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

На правах рукописи

Глазунова Ольга Александровна

Структурно-функциональное исследование лакказ базидиомицетов

03.01.04. Биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научные руководители: доктор химических наук, профессор А.И. Ярополов

кандидат физико-математических наук К.М. Поляков

ОГЛАВЛЕНИЕ

Спі	исок с	окращений	4
BB	ЕДЕН	ИЕ	5
ГЛ	ABA 1	. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1	Распр	ространение в природе и функции лакказ	9
1.2	Физи	ко-химические свойства лакказ	.10
1.3	Катал	питические свойства лакказ	.12
1.4	Окис	лительно-восстановительные потенциалы лакказ	.14
1.5	Стру	ктура лакказ	.16
	1.5.1	Первичная структура	.16
	1.5.2	Пространственная структура	.17
	1.5.3	Активный центр	.21
	1.5.4 ионо	Структуры лакказ с отсутствующим ионом меди в центре Т2. Встраивание в меди в центр Т2.	25
	1.5.5	Комплексы лакказ с субстратами	.26
1.6	Mexa	анизм восстановления кислорода до воды в Т2/Т3 центре лакказ	.28
		едования восстановления лакказы под действием рентгеновского излучения в размения и размения и дифракционных данных	32
1.8	Прак	тическое применение лакказ	37
ГЛ	ABA 2	2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	.41
2.1	Штам	имы микроорганизмов	.41
2.2	Реакт	гивы	.41
2.3	Эксп	ресс метод оценки общей лигнолитической и лакказной активностей	.42
2.4	Эксп	ресс метод оценки лигнинпероксидазной активности	.43
2.5	Жиді	кофазное культивирование штаммов базидиомицетов	.43
2.6	Опре	деление лакказной активности	.43
2.7	Очис	тка ферментных препаратов лакказ	.44
2.8	Иссл	едование физико-химических свойств лакказ	.45
2.8.	1 Oı	ценка гомогенности препаратов и определение молекулярной массы	.45
2.8. спе		гистрация спектров поглощения в ультрафиолетовой и видимой области и ЭП	
2.8.	5 Ди	ифференциальная сканирующая калориметрия	.46
2.8.	6 Oı	пределение окислительно-востановительного потенциала	.46
		рение скоростей ферментативной реакции каталитического окисления различнов с участием лакказ	ых 46

2.10 Определение каталитических параметров окисления различных субстратов с	
участием лакказ	48
2.11 Определение рН и температурных оптимумов, термостабильности лакказ	49
2.12 Селективное удаление иона меди и реконструктция центра Т2 лакказы	
Coriolopsis caperata	50
2.13 Кристаллизация лакказ	50
2.14 Сбор дифракционных данных, решение и уточнение структур лакказ	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	55
3.1 Штаммы базидиомицетов и оценка лигнолитического потенциала грибов Antrodie faginea и Steccherinum murashkinskyi	
3.2 Глубинное культивирование грибов A. faginea и S. murashkinskyi	56
3.3 Очистка препаратов лакказ	57
3.4 Определение окислительно-восстановительных потенциалов центра Т1 лакказ из <i>A. faginea</i> и <i>S. murashkinskyi</i>	59
3.5 Спектральные характеристики лакказ	60
3.6 Физико-химические свойства лакказ	61
3.7 Каталитические свойства лакказ	64
3.8 Структура лакказ	73
3.8.1 Сравнение первичных структур лакказ из A. faginea, S. murashkinskyi и	
C. caperata	73
3.8.2 Пространственная структура лакказ из A. faginea, S. murashkinskyi и C. caperata также комплексов лакказы C. caperata с хлоридом меди(I) и сульфатом меди(II)	
3.8.3 Сравнительный анализ строения окружения центра Т1 лакказ базидиомицетов в влияние на окислительно-восстановительный потенциал иона меди Cu1	
3.9 Исследование методом рентгеноструктурного анализа процесса ферментативного восстановления молекулярного кислорода до воды лакказой из <i>S. murashkinskyi</i> под	
действием ионизирующего рентгеновского излучения	95
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119

Список сокращений

АБТС -2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевая соль

ГБТ – 1-гидроксибензотриазол

ГП – глюкозопептонная среда

ДДС-Na – додецилсульфат натрия

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ДЭАЭ – диэтиламиноэтил

КФБ – калий-фосфатный буфер

МЭА – среда мальтекс-агар

НВЭ – нормальный водородный электрод

ОВП – окислительно-восстановительный потенциал

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РСА – рентгеноструктурный анализ

ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин

Трис – трис(гидроксиметил)аминометана

УФ – ультрафиолет

ЦФБ – цитратно-фосфатный буфер

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

MAN – остаток маннозы

MES - 2-(N-морфолино) этансульфоновая кислота

MALDI-MS — времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией

NAG – остаток N-ацетилгюкозамина

PDB – Protein Data Bank, банк данных белковых структур

T2D – лакказа с удаленным ионом меди Cu2

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Лакказа (*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 биодеградации 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 Т1, содержащем ион меди первого типа Си1, происходит окисление субстрата-донора. В центре Т2/Т3, содержащем ион меди второго типа Си2 и пару ионов меди третьего типа Си3, происходит восстановление молекулярного кислорода до воды. Эффективность окисления лакказами различных субстратов зависит от значения окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) иона меди Т1. В соответствии со значением ОВП иона меди Т1 лакказы условно подразделяют на ферменты с высоким (730-790 мВ), средним (460-730 мВ) и низким (< 460 мВ) ОВП [1]. Лакказы базидиомицетов обладают высоким ОВП по сравнению с лакказами из других источников [2]. Хотя в ряде работ с использованием точечного мутагенеза было установлено, что аминокислотные остатки из ближайшего окружения иона меди Т1 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 сериальной мультикристальной 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 Т2 этих ферментов. В литературе отсутствуют надежные оценки влияния остатков второй координационной сферы иона меди в центре Т1 на величину ОВП лакказ. В предложенном в литературе механизме восстановления кислорода лакказами не выяснены детали связывания молекулярного кислорода в Т2/Т3 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. Наработка 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 С. caperata с удаленным ионом меди из центра Т2 в кристаллах и в растворе.
- 4. Проведение сравнительного анализа окружения иона меди в центре Т1 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

С. caperata с удаленным из центра Т2 ионом меди (Т2D), а также комплексов Т2D лакказы С. 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 Т2D 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 Т1 центре и его ОВП. При помощи метода сериальной 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 Т2/Т3 центре и их степенью окисления. На основании анализа полученной серии структур был существенно уточнен механизм восстановления кислорода до воды в активном центре лакказ.

Теоретическая практическая значимость работы. И Выделенные 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 Т2 центре. Предложена оценка ОВП лакказ с известной пространственной структурой на основании выявленной корреляции между ОВП лакказы и доступностью растворителю пространственно консервативной части окружения центра Т1 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 Т1 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 Т2 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 Т1 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).

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Распространение в природе и функции лакказ

Лакказа впервые была выделена более 100 лет назад из японского лакового дерева *Rhus vernicifera* [3]. Десятилетие спустя была описана первая грибная лакказа [4]. Долгое время лакказа считалась ферментом, присутствующим только у грибов или высших растений, однако позже лакказы обнаружены также у бактерий и насекомых [5]. К настоящему времени, согласно базе данных BRENDA (http://www.brenda-enzymes.org/) [6], выделено и охарактеризовано около 280 лакказ.

Первая лакказа среди прокариот была выделена из ризосферной бактерии *Azospirillum lipoferum* [7]. Было показано участие этого фермента в процессах пигментации и окисления фенольных соединений растительного происхождения [8,9], а также в функционировании дыхательной цепи переноса электронов [10]. Наиболее хорошо изученной является лакказа CotA из *Bacillus subtilis*, являющаяся компонентом оболочки эндоспор. Данная лакказа задействована в биосинтезе пигментов и защите спор от УФ-излучения и пероксида водорода [11,12]. Помимо этого, бактериальные лакказы участвуют в процессах морфогенеза и гомеостаза меди [13].

У насекомых наличие ферментов, обладающих лакказной активностью, было показано для представителей родов *Drosophila*, *Bombyx*, *Schistocerca*, *Schistocerca*, *Calliphora*, *Lucilia*, *Sarcophaga*, *Periplaneta*, *Anopheles*, *Aedes* и др. [14], а в 2003 году была опубликована первая последовательность кДНК лакказо-подобного белка из *Pimpla hypochondriaca* [15]. Основной ролью лакказ у насекомых считается их участие в склеротизации и пигментации кутикулы, однако в других тканях была также показана лакказная активность [16,17]. Предполагается, что эти ферменты могут принимать участие в гомеостазе ионов металлов, однако эта гипотеза требует дальнейшего подтверждения [14].

Лакказы были найдены у многих видов растений. Например, хорошо охарактеризованы лакказы из Acer pseudoplatanus, Pinus taeda, Aesculus parviflora, Populus euramericana [18]. Растительные лакказы выполняют ряд функций, таких как биосинтез лигнина [19–23], заживление ран [24] и окисление ионов Fe(II) до Fe(III) [23,24].

Большинство известных лакказ были выделены из грибов. Лакказы продуцируются базидиомицетами, аскомицетами и некоторыми дейтеромицетами [25]. Среди широко известных продуцентов лакказ можно назвать такие грибы как *Neurospora crassa*, *Agaricus*

bisporus, Botrytis cinerea, Pleurotus ostreatus, Phlebia radiata, Trametes versicolor, Pycnoporus cinnabarinus, Chaetomium hermophilum, Coprinus cinereus и др. [25]. Лакказы типичны для древоразрушающих базидиомицетов, вызывающих белую гниль, и подстилочных сапротрофов. Практически все виды грибов белой гнили синтезируют лакказу [26], однако есть и исключения, как, например, гриб Phanerochaete chrysosporium [27]. Лакказа является частью лигнин модифицирующей системы грибов, однако мнения исследователей расходятся относительно непосредственного участия лакказы в деградации лигнина [28]. Окислительно-восстановительный потенциал лакказ слишком низок для того, чтобы катализировать окисление нефенольных компонентов лигнина (до 80% от общего состава лигнина). Кроме того, гриб белой гнили *Phanerochaete* chrysosporium, общепринятый модельный организм для изучения деградации лигнина, не производит лакказ [29,30]. Тем не менее, ряд исследований свидетельствует о том, что грибные лакказы способны играть важную роль в деградации лигнина. Так, мутантные формы с нокаутированными генами лакказ грибов Sporotrichum pulverulentum [31], P. cinnabarinus [32,33] и Pleurotus ostreatus [34] были не способны деградировать лигнин или же разрушали лигнин в очень незначительной степени. Было показано, что лакказы способны катализировать окисление модельных соединений лигнина [35,36]. Также известно, что лакказа из T. versicolor способна катализировать окисление нефенольных компонентов лигнина за счет образования радикалов некоторых низкомолекулярных соединений [37]. Грибные лакказы способны выполнять и некоторые другие функции, участвуя в процессах пигментации, образовании плодовых тел, морфогенезе, споруляции, детоксификации и патогенезе [38,39].

1.2 Физико-химические свойства лакказ

Наболее изученными в настоящее время являются лакказы грибов и бактерий. Большинство лакказ представляют собой гликопротеины с молекулярной массой 50-140 кДа, хотя в литературе описаны лакказы как с меньшей, так и со значительно большей массой [2,40]. Как правило, лакказы существуют в мономерной форме, однако известны лакказы, образующие гомо- и гетеродимеры. Образование гомодимеров было показано для лакказ из древоразрушающих грибов *Phellinus ribis* [41], *Pleurotus pulmonarius* [42] и *Trametes villosa* [43], а также для лакказы из аскомицета *Rhizoctonia solani* [44]. Лакказа из *Podospora anserine* представляет собой тетрамер массой 390 кДа [45], а лакказа из *P. ostreatus* состоит из трех различных субъединиц массой 67, 18 и 16 кДа, как было показано при помощи ДДС-Na-ПААГ электрофореза и MALDI масс-спектрометрии [46].

Изоэлектрические точки лакказ находятся в широком диапазоне pH от 2,6 до 7,0. Для грибных лакказ характерно значение изоэлектрических точек вблизи 4,0, тогда как лакказы растений, как правило, имеют нейтральные значения pI [25,40].

Молекула лакказы в активном центре содержит четыре иона меди, которые формируют два центра. В центре Т1 располагается один ион меди (Т1 типа – Си1). Этот ион меди является первичным акцептором электронов. Вторая часть активного центра – Т2/Т3 центр, – в которой происходит восстановление молекулярного кислорода до воды, сформирована тремя ионами меди (один ион меди Т2 типа – Си2 и два иона меди типа Т3 – Си3). Ионы меди можно классифицировать по их спектральным характеристикам. Ион меди типа Т1 характеризуется сильным поглощением при 610 нм и в окисленном состоянии придает лакказам характерный голубой цвет. Ионы меди типа Т3 характеризуются плечом при 330 нм, а у иона меди типа Т2 отсутствует сигнал в спектрах поглощения. В спектрах ЭПР ионы меди типов Т1 и Т2 характеризуются сверхтонким расщеплением, а пара ионов меди типа Т3 не имеет сигнала из-за сильного антиферромагнитного связывания [47].

Углеводная часть молекулы лакказ может составлять до 50% от общей массы белка, причем для растительных лакказ характерно более высокое содержание углеводов (обычно от 20 до 45%), а у грибных лакказ содержание углеводов несколько ниже (обычно от 10 до 25%) [48]. Есть и исключения – лакказа P. pulmonarius содержит 44% углеводов [42], а лакказа Botrytis cinerea – 49% [49]. Известны лакказы и с очень низким содержанием углеводов – два изофермента лакказ из Pleurotus eryngii laccase I и laccase II содержали 7 и 1% углеводов [50]. Для лакказ характерно N-гликозилирование [51–53]. Углеводная часть молекул лакказ представляет собой разветвленные цепи манноз, соединенные с остатками аспарагина посредством двух остатков N-ацетилглюкозамина Молекулы лакказ содержат обычно 3-10 сайтов гликозилирования [55]. Предположительная роль углеводов заключается в стабилизации медных центров, участии процессе секреции белка, защите молекулы от протеолиза и повышении термостабильности [56,57]. У мутантной формы лакказы из Trametes sp. 420, у которой в одном из потенциальных сайтов гликозилирования была сделана замена остатка аспарагина на остаток глутамина, значительно изменилась удельная активность по сравнению с лакказой дикого типа [58]. Активность и стабильность дегликозилированной лакказы из Pycnoporus sanguineus значительно снизились [59]. В то же время дегликозилированная лакказа из Lentinus sp., у которой в каждом из трех сайтов гликозилирования оставался только один остаток N- ацетилглюкозамина, практически не изменила своих свойств. Мутантные формы этой лакказы, у которых в сайтах гликозилирования остатки аспарагина были заменены на остатки глутамина, сохранили от 4 до 50% активности по сравнению с дикой формой фермента [60]. Отличиями в гликозилировании объясняется также наличие большого количества изоформ лакказ, отличающихся по молекулярной массе и рI [61,62].

1.3 Каталитические свойства лакказ

Для грибных лакказ типичны кислые pH-оптимумы. Оптимум окисления АБТС, как правило, ниже pH 4,0, тогда как оптимумы окисления фенольных соединений, таких как 2,6-диметоксифенол, гваякол и сирингалдазин находятся в диапазоне pH 4,0 – 7,0 [25]. pH-профили лакказ обычно имеют колоколообразную форму, что объясняется действием двух противоположных эффектов. С одной стороны, окислительно-восстановительный потенциал фенольных соединений понижается при повышении pH за счет депртонирования, в то время как окислительно-восстановительный потенциал лакказ намного меньше зависит от pH [63]. С другой стороны, активность лакказы падает с возрастанием pH, что, по мнению некоторых исследователей, может быть обусловлено ингибирующим действием гидроксид-иона, связывающегося в центре Т2/Т3 лакказ и препятствующего переносу электронов внутри молекулы [50].

Обычно температурный оптимум лакказной активности лежит в диапазоне от 50 до 70 °C. У немногих лакказ температурный оптимум находится ниже 35 °C [25]. Температурная стабильность лакказ из различных источников сильно различается. Иногда термостабильность отличается даже у ферментов, выделенных из разных штаммов одного и того же продуцента. Например, лакказа базидиомицета Coriolopsis gallica A241 имеет время полуинактивации при $60\,^{\circ}\mathrm{C}$ порядка $8\,$ суток [64], а лакказа другого штамма C. gallica значительно менее стабильна и имеет время полуинактивации при 60 °C менее 10 минут [65]. Термостабильность лакказ зависит от многих физико-химических факторов – от упаковки белковой глобулы, гидрофобности, количества внутримолекулярных водородных связей и солевых мостиков, распределения заряженных аминокислотных определенных остатков поверхности белка И повышенного содержания на аминокислотных остатков [56]. Например, для бактериальной лакказы B. subtilis CotA было показано, что ее повышенной термостабильности по сравнению с лакказой СиеО из Escherichia coli способствует повышенное содержание остатков пролина, гидрофобные взаимодействия между доменами и более плотная упаковка молекулы [66]. Сильное снижение активности лакказы базидиомицета РМ1 при 55-65 °C было ассоциировано авторами с потерей иона меди из центра Т2 [67]. Конформационные изменения в центрах T1 и T2 при повышении температуры были изучены на примере лакказ из Coriolus (Trametes) hirsutus и Coriolus zonatus (Trametes ochracea) [68].

Лакказы способны катализировать окисление очень широкого спектра соединений. Типичными субстратами лакказ являются различные замещенные фенолы. Тем не менее, каталитические константы определены в основном для небольшой группы модельных субстратов, таких как нефенольный субстрат АБТС и фенольные субстраты 2,6-диметоксифенол, гваякол и сирингалдазин [25]. Значения константы Михаэлиса (К_М) варьируется от десятков мкМ для АБТС и сирингалдазина до сотен мМ для 2,6-диметоксифенола и гваякола. Каталитическая константа k_{саt} также варьируется в очень широких пределах для различных субстратов. Каталитические параметры реакций сильно зависят от источника лакказы. В целом, для лакказ характерно высокое сродство (низкие значения К_М) и высокие каталитические константы для АБТС и сирингалдазина, тогда как окисление гваякола и 2,6-диметоксифенола обычно протекает медленнее, а значения К_М выше для данных субстратов. Низкие значения К_М также характерны для синаповой кислоты, гидрохинона и сиреневой кислоты, а более высокие — для ванильной кислоты [25]. Лакказы базидиомицетов обладают более широкой субстратной специфичностью по сравнению с лакказами аскомицетов, растений и бактерий [69].

Лакказы значительно различаются по своим способностям катализировать окисление орто-, пара- и мета-замещенных фенолов. Например, препараты лакказ из Leptoporus litschaueri и Polyporus brumalis наиболее эффективно катализировали окисление орто-замещенных соединений (гваякол, о-фенилендиамин, кофейная кислота, пирокатехин, дигидроксифенилендиамин, 3,4-дигидроксибензойная кислота, галловая кислота и пирогалол), менее эффективно – пара-замещенных соединений (пфенилендиамин, n-крезол, гидрохинон) и медленнее всего — mema-замещенных соединений (м-фенилендиамин, орцинол, резорцин и флороглюцин) [70]. Аналогично, лакказы из T. versicolor, P. anserina и Pyricularia oryzae эффективнее катализировали окисление *орто*- и *пара*-замещенных фенолов [71–73]. В то же время, лакказа из *Pleurotus* eryngii эффективнее катализировала окисление n-метоксифенола по сравнению с oметоксифенолом [50]. На эффективность катализа различных соединений также влияет количество и природа заместителей в фенольном кольце. Например, для лакказы Trametes trogii было показано, что эффективность окисления повышается, если в качестве второго заместителя в фенольном кольце выступает гидроксильная группа. Меньший эффект оказывают метоксильная или аминогруппа, а хлорпроизводные фенола окислялись с очень низкой скоростью [74].

1.4 Окислительно-восстановительные потенциалы лакказ

Важной характеристикой лакказ является значение окислительновосстановительного потенциала (ОВП, E_{T1}^0) центра Т1 фермента. От величины ОВП зависит возможность катализа окисления лакказой тех или иных субстратов. В работе Ф. Сюй (F. Xu) [75] было проведено сравнительное исследование ферментативного окисления ряда фенолов, анилинов и бензентиолов с использованием различных грибных лакказ. Было показано, что эффективность катализа окисления субстратов лакказой зависит от величины разности потенциалов между субстратом и ОВП центра Т1 М. Фраскони (M. Frasconi) с соавторами [76] фермента. также исследовали ферментативное окисление различных фенольных соединений с участием лакказ, обладающих различными ОВП. Авторы сделали вывод, что на эффективность окисления субстратов влияет не только разность потенциалов, но также строение субстратсвязывающего кармана лакказы и строение субстрата в сочетании с выбранным рН. Сходные заключения были сделаны М. Лахтинен (M. Lahtinen) на основании исследования окисления модельных соединений лигнина лакказами ИЗ Melanocarpus albomyces и Т. hirsuta [77].

ОВП грибных лакказ, как правило, выше, чем у ферментов растительного и бактериального происхождения [2]. Однако, ОВП грибных лакказ изменяется в очень широком диапазоне — от 465 мВ у лакказы аскомицета Myceliophthora thermophila до 790 мВ у лакказ из T. ochracea и T. trogii (таблица 1) [1]. Лакказы принято подразделять в соответствии со значением их ОВП на ферменты с высоким, средним и низким ОВП [78]. В группу лакказ с низким ОВП (до 460 мВ) входят в основном лакказы растений (например, из R. vernicifera) и бактерий (E. coli, Streptomyces coelicolor, и B. subtilis). Группа ферментов со средним ОВП (460-710мВ) включает в себя лакказы грибов аскомицетов и базидиомицетов, таких как, например, M. albomyces, M. thermophila, Trichoderma harzianum, R. solani, C. cinereus, P. ostreatus и др. Высоким ОВП (более 710 мВ) обладают преимущественно лакказы базидиомицетов: T. trogii, Ttametes pubescens, T. villosa, T. hirsuta, T. versicolor, P. cinnabarinus и др. Известно всего две аскомицетные лакказы с высоким ОВП — это лакказы В. cinerea и Botrytis aclada.

Значение ОВП центра Т2/Т3 в меньшей степени оказывает влияние на катализ лакказ [55]. ОВП центра Т2 было измерено для лакказ *Т. hirsuta* (400 мВ) [79] и *R. vernicifera* (365 мВ) [80]. ОВП центра Т3 составляет 756 мВ для лакказы *Т. hirsuta* [81] и 434 мВ для лакказы *R. vernicifera* [80].

Таблица 1. Значение ОВП лакказ различного происхождения

	Таксономическая принадлежность	ОВП отн. НВЭ, мВ	Ссылка
Лакказы с высоким ОВП	1		
Trametes ochracea	базидиомицет	+790	[82]
Trametes trogii	базидиомицет	+790	[83]
Trametes versicolor	базидиомицет	+785	[80]
Botrytis cinerea	аскомицет	+780	[57]
Coriolopsis fulvocinerea	базидиомицет	+780	[82]
Trametes hirsuta	базидиомицет	+780	[82]
Trametes villosa	базидиомицет	+780	[57]
Basidiomycete PM1	базидиомицет	+759	[84]
Cerrena maxima	базидиомицет	+750	[82]
Pycnoporus cinnabarinus	базидиомицет	+750	[57]
Trametes pubescens (LAC1)	базидиомицет	+746	[85]
Pleurotus ostreatus (POXC)	базидиомицет	+740	[83]
Trametes pubescens (LAC2)	базидиомицет	+738	[85]
Trametes sp. C30 (LAC1)	базидиомицет	+730	[86]
Botrytis aclada	аскомицет	+720	[87]
Лакказы со средним ОВП			
Rhizoctonia solani	базидиомицет	+710	[78]
Rigidoporus lignosus	базидиомицет	+700	[88]
Trichoderma harzianum	аскомицет	+692	[89]
Pleurotus ostreatus (POXA1b)	базидиомицет	+650	[83]
Trametes sp. C30 (LAC2)	базидиомицет	+560	[86]
Coprinus cinereus	базидиомицет	+550	[90]
Trichophyton rubrum	аскомицет	+540	[91]
Trametes sp. C30 (LAC3)	базидиомицет	+530	[92]
Scytalidium thermophilum	аскомицет	+510	[78]
Melanocarpus albomyces	аскомицет	+470	[93]
Myceliophthora thermophila	аскомицет	+470	[78]
Лакказы с низким ОВП			
Bacillus subtilis (CotA)	бактерия	+455	[94]
Escherichia coli (CueO)	бактерия	+440	[95]
Rhus vernicifera	растение	+434	[80]
Streptomyces coelicolor (SLAC)	бактерия	+430	[96]
Pyrobaculum aerophilum (McoP)	бактерия	+398	[97]
Streptomyces sviceus (Ssl1)	бактерия	+375	[98]

1.5 Структура лакказ

1.5.1 Первичная структура

Аминокислотные последовательности грибных лакказ как правило содержат 520-550 аминокислотных остатков [2]. Аминокислотные последовательности лакказ растений обычно несколько длиннее — 560-580 аминокислотных остатков [99]. Длина аминокислотных последовательностей бактериальных лакказ варьируется в очень широком диапазоне. Так, например, длина аминокислотной последовательности лакказы ероА из *Streptomyces griseus* (gb|BAB64332) составляет 348 аминокислотных остатка, а длина аминокислотной последовательности лакказы mnxG *Bacillus sp.* (gb|AAB06489) составляет 1217 аминокислотных остатка. Аминокислотные последовательности лакказ насекомых в среднем содержат большее количество аминокислотных остатков, чем последовательности лакказ грибов и растений — около 650-750 аминокислотных остатков [14]. Идентичность последовательностей лакказ организмов, относящихся к разными классам, составляет 20-30%.

На основании множественного выравнивания аминокислотных последовательностей более чем 100 грибных и растительных лакказ было выделено 4 консервативных области, L1–L4, которые позволяют отличить лакказы от других белков из семейства медьсодержащих оксидаз [100]. На рисунке 1 на примере лакказы LacA из *T. hirsuta* области L1–L4 показаны фиолетовым цветом. Эти области содержат 12 аминокислотных остатков, которые являются лигандами ионов меди в активном центре фермента.

AVGPVADLTITDAAVSPDGFSRQAVVVNGVTPGPLVAGNIGDRFQLNVIDNLTNHTMLKSTSIHWHGFFQ 70

L1

L2

HGTNWADGPAFINQCPISPGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPFVVYDPNDPHASRYDVD 140

NDDTVITLADWYHTAAKLGPRFPLGADATLINGKGRAPSDTTAELSVIKVTKGKRYRFRLVSLSCDPNHT 210

FSIDGHNLTIIEVDSVNSQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLDANQAVDNYWIRANPNFGNVGFDGGINSAILR 280

YDGAPAVEPTTNQTTSVKPLNEVDLHPLVSTPVPGSPSSGGVDKAINMAFNFNGSNFFINGASFVPPTVP 350

L3

VLLQILSGAQTAQDLLPSGSVYVLPSNASIEISFPATAAAPGAPHPFHIHGHTFAVVRSAGSTVYNYDNP 420

L4

IFRDVVSTGTPAAGDNVTIRFDTNNFGPWFLHCHIDFHLEGGFAVVMAEDTPDVKAVNPVPQAWSDLCPT 480

YDALDPNDQ

Рисунок 1. Аминокислотная последовательность лакказы *T. hirsuta* LacA (gb|KP027478.1). Области L1-L4 показаны фиолетовым цветом, лиганды иона меди Cu1 показаны оранжевым цветом, Cu2 – зеленым цветом, Cu3 – голубым. Остатки цистеинов, участвующие в образовании дисульфидных связей, показаны желтым цветом.

1.5.2 Пространственная структура

Первая пространственная структура была решена в 1998 году для лакказы из гриба *С. cinereus* [101]. На данный момент в банке данных PDB (www.rcsb.org) [102] представлено 182 структуры лакказ, среди них 101 бактериальная лакказа из 17-ти различных организмов, 70 грибных лакказ из 25-ти различных организмов и две лакказы из метагенома. Из них только половина решена с высоким разрешением лучше 2 Å (Таблица 2). В банке данных PDB нет структур лакказ растений и насекомых.

Таблица 2. Структуры лакказ, решенные с разрешением лучше 2 Å, представленные в банке данных PDB.

Организм	Код PDB	Разрешение, Å	Примечание
Базидиомицеты			
Coprinus cinereus	1HFU	1,68	Отсутствует ион меди в центре Т2
Cerrena maxima	2H5U	1,9	
(Trametes maxima)	1DIV	1,76	
Coriolopsis gallica	4A2E	1,8	
	4A2G	1,8	
	4A2F	1,8	
	5A7E	1,5	
Lentinus sp.	3X1B	1,8	
Lentinus tigrinus	2QT6	1,5	
Pycnoporus cinnabarinus (Trametes cinnabarina)	2XYB	1,75	
Pycnoporus sanguineus	5NQ8	2,0	
Rigidoporus lignosus	1V10	1,7	
Steccherinum ochraceum	3T6V	2,0	
Trametes hirsuta	3FPX	1,8	
	3PXL	1,2	Удален ион меди из центра Т2. Большая доза поглощенного рентгеновского излучения
	3V9C	2,0	Удален ион меди из центра Т2. Малая доза поглощенного рентгеновского излучения
Trametes trogii	2HRH	1,58	
Trametes versicolor	1GYC	1,9	
Аскомицеты			
Botrytis aclada	3SQR	1,67	
	3V9E	1,7	Мутант L499М
Melanocarpus albomyces	2Q9O	1,3	
	3FU7	1,67	
	3FU8	1,8	Комплекс с 2,6-диметоксифенолом
	3FU9	2,0	Комплекс с 2,6-диметоксифенолом
	3QPK	1,9	Комплекс с 2,6-диметоксифенолом
	2IH8	2,0	Мутант L559A

	2IH9	2,0	Большая доза поглощенного рентгеновского излучения
Бактерии	·		
Bacillus subtilis	1GSK	1,7	
	2X88	1,8	Холо-форма фермента
	2X87	2,0	Комплекс с [Cu(I)(MeCN) ₄]PF ₆
	3ZDW	1,91	Комплекс с АБТС
	1W6L	2,0	Комплекс с CuCl ₂
	4AKO	1,7	Мутант Е498L
	4AKP	2,0	Мутант Е498Т
	4AKQ	2,0	Мутант Е498D
	4A66	1,95	Мутант D116A
	4A68	2,0	Мутант D116N
	2WSD	1,6	Мутант І494А
	5ZLJ	1,96	
	5ZLM	1,7	Мутант Н491С
Escherichia coli	3PAU	2,0	
	3PAV	1,45	
	4E9Q	1,3	
	4E9R	1,3	
	4E9S	1,06	
	4E9T	1,3	
	4NER	1,6	
	5B7E	1,42	
	1N68	1,7	T. 0.00
	2YXV	1,81	Комплекс с CuSO ₄
	2YXW	1,5	Мутант с удаленным фрагментом С-конца
	3NSF	2,0	Мутант с удаленным фрагментом С-конца
	4EF3	1,9	
	4HAK	1,4	
	4HAL	1,4	Мутант Е506А
	1PF3	1,5	Мутант Е506І
	3NSC	1,5	Мутант M441L
	3NSD	2,0	Мутант C500S, комплекс с CuSO ₄
	3QQX	1,5	Комплекс с AgNO ₃
	3UAA	1,7	
	3UAB	1,3	Мутант C500S/E506Q
	3UAC	1,3	Мутант C500S/E506Q
	3UAD	1,1	Мутант C500S/E506Q
	3UAE	1,3	Мутант C500S/E506Q
	5B7F	1,45	Мутант C500S/E506Q
	5GNO	1,45	
	1KV7	1,4	
	3NT0	1,8	МутантС500S, комплекс с [Cu(MeCN) ₄]PF ₆
	3OD3	1,1	
	5B7M	1,8	
	2FQE	1,92	
	2FQF	2,0	

Thermus thermophilus	2XU9	1,5	
	5JRR	1,9	
	2XUW	1,7	Апофермент
	2YAE	1,8	0,0 - 12,5% дозы поглощенного
			рентгеновского излучения
	2YAF	1,8	12,5 - 25,0% дозы поглощенного
			рентгеновского излучения
	2YAH	1,8	25,0 - 37,5% дозы поглощенного
			рентгеновского излучения
	2YAM	1,8	37,5 - 50,0% дозы поглощенного
			рентгеновского излучения
	2YAO	1,8	50,0 - 62,5% дозы поглощенного
		,	рентгеновского излучения
	2YAP	1,8	62,5 - 75,0% дозы поглощенного рентгеновского излучения
	2YAQ	1,8	75,0 - 87,5% дозы поглощенного рентгеновского излучения
	2YAR	1,8	87,5 - 100,0% дозы поглощенного рентгеновского излучения
	4AI7	1,7	Комплекс апофермента с HgCl ₂ (2 часа)
	2XVB	1,7	Комплекс апофермента с HgCl ₂ (5 мин)
	5JX9	1,6	Комплекс с циклофаном меди (II) (5 мин)
	5K0D	1,82	Комплекс с циклофаном меди (II) (3 мин)
	5K5K	1,8	Комплекс с аскорбиновой кислотой
	5K7A	1,5	Комплекс с нитратом натрия (1,5 мин)
	5K84	1,78	Комплекс с нитратом натрия (10 мин)
	5K15	1,55	Комплекс с CuSO ₄
	5K3K	1,64	
Ochrobactrum sp.	6EVG	1,1	
Amycolatopsis sp. ATCC 39116	3T9W	1,5	
Nitrosomonas europaea	3G5W	1,9	
Streptomyces	5LHL	2,0	
griseoflavus	5O4I	1,8	Мутант M54L/M64L/M96L
	5O4Q	1,7	Мутант M54L/M64L/M96L
Streptomyces sviceus	4WTQ	1,8	Мутант M295L
1	4UAH	1,73	Мутант H99N, нет иона меди в центре T2
	4UAN	1,8	Мутант H99Q, нет иона в центре меди Т2
	4W1T	1,55	Мутант Н99Ү, нет иона в центре меди Т2
Метагеном	2ZWN	1,7	

Трехмерная структура грибных лакказ во многом схожа со структурой других медь-содержащих оксидаз, таких как аскорбатоксидаза, билирубин оксидаза и церулоплазмин [101,103,104]. Три купредоксино-подобных домена соединены последовательно (рисунок 2). Каждый домен имеет топологию β-слоя, организованного по

типу «греческого ключа», что типично для всех белков семейства медьсодержащих оксидаз [5]. На рисунке 2 показана пространственная структура лакказы *М. albomyces* и топологическая схема ее купредоксиновых доменов. Как правило, структура стабилизирована двумя дисульфидными мостиками, первый из которых соединяет первый и второй домены, а второй – первый и третий домены [105]. Как уже было отмечено выше, активный центр лакказ состоит из двух частей. Центр Т1 располагается в третьем домене, а Т2/Т3 центр — между первым и вторым доменом. Центры Т1 и Т2/Т3 разнесены в пространстве приблизительно на 13 Å, но соединяются консервативным мотивом His-Cys-His, служащим для переноса электронов [47].

