % этаноле.
 2. Два раза отмыли гель в 7 % уксусной кислоте при перемешивании
 3. На 15 минут перенесли гель в раствор окислителя (периодной кислоты) в 7 % уксусной кислоте
 4. Гель отмыли 2 раза в течение 5 минут 7 % уксусной кислотой при перемешивании
 5. Оставили гель в растворе восстановителя (фуксин кислый) на 15 минут при перемешивании
 6. Несколько раз отмыли гель 7 % уксусной кислотой
- Гликозилированные белки проявились на геле в виде фиолетовых полос.

2.7 Кристаллизация лакказы из *B. aclada* методом диффузии пара

Поиск условий кристаллизации осуществляли методом диффузии пара в варианте с сидячей каплей с использованием автоматизированной системы Rigaku CrystalTrak+Phoenix+Gallery 700 (Rigaku, Япония) и коммерческих наборов для кристаллизации белков: Index, Crystal Screen и Peg/Ion (Hampton Research, США). Эксперименты по кристаллизации проводили с использованием растворов BaL и L499M BaL с концентрацией 20 мг/мл в 25 mM натрий

ацетатном буфере, pH 5.0, или 50 мМ натрий цитратном буфере, pH 5.0. Капля состояла из 0.2 μ л противораствора и 0.2 μ л белка.

Оптимизация подобранных условий проводилась вручную методом диффузии пара в варианте «висячая капля» при 298 К. Для кристаллизации использовали 24-луночные планшеты «VDX Plate» (Hampton Research, США). Капли объемом 2 μ л состояли из равных объемов белкового раствора и противораствора. Оптимизацию проводили варьированием концентрации осадителя (1-2 М сульфата аммония или 10-45 % ПЭГ 3350/4000) и pH в диапазоне ± 2 от pH исходного условия. При оптимизации условий кристаллизации с противорастворами, содержащими ПЭГ и соли, дополнительно варьировали концентрацию соли (0.05-0.2 М) и ее состав ($\text{Li}^+/\text{Na}^+/\text{NH}_4^{2+}$)($\text{I}^-/\text{Cl}^-/\text{SO}_4^{2-}/\text{SCN}^-$ / ацетат/ цитрат).

Образование и рост кристаллов контролировали с помощью поляризационного микроскопа (Nikon, Япония), снабженного фотокамерой, передающей изображение на компьютер.

2.8 Получение комплексов лакказы из *B. aclada* методом вымачивания кристаллов

Комплексы BaL с Cu^+ и Cu^{2+} были получены путем вымачивания кристаллов BaL в противорастворе, дополнительно содержащем 0.6 мМ (насыщ) CuCl (комплекс BaLCu^+) или 10 мМ CuSO_4 (комплекс BaLCu^{2+}). Время настаивания с CuSO_4 составило 1 сутки. Вымачивание в CuCl ухудшало качество кристаллов, что было заметно при наблюдении кристаллов в микроскоп. Поэтому время настаивания ограничили 10 минутами.

Комплекс BaL с 2,6-ДМФ был получен путем вымачивания кристаллов BaL в противорастворе, содержащем 2,6-ДМФ в насыщающей концентрации 125 мМ. Кристаллы быстро окрашивались в оранжевый цвет, который постепенно становился интенсивнее. После 30 минут дальнейшее изменение цвета не наблюдалось. Поэтому время настаивания ограничили 40 минутами.

2.9 Сбор дифракционных данных и решение структур

Наборы дифракционных данных были собраны на станции «Белок» Курчатовского Центра Синхротронного Излучения при 100 К на длине волны 0.98 Å с использованием CCD-детектора Rayonix SX165 (США). Для сбора дифракционных данных в криогенных условиях кристаллы были перенесены на 5 сек в противораствор, содержащий помимо осадителя 20 % об. глицерина, и заморожены до 100 К в струе азота.

Все собранные наборы дифракционных данных были обработаны с использованием

пакета XDS [143]. Все кристаллы принадлежали к пространственной группе C2 и имели сходные параметры элементарной ячейки (Таблица 12).

Поиск стартовой модели для решения структуры методом молекулярного замещения проводили в программе BALBES [144] по первичной структуре и дифракционным данным BaL. Кристаллы L499M BaL, BaLCu⁺ и BaLCu²⁺ были изоморфны кристаллам BaL. Все кристаллографические расчеты были выполнены в пакете CCP4 [145]. Структуры были уточнены с использованием программы REFMAC5 [146]. Заселенности ионов меди активного центра уточнялась вручную, так как при полной заселенности ионов меди на картах электронной плотности появлялись пики отрицательной электронной плотности. Постепенное снижение заселенности ионов меди с шагом 0.1 проводилось до тех пор, пока не пропали пики отрицательной электронной плотности. После уточнения заселенностей ионов меди температурные факторы ионов меди и их лигандов сравнивались. На заключительных этапах уточнения (после коррекции заселенностей) проводилось анизотропное уточнение температурных факторов всех ионов меди в случае BaL, BaLCu²⁺ и L499M BaL.

Визуальное инспектирование и ручную перестройку модели проводили с использованием программы COOT [147]. Молекулы растворителя были добавлены в структуры вручную на основе анализа разностных карт электронной плотности. Качество финальных структур проверяли с использованием программ SFCHECK [148] и PROCHECK [149]. Ошибка в координатах определена по Крушанку [150] в REFMAC5. Анализ упаковки лакказы в кристалле проводили в программе PISA [104]. Все иллюстрации были подготовлены с использованием CCP4MG [151] и PYMOL 1.6 (Shrodinger LLC, нет публикации). Анализ графика Рамачандрана проводился в MOLPROBITY [152].

Для определения из первичной структуры молекулярной массы, коэффициента экстинкции ϵ_{280} и pI использовалась программа ProtParam [139]. Выравнивание аминокислотных последовательностей осуществляли в CLUSTALW2 [153]. Расчет r.m.s.d. осуществляли функцией align в PYMOL.

Таблица 12. Статистические характеристики наборов дифракционных данных и уточнения структур. В скобках указаны величины для слоя с наивысшим разрешением

	BaL	L499M BaL	BaLCu ⁺	BaLCu ²⁺	BaL+ДМФ
--	-----	-----------	--------------------	---------------------	---------

Код PDB	3SQR	3V9E	4X4K	----	----
Пространственная группа симметрии	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	a=70.1, b=114.9, c=79.7, β=107.9
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)	30–1.98 (1.98–2.10)
I/σ	16.1 (2.1)	16.1 (2.8)	16.3 (2.3)	20.8 (5.1)	13.4 (2.9)
Полнота набора (%)	96.3 (90.6)	97.4 (95.2)	96.7 (94.6)	96.1 (90.5)	92.0 (72.6)
Общее число отражений	181887 (24180)	199830 (31000)	81583 (12203)	124585 (16545)	102011 (11178)
Число уникальных отражений	65731 (9904)	62839 (9875)	25106 (3913)	50252 (7615)	38357 (4839)
Избыточность	2.8 (2.4)	3.2 (3.1)	3.3 (3.1)	2.5 (2.2)	2.7 (2.3)
*R _{meas} (%)	4.7(53.1)	6.5(54.0)	7.1(60.0)	3.9 (23.0)	6.9 (42.0)
Уточнение					
R _{cryst} (%)	16.6(28.0)	16.5(24.5)	18.1 (27.8)	16.2 (24.1)	18.1 (28.3)
R _{free} (%)	19.1(29.0)	20.0(28.2)	23.3 (34.7)	20.4 (30.2)	22.6 (35.3)
Отклонение от идеальных значений:					
Длины связей (Å)	0.021	0.017	0.011	0.016	0.012
Углы между связями (°)	1.91	1.97	1.62	1.92	1.68
Число атомов					
Белок	4206	4187	4087	4208	4209
Сu	3	3	5	3	3
вода	445	305	155	429	293
остальное	197	164	197	197	210

График Рамачандрана					
Наиболее благоприятная область (%)	96.8	96.8	96.2	96.8	96.6
Разрешенная область (%)	3.2	3.2	3.6	3.2	3.4
Температурные факторы ($\text{\AA}^2$)					
белок	28.3	23.4	38.6	23.3	32.2
Си	26.7	24.6	38.3	21.2	29.4
вода	34.7	28.1	35.8	29.8	34.8
остальное	39.0	35.3	58.9	37.7	50.0

$$*R_{meas} = \frac{\sum_{hkl} \sqrt{\frac{n_{hkl}}{n_{hkl}-1}} \sum_{j=1}^n |I_{hkl,j} - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_j I_{hkl,j}}, \text{ где } I_{hkl,j} - \text{интенсивность } j\text{-го наблюдения отражения с}$$

индексами hkl , $\langle I_{hkl} \rangle$ - средняя интенсивность отражения и n_{hkl} - избыточность отражения с индексами hkl [154]

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ:

3.1 Молекулярные свойства препаратов лакказы из *B. aclada* и её мутанта Leu499Met

Рассчитанная из аминокислотной последовательности молекулярная масса BaL равна ~62 кДа. По данным SDS-PAGE препараты BaL и L499M BaL содержали белок с одинаковой молекулярной массой ~110 кДа и чистотой 95 % (Рисунок 17).

Разность между рассчитанной из последовательности и экспериментально определенной массами BaL можно объяснить гликозилированием фермента. После дегликозилирования масса белка уменьшилась со 110 до 70 кДа по данным электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (Рисунок 17).

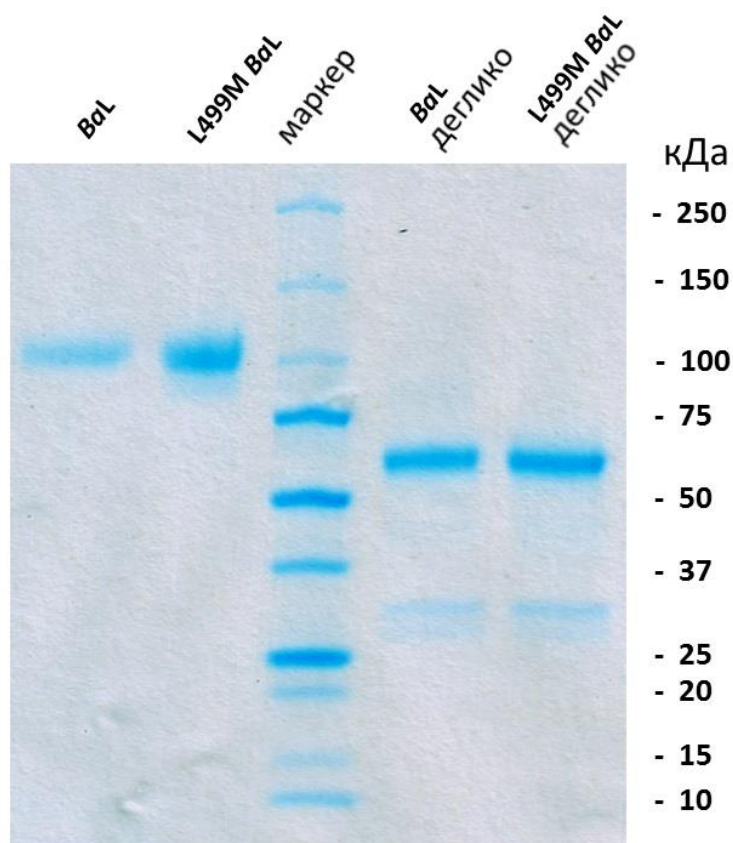


Рисунок 17. Полосы BaL (первая слева), L499M BaL (вторая слева) и их дегликозилированных форм (четвертая и пятая полосы слева, соответственно) в полиакриламидном геле после SDS-PAGE, окрашенные Кумасси синим R-250. Маркер молекулярных масс на третьей дорожке.

Окрашивание полиакриламидного геля после SDS-PAGE, по гликопротеинам показало, что небольшое количество сахаров осталось в дегликозилированных формах BaL и L499M BaL (Рисунок 18). Рассчитанная из экспериментальных данных масса углеводной части в BaL составляет 38 кДа или 38 % масс., а в дегликозилированном препарате BaL и L499M BaL 8 кДа или 11 % масс.

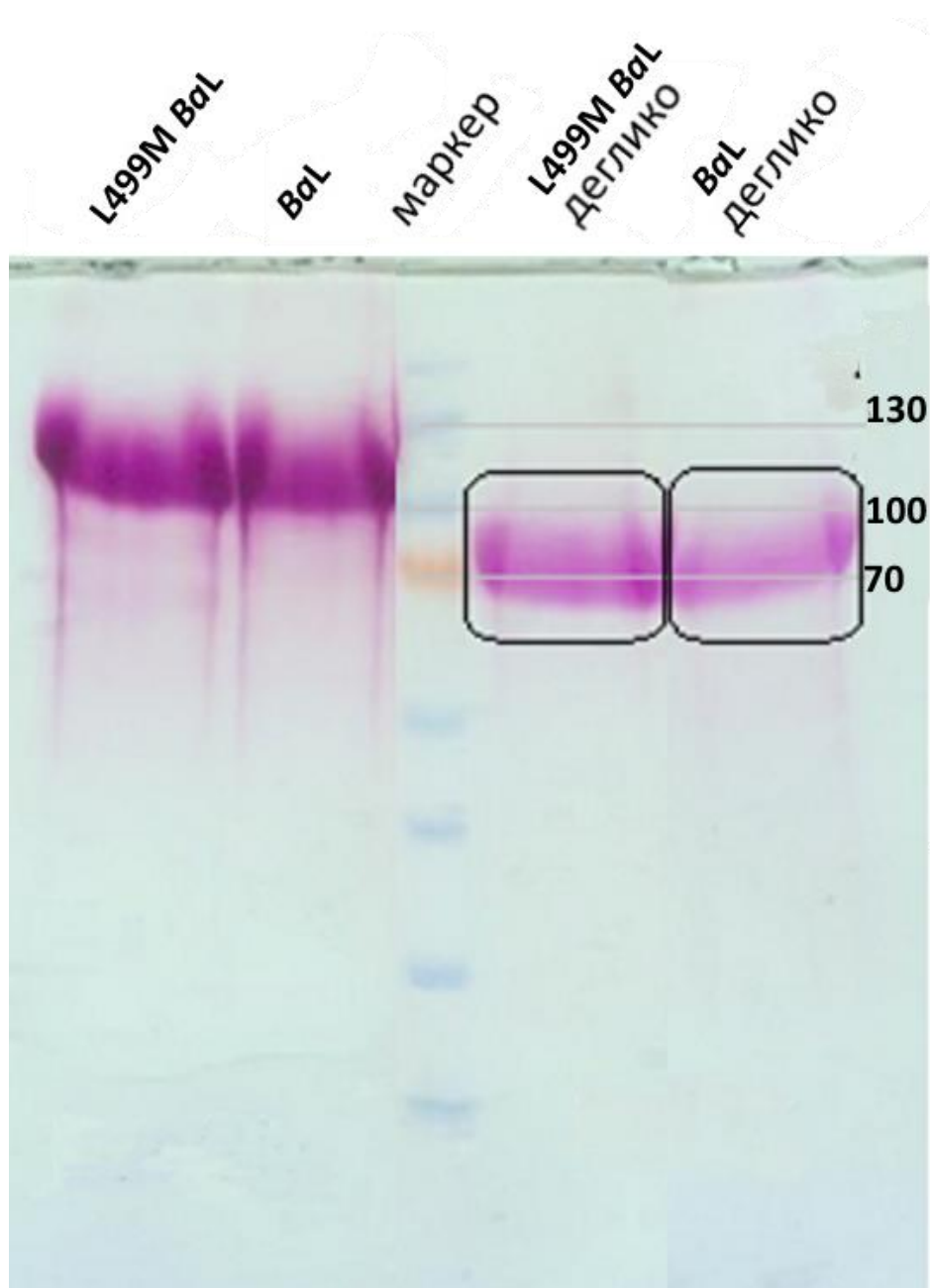


Рисунок 18. Полиакриламидный гель после SDS-PAGE, окрашенный по углеводам. Полосы L499M BaL (1-ая слева), BaL (2-ая слева) и их дегликозилированных форм (4-ая и 5-ая полосы слева, соответственно). Полоса 3 – маркер молекулярных весов.

