

На правах рукописи

Глазунова Ольга Александровна

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЛАККАЗ
БАЗИДИОМИЦЕТОВ**

Специальность 03.01.04 Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

МОСКВА 2019

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

Научные руководители:

доктор химических наук, профессор
Ярополов Александр Иванович

кандидат физико-математических наук
Поляков Константин Михайлович

Официальные оппоненты:

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

Лисов Александр Викторович
кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», старший научный сотрудник.

Ведущая организация:

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

Защита состоится «__» 2019 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.247.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Лакказы (*n*-дифенол: кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) относится к группе «голубых» медьсодержащих оксидаз, катализирующих одноэлектронное окисление широкого спектра соединений с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. Субстратами-донорами электронов для лакказ могут являться замещенные монофенолы, полифенолы, ароматические амины и некоторые неорганические соединения. Благодаря своим свойствам эти ферменты имеют большой потенциал использования в различных отраслях биотехнологии в качестве биокатализаторов для биodeградации ксенобиотиков, органического синтеза, производства лекарственных препаратов, в текстильной и пищевой промышленности, а также в других областях. Поскольку для каждого конкретного процесса требуются биокатализаторы с определенными характеристиками, поиск и изучение лакказ с новыми свойствами являются чрезвычайно актуальными. Помимо этого, изучение структурных основ, обеспечивающих функционирование данных ферментов, также представляется весьма актуальным, так как данная информация позволит в дальнейшем выработать стратегию для проведения сайт-специфического мутагенеза и получать ферменты с требуемыми свойствами.

Степень разработанности темы исследования. К настоящему времени выделено и биохимически охарактеризовано более 280 лакказ, выделенных из растений, грибов, бактерий и насекомых. Физико-химические и каталитические свойства лакказ из различных источников значительно отличаются. В частности, сильно отличается спектр соединений, окисление которых способны катализировать эти ферменты.

Активный центр лакказы состоит из двух частей. В центре T1, содержащем ион меди первого типа Cu1, происходит окисление субстрата-донора. В центре T2/T3, содержащем ион меди второго типа Cu2 и пару ионов меди третьего типа Cu3, происходит восстановление молекулярного кислорода до воды. Эффективность окисления лакказами различных субстратов зависит от значения окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) иона меди T1. В соответствии со значением ОВП иона меди T1 лакказы условно подразделяют на ферменты с высоким (730-790 мВ), средним (460-730 мВ) и низким (< 460 мВ)

Используемые сокращения: ОВП – окислительно-восстановительный потенциал, НВЭ – нормальный водородный электрод, AfL – лакказа из *A. faginea*, CcL – лакказа из *C. caperata*, SmL – лакказа из *S. murashkinskyi*, ThL – лакказа из *T. hirsuta*, T2D – лакказа с удаленным ионом меди из центра T2, Cu1 – ион меди первого типа, Cu2 – ион меди второго типа, Cu3 – ион меди третьего типа, PDB – база данных Protein Data Bank.

ОВП. Лакказы базидиомицетов обладают высоким ОВП по сравнению с лакказами из других источников. Хотя в ряде работ с использованием точечного мутагенеза было установлено, что аминокислотные остатки из ближайшего окружения иона меди T1 оказывают влияние на значение ОВП, рассчитать значение ОВП на основании структуры фермента в настоящее время не представляется возможным.

Механизм восстановления кислорода до воды в активном центре лакказ первоначально был предложен на основании различных методов спектроскопии, квантово-механических расчетов и единственной известной на тот момент структуры медьсодержащей оксидазы – аскорбатоксидазы. Данные, полученные традиционными методами рентгеноструктурного анализа и методами серийной мультикристалльной кристаллографии, согласуются с этой моделью механизма реакции.

Несмотря на то, что лакказы детально исследованы различными методами, остается неясным целый ряд вопросов о влиянии структуры ферментов на их свойства. Недостаточно изучены лакказы базидиомицетов со средним и низким ОВП, а также процесс встраивания ионов меди в центр T2 этих ферментов. В литературе отсутствуют надежные оценки влияния остатков второй координационной сферы иона меди в центре T1 на величину ОВП лакказ. В предложенном в литературе механизме восстановления кислорода лакказами не выяснены детали связывания молекулярного кислорода в T2/T3 центре и высвобождения молекулы воды, образующейся в процессе реакции.

Цель диссертационной работы: структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов с различными ОВП. Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие **задачи:**

1. Нарботка препаратов двух новых лакказ – из *Antrodiella faginea* и *Steccherinum murashkinskyi*. Детальное изучение и сравнение физико-химических и каталитических свойств лакказ со средним ОВП из *A. faginea*, *S. murashkinskyi* и лакказ с высоким ОВП из *Coriolopsis caperata* и *Trametes hirsuta*.
2. Решение с высоким разрешением пространственных структур лакказ из *A. faginea*, *S. murashkinskyi* и *C. caperata*.
3. Изучение встраивания ионов меди в лакказу из *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 в кристаллах и в растворе.
4. Проведение сравнительного анализа окружения иона меди в центре T1 для решенных с высоким разрешением лакказ базидиомицетов с целью выявления корреляции между строением ферментов и их ОВП.
5. Исследование динамики ферментативного восстановления кислорода в кристалле лакказы *S. murashkinskyi* за счет решения с высоким разрешением

серии структур, дифракционные данные для которых были собраны последовательно с одного кристалла с увеличивающейся дозой поглощенного образцом ионизирующего рентгеновского излучения.

Научная новизна. Впервые были получены и детально охарактеризованы лакказы базидиомицетов *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Решены структуры лакказ *A. faginea* и *C. caperata* с удаленным из центра T2 ионом меди (T2D), а также комплексов T2D лакказы *C. caperata* с солями меди CuCl и CuSO₄ с высоким разрешением (1,6 – 1,89 Å), а структура *S. murashkinskyi* – со сверхвысоким разрешением (0,95 Å, единственная структура лакказы в банке данных PDB с разрешением лучше 1 Å). Впервые показана возможность встраивания в T2D лакказу *C. caperata* ионов меди при обработке ее солью CuCl как в растворе, так и в кристалле. Была установлена корреляция между строением петель из окружения иона меди в T1 центре и его ОВП. При помощи метода серийной кристаллографии высокого разрешения для лакказы *S. murashkinskyi* с одного кристалла была получена серия структур с возрастающими дозами поглощенного рентгеновского излучения. Впервые для лакказ была установлена связь между координацией ионов меди в T2/T3 центре и их степенью окисления. На основании анализа полученной серии структур был существенно уточнен механизм восстановления кислорода до воды в активном центре лакказ.

Теоретическая и практическая значимость работы. Выделенные и охарактеризованные лакказы из *A. faginea* и *S. murashkinskyi* обладают высокой термостабильностью. Обе лакказы катализируют окисление монофенольных соединений с высокой эффективностью, несмотря на то, что они обладают средним значением ОВП. Это делает их перспективными для применения в промышленных процессах, протекающих при повышенных температурах. Показанная в работе возможность реконструкции центра T2 базидиомицетной лакказы с использованием CuCl позволяет восстанавливать активность ферментов с недостаточным содержанием ионов меди в T2 центре. Предложена оценка ОВП лакказ с известной пространственной структурой на основании выявленной корреляции между ОВП лакказы и доступностью растворителю пространственно консервативной части окружения центра T1 лакказ. Механизм ферментативного восстановления молекулярного кислорода до воды лакказами, существенно уточненный в работе, имеет важное теоретическое значение для понимания функционирования медьсодержащих оксидаз.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для каталитического окисления монофенольных соединений с потенциалом окисления выше 700 мВ, а также некоторых красителей ОВП иона

меди в центре T1 лакказ является определяющим фактором. Для субстратов лакказ с потенциалом окисления ниже 700 мВ не наблюдалось корреляции между ОВП лакказ и эффективностью каталитического окисления этих субстратов.

2. Встраивание ионов меди в центр T2 лакказы в кристаллах происходит при обработке CuCl и не происходит при обработке CuSO₄.

3. Существует корреляция между доступностью растворителю консервативных участков окружения иона меди в центре T1 и величиной ОВП лакказ.