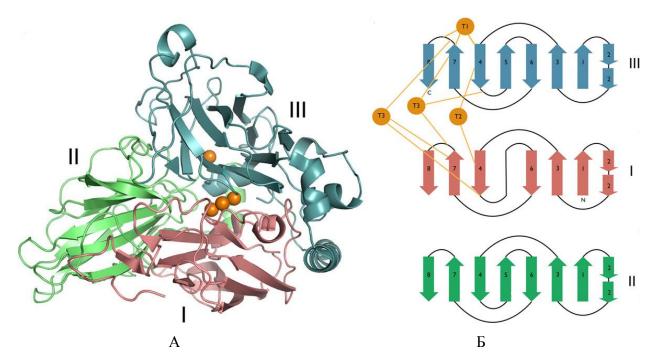


Рисунок 2. Третичная структура лакказы *М. albomyces*. А – ход полипептидной цепи, представленный моделью элементов вторичной структуры. Б – схематическая топологическая диаграмма купредоксиновых доменов лакказы [105].

Бактериальные лакказы могут иметь трехдоменную структуру, как и грибные лакказы. Трехдоменной структурой обладает, например, лакказа CotA из *B. subtilis*. Однако, наряду с трехдоменными лакказами, у бактерий существуют также двухдоменные лакказы, которые образуют тримеры (рисунок 3. Б, В).

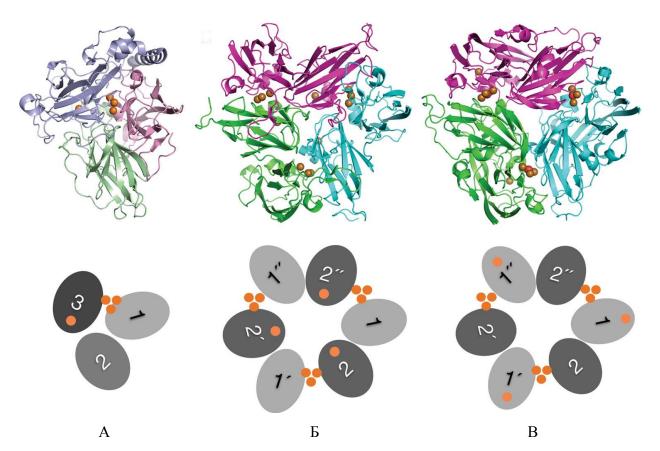


Рисунок 3. Ленточные диаграммы и схемы расположения доменов и ионов меди активных центров трехдоменных (A) и двухдоменных (Б, В) лакказ. Ионы меди показаны оранжевыми сферами [105].

Различают два типа структур двухдоменных лакказ в зависимости от расположения ионов меди активного центра. У лакказ первого типа центр Т1 расположен во втором домене, а центр Т2/Т3 расположен между первым и вторым доменом разных субъединиц тримера (рисунок 3, Б). Представителем такого типа лакказ является SLAC из *S. coelicolor* [106]. Другой тип четвертичной структуры двухдоменных лакказ был обнаружен у лакказы из метагенома (PDB код 2ZWN). У данного типа лакказ центр Т1 расположен в первом домене (рисунок 3, B) [107].

1.5.3 Активный центр

В центре Т1 происходит окисление субстрата-донора электронов. У всех лакказ строение Т1 центра идентично. Ион меди в центре Т1 координирован двумя атомами ND1 остатков гистидина и атомом SG остатка цистеина (рисунок 4). С двух сторон от плоскости, содержащей в себе ион меди и координирующие его атомы, расположены боковые цепи двух гидрофобных аминокислотных остатков (показаны серым на рисунке 4). Один из них, изолейцин, строго консервативен среди лакказ. Во второй позиции могут находиться остатки фенилаланина, лейцина или метионина. Остаток метионина

встречается только у бактериальных лакказ. Вышеописанные пять аминокислотных остатков, расположенных на расстоянии ~5 Å от иона меди Cu1, образуют первую координационную сферу этого иона меди. У грибных лакказ ион меди в центре T1 плоско координирован. У бактериальных лакказ координация иона меди в центре T1 имеет геометрию искаженного тетраэдра благодаря тому, что остаток метионина образует связь с ионом меди.

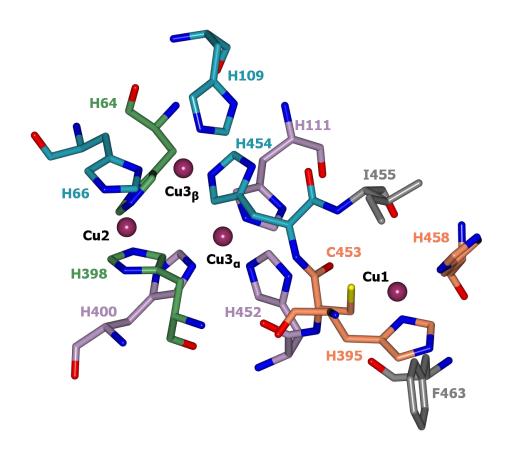


Рисунок 4. Активный центр лакказы *T. hirsuta*. Ионы меди показаны фиолетовым цветом, атомы кислорода – красным, атомы азота – синим. Атомы углерода остатков гистидина, координирующих ионы меди Cu1, Cu2, Cu3 $_{\alpha}$ и Cu3 $_{\beta}$ показаны коралловым, зеленым, лиловым и голубым цветами, соответственно. Атомы углерода некоординирующих аминокислотных остатков из первой координационной сферы иона меди Cu1 показаны серым цветом.

Существует корреляция между значением ОВП лакказ и природой неконсервативного аминокислотного остатка из ближайшего окружения иона меди в активном центре Т1. Лакказы, обладающие высоким ОВП (730-790 мВ), имеют в качестве неконсервативного остатка из ближайшего окружения иона меди Сu1 остаток Phe, изредка Leu. Лакказы, обладающие средним ОВП (460-730 мВ), в данной позиции

преимущественно имеют остаток Leu, иногда Phe, а лакказы, обладающие низким ОВП (менее 460 мВ) — остаток Met [1]. В ряде работ методами генной инженерии изучалось влияние данного остатка из ближайшего окружения иона меди Cu1 на его ОВП [78,87,108,109]. Замена Leu на Phe в лакказах *М. thermophila* и *R. solani* не приводит к увеличению потенциала центра T1 [78]. Мутация Met/Leu и Met/Phe в лакказе CotA из *В. subtilis* приводит к увеличению ОВП центра T1 на 100 и 60 мВ соответственно, но изменения в координации иона меди Cu1 незначительны по данным исследования пространственных структур лакказ с мутациями [108]. В работе Ф. Сью (F. Xu) и коллег [109] было показано, что мутация Phe/Met в лакказе *Т. villosa* понижает ОВП на 110 мВ. При этом в спектре ЭПР исследуемой лакказы с мутацией были выявлены изменения, которые могут свидетельствовать об изменениях в структуре активного центра лакказы. В работе [87] исследовалась такая же мутация в лакказе аскомицета *В. aclada*. Потенциал иона меди в центре T1 снизился на 140 мВ, при этом не обнаружено существенных изменений в строении окружения центра T1 за исключением небольшого смещения иона меди Cu1 в сторону атома серы остатка Met.

Величина ОВП центра Т1 лакказ зависит от состава и строения не только первой координационной сферы, но и второй координационной сферы иона меди Си1 [110]. Влияние аминокислотных остатков второй координационной сферы на ОВП иона меди Т1 было обнаружено в ряде работ при помощи мутагенеза. Так, мутантная форма лакказы из *Pleurotus ostreatus*, содержащая пять аминокислотных замен (К37Q, К51N, L112F, V148L и Р494T), одна из которых (Р494T) находилась вблизи активного центра Т1, имела ОВП на 120 мВ выше, чем лакказа дикого типа [111]. Мутация Е235Т в петле около центра Т1 лакказы *М. albomyces* также немного повысила ее ОВП [112].

Связывание молекулярного кислорода происходит в T2/T3 центре фермента. Т2/T3 центр состоит из иона меди Cu2 и пары ионов Cu3. Ион меди Cu2 координирован двумя атомами NE2 остатков гистидина. Один из ионов меди Cu3 координирован тремя атомами NE2 остатков гистидина, второй ион меди Cu3 координирован двумя атомами NE2 и одним атомом ND1 остатков гистидина (рисунок 4). Помимо остатков гистидина, в координации ионов меди центра T2/T3 могут принимать участие от 1 до 3 атомов кислорода (рисунок 5).

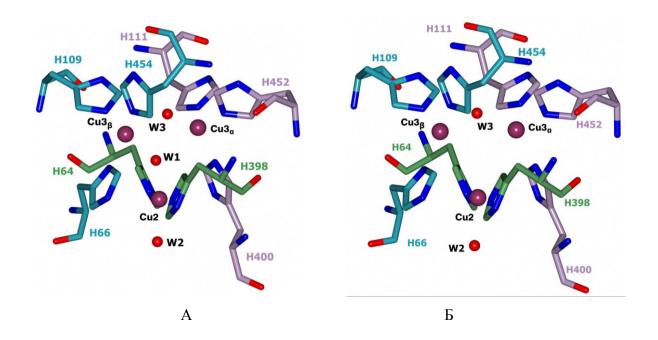


Рисунок 5. Строение T2/T3 центра на примере лакказ из *T. hirsuta* (A) и *T. versicolor* (Б). Ионы меди показаны фиолетовым цветом, атомы кислорода – красным, атомы азота – синим. Атомы углерода остатков гистидина, координирующих ионы меди Cu2, Cu3 $_{\alpha}$ и Cu3 $_{\beta}$ показаны зеленым, лиловым и голубым соответственно.

Кислородный лиганд W1 располагается в середине T2/T3 центра и координирует все три иона меди. Данный лиганд был обнаружен в структурах лакказ T. hirsuta (PDB код 3FPX) [113], S. ochraceum (PDB код 3T6W) [114], L. tigrinus (PDB код 3QT6) [115], CueO (PDB коды 4NER, 4E9Q) и лакказы из метагенома (PDB код 4E9V) [116] (рисунок 5, A). Практически во всех известных структурах лакказ ион меди Cu2 образует связь с кислородным лигандом W2, лежащим вне T2/T3 центра. В структуре лакказы M. albomyces (PDB код 2Q9O) в позиции данного лиганда локализован ион хлора. Лиганд W3 также присутствует во всех известных структурах лакказ. В данной позиции, как правило, находится одноатомный кислородный лиганд (молекула воды или гидроксидион). В структурах лакказы M. albomyces (PDB код 1GW0), CotA (PDB код 3ZDW) и T. hirsuta (PDB код 3V9C) в позиции лиганда W3 расположен один из атомов молекулы кислорода (второй атом располагается вне Т2/Т3 центра). Известна также структура комплекса лакказы CotA с пероксидом водорода (PDB code 1WE8) и азидом (PDB code 1W6W), один из атомов которых расположен в позиции лиганда W3 [117]. Однако, низкое разрешение (2,2 Å) этих структур делает невозможным однозначную интерпретацию лигандов в активном центре.

Состояние активного центра фермента с двумя кислородными лигандами (W2 и W3, рисунок 5, Б) некоторые авторы интерпретируют как «состояние покоя» фермента

[105], как это было предложено в механизме реакции по Э. Соломону (Е. Solomon), (см. ниже) [47]. Согласно этому механизму, состояние активного центра с тремя кислородными лигандами (W1, W2 и W3, рис. 5, A) рассматривается как «нативный интермедиат» [113–115]. В то же время в работе Х. Комори (Н. Котогі) [116] данное состояние Т2/Т3 центра рассматривается как «состояние покоя» фермента.

1.5.4 Структуры лакказ с отсутствующим ионом меди в центре Т2. Встраивание ионов меди в центр Т2

Активность лакказы зависит от наличия ионов меди в активном центре. Наиболее лабильным является ион меди Cu2. Известно несколько структур лакказ с отсутствующим ионом меди Cu2: лакказа T. hirsuta (PDB код 3PXL), C. gallica (PDB код 4A2D) [118], T. thermophilus (PDB код 2YAF), C. cinereus (PDB код 1HFU) [119], B. aclada (PDB код 3SQR) [87], CueO из E. coli (PDB код 2FQD) [120]. В структурах CotA из B. subtilis (PDB коды 2BHF и 1W8E) заселенность иона меди Cu2 была задана 0,5 [117] и 0,3 (PDB код 2X87) [121]. Для лакказ *C. cinereus* [119] и *B. aclada* [87] были получены только структуры, не содержащие ионов меди второго типа. В случае лакказы *T. hirsuta* (3PXL) ион меди был намеренно удален. Отсутствие иона меди Cu2 у лакказы C. gallica [118] авторы связывают с рН 4,5 кристаллизационного раствора, поскольку в других структурах лакказы C. gallica, полученных при выращивании кристаллов при других значениях pH, ион меди присутствовал. Это утверждение противоречит тому факту, что во многих других структурах лакказ, кристаллы которых были выращены при близких значениях рН, ион меди Cu2 присутствует. Для получения кристаллов лакказы C. cinereus препарат был подвергнут процедуре дегликозилирования в присутствии ЭДТА, что могло привести к потере иона меди Cu2 [119]. Неполную заселенность ионов меди активного центра лакказ CueO из E. coli [120], Cot A из B. subtilis [117] и B. aclada [87] авторы объясняют особенностью систем экспрессии, которые использовались для получения белков, или же потерей ионов меди в ходе очистки препаратов.

Структура молекулы лакказы с удаленным ионом меди Cu2 остается неизменной за исключением конформационных изменений, которые может претерпевать один из остатков гистидина, координирующих ион меди Cu2. В структурах лакказ T. hirsuta, C. gallica, C. cinereus и B. aclada наблюдаются два положения боковой цепи остатка гистидина His498 (нумерация по структуре лакказы T. hirsuta). В ряде структур лакказ с отсутствующим ионом меди Cu2 этот остаток служит четвертым лигандом, координирующим ион меди Cu3 $_{\alpha}$. При этом ион меди Cu3 $_{\alpha}$ смещается в сторону атома ND1 остатка His498, что видно на примере структур C. gallica и C. cinereus [101,118].

В ряде работ сообщается об обратимости удаления иона меди второго типа при добавлении к раствору фермента солей меди [117,122-125]. В большинстве случаев для успешного встраивания иона меди Cu2 добавлялся восстанавливающий агент бактериальных (аскорбиновая кислота). Для лакказ предпринимались реконструкции рекомбинантных ферментов с дефицитом ионов меди в активном центре солями меди в разных степенях окисления. Для лакказы из CotA из B. subtilis встраивание ионов меди происходило при обработке препаратов апофермента солями меди Cu(I) и Cu(II) [125]. Более эффективно встраиваются ионы меди при обработке препарата солью Cu(I), что было показано с использованием оптической и ЭПР спектроскопии. Однако в структурах апо-формы CotA из B. subtilis заселенность ионов меди Cu2 достигала 0,3-0,5 при реконструкции препарата лакказы в растворе соли CuCl и 0,67 при настаивании кристаллов в растворе CuCl₂. [117,121]. Для лакказы из E. coli CueO было показано, что происходит полное встраивание меди при обработке препаратов апо-фермента раствором CuSO₄ [126]. Однако, в структурах кристаллов лакказы E. coli CueO, выращенных при различных концентрациях CuCl₂ в кристаллизационном растворе, встраивание меди происходит не полностью [120] (PDB коды 2FQD, 2FQE, 2FQF и 2FQG). В работе C. Сингха (S. Singh) [127] изучалось связывание ионов Cu^+ и Cu^{2+} в кристаллах бактериальной лакказы СиеО. Структура Т2/Т3 центра нативного фермента была схожа со структурами комплексов CueO с ионами Cu⁺ и Cu²⁺. Заселенность ионов меди Cu2 в структурах данных комплексов составляет 0,75 и 1,0 соответственно (коды PDB 3NSC and 3NT0). Однако на разностной карте электронной плотности в области иона Cu2 присутствует значительный отрицательный пик, что может свидетельствовать о том, что заселенность иона Cu2 была переоценена.

Также следует отметить, что для большинства грибных лакказ, даже решенных с высоким разрешением, заселенности ионов меди активного центра обычно принимаются равными единице и не уточняются. Так, например, в структуре лакказы *M. albomyces*, решенной с разрешением 1,3 Å [128], несмотря на значительные отрицательные пики на разностной карте электронной плотности на одном из ионов меди Cu3 и ионе меди Cu2, их заселенность была принята равной 1.

1.5.5 Комплексы лакказ с субстратами

Предпринималось несколько попыток получения структур комплексов лакказ с субстратами. В настоящее время удалось получить только структуры комплексов лакказы *T. versicolor* с 2,5-ксилидином с разрешением 2,4 Å (PDB код 1KYA) [129], лакказы *T. trogii* с *n*-толуатом с разрешением 1,58 Å (PDB код 2HRG) [110], лакказы CotA с

синаповой кислотой с разрешением 1,91 Å (PDB код 4Q8B)[130] и АБТС (PDB коды 3ZDW, 4YVN) с разрешением 2,4 Å [131] и 2,3 Å [132], а также лакказы *М. albomyces* с 2,6-диметоксифенолом и продуктами его окисления с разрешением 1,7 – 2,0 Å (PDB коды 3FU7, 3FU8 и 3FU9) [112]. Практически все структуры комплексов лакказ с субстратом имеют низкое разрешение, менее 2 Å. Во всех моделях у лиганда очень высокие температурные факторы, а электронная плотность плохо соответствует модели. В случае структуры комплекса лакказы *Т. trogii* с *п*-толуатом, решенной с наиболее высоким разрешением, молекула субстрата находится на границе контакта с симметричной молекулой, что может нарушать картину связывания субстрата. Все это не позволяет сделать однозначных выводов о способе связывания субстрата в субстрат-связывающем кармане фермента. Таким образом, можно заключить, что получение комплексов лакказ с субстратами затруднено. Связывание, видимо, происходит в основном за счет неспецифичных ван-дер-ваальсовых контактов.

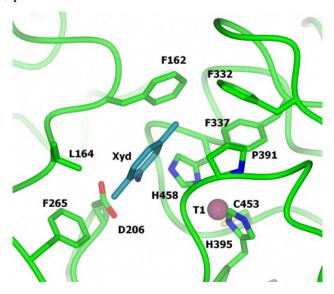


Рисунок 6. Связывание молекулы 2,5-ксилидина в субстрат-связывающем кармане лакказы *T. versicolor*.

У трехдоменных лакказ субстрат-связывающий карман для окисляемых фенольных соединений расположен вблизи центра Т1 и сформирован петлями первого и второго доменов (рисунок 6). Субстрат-связывающий карман образован гидрофобными аминокислотными остатками (рисунок 6, остатки Phe162, Leu164, Phe265, Phe332, Phe337, Pro391) и включает в себя остаток His458, координирующий ион меди Сu1. Предположительно, в связывании субстрата также участвует остаток Asp206, консервативный для лакказ базидиомицетов. У аскомицетных лакказ в данной позиции находится остаток глутаминовой кислоты, а у бактериальных лакказ — остаток треонина.

Авторы работы [129] связывают уменьшение констант Михаэлиса для фенольных субстратов при повышении рН с депротонированием остатка Asp206 (рКа 3,9), что приводит к появлению отрицательного заряда в субстрат-связывающем кармане и способствует взаимодействию лакказы с субстратами, имеющими –ОН или –NH₂ группы. Для бактериальной лакказы CotA было показано, что важную роль в связывании играет остаток аргинина, который образует π - π стекинг с субстратом [130].

Важная роль остатка Asp206 для катализа была подтверждена с использованием точечных мутаций. Мутация Asp206Glu в лакказе *T. versicolor* привела к снижению константы Михаэлиса для ферментативного окисления как фенольного субстрата 2,6-диметоксифенола, так и для нефенольного субстрата АБТС. При этом рН профили окисления обоих субстратов при мутации оставались практически неизменными [133]. Для лакказы *М. albomyces* была изучена «обратная» мутация (Glu235Asp). Данная аминокислотная замена привела к незначительному повышению константы Михаэлиса для фементативного окисления АБТС и к семикратному повышению — для 2,6-диметоксифенола. Оптимальный рН окисления данных субстратов сдвинулся при мутации в щелочную область на одну единицу [112].

В другой работе, на примере лакказы *T. versicolor*, исследовалось влияние остатков фенилаланина в субстрат-связывающем кармане на возможность окисления крупных фенольных субстратов. Были получены формы лакказы со следующими мутациями: Phe162Ala, Phe265Ala, Phe332Ala, Phe337Ala и Phe162Ala/Phe332Ala. Эффективность каталитического окисления крупных фенольных субстратов возросла только в случае мутантов Phe162Ala и Phe 162Ala/Phe332Ala [134].

1.6 Механизм восстановления кислорода до воды в T2/T3 центре лакказ

Механизм восстановления кислорода до воды лакказой был первоначально предложен Э. Соломоном (Е. Solomon) и коллегами на основании данных спектроскопии и трехмерной структуры родственного лакказе фермента — аскорбатоксидазы [135]. Значительное количество исследований было сфокусировано на растительной лакказе *R. vernicifera* [136–138] и на родственном лакказе белке Fet3p из *Saccharomyces cerevisiae* [139,140]. Современные представления о механизме восстановления кислорода до воды лакказами суммированы в обзоре [47]. Механизм схематически представлен на рисунке 7. Процесс восстановления кислорода состоит из двух этапов. Каталитический цикл начинается с полностью восстановленного фермента, с которым связывается молекулярный кислород. В результате первого двухэлектронного восстановления

молекула кислорода превращается в пероксидный интермедиат. Второе двухэлектронное восстановление приводит к расщеплению связи между атомами кислорода и образованию «нативного интермедиата».

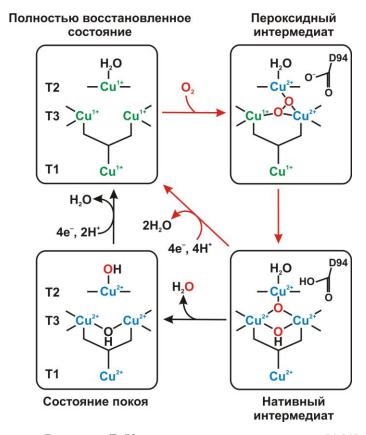


Рисунок 7. Каталитический цикл лакказ [141].

Окисленный фермент в «состоянии покоя» (рисунок 7., нижняя левая панель) содержит в себе четыре окисленных иона меди, причем между ионами меди Cu3 имеется мостиковый лиганд — гидроксид-ион. Процесс катализа начинается с восстановления всех четырех ионов меди до степени окисления +1 субстратом-донора электронов. Электроны первоначально переносятся на ион меди Cu1, а затем — на ионы меди T2/T3 центра.

Полностью восстановленный Т2/Т3 центр реагирует с молекулярным кислородом с образованием пероксидного интермедиата. В работе Л. Кинтанар (L. Quintanar) и коллег [142] на примере родственной лакказе медьсодержащей оксидазы Fet3р исследовалась роль консервативного остатка Asp94 (D77 на рисунке 8) в процессе связывания молекулярного кислорода ферментом. Производные фермента с заменой остатка аспартата на остаток аланина или аспарагина не реагировали с молекулярным кислородом, а фермент с заменой аспартата на глутамат был способен реагировать с О2. Это показывало необходимость отрицательно заряженного остатка в данной позиции для сохранения активности фермента [142]. Расчеты показали, что отрицательно заряженный остаток Asp94 снижает редокс-потенциал ионов меди Cu2 и Cu3_β, что позволяет им

осуществлять донирование электронов на O_2 [143]. Положение атомов кислорода пероксидного интермедиата в рассматриваемой схеме предлагалось асимметричным по отношению к ионам меди Cu3 (рисунок 7, верхняя правая панель) [141]. С использованием масс-спектрометрии изотопных отношений (IRMS) было установлено, что оба атома кислорода пероксидного интермедиата принадлежали молекулярному кислороду [144]. Было показано, что перенос электронов на молекулярный кислород на первой стадии происходит с иона меди Cu2 и одного из ионов Cu3 (Cu3 $_{\beta}$ на рисунке 8), поскольку только форма оксидазы Fet3p с деактивированным ионом меди Cu3 $_{\beta}$ не была способна реагировать с кислородом [141].

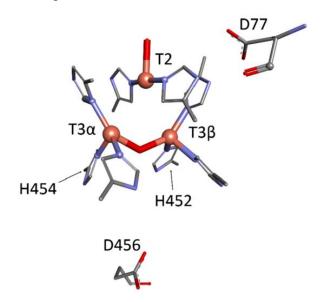


Рисунок 8. Т2/Т3 центр мультимедных оксидаз и консервативные карбоксилатные остатки вблизи него (нумерация в соответствии со структурой лакказы *T. versicolor* PDB код 1GYC). Т2 – ион меди Cu2, Т3 – ион меди Cu3 [47].

Распад пероксидного интермедиата (переход фермента в состояние «нативного интермедиата», рисунок 7) является лимитирующей стадией процесса восстановления кислорода, как было показано при помощи исследования кинетического изотопного эффекта реакции [137]. Важную роль в этом процессе играет остаток Glu487 (D456 на рисунок 8), расположенный вблизи ТЗ центра, что было выявлено при исследовании оксидазы Fet3p и ее мутантной формы Glu487Ala [140]. Было показано снижение скорости распада пероксидного интермедиата у мутантной формы Fet3p с заменой Glu487Ala по сравнению с ферментом дикого типа. Для мутантной формы Fet3p Asp94Glu также было показано снижение скорости распада пероксидного интермедиата. Аналогичные результаты были получены при исследовании мутаций этих двух остатков в лакказе CotA [145,146].

Модель расщепления пероксида включает в себя два пути: протон-независимый путь при высоких значениях рН реакционной среды и протон-зависимый путь при низких значениях рН, как показано на рисунке 9 [140,143]. Оба пути начинаются с переноса протона пероксиду от остатка Gln487 через сеть водородных связей к атому кислорода, расположенному между ионами меди Cu3 с внешней стороны T2/T3 центра. Согласно этой модели, роль остатка Asp94 заключается в депротонировании воды, связанной с ионом меди Cu2 при его окислении. Образующийся гидроксид-ион понижает потенциал иона меди Cu2, способствуя переносу электрона на пероксид. При низких значениях рН сначала переносится протон от остатка Gln487 на мостиковый кислород между ионами меди Cu3, а затем происходит восстановительное расщепление О–О связи. При высоких значениях рН сначала происходит удлинение О–О связи пероксида, после чего происходит перенос протона [140].

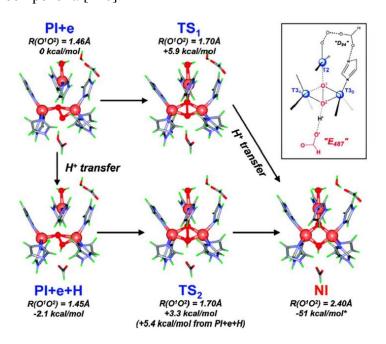


Рисунок 9. Схема расщепления пероксидного интермедиата [143].

В результате расщепления О–О связи в пероксидном интермедиате образуется так называемый «нативный интермедиат». «Нативный интермедиат» соответствует полностью окисленному состоянию фермента, в котором все три иона меди Т2/Т3 центра связаны двумя мостиковыми μ_3 -кислородным и μ_2 -гидроксидным кислородными лигандами (рисунок 7, нижняя правая панель) [143]. Дальнейшее протонирование μ_2 -гидроксидного лиганда не происходит.

При наличии субстрата-донора электронов происходит восстановление ионов меди T2/T3 центра, и каталитический цикл начинается заново. В отсутствие субстрата-донора электронов T2/T3 центра из состояния «нативного интермедиата» медленно переходит в

«состояние покоя». Несмотря на то, что и «нативный интермедиат», и фермент в «состоянии покоя» имеют полностью окисленный T2/T3 центр, они проявляют различные спектральные свойства из-за различного количества мостиковых лигандов (μ_3 -О и μ_2 -ОН в «нативном интермедиате» и μ_2 -ОН в T2/T3 центре в «состоянии покоя»). С использованием спектрофотометрии остановленной струи (stopped flow absorption spectroscopy) было показано, что скорость катализа ($560 \, c^{-1}$) значительно выше, чем скорость переноса электрона от иона меди Cu1 к иону меди Cu3 в T2/T3 центре в «состоянии покоя» ($1.1 \, c^{-1}$) или скорости перехода от «нативного интермедиата» до T2/T3 центра в «состоянии покоя» ($0.05 \, c^{-1}$). Поэтому T2/T3 центр в «состоянии покоя» был признан каталитически неактивным [147].

Было предпринято несколько попыток предложить механизм катализа лакказами восстановления кислорода до воды на основании данных рентгеноструктурного анализа. И. Бенто (I. Bento) и коллегами [117,121] были представлены различные структуры Т2/Т3 центра, которые наблюдались для лакказ и аскорбатоксидазы. М. Феррарони (М. Ferraroni) и коллегами [115] была предложена еще одна схема механизма восстановления кислорода до воды в Т2/Т3 центре лакказ на основании решенной авторами структуры лакказы *L. tigrinus*. Электронная плотность в Т2/Т3 центре в двух независимых молекулах в кристаллической ячейке была интерпретирована как пероксидный интермедиат и «нативный интермедиат». Во всех трех работах не учитывается, что структуры, полученные при помощи РСА, представляют собой смесь состояний, образующихся в результате восстановления ионов меди активного центра под действием ионизирующего рентгеновского излучения. Помимо этого, практически все использованные в упомянутых выше работах структуры имеют разрешение, недостаточное для однозначной интерпретации состояний активного центра.

1.7 Исследования восстановления лакказы под действием рентгеновского излучения в ходе сбора дифракционных данных

Традиционно механизм действия фермента изучают, получая комплексы фермента с субстратом/продуктом/ингибиторами и т.п. Для изучения механизма действия окислительно-восстановительных ферментов для запуска реакции можно использовать свободные электроны, которые генерируются в образце в процессе сбора дифракционных данных [148,149]. Сбор дифракционных данных сопровождается неэластичным рассеянием рентгеновских лучей в белковых кристаллах. Неэластичное рассеивание

ренттеновских лучей вызывает ионизацию образца за счет фотоэффекта и эффекта Комптона. Неэластичное рассеяние приводит к радиационному повреждению и восстановлению образца в процессе сбора дифракционных данных. Один неэластично рассеянный рентгеновский фотон вызывает лавинообразный процесс, приводящий к появлению около 500 свободных электронов с низкой энергией [150]. Фотоэлектроны могут вызывать восстановление ионов металлов в активном центре окислительновосстановительных ферментов [150,151] и вызывать ферментативную реакцию [148,149]. Для изучения воздействия ионизирующего рентгеновского излучения на лакказу и процесса восстановления молекулярного кислорода применялось три различных подхода: сбор данных от разных кристаллов с разной дозой поглощенного кристаллом рентгеновского излучения, метод сбора данных от нескольких кристаллов с последующим получением комбинированных наборов данных, соответствующих разным дозам поглощенного рентгеновского излучения, и метод последовательного сбора данных от одного кристалла с возрастающими дозами поглощенного рентгеновского излучения.

Для лакказ восстановление ионов меди активного центра впервые было изучено на примере лакказы из *М. albomyces*, для которой были решены структуры с низкой (PDB код 2IH8) и высокой (PDB код 2IH9) дозой поглощенного в ходе съемки ионизирующего рентгеновского излучения. Было показано, что под воздействием ионизирующего рентгеновского излучения исчезает молекула кислорода, связанная в активном центре фермента, то есть, под воздействием рентгеновского излучения протекает ферментативная реакция [152].

Позднее был реализован иной подход. На примере лакказы S. ochraceum было проведено исследование изменений, происходящих в активном центре фермента под действием рентгеновского излучения, при помощи метода сбора данных с нескольких кристаллов [114]. В работе было получено семь наборов данных, состоявших из 100 изображений, от разных кристаллов лакказы S. ochraceum в произвольной ориентации. Набор данных для каждого кристалла разбивался на 10 частей в соответствии с поглощенной дозой рентгеновского излучения. Каждая часть набора для каждого кристалла соответствовала определенной дозе поглощенного кристаллом ионизирующего рентгеновского излучения. Части набора для каждого кристалла обрабатывались независимо. Полученные частичные наборы данных, соответствующие одинаковым дозам поглощенного рентгеновского излучения для разных кристаллов, затем объединялись. Таким образом, было получено десять комбинированных наборов данных, кристаллами соответствующих различным дозам поглощенного рентгеновского излучения. Благодаря такому подходу авторами работы предложены различные варианты интерпретации структур комплексов фермента с кислородными лигандами для двух независимых молекул фермента при различных дозах поглощенного рентгеновского излучения (рисунок 10). На основании этих структур предложен механизм функционирования фермента (рисунок 10).

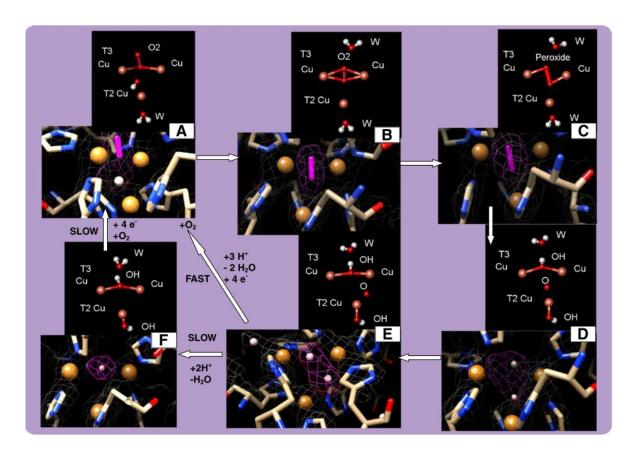


Рисунок 10. Состояния активного центра лакказы *S. ochraceum*, полученные с применением метода сбора данных от нескольких кристаллов и соответствующие различным дозам поглощенного рентгеновского излучения, которые представляют собой различные стадии механизма восстановления кислорода. 2*Fo-Fc* (желтый цвет) и разностная (OMIT) *Fo-Fc* (розовый цвет) карты электронной плотности показаны на уровне 1σ и 3σ соответственно. Структуры Т2/Т3 центра лакказы *S. ochraceum*: (A) независимая молекула A, 10% поглощенной дозы рентгеновского излучения. (В) независимая молекула C, 10% поглощенной дозы рентгеновского излучения. (С) независимая молекула A, 60% поглощенной дозы рентгеновского излучения. (Е) независимая молекула A, 70% поглощенной дозы рентгеновского излучения. (F) независимая молекула A, 90% поглощенной дозы рентгеновского излучения. (F) независимая молекула A, 90% поглощенной дозы рентгеновского излучения. Ионы меди показаны оранжевыми сферами [114].