3.2 Сравнительная характеристика кинетических свойств лакказы из

B. aclada и её мутанта Leu499Met

Редокс потенциалы T1 центра BaL и L499M BaL, равные соответственно 720 и 580 мВ, были измерены С.В. Шлеевым. Измерение проводилось методом медиаторного спектроэлектрохимического редокс титрования в анаэробных условиях [82]. BaL относится к высокопотенциальным лакказам, что нехарактерно для лакказ из аскомицетов.

Для сравнительной характеристики каталитических свойств BaL и L499M BaL использовали наиболее специфичные для BaL субстраты: АБТС и 2,6-ДМФ (Таблица 10). С этими субстратами была измерена pH-зависимость удельной активности обоих препаратов (Рисунок 19), из которой следует, что pH-оптимумы реакций окисления обоих субстратов, катализируемых BaL, и pH-оптимум реакции окисления АБТС, катализируемой L499M BaL, лежат в кислой области pH. При pH 7 скорость этих реакций близка к нулю. В интервале pH 2.5-8 скорость реакции, катализируемой BaL, выше скорости той же реакции, катализируемой L499M BaL. Этот результат согласуется с более высоким редокс потенциалом T1 центра BaL.

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

Для более подробного исследования роли pH в регуляции каталитической активности BaL и L499M BaL было проверено влияние pH на величину кинетических констант K_m и V_{max} в интервале pH 3 – 6 (Таблица 13). Из полученных результатов следует, что 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 . Интересно, что константы Михаэлиса для АБТС и 2,6-ДМФ изменяются с ростом pH в противоположных направлениях: для АБТС K_m растет с ростом pH в 30 – 56 раз, а для 2,6-ДМФ падает в 12 - 22 раза, как следствие эффективность катализа (V_{max}/K_m) для АБТС монотонно падает, а для 2,6-ДМФ растет до pH 5, после чего снижается (BaL) или практически не изменяется (L499M BaL) (Таблица 13).

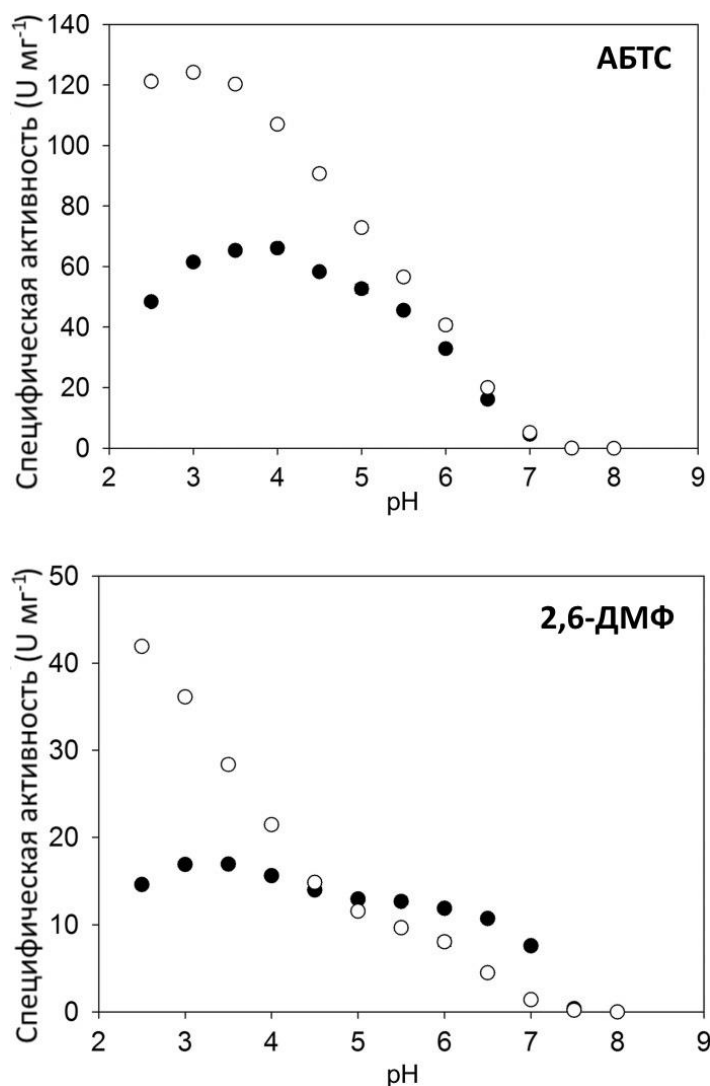


Рисунок 19. Профиль pH-зависимости специфической активности BaL (○) и L499M BaL (●) при использовании ABTS и 2,6-ДМФ. Условия эксперимента: 100 мМ цитрат-фосфатный буфер pH 2.5 – 8.0, концентрация ABTS 2 мМ, 2,6-ДМФ – 1 мМ, 30 °С.

Для лакказ из *T. villosa* и *M. thermophila* показано, что при росте pH Км нефенольных субстратов растёт, а Км фенольных субстратов снижается [56]. Подобная pH-зависимость Км объясняется редокс свойствами и особенностями связывания окисляемого субстрата [56]. Редокс потенциал фенольных субстратов зависит от pH, а нефенольных субстратов – не зависит. Кроме того, окисление лакказой нефенольных субстратов не подразумевает протонирования субстрата или продукта, в случае фенольных субстратов окисление может включать pH-зависимую стадию протонирования субстрата или образующегося продукта. Как будет показано далее (см. раздел 3.9) BaL и L499M BaL имеют одинаковое строение, следовательно отличия в pH-зависимости активности между BaL и L499M BaL можно связать с различиями в редокс потенциале Т1 центра. По аналогии с малыми белками-переносчиками электронов изменение pH-зависимости каталитической эффективности мутанта L499M BaL

можно объяснить связью между редокс потенциалом Т1 центра и рКа экспонированного в растворитель гистидина – лиганда Т1 центра [155] и разницей в редокс потенциалах Т1 центра и Т2/Т3 кластера [56].

рН-Зависимость величины $V_{\max}$, как и в случае лакказ из базидиомицетов, вероятнее всего объясняется нарушением внутримолекулярного электронного переноса между Т1 центром и Т2\Т3 кластером из-за связывания OH^- с ионом меди Т2 [56].

Таблица 13. Кинетические константы *BaL* и *L499M BaL* для АБТС и 2,6-ДМФ при различных рН

Субстрат	АБТС						
Фермент		<i>BaL</i>			<i>L499M BaL</i>		
	рН	К _м , μM	$V_{\max}$, U мг^{-1}	$V_{\max}/\text{К}_m \times 10^6$ $\text{U M}^{-1} \text{ мг}^{-1}$	К _м , μM	$V_{\max}$, U мг^{-1}	$V_{\max}/\text{К}_m \times 10^6$ $\text{U M}^{-1} \text{ мг}^{-1}$
	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

3.3 Первичная структура лакказы из *B. aclada*

Идентичность первичной структуры для *BaL* и наиболее гомологичных структурно-охарактеризованных представителей лакказ из бактерий и грибов приведена в таблице Таблица 14. Лакказа из аскомицета *M. albomyces* имеет наибольшую идентичность (42 %) с *BaL* среди лакказ с известными структурами. Для лакказ из базидиомицета *T. hirsuta* и бактерии *B. subtilis*

идентичность последовательностей с BaL равна 36 и 28 %.

Таблица 14. Идентичность первичных структур BaL и лакказ с известной пространственной структурой

Организм(код PDB)	Число аминокислотных остатков	Идентичность, %
Аскомицеты		
<i>B. aclada</i> (---)	543	100
<i>M. albomyces</i> (2Q9O)	559	42
Базидиомицеты		
<i>T.hirsuta</i> (3FPX)	499	36
Бактерии		
<i>B.subtilis</i> (1GSK)	502	28

На рисунке Рисунок 20 приведено выравнивание аминокислотных последовательностей BaL и лакказ из аскомицета *M. albomyces* [65], базидиомицета *T. hirsuta* [100] и бактерии *B. subtilis* [52]. Аминокислотная последовательность BaL приведена с сигнальным пептидом. При созревании белка отщепление сигнального пептида происходит по пептидной связи между остатками Ala19 и Ser20 [3]. В аминокислотной последовательности BaL присутствуют четыре медь-связывающих мотива. В аминокислотной последовательности в позициях, соответствующих аксиальным положениям T1 центра у гомологичных белков, расположены остатки Leu499 (вариабельный) и Ile491 (консервативный). В структуре BaL С-концевой пептид DSGI гомологичен С-концевому пептиду DSGL в MaL. Замены в этом тетрапептиде влияют на кинетические свойства MaL [121]. В аминокислотной последовательности BaL было найдено 9 потенциальных сайтов N-гликозилирования с аминокислотной последовательностью NXS/T. На рисунке Рисунок 20 отмечены только те остатки Asn, которые в структуре содержали связанные углеводные цепи.

B.aclada	-----SCANSATSRSCWGE-YSIDTNWYDVTP-TGVTREYW--LSVENSTITPDGYTR-SAMTFNGTVPGPAILIADWGD----NLIIHVTNNL
M.albomyces	-----EPTC-NTPSNRACWSGDGFDINTDYEVSPTDGTQSYVFNLTVEVDNWMGPDGVVKEKVMLINGNIMGPNIVANWGD----TVEVTVINNL
T.hirsuta	-----A-VGPVAD---LTITDAAVSPDGFSSR-QAVVNGVTPGPLVAGNIGDRFQLNVIDNLTNHT
B.subtilis	TLEKFVDALPIPDTLKPV--Q-QSKEKTYEVTM-EECTHQLH--RDLPPTRLW--GY-----NGLFPGPTIEVKRNE----NVYVKWMNNL
B.aclada	-----EHN-----GTSIHWHGIRQLGSLEYDGVPGVTQCPIAP-GDTLTY-----KFQV-TQY-----GTTWYHSH---
M.albomyces	-----VTN-----GTSIHWHGIQKDTNL-HDGANGVTECPIPPKGGQRTY-----RWRA-RQY-----GTSWYHSH---
T.hirsuta	-----MLK-----STSIHWHGFFQHGTNWADGPAFINQCPISP-GHSFLY-----DFQVPDQA-----GTFWYHSH---
B.subtilis	PSTHFLPIDHTIHEPEVKTVVHLHG-----GVT-----P-DDSDGYPEAWFSKDFEQTGPYFKREV-YHYPNQQRGAILWYHDHAMA
B.aclada	-FSLQYGDGLFGPLIINGP-----ATADYDE-DVGVIIFLDWAHESVFEIWDTARLGA--PPALENTLMNGTNTFDCSASTDPNCVGGGKKFELT
M.albomyces	-FSAQYGNVVGTIQINGP-----ASLPYDI-DLGVFPITDYYYRAADDLVHFTQNNA--PPFSDNVLINGT-----AVNPN-TGEGQYANVT
T.hirsuta	-LSTQYCDGLRGPFVYDPNDPHASRYDVDN-DDTVITLADWYHTA-----AKLGPRFPGGADATLINGKG----RAPSD-----SVAELS
B.subtilis	LTRLNVYAGLVGAYIIHDPKEKR-LKLPSDEYDVPLLTIDRTINED-----GSLFY--PSAPENPSPSLPNPSIVPAFCGETILVNGKVWPYL
B.aclada	-----VPYTT--DTLLIGIGQRYDVIVEANAAADNYWIR-----GNWG--TTC--STNNEAANATGILRYDSSSI--ANPTSVGTT---P-RGT
M.albomyces	-----NAMTV--DSLFLAVGQRYDVVIDASRAPDNYWFN-----VTFGGQAACGGSNLNHPA--AIFHYAGAPG--GLPTDEGTP---PVDHQ
T.hirsuta	-----QPLEV--DSIQIFAAQRYSFVLDANQAVDNWIRANPNFNGVG--FDG--GIN-----SAILRYDGAPA--VEPTTNQTTSVKPLN-E
B.subtilis	GSDGGLLPRSVKLNFSFLAPAERYDIIIDFTA-----YEGESIILANSAGCG-----GD
B.aclada	CEDE-----PVASLV-----PH-----LALD-----VGGY-SLVDEQVSSAF----TNYFTWTINSSS---LLLD---WSSPTTL
M.albomyces	CLDTLDVRPVVPRSPVNSFV-----KRPDNTLPVALD-----LTG-----TPLFVWKVNGSD---INVD---WGKPIID
T.hirsuta	VDLH-----PLVSTP-----VP-----GSPS-----SGG---VDKAINMAFNFNNGSNFF---INGAS---FVPP---TVPVLL
B.subtilis	VNPE-----TDANIMQFRVTKPL-----AQKDESRKPKYLASYPSVQHERIQNIR---TLKLAGTQDEYGRPVLNKRWHDPVT-
B.aclada	KIFN----NET-IFPTEYNVVALEQ-EEWVVYVIE-DLTG-F-----GIWHPIHLHGHGDFIV-AQET-D-----VFNSDES--
M.albomyces	YILTG---NTS--YPVSDNIVQVDAVDQWTYWLIENDPEGPF-----SLPHPMHLHGHDFLVL-GRSP-DVPAASQORFVFDPAVD--
T.hirsuta	QILSGAQTAQD--LLPS-----GSVYVLP-SNAS-IEISFPATAAAGAPHPFHHLHGHTFAVVRSGS-T-----VYNYD----
B.subtilis	-----ETPKVGTTEI-----W--SIIN-PTRG-----THPIHLHLVSFRVL-DRRPF-----IARYQESGE
B.aclada	-----PAKFNLVNPPR-----RDVAA--LPGNG-YLAIAFKLDNP--GSWLLHCHIAWHASEGL--AMQFVESQSSI--AVKMTDTAIFEDTCAN
M.albomyces	-----LARLNGDNPPR-----RDTTM--LPAGG-WLLLAFRDNDP--GAWLFHCHIAWHVSGGL--SVDFLERPADLRQRISQEEDDDFNRCDE
T.hirsuta	-----NPIF-----RDVVSTGTPAAGDNVTIRFDTNPNP--GPWFLHCHIDFHLEGGF--AVVMAEDTPDV--KAVNPVPQAWSDLCP
B.subtilis	LSYTGPA---VPPPPSEKGWKDTIQ--AHAGE-VLRIAATF-GPYSGRYVWHCHILEHEDYDMMRPMDITD-----
B.aclada	WNAYTPTQLFAEDDSGI
M.albomyces	WRAYWPTNPYPKIDSGL
T.hirsuta	YDALDPNDQ-----
B.subtilis	-----

Рисунок 20. Выравнивание аминокислотных последовательностей BaL, лакказы из аскомицета *M. albomyces*, лакказы из базидиомицета *T. hirsuta* и бактериальной лакказы из *B. subtilis*. Лиганды T1, T2 и T3 центров отмечены красным, зеленым и синим цветом соответственно. Аксиальные остатки T1 центра отмечены розовым. Сайты N-гликозилирования отмечены бирюзовым. С-концевой пептид отмечен серым цветом.

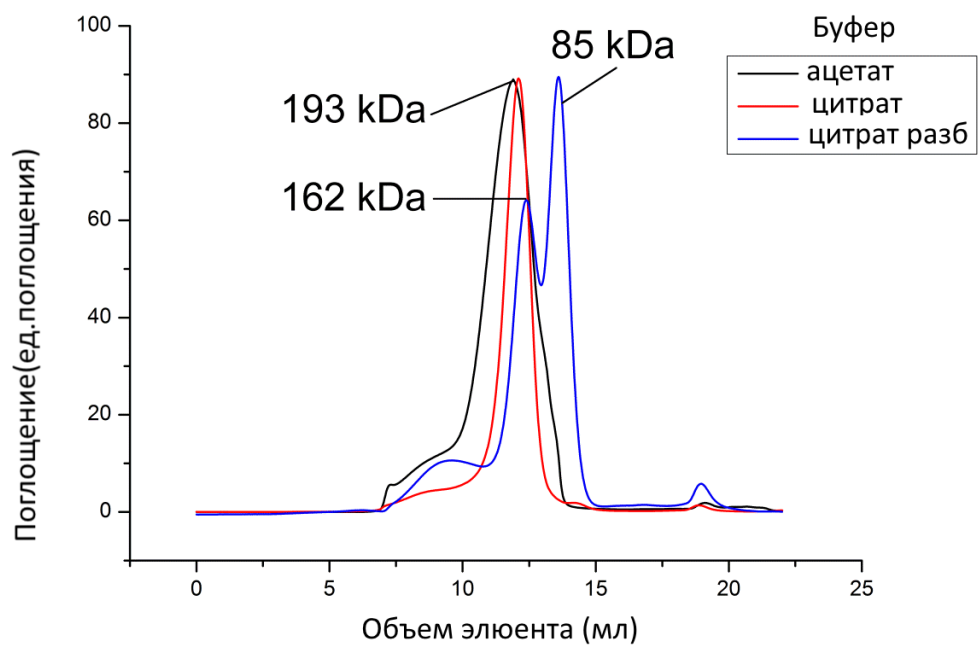
3.4 Определение олигомерного состава лакказы из *B. aclada* методом гель-фильтрации

Для определения молекулярной массы лакказы из *B. aclada* в растворе и доочистки препаратов для кристаллизации использовался метод гель-фильтрации на хроматографической колонке Superdex 200 10/300. В качестве буфера для уравнивания хроматографической системы использовали 25 мМ ацетат натрия, pH 5.0, или 50 мМ цитрат натрия, pH 5.5.