4. Уточнение механизма восстановления кислорода до воды в активном центре лакказ.

Методология и методы исследования. В работе использованы современные биохимические методы для выделения и характеристики лакказ, методы кристаллизации белков, классические методы рентгеноструктурного анализа белков и метод сериального сбора дифракционных данных с одного кристалла с возрастающей дозой поглощенного образцом рентгеновского излучения.

Степень достоверности и апробация результатов исследования. По материалам диссертации было опубликовано семь статей в рецензируемых журналах, входящих в международные реферативные базы данных: Acta Crystallographica section D, International Journal of Biological Macromolecules, PLoS ONE, Catalysts, International Journal of Molecular Sciences, Прикладная биохимия и микробиология. Основные результаты работы были представлены на следующих конференциях: OxiZymes 2012 (Марсель, Франция), Биокатализ-2013 (Москва), 5th Congress of European Microbiologists (FEMS) 2013 (Лейпциг, Германия), 38th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2013 (Санкт-Петербург), OxiZymes 2014, (Вена, Австрия), V Съезд биохимиков России 2016 (Дагомыс), VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" 2017 (Москва), 43th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2018 (Прага, Чехия).

Связь с государственными программами. Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (РФФИ) (номера проектов: 11-04-01539, 16-04-00552, 16-34-01355).

Личный вклад диссертанта. Автор лично принимал участие в наработке препаратов лакказ, в изучении их физико-химических и каталитических свойств, в кристаллизации ферментов, в сборе дифракционных данных на синхротронном источнике в НИЦ «Курчатовский институт», в обработке всех наборов дифракционных данных, в решении, уточнении и анализе структур лакказ. Автор принимал участие в планировании экспериментов и публикации результатов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 16 печатных работ: 7 статей в рецензируемых научных изданиях и 9 тезисов докладов всероссийских и международных научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация содержит следующие разделы: введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, список литературы. Общий объем диссертации составляет 138 страниц, включая 17 таблиц и 38 рисунков. Список использованной литературы содержит 277 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Штаммы грибов и наработка ферментных препаратов лакказ

Для всестороннего структурно-функционального исследования лакказ из Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института им. В. Л. Комарова было выбрано четыре штамма базидиомицетов белой гнили. Два штамма грибов – *Antrodiella faginea* Vampola et Pouzar LE-BIN 1998 и *Steccherinum murashkinskyi* (Burt) Maas Geest. LE-BIN 1963 относятся к малоизученному семейству *Steccherinaceae*, а два штамма базидиомицетов – *Coriolopsis caperata* (Berk.) Murrill LE-BIN 0677 и *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd LE-BIN 072 относятся к хорошо изученному семейству *Polyporaceae*. Все четыре штамма обладали высокими общей лигнолитической и лакказной активностями.

Было проведено глубинное культивирование выбранных штаммов на глюкозо-пептонной среде с добавлением CuSO_4 . Пик лакказной активности достигался на 16 сутки у *S. murashkinskyi*, на 18 сутки – у *A. faginea*. Выход гомогенных препаратов лакказ составлял от 14 до 33% от общей активности фермента в культуральной жидкости, а удельная активность увеличилась в 70-90 раз. Гомогенность полученных фракций лакказы была подтверждена при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях и изоэлектрофокусирования.

Физико-химические и каталитические свойства лакказ

Все исследованные в работе лакказы обладали характерным для лакказ базидиальных грибов спектром поглощения в УФ/видимой области. Полоса поглощения при 610 нм свидетельствует о наличии иона меди первого типа, отвечающего за голубую окраску фермента, а «плечо» на 330 нм соответствует поглощению пары ионов меди третьего типа. Наличие в препаратах меди второго типа было подтверждено спектрами ЭПР. Основные физико-химические характеристики лакказ из *A. faginea* (AfL), *S. murashkinskyi* (SmL), *C. caperata* (CcL) и *T. hirsuta* (ThL) приведены в таблице 1.

По данным потенциометрического титрования лакказы AfL и SmL обладали более низким ОБП, нежели лакказы CcL и ThL. Еще одной отличительной особенностью лакказ AfL и SmL были более высокие значения температурных оптимумов и значительно более высокая термостабильность по сравнению с лакказами ThL и CcL. Значения полученных температур плавления белковой глобулы и энтальпии денатурации коррелируют с термостабильностью лакказ. Более высокая термостабильность AfL и SmL не может объясняться более высоким содержанием сахаров у этих лакказ, поскольку содержание сахаров у SmL ниже, чем у CcL и ThL.

Таблица 1. Физико-химические характеристики лакказ.

Характеристики	AfL	SmL	CcL	ThL
M_r , кДа	65	63	63	66
pI	4,6	3,0	3,5	4,0
Содержание сахаров, %	17	10	16	12
E°_{T1} , мВ (отн. НВЭ)	620±20	650±10	780±10	780±10
Температурный оптимум, °C	70	60	55	55
$\tau_{1/2}$ (60°C), мин	640	890	200	20
$\tau_{1/2}$ (70°C), мин	70	180	9,5	<1
T_{max} , °C	79,1	83,7	77,0	69,4
ΔH_{cal} , кДж/моль	781,0	834,7	511,6	287,0
pH-оптимум (фенольные субстраты)	3,2 – 4,5	3,5 – 4,8	3,5 – 4,9	3,5 – 4,5

Для оценки субстратной специфичности исследуемых лакказ было изучено окисление 20 монофенольных соединений и 4 красителей с различной структурой (рисунок 1).

Было показано, что лакказы с высоким ОБП (CcL и ThL) с более высокой скоростью катализируют окисление монофенольных субстратов с потенциалом окисления выше 700 мВ (кумаровые кислоты, сиреневая кислота, ванильная кислота, ванилин, 2,5-ксилидин), а также красителей по сравнению с лакказами со средним ОБП (AfL и SmL). Для субстратов с потенциалом окисления ниже

700 мВ не наблюдалось корреляции между ОВП лакказ и скоростью окисления этих субстратов.

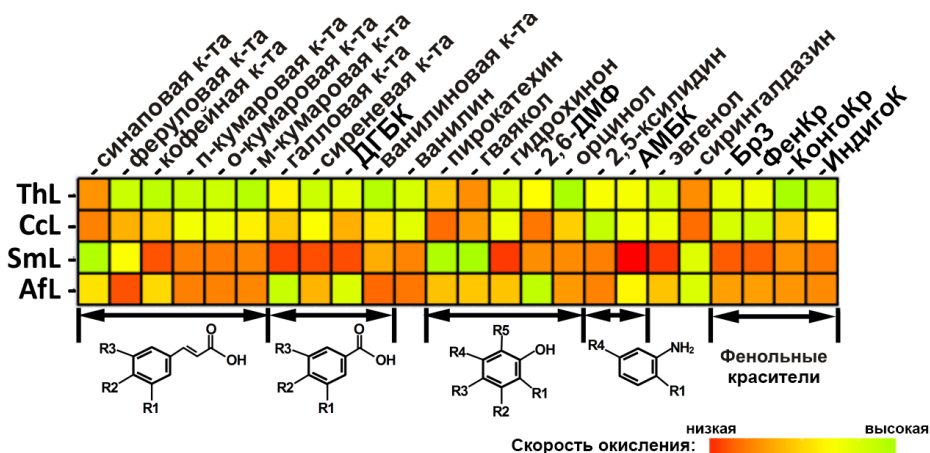


Рисунок 1. Графическое представление скоростей каталитического окисления лакказами различных фенольных субстратов. Цветовая окраска соответствует стандартизованной оценке значений скоростей для каждого субстрата: $z = (V - V_{cp})/S$, где V – скорость реакции, V_{cp} – средняя скорость реакции, S – стандартное отклонение. 2,6-ДМФ – 2,6-диметоксифенол, ДГБК – 2,3-дигидроксibenзойная кислота, АМБК – 2-амино-4-метоксibenзойная кислота, БрЗ – бромкрезоловый зеленый, ФенКр – феноловый красный, КонгоКр – конго красный, ИндигоК - индигокармин.