При 10% дозы поглощенного рентгеновского излучения пик электронной плотности между ионами меди Сu3 был интерпретирован как молекула кислорода, связанная асимметрично (рисунок 10, A) или симметрично (рисунок 10, B). Состояние активного центра в структуре, соответствующей 20% дозы рентгеновского излучения,

было описано как пероксидный интермедиат (рисунок 10, С). Полученная при дальнейшем повышении дозы поглощенного рентгеновского излучения структура была интерпретирована как «нативный» интермедиат, связанный симметрично (рисунок 10, D) или асимметрично (рисунок 10, Е). В последней структуре, соответствующей 90% поглощенного рентгеновского излучения, наблюдался только один кислородный лиганд между ионами меди Cu3 (рисунок 10, F). В ходе эксперимента наблюдалось увеличение расстояния между ионами меди Cu3 от 3,7-3,8 до 5,0 Å. Стоит отметить, что в данном эксперименте при использовании метода сбора данных с нескольких кристаллов проводилось усреднение данных от семи разных кристаллов. Как следует из анализа статистических данных для каждого из наборов с фиксированной поглощенной дозой, достоверности определения интенсивностей (I/sigma(I)) факторы рентгеновских отражений в 1,5 раза превышают таковые для данных, полученных от одного кристалла. То есть, вклад в статистические показатели комбинированных наборов от усреднения данных от различных кристаллов заметно превышает вклад от радиационного разрушения. Это обстоятельство, наряду с тем, что структуры были решены с разрешением только 2,15 Å, привело к тому, что невозможно точно идентифицировать кислородные лиганды в этих структурах.

На лакказе из *C. gallica* также изучалось влияние рентгеновского излучения на структуру фермента с использованием обоих вышеописанных методов. При сравнении структур, полученных при съемке с использованием «домашнего» источника и синхротрона, мощность которого была выше в 8 раз, по сравнению с домашним источником, было обнаружено существенное понижение заселенности ионов меди активного центра. При этом происходило восстановление ионов меди, как было показано при помощи рентгенофлуоресцентного анализа. Для лакказы *C. gallica* также были получены четыре комбинированных набора данных от трех кристаллов. Однако даже в структуре, соответствующей минимальной дозе поглощенного рентгеновского излучения (4 МГр), отсутствовал ион меди Cu2. Других изменений в активном центре лакказы авторы работы не пронаблюдали [118].

Для лакказы из *Т. thermophilus* проводилось исследование влияние поглощенного рентгеновского излучения в диапазоне 0,2-1,6 МГр при помощи метода сбора данных от нескольких кристаллов [153]. Состояние активного центра фермента при 12,5% дозы поглощенного рентгеновского излучения было интерпретировано как состояние активного центра с молекулярным кислородом, связанным между ионами меди Cu3, при 25% дозы – как «состояние покоя» фермента с кислородным лигандом между ионами меди Cu3 и при 75% дозы – как полностью восстановленное состояние фермента без каких-либо

кислородных лигандов в T2/T3 центре. Однако необходимо отметить, что в первой структуре серии (12,5% дозы) электронная плотность между ионами меди Cu3 плохо описывается молекулой кислорода. При этом авторы предполагают, что в этой структуре ионы меди активного центра находятся в окисленном состоянии, что не согласуется с расстоянием в \sim 5 Å между ионами меди Cu3, которое практически не изменяется в ходе эксперимента. Как и в случае лакказы C. gallica, наблюдалось уменьшение заселенностей ионов меди (в особенности Cu2 и Cu3) под действием рентгеновского излучения [153].

В 2014 году Х. Комори (Н. Котогі) и коллеги [116] провели исследование изменений в активном центре лакказы CueO из E. coli и лакказы из метагенома под действием рентгеновского излучения, последовательно собрав с одного кристалла несколько наборов данных, соответствующих возрастающим дозам поглощенного кристаллом рентгеновского излучения. В первой структуре CueO, соответствующей минимальной дозе поглощенного рентгеновского излучения, в Т2/Т3 центре наблюдалось два кислородных лиганда, один из которых находился в центре Т2/Т3 центра, а второй – между парой ионов меди Cu3. При этом ионы меди Cu3 находились в окисленном состоянии (расстояние между ними составляло 3,4 Å) (рисунок 11, «Resting form»). В структурах CueO, соответствующих более высоким дозам поглощенного рентгеновского излучения, кислородный лиганд из центра T2/T3 центра пропадал, а ионы меди Cu3 восстанавливались (расстояние между ними увеличивалось до 4,9 Å) (рисунок 11, «Reduced form»). В качестве формы фермента в «состоянии покоя» была предложена первая структура, полученная в эксперименте, содержавшая в активном центре два кислородных лиганда (рисунок 11, «Resting form»). Далее происходило восстановление фермента, чему соответствовали структуры с одним кислородным лигандом в Т2/Т3 центре (рисунок 11, «Resting form»). Авторы этой работы не берутся предполагать, является ли «состояние покоя» фермента, в котором T2/T3 центр содержит два кислородных лиганда, характерным для всех медьсодержащих оксидаз или же только для некоторых, таких как CueO и лакказа из метагенома, на которых они проводили свое исследование [154]. Об остальных стадиях механизма восстановления кислорода до воды авторы судят на основании механизма, предложенного Э. Соломоном (E. Solomon) [47], (рисунок 11, «Intermediate I» и «Intermediate II»).

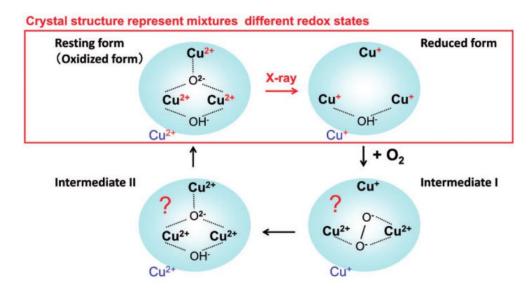


Рисунок 11. Изменения структуры активного центра лакказ в ходе восстановления кислорода до воды [154].

1.8 Практическое применение лакказ

Лакказы начали использоваться в промышленности еще в 1990-е годы [155]. С тех пор в литературе было описано большое число примеров возможного использования лакказ в биотехнологии [156]. Привлекательность лакказ для промышленного применения обусловлена тем, что эти ферменты способны катализировать окисление широкого спектра химических соединений нетоксичным соединением — молекулярным кислородом, — который присутствет в атмосфере. Кроме того, большинство лакказ является внеклеточными ферментами, что упрощает процедуру их очистки [25].

Лакказы способны катализировать окисление целого ряда ксенобиотиков, таких как хлорфенолы, диметоксифенолы, нитрофенолы, синтетические красители и пестициды [157–159]. Помимо ферментативного окисления загрязняющих веществ, лакказа также способна связывать их с гуминовыми веществами почвы, что делает их менее биодоступными и токсичными [160,161]. Особый интерес представляет деградация полициклических ароматических углеводородов при помощи лакказ, поскольку эти соединения являются очень опасной группой ксенобиотиков мутагенного и канцерогенного действия и широко распространены как в наземной, так и в водной среде [162–164].

В целлюлозно-бумажной промышленности технологии на основе лакказ потенциально способны заменить собой процессы, неблагоприятные для окружающей среды. Отделение лигнина от целлюлозы является важным этапом при производстве бумажной пульпы. Традиционные методы включают в себя обработку сырья хлор-, сульфит- или кислород-содержащими окислителями, использование которых приводит к

образованию токсичных побочных продуктов и потере прочности целлюлозных волокон [165]. Использование лакказа-медиаторных систем для отбеливания бумажной пульпы позволяет этого избежать [166].

Материалы с новыми или улучшенными свойствами могут быть получены за счет модификации поверхности материала определенными соединениями с использованием так называемой технологии графтинга. Ферментативная модификация материалов находит широкое применение В текстильной, целлюлозно-бумажной, деревообрабатывающей и пищевой промышленности. Например, некоторые исследования были направлены на получение упаковочных материалов с антимикробными свойствами с использованием лакказ [167,168]. При помощи биографтинга фенольных соединений возможно повысить прочность крафт-бумаги, придать гидрофобные или антимикробные свойства поверхности древесины [156]. Модификация шерстяных и хлопковых волокон функциональными молекулами с использованием лакказ позволяет придать им водоотталкивающие, антиоксидантные и антимикробные свойства, а также повышает их прочность [169,170]. Недавно Я. Чжан (Y. Zhang) и коллеги [171] показали возможность использования лакказы для получения хлопка с улучшенными антистатическими свойствами.

В текстильной промышленности обязательным этапом обработки волокна перед окрашиванием является отбеливание – удаление натуральных пигментов и других примесей. Лакказа представляет собой эффективную альтернативу наиболее распространенному отбеливающему агенту, пероксиду водорода [172,173], при этом сокращается время обработки волокна и снижается температура отбеливания [174]. Кроме того, становится возможным объединить процесс отбеливания и модификации волокон [175]. Лакказы также могут использоваться для отбеливания джинсовых тканей, позволяя отказаться от использования таких сильных окислителей, как гипохлорит натрия. Первый коммерческий препарат для обработки джинсовой ткани был выпущен еще в 1996 году компанией Novozymes [156].

Лакказы могут использоваться не только для отбеливания, но и для окрашивания тканей в мягких условиях. Было показано, что фенольные соединения присоединяются по принципу графтинга к натуральным флавоноидам, присутствующим в хлопке, при этом тесты на вымывание и истирание дали хорошие результаты, подтверждая эффективность предложенной методики [173].

Текстильные красители занимают важный сегмент рынка химической промышленности. Из-за высокой токсичности и жестких условий, необходимых для их синтеза, существует потребность в разработке экологически чистых процессов для их

получения. В результате окисления при помощи лакказ фенольных соединений образуются радикалы, которые могут подвергаться дальнейшим превращениям, образуя окрашенные продукты [176]. Было показано, что лакказы могут использоваться для синтеза соединений разнообразных цветов – от желто-коричневого до красного и синего при окислении производных бензола с по меньшей мере двумя заместителями (гидроксильные, амино- или метокси-группы) [176,177]. С использованием лакказ удалось получить феноксазиноны – нетоксичные соединения с отличными окрашивающими свойствами [178–180] и ряд азо-красителей, являющихся наиболее важным классом промышленных красителей [181–183].

В пищевой промышленности лакказы используются для самых разнообразных целей — от модификации органолептических свойств и текстуры пищи до увеличения сроков годности и определения содержания некоторых соединений в напитках с использованием биосенсоров на основе лакказы [156]. Применение лакказ в процессе приготовления теста приводит к повышению его прочности и стабильности, а также к уменьшению липкости, что облегчает его обработку [184]. Лакказы могут использоваться для стабилизации вин, селективно окисляя полифенолы, нежелательно влияющие на их вкус и аромат [185–187]. Аналогично, соки могут обрабатываться лакказой для стабилизации и предотвращения образования взвеси или осадка [186,188–190].

Способность лакказ катализировать синтез различных полимеров чрезвычайно важна для современной промышленности. Полимерные материалы применяются в каждой сфере человеческой жизни, и потому требуется все больше «зеленых» технологий для их производства. Основные классы полимеров, получаемых с использованием лакказ — это флавоноиды, обладающие биологической активностью, включая антиоксидантные, антимутагенные, противораковые, противовирусные и противовоспалительные свойства [191], а также электропроводящие полимеры, такие как полианилин, политиофен и полипиррол [192,193].

Лакказы можно применять для синтеза различных лекарственных препаратов, таких как антибиотики и противораковые средства. Многие ароматические заместители пенициллина и цефалоспорина являются субстратами лакказ. Например, новые беталактамные антибиотики были синтезированы в результате катализированного лакказой аминирования амино-бета-лактама и 2,5-дигидроксифенилуксусной кислоты, 2,5-дигидроксибензойной кислоты или катехолов [194–197]. Сообщается о синтезе ангидровинбластина, митомицина и других схожих по структуре соединений, обладающих противораковым действием [198–200]. Лакказы из Tricholoma giganteum, Lepiota ventrisospora, Lentinus edodes, Pleurotus cornucopiae, Coprinus comatus, Lentinus

tigrinus, Hericium coralloides, Agaricus placomyces и Abortiporus biennis являются ингибиторами обратной транскриптазной активности вируса HIV-1, как сообщается в работах [201–208].

Все больший интерес лакказа привлекает со стороны косметической промышленности в качестве катализатора окисления в красках для волос или компонента в составе средств индивидуальной гигиены, включая дезодоранты, зубные пасты, ополаскиватели для полости рта, детергенты и мыла. Краски для волос на основе лакказ обладают более слабым раздражающим действием, нежели краски на основе пероксида водорода и фенилендиаминов [209,210]. Лакказы также востребованы для осветления кожи и в качестве антимикробного агента в кремах, дезодорантах и мылах [211–213].

Лакказы также могут использоваться для создания биосенсоров для детекции кислорода, азидов, морфина, кодеина, катехоламинов или флавоноидов [18,186,214]. Эти ферменты обладают большим потенциалом при разработке катодов биотопливных элементов, так как позволяют эфективно катализировать реакцию электровосстановления кислорода по безмедиаторному механизму. Донором электронов в этой ферментативной реакции является электрод [2].

Таким образом, лакказы безусловно являются перспективными ферментами, которе могут применяться в самых различных областях. Особенно стоит отметить, что технологии на основе лакказ в качестве биокатализаторов являются экологически чистыми и наносят минимальный ущерб окружающей среде.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы микроорганизмов

В работе использовали следующие штаммы из коллекции ЛЕ-БИН Ботанического Института им. Комарова РАН:

- Steccherinum murashkinskyi (Burt) Maas Geest. ЛЕ-БИН 1968;
- Antrodiella faginea Vampola et Pouzar ЛЕ-БИН 1998;
- Trametes hirsuta (Wulfen) Lloyd ЛЕ-БИН 072;
- Coriolopsis caperata (Berk.) Murrill ЛЕ-БИН 067.

Все культуры хранились в пробирках на скошенном сусло-агаре (плотность сусла 4%; агар 1,5%) при 4°C.

2.2 Реактивы

Для выделения и очистки лакказ использовали следующие носители: ДЭАЭцеллюлозная вата (Whatman, Швеция), DEAE-Toyopearl-650M (Toyo-soda, Япония) и Superdex 75 (Pharmacia, Швеция).

Для приготовления сред использовали пептон и экстракт солодовый фирмы ДИА-М) Россия), агар-агар (Difco, США), глюкозу, гидрофосфат калия, дигидрофосфат калия, сульфат цинка, сульфат железа (II), сульфат магния, сульфат марганца, хлорид кальция и сульфат меди фирмы Химмед (Россия).

Субстраты лакказ лакказ, использованные в работе: 2,2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты) диаммониевая соль (АБТС), пирокатехин, 2,6-диметоксифенол, гваякол, феруловая кислота, сирингалдазин, галловая кислота, 3,4-дигидроксибензойная кислота, кофейная кислота, сиреневая кислота, ванилиновая кислота, ванилин, 2-амино-4-метоксибензойная кислота, орцинол, 2,5-ксилидин, эвгенол, феноловый красный фирмы Sigma (США), *п*-кумаровая кислота, *о*-кумаровая, *м*-кумаровая кислота фирмы ICN Biomedicals (США), индигокармин и бромкрезоловый зеленый фирмы Alfa Aesar (Германия), конго красный (Carl Roth, Германия), синаповая кислота (Fluka, Германия) и гидрохинон (Riedel-de Haen, Италия).

Дегликозилирование лакказ проводилось с использованием амидазы PNGase F (Sigma, США).

Для качественного анализа ОВП лакказ использовался Азур Б (Sigma, США) и гидрокисбензотриазол (Sigma, США).

Коммерческие наборы и реактивы для кристаллизации: Crystal Screen I, Crystal Screen II и Crystal Screen Cryo (Hampton Research, США), Трис (Merk, Германия), ПЭГ 3350 (Fluka, Германия), ПЭГ 600, ПЭГ 8000, НЕРЕS, сульфат аммония, ацетат цинка и какодилат натрия фирмы Sigma (США).

Маркеры молекулярной массы и р*I*: набор маркеров для электрофореза в денатурирующих условиях Page Rule Prestained Protein Ladder со значениями молекулярных масс: 11-250 кДа (Fermentas, Литва); набор маркеров для изоэлектрофокусирования IEF kit low range 2,8-6,5 (GE Healthcare/Life Sciences, USA).

Реактивы для денатурирующего электрофореза и изоэлектрофокусирования: акриламид (AppliChem, Германия), бисакриламид (AppliChem, Германия), глицерин (AppliChem, Германия), ТЕМЕД (AppliChem, Германия), персульфат аммония (Sigma, США), додецилсульфат натрия (Sigma, США), глицин (AppliChem, Германия), Ampholyte 3/5 (Serva, Германия), Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma, США).

Для удаления иона меди Cu2 лакказ были использованы: аскорбиновая кислота (Sigma, CША), гидрохлорид гуанидина (Merck, Германия), баскупроин дисульфонат натрия (Merck, Германия).

Реактивы для приготовления буферных смесей: лимонная кислота (Merk, Германия), гидрофосфат натря (Sigma, США), борная кислота (Sigma, США), ледяная уксусная кислота (Химмед, Россия), ортофосфорная кислота (Roth, Германия), соляная кислота (Химмед, Россия), гидроксид натрия (Sigma, США), гидроксид калия (Sigma, США).

Все неорганические реагенты имели марку «ХЧ», «ОСЧ» и «Analytical grade».

2.3 Экспресс метод оценки общей лигнолитической и лакказной активностей

Для качественной оценки лигнолитической и лакказной активностей экспресс методом [215] штаммы выращивали в темноте при 25 °C на чашках Петри (90 мм) на среде Сусло-Агар следующего состава: пивное сусло – 4,0 %, агар – 2,0 %. При посеве блоки диаметром 5 мм 7-суточного мицелия гриба, выращенного на среде МЭА (солодовый экстракт – 2 %, агар – 1,6 %), помещали с краю чашки мицелиальным слоем вниз. Активность лигнолитических ферментов определяли через 1 и 2 недели роста. Около растущего края колонии вырезали мицелиальные блоки диаметром 5 мм, переносили в лунки микробиологических планшетов и по каплям наносили растворы 2,0%-го гваякола в воде или 1,0%-го сирингалдазина в этаноле. Активность оценивали визуально по

интенсивности цветовых реакций: от «-» – нет активности до «+++» – высокая активность, через 5, 15, 30, 60 мин и 3, 24 ч.

2.4 Экспресс метод оценки лигнинпероксидазной активности

Качественную оценку лигнинпероксидазной активности проводили диффузионным экспресс методом [216]. Штаммы выращивали в темноте при 25 °C на чашках Петри (90 мм) на среде Сусло-Агар с добавлением в них в стерильных условиях перед розливом 0,02%-го раствора азура Б. При посеве блоки 7-суточного мицелия на среде МЭА диаметром 5 мм помещали с краю чашки мицелиальным слоем вниз. Активность лигнинпероксидазы определяли через 1 и 2 недели роста. Активность оценивали визуально по интенсивности изменения окраски красителя в диапазоне «—» — нет активности до «+++» — высокая активность.

2.5 Жидкофазное культивирование штаммов базидиомицетов

Инокулят грибов выращивали стационарно в 750 мл конических колбах с фарфоровыми бусами на глюкозо-пептонной среде (ГП, 0,6 $\rm KH_2PO_4$, 0,4 г/л $\rm K_2HPO_4$, 0,5 г/л $\rm MgSO_4\cdot7H_2O$, 0,05 г/л $\rm CaCl_2$, 0,05 г/л $\rm MnSO_4$, 0,001 г/л $\rm ZnSO_4$, 0,0005 г/л $\rm FeSO_4$, 3,0 г/л пептона, 10,0 г/л глюкозы) при 25 °C 10-14 суток в зависимости от скорости роста гриба. Перед засевом инокулят измельчали фарфоровыми бусами 20 мин при 180 об/мин до образования однородной суспензии, которую в объеме 10 % стерильно вносили в колбы для культивирования.

Глубинное культивирование проводили на шейкере при 180 об/мин и температуре 27 °C в 750 мл конических колбах на средах ГП и ГП+Си. Среда ГП+Си для грибов $A.\ faginea$ и $S.\ murashkinskyi$ содержала $0,15\ \Gamma/л$ CuSO₄ в качестве индуктора биосинтеза лакказы, а для грибов $T.\ hirsuta$ и $C.\ caperata$ среда ГП+Си содержала $0,25\ \Gamma/л$ CuSO₄. Время культивирования для $A.\ faginea$ и $S.\ murashkinskyi$ составляло $20-22\ \text{суток}$, для $T.\ hirsuta$ и $C.\ caperata-10-12\ \text{суток}$. Отбор проб культуральной жидкости для измерения лакказной активности проводили каждые три дня.

2.6 Определение лакказной активности

Активность лакказы регистрировали спектрофотометрическим методом при длине волны $\lambda = 410$ нм с использованием пирокатехина в качестве хромогенного субстрата ($\epsilon = 740 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Реакционная смесь состояла из 2 мл раствора 10 мМ пиракатехина в 0,1 М натрий-ацетатном буфере и 50 мкл культуральной жидкости [217]. Увеличение

оптической плотности регистрировали в течение 3 минут. За условную единицу ферментативной активности принимали увеличение оптической плотности реакционной среды за 1 мин. Скорость ферментативной реакции регистрировали с использованием спектрофотометра Lambda 25 (Perkin Elmer, США).

2.7 Очистка ферментных препаратов лакказ

Выделение лакказ из культуральной жидкости исследуемых грибов осуществляли на основе ранее разработанного протокола очистки лакказы из гриба T. hirsuta [218]. Из фильтрата культуральной жидкости лакказу выделяли путем осаждения 90%-ным сульфатом аммония. Осадок перерастворяли в дистиллированной воде и затем проводили диализ против дистиллированной воды в течение 12 часов для удаления оставшегося сульфата аммония. На следующем этапе очистки препарат наносили на ДЭАЭцеллюлозную вату. Элюцию фермента с носителя проводили двукратно 0,2 М калийфосфатным буферным раствором (КФБ), рН 6,5. После повторного осаждения препарата 90%-ным сульфатом аммония и перерастворения осадка в дистиллированной воде проводили второй диализ против дистиллированной воды в течение 12 часов. Затем препарат наносили на колонку с носителем DEAE-Toyopearl 650M, уравновешенную 5 мМ КФБ, рН 6,5. Элюцию проводили линейным градиентом от 5 до 50 мМ того же буфера. Фракции, обладавшие лакказной активностью, объединяли и концентрировали центрифугированием до 2 мл. Гомогенные препараты лакказ из грибов A. faginea, T. hirsuta и C. caperata получали после заключительной стадии гель-фильтрации на колонке с носителем Superdex 75. Фракции лакказы S. murashkinskyi после гельфильтрации содержали в себе две изоформы лакказы с различной молекулярной массой и рІ. Разделение изоформ проводили методом ионообменной хроматографии. Фракции, содержащие две изоформы лакказы, были объединены и диализованы против 7,5 мМ цитратно-фостфатного буфера (ЦФБ) рН 4,5, после чего нанесены на колонку с носителем DEAE-Toyopearl 650M, уравновешенную тем же буфером. Фракции с минорной изоформой лакказы были элюированы 7,5 мМ ЦФБ, а фракции, содержащие мажорную изоформу лакказы, были элюированы линейным градиентом ЦФБ с молярностью от 7,5 до 50 мМ. Концентрацию белка в препаратах лакказы определяли по усовершенствованному методу Лоури с использованием коммерческого набора BCA («Pierce», США). В качестве стандарта использовали раствор бычьего сывороточного альбумина.

2.8 Исследование физико-химических свойств лакказ

2.8.1 Оценка гомогенности препаратов и определение молекулярной массы

Гомогенность фракций лакказы определяли методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС-Nа-ПААГ) по методике Лэммли [219]. Электрофорез проводили в 12%-ном полиакриламидном геле на приборе Mini Protean III (Bio-Rad, США). В качестве стандарта использовали смесь маркерных белков Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas, Литва) с диапазоном молекулярных масс 11 – 250 кДа. Гель окрашивали красителем Кумасси бриллиантовым голубым R-250.

2.8.2 Определение изоэлектрической точки

Изоэлектрофокусирование в полиакриламидном геле проводили с использованием Ampholyte 3/5 (Bio-Rad, CIIIA) на установке Mini IEF Cell (Bio-Rad, CIIIA). В качестве стандарта использовали смеси белков IEF kit low range (GE Helthcare, СIIIA) в диапазоне pI 2,8-6,5.

2.8.3 Определение количества углеводов в препаратах

Для определения количества углеводов в препаратах лакказ, фермент подвергали ферментативному дегликозилированию амидазой PNGase F. Препарат лакказы был предварительно денатурирован путем инкубации при 100 °C с додецилсульфатом натрия и 2-меркаптоэтанолом (1,86 % ДДС и 5 % 2-меркаптоэтанола) в течение 15 минут. Далее к препарату добавляли 0,5 мкл раствора PNGase F (на 50 мкл образца) и инкубировали в течение 1,5 часов. Полученные образцы анализировали методом ДДС-Nа-ПААГ электрофореза.

2.8.4 Регистрация спектров поглощения в ультрафиолетовой и видимой области и ЭПР-спектров

Оптический спектр лакказы регистрировали в диапазоне 200-800 нм в 1 см кварцевой термостатируемой кювете при температуре 25 °C на спектрофотометре Lambda 25 (Perkin Elmer, США) в 20 мМ КФБ, рН 6,5. Концентрация белка составляла 2 мг/мл.

ЭПР-спектры регистрировали на спектрометре Bruker EMX 8.7/2 (Германия) при частоте 9,4 Гц и температуре 77 К. Образцы лакказ (10 мг/мл в 50 мМ КФБ рН 6,5)

помещались в кварцевый капилляр, и ЭПР-спектры регистрировали при 2 мВт и амплитуде модуляции – 5 Γ с.

2.8.5 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Температура плавления T_M лакказ была определена методом дифференциальной сканирующей калориметрии с использованием микрокалориметра Nano Differential Scanning Calorimeter (N-DSC III) (TA Instruments, США) при скорости нагрева 1 градус в минуту в диапазоне от 30 до 95 °C и избыточном давлении 3 атм. Образцы содержали 1,2 мг/мл лакказы в 20 мМ КФБ рН 6,5. Контрольная ячейка сравнения содержала тот же буферный раствор. Анализ данных производили с использованием программы Launch NanoAnalyze Software (TA Instruments, США).

2.8.6 Определение окислительно-востановительного потенциала

Качественное определение окислительно-восстановительного потенциала центра Т1 лакказ было проведено при помощи теста с азуром Б. Обесцвечивание азура Б проводили препаратами лакказ с концентрацией 0,1 мл/мл. Реакционный раствор состоял из 900 мкл 2%-ного азура Б, 100 мкл 10 мМ гидроксибензотриазола и 10 мкл лакказы с концентрацией 0,1 мг/мл. Время инкубации составляло 20 ч.

Окислительно-восстановительный потенциал центра T1 лакказ определяли методом окислительно-восстановительного титрования по методике, описанной в работе [81]. В качестве окислительно-восстановительной пары были использованы $Na_2(IrCl_6)$ и $K_4[Fe(CN)_6]$. Концентрация лакказы составляла 1 мг/мл. Титрование проводили в 0,1 М КФБ рН 6,5.

2.9 Измерение скоростей ферментативной реакции каталитического окисления различных субстратов с участием лакказ

Все исследуемые субстраты были растворены в 95,6%-ном этаноле (концентрация 10 мМ). Реакции проводили при 25 °C. Реакционная смесь содержала 1800 мкл 0,1 М ацетатного буфера рН 4,5, 200 мкл раствора субстрата и 10 мкл раствора лакказы с концентрацией 0,1 мг/мл. Регистрацию спектров оптического поглощения проводили в ультрафиолетовой и видимой области в диапазоне 230-700 нм до добавления раствора лакказы и каждые 70 с в течение 12 мин после добавления раствора лакказы, используя

спектрофотометр Lambda 35 (Perkin Elmer, США). Для *n*-кумаровой кислоты, *o*-кумаровой кислоты, м-кумаровой кислоты, 3,4-дигидроксибензойной кислоты, кофейной кислоты, сиреневой кислоты, ванилиновой кислоты, гидрохинона, ванилина, метоксибензойной кислоты, синаповой кислоты, феруловой кислоты, конго красного, индигокармина, фенолового красного и бромкрезолового зеленого регистрацию скорости реакции проводили по скорости расходования субстрата. Для орцинола, эвгенола, 2,5ксилидина, пирокатехина, 2,-6-диметоксифенола, гваякола, сирингалдазина и галловой кислоты регистрация скорости реакции проводили по скорости накопления продукта реакции. Молярные коэффициенты экстинкции при соответствующих длинах волн приведены в таблице 3. Для соединений, коэффициенты экстинкции которых были неизвестны, они были определены в данной работе. Для этого готовили серию разведений субстратов с концентрациями от 10 до 2000 мкМ в ацетатном буфере рН 4,5. По спектрам поглощения в диапазоне от 230 до 700 нм определяли величину поглощения при соответствующей длине волны, строили график зависимости поглощения концентрации раствора и рассчитывали молярный коэффициент экстинкции как тангенс угла наклона градуировочной кривой. Для продуктов реакции коэффициент экстинкци определяли аналогичным образом, но перед регистрацией спектров поглощения к раствору субстрата добавляли лакказу с концентрацией 0,1 мг/мл и проводили ферментативную реакцию до полной конверсии субстрата. За одну единицу активности принимали количество субстрата (в мкМ), превращенного ферментом с концентрацией 1 мг/мл за 1 минуту.

Таблица 3. Коэффициенты экстинкции и длины волн, при которых регистрировали скорость реакции. *-измерено в данной работе.

Субстрат	Длина волны, нм	Коэффициент экстинкции, М ⁻¹ см ⁻¹	Способ детекции	
Пирокатехин	410	740 [220]	Накопление продукта	
2,6-диметоксифенол	470	35645 [221]	Накопление продукта	
Синаповая кислота	306	14640*	Расходование субстрата	
Сирингалдазин	520	65000 [222]	Накопление продукта	
Гваякол	464	26600 [61]	Накопление продукта	
Феруловая кислота	314	12940*	Расходование субстрата	
Галловая кислота	385	4610 [222]	Накопление продукта	
АБТС	436	29500 [223]	Накопление продукта	
п-кумаровая кислота	290	15900*	Расходование субстрата	
о-кумаровая кислота	315	6580*	Расходование субстрата	
м-кумаровая кислота	272	13440*	Расходование субстрата	
кофейная кислота	315	12930*	Расходование субстрата	
3,4-дигидроксибензойная кислота	290	4740*	Расходование субстрата	
Сиреневая кислота	265	8060*	Расходование субстрата	
Ванилиновая кислота	289	4580*	Расходование субстрата	
Ванилин	309	9750*	Расходование субстрата	
2-амино-4- метоксибензойная кислота	318	3560*	Расходование субстрата	
Гидрохинон	289	2390*	Расходование субстрата	
Орцинол	341	840*	Накопление продукта	
Эвгенол	360	2300*	Накопление продукта	
2,5-ксилидин	540	1980*	Накопление продукта	
Конго красный	652	13700 [224]	Расходование субстрата	
Индигокармин	610	16365 [225]	Расходование субстрата	
Бромкрезоловый зеленый	620	12000 [226]	Расходование субстрата	
Феноловый красный	431	21240 [227]	Расходование субстрата	

2.10 Определение каталитических параметров окисления различных субстратов с участием лакказ

Кинетические параметры лакказ определяли по начальным скоростям реакции, которые измеряли спектрофотометрическим методом в цитратно-фосфатном буфере pH 4,5 с использованием спектрофотометра Lambda 35 (Perkin Elmer, США). Концентрации субстратов варьировались в диапазоне 0,05-10 мМ для пирокатехина, 0,005-1 мМ для 2,6-диметоксифенола, 0,05-1 мМ для галловой кислоты, 0,005-0,15 мМ для синаповой и феруловой кислот, 0,05-5 мМ для гваякола и 0,0021-0,042 мМ для сирингалдазина. Длины волн, при которых производили регистрацию скорости реакции, и соответствующие коэффициенты экстинкции приведены в таблице 3. Типично эксперимент проводили следующим образом. К 2 мл раствора субстрата добавлялось 10 мкл раствора фермента. Для каждой лакказы и каждого субстрата был установлен диапазон, в котором соблюдается линейная зависимость между концентрацией фермента скорости реакции. Соблюдение данной величиной начальной зависимости свидетельствует о том, что наблюдаемая начальная скорость реакции соответствует ферменативной скорости реакции. Рабочая концентрация фермента для каждого субстрата была выбрана из соответствующего диапазона.

Кинетические параметры (V_{max} и K_M) были определены по зависимостям начальных скоростей образования продуктов реакции (расходования субстрата) от концентрации субстратов в прямых координатах с использованием программы Origin-Lab (Northampton, США). Все измерения проводили в трех повторностях.

2.11 Определение рН и температурных оптимумов, термостабильности лакказ

Влияние рН на скорость ферментативного окисления различных субстратов изучали путем измерения активности ферментов в универсальной буферной смеси (рН 1,81–6,5). рН-оптимумы ферментативного окисления 2,6-диметоксифенола, галловой кислоты, феруловой кислоты и синаповой кислоты определяли при концентрации субстрата 1 мМ, рН-оптимум окисления пирокатехина и гваякола — при концентрации субстрата 10 мМ, рН-оптимум окисления сирингалдазина — при концентрации субстрата 0,42 мМ.

Температурные оптимумы лакказ изучали в диапазоне 25-80 °C в 0,1 М натрийацетатном буфере рН 4,5. Активность лакказы определяли, как описано в пункте «2.6 Определение лакказной активности» с использованием пирокатехина в качестве субстрата.

Термостабильность лакказ была изучена путем измерения остаточной активности фермента после инкубации при температурах 60 и 70 °C. Концентрация лакказы составляла 0,1 мг/мл в 50 мМ КФБ рН 6,5. Активность лакказы определяли, как описано в

пункте «2.6 Определение лакказной активности» с использованием пирокатехина в качестве субстрата.

2.12 Селективное удаление иона меди и реконструктция центра Т2 лакказы Coriolopsis caperata

Удаление иона меди из центра Т2 лакказы *С. сарегата* проводили по методике, описанной в работе [124]. Реакционная смесь (объемом 6 мл) содержала 0,13 мМ лакказы, 28 мМ аксорбиновой кислоты, 1 М гидрохлорида гуанидина и 1,2 мМ баскупроиндисульфоната натрия в 0,1 М натрий-ацетатном буфере рН 4,5. После инкубации в течение 40 мин при комнатной температуре реакционную смесь наносили на колонку с носителем Sephadex G-25 (2×55 см, Pharmacia, Швеция), уравновешенную 20 мМ КФБ рН 6,5. Элюированный раствор белка был сконцентрован методом ультрафильтрации с использованием мембран Vivaspin 20 (Sartorius, Герамния).