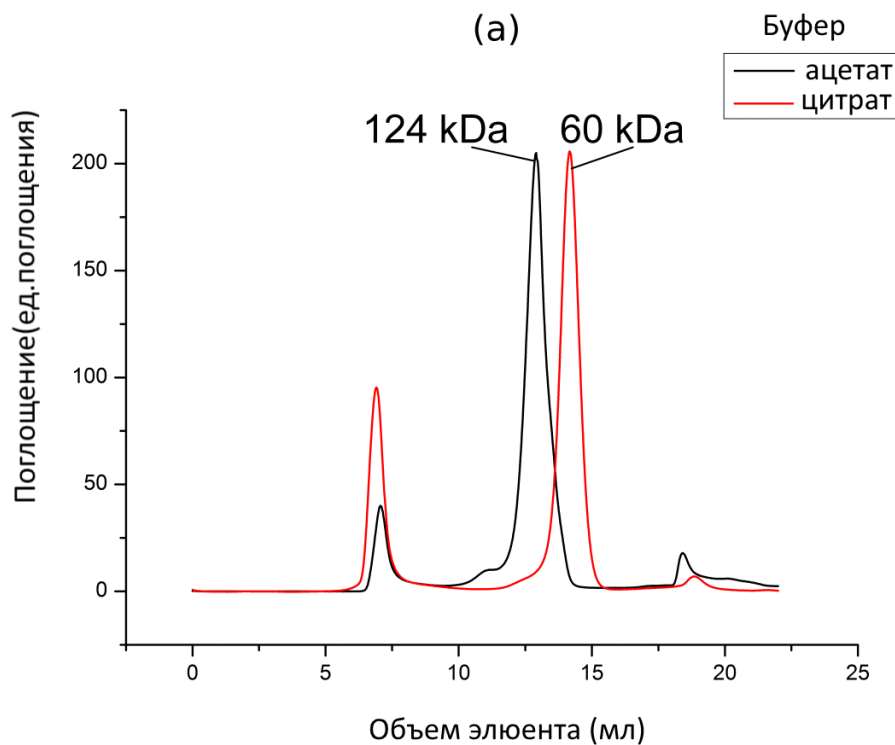
В 25 мМ ацетате натрия, pH 5.0, BaL находится в димерном состоянии с молекулярной массой 193 кДа (Рисунок 21а черная кривая). Дегликозилированная форма BaL выходит двумя мажорными пиками. Один из пиков соответствует высокомолекулярным агрегатам, а другой пик соответствует димеру с молекулярной массой 124 кДа (Рисунок 21б черная кривая).

Результат гель-фильтрации BaL в 50 мМ цитрате натрия, pH 5.5, приведен на рисунке (Рисунок 21). При нанесении на гель-фильтрационную колонку концентрированного препарата BaL (концентрация белка 20 мг/мл) белок находится в димерном состоянии с молекулярной массой димера около 190 кДа (Рисунок 21 красная кривая). Если исходный препарат BaL разбавляли цитратным буфером до концентрации 2 мг/мл и инкубировали около 20 минут, то полученный препарат сходил с колонки в виде смеси димер-мономер с молекулярными массами 162 и 85 кДа, соответственно (Рисунок 21 синяя кривая). Дегликозилированная форма BaL в этих условиях элюировалась в виде мономера с молекулярной массой 60 кДа.

В цитратном буфере BaL может существовать в виде смеси димер-мономер. Кроме того, на профиле элюции дегликозилированной формы BaL видно, что соотношение высокомолекулярных агрегатов, которым соответствует пик на 7 мл, и мономера(димера) выше для цитратного буфера. Следовательно в цитратном буфере фермент имеет большую полидисперсность, чем в условиях с ацетатным буфером. Полидисперсность белковых образцов считается фактором, затрудняющим кристаллизацию белков. Действительно, при кристаллизации BaL кристаллы удалось получить только при использовании ацетатного буфера. Поиск условий кристаллизации BaL при использовании цитратного белкового буфера был безуспешен.



(a)



(b)

Рисунок 21. Гель-фильтрация BaL (концентрация 20 мг/мл) на гель-фильтрационной колонке Superdex 200 10/300 GL, уравновешенной 25 мМ ацетатом натрия, pH 5.0 (ацетат - черные линии) или 50 мМ цитратом натрия, pH 5.5 (цитрат - красные и синяя линии). Цитрат разб – предварительно разбавленный цитратным буфером препарат BaL (концентрация 2 мг/мл). Верхняя панель а: BaL; нижняя панель б: дегликозилированная форма BaL. Молекулярные массы пиков рассчитаны из калибровочной кривой.

3.5 Кристаллизация лакказы из *B. aclada* и её мутанта Leu499Met

Гликозилированная форма BaL кристаллизовалась в виде тонких пластин при использовании противораствора состава 25 % ПЭГ 3350, 0.2 М хлорид натрия, 0.1 М ацетат натрия, pH 4.6. Оптимизировать эти условия кристаллизации с целью получения кристаллов большего размера, пригодных для рентгеноструктурного анализа, не удалось. Попытка кристаллизации гликозилированной формы L499M BaL не предпринималась.

Небольшие кристаллы дегликозилированной формы BaL были получены в условиях Crystal Screen A4, A10, C8, D11 и E5. Небольшие кристаллы дегликозилированной формы L499M BaL были получены в условиях Index F10 и Crystal Screen A9, B8 и F3. Состав этих условий приведен в таблице (Таблица 15).

Таблица 15. Исходные условия, в которых были получены кристаллы лакказ

Лакказа	Препарат лакказы	Состав противораствора		
		Осадитель	Буфер	Добавка
BaL	20 мг/мл белок; 25 mM ацетат натрия, pH 5.0	2.0 М сульфат аммония	0.1 М Трис, pH 8.5	-
		30 % масс. ПЭГ 4000	0.1 М ацетат натрия, pH 4.6	0.2 М ацетат аммония
		2.0 М сульфат аммония	-	-
		2.0 М сульфат аммония	0.1 М ацетат натрия, pH 4.6	-
		2.0 М сульфат аммония,		5% об. изопропанол
L499M BaL	20 мг/мл белок; 25 mM ацетат натрия, pH 5.0	30 % масс. ПЭГ 4000	0.1 М цитрат натрия, pH 5.6	0.2 М ацетат аммония
		25 % масс. ПЭГ 4000	0.1 М ацетат натрия, pH 4.6	0.2 М сульфат аммония
		1.0 М сульфат лития, 0.5 М сульфат аммония	0.1 М цитрат натрия, pH 5.6	-
		25 % масс. ПЭГ 3350	0.1 М Бис-Трис, pH 5.5	0.2 М хлорид натрия

С целью получения кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа, была проведена оптимизация найденных условий кристаллизации. Пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы дегликозилированной формы BaL были получены

при использовании в качестве противораствора 1.8 М сульфата аммония в воде (Рисунок 22). Для дегликолизированной формы L499M BaL монокристаллы были получены с использованием в качестве противораствора 1.0 М сульфата лития, 0.5 М сульфата аммония в 0.1 М цитрате натрия, pH 5.5. В обоих случаях кристаллы появлялись на третий день и росли до максимального размера 0.2x0.1x0.05 мм в течение месяца.

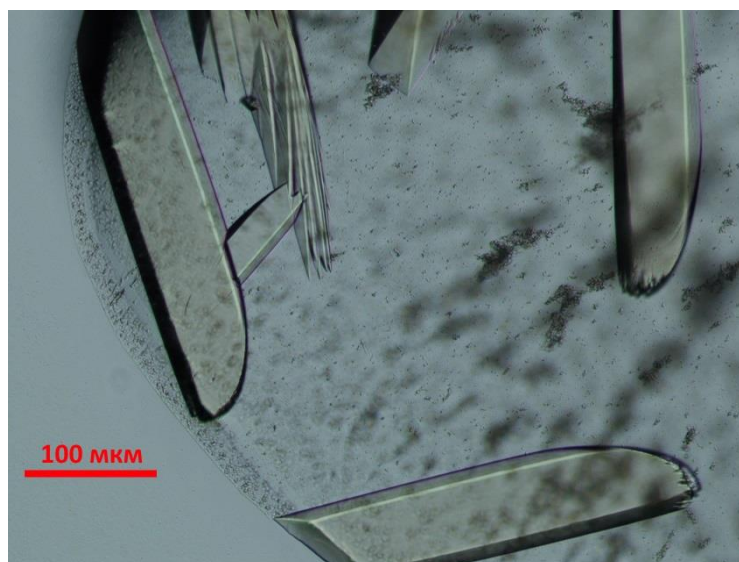


Рисунок 22. Монокристаллы дегликозированной BaL, полученные в 1.8 М сульфате аммония.

Кристаллы дегликозированной BaL в течение месяца после появления постепенно теряют свою голубую окраску и приобретают грязно-желтый оттенок (Рисунок 22, Рисунок 23). Для кристаллов мутантной формы обесцвечивание не наблюдалось. Обесцвечивание лакказ может быть связано с восстановлением T1 центра. Однако, в кристаллизационной капле кроме BaL содержались только ацетат натрия и сульфат аммония. С другой стороны, известно, что при агрегации препараты лакказ могут обесцвечиваться, даже если раствор не содержал восстановителей [156]. В работе [156] обесцвечивание препаратов фермента связывается с автовосстановлением лакказ, протекающим при их агрегации.

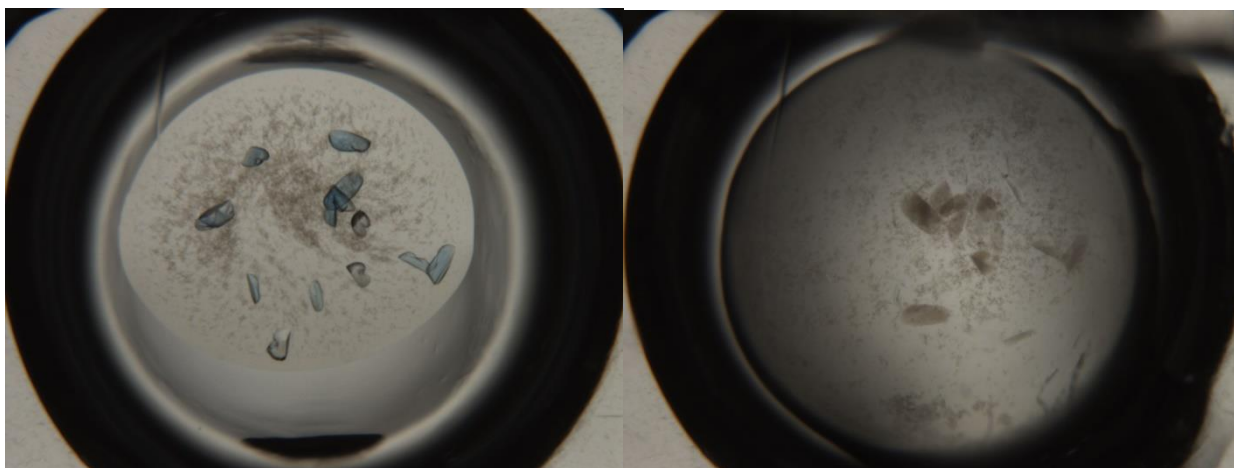


Рисунок 23. Кристаллы BaL, выращенные в 2 М сульфате аммония, 5% об. изопропанола. Левая панель: фото, полученное через три дня после появления кристаллов, справа: фото в тех же условиях через две недели.

3.6 Пространственная структура лакказы из *B. aclada*

Кристаллы BaL и L499M BaL принадлежат пространственной группе симметрии C2 со сходными параметрами элементарной ячейки (Таблица 12). Структуры BaL и L499M BaL, BaLCu^{2+} и BaLCu^+ были решены с разрешением 1.67 и 1.7, 1.8 и 2.3 Å, соответственно (см. Материалы и методы). Все структуры похожи на структуру BaL и могут быть совмещены с ней по координатам всех Cα 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 BaL; 3V9E для L499M BaL и 4X4K для BaLCu^+ . Структура BaLCu^{2+} ничем не отличалась от структуры BaL, поэтому в PDB не депонировалась.

Структура мономера BaL приведена на рисунке 24. Фермент состоит из 543 аминокислотных остатков. Остатки 405-408 не были локализованы на карте электронной плотности во всех структурах. Структура BaL содержит три купредоксин-подобных домена: I (Ser1-Pro151), II (Ala152-Leu343) и III (Ala344-Ile543).

Каждый домен имеет сходную β-сандвичевую укладку полипептидной цепи. Укладка полипептидной цепи BaL аналогична укладке других трехдоменных лакказ и аскорбатоксидазы [157]. В структуре BaL локализовано три атома меди: один расположен в T1 центре и два в T3 центре. К T2/T3 кластеру от поверхности белка ведут два канала. Каналы образованы остатками, принадлежащими доменам I и III. Как и в структурах лакказ из *M. albomyces* [65] и *T. arenaria* [30] канал со стороны T3 ионов меди прикрыт C-концевым тетрапептидом.

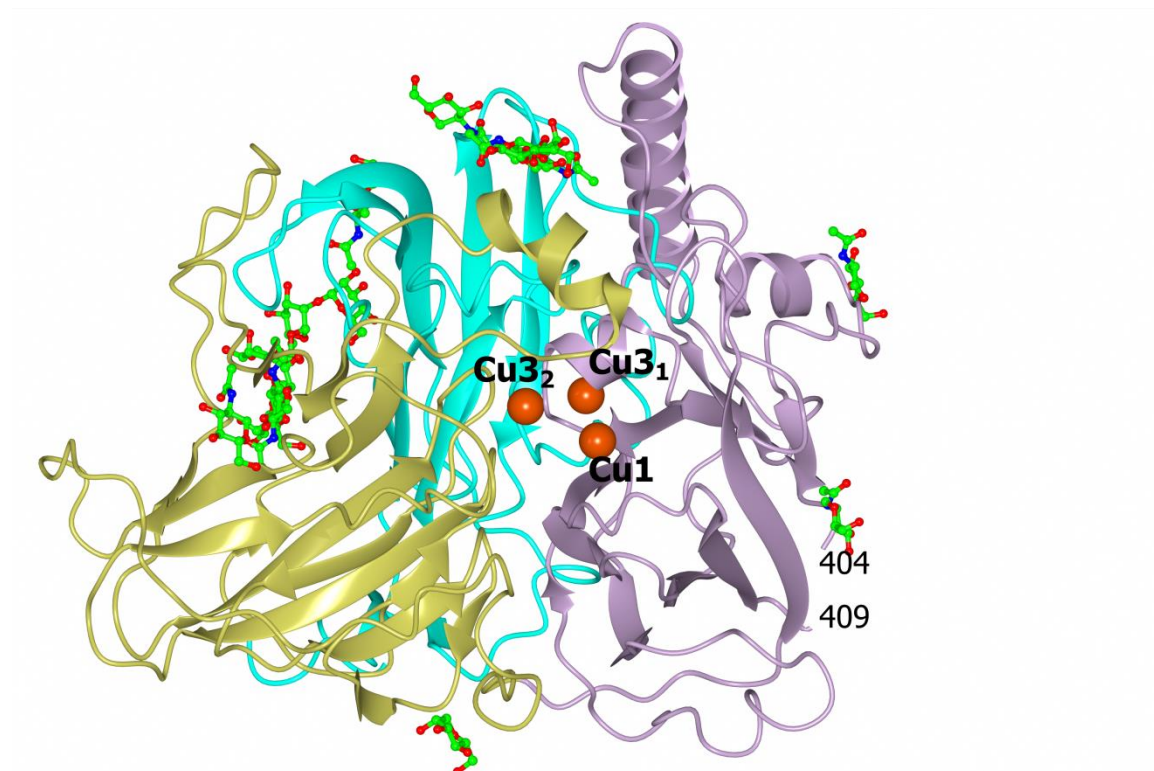


Рисунок 24. Ленточная модель структуры BaL. Домены I, II и III окрашены бирюзовым, золотым и фиолетовым цветом. Ионы меди показаны сферами оранжевого цвета. Углеводные остатки показаны шаростержневыми моделями с окраской по типу атомов. Указаны номера остатков, ограничивающих нелокализованную на картах электронной плотности петлю.