Каталитические параметры ферментативного окисления были определены для семи субстратов (таблица 2). Эти соединения можно рассматривать как природные субстраты лакказ – производные лигнина сирингильного (2,6-диметоксифенол, синаповая кислота, сирингалдазин) и гваяцильного рядов (гваякол, феруловая кислота), а также экстрактивные вещества древесины (пирокатехин, галловая кислота). Для всех четырех лакказ рН оптимумы окисления этих субстратов находились в кислой области: 3,2 – 4,9 (таблица 1).

Все лакказы, кроме ThL, имели наименьшее сродство (наибольшее значение K_M) к двум наиболее простым производным фенола – гваяколу и пирокатехину, причем сродство к субстрату с метоксильной группой в орто-положении (гваяколу) было ниже, нежели сродство к субстрату с гидроксильной группой в той же позиции (пирокатехину). Вторая метоксильная группа (2,6-диметоксифенол) и/или $-CH=CH-COOH$ группа (2,6-ДМФ, синаповая и феруловая кислоты) приводила к значительному снижению константы

Михаэлиса у всех исследованных лакказ. Все лакказы проявляли большее сродство к соединениям синрингильного ряда по сравнению с соединениями гваяцильного ряда. Эффективность катализа ($V_{\max}/K_M$) в большей степени определялась значениями K_M (значения K_M варьируются в большем диапазоне, нежели значения $V_{\max}$). Наибольшая эффективность (и наибольшее сродство) окисления выбранных субстратов (за исключением гваякола и феруловой кислоты) наблюдалась для лакказы AfL.

Не было выявлено корреляции между величиной ОВП центра T1 лакказ и значением $V_{\max}$ или эффективностью катализа ($V_{\max}/K_M$). Можно предположить, что эффективность катализа окисления выбранных субстратов зависит не только от разности между ОВП лакказы и потенциалом окисления субстрата, но, возможно, и от структуры субстрат-связывающего кармана лакказ. Следует отметить, что все приведенные в таблице 2 модельные субстраты обладают потенциалом окисления менее 700 мВ.

Таблица 2. Каталитические параметры окисления модельных субстратов с участием лакказ.

Лакказа Субстрат		AfL	SmL	ThL	CcL
Пирокатехин	$V_{\max}/K_M, \text{с}^{-1}$	31±3	8±0,5	13±2	3±0,2
	$K_M, \text{мкМ}$	76±8	381±21	183±16	815±65
Галловая кислота	$V_{\max}/K_M, \text{с}^{-1}$	7±0,9	3±0,4	2±0,3	3±0,4
	$K_M, \text{мкМ}$	76±9	119±15	223±32	129±18
2,6-диметокси-фенол	$V_{\max}/K_M, \text{с}^{-1}$	105±11	57±4	42±5	15±2
	$K_M, \text{мкМ}$	10±1	17±1	24±2	65±5
Синаповая кислота	$V_{\max}/K_M, \text{с}^{-1}$	532±90	376±35	151±23	194±15
	$K_M, \text{мкМ}$	6±1	11±1	17±2	13±1
Синрингалдазин	$V_{\max}/K_M, \text{с}^{-1}$	1437±290	284±58	31±4	194±12
	$K_M, \text{мкМ}$	1±0,2	5±1	34±4	5±0,3
Гваякол	$V_{\max}/K_M, \text{с}^{-1}$	6±0,6	2±0,2	8±0,9	2±0,2
	$K_M, \text{мкМ}$	243±10	1076±50	173±15	696±50
Феруловая кислота	$V_{\max}/K_M, \text{с}^{-1}$	49±10	22±4	77±10	93±9
	$K_M, \text{мкМ}$	35±7	97±15	28±3	20±2

Структура лакказ

Аминокислотные последовательности лакказ AfL, SmL и CcL содержат в себе четыре строго консервативные для лакказ области L1-L4 (аминокислотные остатки 65-88, 105-125, 397-404, 447-487, нумерация в соответствии со структурой SmL). В областях L1-L4 находятся десять консервативных остатков гистидина и один остаток цистеина, координирующие ионы меди активного центра лакказ. Также при анализе аминокислотных последовательностей лакказ были выявлены четыре консервативных остатка цистеина, участвующих в образовании дисульфидных мостиков (выделены желтым цветом на рисунке 2). Лакказы AfL и SmL содержат по 6 потенциальных сайтов гликозилирования, CcL – три (выделены серым цветом на рисунке 2).

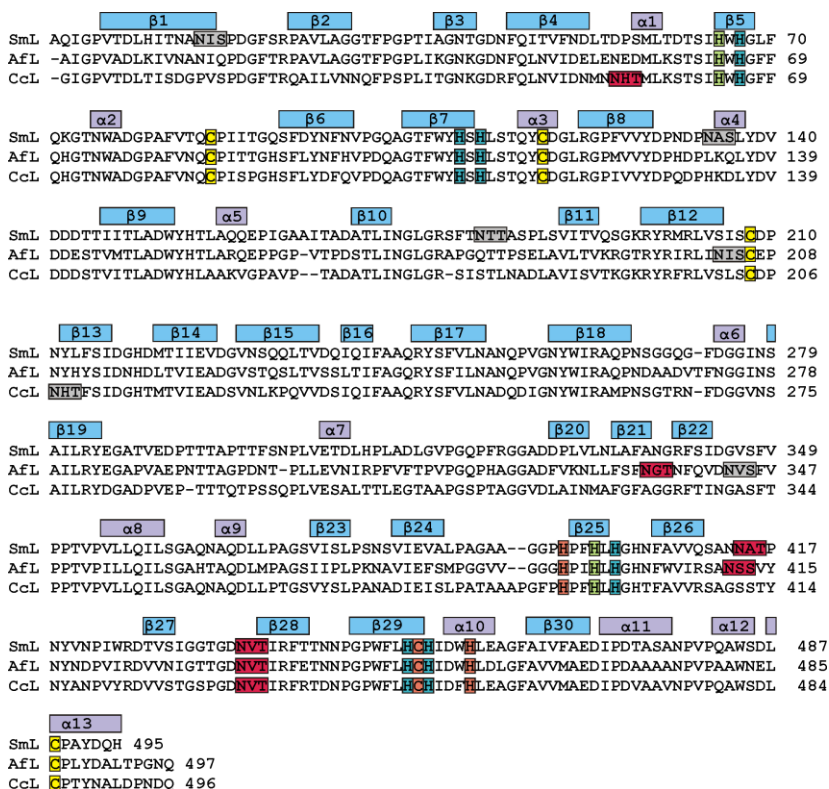


Рисунок 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей лакказ AfL, SmL и CcL. Элементы вторичной структуры лакказ показаны на примере SmL. β X – бета-цепь, α X – альфа-спираль, X – лиганды, координирующие Cu1, X – лиганды, координирующие Cu2, X – лиганды, координирующие Cu3. XXX – потенциальный сайт гликозилирования, XXX – занятый сайт гликозилирования.

Методом диффузии паров в висячей капле были получены кристаллы лакказ AfL и SmL, а также лакказы CcL с удаленным из центра T2 ионом меди (T2D). С высоким разрешением были определены структуры нативных форм лакказ AfL и SmL, структура T2D лакказы CcL и структуры комплексов T2D CcL с хлоридом меди (I) ($\text{CcL} + \text{Cu}^+$) и комплекса T2D CcL с сульфатом меди (II) ($\text{CcL} + \text{Cu}^{2+}$). Структуры лакказ AfL, SmL и CcL были решены с разрешением 1,75 Å, 0,95 Å и 1,6 Å соответственно. При настаивании кристаллов T2D лакказы CcL в растворе CuSO_4 разрешение практически не изменилось и составило 1,67 Å, а при настаивании в растворе CuCl снизилось до 1,89 Å (таблица 3). Следует отметить, что структуры CcL и комплекса $\text{CcL} + \text{Cu}^{2+}$ ничем не отличаются.

Таблица 3. Характеристики наборов дифракционных данных и структур лакказ. В скобках указаны значения для слоя с максимальным разрешением.