Реконструкцию препаратов лакказы C. caperata с удаленным ионом меди из центра T2 в растворе проводили с использованием хлорида меди (I) и сульфата меди (II). Раствор фермента с концентрацией 1 мг/мл в 50 мМ КФБ рН 6,5 инкубировали в насыщенном растворе CuCl и с 100 мМ-ном растворе $CuSO_4 \times 5H_2O$ при 25 °C от 20 мин (для CuCl) до 24 ч (для $CuSO_4 \times 5H_2O$). После инкубирования проводили измерение ферментативной активности как описано в пункте 2.6.

2.13 Кристаллизация лакказ

Кристаллы лакказ были получены методом диффузии паров в висячей капле. Был проведен поиск условий кристаллизации при двух температурах (4 и 20 °C) с использованием коммерческих наборов для кристаллизации фирмы «Hampton Research» (США): Crystal Screen Kit I, Crystal Screen Kit II, Crystal Screen Kit Lite и Crystal Screen Kit Index с последующей оптимизацией условий.

Для лакказы *A. faginea* (AfL) кристаллы в форме друз были получены при температуре 20 °C и использовании противораствора следующего состава: 0,2 М ацетат цинка, 0,1 М какодилат натрия, 18 % ПЭГ 8000, рН 6,5 (№45 из набора Crystal Screen Kit II, HR2-110). Капля состояла из равных объемов белка с концентрацией 12 мг/мл в 20 мМ калий-фосфатном буфере рН 6,5 и соответствующего раствора из набора для кристаллизации. Поиск условий кристаллизации, в которых вырастают одиночные кристаллы, пригодные для рентгенструктурного анализа, проводили, варьируя концентрацию ПЭГ 8000 от 10 % до 20 % с шагом 5 % и концентрацию ацетата цинка от

 $0,01~\mathrm{M}$ до $0,2~\mathrm{M}$ в растворе $0,1~\mathrm{M}$ какодилата натрия с pH 6,5. Оптимальный противораствор для кристаллизации содержал $0,01~\mathrm{M}$ ацетата цинка, $0,1~\mathrm{M}$ какодилата натрия pH 6,5 и 20~% ПЭГ 8000. Кристаллы вырастали в течение 10-14 суток при температуре $20~\mathrm{^oC}$. Они имели голубой цвет и форму прямоугольного параллелепипеда с размерами приблизительно $0,3~\mathrm{x}$ $0,2~\mathrm{x}$ $0,15~\mathrm{mM}$ (рисунок $12,~\mathrm{A}$).

Для лакказы *S. murashkinskyi* (SmL) одиночные кристаллы лакказы размером более 500 мкм выросли при температуре 24 °C и использовании противораствора следующего состава: 0,2 М сульфат аммония, 0,1 М Трис-HCl pH 8,5, 25 % ПЭГ 3350 (№69 из набора Crystal Screen Kit Index). В состав капли входил раствор белка с концентрацией 12 мг/мл в 5 мМ калий-фосфатном буфере pH 6,5 и противораствор в соотношении 1:1. Кристаллы вырастали в течение 5-7 суток при температуре 20 °C. Они имели голубой цвет и форму прямоугольного параллелепипеда с размерами приблизительно 0,2 х 0,2 х 0,5 мм (рисунок 12, Б).

Для нативной формы лакказы *С. сарегата* (CcL) не удалось получить кристаллы ни в одних из условий с использованием коммерческих наборов для кристаллизации. Варьирование буферной системы, концентрации белка и температуры также не дало положительных результатов. Была предпринята попытка получить кристаллы лакказы с удаленным ионом меди второго типа. Кристаллы в форме друз были получены с использованием противорастворов следующего состава: 0,2 М сульфат аммония, 15 % ПЭГ 8000 и 0,1 М НЕРЕЅ рН 7,5, 10 % ПЭГ 8000, 8 % этиленгликоль (№ 30 и № 37 из набора Crystal Screen Kit Lite). Поиск условий кристаллизации, в которых вырастают пригодные для рентгенструктурного анализа одиночные кристаллы, проводили, варьируя концентрацию ПЭГ от 13 % до 17 % с шагом 1% в растворе 0,1 М НЕРЕЅ с рН от 6,0 до 7,5. Оптимальный противораствор для кристаллизации СсL содержал 0,1 М НЕРЕЅ рН 6,0 и 17 % ПЭГ 8000. В состав капли входил раствор белка с концентрацией 24 мг/мл в 5 мМ калий-фосфатном буфере рН 6,5 и противораствор в соотношении 1:1. В этих условиях кристаллы росли 7-8 суток при температуре 20 °C. Они имели голубой цвет и форму параллелепипеда с размерами приблизительно 0,2 х 0,4 х 0,15 мм (рисунок 12, В).

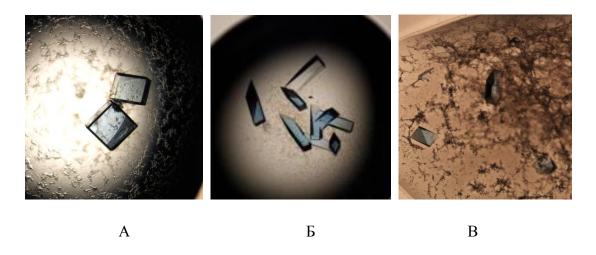


Рисунок 12. Кристаллы лакказ AfL (A), SmL (Б) и CcL (С).

2.14 Сбор дифракционных данных, решение и уточнение структур лакказ

Сбор данных от кристаллов SmL и CcL производили в EMBL (Гамбург) на синхротроне DESY (станция X13) с использованием детектора MAR CCD 165 мм. Для планирования экспериментов по сбору дифракционных данных на синхротроне DESY была использована программа BEST [228]. Для лакказы SmL было собрано два набора данных: первый набор с высоким разрешением и второй быстро снятый набор с низким разрешением, которые затем объединили. Сбор данных от кристаллов AfL и кристаллов комплексов CcL с CuCl (CcL+Cu⁺) и CuSO₄ (CcL+Cu²⁺) осуществлялся на станции K4.4 синхротрона НИЦ «Курчатовский институт» использованием детектора MAR CCD 165 мм. Наборы дифракционных данных собраны при температуре 100 К с использованием системы охлаждения фирмы Oxford instrument (Великобритания).

Перед съемкой кристаллы лакказ настаивали в течение 5-10 с в криопротекторном растворе, содержащем противораствор с добавлением 20 % (v/v) PEG 600. При получении комплексов CcL с ионами меди в различной степени окисления криопротекторный раствор содержал дополнительно CuCl (в концентрации насыщения) и CuSO₄ с концентрацией 100 мМ. В растворе, содержащем CuCl, кристалл настаивался в течение 10 минут, в растворе, содержащем CuSO₄, кристалл настаивался в течение 24 часов.

Кроме того, для изучения динамики изменений в строении активного центра лакказы в зависимости от поглощенной в процессе сбора данных дозы ионизирующего рентгеновского излучения (т.е. степени восстановления ионов меди активного центра фермента) на синхротроне DESY (станция X13) была собрана серия из 16-ти полных последовательных наборов дифракционных данных с одного кристалла с атомным разрешением. Первый набор данных, соответствующий минимальной дозе поглощенного

рентгеновского излучения, был собран таким образом, чтобы достичь разрешения 1,5 Å максимально быстро с условием, чтобы соотношение $I/\sigma(I)$ равнялось 3 для слоя с наивысшим разрешением. Для этого набора было собрано 103 изображения с углом поворота кристалла ($\Delta \varphi$) равным 0,75°. Все последующие наборы данных были собраны до разрешения 1,35 Å ($I/\sigma(I) \cong 5$ для слоя с наивысшим разрешением). Для каждого набора серии было собрано 100 изображений с $\Delta \varphi = 0,76$ ° за 30 минут. Перед сбором последнего (шестнадцатого) набора поток охлаждающего газа был отключен на 15 секунд.

Скорость поглощения образцом рентгеновского излучения была оценена как 0,4 кГр/мин с использованием программы RADDOSE [229]. Размеры пучка рентгеновского излучения составляли $0,3 \times 0,3$ мм², размер кристалла составлял $0,3 \times 0,15 \times 0,15$ мм³. Таким образом, весь кристалл был экспонирован пучку рентгеновского излучения в течение сбора данных. Поток рентгеновского излучения составлял примерно 2×10^{10} фотонов в секунду (в соответствии с измерениями, сделанными персоналом станции). Доза поглощенного кристаллом рентгеновского излучения в течение съемки одного набора данных составляла 12 кГр (начиная со второго набора). Общая доза поглощенного кристаллом рентгеновского излучения до перезаморозки (наборы данных 1-15) составляла 170 кГр. Эта оценка хорошо согласуется с тем, что изменения значений температурных факторов наборов не превышали 0,2 Ų (таблица 10).

Дифрацкионные данные обрабатывались с использованием программ XDS и XSCALE [230].

Решение структур лакказ проводили методом молекулярного замещения при помощи программы MOLREP [231]. В качестве стартовой модели для всех лакказ использовалась структура лакказы *T. hirsuta* (PDB код: 3FPX).

Структуры уточнялись с ипсользованием программы REFMAC5 [232]. Ручную правку модели проводили при помощи программы СООТ [233]. Визуальная корректировка основывалась на анализе карт электронной плотности разностного синтеза Фурье с коэффициентами ($2F_o - F_c$) и ($F_o - F_c$), где F_o , F_c – экспериментальные и рассчитанные модули структурных факторов. Все структуры (за исключением структуры SmL, определенной с разрешением 0,95 Å) уточняли в изотропном приближении для неводородных атомов. Для структуры SmL на заключительных стадиях уточнение проводили с учетом анизотропии тепловых движений неводородных атомов для надежно локализованных участков структуры.

Заселенности позиций ионов меди уточнялись в ручном режиме на заключительных этапах уточнения структур. Варьированием заселенностей ионов меди добивались исчезновения пиков на карте разностного синтеза электронной плотности при

условии примерного равенства атомных температурных факторов ионов меди значениям температурных факторов координирующих их атомов. Для структуры комплекса $CcL+Cu^+$ заселенности ионов меди в активном центре не уточнялись из-за недостаточно высокого качества дифракционных данных.

ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Штаммы базидиомицетов и оценка лигнолитического потенциала грибов Antrodiella faginea и Steccherinum murashkinskyi

Для всестороннего структурно-функционального исследования лакказ было выбрано четыре штамма грибов из Коллекции культур базидиомицетов Ботанического института В. Л. Комарова (LE-BIN). Коллекция культур базидиомицетов Ботанического института им. В. Л. Комарова является уникальной специализированной коллекцией базидиальных грибов. В лаборатории биохимии грибов Ботанического Института им. В. Л. Комарова РАН (г. Санкт-Петербург) проводится систематический поиск грибов из Коллекции, обладающих высоким лигнолитическим потенциалом. На основании данных, предоставленных сотрудниками лаборатории биохимии грибов, из Коллекции были выбраны четыре штамма базидиомицетов, обладавших высоким лигнолитическим потенциалом – Antrodiella faginea Vampola et Pouzar LE-BIN 1998 и Geest. Steccherinum murashkinskyi (Burt) Maas LE-BIN 1963, относящиеся малоизученному семейству Steccherinaceae, а также Coriolopsis caperata (Berk.) Murrill LE-BIN 0677 и Trametes hirsuta (Wulfen) Lloyd LE-BIN 072, относящихся к хорошо изученному семейству *Polyporaceae*. Для последних двух штаммов ранее было показано, что они являются эффективными продуцентами лакказ [234,235]. Также было показано, что лакказы грибов, относящихся к семействам Steccherinaceae и Polyporaceae, образуют различные клады на филогенетическом дереве, построенном по аминокислотным последовательностям данных лакказ [236], a процент сходства последовательностями лакказ этих семейств составляет не более 60 %, что позволяет предположить, что эти лакказы обладают различными свойствами.

Для базидиомицетов A. faginea и S. murashkinskyi была проведена качественная оценка лигнолитического потенциала с целью определить, являются ли эти штаммы эффективными продуцентами лакказ. C. caperata и T. hirsuta были выбраны в качестве контрольных штаммов. Результаты качественной оценки лигнолитического потенциала приведены в таблице 4.

Таблица 4. Активность лигнолитических ферментов исследуемых и контрольных штаммов грибов, определенная экспресс методом на 14-е сутки культивирования.

Вид	штамм LE-BIN	Гваякол	Сирингалдазин	Азур Б
Antrodiella faginea	1998	+++	+++	+
Steccherinum murashkinskyi	1963	+++	+++	±
Trametes hirsuta	072	+++	+++	++
Coriolopsis caperata	0677	+++	+++	+

В качестве субстрата для определения общей лигнолитической активности был использован гваякол [237]. Все исследованные в работе базидиомицеты демонстрировали высокую общую лигнолитическую активность, что подтверждает наличие у данных грибов секретируемых ферментов лигнолитического комплекса.

Для определения лакказной активности в качестве субстрата был использован сирингалдазин [238]. Все исследованные грибы обладали высокой лакказной активностью (+++).

Третьим субстратом для скрининга был выбран азур Б. Это тиазиновый краситель, который может окисляться с участием лигнин-пероксидаз или лакказ в присутствии редокс-медиаторов [239,240]. Основываясь на данных о том, что грибы белой гнили синтезируют соединения, способные выступать в роли редокс-медиаторов [241,242], можно предположить, что степень обесцвечивания азура Б будет зависеть как от наличия секретируемых лигнин-пероксидаз, так и лакказ. Скорость обесцвечивания азура Б штаммом *A. faginea* была сравнима со скоростью обесцвечивания азура Б штаммом *C. caperata. S. murashkinskyi* обесцвечивал азур Б лишь в незначительной степени.

По результатам оценки лигнолитического потенциала штаммов A. faginea и S. murashkinskyi можно заключить, что оба штамма являются перспективными продуцентами лакказ.

3.2 Глубинное культивирование грибов A. faginea и S. murashkinskyi

Было проведено глубинное культивирование выбранных штаммов на среде ГП с добавлением CuSO₄ в качестве индуктора биосинтеза лакказ. Было определено оптимальное время культивирования для получения максимальной продукции лакказ грибами *A. faginea* и *S. murashkinskyi*. Добавление в среду ионов меди увеличивало

продукцию лакказы более чем в два раза. Пик лакказной активности достигался на 16 сутки у *S. murashkinskyi* и на 18 сутки – у *A. faginea* (рисунок 13).

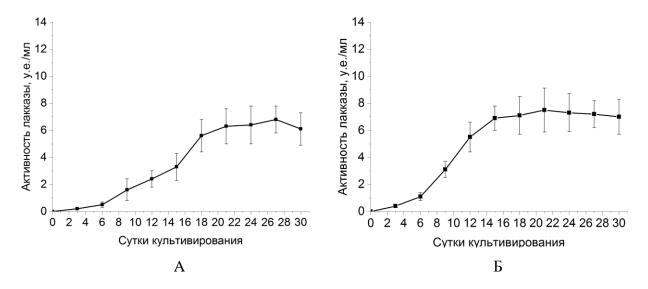


Рисунок 13. Динамика лакказной активности при жидкофазном глубинном культивировании *A. faginea* (A), *S. murashkinskyi* (Б).

Лакказная активность в культуральной жидкости изучаемых штаммов составляла 6-8 Ед/мл. При этом лакказная активность сохранялась примерно на одном и том же уровне вплоть до 30 суток культивирования, что отличает *A. faginea* и *S. murashkinskyi* от *T. hirsuta*, пик лакказной активности у которого приходится на 8 сутки культивирования, после чего лакказная активность падает [243]. Пик лакказной активности у *C. caperata* приходится на 10-12 сутки культивирования, как ранее было установлено в нашей лаборатории.

3.3 Очистка препаратов лакказ

Для получения чистых ферментных препаратов лакказ был использован протокол, ранее разработанный для лакказы *Т. hirsuta* [218] с дополнительной стадией гельфильтрации. Гомогенность полученных фракций лакказы была подтверждена ДДС-Nа-ПААГ электрофорезом и изоэлектрофокусированием (рисунок 14). Данные по очистке препаратов лакказ приведены в таблице 5. Как видно из приведенных данных, выход гомогенных препаратов лакказ составлял от 14 до 33% от общей активности фермента в культуральной жидкости, а удельная активность увеличилась в 70-90 раз.

Идентификацию ферментных препаратов проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-MS) на основании анализа спектров фрагментации полученных пептидов. Все четыре препарата лакказ были идентифицированы как лакказы соответствующих грибов: laccase A из

T. hirsuta (AIZ72721.1), laccase 2 из C. caperata (AGE13770.1), laccase A из A. faginea (ALE66817.1) и laccase 2 из S. murashkinskyi (AFI41889).

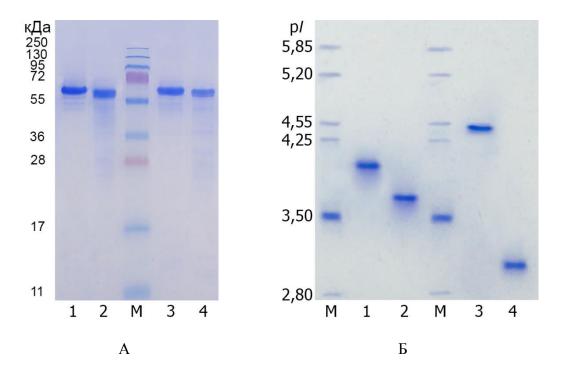


Рисунок 14. Электрофореграмма (A) и изоэлектрофокусирование (Б) очищенных препаратов лакказ. 1 - ThL, 2 - CcL, 3 - AfL, 4 - SmL, M - маркеры молекулярной массы.

Таким образом, в результате проведенной работы было получено четыре гомогенных препарата лакказ из грибов *A. faginea* (AfL), *S. murashkinskyi* (SmL), *T. hirsuta* (ThL) и *C. caperata* (CcL).

Таблица 5. Очистка лакказ исследуемых грибов

Стадии очистки	Выход, %			Степень очистки				
	AfL	SmL	CcL	ThL	AfL	SmL	CcL	ThL
Культуральная жидкость	100	100	100	100	1,0	1,0	1,0	1,0
Осаждение сульфатом аммония	89	95	91	93	9,0	9,6	9,1	8,4
Ионообменная хроматография на носителе ДЭАЭ-целлюлоза	66	89	80	85	17,5	17,2	14,9	12,7
Ионообменная хроматография на носителе ДЭАЭ -Toyopearl	35	54	31	80	40,9	86,2	42,7	43,8
Гельпроникающая хроматография на носителе Superdex-75	26	33	20	42	78	90,5	47,2	57,2
Ионообменная хроматография на носителе ДЭАЭ -Toyopearl	-	-	14	17	-	-	70,3	84,6

3.4 Определение окислительно-восстановительных потенциалов центра Т1 лакказ из A. faginea и S. murashkinskyi

Для приблизительной оценки ОВП центра Т1 лакказ был проведен тест с использованием азура Б и ГБТ в качестве медиатора. Две лакказы с известным потенциалом — ThL и CcL ($E^0_{T1} = 780 \,\mathrm{mB}$ [82,235]) были использованы в качестве контрольных образцов. Обе лакказы, AfL и SmL, катализировали окисляление азура Б в присутствии ГБТ значительно медленнее, чем контрольные лакказы с высоким ОВП (рисунок 15). Азур Б был полностью обесцвечен за 20 часов только контрольным образцами, на основании чего было сделано предположение, что ОВП центра Т1 лакказ AfL и SmL ниже ОВП контрольных образцов (780 мВ).

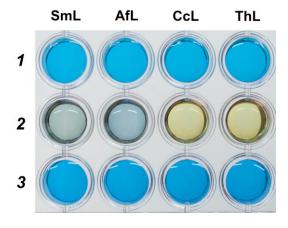


Рисунок 15. Обесцвечивание красителя азур Б лакказами в присутствии ГБТ за 20 часов. $1 - \text{Азур } \text{Б}, 2 - \text{Азур } \text{Б} + \Gamma \text{БТ} + \text{фермент}, 3 - \text{Азур } \text{Б} + \Gamma \text{БТ}.$

Точное значение ОВП центра Т1 для AfL и SmL было определено методом потенциометрического титрования с использованием окислительно-восстановительной пары Na₂(IrCl₆)/K₄[Fe(CN)₆] [81]. Кривые титрования приведены на рисунке 16. Для AfL значение ОВП центра Т1 составило 620 мВ (отн. НВЭ), а для SmL – 650 мВ (отн. НВЭ). Таким образом, обе лакказы обладали средним ОВП. Данные теста с азуром Б совпали с результатами потенциометрического титрования, что подтверждает пригодность этой методики для оценки значения ОВП центра Т1 лакказ.

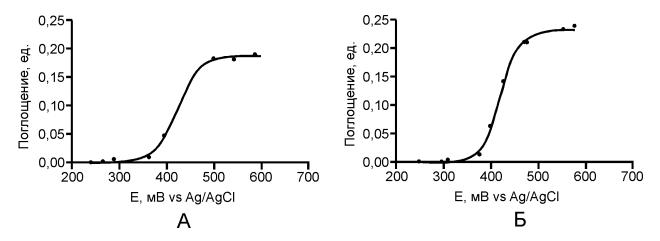


Рисунок 16. Кривые окислительно-восстановительного титрования AfL (A) и SmL (Б).

3.5 Спектральные характеристики лакказ

Обе лакказы, AfL и SmL, обладали типичным 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 340 нм соответствует поглощению пары ионов меди третьего типа (рисунок 17).

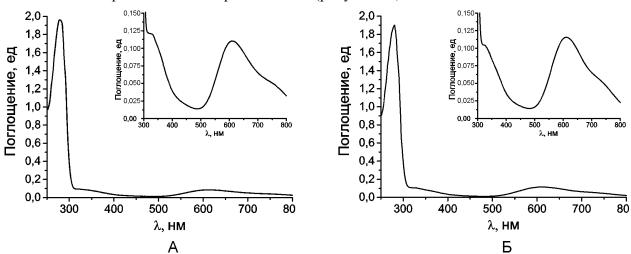


Рисунок 17. Спектры поглощения AfL (A) и SmL (Б) в УФ/видимом спектре.

Ион меди второго типа не детектируется в оптическом спектре, поэтому были записаны ЭПР-спектры полученных препаратов лакказ. ЭПР-спектры обеих лакказ содержали сигналы от ионов меди типа Т1 и Т2. ЭПР-спектры центров Т1 и Т2 были типичны для грибных лакказ (рисунок 18) [244]. Параметры сверхтонкой структуры медного центра Т1 для AfL и SmL были следующие: $g_{II} = 2,19$ и 2,19, $A_{II} = 90$ х 10^{-4} см $^{-1}$ и 91 х 10^{-4} см $^{-1}$, медного центра $T2 - g_{II} = 2,20$ и 2,24, $A_{II} = 190$ х 10^{-4} см $^{-1}$ и 185 х 10^{-4} см $^{-1}$.

Таким образом, полученные препараты лакказ содержали все три типа ионов меди в активном центре.

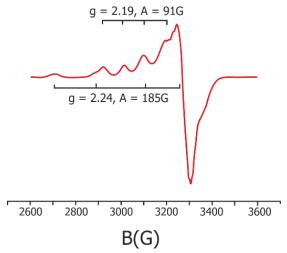


Рисунок 18. ЭПР-спектр лакказы из *S. murashkinskyi*.

3.6 Физико-химические свойства лакказ

Физико-химические характеристики лакказ AfL, SmL, CcL и ThL приведены в таблице 6. Молекулярные массы всех четырех лакказ были примерно одинаковыми – 63-65 кДа (рисунок 14, A). Подобные значения типичны для лакказ базидиомицетов [25]. Изоэлектрические точки всех лакказ находились в кислой области, причем наиболее кислой изоэлектрически точкой обладала лакказа SmL, а наименее кислой – AfL (таблица 6, рисунок 14, Б). Это также характерно для лакказ базидиомицетов, изоэлектрические точки которых обычно лежат в диапазоне 3 – 4,5 и очень редко превышают значение 6,0 [25]. Значения молекулярной массы и рІ для ThL совпали с определенными ранее значениями для этой лакказы [245]. Содержание сахаров было рассчитано, исходя из разницы между теоретической и экспериментальной массой белка. Теоретическая масса белков была рассчитана на основании их аминокислотной последовательности. Массовая доля сахаров в лакказах варьировалась от 10 до 17 %.

Таблица 6. Физико-химические характеристики исследуемых в работе лакказ.

Характеристики	AfL	SmL	CcL	ThL	
М _г , кДа	65	63	63	66	
p <i>I</i>	4,6	3,0	3,5	4,0	
Содержание сахаров, % (w/w)	17	10	16	12	
E^{o}_{T1} , мВ (отн. НВЭ)	620	650	780 [82]	780 [235]	
Температурный оптимум, °С	70	60	55	55	
т _{1/2} (60°С), мин	640	890	200	20	
т _{1/2} (70°С), мин	70	180	9,5	<1	
T _M , °C	79,1	83,7	77,0	69,4	
ΔH _{cal} , кДж/моль	781,0	834,7	511,6	287,0	

Лакказы AfL и SmL обладали более высокими температурными оптимумами и значительно более высокой термостабильностью по сравнению с лакказами CcL и ThL. Наиболее высоким температурным оптимумом обладала лакказа AfL. Ее температурный оптимум составлял 70 °C (рисунок 19). Несколько ниже оказался температурный оптимум лакказы SmL – 60 °C, однако стоит отметить, что он более широкий по сравнению с другими лакказами (рисунок 19).

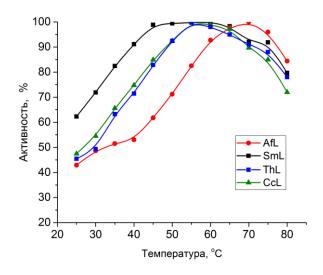


Рисунок 19. Зависимость активности лакказ AfL, SmL, CcL и ThL от температуры.

Наиболее высокой термостабильностью обладала лакказа SmL, время полуинактивации которой составляло 890 минут при 60 °C (таблица 6, рисунок 20, A). Лакказы единственного ранее охарактеризованного представителя рода Steccherinum – Steccherinum осhraceum – также обладали высокими температурными оптимумами (70-80 °C) и высокой термостабильностью (время полуинактивации при 60 °C – 5-6 часов) [246]. Можно предположить, что высокие значения температурного оптимума и термостабильности являются характерными для лакказ данного рода грибов. Наименее стабильной оказалась лакказа ThL, время полуинактивации которой при 60 °C составило лишь 20 мин (таблица 6, рисунок 20, A).

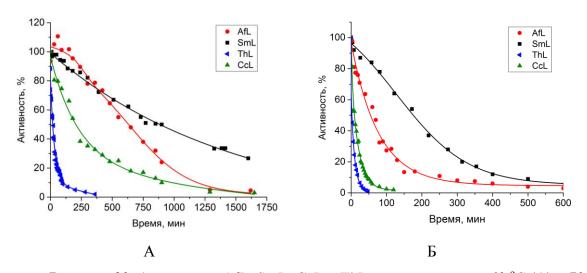


Рисунок 20. Активность AfL, SmL, CcL и ThL при температуре 60 °C (A) и 70 °C (Б).

Для изучения структурной стабильности и определения температуры плавления (T_M) исследуемых в работе лакказ был применен метод дифференциальной сканирующей калориметрии. Результаты анализа показали, что SmL денатурирует при более высокой температуре $(T_M = 83,7 \, ^{\circ}\text{C})$, нежели AfL $(T_M = 79,1 \, ^{\circ}\text{C})$. Для ThL и CcL значения T_M были еще ниже, составляя $69,4 \, ^{\circ}\text{C}$ и $77,0 \, ^{\circ}\text{C}$ (таблица 6, рисунок 21). Значения полученных температур плавления белковой глобулы коррелируют со значениями времен полуинактивации лакказ. Энтальпия денатурации AfL и SmL приблизительно равна и составляет 781,0 и 834,7 кДж/моль соответственно. Значения энтальпии денатурации ThL и CcL были примерно в 3 и в 2 раза ниже (таблица 6). ДСК-профили AfL и SmL содержат небольшой дополнительный пик в области более высоких температур (рисунок 21), что позволяет предположить наличие еще одного калориметрического домена у данных лакказ. Более высокая термостабильность AfL и SmL не может объясняться более высоким содержанием сахаров у 9 тих лакказ, поскольку содержание сахаров у SmL ниже,

чем у CcL и ThL. Подобная ситуация прежде наблюдалась и другими исследователями [56,57].

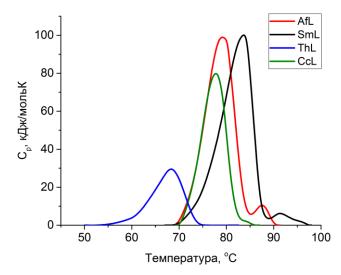


Рисунок 21. Термограммы лакказ AfL, SmL, CcL и ThL.

3.7 Каталитические свойства лакказ

Для оценки субстратной специфичности исследуемых лакказ было изучено окисление 20 монофенольных соединений и 4 красителей с различной структурой (рисунок 22). Скорости каталитического окисления лакками выбранных субстратов представлены на рисунке 22. Для более удобного сравнения скоростей ферментативного окисления лакказами различных субстратов на верхней панели рисунка 22 представлены значения активностей в логарифмической шкале. Для более удобного сравнения скоростей ферментативного окисления одного и того же субстрата разными лакказами на нижней панели рисунка 22 представлены стандартизованные оценки (Z-score) значений скоростей окисления для каждого субстрата: Z = (V-Vcp)/S, где V – скорость реакции, Vcp – средняя скорость реакции, S – стандартное отклонение. Обозначения заместителей в фенольном кольце (R_X) у исследуемых соединений представлены в нижней части рисунка.

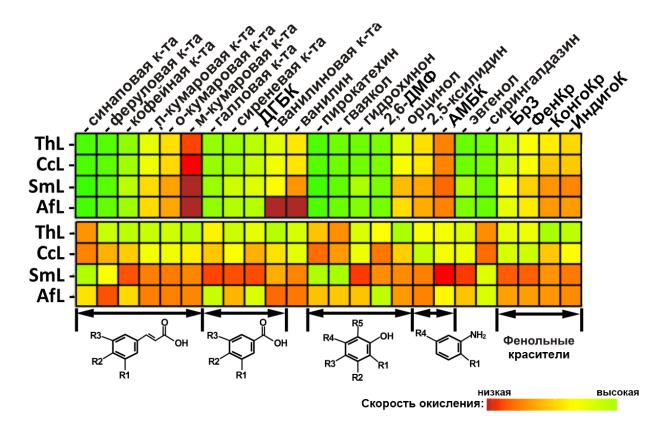


Рисунок 22. Графическое представление скоростей каталитического окисления лакказами различных фенольных субстратов. Цветовая окраска соответствует стандартизованной оценке значений скоростей для каждого субстрата: Z = (V-Vcp)/S, где V- скорость реакции, Vcp- средняя скорость реакции, S- стандартное отклонение. 2,6-ДМФ - 2,6-диметоксифенол, ДГБК - 2,3-дигидроксибензойная кислота, АМБК - 2-амино-4-метоксибензойная кислота, Бр3 - бромкрезоловый зеленый, ФенКр - феноловый красный, КонгоКр - конго красный, ИндигоК - индигокармин.

Представление значений скоростей окисления в логарифмической шкале (рисунок 22, верхняя панель) позволяет выявить некоторые общие тенденции в отношении возможности катализа окисления исследуемыми четырьмя лакказами различных субстратов.

Для производных коричной кислоты скорость окисления убывает в ряду синаповая кислота ($R_2 = OH$, $R_{1,3} = OCH_3$) > феруловая кислота ($R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$) > кофейная кислота ($R_{1,2} = OH$, $R_3 = H$) > изомеры кумаровой кислоты ($R_2 = OH$, $R_{1,3} = H$). Среди производных бензойной кислоты скорость окисления убывает в ряду галловая кислота ($R_{1,2,3} = OH$) > сиреневая кислота ($R_2 = OH$, $R_{1,3} = OCH_3$) > 3,4-дигидроксибензойная кислота ($R_{1,2} = OH$, $R_3 = H$) > ванильная кислота ($R_1 = OCH_3$, $R_2 = OH$, $R_3 = H$). Скорость окисления ароматического альдегида ванилина ниже, чем скорость окисления ванильной кислоты.

В целом, окисление производных бензойной кислоты медленнее катализируется лакказами, чем окисление производных коричной кислоты с такими же заместителями.

Интересно, что в случае производных бензойной кислоты метоксильный заместитель оказывает меньшее влияние на скорость окисления, нежели гидроксильный заместитель, тогда как для производных коричной кислоты наблюдается противоположная тенденция.

В случае производных фенола присутствие гидроксильного заместителя в *орто*-положении (пирокатехин, R_1 = OH, $R_{2,3,4,5}$ = H) сильнее увеличивает скорость окисления, чем присутствие метоксильного заместителя в *орто*-положении (гваякол, R_1 = OCH₃, $R_{2,3,4,5}$ = H) и гидроксильного заместителя в *пара*-положении (гидрохинон, R_3 = OH, $R_{1,2,4,5}$ = H). Наличие второй метоксильного заместителя в *орто*-положении (2,6-диметоксифенол, $R_{1,5}$ = OCH₃, $R_{2,3,4}$ = H) не приводит к увлечению скорости окисления. Присутствие метильного заместителя одновременно с гидроксильным заместителем (орцинол, R_2 = OH, R_4 = CH₃, $R_{1,3,5}$ = H) значительно снижает положительный эффект от гидроксильного заместителя. Среди производных фенола ферментативное окисление орцинола в присуиситвии лакказ происходит медленнее всего.

Все четыре лакказы катализируют окисление соединений с амино-группой (2,5-ксилидин и 2-амино-4-метоксибензойная кислота) со значительно более низкой скоростью, нежели соединений с гидроксильной группой. Аналогичная тенденция наблюдается и для красителей. Все лакказы катализируют окисление конго красного и индигокармина, содержащих амино-группу и азот в индольном кольце, значительно медленнее, чем бромкрезолового зеленого и фенолового красного, содержащих гидроксильную группу в бензольном кольце.

Необходимо отметить, что все лакказы со значительно меньшей скоростью катализируют окисление соединений с потенциалом окисления выше 700 мВ (например, изомеры кумаровой кислоты, ванильной кислоты, ванилина, 2,5-ксилидина) [247–249]. Однако для соединений с потенциалом окисления ниже 700 мВ не было выявлено однозначной корреляции между значением потенциала окисления субстрата и скоростью его каталитического окисления лакказой. Например, кофейная кислота, потенциал окисления которой ниже, чем у синаповой и феруловой кислот [247], окисляется медленнее всеми четырьмя лакказами (рисунок 22). Более того, в случае красителей, индигокармин, имеющий более низкий потенциал, чем конго красный [250,251], окислялся всеми четырьмя лакказами с меньшей скоростью, чем другие красители (рисунок 22, верхняя панель).