Аминокислотная последовательность BaL содержит девять остатков Cys: 2, 11, 108, 201, 209, 297, 331, 489, 524 (Рисунок 20). Остаток Cys489 консервативен, он расположен в активном центре BaL, где участвует в координации иона меди T1 центра. Остальные остатки Cys в структуре BaL образуют 4 дисульфидных моста. Связь Cys108-Cys524 обнаружена в структуре всех грибных лакказ, она стабилизирует положение С-концевой α -спирали. Дисульфидные связи Cys2-Cys11, Cys297-Cys331 обнаружены только в структуре лакказ из аскомицетов MaL и TaL. Связь Cys297-Cys331 располагается на поверхности, в зоне межмолекулярного контакта, на расстоянии около 12 Å от T1 центра. Дисульфидная связь Cys201-Cys209 – неконсервативная и была обнаружена только в структуре BaL. Эта дисульфидная связь стабилизирует положение петли внутри домена II.

3.7 Димерная структура лакказы из *B. aclada*

Анализ кристаллической упаковки BaL с использованием программы PISA показал наличие в кристалле межмолекулярного контакта, образованного субстрат-связывающими областями двух субъединиц. Хотя PISA предполагает, что этот димер нестабилен в растворе, он представляет интерес, так как ранее нами была описана димеризация BaL в растворе (см раздел 3.4), а аналогичный по устройству димер был найден в структурах лакказ из аскомицетов *M. albomyces* (MaL) и *T. arenaria* (TaL) [30,94]. Димер BaL, образованный первым контактом, показан на рисунке (Рисунок 25). Димерный контакт в BaL отличается от MaL и TaL большей энергией сольватации и числом остатков в интерфейсе (Таблица 18). Две субъединицы в димерах лакказ из аскомицетов связаны поворотной осью 2-го порядка. В структуре BaL эта ось кристаллографическая, а в структурах MaL и TaL – некристаллографическая.

Таблица 16. 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
BaL(3sqr)	1007	-13.1	70	2
MaL(2q9o)	800	-12.2	54	7
TaL(3pps)	673	-10.7	55	6

Таблица 17. Аминокислотные остатки, входящие в димерный контакт BaL

Порядковые номера остатков	Аминокислотная последовательность участка
182-187	LGAPPA
295-304	TTCSTNNGAA
358-367	SSAFTNYFTW
418-425	DLTGFGIW
442-444	TDV
469-470	GN

Остатки 182-187, 295-304, 358-367, 418-425, 442-444, 469-470 расположены в межсубъединичном интерфейсе димера (Таблица 17). Димер BaL сформирован за счет гидрофобных взаимодействий (Phe361, Phe365, Trp367, Phe422, Ile424, Trp425), π - π взаимодействия двух остатков Phe422 и двух водородных связей между атомами N δ Asn470 и O Thr296 связанных операцией симметрии (-x,y,-z) молекул фермента. Остаток Phe422, предположительно участвующий в связывании субстрата и расположенный в димерном интерфейсе, расположен на расстоянии 3.7 Å от остатка Phe422 соседней молекулы. Плоскости бензольных колец остатков Phe422 копланарны и расстояние между нормальными, проходящими через центр бензольного кольца, составляет 1.3 Å. Подобное расположение соответствует наиболее сильному π - π взаимодействию между этими остатками [33].

Различия в упаковке димеров BaL, MaL и TaL обусловлены в основном различиями в укладке участков Thr295-Ala304, Asp418-Trp425, Thr442-Val444 в области сайта связывания субстрата возле T1 центра. В результате этих различий расстояние между ионами меди T1 центров в димере BaL составляет 20 Å, в то время как в соответствующих димерах MaL и TaL 27 Å.

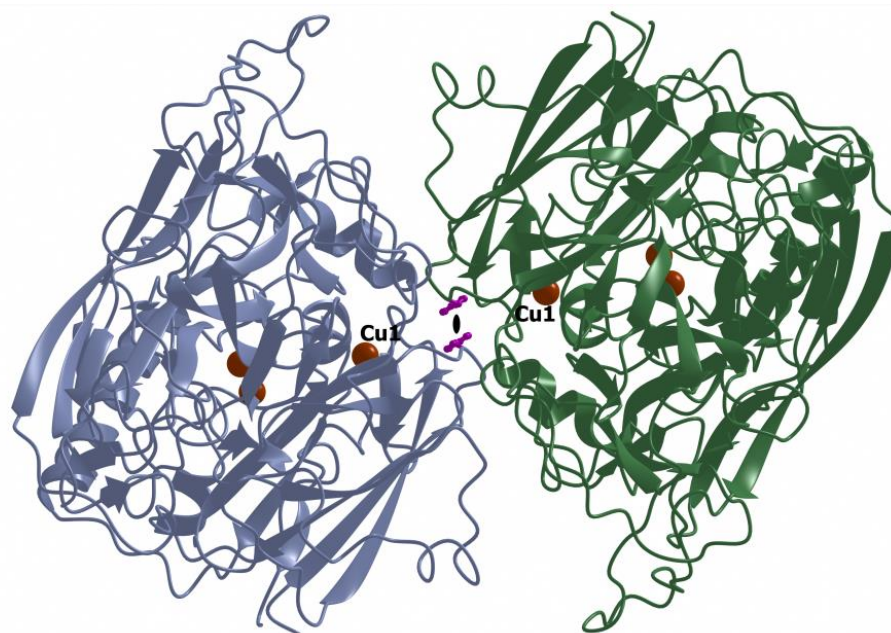


Рисунок 25. Димер BaL в кристалле. Боковые цепи остатков Phe422 в обеих субъединицах показаны шаростержневой моделью фиолетового цвета, ионы меди показаны сферами оранжевого цвета. Кристаллографическая поворотная ось 2-го порядка перпендикулярна плоскости рисунка и показана в виде черной линзы.

В междимерном интерфейсе BaL обнаружена полость. Она имеет уплощенную форму, ее линейные размеры 28x15x8 Å. Аналогичная полость обнаружена в структуре димеров MaL и TaL [116]. В структуре BaL линейные размеры полости меньше из-за упаковки составляющих ее петель. Внутренняя поверхность этой полости в BaL образована боковыми цепями гидрофобных остатков Phe365, Trp367 и Phe422. В структуре MaL с 2,6-ДМФ эта полость занята продуктами окисления 2,6-ДМФ [116]. В структуре BaL с 2,6-ДМФ субстрата или продуктов его окисления в полости не обнаружено.

3.8 Гликозилирование лакказы из *B. aclada*

Лакказы из грибов рода *Botrytis* сильно гликозилированы [28]. Углеводная часть может препятствовать кристаллизации, поэтому нативная и мутантная формы BaL были дегликозилированы. Семь из девяти потенциальных сайтов гликозилирования содержали углеводную цепь, связанную посредством N-гликозидной связи с остатками Asn: 39, 55, 82, 194, 305, 370 и 389. Всего на картах электронной плотности были локализованы девять остатков NAG и шесть остатков MAN. К пяти остаткам Asn (39, 55, 305, 370, 389) прикреплено по одному остатку NAG. Структуры BaL и L499M BaL различались по длине углеводной цепи у остатка Asn194.

Углеводная цепь при Asn194 содержит шесть углеводных остатков и имеет вид: MAN(α 1->2)MAN(α 1->6)MAN(α 1->6)MAN(β 1->4)NAG(β 1->4)NAG(β 1->N δ)Asn194 (Рисунок 26). Концевой α -MAN (MAN557) в этой цепи образует две водородные связи (O6 MAN-OH Tyr33, O4 MAN-N Glu32), что стабилизирует положение этого углевода в пространстве и может препятствовать его отщеплению α -маннозидазой. Устойчивость к дегликозилированию связи NAG(β 1->4) NAG в этой же цепи объясняется совокупностью факторов: расположением данной цепи в углублении на поверхности белка, стабилизацией цепи в пространстве за счет образования водородных связей первого в этой цепи остатка NAG с атомами полипептидной цепи (O3 NAG-O Val160). Из-за стабилизации в пространстве этой углеводной цепи В-факторы крайних остатков существенно ниже, чем у центральных остатков. В структуре мутантной формы аналогичная углеводная цепь короче и на карте электронной плотности локализованы только 3 остатка (MAN(β 1->4)NAG(β 1->4)NAG(β 1->N δ)Asn194). Как и в случае структуры лакказы из *Lentinus* spp. [132] углеводная цепь участвует в образовании дополнительных водородных связей между доменами. Первый и последний углеводные остатки цепи соединяют двумя водородными связями N2 NAG-O Val162 и O4 MAN-N Glu32 домен I с III.

Углеводная цепь при Asn82 содержит три углеводных остатка в цепи MAN(β 1->4)NAG(β 1->4)NAG(β 1->N δ)Asn82 (Рисунок 27). Эта цепь расположена в углублении на

поверхности белка, и доступ к гликозидной связи между остатками NAG стерически заблокирован боковыми цепями остатков Phe174, Phe536 и остатком NAG, присоединенным к Asn39. Наличие в этой цепи остатка β -MAN объясняется тем, что при дегликозилировании не использован фермент, специфически расщепляющий связь MAN(β 1-4)NAG.

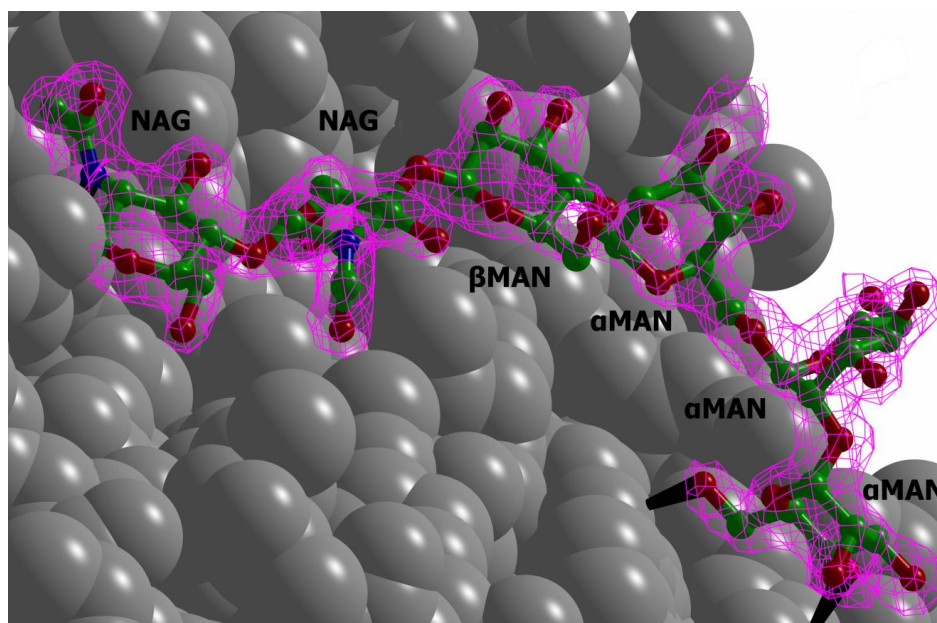


Рисунок 26. Углеводная цепь, прикрепленная к Asn194. Углеводы показаны шаростержневой моделью. Поверхность белка показана как шаровая модель серого цвета. Карты электронной плотности 2Fo-Fc (на уровне 1σ) окрашены фиолетовым. Водородные связи показаны черными конусами.

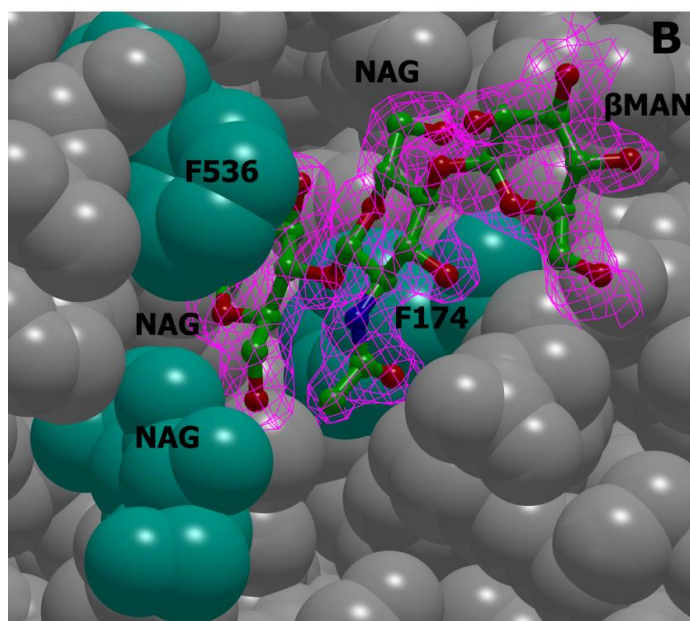


Рисунок 27. Строение углеводной цепи, прикрепленной к Asn82. Углеводы показаны шаростержневой моделью. Поверхность белка показана как шаровая модель серого цвета (остатки Phe174, Phe536 и NAG, прикрепленный к Asn39, выделены бирюзовым цветом). Карты электронной плотности 2Fo-Fc (на уровне 1σ) окрашены фиолетовым.

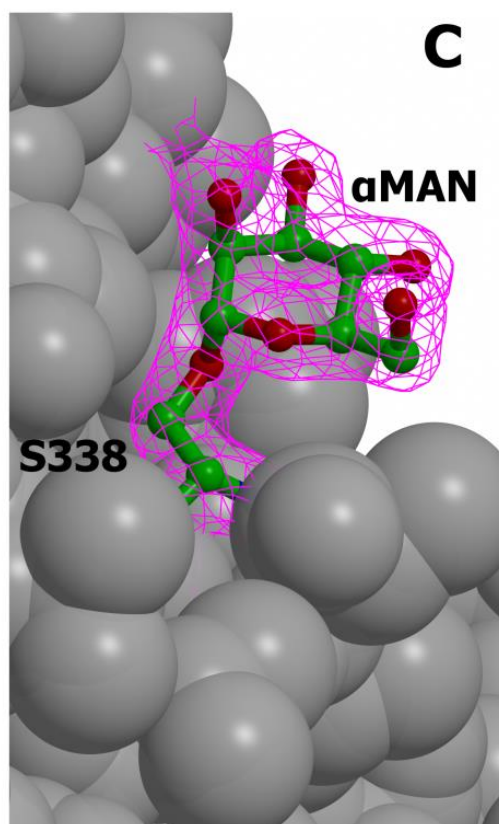


Рисунок 28. Остаток α -маннозы, прикрепленный к Ser338. Ser338 и манноза показаны шаростержневой моделью. Поверхность белка показана как шаровая модель серого цвета Карта электронной плотности 2Fo-Fc (на уровне 1σ) окрашена фиолетовым.

Один остаток маннозы был прикреплен к остатку Ser338 (MAN(α 1->O γ)Ser338, Рисунок 28). Для лакказ О-гликозилирование нехарактерно и ранее в литературе не описывалось. О-гликозилирование, возможно, связано с использованием в качестве экспрессионной системы дрожжей *P. pastoris* [158].