Структура	AfL	SmL	CcL	$\text{CcL} + \text{Cu}^+$	$\text{CcL} + \text{Cu}^{2+}$
Станция	«Белок»	X13	X13	«Белок»	«Белок»
PDB код	5EHF	5E9N	4JHU	4JHV	—
Разрешение, Å	30,0-1,75 (1,86-1,75)	20,0-0,95 (0,975-0,95)	20-1,6 (1,65-1,60)	50-1,89 (2,01-1,89)	20-1,67 (1,78-1,67)
Полнота набора, %	89,4 (77,6)	94,9 (96,1)	97,4 (88,0)	98,2 (91,8)	96,8 (95,4)
I/σ	11,3 (2,6)	10,4 (2,0)	32,6 (5,9)	16,1 (3,3)	22,75 (5,0)
R_{meas} , %	7,3 (42,0)	8,5 (80,0)	4,3 (34,1)	9,2 (59,8)	4,8 (30,0)
R_{f} , %	16,1 (24,4)	12,1 (27,7)	15,6 (21,0)	20,2 (23,4)	16,5
R_{free} , %	19,5 (26,9)	14,0 (27,8)	17,8 (27,6)	26,2 (30,7)	19,9
Ошибка определения координат атомов по Крушанку, Å					
	0,11	0,02	0,08	0,12	0,09
Среднеквадратичное отклонение от идеальных значений:					
длины связей, Å	0,019	0,018	0,018	0,021	0,019
валентных углов, °	1,8	1,8	1,9	1,8	2,2

Как и у всех ранее изученных грибных лакказ, у AfL, SmL и CcL молекула состоит из трех доменов (1-129, 130-313 и 314-495 остатки; здесь и далее нумерация в соответствии со структурой SmL), образующих глобулу с размерами приблизительно 65 x 55 x 40 Å. На рисунке 3 показана ленточная модель лакказы SmL. Ход полипептидной цепи у всех изученных лакказ очень похож (значения среднеквадратичного отклонения при совмещении структур по координатам соответствующих α -атомов составляют 0,56-0,75 Å). Основные отличия в ходе полипептидной цепи лакказ AfL, SmL и CcL наблюдаются на

поверхности белковой глобулы в районе аминокислотных остатков 160-163, 179-186, 268-272, 294-301, 335-341 и 362-374. Вторичная структура изученных лакказ также практически совпадает (рисунок 2).

Активный центр лакказы состоит из двух частей. Моноядерный центр T1 расположен в третьем домене на расстоянии 10-12 Å от поверхности глобулы, а трехядерный центр T2/T3 – между первым и третьим доменом. В центре T1 происходит окисление фенольных субстратов, а в T2/T3 центре происходит восстановление молекулярного кислорода до воды. К T2/T3 центру от поверхности молекулы ведут два канала со стороны иона меди Cu2 и со стороны пары ионов меди Cu3. Оба канала можно проследить в структурах лакказ по цепям кислородных лигандов (молекул воды) внутри них (рисунок 3, показаны красными цилиндрами).

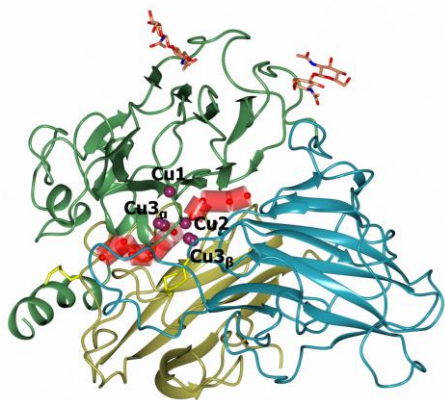


Рисунок 3. Ход полипептидной цепи, представленный моделью элементов вторичной структуры для лакказы SmL. Первый домен показан золотым, второй – голубым, третий – зеленым цветом. Атомы меди показаны фиолетовыми сферами. Сахара и дисульфидные мостики показаны шаростержневыми моделями (С – оранжевый, О – красный, N – синий, S – желтый).

Центр T1 содержит ион меди Cu1, который координирован атомами ND1 двух остатков гистидина His397 и His458, а также атомом SG остатка цистеина Cys453. Координация иона Cu1 плоская. С двух сторон от плоскости, содержащей ион меди Cu1 и координирующие его атомы, расположены боковые цепи остатков Ile (строго консервативен у всех известных лакказ) и Phe. Строение центра T1 одинаково у всех трех изученных лакказ. Координирующие медь остатки и два вышеупомянутых остатка Ile и Phe образуют первую координационную сферу иона меди Cu1 (рисунок 5, показаны фиолетовым цветом).

Трехядерный центр T2/T3 состоит из одного иона меди Cu2 и пары ионов меди Cu3 (рисунок 4). Ион меди Cu2 координирован атомами NE2 аминокислотных остатков His65 и His400 (зеленый цвет на рисунке 4). Каждый из ионов меди Cu3 координируется тремя атомами азота остатков гистидина:

His112, His 400, His452 и His110, His454, His67 соответственно (лиловый и голубой цвета на рисунке 4). Основные отличия в T2/T3 центрах исследованных лакказ касаются координации и заселенности ионов меди, количества кислородных лигандов, координирующих ионы меди, и положения ионов меди Cu3 (рисунок 4).

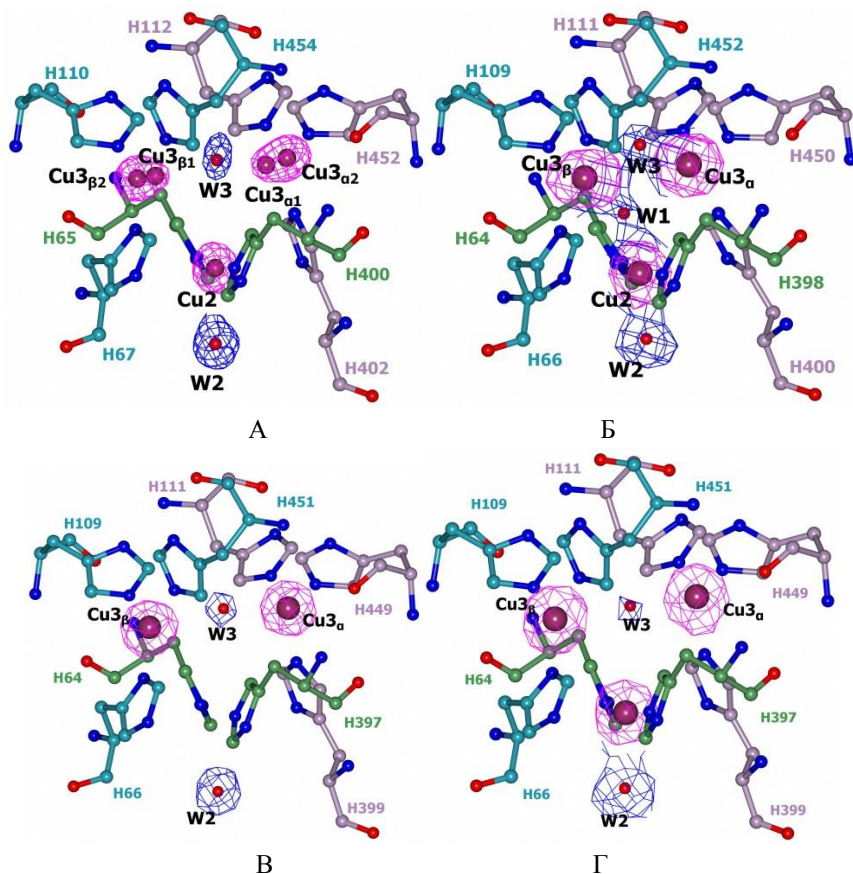


Рисунок 4. Строение центра T2/T3 лакказ SmL (А), AfL (Б), CcL (В) и комплекса CcL+Cu⁺ (Г). Ионы меди показаны фиолетовым цветом, атомы кислорода – красным, атомы азота – синим. Атомы углерода остатков гистидина, координирующих ионы меди Cu2, Cu3_α и Cu3_β показаны зеленым, лиловым и голубым соответственно. Карта электронной плотности $2F_o - F_c$ показана розовым цветом для атомов меди (на уровне 5σ) и синим цветом для кислородных лигандов (1σ).