Представление стандартизованных оценок (Z-score) значений скоростей окисления для каждого субстрата (рисунок 22, нижняя панель) позволяет выявить различия между лакказами с высоким и средним ОВП в отношении окисления различных субстратов.

Так же как более высокая скорость окисления субстратов не может полностью объясняться более низким потениалом окисления субстрата, более высокий ОВП лакказы также не всегда гарантирует более высокую скорость окисления. Такие субстраты, как сирингалдазин, синаповая кислота и гваякол значительно быстрее окислялись при катализе лакказами со средним ОВП – AfL и SmL – по сравнению с лакказами, обладающими высоким ОВП – CcL и ThL. Тем не менее, для субстратов с потенциалом окисления выше 700 мВ разница в скорости катализа между лакказами с высоким и со средним ОВП становится более очевидной. Лакказы с высоким ОВП (ThL и CcL) катализируют окисление субстратов с высоким потенциалом окисления (например, кумаровые кислоты, ванильную кислоту, ванилин, 2,5-ксилидин) с более высокой скоростью, нежели лакказы со средним ОВП.

Интересно, что и при окислении фенольных красителей разница между лакказами с высоким и средним ОВП более очевидна. ThL и CcL катализируют окисление всех четырех красителей с большей скоростью, чем AfL и SmL. В этом случае более высокий потенциал лакказ ThL и CcL играет определяющую роль. Сходные результаты были получены П. Майялой (Р. Maijala) и коллегами [252]. Лакказа из *T. hirsuta* эффективнее, чем лакказы со средним ОВП из *M. albomyces* and *T. arenaria*, катализировала окисление таких крупных фенольных субстратов как матарезинол и гидроксиматарезинол. Тем не менее, некоторые случаи не могут быть объяснены только разностью ОВП между лакказы и потенциалом окисления субстрата. Несмотря на более низкий чем у SmL ОВП, AfL катализирует с большей скоростью ферментативное окисление всех красителей, за исключением конго красного.

Таким образом, разность между ОВП лакказы и потенциалом окисления субстрата является определяющей для скорости окисления простых фенольных субстратов с потенциалом окисления выше 700 мВ и красителей. Во всех случаях лакказы ThL и CcL катализировали с большей скоростью окисление данных субстратов. Для простых фенольных субстратов потенциалом окисления ниже 700 мВ не выявлено очевидной зависимости между разностью потенциалов и скоростью окисления. По всей видимости, в этом случае на скорость окисления влияет не только разность потенциалов, но и особенности строения субстрат-связывающего кармана каждой лакказы.

Каталитические параметры ферментативного окисления были определены для семи субстратов (таблица 8). 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, ингибирующие рост грибов (пирокатехин, галловая кислота) [253].

Были изучены зависимости активности лакказ от pH для выбранных субстратов (рисунок 23, таблица 7). Все зависимости имели типичную для лакказ колоколообразную форму. Оптимальные значения pH для окисления лакказами различных соединений приведены в таблице 7. Для всех изученных субстратов оптимальные значения pH лежали в кислом диапазоне 3 – 5. Наиболее низкие значения оптимального pH были получены для 2,6-диметоксифенола.

Таблица 7. Оптимальные значения рН для катализа окисления различных соединений лакказами.

Субстрат	AfL	SmL	CcL	ThL
Гваякол	4,1	4,6	4,8	3,8
Феруловая кислота	4,5	4,8	4,6	4,2
2,6-диметоксифенол	3,2	3,5	3,5	3,5
Синаповая кислота	3,9	4,4	4,4	3,8
Пирокатехин	3,5	4,3	4,9	4,5
Галловая кислота	3,6	4,1	4,1	4,0
Сирингалдазин	4,0	4,6	4,5	4,7

Наиболее низкие значения рН-оптимумов были получены для лакказы AfL при окислении 2,6-диметоксифенола, пирокатехина, галловой кислоты и сирингалдазина. В целом же для разных лакказ оптимальные значения рН отличались не более, чем на одну единицу рН. Изучение рН-профилей окисления представленных в таблице 7 соединений позволило выбрать рН для определения каталитических констант — 4,5. При этом значении рН все субстраты находятся в протонированном состоянии, а активность фермента близка к максимальной.

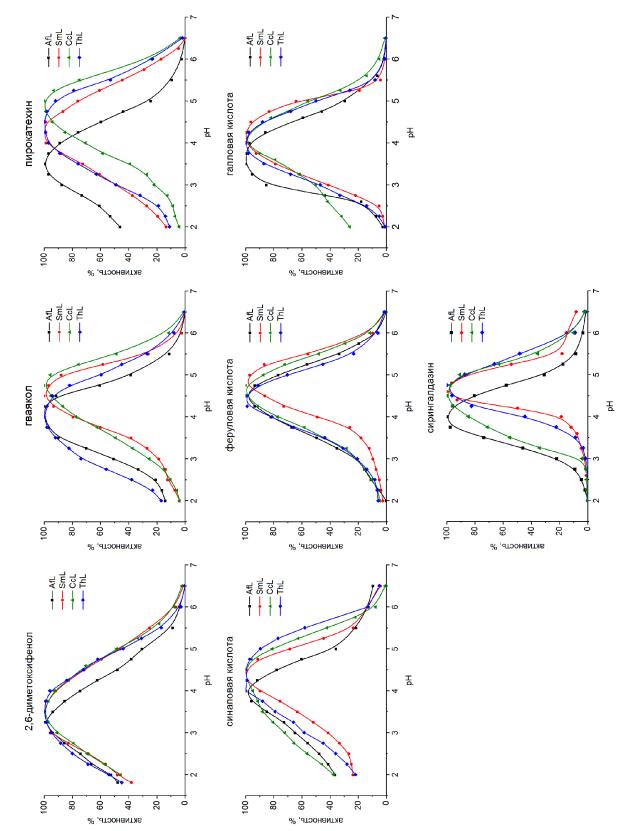


Рисунок 23. рН-зависимости активности лакказ AfL, SmL, CcL и ThL для различных субстратов.

Каталитические параметры окисления были определены для выбранных семи модельных субстратов лакказ. Результаты приведены в таблице 8.

Таблица 8. Каталитические параметры окисления модельных субстратов лакказами.

Лакказа Субстрат		AfL	SmL	ThL	CcL
Пирокатехин _{он}	$V_{\text{max}}/K_{\text{M},} c^{-1}$	31±3	8±0,5	13±2	3±0,2
ОН	К _{м,} мкМ	76±8	381±21	183±16	815±65
Галловая кислота	$V_{\text{max}}/K_{\text{M}},c^{\text{-}1}$	7±0,9	3±0,4	2±0,3	3±0,4
но он	$K_{M,}$ мк M	76±9	119±15	223±32	129±18
2,6-диметоксифенол он н₃со ↓ осн₃	$V_{\text{max}}/K_{\text{M},}c^{\text{-}1}$	105±11	57±4	42±5	15±2
H ₃ CO OCH ₃	$K_{M,}$ мк M	10±1	17±1	24±2	65±5
Синаповая кислота	$V_{\text{max}}/K_{\text{M},} c^{-1}$	532±90	376±35	151±23	194±15
	$K_{\mathrm{M,}}$ мк M	6±1	11±1	17±2	13±1
Сирингалдазин н₃со осн₃	$V_{\text{max}}/K_{\text{M},}c^{\text{-}1}$	1437±290	284±58	31±4	194±12
HO————————————————————————————————————	$K_{M,}$ мк M	1±0,2	5±1	34±4	5±0,3
Гваякол он осн₃	$V_{\text{max}}/K_{\text{M},}c^{\text{-}1}$	6±0,6	2±0,2	8±0,9	2±0,2
	К _{М,} мкМ	243±10	1076±50	173±15	696±50
Феруловая кислота н ₃ со он	$V_{\text{max}}/K_{\text{M}}$, c^{-1}	49±10	22±4	77±10	93±9
	$K_{M,}$ мк M	35±7	97±15	28±3	20±2

Наиболее простыми субстратами из выборки являются пирокатехин (два –ОН заместителя) и гваякол (–ОН и –ОСН₃ заместители). Все лакказы, кроме ThL, имели наименьшее сродство (наибольшее значение $K_{\rm M}$) к этим двум субстратам. Причем сродство к субстрату с метоксильной группой в *орто*-положении (гваяколу, соединение гваяцильного ряда) было ниже, нежели сродство к субстрату с гидроксильной группой в *орто*-положении (пирокатехину). Вторая метоксильная группа (2,6-диметоксифенол, соединение сирингильного ряда) приводит к значительному снижению константы Михаэлиса (повышению сродства) у всех лакказ. Введение –СН=СН—СООН группы

дополнительно к одной метоксильной группе (феруловая кислота) приводит к сильному снижению константы Михаэлиса у всех лакказ. Введение данной группы дополнительно к двум метоксильным группам (синаповая кислота) также приводит к снижению констант Михаэлиса у всех лакказ, но для CcL этот эффект наиболее выражен (K_M снижается в 5 раз). Сродство к галловой кислоте (три -ОН группы и -СООН группа) по сравнению с пирокатехином (две –OH группы) значительно выше у всех лакказ, кроме ThL. Наибольшее сродство все исследуемые лакказы, кроме ThL, проявляли к сирингалдазину - субстрату, имеющему в своем составе две сирингильные единицы. Интересно отметить, что у AfL необычайно низкое значение K_M для окисления сирингалдазина – 1 μ M. Ранее в литературе подобные низкие значения К_М для данного субстрата наблюдались только для изоформ лакказы из S. ochraceum – 2 µМ и 1,7 µМ [246]. Если сравнивать субстраты гваяцильного ряда (гваякол и феруловая кислота) и субстраты сирингильного ряда (2,6диметоксифенол, синаповая кислота, сирингалдазин), то во всех случаях все лакказы проявляли большее сродство к соединениям сирингильного ряда. Более высокое сродство лакказ к сирингильным субстратам по сравнению с гваяцильными было ранее описано в литературе [77,254,255]. Это может объясняться тем, что исследуемые в работе базидиомицеты предпочитают заселять древесину лиственных деревьев, в состав лигнина которой входит больше сирингильных единиц [253,256].

Во многом схожая ситуация наблюдается и в отношении эффективности катализа (V_{max}/K_M) , поскольку эффективность окисления в большей степени определялась значениями K_M , так как значения K_M варьируются в большем диапазоне, нежели значения V_{max} . На эффективность катализа также положительно влияет введение второй метоксильной группы, -CH=CH-COOH группы или их обеих в фенольное кольцо. С наибольшей эффективностью все лакказы, кроме ThL, катализируют окисление сирингалдазина. Однако появление двух дополнительных гидроксильной и карбоксильной групп отрицательно сказывается на эффективности окисления галловой кислоты по сравнению с пирокатехином. У всех лакказ, кроме CcL, эффективность окисления пирокатехина была выше, нежели галловой кислоты. Любопытно отметить, что с наименьшей эффективностью все лакказы, кроме ThL, катализировали окисление галловой кислоты и гваякола.

Если сравнивать исследуемые в работе лакказы между собой, то наибольшая эффективность окисления выбранных субстратов (за исключением гваякола и феруловой кислоты) наблюдалась для лакказы AfL. Это объясняется тем, что AfL обладает наибольшим сродством к выбранным субстратам – константы Михаэлиса были наиболее низкими у данной лакказы для всех субстратов, кроме феруловой кислоты и гваякола.

Также прослеживается более высокая эффективность окисления сирингильных субстратов (2,6-диметоксифенола, синаповой кислоты и сирингалдазина) в случае катализа лакказами AfL и SmL по сравнению с гваяцильными субстратами, окисление которых эффективнее всего катализирует лакказа ThL. Лакказа ThL среди всех четырех лакказ с наибольшей эффективностью катализировала окисление гваякола, обладающего наименьшей площадью полярной поверхности среди выбранных субстратов, а с наименьшей – галловой кислоты, обладающей наибольшей площадью полярной поверхности. Вероятно, эти эффекты связаны с отличиями в строении субстрат-связывающего кармана исследуемых лакказ.

Все изученные модельные соединения имели потенциал окисления ниже 700 мВ. Как и на предыдущем этапе исследования, не было выявлено корреляции между величиной ОВП центра Т1 лакказ и скоростью окисления субстратов. Аналогично, не было выявлено корреляции между ОВП центра Т1 лакказ и эффективностью катализа (V_{max}/K_M) . Например, лакказа AfL, обладающая самым низким потенциалом среди исследуемых лакказ, имеет наибольшую константу эффективности при окислении всех субстратов, кроме гваякола и феруловой кислоты, а для синаповой кислоты и сирингалдазина значения V_{max} у лакказ со средним ОВП (AfL и SmL) оказались выше, чем у лакказ с высоким ОВП (ThL и CcL). Это противоречит данным, полученным в работе Ф. Сью (F. Xu) [75], где была показана корреляция между разностью ОВП центра Т1 лакказ и субстратов и эффективностью катализа. Однако необходимо учесть, что большинство соединений, использованных в работе Ф. Сью, имели потенциал выше 700 мВ. Таким образом, подтверждается предположение о том, что для монофенольных соединений с ОВП ниже 700 мВ определяющей для скорости окисления является не только разность между ОВП центра Т1 лакказ и потенциалом окисления субстрата. Можно предположить, что эффективность катализа окисления монофенольных субстратов с потенциалом ниже 700 мВ зависит также от структуры субстрат-связывающего кармана лакказ.

Влияние строения субстрат-связывающего кармана на катализ лакказами окисления различных соединений ранее изучалось на примере лакказы *T. versicolor* [133,257,258]. Было показано, что аминокислотный остаток в позиции Asp206 может оказывать влияние на сродство лакказы к фенольному субстрату 2,6-диметоксифенолу [133]. Данный остаток консервативен среди лакказ базидиомицетов, однако у AfL в данной позиции находится остаток глутаминовой кислоты (см. раздел 3.8, таблица 16, рисунок 33), с чем может быть связано высокое сродство этой лакказы к фенольным субстратам (см. раздел 3.7.3). В другой работе [134] для лакказы *T. versicolor* была

показана важность наличия остатков Phe162 и Phe265 при окислении фенольных субстратов. У лакказы ThL аминокислотные остатки в субстрат-связывающем кармане практически полностью совпадают с лакказой *T. versicolor*, а у остальных лакказ в этой позиции находятся полярные или меньшие по размеру гидрофобные остатки (Val162 и Ser264 у CcL, Val164 и Asp266 у AfL, Ala164 и Ser268 у SmL). У лакказы ThL, имеющей в обеих позициях остатки фенилаланина, обнаруживается наименьшее среди исследованных лакказ сродство к галловой кислоте, которая обладает четырьмя полярными заместителями, и наибольшее сродство к гваяколу, у которого всего два заместителя, один из которых метоксильная группа.

3.8 Структура лакказ

3.8.1 Сравнение первичных структур лакказ из A. faginea, S. murashkinskyi и C. caperata

Нуклеотидные последовательности генов, кодирующих лакказы AfL, SmL и CcL, были получены в нашей лаборатории и депонированы в базу данных GenBank. В таблице 9 приведены характеристики аминокислотных последовательностей этих лакказ и их идентификаторы в базе данных GenBank. На рисунке 24 приведено выравнивание аминокислотных последовательностей лакказ AfL, SmL и CcL без учета сигнальных пептидов.

Анализ аминокислотных последовательностей лакказ позволил определить длину сигнальных пептидов и длину зрелых белков. Аминокислотная последовательность AfL имеет степень идентичности 82% с последовательностью laccase3 S. murashkinskyi (AFI41890.1). Со всеми остальными известными аминокислотными последовательностями из базы данных NCBI AfL имеет степень идентичности менее 68%. Аминокислотная последовательность SmL имеет наибольшую степень идентичности с лакказой гриба того же рода – S. ochraceum, она составляет 80% (3T6V A). Следующий ближайший гомолог для данной лакказы – laccase B гриба A. faginea (ALE66818.1), идентичность с этой последовательностью составляет 78%. Стоит отметить, что на данный момент в базе данных NCBI отсутствуют последовательности лакказ других базидиомицетов из этого последовательность CcLсемейства. Аминокислотная имеет высокую идентичности 90-93% с лакказами других грибов того же рода: C. gallica (AJV90967.1), C. trogii (CAC13040.1), базидиомицета РМ1 (C. trogii) (CAA78144.1) и Coriolopsis rigida (ADK13098.1).

Таблица 9. Характеристика аминокислотных последовательностей лакказ AfL, SmL и CcL.

Лакказа	Название гена	Длина аминокислотной последователь-	Длина сигнального пептида	Количество потенциальных сайтов гликозилирования	Идентификатор в базе данных GenBank
AfL	Laccase A	517	20	6	ALE66817.1
SmL	Laccase 2 546		19	6	AFI41889.1
CcL	Laccase 2	517	21	3	AGE13770.1

Аминокислотные последовательности всех лакказ 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 SmL) [100]. В областях L1-L4 находятся десять консервативных остатков гистидина и один остаток цистеина, координирующих ионы меди активного центра лакказ (отмечены на рисунке 24 зеленым, голубым и фиолетовым цветами в соответствии с типом ионов меди активного центра). Также при анализе аминокислотных последовательностей лакказ были выявлены четыре консервативных остатка цистеина, участвующих в образовании дисульфидных мостиков (выделены желтым цветом на рисунке 24).

При помощи программы Net-N-Glyc [259] были определены потенциальные сайты гликозилирования (мотив NXS/T, где X – любой аминокислотный остаток, кроме пролина). Лакказы AfL и SmL содержат по 6 потенциальных сайтов гликозилирования, CcL – три.

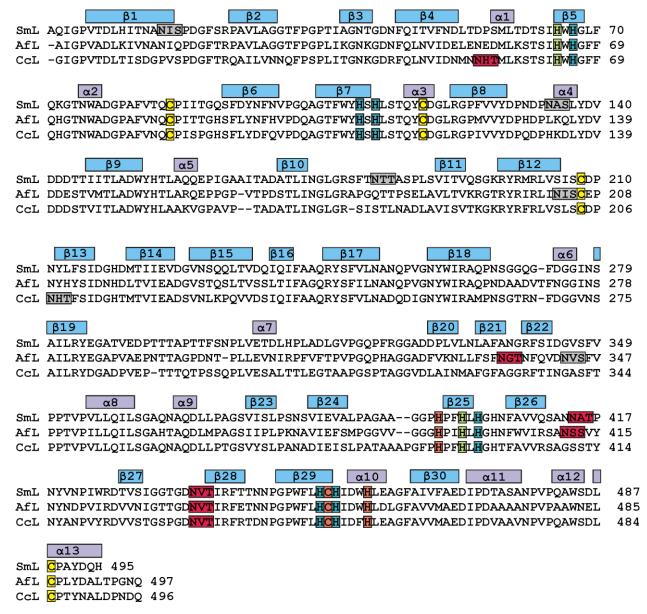


Рисунок 24. Выравнивание аминокислотных последовательностей лакказ AfL, SmL и CcL. Элементы вторичной структуры лакказ показано на примере SmL. βX - бета-цепь, αX - альфа-спираль, X - лиганды, координирующие Cu1, X - лиганды, координирующие Cu2, X - лиганды, координирующие Cu3. XXX - потенциальный сайт гликозилирования, XXX - занятый сайт гликозилирования. Аминокислотные последовательности приведены без учета сигнального пептида.

Таблица 10. Характеристики наборов дифракционных данных и структур лакказ. В скобках указаны значения для слоя с максимальным разрешением.

Структура	AfL	SmL	CcL	CcL+Cu ⁺	CcL+Cu ²⁺
Станция	«Белок»	X13	X13	«Белок»	«Белок»
PDB код	5EHF	5E9N	4JHU	4JHV	
Пространственная группа	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Параметры элементарной ячейки, Å,°	$a = 48,15,$ $b = 81,54,$ $c = 78,50,$ $\beta=104,75$	a=55,51, b= 83,27, c=111,04	a=62,78, b=84,91, c=116,95	a=62,90, b=84,42, c=116,12	a=62,31, b=84,18, c=115,70
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)
Общее число рефлексов	137773	981844	599320	124869	311109
Число уникальных рефлексов	52971	305838	80952	20881	68244
Полнота набора, %	89,4 (77,6)	94,9 (96,1)	97,4 (88,0)	98,2 (91,8)	96,8 (95,4)
Ι/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)
В-фактор, Å ²	18,3	6,9	17,3	25,3	18,6
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 [260]	0,11	0,02	0,08	0,12	0,09
Среднее квадратичное отклонение от идеальных значений: валентных связей, Å валентных углов, °	0,019 1,8	0,018 1,8	0,018 1,9	0,021 1,8	0,019 2,2
Число атомов:					
белок	3853	7082	3804	3798	3792
Cu	4	4	3	14	3
вода	419 70	730 102	569 149	341 67	473 140
другие атомы	70	102	177	07	140

$$*R_{meas} = rac{\displaystyle\sum_{hkl}\sqrt{rac{n_{hkl}}{n_{hkl}-1}}\sum_{j=1}^{n}\left|I_{hkl,j}-\left\langle I_{hkl}
ight
angle}
ight|}{\displaystyle\sum_{hkl}\sum_{j}I_{hkl,j}}$$
, где $I_{hkl,j}$ - интенсивность j -го рефлекса с

индексами hkl, $\langle I_{hkl} \rangle$ - средняя интенсивность рефлекса, and n_{hkl} - повторяемость рефлекса с индексами hkl [261].

3.8.2 Пространственная структура лакказ из A. faginea, S. murashkinskyi и C. caperata, а также комплексов лакказы C. caperata с хлоридом меди(I) и сульфатом меди(II)

Были определены с высоким разрешением структуры для нативных форм лакказ из A. faginea и S. murashkinskyi, структура лакказы C. caperata с удаленным ионом меди из центра T2 (T2D), структуры комплексов T2D лакказы C. caperata с хлоридом меди(I) (CcL +Cu⁺) и с сульфатом меди(II) (CcL + Cu²⁺). Статистические характеристики наборов дифракционных данных и уточненных моделей лакказ приведены в таблице 10. 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 CuSO4 разрешение практически не изменилось и составило 1,67 Å, а при настаивании в растворе CuCl – снизилось до 1,89 Å (таблица 10). Как и у всех ранее изученных грибных лакказ, у AfL, SmL и CcL молекула состоит из трех купредоксино-подобных доменов, образующих глобулу с размерами приблизительно 65 х 55 х 40 Å. Ход полипептидной цепи в виде ленточной модели для лакказ AfL (A), SmL (Б), CcL (В) и комплекса CcL+Cu⁺ (Г) показан на рисунке 25.

Моноядерный центр Т1 расположен в третьем домене на расстоянии 10-12 Å от поверхности глобулы, а трехядерный центр Т2/Т3 — между первым и третьим доменом. К Т2/Т3 центру от поверхности молекулы ведут два канала со стороны иона меди Сu2 и со стороны пары ионов меди Сu3. Оба канала можно проследить в структурах лакказ по цепям кислородных лигандов (молекул воды) внутри них (рисунок 25, показаны красными цилиндрами). По каналу Т3 молекулы кислорода могут проникать к паре ионов меди Сu3. По каналу Т2 вода или гидроксид-ионы могут проникнуть к иону меди Сu2.

Первый домен (1-129 остатки, здесь и далее нумерация приводится по структуре SmL, золотой цвет на рисунке 25) содержит в себе три α-спирали и два β-листа. Второй домен (130-313 остатки, голубой цвет на рисунке 25) состоит из 4 коротких α-спиралей и двух β-листов смешанного типа, состоящих из 6 и 5 β-слоев. Третий домен (314-495 остатки, зеленый цвет на рисунке 25) образован 6 α-спиралями и двумя β-листами, каждый из которых состоит из пяти параллельных и антипараллельных слоев. Вторичная структура всех трех лакказ практически совпадает. На рисунке 24 приведены элементы вторичной структуры лакказы SmL. У AfL β-цепи β21 и β22 короче на один аминокислотный остаток, спираль α13 короче на 2 аминокислотных остатка, а цепь β28 – длиннее на 2 аминокислотных остатка (рисунок 24). У СсL отсутствует спиральный элемент α5, цепи β24 и β28 длиннее на два аминокислотных остатка, а спирали α12 и α13 представляют собой единую спираль.

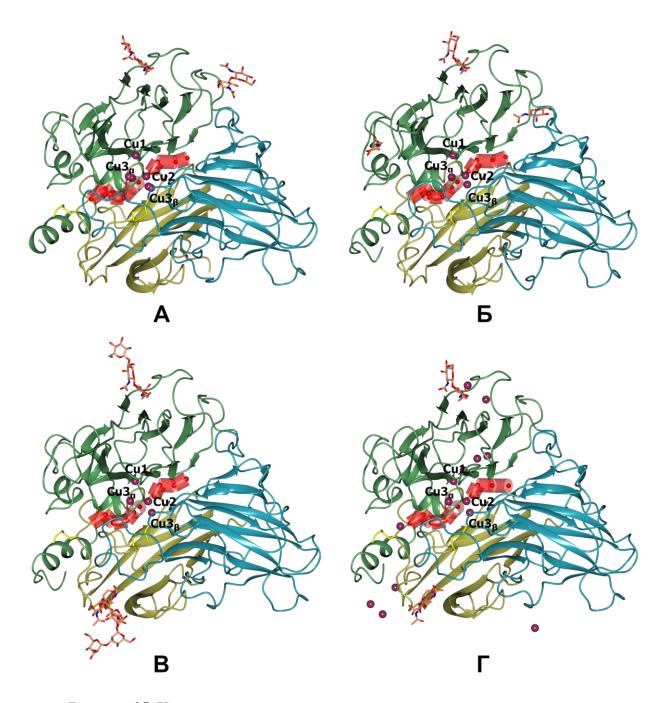


Рисунок 25. Ход полипептидной цепи, представленный моделью элементов вторичной структуры для лакказ SmL (A), AfL (Б), CcL (В) и комплекса CcL+Cu⁺(Γ). Первый домен показан золотым, второй – зеленым, третий – голубым цветом. Атомы меди показаны фиолетовыми сферами. Сахара показаны шаростержневыми моделями, атомы покрашены по типу (С – оранжевый, О – красный, N – синий). Дисульфидные мостики показаны желтым цветом. Заселенность иона меди Cu2 в структуре В равна 0,1, а в структуре Γ – 1,0.

Модель лакказы AfL содержит в себе 497 аминокислотных остатков, что полностью соответствует последовательности лакказы AfL, транслированной из нуклеотидной последовательности гена, кодирующего данную лакказу. С-концевые аминокислотные остатки в этой структуре надежно локализованы благодаря наличию водородных связей между атомами кислорода концевой карбоксильной группы, боковыми

цепями остатков Glu55 и Ser60 и атомом азота основной цепи остатка Ser60. Модель лакказы SmL содержит 495 аминокислотных остатков. В ней не удалось локализовать концевую карбоксильную группу. В структуре не локализованы 32 С-концевых аминокислотных остатка, которые есть в последовательности, транслированной с гена. Следует отметить, что локализованные в структуре С-концевые остатки имеют относительно большую подвижность (большие значения атомных температурных факторов), хотя эти остатки и включены в α-спираль. Модель лакказы CcL содержит в себе 496 аминокислотных остатков, что, как и в случае лакказы AfL, соответствует длине аминокислотной последовательности, транслированной с гена, кодирующего данную лакказу. Подобно лакказе AfL, С-концевая карбоксильная группа стабилизирована водородными связями с остатками His55, Lys59 и Ser 60.

Ход полипептидной цепи у всех изученных лакказ очень схож, значения среднеквадратичного отклонения при совмещении структур по координатам соответствующих $C\alpha$ -атомов составляют 0,56-0,75 Å (таблица 11). Структуры лакказы CcL и ее комплекса с $CuSO_4$ практически идентичны (поэтому структура $CcL+Cu^{2+}$ не помещена в банк данных). Значение среднеквадратичного отклонения по координатам соответствующих $C\alpha$ -атомов для лакказы CcL и ее комплекса $CcL+Cu^+$ составляет 0,24, а для комплекса с $Cu^{2+}-0,18$.

Таблица 11. Значения среднеквадратичного отклонения при совмещении структур лакказ по координатам соответствующих Сα-атомов, Å.

Структура	AfL	SmL	CcL	ThL
AfL	0	0,72	0,74	0,69
SmL	0,72	0	0,75	0,72
CcL	0,74	0,75	0	0,56
ThL	0,69	0,72	0,56	0

Совмещение структур исследуемых лакказ представлено на рисунке 26. 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.

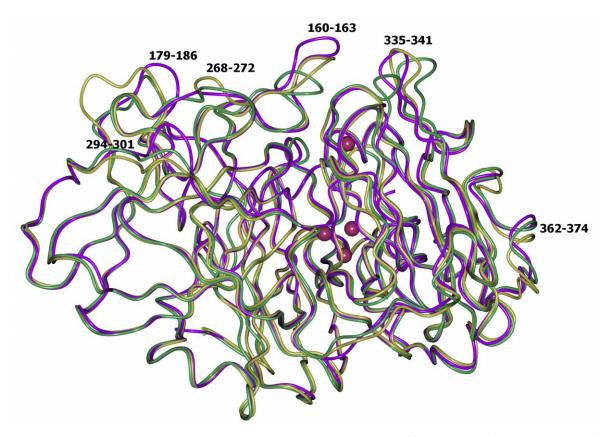


Рисунок 26. Наложение ленточных моделей SmL (фиолетовая), AfL (золотая) и CcL (зеленая).

В структуре лакказ имеется два дисульфидных мостика. Один из них, образованный остатками Cys118 и Cys208, расположен в первом домене, а второй, образованный остатками Cys86 и Cys488, соединяет первый домен и α-спираль из третьего домена (рисунок 25, показаны ярко-желтым цветом).

При анализе аминокислотной последовательности исследуемых лакказ были выявлены потенциальные сайты гликозилирования (см. раздел 3.8.1, таблица 11). Анализ пространственных структур позволил выявить те из них, в которых действительно происходит гликозилирование остатков аспарагина. У всех трех лакказ имеется одинаковый сайт гликозилирования при Asn433. Сайт гликозилирования при Asn433 является консервативным среди лакказ базидиомицетов с известными структурами за исключением лакказы из *С. cinereus*. У лакказ AfL и SmL также есть еще один общий сайт гликозилирования — Asn411. Помимо лакказ SmL и AfL, сайт гликозилирования при Asn411 присутствует у лакказы *S. ochraceum* (PDB код 3T6W), относящегося к тому же семейству, что *S. murashkinskyi* и *A. faginea*. Помимо вышеназванных двух сайтов гликозилирования, у AfL присутствует также сайт гликозилирования при Asn335. Схематичное представление углеводных цепей при гликозилированных остатках аспарагина представлено в таблице 12.

Таблица 12. Углеводные цепи в лакказах AfL, SmL и CcL.

Лакказа	Углеводные цепи
	Asn335—NAG
AfL	Asn411—NAG
	Asn433— $(NAG)^{\beta(1\rightarrow 4)}(NAG)$
SmL	Asn414— $(NAG)^{\beta(1\rightarrow 4)}$ (NAG)
SIIL	Asn436— $(NAG)^{\beta(1\rightarrow 4)}$ (NAG)
CcL	Asn54 - NAG
	Asn433 $ \overline{\text{NAG}}^{\beta(1\rightarrow 4)}$ $\overline{\text{NAG}}^{\beta(1\rightarrow 4)}$ $\overline{\text{MAN}}$

Структура углеводных цепей во всех трех лакказах является типичной для лакказ базидиомицетов. Наиболее длинную цепь из шести звеньев удалось локализовать в структуре CcL при остатке Asn54 (рисунок 27). Данная цепь состоит из двух остатков N-ацетилглюкозамина и 4 остатков маннозы. Остатки N-ацетилглюкозамина и остаток β -D-маннозы соединены между собой связями $\beta(1\rightarrow 4)$. К атому О3 β -D-маннозы присоединен остаток α -D-маннозы, а к атому О6 присоединены два остатка α -D-маннозы (связями $\alpha(1\rightarrow 3)$).

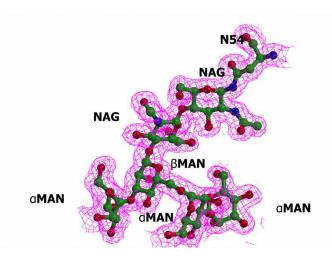


Рисунок 27. Разветвленная цепь сахаров, связанных с остатком Asn54, в структуре CcL. Показана электронная плотность $(2F_0$ - F_c , 1σ).

В структуре комплекса $CcL+Cu^{2+}$ гликозилирование в точности совпадает со структурой CcL. В структуре комплекса $CcL+Cu^{+}$ на картах электронной плотности локализованы только остатки N-ацетилглюкозамина и один остаток β -D-маннозы в цепи при Asn54, что может быть связано с ухудшением разрешения структуры в процессе

настаивания кристалла в растворе CuCl. В структурах AfL и SmL удалось локализовать только цепочки, состоящие из одного или двух остатков N-ацетилглюкозамина. Скорее всего, это связано с большей подвижностью углеводных цепей, из-за чего не удается локализовать более длинные цепи.

Модель активного центра лакказы SmL, решенной с разрешением 0,95 Å, приведена на рисунке 28. Активный центр лакказ состоит из двух частей: центр Т1, содержащий один ион меди Cu1, и T2/T3 центр, содержащий один ион меди Cu2 и два иона меди Cu3. В центре Т1 происходит окисление фенольных субстратов, а в Т2/Т3 центре происходит восстановление молекулярного кислорода до воды.

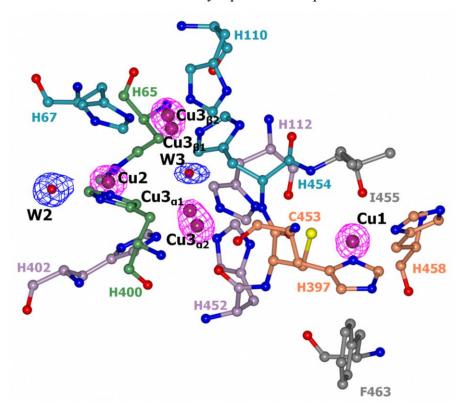


Рисунок 28. Шаростержневая модель активного центра лакказы SmL. Атомы показаны цветами, соответствующими их типу. Ионы меди показаны фиолетовым цветом, атомы кислорода — красным, атомы азота — синим. Атомы углерода остатков гистидина, координирующих ионы меди Cu1, Cu2, Cu3 $_{\alpha}$ и Cu3 $_{\beta}$, показаны коралловым, зеленым, лиловым и голубым цветами соответственно. Атомы углерода некоординирующих аминокислотных остатков из первой координационной сферы иона меди Cu1 показаны серым цветом. Карта электронной плотности $2F_{o}$ - F_{c} показана розовым цветом для атомов меди (на уровне 5σ) и синим цветом для кислородных лигандов (на уровне 1σ).