Водородные связи некоторых углеводных остатков стабилизируют кристалл за счет образования межмолекулярных водородных связей. Остаток NAG, прикрепленный к Asn55, образует четыре связи, с остатками Glu38, Ser40 и Thr41 соседней молекулы, связанной с исходной операциями симметрии (-x, y, -z-1). Остаток NAG, прикрепленный к Asn389, образует две водородные связи с Glu521 соседней молекулы, связанной с исходной операциями симметрии (-x-1, y, -z-1).

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

Мы провели сравнение BaL со структурно охарактеризованными лакказами из аскомицетов *M. albomyces* [94] и *T. arenaria* [30]. Структуры BaL и MaL могут быть совмещены по координатам 402 эквивалентных Ca атомов со среднеквадратичным отклонением 0.8 Å. Наибольшие различия между структурами BaL и MaL наблюдаются в расположении петель (остатки 199-213, 292-297, 347-354, 419-424, 441-445), часть из которых (остатки 292-297, 419-424, 441-445) расположена в субстратсвязывающей области (Рисунок 29). В MaL субстратсвязывающая область была локализована в структуре комплекса лакказы с 2,6-ДМФ [116].

Для сравнения структуры BaL с лакказами из базидиомицетов использовалась структура лакказы из *T. hirsuta* (ThL, код PDB 3FPX). Структуры BaL и ThL могут быть совмещены по координатам 443 Ca-атомов со среднеквадратичным отклонением 0.9 Å. Наибольшие различия между структурами, как и в случае лакказ из аскомицетов, наблюдаются в укладке полипептидной цепи на поверхности белковой глобулы (Рисунок 30). Кроме того, полипептидная цепь ThL короче на 27 остатков с N-конца и на 44 остатка с C-конца. В структуре BaL эти N- и C- концевые пептиды прикрывают доступ к каналам, ведущим к T2/T3 кластеру. При совмещении структур BaL и ThL только одна C-концевая дисульфидная связь между доменами I и III сохраняет свое положение, остальные связи пространственно разнесены.

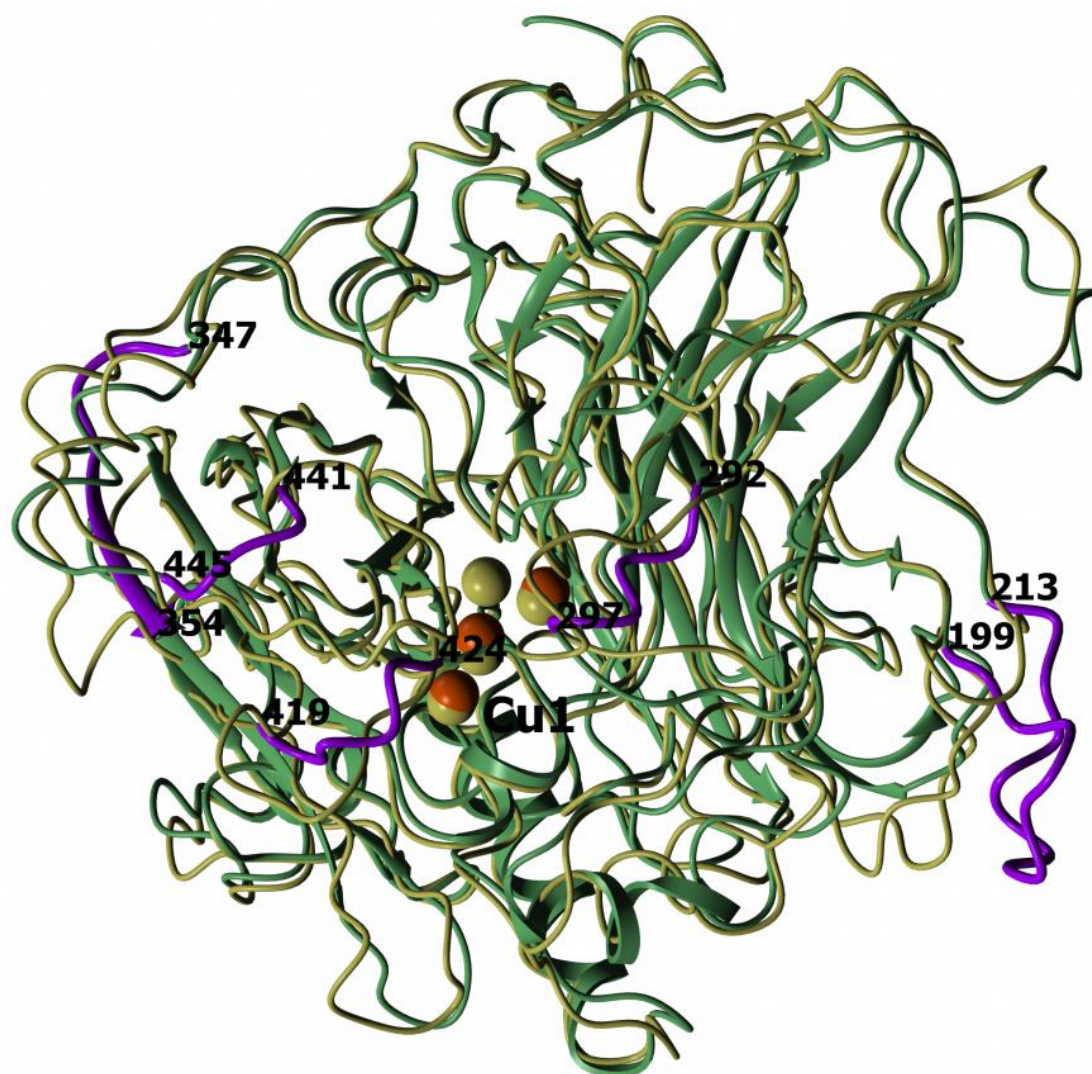


Рисунок 29. Структуры BaL (зеленая) и MaL (золотая), совмещенные по координатам эквивалентных $\text{C}\alpha$ -атомов. Ионы меди показаны в виде оранжевых (BaL) и золотых (MaL) сфер. В структуре BaL наиболее отличающиеся от MaL петли окрашены фиолетовым. Указаны номера остатков, ограничивающие эти петли.

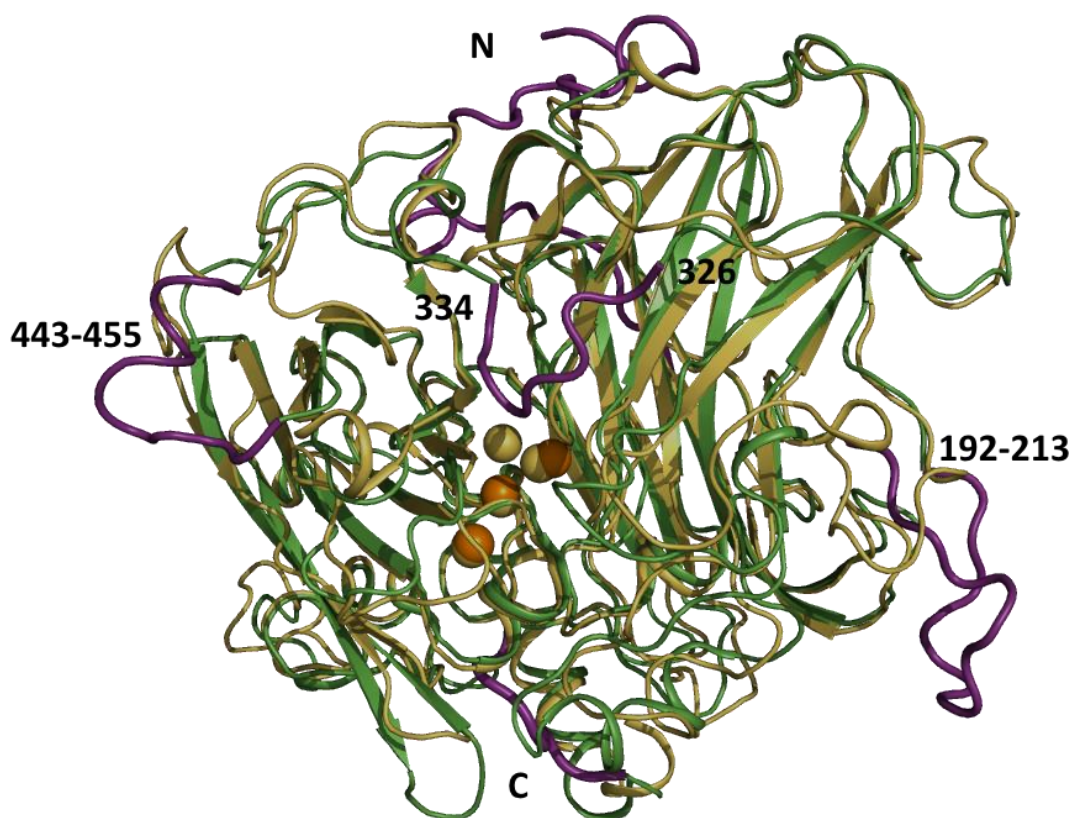


Рисунок 30. Структуры BaL (зеленая) и ThL (синяя), совмещенные по координатам эквивалентных $\text{C}\alpha$ -атомов. Ионы меди показаны в виде оранжевых (BaL) и золотых (ThL) сфер. В структуре BaL наиболее отличающиеся от ThL петли окрашены фиолетовым. Отмечены N- и C- концевые участки. Номера остатков в BaL указаны на концах различающихся петель.

3.10 Активный центр лакказы из *B. aclada*

Активный центр BaL состоит из двух частей: T1 центра и T2/T3 кластера (Рисунок 31). T2/T3 кластер в свою очередь состоит из T2 и T3 центров. T1 центр расположен в домене III. T2/T3 кластер расположен на границе доменов I и III. T1 центр и T2/T3 кластер связаны через консервативный мотив His488-Cys489-His490, в котором остатки His488 и His490 координируют ионы меди T3, а Cys489 координирует ион меди T1. Расстояние между ближайшими ионами меди T1 центра и T2/T3 кластера равно 12.2 Å. В координации ионов меди активного центра участвуют остатки из доменов I (His87, His89, His131, His133) и III (Cys489, His426, His429, His431, His488, His490, His494). BaL и L499M BaL отличаются по строению T1 центра. В структурах BaL, L499M BaL и BaLCu⁺ различное строение T2/T3 кластера. Длины связей между ионами меди и их лигандами приведены в таблице (Таблица 18). Длины координационных связей ионов меди в структуре BaL такие же, как и в активных центрах других лакказ.

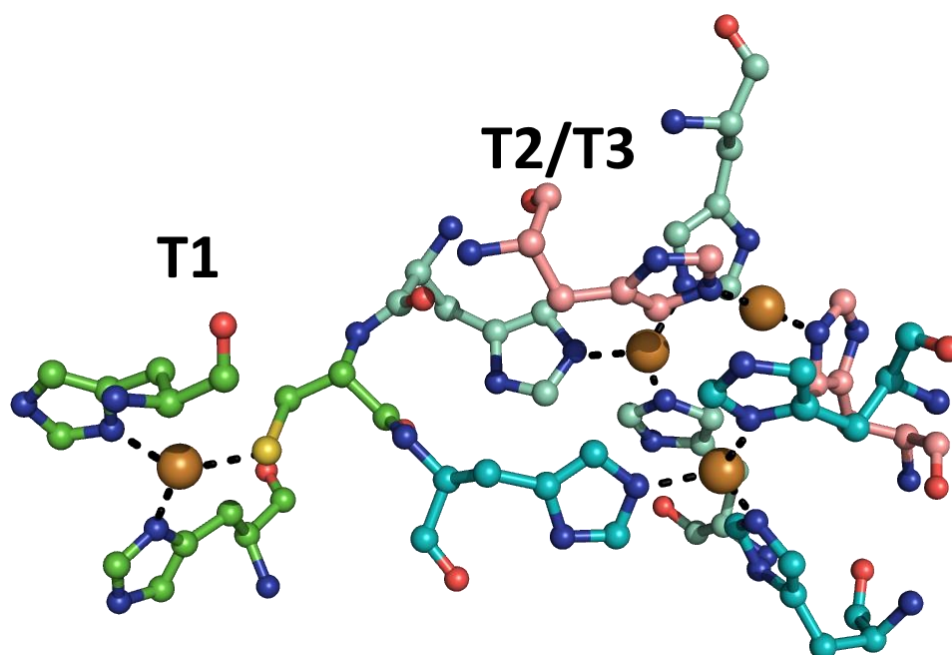


Рисунок 31. Взаимное расположение медных центров активного центра в структуре BaLCu^+ . Ионы меди показаны в виде оранжевых сфер. Аминокислотные остатки – лиганды активного центра – показаны шаростержневой моделью. Координационные связи показаны пунктирными линиями. Атомы углерода аминокислотных остатков – лигандов ионов меди T1, T2 центра и пары ионов меди T3 центра показаны сферами зеленого, розового и двумя оттенками бирюзового, соответственно. Не показан кислородный лиганд пары ионов меди T3 центра.

Ион меди T1 центра во всех структурах уточнен с полной заселенностью. В структурах BaL и L499M BaL отсутствовал ион меди T2. При полной заселенности ионов меди T3 центра на картах электронной плотности в положении ионов меди T3 центра появлялись пики отрицательной электронной плотности. Кроме того, при полной заселенности ионов меди T3 центра температурные факторы этих ионов и их лигандов отличались. По этой причине заселенность ионов меди уточнялась вручную. Постепенное снижение заселенности ионов меди с шагом 0.1 проводилось пока не пропали пики отрицательной электронной плотности. После уточнения заселенностей ионов меди температурные факторы ионов меди и их лигандов сравнивались. В структурах BaL и L499M BaL пара ионов меди T3 центра уточнена с заселенностью 0.8. В структуре BaLCu^+ заселенность ионов меди T2 и пары T3 равнялась 0.7, 0.8 и 0.8.

Таблица 18. Межатомные расстояния в активном центре BaL, L499M BaL и BaLCu⁺. Температурные факторы для атомов BaL приведены в скобках.

Атом А	Атом В	Расстояние А-В (Å)		
		BaL	L499M BaL	BaLCu ⁺
Cu1 (25.4)	Sγ Cys489 (23.4)	2.2	2.2	2.2
	Nδ His426 (22.1)	2.0	2.0	2.0
	Nδ His494 (23.2)	2.0	2.0	2.0
	Cδ Ile491 (22.7)	3.5	3.7	3.5
	Cδ Leu499 (24.9)	3.6	-	3.6
	Sδ Met499	-	3.2	-
Cu2	Nε His87 (24.0)	-	-	2.0
	Nε His429 (30.4)	-	-	1.8
	W1 (31.2)	-	-	3.4
	W2 (22.1)	-	-	2.5
Cu3α (27.3)	Nε His133 (23.0)	2.1	2.2	2.1
	Nε His431 (21.4)	2.0	2.0	2.0
	Nε His488 (25.6)	2.0	2.0	1.9
	W1	2.1	2.0	2.3
	Nδ His429 (29.2)	2.8	2.6	-
Cu3β (27.5)	Nδ His89 (21.7)	2.0	1.9	2.0
	Nε His131 (22.6)	2.0	2.0	2.0
	Nε His490 (24.0)	2.0	2.3	2.1
	W1	2.6	2.9	2.8
	Cu3α (27.3)	4.6	4.6	

С целью получения структуры BaL, содержащей полный набор ионов меди в активном центре, кристаллы T2-деплецированной формы BaL настаивали в противорастворе, содержащем соли Cu^+ и Cu^{2+} . Для получения комплексов были использованы кристаллы из одной капли. Настаивание кристаллов BaL в противорастворе, содержащем соли Cu^{2+} , не привело к встраиванию иона меди в T2 центр несмотря на большую концентрацию Cu^{2+} (10 mM CuSO_4) и время настаивания (около суток). Соли Cu^+ плохо растворимы в воде, поэтому для вымачивания использовали насыщенный раствор CuCl с концентрацией 0.6 mM. В процессе получения BaLCu^+ , несмотря на низкую концентрацию ионов Cu^+ , визуально обнаруживается ухудшение качества кристаллов. Поэтому время вымачивания кристалла BaL ограничили десятью минутами.