Лакказы SmL и AfL содержат в себе полный набор ионов меди (рисунок 4 А, Б). Положение ионов меди Cu²⁺ и координирующих их остатков гистидина в обеих структурах практически совпадает. У лакказы CcL и комплекса CcL+Cu²⁺ отсутствует ион меди Cu²⁺ (рисунок 4, В). В структуре комплекса CcL+Cu⁺ локализован ион меди в центре T2 и уточнен с полной заселенностью. В структуре SmL было обнаружено два положения для каждого из ионов меди Cu³⁺ с межатомными расстояниями между ними 3,9 Å и 5,3 Å (рисунок 4, А). В структуре AfL расстояние между ионами меди Cu³⁺ составляет 3,7 Å, а в структурах CcL и CcL+Cu⁺ – 5,1 и 5,2 Å.

Во всех структурах имеются два одинаковых кислородных лиганда (молекула воды или гидроксид-ион) в T2/T3 центре (W3 – между ионами Cu³⁺ и W2 около иона Cu²⁺ с внешней стороны T2/T3 центра). Дополнительный кислородный лиганд W1 был обнаружен в центре T2/T3 центра в структуре AfL.

Как будет показано ниже в разделе «Исследование методом рентгеноструктурного анализа процесса восстановления молекулярного кислорода лакказой SmL под действием рентгеновского излучения», различные расстояния между ионами меди Cu³⁺, наличие двух положений ионов меди Cu³⁺ в структуре SmL, различное количество кислородных лигандов в T2/T3 центре и различная координация ионов меди может быть связана с разной степенью восстановления ионов меди в активном центре. В структуре AfL наблюдается окисленное состояние T2/T3 центра, в структурах CcL и CcL+Cu⁺ восстановленное состояние, а в структуре SmL – смесь окисленного и восстановленного состояний T2/T3 центра.

Различные наблюдаемые состояния T2/T3 центров в структурах SmL, AfL и CcL объясняются отличием условий сбора дифракционных данных от кристаллов этих лакказ, так как интенсивность излучения у синхротронов DESY и Сибирь-2 сильно отличается, а наборы данных были собраны с различным разрешением. В результате доза рентгеновского излучения, поглощенная кристаллами лакказ в ходе съемки, значительно отличается, и восстановление препаратов произошло в различной степени. В случае комплекса CcL+Cu⁺ восстановление препарата могло произойти в результате добавления большого избытка соли CuCl при обработке кристалла перед сбором данных.

Сравнение структур CcL и комплексов CcL+Cu⁺ и CcL+Cu²⁺ показывает, что при настаивании кристалла лакказы с удаленным ионом меди Cu²⁺ в растворе соли CuCl происходит встраивание ионов меди в центр T2, в то время как при настаивании кристалла лакказы с удаленным ионом меди Cu²⁺ в растворе соли CuSO₄ встраивания ионов меди в центр T2 не происходит. Однако следует

отметить, что обработка кристалла CcL солью CuCl привела к заметному ухудшению качества кристалла (1,89 Å). При обработке препарата CcL с удаленным ионом меди Cu²⁺ солями CuCl в растворе активность препарата восстанавливается до 85%, в то время как при использовании CuSO₄ активность не восстанавливается. Неполное восстановление активности в первом случае может быть связано с ингибирующим эффектом ионов хлора.

Сравнительный анализ строения окружения центра T1 лакказ базидиомицетов и его влияние на ОВП иона меди CuI

На рисунке 5 показано окружение иона меди CuI лакказы SmL. Было проанализировано строение окружения иона меди CuI в 10 лакказах, структуры которых были решены с разрешением лучше 2 Å. Вторую координационную сферу иона меди CuI у этих лакказ формируют структурно консервативные петли S2, S3, спиральный сегмент S7 и С-концевой участок петли S6, содержащие координирующие ион меди CuI остатки, а также вариабельные петли S1, S4, S5 и S6 (рисунки 5 и 6 А). Вариабельные петли из окружения T1 центра отличаются по своему пространственному расположению, длине и аминокислотному составу.

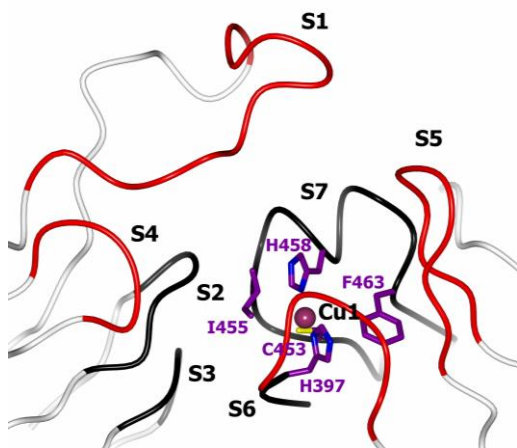


Рисунок 5. Строение окружения иона меди CuI на примере SmL. Первая координационная сфера иона меди CuI показана фиолетовым цветом. Структурно-консервативные петли из окружения иона меди CuI показаны черным цветом, а вариабельные – красным цветом.

На основании анализа пространственного расположения вариабельных петель вокруг центра T1 можно выделить шесть типов лакказ (рисунк 6, А). К типу I относятся лакказы из *T. hirsuta* (PDB код 3FPX), *T. versicolor* (PDB код 1GYC) и *P. cinnabarinus* (PDB код 2XYB). К типу II относятся лакказы из *C. caperata* (PDB код 4JHV), *T. trogii* (PDB код 2HRH) и *C. gallica* (PDB код 4A2G). К типу III – лакказа из *R. lignosus* (PDB код 1V10). К типу IV относится

лакказы из *S. murashkinskyi* (PDB код 5E9N). К типам V и VI – лакказы из *A. faginea* (PDB код 5EHF) и *C. cinereus* (PDB код 1HFU).

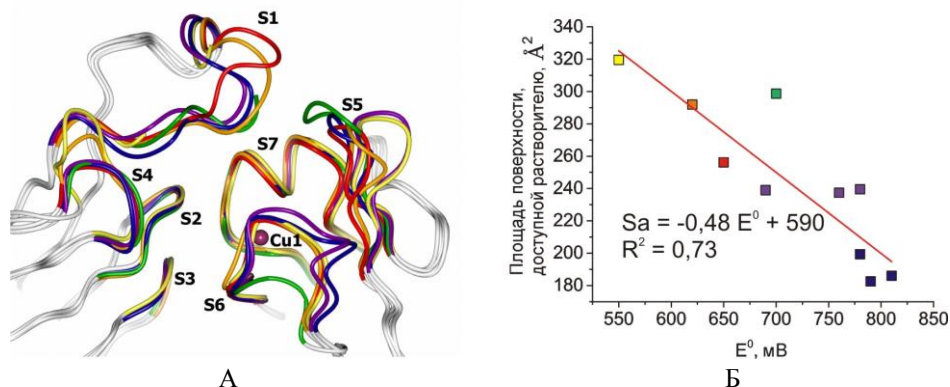


Рисунок 6. Сравнение ленточных моделей структур шести лакказ с различным ходом полипептидной цепи в окрестности центра T1 (А). Тип I – синий, тип II – фиолетовый, тип III – зеленый, тип IV – красный, тип V – оранжевый, тип VI – желтый цвет. Корреляция между площадью поверхности, доступной растворителю, консервативных участков около центра T1 и величиной ОВП центра T1 лакказ (Б). Точки на графике покрашены в соответствии с типом петель соответствующих лакказ.

Было установлено, что величина доступной растворителю поверхности консервативных участков из окружения иона меди в центре T1 коррелирует с величиной ОВП (рисунок 6, Б). Интересно, что деление лакказ на группы в соответствии со структурой петель около центра T1 хорошо согласуется с топологией филогенетического дерева, построенного по полным аминокислотным последовательностям исследованных лакказ (рисунок 7). При этом лакказы грибов, относящихся к одним и тем же экофизиологическим группам, образуют отдельные клады на филогенетическом дереве (выделены разными цветами на рисунке 7). Величина доступности растворителю консервативных участков около центра T1 возрастает в следующем ряду: лакказы первичных ксилотрофов (ОВП более 700 мВ) < лакказа фитопатогена (ОВП около 700 мВ) < лакказы вторичных ксилотрофов (ОВП 600-700 мВ) < лакказа гумусового сапротрофа (ОВП около 550 мВ).