Строение центра Т1 показано на рисунке 29. Ион меди Сu1 в центре Т1 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 Пе (строго консервативен среди лакказ) и Phe. Строение активного центра Т1

одинаково у всех трех изученных лакказ. На рисунке 29 представлено строение активного центра Т1 на примере лакказ SmL и AfL. Интересно отметить, что положение боковой цепи Phe461 у AfL немного отличается от лакказ SmL, CcL и всех остальных лакказ с известными пространственными структурами, содержащими в данной позиции остаток Phe. Координирующие медь остатки и два вышеупомянутых остатка Пе и Phe образуют первую координационную сферу иона меди Cu1.

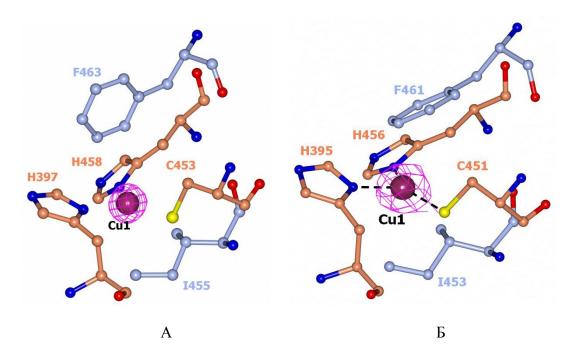


Рисунок 29. Строение активного центра T1 лакказы SmL (A) и AfL (Б). Атомы показаны цветами, соответствующими типу атомов. Ионы меди показаны фиолетовым цветом, атомы кислорода – красным, атомы азота – синим. Атомы углерода остатков гистидина и цистеина, координирующих ионы меди Cu1, показаны коралловым цветом, а двух некоординирующих остатков – светло-голубым цветом. Карта электронной плотности $2F_0$ - F_c показана розовым цветом для атомов меди (на уровне 5σ).

Структуры T2/T3 центров лакказ SmL, AfL, CcL и комплекса CcL+Cu $^+$ показаны на рисунке 30, межатомные расстояния в активных центрах приведены в таблице 13. Следует отметить, что структура комплекса CcL+Cu $^{2+}$ практически совпадает со структурой CcL, поэтому она не приведена на рисунке 30.

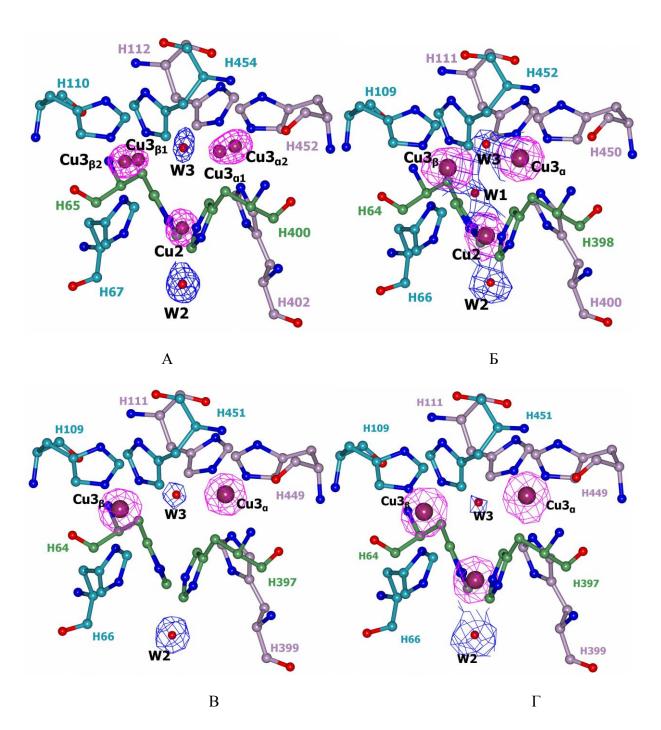


Рисунок 30. Строение T2/T3 центров лакказ SmL (A), AfL (Б), CcL (В) и комплекса CcL+Cu⁺ (Г). Атомы показаны цветами, соответствующими их типу. Ионы меди показаны фиолетовым цветом, атомы кислорода – красным, атомы азота – синим. Атомы углерода остатков гистидина, координирующих ионы меди Cu2, Cu3 $_{\alpha}$ и Cu3 $_{\beta}$, показаны зеленым, лиловым и голубым цветами соответственно. Карта электронной плотности $2F_{o}$ - F_{c} показана розовым цветом для атомов меди (на уровне 5σ) и синим цветом для кислородных лигандов (на уровне 1σ).

Таблица 13. Межатомные расстояния в активных центрах лакказ.

Расстояние A-B, Å									
Атом А	Атом В	AfL	SmL	CcL	CcL+Cu ⁺	CcL+Cu ²⁺			
	ND1 H397	2,1	2,0	2,0	2,0	2,0			
Cu1	ND1 H458	2,1	2,0	2,0	2,0	2,0			
	SG C453	2,2	2,2	2,2	2,2	2,2			
	$Cu3_{\alpha 1}$	3,9	3,8	-	4,6	-			
	$Cu3_{\alpha 2}$	-	4,4	-	-	-			
	$Cu3_{\beta 1}$	3,8	3,8	-	4,1	-			
~ •	$Cu3_{\beta 2}$	-	4,1	-	-	-			
Cu2	NE2 H65	2,0	1,9	-	1,9	_			
	NE2 H400	2,0	1,9	-	1,9	_			
	W1	2,0	-	-	-	-			
	W2	2,2	2,5	-	2,5	-			
	Cu3 _{β1}	3,7	3,9	5,2	5,0	5,1			
	NE2 H112	2,1	2,2	2,0	2,0	2,0			
G 4	NE2 H402	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0			
$Cu3_{\alpha 1}$	NE2 H452	2,0	2,2	2,0	2,0	2,0			
	W1	2,7	-	-	-	-			
	W3	2,0	1,8	2,4	2,7	2,9			
	Cu3 _{β2}	-	5,3	-	-	-			
	NE2 H112	-	2,0	-	-	-			
$Cu3_{\alpha 2}$	NE2 H402	-	2,0	-	-	-			
Cu3 ₀₂	NE2 H452	-	1,9	-	-	-			
	W1	-		-	-	-			
	W3	- 2.1	2,5	-	-	-			
	ND1 H67	2,1	2,1	2,0	2,0	2,0			
~ 4	NE2 H110	2,1	2,1	2,0	2,0	2,0			
$\text{Cu}3_{\beta 1}$	NE2 H454	2,1	2,0	2,1	2,0	2,0			
	W1	1,9	2.2	-	- 2.4	-			
	W3	2,2	2,2	2,8	2,4	2,3			
	ND1 H67	-	2,0	-	-	-			
	NE2 H110	-	2,0	-	-	-			
$\text{Cu}3_{\beta 2}$	NE2 H454	-	2,1	-	-	-			
	W1	-	-	-	-	-			
	W3	-	2,9	-		_			

Трехядерный центр T2/T3 состоит из иона меди Cu2 и пары ионов меди Cu3. Ион меди Cu2 координирован атомами NE2 аминокислотных остатков His65 и His400. Ионы меди Cu3 координируются тремя атомами азота остатков гистидина. Следует отметить, что ионы меди Cu3 не идентичны, поскольку ион меди Cu3 $_{\alpha}$ координируется тремя атомами NE2 остатков гистидина His112, His 400 и His452, а в координации иона меди Cu3 $_{\beta}$ принимают участие два атома NE2 остатков His110 и His454 и атом ND1 остатка His67. Расстояния между ионами меди и координирующими их атомами азота остатков гистидина практически одинаковы (различия не превышают 0,2 Å). Основные отличия в T2/T3 центрах исследованных лакказ касаются количества кислородных лигандов, координации и заселенности ионов меди, а также положения ионов меди Cu3.

Совместный анализ четырех структур активных центров представляется затруднительным. Поэтому сначала будет проанализировано строение активных центров нативных лакказ SmL и AfL, содержащих в себе полный набор ионов меди. Положение ионов меди Cu2 и координирующих их остатков гистидина в обеих структурах практически совпадает. В структуре AfL ионы меди Cu3 имеют одно положение (заселенность q = 0.8). В структуре SmL было обнаружено два положения ионов меди Cu3 с различной заселенностью (Cu3 $_{\alpha 1}$ и Cu3 $_{\beta 1}$ – q = 0.2; Cu3 $_{\alpha 2}$ и Cu3 $_{\beta 2}$ – q = 0.7, таблица 14). Положение ионов меди Cu3 $_{\alpha 1}$ и Cu3 $_{\beta 1}$ в структуре SmL совпадает с положением ионов меди Cu3 в структуре AfL. Расстояние между ионами меди Cu3 $_{\alpha 1}$ и Cu3 $_{\beta 1}$ в структуре SmL составляет 3,9 Å и сравнимо с расстоянием между ионами меди Cu3 в структуре AfL – 3,7 Å. Расстояние между ионами меди Cu3 $_{\alpha 2}$ и Cu3 $_{\beta 2}$ в структуре SmL составляет 5,3 Å.

В обеих структурах имеются два одинаковых кислородных лиганда 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 структуре AfL в центре треугольника, образованного ионами меди T2/T3 центра.

Таблица 14. Заселенности и температурные факторы ионов меди активного центра лакказ.

_	AfL		S	SmL		CcL		CcL+Cu ⁺		$+Cu^{2+}$
_	q	B, A^2	q	B, $Å^2$	q	B, $Å^2$	q	B, A^2	q	B, A^2
Cu1	0,8	16,0	0,9	6,8	0,8	9,5	1,0	20,5	0,8	11,3
Cu2	0,8	15,0	0,8	6,5	0,1	16,1	1,0	19,8	-	-
$Cu3_{\alpha 1}$	0,8	14,6	0,2	6,6	0,8	10,7	1,0	19,1	0,8	11,5
$\text{Cu}3_{\alpha 2}$	0,8	16,1	0,7	6,9	0,8	9,6	1,0	17,5	0,8	10,7
$\text{Cu}3_{\beta 1}$	-		0,7	13,2	-	-	-	-	-	-
$Cu3_{\beta 2}$	-		0,3	16,4	-	-	-		_	

В структуре AfL ион меди Cu2 плоско координирован двумя атомами азота остатков гистидина и двумя кислородными лигандами (W1 и W2). В структуре SmL ион меди Cu2 линейно координирован двумя атомами азота остатков гистидина. Расстояние между ионом меди Cu2 и кислородным лигандом W2 в структуре SmL составляет 2,5 Å. Ион меди Cu2 в этой структуре не образует координационной связи с кислородным лигандом W2, а взаимодействие между ними имеет электростатическую природу (см. ниже, раздел 3.9). Координация ионов меди Cu3 в структуре AfL имеет геометрию тригональной бипирамиды. Лигандами для каждого из ионов меди Cu3 выступают три атома азота остатков гистидина и два кислородных лиганда (W1 и W3). В структуре SmL координация ионов меди Cu3 $_{\alpha 1}$ и Cu3 $_{\beta 1}$ тетраэдрическая, лигандами выступают три атома азота остатков гистидина и кислородный лиганд W3. В случае же ионов Cu3 $_{\alpha 2}$ и Cu3 $_{\beta 2}$ координация плоская, лигандами меди являются только атомы азота остатков гистидина, а расстояния между W3 и ионами меди слишком велики для координационных связей.

Вышеописанные различия являются следствием различных степеней окисления ионов меди в структурах AfL и SmL (см. раздел 3.9). Большое расстояние между ионами меди Cu3, их плоская координация и линейная координация иона меди Cu2 соответствуют восстановленному состоянию фермента. Короткое расстояние между ионами меди Си3, их тригональная бипирамидальная координация пятью лигандами (или тетраэдрическая координация четырьмя лигандами) и плоская координация иона меди Cu2 четырьмя лигандами соответствуют окисленному состоянию фермента. Таким образом, в структуре AfL наблюдается окисленное состояние T2/T3 центра, а в структуре SmL – смесь окисленного и восстановленного состояний Т2/Т3 центра. Окисленное состояние ионов меди наблюдается при низких дозах поглощенного кристаллом в ходе съемки рентгеновского излучения. При большой поглощенной дозе радиационного излучения возможно восстановление ионов меди (см. раздел 3.9, [116,152]). Различные наблюдаемые состояния окисления ионов меди T2/T3 центра в структурах SmL и AfL объясняются различными условиями сбора дифракционных данных. У синхротронов DESY и Сибирь-2 интенсивность излучения сильно отличается. Учитывая, что набор данных для кристалла SmL был собран с атомным разрешением 0,95 Å на синхротроне DESY, а набор данных для кристалла AfL был собран только с разрешением 1,75 Å на синхротроне Сибирь-2, можно заключить, что данные для SmL были собраны со значительно большей дозой поглощенного кристаллом рентгеновского излучения по сравнению с AfL. В случае AfL наблюдается окисленное состояние T2/T3 центра, поскольку кристалл AfL в ходе съемки получил меньшую дозу рентгеновского излучения, а для SmL наблюдалась смесь окисленного и восстановленного состояния Т2/Т3 центра, что соответствует большой дозе поглощенного кристаллом рентгеновского излучения. В структуре SmL в основном наблюдается восстановленное состояние T2/T3 центра. Заселенность ионов меди Cu3 в окисленном состоянии составила только q = 0,2, а лиганд W1 не был локализован. Лиганд W1 ранее наблюдался в структурах лакказ из *M. albomyces* [152], *L. tigrinus* [115], *T. hirsuta* [113], *S. ochraceum* [114], лакказы CueO и ее мутантной формы [116,262] и лакказы, клонированной из метагенома [116]. В случае лакказы из *M. albomyces*, *S. ochraceum*, лакказы CueO и ее мутантной формы, а также лакказы, клонированной из метагенома, лиганд W1 наблюдался в структурах, соответствующих низкой дозе поглощенного кристаллом рентгеновского излучения.

Сравнение структур СсL и комплекса СсL+Сu⁺ позволяет получить информацию о встраивании иона меди Cu2 в активный центр лакказы. Обработка кристалла T2D СсL хлоридом меди(I) привела к встраиванию иона меди Cu2. В то время как при обработке кристалла T2D СсL сульфатом меди(II) встраивания иона Cu2 в активный центр не происходило. Надо отметить, что в структурах СсL и комплекса СсL+Cu⁺ ионы меди Cu3 имеют одно положение (рисунок 30). Расстояние между ними равно около 5,0 Å. В Т2/Т3 центре не наблюдается лиганд W1. Координация ионов Cu3 плоская, а координация иона Cu2 линейная. Данные наблюдения позволяют заключить, что в случае структур СсL и комплекса CcL+Cu⁺ наблюдается восстановленное состояние фермента. Восстановленное состояние активного центра CcL может быть связано с тем, что сбор данных от кристалла СсL производился на синхротроне DESY (как и в случае SmL) и при этом кристалл поглотил значительную дозу рентгеновского излучения в ходе съемки. В случае комплекса CcL+Cu⁺ восстановление препарата могло произойти в результате добавления большого избытка хлорида меди(I) при обработке кристалла перед сбором данных.

В структуре CcL электронная плотность для иона меди Cu2 практически полностью отсутствует и заселенность позиции иона Cu2 равна 0,1, поскольку из лакказы CcL был селективно удален ион меди Cu2 перед кристаллизацией. Ранее обнаруженные в структурах лакказ *T. hirsuta* (PDB код 3PXL), *C. gallica* (PDB код 4A2D) [118], *B. aclada* (PDB код 3SQR) [87] различные положения боковой цепи остатка гистидина His397, координирующего ион меди Cu2, в структуре лакказы CcL не наблюдаются. В структуре комплекса CcL+Cu⁺ локализован ион меди в центре T2 и уточнен с полной заселенностью. Однако следует отметить, что обработка кристалла CcL хлоридом меди(I) привела к заметному ухудшению качества кристалла (разрешение ухудшается до 1,89 Å). Это не позволяет с уверенностью утверждать, что произошло полное встраивание иона Cu2. Тем не менее, из полученных данных следует, что при настаивании кристалла лакказы с удаленным ионом меди Cu2 в растворе CuCl происходит встраивание ионов меди в центр

Т2, в то время как при настаивании кристалла лакказы с удаленным ионом меди Cu2 в растворе CuSO₄ встраивания ионов меди в центр T2 не происходит. Заселенности и температурные факторы ионов меди активного центра приведены в таблице 14. В структуре комплекса CcL+Cu⁺ помимо ионов меди активного центра обнаружено 10 дополнительных атомов меди с частичной заселенностью, локализованных на поверхности глобулы в разных частях молекулы (рисунок 25). Дополнительные ионы меди координированы преимущественно остатками аспарагиновой кислоты, гистидина и глутаминовой кислоты. Эффективное связывание ионов меди в степени окисления +1 на поверхности белковой глобулы позволяет предположить, что эффективным приемом для получения тяжелоатомных производных может оказаться использование ионов металлов в непредельных степенях окисления.

К настоящему времени были предприняты попытки реконструкции в растворе лакказ с удаленным ионом меди Cu2 из растений, грибов и бактерий. Для грибных и растительных лакказ реконструкция препаратов с удаленным ионом меди Cu2 была показана только при обработке препаратов лакказ солями меди(I) в присутствии восстановливающего агента [122–124], тогда как для лакказы CotA из *B. subtilis* встраивание ионов меди происходит при обработке препаратов апо-фермента как солями меди(I), так и солями меди(II) [125,126], но эффективнее встраивание происходит при использовании солей меди(I) [125]. Встраивание ионов меди в активный центр в кристалле изучалось только для бактериальных лакказ. Во всех случаях не происходило полного восстановления заселенности иона меди в центре T2 [121,127].

Активность препарата CcL с удаленным ионом меди Cu2 восстанавливалась до 85% при обработке CuCl, в то время как при использовании CuSO₄ активность не восстанавливалась. Неполное восстановление активности CcL с удаленным ионом меди Cu2 при обработке препарата CuCl может быть связано с ингибирующим эффектом ионов хлора.

3.8.3 Сравнительный анализ строения окружения центра Т1 лакказ базидиомицетов и его влияние на окислительно-восстановительный потенциал иона меди Cu1

На рисунке 31 на примере лакказы SmL показано окружение иона меди Cu1. Ближайшее окружение иона меди Cu1 (первая координационная сфера) показано фиолетовым цветом. Голубым цветом показаны аминокислотные остатки, расположенные на расстоянии менее 12 Å от иона меди Cu1 (рисунок 31).

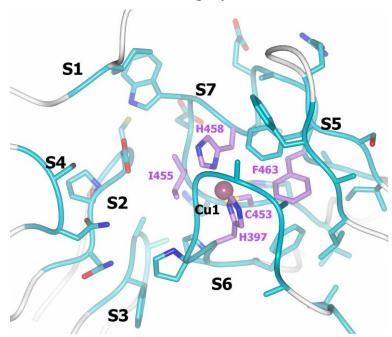


Рисунок 31. Окружение иона меди Cu1 на примере SmL. Первая координационная сфера иона меди Cu1 показана фиолетовым цветом. Голубым цветом показаны аминокислотные остатки, расположенные на расстоянии менее 12 Å от иона меди Cu1.

Как уже упоминалось выше, одной из важных характеристик лакказ является величина окислительно-восстановительного потенциала центра T1 (E^0_{T1}), от которой зависит эффективность катализа фермента. Величина E^0_{T1} в значительной степени определяется строением первой координационной сферы иона меди Cu1. У лакказ базидиомицетов вариабельным аминокислотным остатком из первой координационной сферы является Phe463. Однако связать тип и расположение боковой цепи остатка в этой позиции с величиной ОВП в нашем случае не удается. Так, у CcL, обладающей высоким ОВП, и у SmL и AfL, обладающих средним ОВП, в данной позиции находится остаток Phe. Таким образом, можно предположить, что отличия в ОВП лакказ обусловлены строением не только первой координационной сферы, но и строением петель, окружающих центр T1.

Таблица 15. Выравнивание участков аминокислотных последовательностей около центра Т1 лакказ. Остатки первой координационной сферы иона меди Cu1 (~5 Å) показаны фиолетовым цветом, остатки, расположенные на расстоянии ~12 Å от иона меди Cu1 – голубым цветом.

Номера а/к остатков	158-169	207-211	242-244	266-270	334-343 388-399		451-465	$E^{o}_{\ \mathrm{T1}}$, мВ
Участок	S1	S2	S 3	S4	S5 S6		S7	
3FPX: T.hir	KLGP- <mark>RFP</mark> GGAD	SCDPN	FAA	P <mark>NF</mark> G-N	FNFNG-S-NFFI	FP <mark>ATAAAPGAPH</mark> PF	LHCHIDFHLEGGFAV	790 [235]
1GYC: T.ver	RLGP- <mark>RFP</mark> LGAD	SCDPN	FAA	P <mark>NF</mark> G-T	FNFNG-T-NFFI	IPATALAPGAP <mark>H</mark> PF	LHCHIDFHLEAGFA I	780 [57,80]
2XYB: P.cin	KLGP- <mark>RFP</mark> FGSD	SCDPN	FAA	P <mark>AF</mark> G-N	FNFNG-T-NFFI	FPATANAPGFP <mark>H</mark> PF	LHCHIDFHLDAGFAV	810 [263]
4JHV: C.cap	KVGP- <mark>AVP</mark> -TAD	SCDPN	FAA	P <mark>NS</mark> G-T	FGFAG-G-RFTI	IPATAAAPGFP <mark>H</mark> PF	LHCHIDFHLEGGFAV	780 **
2HRH: T.tro	KVGS-PVP-TAD	SCDPN	FAA	P <mark>NS</mark> G-T	FGFAG-G-KFTI	IPATAAAPGFP <mark>H</mark> PF	LHCHIDFHLEAGFAV	760 [83]
4A2G: C.gal	KVGA- <mark>PVP</mark> -TAD	SCDPN	FAA	P <mark>NS</mark> G-T	FGFAG-G-NFTI	IPATAAAPGFP <mark>H</mark> PF	LHCHIDFHLEAGFAV	690-740 [*] [118]
1V10: R.lig	TVNPN <mark>KAPP</mark> APD	SCFPN	FAG	P <mark>SN</mark> G-R	IGRNATTADFTI	IPGGGNHPF	LHCHIDWHLEAGLAV	700 [88]
5E9N: S.mur	QQEPIGAA <mark>I</mark> TAD	SCDPN	FAA	P <mark>NS</mark> G-G	LAFAN-G-RFSI	LPAGAAGGPHPF	LHCHIDWHLEAGFA I	650**
5EHF: A.fag	RQEP-P <mark>GPV</mark> TPD	SCEPN	FAG	P <mark>ND</mark> AAD	FSFNG-T-NFQV	MPGGVVGGGHPI	LHCHIDWHLDLGFAV	620**
1HFU: C.cin	PSIQ <mark>GAA</mark> QPD	SCDPN	FTG	P <mark>NK</mark> GRN	LGFSG-G-RFTI	VPAGVLGGPHPF	FHCHIEFHLMNGLAI	550 [90]

 $[*]E^0_{T1}$ был определен при разных рН.

 $^{**}E^0_{T1}$ определен в настоящей работе.

К началу исследования были известны структуры всего двух лакказ с ОВП менее 730 мВ (таблица 15). Полученные в работе две новые структуры лакказ со средним ОВП позволили изучить влияние окружения иона меди Си1 на величину его ОВП. Были проанализированы все известные структуры лакказ, решенные с разрешением лучше 2 Å, для которых был определен ОВП центра Т1, а также достоверно определена аминокислотная последовательность белка: *T. hirsuta* (PDB код 3FPX), *T. versicolor* (PDB код 1GYC), *P. cinnabarinus* (PDB код 2XYB), *C. caperata* (PDB код 4JHV), *T. trogii* (PDB код 2HRH), *C. gallica* (PDB код 4A2G), *R. lignosus* (PDB код 1V10), *S. murashkinskyi* (PDB код 5E9N), *A. faginea* (PDB код 5EHF) и *C. cinereus* (PDB код 1HFU) (таблица 15).

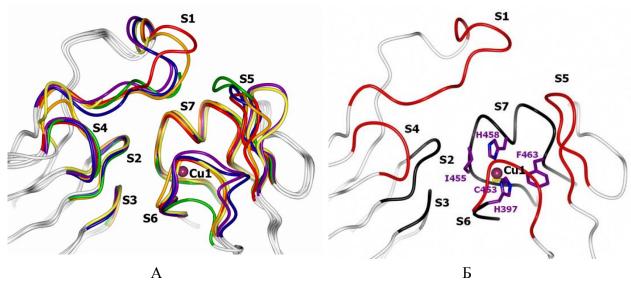


Рисунок 32. (А) Сравнение ленточных моделей структур шести лакказ с различным ходом полипептидной цепи в окрестности центра Т1. Тип I (синий цвет) — лакказа *T. hirsuta*, тип II (фиолетовый цвет) — лакказа *C. caperata*, тип III (зеленый цвет) — *R. lignosus*, тип IV (красный цвет) — лакказа *S. murashkinskyi*, тип V (оранжевый цвет) — лакказа *A. faginea*, тип VI (желтый цвет) — *C. cinereus*. (Б) Строение окружения иона меди Си1 на примере SmL. Первая координационная сфера иона меди Си1 показана фиолетовым цветом. Структурно-консервативные петли из окружения иона меди Си1 показаны черным цветом, а вариабельные — красным цветом.

Было проанализировано строение окружения иона меди Cu1 для всех 10 отобранных структур. Вторую координационную сферу иона меди Cu1 у этих лакказ формируют структурно консервативные петли S2, S3, спиральный сегмент S7 и Сконцевой участок петли S6, содержащие координирующие ион меди Cu1 остатки, а также вариабельные петли S1, S4, S5 и S6 (рисунок 32, таблица 15). Вариабельные петли из окружения T1 центра отличаются по своему пространственному расположению, длине и аминокислотному составу.

На основании анализа структур вариабельных петель вокруг центра Т1 можно выделить шесть типов лакказ (рисунок 32, A). 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 лакказа из *S. murashkinskyi* (PDB код 5E9N). К типам V и VI – лакказы из *A. faginea* (PDB код 5EHF) и *C. cinereus* (PDB код 1HFU).

Для оценки ОВП лакказ можно использовать величину доступности растворителю консервативных участков около центра Т1, а именно петель S2, S3, спирального сегмента S7 и С-концевого участка петли S6. Величина доступной растворителю поверхности консервативных участков второй координационной сферы иона меди Т1 коррелирует с величиной ОВП (рисунок 33). Следует отметить, что корреляция между доступностью растворителю консервативных участков около центра Т1 и значения ОВП достаточно высока, несмотря на то что использованные для анализа значения ОВП центра Т1 лакказ были измерены в разных условиях.

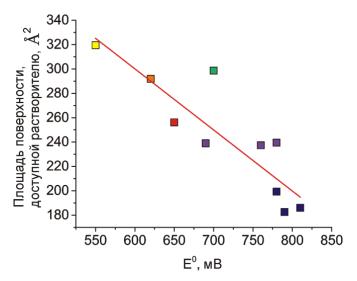


Рисунок 33. Зависимость между площадью доступной растворителю поверхности консервативных участков около центра T1 и величиной ОВП центра T1 лакказ. Точки на графике покрашены в соответствии с типом петель (как на рисунке 32): тип I — синий; тип II — фиолетовый; тип III — зеленый; тип IV — красный; тип V — оранжевый; тип VI — желтый. Линия тренда линейной регрессии (Sa = $-0.48E^0 + 590$, $R^2 = 0.73$) показана красным цветом. Точки на графике покрашены в соответствии с типом петель соответствующих лакказ (как на рисунке 32).

На основании величины доступности растворителю консервативных участков окружения центра Т1, а именно петель S2, S3, спирального сегмента S7 и С-концевого участка петли S6 можно оценивать ОВП лакказ базидиомицетов. Лакказы типа I и типа II

имеют высокий ОВП. ОВП лакказ из L. tigrinus и Lentinus sp., которые также можно отнести к типу I, неизвестен, но на основании величины доступности растворителю консервативных участков около центра T1 (184 Ų и 225 Ų) можно предположить, что эти лакказы обладают высоким ОВП. Относящаяся к типу III лакказа из R. lignosus имеет ОВП между высоким и средним значениями. Лакказы типов IV и V характеризуются средним ОВП. Для лакказы из S. ochraceum, относящейся к типу IV, ОВП неизвестен, но можно предположить, что она также обладает средним ОВП на основании доступности растворителю консервативных участков около центра T1 (260 Ų). К типу VI относится лакказа из C. cinereus, у которой ОВП также средний, но ниже, чему у лакказ с петлями типа IV и типа V.

Интересно, что деление лакказ на группы в соответствии со структурой петель около центра Т1 хорошо согласуется с топологий филогенетического дерева, построенного по полным аминокислотным последовательностям исследованных лакказ и делением грибов, продуцирующих эти лакказы, на экофизиологические группы (рисунок 34). Грибы, продуцирующие лакказы типа I и типа II, принадлежат к группе первичных ксилотрофов. R. lignosus, продуцирующий лакказу типа III, является фитопатогеном. Грибы, продуцирующие лакказы типов IV и V, относятся к группе вторичных ксилотрофов, а C. cinereus, продуцирующий лакказу типа VI, относится к Таким образом, гумусовым сапротрофам. величина доступности растворителю консервативных участков около центра Т1 возрастает в следующем ряду: лакказы первичных ксилотрофов с ОВП более 700 мВ < лакказа фитопатогена с ОВП около 700 мВ < лакказы вторичных ксилотрофов с ОВП 600-700 мВ < лакказа гумусового сапротрофа с ОВП 550 мВ.

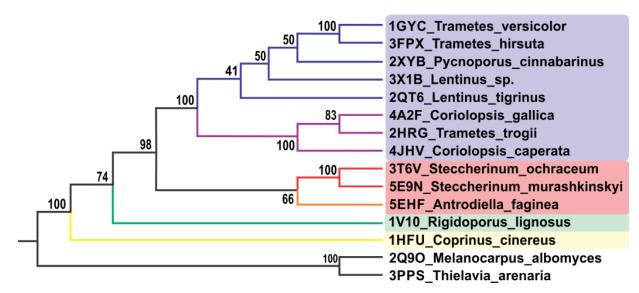


Рисунок 34. Филогенетическое дерево, построенное по полным аминокислотным последовательностям лакказ (при помощи алгоритма максимального правдоподобия). Ветви дерева покрашены в соответствии со структурой петель вокруг Т1 центра (как на рисунке 32). Цветными прямоугольниками выделены лакказы грибов, относящихся к одним и тем же экофизиологическим группам: фиолетовый — первичные ксилотрофы, красный — вторичные ксилотрофы, зеленый — фитопатоген, желтый — гумусовый сапротроф. В качестве внешней группы были использованы последовательности лакказ аскомицетов *М. albomyces* и *Т. arenaria*. Ветви дерева покрашены в соответствии с типом петель лакказ (как на рисунке 32).

3.9 Исследование методом рентгеноструктурного анализа процесса ферментативного восстановления молекулярного кислорода до воды лакказой из *S. murashkinskyi* под действием ионизирующего рентгеновского излучения

Под действием ионизирующего рентгеновского излучения происходит восстановление ионов меди активного центра лакказы [116,152]. Таким образом, возможно запустить ферментативную реакцию восстановления кислорода до воды в активном центре лакказы с использованием источника рентгеновского излучения. Изучение происходящих под действием ионизирующего рентгеновского излучения изменений в Т2/Т3 центре лакказ можно проводить при помощи трех различных подходов: 1) сбор данных от разных кристаллов с низкой и высокой дозой поглощенного кристаллом рентгеновского излучения, 2) сбор данных от нескольких кристаллов с последующим получением комбинированных наборов данных, соответствующих различным дозам поглощенного рентгеновского излучения, 3) сбор последовательных наборов данных от одного кристалла с возрастающей дозой поглощенного рентгеновского излучения. Последний подход позволяет получить наиболее точные данные, однако для его реализации необходимы кристаллы очень высокого качества.

Кристаллы SmL были достаточно высокого качества, чтобы было возможно собрать шестнадцать наборов данных до разрешения 1,35 Å от одного кристалла. Статистические характеристики наборов данных и уточненных моделей лакказ приведены в таблице 16. Все структуры серии и ранее решенная структура SmL могут быть совмещены со среднеквадратичным отклонением менее 0,15 Å (для соответствующих Сα атомов). Заселенность ионов меди активного центра в структурах серии не полная и составляет 1,0, 0,9 и 0,8 для ионов меди Cu1, Cu2 и Cu3 соответственно. Существенные отличия были обнаружены только в активном центре лакказы. Эти отличия являются следствием протекания ферментативной реакции восстановления молекулярного кислорода и восстановления фермента под действием рентгеновского излучения, поглощенного кристаллом во время съемки наборов данных.

Во всех структурах серии, кроме последней, наблюдается смесь структур с различными состояниями окисления ионов меди активного центра. Интерпретация таких смешанных состояний сложна и требует привлечения данных о строении комплексов ионов меди в различных степенях окисления.

Таблица 16. Характеристики наборов дифракционных данных и структур лакказы SmL, полученных при съемке серии наборов данных с возрастающей дозой поглощенного рентгеновского излучения. В скобках указаны значения для слоя с максимальным разрешением.