В кристалле BaL сохранилась активность: кристалл окрашивался продуктами окисления 2,6-ДМФ в темно-оранжевый цвет. С кристалла, вымоченного в растворе 2,6-ДМФ, был собран набор дифракционных данных с разрешением 1.9 Å. Молекулу продукта не удалось обнаружить на картах электронной плотности. Вымачивание кристаллов в растворе, содержащем субстрат, не повлияло на их качество. Каталитическая активность в кристалле BaL может быть связана с небольшой долей активной формы BaL, содержащей ион меди в T2 центре. При заселенности менее 5 % ион меди T2 не будет детектироваться на картах электронной плотности, так как его вклад в рассеяние рентгеновского излучения слишком мал.

3.11 Строение T1 центра в лакказе из *B. aclada* и её мутанте Leu499Met

В структуре BaL ион меди T1 центра координирован атомами N δ His426, N δ His494 и S γ Cys489 (Рисунок 32). Ион меди T1 центра BaL имеет плоскую тригональную координацию. Остаток His494 расположен на поверхности белковой глобулы. Этот остаток связывает и ориентирует субстрат в субстрат-связывающем кармане и по сути является первичным акцептором электрона. С двух сторон от плоскости комплекса расположены боковые цепи двух аксиальных гидрофобных остатков. С одной стороны расположен консервативный Ile491. С другой стороны от плоскости в структуре BaL расположен остаток Leu499, а в структуре мутанта Met499.

В случае лакказы BaL замена аксиального лейцина на метионин привела к снижению редокс потенциала T1-центра на 140 мВ. Структуры BaL и L499M BaL можно совместить с отклонением 0.11 Å. BaL и L499M BaL отличаются только в области T1 центра. Длины координационных связей иона меди T1 центра в обеих структурах также совпадают (Таблица 18).

В BaL, как и в большинстве известных лакказ с некоординирующим аксиальным остатком T1 центра, ион меди T1 центра находится в плоскости, образованной его лигандами. В L499M BaL замена аксиального Leu499 на остаток метионина приводит к смещению иона меди в направлении S δ Met499. Расстояние от иона меди до плоскости, образованной атомами N δ His426, N δ His494 и S γ Cys489, составляет 0.17 Å. При этом длины координационных связей иона меди T1 центра не изменяются. Величина ошибки в координатах атомов по Крушанку [150] для данной модели составляет 0.1 Å, 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 лакказ из *B. subtilis* [52], *Amycolatopsis* sp ATCC 39116 [49], *Campilobacter jejuni* [110] и полученной из метагенома лакказы [37], а также в структуре аскорбатоксидазы из *Zicchini* [157]. В L499M BaL и указанных лакказах наблюдается только одна конформация боковой цепи аксиального метионина. В указанных структурах расстояние между S δ аксиального метионина и ионом меди находится в диапазоне 2.8-3.3 Å, что свидетельствует о наличии слабой координационной связи. В структуре L499M BaL расстояние между ионом меди T1 центра и S δ Met499 составляет 3.2 Å, что может быть описано как слабая координационная связь. Единственное исключение – лакказа из *T. thermophilus*, структура которой решена с разрешением 1.5 Å [102]. В этой структуре аксиальное положение занято Met455, но выхода иона меди T1 центра из плоскости не наблюдается. Расстояние Cu1 – S δ

Met455 равно 3.6 Å. Кроме того, в этой структуре аксиальный остаток метионина имеет две альтернативные конформации, что также указывает на отсутствие взаимодействия между ионом меди T1 центра и Sδ Met455.

Редокс потенциал T1-центра лакказ с фенилаланином или лейцином в аксиальном положении равен или выше, чем у лакказ с аксиальным метионином [77,86]. Сравнение структур BaL и L499M BaL показало отсутствие изменений в структуре за исключением области T1 центра. Следовательно, снижение редокс потенциала на 140 мВ связано с образованием в L499M BaL координационной связи Cu1 – Sδ Met499.

Аксиальные остатки не единственный фактор, влияющий на редокс потенциал T1 центра. Значительные различия в редокс потенциалах лакказ с одинаковыми аксиальными остатками T1 центра связаны с дальним окружением T1 центра (второй координационной сферой). Влияние второй координационной сферы можно оценить сравнением данных для всех структурно охарактеризованных лакказ из аскомицетов BaL (E_{T1}^0 720 мВ), MaL (E_{T1}^0 470 мВ) и TaL (E_{T1}^0 510 мВ). 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 (Рисунок 29). 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 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 на 140 мВ связано исключительно с образованием в L499M BaL координационной связи между ионом меди T1 центра и Sδ Met499
- Различия в редокс потенциалах между BaL и другими аскомицетными лакказами могут быть связаны со строением петель в окружении T1 центра

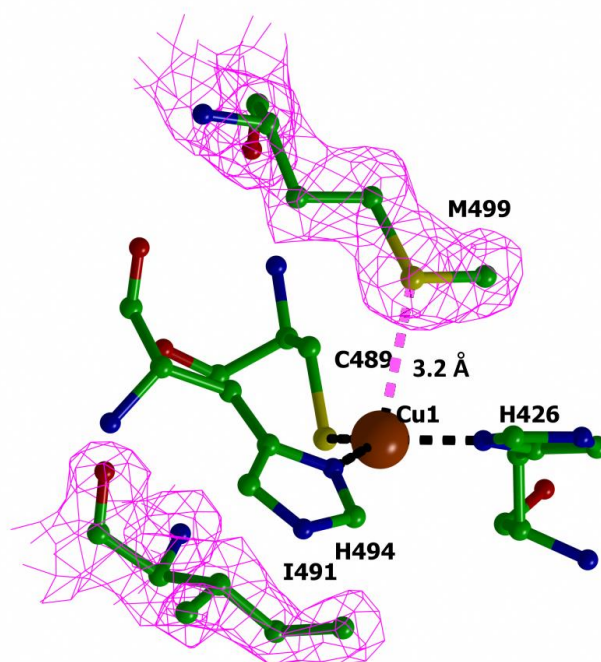
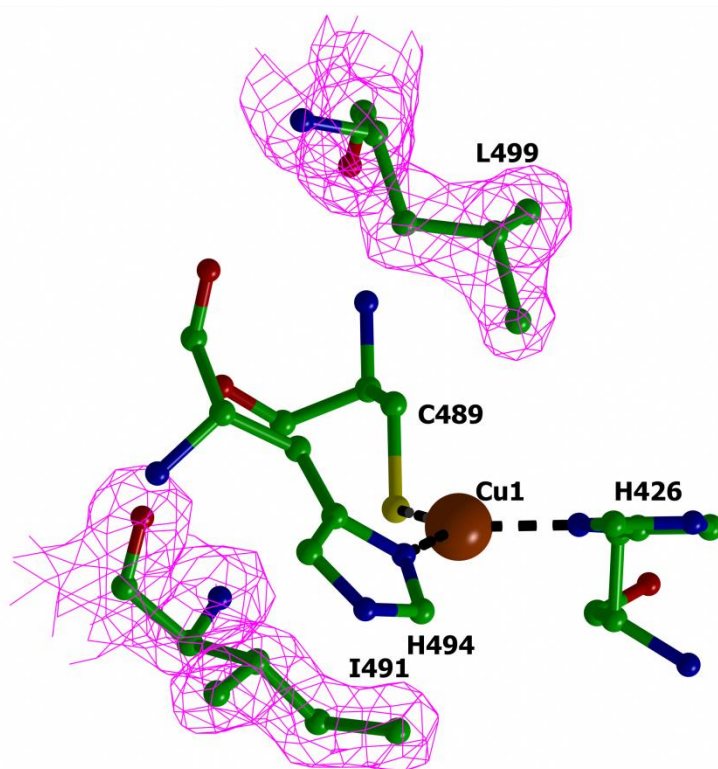


Рисунок 32. Строение T1 центра в BaL (сверху) и L499M BaL (снизу). Карта 2Fo-Fc для аксиальных остатков Leu499/Met499 и Ile491 показана на уровне 1 σ . Ионы меди показаны в виде оранжевых сфер. Координационные связи иона меди T1 центра (Cu1) показаны пунктирными линиями. Слабая координационная связь между Cu1 и S δ Met499 показана розовой пунктирной линией.

3.12 Структура T2/T3 кластера лакказы из *B. aclada*

Строение T2/T3 кластера BaL и BaLCu⁺ приведено на рисунке Рисунок 33. Расстояния для ионов меди и координирующих их атомов приведены в таблице (Таблица 18). T2/T3 кластер состоит из одного иона меди T2 и пары ионов меди T3. 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 33). Ион Cu3 α координирован N ϵ атомами His133, His431 и His488 и молекулой воды W1. Ион Cu3 β координирован N ϵ атомами His131, His490 и N δ атомом His89 и молекулой воды W1. Молекула воды W1 расположена ближе к Cu3 α , чем к Cu3 β (Таблица 18). В структуре BaLCu⁺ лигандами иона меди T2 центра являются N ϵ атомы His89 и His429 и молекула воды (W2 Рисунок 33). В структурах BaL и L499M BaL отсутствовал ион меди T2 центра. В структуре BaL остаток His429 развернут вокруг связи C β -C γ на 180°. Развернутый остаток His429 координирует ион меди Cu3 α через N δ атом и образует водородную связь с молекулой воды W2.

Известны структуры двух лакказ с полностью удаленным ионом меди T2 центра: из *S. cinereus* [98,99] и *T. thermophilus* [102]. В этих структурах гистидин T2 центра, соответствующий His429 в структуре BaL, имеет два альтернативных положения. В одном из 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 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 *S. 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 [117].

Стоит отметить, что в структуре BaL геометрия комплексов 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 33). 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.

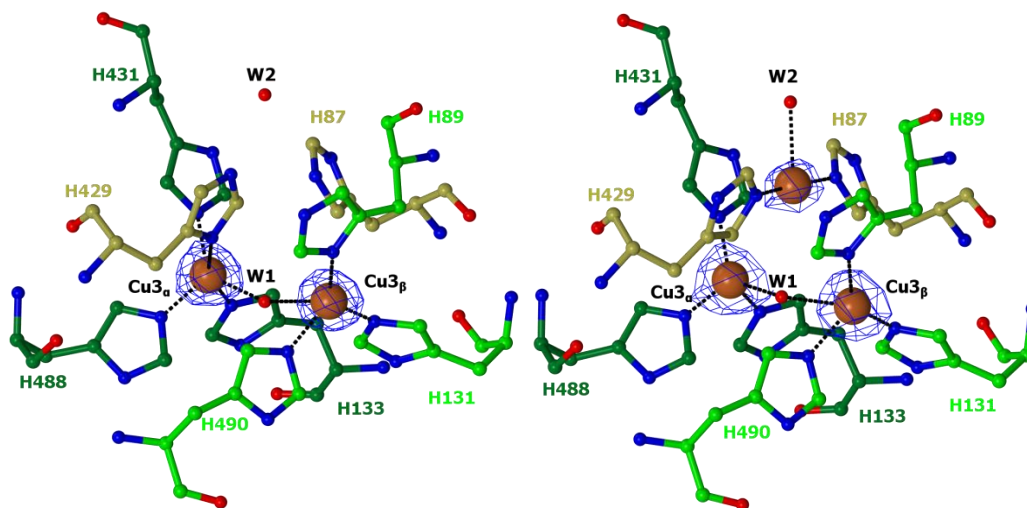


Рисунок 33. Структура T2/T3 медного кластера. Левая панель: BaL. Правая панель: BaLCu⁺. Атомы углерода остатков His, координирующих ионы Cu3α, Cu3β и Cu2, окрашены темно-зеленым, светло-зеленым и желтым, соответственно. Ионы меди показаны оранжевыми сферами. Кислородные лиганды показаны шаростержневой моделью красного цвета. Карты электронной плотности 2Fo-Fc (на уровне 5σ) окрашены синим. Координационные связи ионов меди меди показаны пунктирными линиями.

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

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).

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 структурах BaL и BaLCu²⁺, но и остатки 1-14 (нумерация приведена по структуре BaL). Основные отличия структур BaLCu⁺ и BaL связаны с локализацией иона меди в T2 центре и разворотом боковой цепи His429 от иона меди T3 центра к иону меди T2 центра (Рисунок 33). В структуре BaLCu⁺ лигандами иона меди T2 центра являются атомы Nε His87, Nε His429 и атом кислорода молекулы воды (W2 Рисунок 33). В структуре BaL остаток His429 координирует Cu3α через свой Nδ атом. То есть при удалении иона меди типа 2 боковая цепь His429 разворачивается вокруг связи Cβ-Cγ на 180 градусов и смещается в направлении Cu3α за счет небольшого поворота вокруг связи Ca-Cβ. Атом Nε His429 образует водородную связь с молекулой воды W2, что дополнительно стабилизирует альтернативное положение этого остатка. В структуре BaLCu⁺ заселенность иона меди T2 центра (0.7) меньше заселенности ионов T3 центра (0.8).

На картах электронной плотности комплекса $BaLCu^+$, в районе остатка His81 был обнаружен пик на расстоянии 2.1 Å от его Nε атома. Этот пик был интерпретирован как ион меди с заселенностью 0.2 (Рисунок 34).

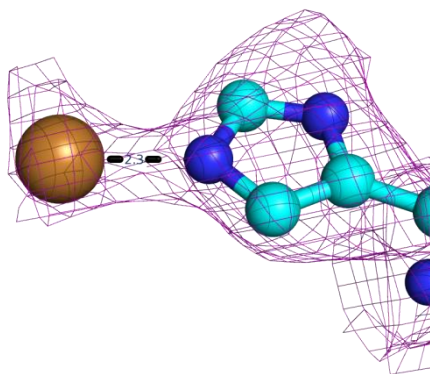


Рисунок 34. Связывание иона меди с остатком His81. Координационная связь показана пунктирной линией. Атомы Cu, C и N показаны сферами соответственно коричневого, бирюзового и синего цвета.

В случае лакказы из базидиомицета *C. caperata* встраивание иона меди в T2 центр также происходит только при использовании солей Cu^+ [117]. Это хорошо согласуется с кинетическими данными по встраиванию ионов Cu^+ в T2 центры препаратов T2-деплецированных лакказ [123,125]. Можно предположить, что только ионы меди Cu^+ могут эффективно встраиваться в активные центры всех T2Д лакказ. В статье [130] тем не менее приводятся данные по встраиванию в препараты бактериальной лакказы из *B. subtilis* как ионов меди Cu^+ , так и Cu^{2+} . Сравнение кинетических данных, полученных для обработанных Cu^+ и Cu^{2+} препаратов этой лакказы, показывает, что активность выше при использовании солей Cu^+ .

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

Как уже обсуждалось выше, лакказы ингибируются галогенид-ионами. Центром связывания галогенид-ионов считается T2/T3 кластер [159]. Фториды являются наиболее

эффективными ингибиторами лакказ, величина $I_{50}(F^-)$ находится в микромолярном диапазоне концентраций. В случае хлорид-ионов величина I_{50} 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* $I_{50}(Cl^-) = 40$ мМ. Для лакказ из аскомицетов эта величина на порядок выше и составляет 500 – 2000 мМ, например, для лакказы из аскомицета *M thermophila* $I_{50}(Cl^-) = 600$ мМ [109].

Нами было охарактеризовано ингибирование BaL ионами F^- и Cl^- в области pH, в которой фермент проявляет каталитическую активность (pH 3.0, 4.5, 6.0) (Таблица 19). Показано, что подобно другим лакказам из аскомицетов, BaL крайне устойчива к ингибированию хлорид-ионами. При pH более 4.5 ионы Cl^- практически не влияют на активность фермента. Мутация в T1 центре Leu499Met повлияла на величины $I_{50}(F^-)$ и $I_{50}(Cl^-)$, а также их pH-зависимость. При pH 3.0 устойчивость мутанта к ингибированию фторид ионами выросла в 20-120 раз, а устойчивость к хлорид ионам упала в 2-4 раза. При pH 6.0 устойчивость мутанта к ингибированию фторид ионами упала в 3 раза в реакции окисления АБТС и не изменилась в реакции окисления 2,6-ДМФ. Различия величин I_{50} между BaL и L499M BaL можно объяснить возрастанием величины $E_{T2/T3} - E_{T1}$ в L499M BaL. С ростом pH $I_{50}(F^-)$ и $I_{50}(Cl^-)$ растут для обеих форм фермента, что может объясняться конкурентным ингибированием лакказной активности галогенид-ионами и OH^- [109].