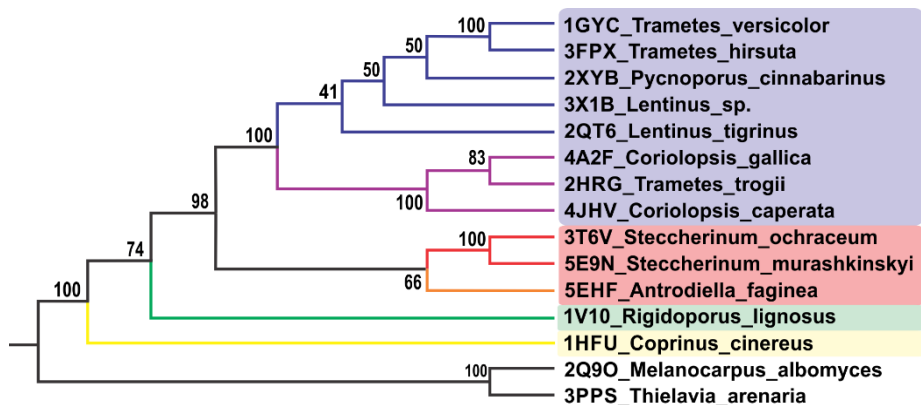


Рисунок 7. Филогенетическое дерево, построенное по полным аминокислотным последовательностям лакказ (алгоритм максимального правдоподобия). Цветными прямоугольниками выделены лакказы грибов, относящихся к одним и тем же экофизиологическим группам: фиолетовый – первичные ксилотрофы, красный – вторичные ксилотрофы, зеленый – фитопатоген, желтый – гумусовый сапротроф. Ветви дерева покрашены в соответствии с типом петель лакказ (рисунок 6).

Исследование методом рентгеноструктурного анализа процесса восстановления молекулярного кислорода лакказой *S. murashkinskyi* под действием рентгеновского излучения

Для изучения процесса восстановления кислорода в активном центре лакказы под действием ионизирующего рентгеновского излучения было собрано 16 наборов данных с одного кристалла лакказы SmL, соответствующих возрастающим дозам поглощенного рентгеновского излучения. Характеристики наборов дифракционных данных и структур лакказ приведены в таблице 4.

Ключевые структуры серии, которые позволяют проследить динамику изменений в активном центре, приведены на рисунке 8, где показано строение центра T2/T3 лакказы SmL при разных дозах поглощенного рентгеновского излучения. Все решенные структуры (за исключением последней структуры) являются наложением различных комплексов кислородных лигандов с ионами меди в различных степенях окисления. Исключение составляет последняя структура серии (453 минуты экспозиции). Эта структура была получена после перезаморозки кристалла (поток охлаждающего азота был остановлен на 15 секунд). В этой структуре ионы меди и кислородные лиганды интерпретируются однозначно (один пик – один атом).

Таблица 4. Характеристики наборов дифракционных данных и структур лакказы SmL, полученных при съемке серии наборов данных с возрастающей дозой поглощенного рентгеновского излучения. Звездочкой отмечен набор, полученный после перезаморозки кристалла.

Номер набора	Время экспозиции/доза, мин/кГр	PDB код:	Разрешение, Å	R _f , %
1	3/1,2	5MEJ	30,0–1,5	13,94
2	33/13,2	5MEW	30,0–1,35	13,15
3	63/25,2	5MHU	30,0–1,35	13,33
4	93/37,2	5MHV	30,0–1,35	13,30
5	123/49,2	5MHW	30,0–1,35	13,10
6	153/61,2	5MHX	30,0–1,35	12,36
7	183/73,2	5MHY	30,0–1,35	13,16
8	213/85,2	5MHZ	30,0–1,35	13,03
9	243/97,2	5MI1	30,0–1,35	13,05
10	273/109,2	5MI2	30,0–1,35	13,06
11	303/121,2	5MIA	30,0–1,35	13,04
12	333/133,2	5MIB	30,0–1,35	13,03
13	363/145,2	5MIC	30,0–1,35	13,15
14	393/157,2	5MID	30,0–1,35	13,17
15	423/169,2	5MIE	30,0–1,35	13,23
16*	453/181,2	5MIG	30,0–1,35	14,09

В результате анализа изменений координации ионов меди Cu2 и Cu3, а также количества и природы кислородных лигандов в центре T2/T3 удалось установить взаимосвязь между положением ионов меди Cu3 и их степенью окисления в структурах серии, а также соотнести различные кислородные лиганды, наблюдаемые в центре T2/T3, с различными степенями окисления ионов меди. В окисленном состоянии ионы меди Cu3 находятся ближе друг к другу (3,8 – 4,3 Å). Эти ионы меди и три атома азота остатков гистидина образуют пирамиды, а также в центре T2/T3 наблюдается два кислородных лиганда – W1 и W3. Лиганд W1 расположен внутри центра T2/T3 и взаимодействует со всеми тремя ионами меди, а W3 расположен между парой ионов меди Cu3. Ион меди Cu2 координирован четырьмя лигандами – двумя атомами азота остатков гистидина и двумя кислородными лигандами W1 и W2. В восстановленном состоянии ионы меди Cu3 расположены на большем расстоянии друг от друга (5,3-5,4 Å) и плоско координированы тремя атомами азота остатков гистидина, а ион меди Cu2 линейно координирован двумя атомами азота остатков гистидина. При этом лиганды W2 и W3 не образуют координационных связей с ионами меди (взаимодействие этих лигандов и ионов

меди носит электростатический характер), а лиганд W1 отсутствует. В случае, когда ионы меди центра T2/T3 находятся в восстановленном состоянии, в позиции лиганда W3 может находиться один из атомов молекулярного кислорода.