Номер набора	1	2	3	4	5	6
Время экспозиции, мин	3	33	63	93	123	153
PDB код:	5MEJ	5MEW	5MHU	5MHV	5MHW	5MHX
Разрешение, Å	30,0–1,5 (1,65–1,5)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)
Ι/σ	14,8 (3,2)	19,3 (4,9)	19,5 (4,7)	20,0 (4,8)	20,0 (4,8)	20,0 (4,8)
Полнота набора, %	97,6 (94,1)	96,2 (98,6)	98,8 (98,5)	98,8 (98,4)	98,8 (98,4)	98,8 (98,5)
Повторяемость	3,2 (3,1)	3,2 (3,0)	3,1 (3,0)	3,1 (3,1)	3,1 (3,0)	3,1 (3,0)
R _{meas} , %*	7,5 (42,5)	4,8 (29,6)	4,8 (31,3)	4,6 (30,4)	4,6 (30,3)	4,6 (30,1)
CC(1/2), %	99,8 (84,2)	99,9 (90,9)	99,9 (89,6)	99,9 (90,2)	99,9 (90,4)	99,9 (90,3)
R _f , %	13,94	13,15	13,33	13,30	13,10	12,36
R _{free} , %	16,15	15,23	15,24	15,06	14,97	14,04
Ошибка определения коорд	инат атомов п	о Крушанку [[260]:			
	0,059	0,041	0,041	0,041	0,041	0,052
Ошибка определения коорд	инат атомов (1	по принципу	максимальног	го правдоподо	обия):	
	0,040	0,026	0,026	0,026	0,026	0,030
Среднеквадратичное отклон	ение от идеал	ьных значені	ий:			
валентных связей, Å	0,017	0,021	0,021	0,021	0.020	0.021
валентных углов, °	1,8	2,0	2,0	2,0	1,97	2,08
Число атомов:						
белок	3905	3912	3900	3900	3904	3904
вода	670	729	693	693	764	747
другое	101	101	97	97	97	97
Cu	4	4	4	4	4	4
Среднее значение температу	урных фактор	ов (Å ²):				
Белок	11,0	10,1	10,1	10,1	10,1	9,7
Вода	21,8	21,7	21,3	21,3	22,1	21,9

Номер набора	7	8	9	10	11
Время экспозиции	183	213	243	273	303
PDB код	5MHY	5MHZ	5MI1	5MI2	5MIA
Разрешение, Å	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0-1,35 (1,40-1,35)
I/σ	19,9 (4,8)	20,8 (5,3)	20,5 (5,1)	19,8 (5,1)	20,6 (4,2)
Полнота набора, %	98,8 (98,5)	98,8 (98,4)	98,7 (98,3)	98,8 (98,6)	98,9 (99,8)
Повторяемость	3,1 (3,0)	3,1 (3,0)	3,1 (3,0)	3,1 (3,0)	3,0 (3,0)
R _{meas} , %*	4,6 (30,0)	4,4 (27,1)	4,5 (28,2)	4,6 (28,1)	4,4 (31,7)
CC(1/2), %	99,9 (90,5)	99,9 (91,8)	99,9 (91,2)	99,9 (91,2)	99,9 (89,8)
R _f , %	13,16	13,03	13,05	13,06	13,04
R _{free} , %	14,51	14,73	14,69	14,75	14,74
Ошибка определения коор	одинат атомов	по Крушанку	[260]:		
	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041
Ошибка определения коор	одинат атомов	(по принципу	максимально	го правдоподо	бия):
	0,025	0,025	0,026	0,026	0,025
Среднеквадратичное откл	онение от иде	альных значен	ий:		
валентных связей, Å	0,020	0,020	0,020	0,020	0,020
валентных углов, °	1,97	1,95	1,96	1,96	1,97
Число атомов:					
белок	3904	3905	3905	3905	3905
вода	750	767	769	766	763
другое	75	75	75	75	75
Cu	4	4	4	4	4
Среднее значение темпера	атурных факто	ров (Ų):	•		•
Белок	10,1	10,1	10,1	10,2	10,2
Вода	22,0	22,2	22,4	22,2	22,2

Номер набора	12	13	14	15	16
Время экспозиции	333	363	393	423	453
PDB код	5MIB	5MIC	5MID	5MIE	5MIG
Разрешение, Å	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)	30,0–1,35 (1,40-1,35)
I/σ	21,3 (4,5)	20,6 (4,0)	20,8 (3,9)	20,7 (3,9)	14,3 (2,0)
Полнота набора, %	98,0 (99,6)	98,5 (99,5)	98,8 (99,7)	98,8 (99,8)	98,9 (99,7)
Повторяемость	2,8 (2,7)	2,9 (2,9)	3,0 (3,0)	3,0 (3,0)	2,9 (2,9)
R _{meas} , %*	4,0 (28,0)	4,4 (32,5)	4,4 (33,9)	4,5 (34,2)	7,1 (70,4)
CC(1/2), %	99,9 (91,4)	99,9 (89,3)	99,9 (88,3)	99,9 (88,1)	99,9 (88,3)
R _f , %	13,03	13,15	13,17	13,23	14,09
R _{free} , %	14,78	14,79	14,99	14,78	16,23
Ошибка определения коор	динат атомов	по Крушанку	[260]:		
	0,041	0,041	0,041	0,041	0,044
Ошибка определения коор	динат атомов	(по принципу	максимально	го правдоподо	бия):
	0,026	0,027	0,027	0,027	0,032
Среднее квадратичное отк	лонение от ид	еальных значе	ений:		
валентных связей, Å	0,020	0,020	0.021	0.020	0.022
валентных углов, °	1.97	1.99	1.98	1.97	2.11
Число атомов:					
белок	3905	3905	3905	3905	3905
вода	717	722	712	715	686
другое	74	96	74	72	70
Cu	5	5	5	5	5
Среднее значение темпера	турных факто	ров (Ų):			
Белок	10,3	10,3	10,3	10,3	11,
Вода	21,8	21,8	21,7	21,7	23,6

Теоретическое описание комплексов переходных металлов было сделано много десятилетий назад (см., например, обзор [264]). Координационная химия меди описана в работе [265]. Координация ионов меди Cu(I) и Cu(II) азот- и кислородсодержащими лигандами, которые наиболее интересны при изучении T2/T3 центра лакказ, подробно изучалась для малых молекул [266–268]. Координация меди Cu(I) в комплексах может быть линейной с двумя лигандами, плоской тригональной с тремя лигандами [265,269] и тетраэдрической с четырьмя лигандами [270]. Медь Cu(II) в комплексах может быть координирована четырьмя и пятью лигандами в зависимости от числа и природы лигандов. Комплексы меди Cu(II) с четырьмя лигандами имеют геометрию, близкую к плоской квадратной [266]. Из-за стерических взаимодействий возможны искажения в сторону тетраэдрической геометрии [268]. Комплексы меди Cu(II) с пятью лигандами имеют геометрию тригональной бипирамиды [267]. Анализ координации ионов меди в центрах различного типа в белках с решенной пространственной структурой был проведен в нескольких публикациях [271,272].

Выделяют пять типов медных центров, три из которых присутствуют в лакказах: тип 1 (Cu1), тип 2 (Cu2) и тип 3 (два иона Cu3). Координация ионов меди в лакказе может быть связана с их степенями окисления. Если ионы меди Cu3 находятся в окисленном состоянии (Cu3(II)), то каждый ион меди координирован пятью лигандами. Три атома азота остатков гистидина и два кислородных лиганда образуют тригональную бипирамиду. При восстановлении ионов меди Cu3 расстояние между ними увеличивается, а кислородный мостик разрушается [271]. Для восстановленных ионов меди Cu3(I), координированных азотсодержащими лигандами, такими как пиридины или имидазолы, характерна слегка искаженная плоская тригональная геометрия в случае трех лигандов или же искаженная тетраэдрическая координация в случае четырех лигандов [266,272]. Ион меди Cu2(II), координированный двумя атомами азота остатков гистидина и двумя кислородными лигандами, имеет плоскую геометрию. Пара атомов азота остатков гистидина и пара кислородных лигандов образуют крест. Когда ион меди Cu2(II) восстанавливается до Cu2(I), возможна только линейная координация двумя атомами азота остатков гистидина, поскольку плоская квадратная координация для меди Cu(I) запрещена [264,272]. Ион меди Сu1 имеет плоскую тригональную координацию вне зависимости от степени окисления, лигандами выступают атом серы остатка цистеина и два атома азота остатков гистидина [271].

Таким образом, при интерпретации структурных данных мы учитывали, что ионы меди Cu3(I) могут образовывать комплекс с тремя лигандами (атомами азота остатков

гистидина), имеющий плоскую геометрию, или комплекс с четырьмя лигандами (тремя атомами азота остатков гистидина и кислородным лигандом), имеющий геометрию тетраэдра. Для ионов меди Cu3(II) характерен комплекс с пятью лигандами (тремя атомами азота остатков гистидина и двумя кислородными лигандами). Для иона меди Cu2(I) возможна только линейная координация двумя атомами азота остатков гистидина, тогда как для иона меди Cu2(II) характерна координация четырьмя лигандами (двумя атомами азота остатков гистидина и двумя кислородными лигандами), имеющая геометрию плоского квадрата.

Ключевые структуры серии, которые позволяют проследить динамику изменений в активном центре, приведены на рисунке 35, где показано строение T2/T3 центра лакказы при разных дозах поглощенного рентгеновского излучения. На рисунках показаны ионы меди Cu2 и Cu3 и координирующие их лиганды c соответствующей электронной плотностью. Электронная плотность ($2F_0$ - F_c) на уровне 1 σ показана серым цветом. Для восстановленного и окисленного состояния T2/T3 центра разностные OMIT карты (в которых были исключены атомы, соответствующие восстановленному и окисленному состоянию) показаны на уровне 6 σ синим и красным цветом соответственно.

Все решенные структуры лакказы SmL (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). Данная структура показана на рисунке 35, А. Между ионами меди Cu3 локализован кислородный лиганд W3 с заселенностью q = 0,5. Присутствуют также два кислородных лиганда W4 и W5 в канале Т3. Расстояние между ионами меди Сu3 составляет 5,12 Å. Каждый ион меди Си3 координирован тремя атомами азота остатков гистидина. Ионы меди располагаются в центре треугольника, образованного атомами азота; при этом все четыре атома лежат в одной плоскости (отклонение от плоскости иона меди Cu3 составляет 0,2 и 0,3 Å), что дает основания полагать, что ионы меди находятся в состоянии Cu(I). Ион меди Cu2 линейно координирован двумя атомами азота остатков гистидина. Расстояние между ионом меди Cu2 и кислородным лигандом W2 составляет 2,65 Å. Это расстояние слишком велико для координационной связи. Таким образом, W2 связан лишь электростатически с ионом меди Cu2. Подобная линейная координация соответствует восстановленному состоянию - Cu2(I). Таким образом, все три иона меди T2/T3 центра в этой структуре

находятся в восстановленном состоянии, что согласуется с большой дозой поглощенного кристаллом рентгеновского излучения.

Для остальных структур серии электронную плотность, относящуюся к ионам меди Cu3, невозможно описать одной позицией атома даже с использованием анизотропного уточнения температурных факторов (рисунок 35, Б, В, Г, Д). Их электронная плотность корректно описывается двумя позициями для каждого иона меди. Когда ионы меди Cu3 находятся ближе друг к другу, эти ионы меди и три атома азота остатков гистидина образуют пирамиды. Во втором случае, когда ионы меди Cu3 находятся на большем расстоянии друг от друга, эти ионы меди и все три атома азота лежат в одной плоскости. В этих двух состояниях расстояние между ионами меди Cu3 составляет 3,8 – 4,3 Å и 5,3-5,4 Å соответственно. Второе положение ионов меди Cu3 во всех структурах соответствует положению ионов меди в последней структуре серии (полученной после перезаморозки кристалла, рисунок 35, A). Таким образом, можно установить взаимосвязь между положением ионов меди Cu3 и их степенью окисления в структурах серии, а также соотнести различные кислородные лиганды, наблюдаемые в T2/T3 центра, с различными степенями окисления ионов меди.

Электронная плотность для первой структуры серии (3 минуты экспозиции) показана на рисунке 35, Б. Она была интерпретирована как наложение состояния с восстановленными ионами меди Cu3(I) с молекулой кислорода между ними (заселенность q = 0,3 для всех соответствующих атомов) и состояния с окисленными ионами меди Cu3(II) и двумя координирующими их кислородными лигандами: W1, расположенным в центре T2/T3 центра и взаимодействующим со всеми тремя ионами меди, и W3 между ионами Cu3 (заселенность q = 0.6 для всех соответствующих атомов). Молекула O_2 расположена симметрично между ионами меди Cu3(I). Кислородный лиганд W3 симметрично расположен между ионами меди Cu3(II) и немного смещен в сторону канала Т3. Определить состояние протонирования кислородных лигандов невозможно в этой и во всех остальных структурах серии из-за недостаточно высокого разрешения. Вне Т2/Т3 центра в канале Т3 имелся значительный пик, отдаленный от кислородного лиганда W3 на расстояние водородной связи. Он был интерпретирован как наложение с одинаковой заселенностью (q = 0.5) молекулярного кислорода (O_2) и двух кислородных лигандов W4 и W5. Это положение соответствует положению молекулярного кислорода в канале Т3 перед его связыванием между ионами меди Cu3.

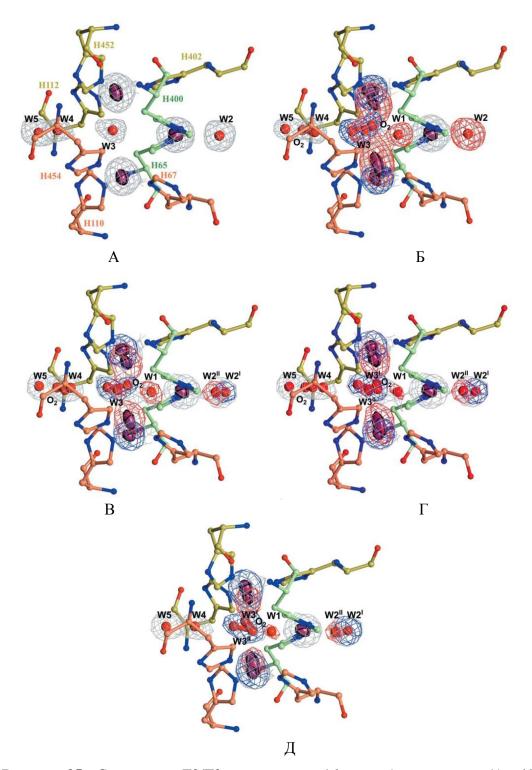


Рисунок 35. Структуры Т2/Т3 центра для 16-го набора данных (A, 453 мин. экспозиции, после перезаморозки), 1-го набора данных (Б, 3 мин. экспозиции), 2-го набора данных (В, 33 мин. экспозиции), 7-го набора данных (Г, 183 мин. экспозиции) и 15-го набора данных (Д, 423 мин. экспозиции). Карта электронной плотности ($2F_o - F_c$) показана серым цветом на уровне 1 σ . Разностные (ОМІТ) карты для восстановленного и окисленного состояния Т2/Т3 центра показаны синим и красным цветом. Для структур А-Б: на уровне 6 σ для ионов меди и кислородных лигандов в Т2/Т3 центре. Для структур В-Г: для ионов меди на уровне 6 σ , для кислородных лигандов W1, W2 и W3, — на уровне 4 σ .

Можно предположить, что окисленное состояние фермента перед сбором дифракционных данных соответствует «нативному интермедиату». Восстановленное состояние является последствием воздействия рентгеновского излучения. При этом происходит связывание молекулярного кислорода между ионами меди Cu3. Ион меди Cu2 в первой структуре серии окружен четырьмя лигандами: двумя атомами азота остатков гистидина и двумя кислородными лигандами W1 и W2. Заселенности равны q = 0,6 для W1, q = 1.0 для W2 и q = 0.8 для иона меди Cu2. Расстояние между ионом меди Cu2 и W2 равно 2,22 Å, а расстояние Cu2 – W1 равно 1,85 Å. Таким образом, в присутствии лиганда W1 координационное число для иона меди Cu2 равно 4, что типично для меди Cu2(II), равно как и плоско-квадратная координация. Несоответствие заселенности лигандов W1 и W2 объясняется одновременным присутствием в T2/T3 центре ионов меди в различных степенях окисления, которые образуют соответствующие координационные комплексы. Следует отметить, что положение иона меди Cu2 и обоих координирующих его атомов азота остатков гистидина практически неизменно во всех структурах серии. Следовательно, в первой структуре серии ион меди Cu2 преимущественно находится в состоянии Cu2(II).

Структуры, полученные для более высоких доз поглощенного кристаллом рентгеновского излучения, лишь немного отличаются от первой структуры, приведенной на рисунке 35, Б. Изменяются только заселенности ионов меди в окисленном и восстановленном состоянии и соответствующих им лигандов (таблица 17). В следующем (33 минуты экспозиции, рисунок 35, В) и во всех последующих наборах данных (кроме набора, полученного после перезаморозки кристалла) хорошо разрешаются два различных положения лиганда W2. Заселенность положения лиганда W2^I, соответствующего восстановленному состоянию иона меди Cu2 (расстояние до иона меди Cu2 - 2,65 Å), равна 0,5. Заселенность положения W2^{II}, соответствующего восстановленному состоянию иона меди Cu2 (расстояние до иона меди Cu2 – 2,2 Å), также равна 0,5. У двух кислородных лигандов W1 и W3 и ионов меди Cu3(II) наблюдаются такие же значения заселенностей – по 0,5. Исходя из этого, заселенность иона меди Cu2(II) равна 0,5, а Cu2(I) - 0,3, так как общая заселенность иона меди Cu2 равна 0,8. Сравнение первого и второго набора данных серии показывает, что степень восстановления ионов меди в Т2/Т3 центре увеличивается. Этот процесс сопровождается увеличением заселенности молекулярного кислорода между ионами меди Cu3.

Таблица 17. Заселенности (и атомные температурные факторы, $Å^2$) ионов меди и кислородных лигандов в T2/T3 центре при различных дозах поглощенного рентгеновского излучения.

	Т2/Т3 центр										анал ТЗ	
№ набора	Вос	сстановленное	состояние		Окисленное состояние							
паоора	Cu3	O_2	W3 ^I	W2 ^I	Cu3	W1	W3 ^{II}	W2 II	Cu2	O_2	W4	W5
1	0,3 (5,6/7,8)	0,3 (4,7/4,5)	-	_	0,6 (10,4/6,5)	0,6 (9,0)	0,6 (5,0)	1,0 (7,4)	0,8 (6,6)	0,5 (13,6/13,4)	0,5 (10,9)	0,5 (7,3)
2	0,4 (5,4/6,2)	0,4 (7,1/7,7)	-	0,5 (6,1)	0,5 (8,1/5,2)	0,5 (6,5)	0,5 (4,0)	0,5 (4,8)	0,8 (6,0)	0,5 (7,6/9,6)	0,5 (23,0)	0,5 (6,3)
3	0,45 (5,6/6,9)	0,45 (8,1/8,4)	_	0,55 (6,7)	0,45 (8,4/6,0)	0,45 (7,1)	0,45 (6,2)	0,45 (6,6)	0,8 (6,3)	0,5 (7,8/10,0)	0,5 (23,9)	0,5 (6,4)
4	0,45 (5,5/5,9)	0,45 (7,5/8,0)	_	0,55 (5,2)	0,45 (9,5/6,2)	0,45 (8,4)	0,45 (6,7)	0,45 (5,4)	0,8 (6,5)	0,5 (10,8/12,0)	0,5 (15,7)	0,5 (6,7)
5	0,45 (5,3/5,9)	0,45 (7,3/8,5)	_	0,55 (5,6)	0,45 (11,5/6,6)	0,45 (9,0)	0,45 (7,2)	0,45 (4,8)	0,8 (6,5)	0,5 (12,5/13,3)	0,5 (13,2)	0,5 (7,4)
6	0,45 (4,3/5,7)	0,4 (7,3/8,7)	0,2 (4,2)	0,6 (5,7)	0,45 (12,6/6,6)	0,4 (8,6)	0,4 (8,0)	0,4 (4,6)	0,8 (6,1)	0,5 (14,8/15,6)	0,5 (10,4)	0,5 (6,1)
8	0,5 (4,0/5,3)	0,35 (7,1/9,5)	0,25 (3,4)	0,6 (5,9)	0,45 (12,0/8,0)	0,4 (11,1)	0,4 (9,6)	0,4 (5,0)	0,8 (6,4)	0,5 (15,2/15,5)	0,5 (11,1)	0,5 (6,9)
9	0,5 (4,4/5,5)	0,35 (5,3/6,7)	0,25 (3,5)	0,65 (5,8)	0,4 (12,1/7,5)	0,35 (11,2)	0,35 (8,6)	0,35 (4,9)	0,8 (6,4)	0,5 (13,0/14,1)	0,5 (12,6)	0,5 (6,4)
10	0,5 (4,2/5,6)	0,3 (6,2/7,5)	0,3 (4,7)	0,65 (5,4)	0,4 (12,3/7,8)	0,35 (11,9)	0,35 (7,8)	0,35 (5,4)	0,8 (6,4)	0,5 (15,3/15,4)	0,5 (10,0)	0,5 (7,6)
11	0,55 (4,4/5,8)	0,25 (5,3/6,0)	0,3 (3,4)	0,7 (5,2)	0,35 (12,1/7,5)	0,3 (10,4)	0,3 (10,5)	0,3 (4,1)	0,8 (6,5)	0,5 (15,9/16,9)	0,5 (11,1)	0,5 (6,3)
12	0,6 (4,9/6,2)	0,25 (6,2/6,7)	0,35 (5,4)	0,75 (6,9)	0,3 (11,4/6,5)	0,25 (9,3)	0,25 (8,9)	0,25 (3,6)	0,8 (6,5)	0,5 (17,5/15,0)	0,5 (10,7)	0,5 (6,9)
13	0,65 (4,6/7,0)	0,25 (4,9/5,2)	0,45 (4,3)	0,75 (5,5)	0,25 (13,0/6,1)	0,25 (4,2)	0,25 (9,0)	0,25 (4,7)	0,8 (6,4)	0,5 (13,2/12,3)	0,5 (9,7)	0,5 (8,1)
14	0,7 (5,8/6,9)	0,2 (5,0/4,8)	0,5 (7,4)	0,8 (6,0)	0,2 (5,0/4,8)	0,2 (5,3)	0,2 (7,5)	0,2 (4,1)	0,8 (6,3)	0,5 (17,1/17,0)	0,5 (9,5)	0,5 (5,8)
15	0,7 (5,5/6,6)	0,2 (3,8/4,1)	0,5 (5,7)	0,8 (5,9)	0,2 (11,1/5,5)	0,2 (6,4)	0,2 (10,1)	0,2 (3,9)	0,8 (6,5)	-	1,0 (17,2)	1,0 (14,6)
16	0,9 (6,9/7,9)	_	0,5 (10,7)	1,0 (8,1)	_	_	_	_	0,8 (6,5)	_	1,0 (23,9)	1,0 (18,3)

Bo всех структурах серии наблюдалось последовательное возрастание заселенности восстановленных ионов меди Cu3(I). Следует отметить, что наиболее подходящее описание электронной плотности в окрестностях Т2/Т3 центра требует только тех лигандов, которые были интерпретированы для крайних случаев – 3 минуты, 33 минуты и 7,5 часов экспозиции, описанных выше и показанных на рисунке 35 Б, В и А соответственно. Но их заселенности должны изменяться в соответствии с тенденцией от одного крайнего случая к другому (таблица 17). Попытки ввести совершенно новые лиганды (такие как пероксид водорода) не улучшали интерпретацию, даже когда их заселенность была выбрана минимальной q = 0.2, а более высокие значения заселенности значительно ухудшали результат. Важным индикатором состояния иона меди Си2 являются два положения лиганда W2, обозначенных как $W2^{I}$ и $W2^{II}$ (рисунок 35, B, Γ , Λ). Попытки интерпретировать этот лиганд как один кислородный лиганд приводили к увеличению расстояния Cu2 – W2 (от 2,2 Å для 3 минут экспозиции до 2,7 Å для 7,5 часов экспозиции) и сопровождались появлением на разностной карте электронной плотности хорошо выраженного положительного пика, смещенного к иону меди Cu2. Это означает, что все три иона меди Т2/Т3 центра наблюдались только в двух стабильных состояниях: либо все ионы находились в восстановленном состоянии, либо все ионы находились в окисленном состоянии. Координация ионов меди в этих двух состояниях показана на рисунке 36. Окисленное состояние Т2/Т3 центра, показанное на рисунке 36, Б соответствует «нативному интермедиату», для которого характерны три кислородных лиганда, координация иона меди Cu2(II) четырьмя лигандами с геометрией плоского квадрата и координация ионов меди Cu3(II) пятью лигандами с геометрией тригональной бипирамиды. Восстановленное состояние наблюдается как комплекс с молекулярным кислородом (рисунок 36, А) или как комплекс с кислородным лигандом (рисунок 35, А). В обоих случаях ион меди Cu2(I) линейно координирован, тогда как ионы меди Cu3(I) плоско координированы тремя лигандами. Другие возможные интермедиаты не прослеживались в рентгеновских данных. В соответствии с полученными данными окисленное состояние (так называемый «нативный интермедиат») является стабильным состоянием для активного центра лакказ в присутствии кислорода, когда невозможно его восстановление при помощи субстрата или рентгеновского излучения. Это состояние пронаблюдать, поскольку оно требует минимально возможной поглощенного образцом гентгеновского излучения [116,262].

Длины координационных связей между ионом меди и его лигандами в центре Т1 не изменялись в ходе эксперимента. Во всех структурах серии ион меди Сu1 плоско координирован тремя лигандами: атомом серы и двумя атомами азота.

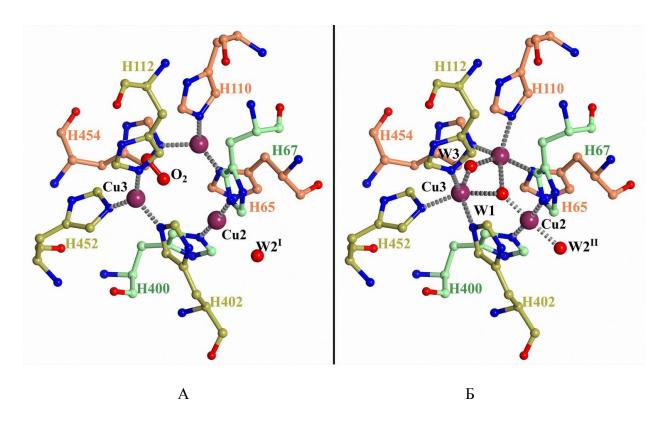


Рисунок 36. Структуры восстановленного (A) и окисленного (Б) состояний Т2/Т3 центра лакказ. Обе структуры являются моделями восстановленного (A) и окисленного (Б) состояния Т2/Т3 центра для седьмого набора данных. Координационные связи показаны серыми пунктирными линиями.

Ранее уже предпринимались попытки исследовать восстановление кислорода лакказами методом рентгеноструктурного анализа с использованием сбора данных с возрастающими дозами поглощенного рентгеновского излучения [114,116,118,153,262]. В трех работах применялась методика сбора данных с нескольких кристаллов, основанная на систематическом распределении дозы рентгеновского излучения по нескольким кристаллам И последующем получении комбинированных наборов данных, различным соответствующих дозам поглощенного рентгеновского излучения. Необходимо отметить, что подобная процедура обработки данных, соответствующих каждой конкретной дозе поглощенного рентгеновского излучения, дает менее точные результаты, нежели обработка данных с одного кристалла (значение R_{merge} становится в 1,5 – 2 раза выше) [114,153]. Это может происходить из-за несовершенного изоморфизма исходных кристаллов и ошибок, связанных с различиями в поглощенной дозе рентгеновского излучения. Кроме того, в этих исследованиях структура, соответствующая каждой поглощенной дозе рентгеновского излучения, рассматривается как отдельное состояние в ходе ферментативной реакции, однако интерпретация рентгеноструктурных данных таким образом выглядит несколько сомнительной. В работе [118] была также применена методика сбора данных с нескольких кристаллов, однако минимальная доза поглощенного рентгеновского излучения для первого набора достигала 4 МГр и изменения, наблюдаемые в Т2/Т3 центре лакказы при повышении дозы поглощенного рентгеновского излучения, связаны скорее с повреждением белка под действием радиации.

В работах [116,262] был применен другой подход, основанный на получении последовательной серии наборов дифракционных данных с одного кристалла. Этот метод более точен, поскольку нет необходимости усреднять данные, полученные с нескольких кристаллов. Для бактериальной трехдоменной лакказы CueO из *E. coli* и ее мутантной формы был наблюден «нативный интермедиат», увеличение расстояния между ионами меди Cu3 при восстановлении фермента под действием ионизирующего рентгеновского излучения, а также два положения ионов меди Cu3 [116,262]. Для двудоменной лакказы из метагенома [116] была решена структура комплекса с молекулярным кислородом. На основании этих данных была предложена другая схема механизма восстановления кислорода, отличающаяся в некоторых деталях от принятой ранее [47].

Полученная в настоящей работе серия наборов данных позволила предложить механизм ферментативного восстановления молекулярного кислорода ДО воды. Последовательность этапов реакции показана на рисунке 37. Цикл начинается с полностью восстановленного состояния фермента (все ионы меди находятся в степени окисления +1, рисунок 37, А). Оно соответствует структуре, показанной на рисунке 35, А. В данной структуре наблюдается единственное состояние активного центра (один атом – один пик электронной плотности). В этом состоянии ионы меди Cu3 находятся на максимальном удалении друг от друга. Молекула воды W3 между ионами меди Cu3 имеет заселенность q = 0,5 и сохраняет свое положение благодаря электростатическому притяжению к ионам меди Cu3. Электростатическая природа взаимодействия этой молекулы воды и ионов меди Cu3 следует из относительно большого расстояния между ними и того факта, что ионы меди в данной структуре образуют плоские тригональные комплексы с атомами азота остатков гистидина. Однако, расстояния Cu3-W3 не равны между собой (2,9 и 2,3 Å, рисунок 35, A). Для иона меди Cu3, которому соответствует расстояние 2,3 Å, наблюдается отклонение 0,3 Å от плоскости, содержащей в себе координирующие этот ион атомы азота. Это значительно меньше, чем в случае тригональной бипирамидальной координации иона меди Cu3 в состоянии Cu(II) (0,6 Å от плоскости), но выше, нежели отклонение для иона меди в восстановленном состоянии в других структурах (0,1 – 0,2 Å). Таким образом, в полностью восстановленном состоянии T2/T3 центра (рисунок 35, A) координация одного из ионов меди Cu3 четвертым лигандом (W3) также возможна. В полностью восстановленном состоянии (рисунок 37, A), ион меди Cu2(I) формирует линейный двухкоординированный комплекс с остатками гистидина His65 и His400 (рисунок 36, A). Молекула воды с внешней стороны T2/T3 центра (W2) связана с ионом меди Cu2 электростатически.

Рисунок 37. Механизм восстановления лакказами молекулярного кислорода до воды: $O_2 + 4e^- + 4H^+ \rightarrow 2H_2O$. Промежуточные состояния показаны на рисунках A-Д. На панели Е представлен механизм высвобождения молекулы воды из T2/T3 центра. Координационные и ковалентные связи показаны сплошными линиями. Ион-дипольные электростатические взаимодействия показаны пунктиром.

Молекула воды, расположенная между ионами меди Си3 (кислородный лиганд W3), может быть замещена молекулой O_2 (рисунок 37, Б). Эта молекула наблюдается во структурах серии за исключением последней. Молекулярный притягивается сильным электростатическим полем, создаваемым ионами меди, благодаря своей поляризации. Электростатическое взаимодействие между ионами меди Cu3 и водой или молекулой кислорода следует из частичной заселенности данных лигандов (общая заселенность этой позиции не превышает заселенности ионов меди Cu3 более, чем на 0,1 – то есть, в пределах точности оценки заселенностей (таблица 17)). Связывание молекулярного кислорода около позиции $W3^{\rm I}$ стерически возможно только в восстановленном состоянии ионов меди Cu3, когда расстояние между ними максимально. Кроме того, электростатическая энергия удаления молекулы воды, расположенной между сферическими ионами с одинаковым зарядом, равна примерно 2,4 кДж/моль для одновалентных ионов и достигает десятков кДж/моль для двухвалентных ионов, как потенциалов усредненной силы взаимодействия следует между гидратированными катионами металлов [273]. Следует отметить, что 2,4 кДж/моль – это приблизительно ЗКТ при температуре жидкого азота (100 К). Расположение молекулы О2 между ионами меди Cu3, когда один из атомов кислорода занимает позицию W3^I, делает возможным их окисление. Молекулярный кислород окисляет оба иона меди до степени окисления +2 и превращается в депротонированную молекулу пероксида (рисунок 37, В). Окисленные ионы меди Си3 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 (О-О) может быть протонирован через атом кислорода со стороны канала Т3. Следующий этап – это разрыв пероксидной связи (рисунок 37, Г). Это второй двухэлектронный процесс: один электрон переносится на пероксид с иона меди Cu2, а второй переносится через ион меди Cu3 от иона меди Cu1. Таким образом, разрыв пероксидной связи сопровождается окислением иона меди Cu2 и зависит от переноса электрона с иона меди Cu1. Ион меди Cu2(II) образует плоский четырехкоординированный комплекс с двумя кислородными лигандами и двумя атомами азота остатков гистидина (рисунок 37, Г). Разрыв одинарной ковалентной связи в пероксиде приводит к образованию интермедиата $OH^- - O^{2-}$. Этот процесс был исследован с некоторыми упрощениями (вакуумное окружение) при помощи квантовохимических расчетов [274]. Было показано, что разрыв ординарной О – О связи приводит к формированию интермедиатов $O^{2-} - O^{2-}$ или $OH^- - O^{2-}$. Это приводит к появлению двух

кислородных лигандов W1 и W3 в T2/T3 центре, которые наблюдались во всех структурах, кроме последней. В последней структуре W1 отсутствует.

Последующее протонирование кислородных лигандов приводит к образованию гидроксид-иона и воды, которые присутствуют в «нативном интермедиате» в Т2/Т3 центре в окисленном состоянии (рисунок 37, Д).

Следующим этапом каталитического цикла является высвобождение кислородных лигандов «нативного интермедиата», вызываемое восстановлением ионов меди T2/T3 центра электронами, переносимыми от иона меди Сu1. Механизм высвобождения показан на рисунке 37, Е. Центральный кислородный лиганд ОН очень плотно окружен ионами меди, с которыми он образует координационные связи, стабилизирующие его. Центральный кислородный лиганд вряд ли может быть молекулой воды, которая может образовывать только две координационные связи с ионами меди, тогда как OH^- может образовывать три таких связи. Восстановление любого иона меди Т2/Т3 центра приводит к уменьшению электростатической энергии системы и высвобождению лиганда из центра треугольника (рисунок 37, E). Восстановление ионов меди до Cu(I) понижает энергию координационных связей приблизительно в четыре раза. Это происходит благодаря тому, обеспечивается данное взаимодействие преимущественно заряд-дипольной электростатической энергией, которая пропорциональна квадрату заряда. Таким образом, после восстановления ионов меди, центральный лиганд ОН⁻ (позиция W1) выталкивается из центра треугольника и замещает молекулу воды W3, которая уходит в канал Т3. Теперь гидроксид-ион электростатически удерживается между ионами меди Cu3(I). Он может быть протонирован со стороны канала ТЗ и стать молекулой воды (рисунок 37, Е). Таким образом, система возвращается в исходное состояние (рисунок 37, А).

Не все промежуточные стадии реакции, приведенные на рисунке 37, были идентифицированы в структурах серии. Не был обнаружен комплекс с пероксидным интермедиатом (рисунок 37, В). По всей видимости, это состояние очень короткоживущее и не может быть детектировано рентгеноструктурными экспериментами. Кроме того, в структурах, решенных с разрешением 1,35 Å, невозможно определить состояние протонирования кислородных лигандов в Т2/Т3 центре (рисунок 37, Г, Д). С другой стороны, в структурах, полученных при помощи рентгеноструктурного анализа, можно четко увидеть полностью восстановленное состояние Т2/Т3 центра с молекулами воды (рисунок 37, А) и молекулярным кислородом (рисунок 37, Д), а также полностью окисленное состояние Т2/Т3 центра с кислородными лигандами (рисунок 37, Г, Д).