Таблица 19. I_{50} для ингибирования BaL и L499M фторидом и хлоридом, измеренные при различных pH

Фермент	$I_{50}(F^-)$, μM				$I_{50}(Cl^-)$, мМ			
	BaL		L499M BaL		BaL		L499M BaL	
Субстрат pH	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

Для объяснения различий в эффективности ингибирования лакказ из аскомицетов и базидиомицетов мы привлекли структурные данные.

Методами ЭПР спектроскопии [35] и рентгеноструктурного анализа [65] на примере лакказ из *R. vernicifera* [35] и *M. albomyces* [65] показано, что фторид- и хлорид- ионы могут связываться с ионом меди T2 центра, замещая связанную с ним молекулу воды W1 (Рисунок 33). Различия в строении и аминокислотном составе этого канала могли бы объяснять наблюдаемые различия между величинами $I_{50}(\text{Cl}^-)$ для лакказ из аскомицетов и базидиомицетов.

В структуре всех лакказ канал, ведущий к T2 центру, заполнен цепью связанных водородными связями молекул воды (Рисунок 35). 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 Asp (Asp434 в BaL). В структуре лакказ из базидиомицетов и бактерий молекула воды w3 связана либо с остатком Ser (код PDB 1GSK, Ser427, бактерия *B. subtilis*) или остатком Thr (код PDB 3FPX, Thr403, базидиомицет *T. hirsuta*). В ряде случаев положение остатка Asp434 занимает гидрофобный остаток, как например в лакказе из *C. gallica* это Ile401 (код PDB 5A7E, нет публикации). Можно предположить, что депротонирование остатка Asp434 и возникающее вследствие него электростатическое отталкивание между отрицательно заряженными ионами и депротонированной карбоксильной группой остатка Asp434 может объяснять хлорид-резистентность лакказ из аскомицетов.

Вторым фактором, определяющим высокую хлорид-резистентность лакказ из аскомицетов может являться N-концевая часть полипептидной цепи (Рисунок 35). В BaL N-концевая часть на 27 аминокислотных остатков длиннее, чем в лакказе из *T. hirsuta*. В структуре всех лакказ из аскомицетов N-концевая часть упакована 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 заряд и размер поступающих по нему ионов.

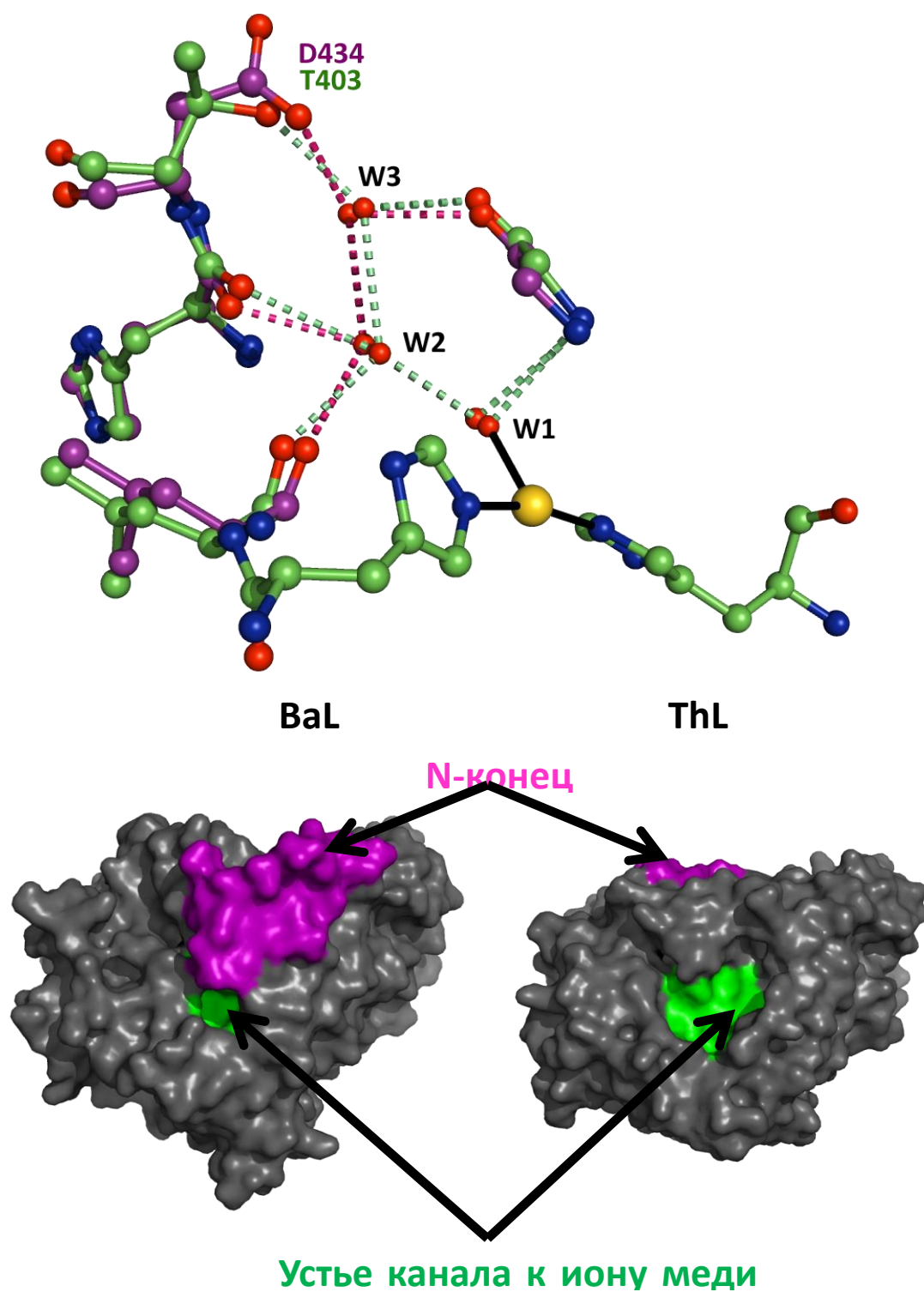


Рисунок 35. Верхняя панель: координация консервативной воды в канале, соединяющем ион меди T2 с поверхностью белка в структуре BaL (фиолетовая) и ThL (зеленая). Нижняя панель: вход в канал (зеленый цвет), соединяющий ион меди T2 с поверхностью белка в структуре BaL и ThL. Поверхность участка Ala1-Thr27 окрашена фиолетовым.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Полученные результаты позволяют сделать следующие 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 ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Yoshida H. Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio: article // J. Chem. Soc. Trans. The Royal Society of Chemistry, 1883. Т. 43. С. 472–486.
2. Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry // Trends Biotechnol. 2006. Т. 24, № 5. С. 219–226.
3. Kittl R. и др. A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris* // J. Biotechnol. 2012. Т. 157, № 2. С. 304–314.
4. Mate D.M. и др. Blood Tolerant Laccase by Directed Evolution: article // Chem. Biol. 2013. Т. 20, № 2. С. 223–231.
5. Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties // FEMS Microbiol. Rev. 2006. Т. 30, № 2. С. 215–242.
6. Morozova O. V и др. «Blue» laccases. // Biochemistry. (Mosc). 2007. Т. 72, № 10. С. 1136–1150.
7. Rivera-Hoyos C.M. и др. Fungal laccases // Fungal Biol. Rev. 2013. Т. 27, № 3–4. С. 67–82.
8. Giardina P. и др. Laccases: A never-ending story // Cell. Mol. Life Sci. 2010. Т. 67, № 3. С. 369–385.
9. Nakamura K., Go N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins.: Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Review // Cell. Mol. Life Sci. Switzerland, 2005. Т. 62, № 18. С. 2050–2066.
10. Adman E.T. Structure and function of copper-containing proteins // Curr. Biol. 1992. Т. 2, № 1. С. 13.
11. Uthandi S. и др. LccA, an archaeal laccase secreted as a highly stable glycoprotein into the extracellular medium by *Haloferax volcanii*. // Appl. Environ. Microbiol. 2010. Т. 76, № 3. С. 733–743.
12. Mayer A.M., Staples R.C. Laccase: New functions for an old enzyme // Phytochemistry. 2002. Т. 60, № 6. С. 551–565.
13. Sterjiades R., Dean J.F., Eriksson K.E. Laccase from Sycamore Maple (*Acer pseudoplatanus*) Polymerizes Monolignols. // Plant Physiol. United States, 1992. Т. 99, № 3. С. 1162–1168.
14. Sato Y., Whetten R.W. Characterization of two laccases of loblolly pine (*Pinus taeda*) expressed

- in tobacco BY-2 cells. // J. Plant Res. Japan, 2006. T. 119, № 6. C. 581–588.
15. Ranocha P. и др. Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases – a divergent gene family – in poplar // Eur. J. Biochem. 1999. T. 259, № 1–2. C. 485–495.
 16. Yatsu J., Asano T. Cuticle laccase of the silkworm, *Bombyx mori*: Purification, gene identification and presence of its inactive precursor in the cuticle. // Insect Biochem. Mol. Biol. 2009. T. 39, № 4. C. 254–262.
 17. Dittmer N.T. и др. Characterization of cDNAs encoding putative laccase-like multicopper oxidases and developmental expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2004. T. 34, № 1. C. 29–41.
 18. Sakurai T., Kataoka K. Basic and Applied Features of Multicopper Oxidases CueO Bilirubin Oxidase and Laccase // Chem. Rec. 2007. T. 7, № 4. C. 220–229.
 19. Ausec L. и др. Characterization of a novel high-pH-tolerant laccase-like multicopper oxidase and its sequence diversity in *Thioalkalivibrio* sp // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2015.
 20. Sirim D. и др. The Laccase Engineering Database: A classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases // Database. 2011. T. 2011. C. 1–7.
 21. Givaudan A. и др. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum* // FEMS Microbiol. Lett. 1993. T. 108, № 2. C. 205–210.
 22. Driks A. *Bacillus subtilis* spore coat. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. T. 63, № 1. C. 1–20.
 23. Santhanam N. и др. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. // Trends Biotechnol. England, 2011. T. 29, № 10. C. 480–489.
 24. Strong P.J., Claus H. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation // Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 2011. T. 41, № 4. C. 373–434.
 25. Thurston C.F. The structure and function of fungal laccases // Microbiology. 1994. T. 140, № 1. C. 19–26.
 26. Madhavi V., Lele S.S. Laccase: Properties and applications // BioResources. 2009. T. 4, № 4. C. 1694–1717.
 27. Singh Arora D., Kumar Sharma R. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. // Appl. Biochem. Biotechnol. United States, 2010. T. 160, № 6. C. 1760–1788.

28. Slomczynski D., Nakas J.P., Tanenbaum S.W. Production and Characterization of Laccase from *Botrytis cinerea* 61-34 // *Applied and Environmental Microbiology*. 1995. T. 61, № 3. C. 907–912.
29. Kiiskinen L.-L., Viikari L., Kruus K. Purification and characterisation of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces* // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002. T. 59, № 2. C. 198–204.
30. Kallio J.P. и др. Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia arenaria* - common structural features of asco-laccases // *FEBS J.* 2011. T. 278, № 13. C. 2283–2295.
31. Bertrand T. и др. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics // *Biochemistry*. 2002. T. 41, № 23. C. 7325–7333.
32. Gigi O., Marbach I., Mayer A.M. Properties of gallic acid-induced extracellular laccase of *Botrytis cinerea* // *Phytochemistry*. 1981. T. 20, № 6. C. 1211–1213.
33. Hunter C.A., Singh J., Thornton J.M. Pi-pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. // *J. Mol. Biol.* 1991. T. 218, № 4. C. 837–846.
34. Muñoz C. и др. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: Characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation // *Appl. Environ. Microbiol.* 1997. T. 63, № 6. C. 2166–2174.
35. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. // *Chem. Rev.* 1996. T. 96, № 7. C. 2563–2606.
36. Saparrat M.C.N. и др. Induction , Isolation , and Characterization of Two Laccases from the White Rot Basidiomycete *Coriolopsis rigida* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. T. 68, № 4. C. 1534–1540.
37. Komori H., Miyazaki K., Higuchi Y. X-ray structure of a two-domain type laccase: A missing link in the evolution of multi-copper proteins // *FEBS Lett.* 2009. T. 583, № 7. C. 1189–1195.
38. Thakker G., Evans C., Rao K.K. Purification and characterization of laccase from *Monocillium indicum* Saxena // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1992. T. 37, № 3. C. 321–323.
39. Suenaga H., Ohnuki T., Miyazaki K. Functional screening of a metagenomic library for genes involved in microbial degradation of aromatic compounds.: Journal Article // *Environ. Microbiol. England*, 2007. T. 9, № 9. C. 2289–2297.

40. Gupta A. и др. Involvement of Tyr108 in the enzyme mechanism of the small laccase from *Streptomyces coelicolor*. // J. Am. Chem. Soc. United States, 2012. Т. 134, № 44. С. 18213–18216.
41. Michniewicz A. и др. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. // Appl. Microbiol. Biotechnol. Germany, 2006. Т. 69, № 6. С. 682–688.
42. Solomon E.I. и др. Copper active sites in biology // Chem. Rev. 2014. Т. 114, № 7. С. 3659–3853.
43. Jones S.M., Solomon E.I. Electron Transfer and Reaction Mechanism of Laccases // Cellular and molecular life sciences : CMLS. 2015. Т. 72, № 5. С. 869–883.
44. Reinhammar B. Spectroscopic and Catalytic Properties of laccase from *Rhus vernicifera* // J. Inorg. Biochem. 1979. Т. 27. С. 115–127.
45. Höfer C., Schlosser D. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase // FEBS Lett. 1999. Т. 451, № 2. С. 186–190.
46. Schlosser D., Höfer C. Laccase-Catalyzed Oxidation of Mn²⁺ in the Presence of Natural Mn³⁺ Chelators as a Novel Source of Extracellular H₂O₂ Production and Its Impact on Manganese Peroxidase: article // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Т. 68, № 7. С. 3514–3521.
47. Vite-Vallejo O. и др. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase // Enzyme Microb. Technol. 2009. Т. 45, № 3. С. 233–239.
48. Petroski R.J., Peczyńska-Czoch W., Rosazza J.P. Analysis, production, and isolation of an extracellular laccase from *Polyporus anceps* // Appl. Environ. Microbiol. 1980. Т. 40, № 6. С. 1003–1006.
49. Majumdar S. и др. Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation. // Biochemistry. United States, 2014. Т. 53, № 24. С. 4047–4058.
50. Xu F. Dioxygen Reactivity of Laccase // Appl. Biochem. Biotechnol. 2001. Т. 95. С. 125–133.
51. Dube E. и др. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. // Appl. Microbiol. Biotechnol. Germany, 2008. Т. 79, № 4. С. 597–603.
52. Enguita F.J. и др. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component: a laccase with enhanced thermostability properties // J. Biol. Chem. 2003. Т. 278, № 21. С. 19416–19425.
53. Martínez S.M.S. и др. Purification and Partial Characterization of a Thermostable Laccase from