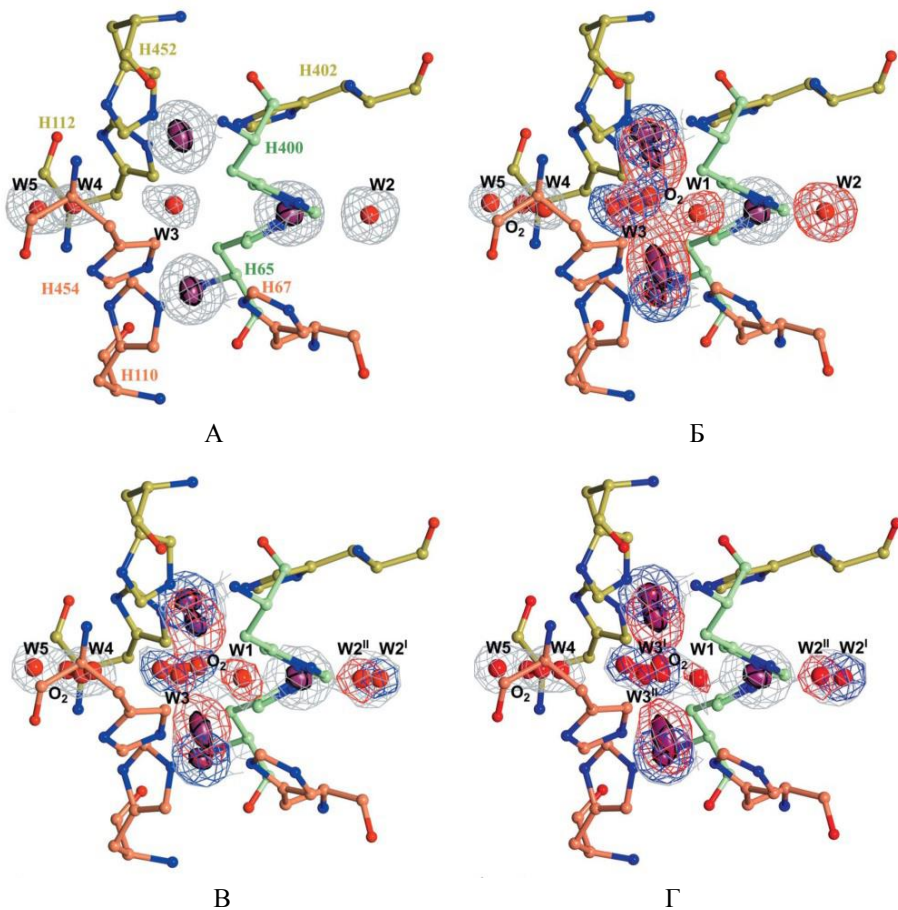


Рисунок 8. Структуры T2/T3 центра для 16-го набора данных (А, 453 мин. экспозиции, после перезаморозки), первого набора данных (Б, 3 мин. экспозиции), второго набора данных (В, 33 мин. экспозиции) и седьмого набора данных (Г, 183 мин. экспозиции). Карта электронной плотности ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$) показана серым цветом на уровне 1σ . Разностные (ОМТ) карты для восстановленного и окисленного состояния T2/T3 центра показаны синим и красным цветом: для структур А-Б – на уровне 6σ для ионов меди и кислородных лигандов W1, W2 и W3; для структур В-Г для ионов меди – на уровне 6σ , для кислородных лигандов W1, W2 и W3 – на уровне 4σ .

Восстановленное состояние активного центра лакказ является последствием воздействия рентгеновского излучения. При этом происходит связывание молекулярного кислорода между ионами меди Cu^{3+} . В первой структуре серии ионы меди находятся преимущественно в окисленном состоянии, а позицию W^3 занимают с частичными заселенностями кислородный лиганд и молекулярный кислород.

Структуры, полученные для более высоких доз поглощенного кристаллом рентгеновского излучения, лишь немного отличаются от первой структуры, показанной на рисунке 8, Б. Изменяются только заселенности ионов меди в окисленном и восстановленном состоянии и соответствующих им лигандов. Заселенности ионов меди в восстановленном состоянии последовательно увеличиваются с повышением дозы поглощенного кристаллом рентгеновского излучения, а заселенности ионов меди в окисленном состоянии, соответственно, падают. Заселенность лиганда W^1 понижалась в ходе эксперимента в соответствии с уменьшением доли окисленного состояния ионов меди центра T^2/T^3 .

Начиная со структуры 2, удается различить два положения кислородного лиганда W^2 (таблица 4, рисунок 8, В). Позиция $\text{W}^{2\text{II}}$ (ближе к иону Cu^2) соответствует окисленному состоянию иона Cu^2 , а позиция $\text{W}^{2\text{I}}$ (дальше от иона Cu^2) соответствует восстановленному состоянию. Заселенности этих позиций лиганда W^2 изменяются в соответствии с изменением доли окисленного и восстановленного состояния центра T^2/T^3 . Заселенность молекулярного кислорода между ионами меди Cu^3 возрастает в 1-3 структурах серии (до $q = 0,45$), а начиная со структуры 6 убывает. Начиная со структуры 6 необходимо вводить новый кислородный лиганд W^3 , соответствующий восстановленному состоянию ионов меди (рисунок 8, Г). Полностью молекулярный кислород исчезает только в последней структуре серии, полученной после перезаморозки кристалла, а его позицию занимает кислородный лиганд W^3 .

Полученная серия наборов данных позволила предложить механизм ферментативного восстановления молекулярного кислорода до воды (рисунок 9). Цикл начинается с полностью восстановленного состояния фермента (все ионы меди находятся в степени окисления +1, рисунок 9, А). Оно соответствует структуре, приведенной на рисунке 8, А. В полностью восстановленном состоянии фермента расстояние между ионами меди Cu^3 максимально и молекула воды (кислородный лиганд W^3), расположенная между ними, может быть замещена молекулой O_2 (рисунок 9, Б). Молекулярный кислород окисляет оба иона меди до степени окисления +2 и превращается в депротонированную молекулу пероксида (рисунок 9, В). Окисленные ионы меди Cu^3 сближаются и

образуют с атомами кислорода пероксида пятикоординированные комплексы с геометрией тригональной бипирамиды. Необходимо отметить, что пероксидный интермедиат не наблюдается в структурах серии. Депротонированный пероксид (O^-O^-) может быть протонирован через атом кислорода со стороны канала ТЗ.

Следующий этап каталитического цикла – это разрыв пероксидной связи (рисунок 9, Г). Это второй двухэлектронный процесс: один электрон переносится на пероксид от иона меди Cu^2 , а второй переносится через ион меди Cu^3 от иона меди Cu^1 . Окисленный ион меди Cu^2 образует плоский четырехкоординированный комплекс с двумя кислородными лигандами и двумя атомами азота остатков гистидина (рисунок 9, Г). Последующее протонирование кислородных лигандов приводит к образованию гидроксид-иона и воды, которые присутствуют в Т2/Т3 центре в окисленном состоянии (рисунок 9, Д).

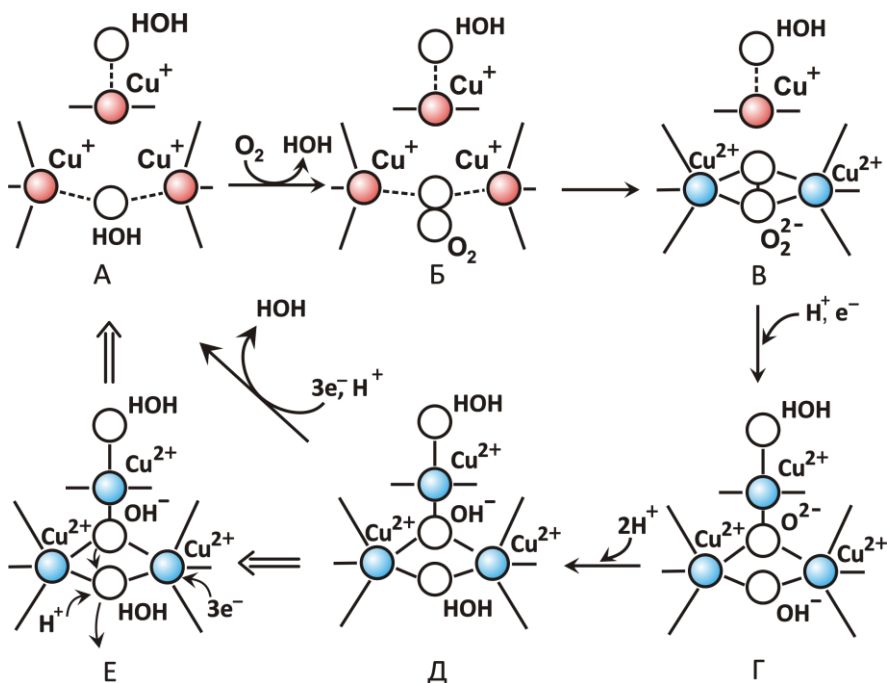


Рисунок 9. Механизм восстановления лакказами молекулярного кислорода до воды. А-Д – промежуточные состояния, Е – механизм высвобождения молекулы воды из Т2/Т3 центра. Координационные и ковалентные связи показаны сплошными линиями. Ион-дипольные электростатические взаимодействия показаны пунктиром. Красным цветом показаны ионы меди в восстановленном состоянии, голубым – в окисленном.

Высвобождение кислородных лигандов из центра T2/T3 происходит благодаря восстановлению ионов меди T2/T3 центра электронами, переносимыми от иона меди CuI. Механизм высвобождения приведен на рисунке 9, Е. После восстановления ионов меди центральный лиганд OH⁻ (позиция W1) выталкивается из центра треугольника и замещает молекулу воды W3, которая уходит в канал T3. Теперь гидроксид-ион электростатически удерживается между ионами меди Cu3. Он может быть протонирован со стороны канала T3 и стать молекулой воды (рисунок 9, Е). Таким образом, система возвращается в исходное состояние (рисунок 9, А).

ВЫВОДЫ:

1. Впервые были выделены и охарактеризованы лакказы из базидиомицетов *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Эти лакказы обладали средним окислительно-восстановительным потенциалом (620 и 650 мВ отн. НВЭ), высокой термостабильностью и были способны катализировать окисление ряда фенольных соединений с эффективностью, сопоставимой (либо превышающей) с лакказами из базидиомицетов *C. caperata* и *T. hirsuta* с высоким окислительно-восстановительным потенциалом.

2. Сравнение скоростей ферментативного окисления фенольных соединений лакказами со средними и с высокими окислительно-восстановительными потенциалами показало, что для окисления монофенольных соединений с потенциалом выше 700 мВ и фенольных красителей окислительно-восстановительный потенциал иона меди в центре T1 лакказ является определяющим фактором. Для монофенольных соединений с потенциалом окисления ниже 700 мВ не наблюдалось корреляции между окислительно-восстановительным потенциалом иона меди в центре T1 лакказ и эффективностью окисления этих субстратов, катализируемого лакказами.

3. Решены с высоким разрешением пространственные структуры лакказ из *A. faginea* (1,75 Å, R_f = 16,1%), *S. murashkinskyi* (0,95 Å, R_f = 12,1%), лакказы *C. caperata* (1,67 Å, R_f = 15,6%) с удаленным ионом меди из центра T2 и комплексов лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 с CuCl (1,98 Å, R_f = 20,2%) и CuSO₄ (1,67 Å, R_f = 16,5%).

4. Показано, что в кристаллах лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 способны встраиваться только ионы меди в степени окисления +1. Также для препарата лакказы *C. caperata* с удаленным ионом меди из центра T2 была показана возможность восстановления активности при обработке солью CuCl в растворе. При обработке солью CuSO₄ восстановления активности не происходило.

5. Для лакказ базидиомицетов было изучено влияние структуры окружения иона меди в T1 центре на его окислительно-восстановительный потенциал. Показано, что доступность растворителю консервативных участков окружения иона меди в центре T1 коррелирует с величиной окислительно-восстановительного потенциала лакказ. Это позволяет проводить приблизительную оценку окислительно-восстановительного потенциала лакказ с известной пространственной структурой.

6. Анализ структур серии из 16 наборов дифракционных данных высокого разрешения, последовательно собранных с одного кристалла лакказы *S. murashkinskyi* с увеличивающейся дозой поглощенного рентгеновского ионизирующего излучения, позволил существенно уточнить механизм восстановления кислорода до воды в активном центре фермента.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Glazunova O.A.**, Polyakov K.M., Moiseenko K.V., Kurzeev S.A., Fedorova T.V. Structure-function study of two new middle-redox potential laccases from basidiomycetes *Antrodia faginea* and *Steccherinum murashkinskyi* // Int. J. Biol. Macromol., 2018, Vol. 118, P. 406–418.
2. **Glazunova O.A.**, Shakhova N.V., Psurtseva N.V., Moiseenko K.V., Kleimenov S.Y., Fedorova T.V. White-rot basidiomycetes *Junghuhnia nitida* and *Steccherinum bourdotii*: oxidative potential and laccase properties in comparison with *Trametes hirsuta* and *Coriolopsis caperata* // PLoS ONE, 2018, Vol. 13(6), e0197667.
3. **Glazunova O.A.**, Trushkin N.A., Moiseenko K.V., Filimonov I.S., Fedorova T.V. Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: redox potential versus substrate-binding pocket structure // Catalysts, 2018, Vol. 8 (152).
4. Polyakov K.M., Gavryushov S., Ivanova, S., Fedorova T.V., **Glazunova O.A.**, Popov A.N., Koroleva O.V. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism // Acta Crystallogr. D, 2017, Vol. D73(5), P. 388–401.
5. **Glazunova O.A.**, Moiseenko K.V., Kamenihina I.A., Isaykina T.U., Yaropolov A.I., Fedorova T.V. Laccases with variable properties from different strains of *Steccherinum ochraceum*: does glycosylation matter? // Int. J. Mol. Sci., 2019, Vol. 20(8): 2008.

6. **Glazunova O.A.**, Polyakov K.M., Fedorova T.V., Dorovatovskii P.V., Koroleva O.V. Elucidation of the crystal structure of *Corioloropsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions // Acta Crystallogr. D, 2015, Vol. 71(4), P. 854-861.

7. Федорова Т.В., Шахова Н.В., Кляйн О.И., **Глазунова О.А.**, Малошенок Л.Г., Куликова Н.А., Псурцева Н.В., Королева О.В. Сравнительный анализ лигнолитического потенциала базидиомицетов, принадлежащих к различным таксономическим и экологическим группам // Прикладная биохимия и микробиология 2013, Т.49(6), С. 570-580.

Тезисы докладов:

1. **Glazunova O.A.**, Fedorova T.V., Polyakov K.M., Filimonov I.S., Koroleva O.V. Comparative analysis of high- and middle-redox potential laccases from basidiomycetes: substrate specificity vs binding pocket structures // International Conference OxiZymes 2014, Vienna, Austria, 1-4 July 2014, Program & Book of Abstracts, P. 28.

2. **Glazunova O.**, Moiseenko K., Shakhova N., Psurtseva N., Fedorova T. New laccases from different isolates of white-rot fungus *Steccherinum ochraceum* // 43th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2018, Prague, Czech Republic, 7-12 July 2018, FEBS OpenBio, Vol. 8, Suppl.S1, P. 183.

3. **Глазунова О.А.**, Трушкин Н.А., Михантьева Е.А., Федорова Т.В. Субстратная специфичность лакказ базидиомицетов: окисление лигнанов и модельных фенольных соединений // VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, 18-22 сентября 2017. Acta Naturae, спецвыпуск, С. 141-142.

4. **Глазунова О.А.**, Трушкин Н.А., Михантьева Е.А. Роль гликозилирования в лакказе базидиомицета *Trametes hirsuta* // V Съезд биохимиков России, Дагомыс, Россия, 4-9 октября 2016, Acta Naturae, спецвыпуск Т.2, С. 106.

5. **Glazunova O.A.**, Fedorova T.V., Filimonov I.S., Kurseev S.A., Koroleva O.V. Catalytic properties, redox potential and pH behavior of the fungal laccase from basidiomycetes *Steccherinum murashkinskyi* 1963 // International Conference Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications, Moscow, Russia, 2-5 July 2013, Book of Abstracts, P. 15.

6. **Glazunova O.A.**, Fedorova T.V., Maloshenok L.G., Shakhova N.V., Polyakov K.M., Koroleva O.V. Purification and characterization of novel laccase from basidiomycete *Antrodia faginea* 1998 // 38th Congress of European Biochemical

Societies (FEBS) 2013, St. Peterburg, Russia, 6-11 July 2013, FEBS Journal, Vol. 280, Special Issue: SI Supplement:1, P. 124.

7. Fedorova T.V., **Glazunova O.A.**, Polyakov K.M., Koroleva O.V. X-ray study of molecular oxygen reduction by fungal laccase from basidiomycete *Steccherinum murashkinskyi* 1963 // 38th Congress of European Biochemical Societies (FEBS) 2013, St. Peterburg, Russia, 6-11 July 2013, FEBS Journal, Vol. 280, Suppl.S1, P. 97.

8. Koroleva O.V., Fedorova T.V., Shakhova N.V., **Glazunova O.A.**, Maloshenok L.G., Psurtseva N.V. Characterization of new laccases from white rot fungi of *Steccherinaceae* family // The 5th Congress of European Microbiologists (FEMS 2013), Leipzig, Germany, 21-25 July 2013.

9. Fedorova T.V., **Glazunova O.A.**, Kurseev S.A., Polyakov K.M., Lamzin V.S., Koroleva O.V. The comparative study of middle and high redox potential laccases from white rot fungi // International Conference OxiZymes 2012, Marseille, France, 16-19 September 2012, Program & Book of Abstracts, P. 22.

Список структур, депонированных в банк данных трехмерных структур:

5EHF, 5E9N, 4JHU, 4JHV, 5MEJ, 5MEW, 5MHU, 5MHV, 5MHW, 5MHX, 5MHY, 5MHZ, 5MI1, 5MI2, 5MIA, 5MIB, 5MIC, 5MID, 3MIE, 5MIG