- Pycnoporus sanguineus* CS-2 with Ability to Oxidize High Redox Potential Substrates and Recalcitrant Dyes, *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches* // *Appl. Bioremediation - Act. Passiv. Approaches*. 2013. C. 353–375.
54. Dedeyan B. и др. Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*: article // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Т. 66, № 3. С. 925–929.
 55. Vaitkyavichyus R.K. и др. Isolation and kinetic parameters of laccase from *Polyporus anisoporus*. // *Biochemistry*. 1984. Т. 49, № 6. С. 859–863.
 56. Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases // *J. Biol. Chem.* 1997. Т. 272, № 2. С. 924–928.
 57. Li C., Morton Z. Hoffman. One-Electron Redox Potentials of Phenols in Aqueous Solution // *J. Phys. Chem. B*. 1999. Т. 103, № 32. С. 6653–6656.
 58. Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: Correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition // *Biochemistry*. 1996. Т. 35, № 23. С. 7608–7614.
 59. Madzak C. и др. Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis // *Protein Eng. Des. Sel.* 2006. Т. 19, № 2. С. 77–84.
 60. Xu F. и др. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. // *Biochem. J.* 1998. Т. 334. С. 63–70.
 61. Heinzkill M. и др. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*) // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. Т. 64, № 5. С. 1601–1606.
 62. Bento I. и др. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. // *Dalton Trans.* 2005. Т. 3, № 21. С. 3507–3513.
 63. Leitner C. и др. Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*.: Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't // *Appl. Biochem. Biotechnol. United States*, 2002. Т. 98–100. С. 497–507.
 64. Quintanar L. и др. Spectroscopic and Electronic Structure Studies of the Trinuclear Cu Cluster Active Site of the Multicopper Oxidase Laccase: Nature of Its Coordination Unsaturation: article // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Т. 127, № 40. С. 13832–13845.
 65. Hakulinen N. и др. A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase // *J. Struct. Biol.* 2008. Т. 162, № 1. С. 29–39.
 66. Koroleva O.. V. и др. Comparative Characterization of Methods for Removal of Cu (II) from

- the Active Sites of Fungal Laccases. 2001. T. 66, № 9. C. 960–966.
67. Johannes C., Majcherczyk A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. // J. Biotechnol. 2000. T. 78, № 2. C. 193–199.
 68. Lahtinen M. и др. On the reactions of two fungal laccases differing in their redox potential with lignin model compounds: products and their rate of formation. // J. Agric. Food Chem. United States, 2009. T. 57, № 18. C. 8357–8365.
 69. Komori H. и др. An O-Centered Structure of the Trinuclear Copper Center in the Cys500Ser/Glu506Gln Mutant of CueO and Structural Changes in Low to High X-Ray Dose Conditions // Angew. Chemie Int. Ed. 2012. T. 51, № 8. C. 1861–1864.
 70. Komori H. и др. New insights into the catalytic active-site structure of multicopper oxidases // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. International Union of Crystallography, 2014. T. 70, № 3. C. 772–779.
 71. Hakulinen N. и др. A crystallographic and spectroscopic study on the effect of X-ray radiation on the crystal structure of Melanocarpus albomyces laccase // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. T. 350, № 4. C. 929–934.
 72. Ferraroni M. и др. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. // BMC Struct. Biol. 2007. T. 7. C. 60.
 73. Komori H., Higuchi Y., Ions F.C. Structural insights into the O₂ reduction mechanism of multicopper oxidase // J. Biochem. 2015. T. 158, № Table I. C. 1–6.
 74. Reinhammar B.R.M. Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin // Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg. 1972. T. 275, № 2. C. 245–259.
 75. Piontek K., Antorini M., Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers // J. Biol. Chem. 2002. T. 277, № 40. C. 37663–37669.
 76. Sakurai T., Kataoka K. Structure and function of type I copper in multicopper oxidases // Cell. Mol. Life Sci. 2007. T. 64, № 19–20. C. 2642–2656.
 77. Durão P. и др. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: Structural, biochemical, enzymatic and stability studies // J. Biol. Inorg. Chem. 2006. T. 11, № 4. C. 514–526.
 78. Durão P. и др. Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic,

- redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants. // *Biochem. J.* 2008. T. 412, № 2. C. 339–346.
79. Reinhammar B. Purification and properties of laccase and stellacyanin from *rhus vernicifera* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1969. T. 205. C. 35–47.
80. Xie Y. и др. Structural reorganization of the copper binding site involving Thr15 of maviacyanin from *Cucurbita pepo medullosa* (zucchini) upon reduction. // *J. Biochem. Japan*, 2005. T. 137, № 4. C. 455–461.
81. Shleev S. и др. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. // *Biochem. J.* 2005. T. 385, № Pt 3. C. 745–754.
82. Christenson A. и др. Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. T. 1757, № 12. C. 1634–1641.
83. Kroneck P.M.H. и др. Ascorbate Oxidase: Molecular Properties and Catalytic Activity. 1982. C. 223–248.
84. Garzillo A.M. и др. Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes troglia*: Comparative Study, Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't // *J. Protein Chem. United States*, 2001. T. 20, № 3. C. 191–201.
85. Shleev S. V. и др. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes // *Biochimie. France*, 2004. T. 86, № 9–10. C. 693–703.
86. Xu F. и др. Targeted Mutations in a *T.villosa* laccase // *Biochemistry.* 1999. T. 274, № 18. C. 12372–12375.
87. Koroliova O. V. и др. Laccase of *Coriolus zonatus*: isolation, purification and some physico-chemical properties: article // *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol. United States: United States*, 1999. T. 76, № 2. C. 115–128.
88. Shleev S. и др. Characterization of two new multiforms of *Trametes pubescens* laccase. // *Bioorg. Chem. United States*, 2007. T. 35, № 1. C. 35–49.
89. Klonowska A. и др. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30: article // *Eur. J. Biochem. Blackwell Science Ltd*, 2002. T. 269, № 24. C. 6119–6125.
90. Yaver D.S. и др. Molecular Characterization of Laccase Genes from the Basidiomycete *Coprinus cinereus* and Heterologous Expression of the Laccase Lcc1 // *Applied and Environmental Microbiology.* 1999. T. 65, № 11. C. 4943–4948.

91. Jung H., Xu F., Li K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7 // *Enzym. Microb Tech.* 2002. T. 30. C. 161–168.
92. Klonowska A. и др. LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain {C30} obtained as a recombinant protein in yeast: article // *Enzyme Microb. Technol.* 2005. T. 36, № 1. C. 34–41.
93. Shleev S. и др. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes. // *Biosens. Bioelectron.* England, 2005. T. 20, № 12. C. 2517–2554.
94. Hakulinen N. и др. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. // *Nat. Struct. Biol.* United States, 2002. T. 9, № 8. C. 601–605.
95. Kumar S.V.S. и др. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family.: Comparative Study, Evaluation Studies, Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't // *Biotechnol. Bioeng.* United States, 2003. T. 83, № 4. C. 386–394.
96. Alcalde M. Chapter 26 Laccases : Biological Functions , Molecular Structure and Industrial Applications // *Structure.* 2007. C. 461–476.
97. Hakulinen N., Rouvinen J. Three-dimensional structures of laccases // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. T. 72, № 5. C. 857–868.
98. Ducros и др. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution // *Nat. Struct. Biol.* 1998. T. 5, № 6. C. 310–316.
99. Ducros V. и др. Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68 Å resolution: evidence for different 'type 2 Cu-depleted' isoforms // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2001. T. 57, № 2. C. 333–336.
100. Polyakov K.M. и др. Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2009. T. 65, № 6. C. 611–617.
101. Colman P.M. и др. X-ray crystal structure analysis of plastocyanin at 2.7 Å resolution // *Nature.* 1978. T. 272, № 5651. C. 319–324.
102. Serrano-Posada H. и др. X-ray-induced catalytic active-site reduction of a multicopper oxidase: structural insights into the proton-relay mechanism and O₂-reduction states.: Journal Article // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* United States, 2015. T. 71, № Pt 12. C. 2396–2411.
103. Roberts S. а и др. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. T. 99, № 5. C. 2766–2771.

104. Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. // J. Mol. Biol. England, 2007. T. 372, № 3. C. 774–797.
105. Garavaglia S. и др. The Structure of Rigidoporus lignosus Laccase Containing a Full Complement of Copper Ions, Reveals an Asymmetrical Arrangement for the T3 Copper Pair: article // J. Mol. Biol. 2004. T. 342, № 5. C. 1519–1531.
106. Messerschmidt A. и др. X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands. // J. Mol. Biol. ENGLAND, 1989. T. 206, № 3. C. 513–529.
107. Palmer A.E. и др. Targeted Mutations in a Trametes villosa laccase // Biochemistry. 1999. T. 274, № 18. C. 12372–12375.
108. Pardo I., Camarero S. Laccase engineering by rational and evolutionary design // Cell. Mol. Life Sci. 2015. T. 72, № 5. C. 897–910.
109. Xu F. и др. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability // Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol. 1996. T. 1292, № 2. C. 303–311.
110. Silva C.S. и др. Crystal structure of the multicopper oxidase from the pathogenic bacterium *Campylobacter jejuni* CGUG11284: characterization of a metallo-oxidase // Metallomics. The Royal Society of Chemistry, 2012. T. 4, № 1. C. 37–47.
111. Schneider P. и др. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase // Enzyme Microb. Technol. 1999. T. 25, № 6. C. 502–508.
112. Farver O. и др. Intramolecular electron transfer in single-site-mutated azurins: article // Biochemistry. 1993. T. 32, № 28. C. 7317–7322.
113. Hall J.F. и др. Role of the axial ligand in type 1 Cu centers studied by point mutations of met148 in rusticyanin.: Journal Article // Biochemistry. 1999. T. 38, № 39. C. 12675–12680.
114. Pavelka M., Burda J. V. Theoretical description of copper Cu(I)/Cu(II) complexes in mixed ammine-aqua environment. DFT and ab initio quantum chemical study // Chem. Phys. 2005. T. 312, № 1–3. C. 193–204.
115. Enguita F.J. и др. Substrate and Dioxygen Binding to the Endospore Coat Laccase from *Bacillus subtilis* // J. Biol. Chem. 2004. T. 279, № 22. C. 23472–23476.
116. Kallio J.P. и др. Structure-Function Studies of a *Melanocarpus albomyces* Laccase Suggest a Pathway for Oxidation of Phenolic Compounds // J. Mol. Biol. Elsevier Ltd, 2009. T. 392, № 4.

C. 895–909.

117. Glazunova O. a. и др. Elucidation of the crystal structure of *Coriolopsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2015. Т. 71, № 4. С. 854–861.
118. DelaMora E. и др. Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2012. Т. 68, № 5. С. 564–577.
119. Chen Z. и др. The role of Glu498 in the dioxygen reactivity of CotA-laccase from *Bacillus subtilis*. // *Dalton Trans.* 2010. Т. 39, № 11. С. 2875–2882.
120. Bento I. и др. Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases. Structural and modelling studies focusing on proton transfer. // *BMC Struct. Biol.* 2010. Т. 10. С. 28.
121. Andberg M. и др. Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure.: Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't // *FEBS J. England*, 2009. Т. 276, № 21. С. 6285–6300.
122. Wynn R.M., Knaff D.B., Holwerda R.A. Reactivity, electrochemical, and spectroscopic studies of type 2 copper-depleted *Rhus vernicifera* laccase // *Biochemistry.* 1984. Т. 23, № 2. С. 241–247.
123. Hanna P.M. и др. Type 2-depleted fungal laccase. // *Biochem. J.* 1988. Т. 253, № 2. С. 561–568.
124. Morpurgo L. и др. Titrations with Ferrocyanide of Japanese-Lacquer-Tree(*Rhus vernicifera*) Laccase and of Type 2 Copper -Depleted Enzyme // *Biochem J.* 1980. Т. 187. С. 367–370.
125. Malkin R., Malmström B.G., Vänngård T. The reversible removal of one specific copper(II) from fungal laccase. // *Eur. J. Biochem.* 1969. Т. 7, № 2. С. 253–259.
126. Graziani M.T. и др. Selective removal of type 2 copper from *Rhus vernicifera* laccase. // *FEBS Lett.* 1976. Т. 70, № 1. С. 87–90.
127. Klemens A.S., McMillin D.R. New method for removing type 2 copper from *Rhus* laccase. // *J. Inorg. Biochem.* 1990. Т. 38, № 2. С. 107–115.
128. Galli I., Musci G., Bonaccorsi di Patti M.C. Sequential reconstitution of copper sites in the multicopper oxidase CueO.: Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't // *J. Biol. Inorg. Chem. Germany*, 2004. Т. 9, № 1. С. 90–95.
129. Morpurgo L. и др. pH dependence of redox properties of the type 2 Cu-depleted tree laccase //

FEBS Lett. 2016. T. 113, № 2. C. 153–156.

130. Durão P. и др. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes.: Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't // J. Biol. Inorg. Chem. Germany, 2008. T. 13, № 2. C. 183–193.
131. Ko E.M., Leem Y.E., Choi H.T. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2001. T. 57, № 1–2. C. 98–102.
132. Maestre-Reyna M. и др. Structural and Functional Roles of Glycosylation in Fungal Laccase from *Lentinus* sp. // PLoS ONE. 2015. T. 10, № 4.
133. Yoshitake A. и др. N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor* // J. Gen. Microbiol. 1993. T. 139, № 1. C. 179–185.
134. Silva C.S. и др. The role of Asp116 in the reductive cleavage of dioxygen to water in CotA laccase: assistance during the proton-transfer mechanism. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. United States, 2012. T. 68, № Pt 2. C. 186–193.
135. Hann S. и др. SEC-ICP-DRCMS and SEC-ICP-SFMS for determination of metal-sulfur ratios in metalloproteins: article // J. Anal. At. Spectrom. The Royal Society of Chemistry, 2004. T. 19, № 1. C. 74–79.
136. Christenson A. Spectroelectrochemistry of Redox Enzymes Department of Analytical Chemistry. 2006.
137. Hoffmann P., Esser K. The phenol oxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. XII. Affinity of laccases II and III to substrates with different substitution patterns.: Journal Article // Arch. Microbiol. 1977. T. 112, № 1. C. 111–114.
138. Childs R.E., Bardsley W.G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen.: Journal Article // Biochem. J. 1975. T. 145, № 1. C. 93–103.
139. The Proteomics Protocols Handbook / под ред. Walker J.M. Totowa, NJ: Humana Press, 2005.
140. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. 1976. T. 72. C. 248–254.
141. Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. Москва: Мир, 1985. 358 с.
142. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage

- T4.: Journal Article // Nature. 1970. T. 227, № 5259. C. 680–685.
143. Kabsch W. XDS: article // Acta Crystallogr. Sect. D. 2010. T. 66, № 2. C. 125–132.
 144. Long F. и др. BALBES: a molecular-replacement pipeline // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2008. T. 64, № Pt 1. C. 125–132.
 145. Winn M.D. и др. Overview of the CCP4 suite and current developments // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2011. T. 67, № Pt 4. C. 235–242.
 146. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method: article // Acta Crystallogr. Sect. D. 1997. T. 53, № 3. C. 240–255.
 147. Emsley P. и др. Features and development of Coot: article // Acta Crystallogr. Sect. D. 2010. T. 66, № 4. C. 486–501.
 148. Vagin A.A., Richelle J., Wodak S.J. SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model.: Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 1999. T. 55, № Pt 1. C. 191–205.
 149. Laskowski R.A. и др. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures: article // J. Appl. Crystallogr. 1993. T. 26, № 2. C. 283–291.
 150. Cruickshank D.W.J. in the Refinement of Macromolecular structures Proceedings of CCP4 Study weekend // Proc. CCP4 Study Weekend. 1996. C. 11–22.
 151. McNicholas S. и др. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software: article // Acta Crystallogr. Sect. D. 2011. T. 67, № 4. C. 386–394.
 152. Chen V.B. и др. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. 2010. T. 66, № Pt 1. C. 12–21.
 153. McWilliam H. и др. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI // Nucleic Acids Res. 2013. T. 41, № W1. C. W597–W600.
 154. Diederichs K., Karplus P.A. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography.: Journal Article // Nat. Struct. Biol. 1997. T. 4, № 4. C. 269–275.
 155. Yanagisawa S. и др. pi-Interaction Tuning of the Active Site Properties of Metalloproteins // J. Am. Chem. Soc. 2008. T. 130, № 46. C. 15420–15428.
 156. Shleev S. и др. Autoreduction and aggregation of fungal laccase in solution phase: possible

- correlation with a resting form of laccase. // *Biochimie*. 2006. Т. 88, № 9. С. 1275–1285.
157. Messerschmidt A. и др. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. // *J. Mol. Biol.* 1992. Т. 224, № 1. С. 179–205.
158. Lin-Cereghino J. и др. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *FEMS Microbiol. Rev.* 2000. Т. 24, № 1. С. 45–66.
159. Koudelka G.B., Ettingers J. Fluoride Effects on the activity of laccase. 1988. Т. 263, № 8. С. 3698–3705.