Уменьшение заселенности молекулы кислорода в Т2/Т3 центре в структурах серии и исчезновение молекулы кислорода в канале Т3, начиная с 15 структуры (таблица 17) показывает, что изменения в структуре серии связаны с восстановлением всего молекулярного кислорода в кристалле фермента за время сбора дифракционных данных, несмотря на то, что температура кристалла поддерживалась на уровне 100 К в течение всего эксперимента. Это следует из таких фактов как: (1) заселенность молекулярного кислорода в Т2/Т3 центре сначала возрастает, но затем падает для структур с более высокой дозой поглощенного рентгеновского излучения; (2) непрерывный рост температурных факторов связанного в канале Т3 молекулярного кислорода при повышении поглощенной дозы рентгеновского излучения и исчезновение данного лиганда в 15 структуре серии; (3) отсутствие молекулярного кислорода в последней структуре серии, полученной после перезаморозки кристалла. Кроме того, доля восстановленного Т2/Т3 центра растет с повышением дозы поглощенного рентгеновского излучения. В частности, это сопровождается понижением заселенности лиганда $W2^{II}$ и повышением заселенности лиганда $W2^{I}$ (рисунок 35, В-Д). Как упоминалось выше, если кислородный лиганд в позиции W2 описывать одним атомом, наблюдаемое расстояние между ним и ионом меди Cu2 неуклонно растет. Увеличение расстояния между ионом меди Cu2 и кислородным лигандом в позиции W2 наблюдалась ранее в структурах бактериальной лакказы CueO [116].

Важной особенностью предложенной схемы (рисунок 37) является симметричное положение всех кислородных лигандов по отношению к ионам меди Си3. Эта симметрия видна во всех структурах, решенных с высоким разрешением (рисунок 35, А-Д). Это противоречит описанному ранее механизму реакции, в которой существенную роль играла асимметрия Т2/Т3 центра в ходе каталитического цикла [47,105,141,143,275,276] (рисунок 7).

Схема восстановления кислорода, предложенная в работе [154](рисунок 11) очень напоминает механизм, представленный на рисунке 37. Схема основывалась на исследовании серии наборов дифракционных данных, полученных для одного кристалла с возрастающей дозой облучения для двух лакказ [116,262]. Динамика изменений структуры T2/T3 центра при различных дозах поглощенного излучения очень похожа на обнаруженные изменения в структурах, представленных в настоящей работе. Однако некоторые детали, а также механизм высвобождения воды из T2/T3 центра описаны не были. В работе [116] были показаны разные положения ионов меди Cu3, связанные с их степенью окисления, T2/T3 центр в окисленном состоянии с двумя кислородными

лигандами и его превращение в восстановленное состояние с одним кислородным лигандом между ионов меди Cu3. Более того, первая структура серии (с экспозицией 7 секунд) соответствовала полностью окисленному состоянию в чистом виде. В экспериментах, проведенных в настоящей работе, такое состояние не было получено, поскольку первый набор данных был собран за 3 минуты экспозиции, что привело к появлению восстановленного состояния фермента.

Однако авторы этой работы [116] не интерпретировали ни возможную молекулу кислорода между ионами меди Cu3, ни степени окисления иона меди Cu2. Степени окисления иона меди Cu2 можно определить по положению молекулы воды, контактирующей с ним со стороны T2 канала. Для пятого набора данных для лакказы CueO (PDB код 4C9S) электронная плотность между ионами меди Cu3 на самом деле не отличается от электронной плотности во второй структуре серии (33 минуты экспозиции), представленной в настоящей работе. Так что электронная плотность между ионами меди Cu3 в структуре 4C9S могла бы быть интерпретирована как наложение кислородного лиганда и молекулярного кислорода с частичной заселенностью. Также на картах электронной плотности для этой структуры четко видно наличие двух близких положений воды в канале T2 около иона меди Cu2. Таким образом, возможна иная интерпретация данных, полученных в работе [116].

Предложенный в более ранних работах [47,141,143,275,276] механизм четырехэлектронного восстановления кислорода до воды отличается в некоторой степени от
механизма, представленного на рисунке 37. В общих чертах механизмы очень похожи.
Они включают в себя две стадии двухэлектронного переноса, приводящие к
восстановлению кислорода и появлению «нативного интермедиата» после разрыва О – О
связи. Различия заключаются в положении пероксидного интермедиата и двух
кислородных лигандов, а также в порядке окисления ионов меди Cu2 и Cu3 (см. раздел
1.4). Несоответствие предложенного механизма (рисунок 37) с более раними работами
других исследователей также касается высвобождения кислородного лиганда W1 из T2/Т3
центра.

Кроме того, в ранее предложенной модели также предполагалось участие в реакции двух аминокислотных остатков: консервативного остатка аспарагиновой кислоты (Asp77) в канале Т2 и еще одного отрицательно заряженного остатка (Glu/Asp456) в канале Т3. В механизме реакции, предложенном Э. Соломоном (E. Solomon) и коллегами, консервативный среди лакказ и ей подобных ферментов остаток аспарагиновой кислоты Asp77 в канале Т2 играет ключевую роль. Вовлечение в реакцию этого остатка

аспарагиновой кислоты ведет к ассиметричному связыванию пероксидного лиганда в Т2/Т3 центре [141]. Данный остаток связан водородной связью с боковой цепью остатка гистидина, координирующего один из ионов меди Cu3. Ранее было показано, что этот остаток влияет на скорость расщепления пероксидного интермедиата в мультимедной оксидазе Fet3p и бактериальной лакказе CotA. Были исследованы мутации этого остатка на остатки аланина, аспарагина и глутаминовой кислоты [142,277], на основании чего было сделано заключение, что остаток аспарагиновой кислоты играет значительную роль в образовании пероксидного интермедиата [143]. Основываясь на данных, полученных в настоящей работе, можно предположить, что роль данного остатка заключается в том, что он координирует молекулу воды в положении W2 (рисунок 38). Эта молекула образует четыре связи: с ионом меди Cu2, с атомом азота основной цепи и с двумя другими молекулами воды. Она может быть донором протона только в двух водородных связях с молекулами воды. Эти две молекулы воды являются консервативными во всех структурах лакказ. Одна из молекул воды расположена в канале Т2, а вторая расположена в ответвлении канала T2 и образует четыре водородные связи: молекулой воды W2 (за счет протона воды W2) атомом азота основной цепи (за счет протона атома азота), атомом кислорода основной цепи (за счет своего протона) и боковой цепью консервативного остатка аспартата (за счет своего протона). Таким образом, наличие аспартата абсолютно необходимо для поддержания структуры воды в канале Т2. Принимая во внимание то, что второй атом кислорода боковой цепи остатка аспарагиновой кислоты связан с координирующим ион меди Cu3 остатком гистидина, только остатки аспарагиновой или глутаминовой кислоты могут находиться в данной позиции. Однако, консервативного аспартата на аспарагин приводит с тому, что вторую молекулу воды должен будет координировать атом азота аспарагина, имеющий два своих протона, что невозможно (рисунок 38) Это согласуется с кинетическими данными, полученными для мутантных форм фермента [142]. Стоит отметить, что подобная координация молекул воды сохраняется даже у двухдоменных лакказ [116].

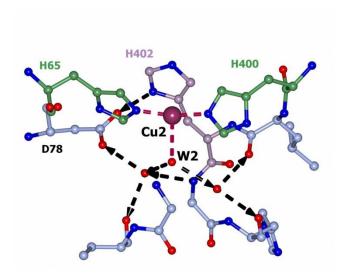


Рисунок 38. Схема водородных связей, образуемых молекулами воды в канале Т2. Стрелки направлены в сторону акцептора протона. Водородные связи показаны черным цветом, координационные – фиолетовым.

В ранее предложенной схеме механизма в позиции кислородного лиганда W2 появляется гидроксид-ион, что выглядит сомнительно, поскольку протоны имеют свободный доступ в канал Т2 при оптимальных для лакказ рН (от кислого до нейтрального). Функцией канала Т2 и является обеспечение доступа воды (и протонов) к кислородному лиганду W2. Вода W2 играет одну из ключевых ролей в реакции (рисунок 37). Благодаря этой молекуле ион меди Cu2 может иметь плоскую координацию с четырьмя лигандами, что позволяет, в свою очередь, образовать координационную связь с кислородным лигандом внутри Т2/Т3 центра и обеспечить разрыв О – О связи. Также в предложенной нами схеме нет необходимости в переносе кислородного лиганда из центра Т2/Т3 центра в канал Т2, как предполагалось в ранее описанной схеме [276]. Подобный перенос стерически затруднен и представляется маловероятным.

Другим аминокислотным остатком, принимающим участие в реакционном процессе, является остаток глутаминовой (или аспарагиновой) кислоты в канале Т3, который, как считалось, играет важную роль в координации лиганда W3 и его протонировании [276]. Можно предположить, что главная роль этого остатка с отрицательно зараженной боковой цепью – это участие в формировании канала Т3 путем координации молекул воды в канале, которые должны проникать в гидрофобное ядро глобулярного белка. Это согласуется с тем, что данный остаток аспарагиновой кислоты высоко консервативен у лакказ базидиомицетов, а у других мультимедных оксидаз в данной позиции находится консервативный остаток глутаминовой кислоты.

В результате проделанной работы удалось установить связь между координацией ионов меди в Т2/Т3 центре и их степенью окисления. Это позволило интерпретировать электронную плотность в Т2/Т3 центре структур серии как наложение окисленного и восстановленного состояния ионов меди и соответствующих лигандов. С возрастанием дозы поглощенного образцом рентгеновского излучения доля окисленного состояния падала, а доля восстановленного состояния увеличивалась. Анализ структур серии показал, что в кристалле происходит ферментативная реакция восстановления молекулярного кислорода. На основании полученных данных был существенно уточнен механизм восстановления кислорода до воды в активном центре лакказ. Показано, что молекулярный кислород связывается между ионами меди Си3, только когда те находятся в восстановленном состоянии и расстояние между ними максимально. Проникновение молекулярного кислорода в T2/T3 центр сопровождается окислением ионов меди Cu3. При этом образовавшийся пероксидный интермедиат связан симметрично относительно ионов меди Cu3. Это является отличительной особенностью предложенной схемы восстановления молекулярного кислорода до воды. Ранее предполагалось, что молекулярный кислород восстанавливается до пероксидного интермедиата ионом Cu2 и одним из ионов Cu3. Кроме того, был предложен механизм высвобождения образовавшейся в ходе реакции молекулы воды из активного центра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования, представленные в настоящей работе, позволяют сделать следующие 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 Т1 лакказ является определяющим фактором. Для монофенольных соединений с потенциалом окисления ниже 700 мВ не наблюдалось корреляции между окислительно-восстановительным потенциалом иона меди в центре Т1 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 *С. сарегаta* с удаленным ионом меди из центра T2 способны встраиваться только ионы меди в степени окисления +1. Также для препарата лакказы *С. сарегаta* 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 Т1 центре на его окислительно-восстановительный потенциал. Показано, что доступность растворителю консервативных участков окружения иона меди в центре Т1 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 ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Mate D.M., Alcalde M. Laccase engineering: from rational design to directed evolution // Biotechnol. Adv. 2015. Vol. 33, № 1. P. 25–40.
- 2. Rivera-Hoyos C.M., Morales-Alvarez E.D., Poutou-Pinales R.A., Pedroza-Rodriguez A.M., Rodriguez-Vazquez R., Delgado-Boada J.M. Fungal laccases // Fungal Biol. Rev. 2013. Vol. 27. P. 67–82.
- 3. Yoshida H. Chemistry of lacquer (urushi) // J. Chem. Soc. 1883. Vol. 43. P. 472–486.
- 4. Bertrand G. Simultaneous occurence of laccase and tyrosinase in the juice of some mushrooms // C. R. Hebd. Séances Acad. Sci. 1896. № 123. P. 463–465.
- 5. Giardina P., Faraco V., Pezzella C., Piscitelli A., Vanhulle S., Sannia G. Laccases: a never-ending story // Cell. Mol. Life Sci. 2010. Vol. 67, № 3. P. 369–385.
- 6. Schomburg I., Chang A., Ebeling C., Gremse M., Heldt C., Huhn G., Schomburg D. BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32, № suppl_1. P. D431–D433.
- 7. Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M.-L., Bally R. Polyphenol oxidase in *Azospirillum lipoferum* isolated from rice rhizosphere: Evidence for laccase activity in non-motile strains of *Azospirillum lipoferum* // FEMS Microbiol. Lett. 1993. Vol. 108, № 2. P. 205–210.
- 8. Faure D., Bouillant M.L., Bally R. Isolation of *Azospirillum lipoferum* 4T Tn5 mutants effected in melanization and laccase activity // Appl. Environ. Microbiol. American Society for Microbiology, 1994. Vol. 60, № 9. P. 3413–3415.
- 9. Faure D., Bouillant M., Bally R. Comparative study of substrates and inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* laccases // Appl. Environ. Microbiol. American Society for Microbiology, 1995. Vol. 61, № 3. P. 1144–1146.
- 10. Alexandre G., Bally R., Taylor B.L., Zhulin I.B. Loss of cytochrome c oxidase activity and acquisition of resistance to quinone analogs in a laccase-positive variant of *Azospirillum lipoferum* // J. Bacteriol. American Society for Microbiology, 1999. Vol. 181, № 21. P. 6730–6738.
- 11. Santhanam N., Vivanco J.M., Decker S.R., Reardon K.F. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style // Trends in Biotechnology. Elsevier Current Trends, 2011. Vol. 29, № 10. P. 480–489.
- 12. Shraddha, Shekher R., Sehgal S., Kamthania M., Kumar A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications // Enzyme Res. 2011. Vol. 2011. P. 1–11.
- 13. Sharma P., Goel R., Capalash N. Bacterial laccases // World J. Microbiol. Biotechnol. 2007. Vol. 23, № 6. P. 823–832.
- 14. Dittmer N.T., Kanost M.R. Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles // Insect Biochem. Mol. Biol. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 40, № 3. P. 179–188.

- 15. Parkinson N.M., Conyers C.M., Keen J.N., MacNicoll A.D., Smith I., Weaver R.J. cDNAs encoding large venom proteins from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* identified by random sequence analysis // Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 2003. Vol. 134, № 4. P. 513–520.
- 16. Nakamura K., Go N. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins // Cell. Mol. Life Sci. 2005. Vol. 62, № 18. P. 2050–2066.
- 17. Sakurai T., Kataoka K. Structure and function of type I copper in multicopper oxidases // Cell. Mol. Life Sci. 2007. Vol. 64, № 19–20. P. 2642–2656.
- 18. Mayer A.M., Staples R.C. Laccase: New functions for an old enzyme // Phytochemistry. 2002. Vol. 60, № 6. P. 551–565.
- 19. Sterjiades R., Dean J.F.D., Eriksson K.-E.L. Laccase from sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) polymerizes monolignols // Plant Physiol. Am Soc Plant Biol, 1992. Vol. 99, № 3. P. 1162–1168.
- 20. Liu L., Dean J.F.D., Friedman W.E., Eriksson K.L. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues // Plant J. 1994. Vol. 6, № 2. P. 213–224.
- 21. Boudet A.-M. Lignins and lignification: selected issues // Plant Physiol. Biochem. 2000. Vol. 38, № 1–2. P. 81–96.
- 22. Ranocha P., Chabannes M., Chamayou S., Danoun S., Jauneau A., Boudet A.-M., Goffner D. Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar // Plant Physiol. 2002. Vol. 129, № 1. P. 145–155.
- 23. Hoopes J.T., Dean J.F.D. Ferroxidase activity in a laccase-like multicopper oxidase from *Liriodendron tulipifera* // Plant Physiol. Biochem. 2004. Vol. 42, № 1. P. 27–33.
- 24. McCaig B.M.C., Meagher R.B., Dean J.F.D.D. Gene structure and molecular analysis of the laccase-like multicopper oxidase (LMCO) gene family in *Arabidopsis thaliana* // Planta. 2005. Vol. 221, № 5. P. 619–636.
- 25. Baldrian P. Fungal laccases occurrence and properties // FEMS Microbiol. Rev. 2006. Vol. 30, № 2. P. 215–242.
- 26. Hatakka A. Biodegradation of lignin // Lignin, humic substances and coal / ed. Hofrichter M S.A. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2001. P. 129–179.
- 27. Martinez D., Larrondo L.F., Putnam N., Sollewijn Gelpke M.D., Huang K., Chapman J., Helfenbein K.G., Ramaiya P., Detter J.C., Larimer F., Coutinho P.M., Henrissat B., Berka R., Cullen D., Rokhsar D. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78 // Nat. Biotechnol. 2004. Vol. 22, № 6. P. 695–700.
- 28. Munk L., Sitarz A.K., Kalyani D.C., Mikkelsen J.D., Meyer A.S. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? // Biotechnol. Adv. 2015. Vol. 33, № 1. P. 13–24.
- 29. Hatakka A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role from in lignin degradation // FEMS Microbiol. Rev. 1994. Vol. 13, № 2–3. P. 125–135.
- 30. Kirk T.K., Farrell R.L., Gifford O., Drive P., Farrell R.L. Enzimatic "combustion": the

- microbial degradation of lignin // Annu. Rev. Microbiol. 1987. Vol. 41, № 1. P. 465–505.
- 31. Ander P., Eriksson K.E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulverulentum* // Arch. Microbiol. 1976. Vol. 109, № 1–2. P. 1–8.
- 32. Eggert C., Temp U., Eriksson K.E.L. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* // FEBS Lett. 1997. Vol. 407, № 1. P. 89–92.
- 33. Bermek H., Li K., Eriksson K.E.L. Laccase-less mutants of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* cannot delignify kraft pulp // J. Biotechnol. 1998. Vol. 66, № 2–3. P. 117–124.
- 34. Kim K.-J., Shin K.-S., Hong S.-W. Induction of extracellular polyphenol oxidase from two white-rot fungi // Korean J. Mycol. 1986. Vol. 14, № 1. P. 43–47.
- 35. Kawai S., Umezawa T., Higuchi T. Degradation mechanisms of phenolic B-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor* // Biophysics (Oxf). 1988. Vol. 262, № 1. P. 99–110.
- 36. Youn H.-D., Hah Y.C., Kang S. Role of lactase in lignin degradation by white-rot fungi // FEMS Microbiol. Lett. 1995. Vol. 132, № 95. P. 183–188.
- 37. Bourbonnais R., Paice M.G. Oxidation of non-phenolic substrates // FEBS Lett. 1990. Vol. 267, № 1. P. 99–102.
- 38. Thurston C. The structure and function of fungal laccases // Microbiology. 1994.
- 39. Alcalde M. Laccases: biological functions, molecular structure and industrial applications // Industrial Enzymes. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. P. 461–476.
- 40. Морозова О.В., Шумакович Г.П., Горбачева М.А., Шлеев С.В., Ярополов А.И. «Голубые» лакказы (обзор) // Биохимия. 2007. Vol. 72, № 10. Р. 1396–1412.
- 41. Min K.-L., Kim Y.-H., Kim Y.W., Jung H.S., Hah Y.C. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis* // Arch. Biochem. Biophys. 2001. Vol. 392, № 2. P. 279–286.
- 42. de Souza C.G.M., Peralta R.M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium // J. Basic Microbiol. 2003. Vol. 43, № 4. P. 278–286.
- 43. Yaver D.S., Xu F., Golightly E.J., Brown K.M., Brown S.H., Rey M.W., Schneider P., Halkier T., Mondorf K., Dalboge H. Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62, № 3. P. 834–841.
- 44. Wahleithner J.A., Xu F., Brown K.M., Brown S.H., Golightly E.J., Halkier T., Kauppinen S., Pederson A., Schneider P. The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* // Curr. Genet. 1996. Vol. 29, № 4. P. 395–403.
- 45. Fernández-Larrea J., Stahl U. Isolation and characterization of a laccase gene from *Podospora anserina* // Mol. Gen. Genet. 1996. Vol. 252, № 5. P. 539–551.

- 46. Palmieri G., Cennamo G., Faraco V., Amoresano A., Sannia G., Giardina P. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures // Enzyme Microb. Technol. 2003. Vol. 33, № 2–3. P. 220–230.
- 47. Jones S.M., Solomon E.I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases // Cell. Mol. Life Sci. 2015. Vol. 72, № 5. P. 869–883.
- 48. Claus H. Laccases: Structure, reactions, distribution // Micron. 2004. Vol. 35, № 1–2. P. 93–96.
- 49. Slomczynski D., Nakas J.P., Tanenbaum S.W. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34 // Appl. Environ. Microbiol. 1995. Vol. 61, № 3. P. 907–912.
- 50. Muñoz C., Guillén F., Martínez A.T., Martínez M.J. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation // Appl. Environ. Microbiol. 1997. Vol. 63, № 6. P. 2166–2174.
- 51. 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. Vol. 57, № 1–2. P. 98–102.
- 52. Brown M.A., Zhao Z., Grant Mauk A. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor* // Inorganica Chim. Acta. 2002. Vol. 331, № 1. P. 232–238.
- 53. Saparrat M.C.N.N., Guillén F., Arambarri A.M., Martínez A.T., Martínez M.J., Guillen F., Arambarri A.M., Martinez A.T., Martinez M.J. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida* // Appl. Environ. Microbiol. 2002. Vol. 68, № 4. P. 1534–1540.
- 54. Rydén L.G., Hunt L.T. Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins // J. Mol. Evol. 1993. Vol. 36, № 1. P. 41–66.
- 55. Rodgers C.J., Blanford C.F., Giddens S.R., Skamnioti P., Armstrong F.A., Gurr S.J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? // Trends Biotechnol. 2010. Vol. 28, № 2. P. 63–72.
- 56. Hildén K., Hakala T.K., Lundell T. Thermotolerant and thermostable laccases // Biotechnol. Lett. 2009. Vol. 31, № 8. P. 1117–1128.
- 57. Li K., Xu F., Eriksson K.E.L. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound // Appl. Environ. Microbiol. 1999. Vol. 65, № 6. P. 2654–2660.
- 58. Xu Y., Hong Y., Xiao Y., Fang W. Preparation and application of polyclonal antibody against a recombinant laccase // Cell. Mol. Immunol. 2007. Vol. 4, № 4. P. 315–317.
- 59. Vite-Vallejo O., Palomares L. a., Dantán-González E., Ayala-Castro H.G., Martínez-Anaya C., Valderrama B., Folch-Mallol J. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase // Enzyme Microb. Technol. 2009. Vol. 45, № 3. P. 233–239.
- 60. Maestre-Reyna M., Liu W.C., Jeng W.Y., Lee C.C., Hsu C.A., Wen T.N., Wang A.H.J., Shyur L.F. Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus*

- sp. // PLoS One. 2015. Vol. 10, № 4. P. 1–28.
- 61. Lisova Z.A., Lisov A.V., Leontievsky A.A. Two laccase isoforms of the basidiomycete *Cerrena unicolor* VKMF-3196. Induction, isolation and properties // J. Basic Microbiol. 2010. Vol. 50, № 1. P. 72–82.
- 62. Васина Д.В., Логинов Д.С., Королева О.В. Сравнительный анализ протеома базидиального гриба Trametes hirsuta при культивировании на средах различного состава // Биохимия. 2013. Vol. 78, № 5. Р. 627–636.
- 63. Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272, № 2. P. 924–928.
- 64. Calvo A.M., Copa-Patiño J.L., Alonso O., González A.E. Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Coriolopsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents // Arch. Microbiol. 1998. Vol. 171, № 1. P. 31–36.
- 65. Dong J.L., Zhang Y.Z. Purification and characterization of two laccase isoenzymes from a ligninolytic fungus *Trametes gallica* // Prep. Biochem. Biotechnol. 2004. Vol. 34, № 2. P. 179–194.
- 66. Enguita F.J., Martins L.O., Henriques A.O., Carrondo M.A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component. A laccase with enhanced thermostability properties // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, № 21. P. 19416–19425.
- 67. Coll P.M., Fernández-Abalos J.M., Villanueva J.R., Santamaría R., Pérez P. Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). // Appl. Environ. Microbiol. 1993. Vol. 59, № 8. P. 2607–2613.
- 68. Koroleva O. V., Stepanova E. V, Binukov V.I., Timofeev V.P., Pfeil W. Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus* // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1547, № 2. P. 397–407.
- 69. Reiss R., Ihssen J., Richter M., Eichhorn E., Schilling B., Thöny-Meyer L. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 6. P. e65633.
- 70. Blaich R., Esser K. Function of enzymes in wood destroying fungi II. Multiple forms of laccase in white rot fungi // Arch. Microbiol. 1975. Vol. 103, № 1. P. 271–277.
- 71. Fåhraeus G., Ljunggren H. Substrate specificity of a purified fungal laccase // Biochim. Biophys. Acta. 1961. Vol. 46, № 1. P. 22–32.
- 72. Fåhraeus G. Monophenolase and polyphenolase activity of fungal laccase // Biochim. Biophys. Acta. 1961. Vol. 54, № 1. P. 192–194.
- 73. Scháněl L., Esser K. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina* // Arch. Mikrobiol. 1971. Vol. 77, № 2. P. 111–117.
- 74. Garzillo A.M., Colao M.C., Caruso C. Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. Vol. 49. P. 545–551.
- 75. Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition // Biochemistry. 1996.

- Vol. 35, № 23. P. 7608–7614.
- 76. Frasconi M., Favero G., Boer H., Koivula A., Mazzei F. Kinetic and biochemical properties of high and low redox potential laccases from fungal and plant origin // Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol. 1804, № 4. P. 899–908.
- 77. Lahtinen M., Kruus K., Boer H., Kemell M., Andberg M., Viikari L. The effect of lignin model compound structure on the rate of oxidation catalyzed by two different fungal laccases // J. Mol. Catal. 2009. Vol. 57. P. 204–210.
- 78. Xu F., Berka R.M., Wahleithner J., Nelson B. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile // Biochem. J. 1998. Vol. 70. P. 63–70.
- 79. Shleev S., Christenson A., Serezhenkov V., Burbaev D., Yaropolov A., Gorton L., Ruzgas T. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode // Biochem. J. 2005. Vol. 385, № Pt 3. P. 745–754.
- 80. Reinhammar B.R.M. Oxidation-reduction potentials of the electron acceptors in laccases and stellacyanin // BBA Bioenerg. 1972. Vol. 275, № 2. P. 245–259.
- 81. Farver O., Wherland S., Koroleva O., Loginov D.S., Pecht I. Intramolecular electron transfer in laccases // FEBS J. 2011. Vol. 278, № 18. P. 3463–3471.
- 82. Shleev S. V, Morozova O. V, Nikitina O. V, Gorshina E.S., Rusinova T. V, Serezhenkov V.A., Burbaev D.S., Gazaryan I.G., Yaropolov A.I. Comparison of physico-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes // Biochimie. 2004. Vol. 86, № 9–10. P. 693–703.
- 83. Garzillo A.M., Colao M.C., Buonocore V., Oliva R., Falcigno L., Saviano M., Santoro a M., Zappala R., Bonomo R.P., Bianco C., Giardina P., Palmieri G., Sannia G. Structural and kinetic characterization of native laccases from *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*, and *Trametes trogii* // J. Protein Chem. 2001. Vol. 20, № 3. P. 191–201.
- 84. Mate D.M., Garcia-Ruiz E., Camarero S., Shubin V. V., Falk M., Shleev S., Ballesteros A., Alcalde M. Switching from blue to yellow: altering the spectral properties of a high redox potential laccase by directed evolution // Biocatal. Biotransformation. 2013. Vol. 31, № 1. P. 8–21.
- 85. Shleev S., Nikitina O., Christenson A., Reimann C.T., Yaropolov A.I., Ruzgas T., Gorton L. Characterization of two new multiforms of *Trametes pubescens* laccase // Bioorg. Chem. 2007. Vol. 35, № 1. P. 35–49.
- 86. Klonowska A., Gaudin C., Fournel A., Asso M., Le Petit J., Giorgi M., Tron T. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30 // Eur. J. Biochem. 2002. Vol. 269, № 24. P. 6119–6125.
- 87. Osipov E., Polyakov K., Kittl R., Shleev S., Dorovatovsky P., Tikhonova T., Hann S., Ludwig R., Popov V. Effect of the L499M mutation of the ascomycetous *Botrytis aclada* laccase on redox potential and catalytic properties // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2014. Vol. 70, № 11. P. 2913–2923.
- 88. Bonomo R.P., Boudet A.M., Cozzolino R., Rizzarelli E., Santoro A.M., Sterjiades R., Zappalà R. A comparative study of two isoforms of laccase secreted by the "white-rot" fungus *Rigidoporus lignosus*, exhibiting significant structural and functional differences //

- J. Inorg. Biochem. 1998. Vol. 71, № 3–4. P. 205–211.
- 89. Sadhasivam S., Savitha S., Swaminathan K., Lin F.H. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1 // Process Biochem. 2008. Vol. 43, № 7. P. 736–742.
- 90. Schneider P., Caspersen M.B., Mondorf K., Halkier T., Skov L.K., Østergaard P.R., Brown K.M., Brown S.H., Xu F. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase // Enzyme Microb. Technol. 1999. Vol. 25, № 6. P. 502–508.
- 91. Jung H., Xu F., Li K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7 // Enzyme Microb. Technol. 2002. Vol. 30, № 2. P. 161–168.
- 92. Klonowska A., Gaudin C., Asso M., Fournel A., Réglier M., Tron T. LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast // Enzyme Microb. Technol. 2005. Vol. 36, № 1. P. 34–41.
- 93. Andberg M., Hakulinen N., Auer S., Saloheimo M., Koivula A., Rouvinen J., Kruus K. Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure // FEBS J. 2009. Vol. 276, № 21. P. 6285–6300.
- 94. Melo E.P., Fernandes A.T., Durão P., Martins L.O. Insight into stability of CotA laccase from the spore coat of *Bacillus subtilis* // Biochem. Soc. Trans. 2007. Vol. 35, № 6. P. 1579–1582.
- 95. Miura Y., Tsujimura S., Kurose S., Kamitaka Y., Kataoka K., Sakurai T., Kano K. Direct electrochemistry of CueO and its mutants at residues to and near Type I Cu for oxygen-reducing biocathode // Fuel Cells. 2009. Vol. 9, № 1. P. 70–78.
- 96. Gallaway J., Wheeldon I., Rincon R., Atanassov P., Banta S., Barton S.C. Oxygen-reducing enzyme cathodes produced from SLAC, a small laccase from *Streptomyces coelicolor* // Biosens. Bioelectron. 2008. Vol. 23, № 8. P. 1229–1235.
- 97. Fernandes A.T., Damas J.M., Todorovic S., Huber R., Baratto M.C., Pogni R., Soares C.M., Martins L.O. The multicopper oxidase from the archaeon *Pyrobaculum aerophilum* shows nitrous oxide reductase activity // FEBS J. 2010. Vol. 277, № 15. P. 3176–3189.
- 98. Gunne M., Höppner A., Hagedoorn P., Urlacher V.B. Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviceus* // FEBS J. 2014. Vol. 281, № 18. P. 4307–4318.
- 99. Gavnholt B., Larsen K. Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation // Physiol. Plant. 2002. Vol. 116, № 3. P. 273–280.
- 100. Kumar S.V.S., Phale P.S., Durani S., Wangikar P.P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family // Biotechnol. Bioeng. 2003. Vol. 83, № 4. P. 386–394.
- 101. Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Ostergaard P., Shneider P., Yaver D.S., Pedersen A.H., Davies G.J. Crystal structure of type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus Cinereus* at 2,2 A resolution // Nat. Struct. Biol. 1998. Vol. 5, № 4. P. 310–316.

- 102. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank, 1999–// International Tables for Crystallography. Chester, England: International Union of Crystallography, 2006. P. 675–684.
- 103. Messerschmidt A., Ladenstein R., Huber R., Bolognesi M., Avigliano L., Petruzzelli R., Rossi A., Finazzi-Agró A. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution // J. Mol. Biol. 1992. Vol. 224, № 1. P. 179–205.
- 104. Bento I., Peixoto C., Zaitsev V.N., Lindley P.F. Ceruloplasmin revisited: structural and functional roles of various metal cation-binding sites // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2007. Vol. 63, № 2. P. 240–248.
- 105. Hakulinen N., Rouvinen J. Three-dimensional structures of laccases // Cell. Mol. Life Sci. 2015. Vol. 72, № 5. P. 857–868.
- 106. Skálová T., Dohnálek J., Østergaard L.H., Østergaard P.R., Kolenko P., Dušková J., Štěpánková A., Hašek J. The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases // J. Mol. Biol. 2009. Vol. 385, № 4. P. 1165–1178.
- 107. 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. Vol. 583, № 7. P. 1189–1195.
- 108. Durão P., Chen Z., Silva C.S., Soares C.M., Pereira M.M., Todorovic S., Hildebrandt P., Bento I., Lindley P.F., Martins L.O. 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. Vol. 412, № 2. P. 339–346.
- 109. Xu F., Palmer A.E., Yaver D.S., Berka R.M., Gambetta G.A., Brown S.H., Solomon E.I. Targeted mutations in a *Trametes villosa* laccase // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274, № 18. P. 12372–12375.
- 110. Matera I., Gullotto A., Tilli S., Ferraroni M., Scozzafava A., Briganti F. Crystal structure of the blue multicopper oxidase from the white-rot fungus *Trametes trogii* complexed with p-toluate // Inorganica Chim. Acta. 2008. Vol. 361, № 14–15. P. 4129–4137.
- 111. Macellaro G., Baratto M.C., Piscitelli A., Pezzella C., Fabrizi De Biani F., Palmese A., Piumi F., Record E., Basosi R., Sannia G. Effective mutations in a high redox potential laccase from *Pleurotus ostreatus* // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 98, № 11. P. 4949–4961.
- 112. Kallio J., Auer S., Jänis J., Andberg M., Kruus K., Rouvinen J., Koivula A., Hakulinen N. Structure–function studies of a *Melanocarpus albomyces* laccase suggest a pathway for oxidation of phenolic compounds // J. Mol. Biol. 2009. Vol. 392, № 4. P. 895–909.
- 113. Polyakov K.M., Fedorova T. V., Stepanova E. V., Cherkashin E.A., Kurzeev S.A., Strokopytov B. V., Lamzin V.S., Koroleva O. V. Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 A resolution. // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2009. Vol. 65, № Pt 6. P. 611–617.
- 114. Ferraroni M., Matera I., Chernykh A.M., Kolomytseva M., Golovleva L.A., Scozzafava A., Briganti F. Reaction intermediates and redox state changes in a blue laccase from

- *Steccherinum ochraceum* observed by crystallographic high/low X-ray dose experiments // J. Inorg. Biochem. 2012. Vol. 111. P. 203–209.
- 115. Ferraroni M., Myasoedova N.M., Schmatchenko V., Leontievsky A.A., Golovleva L.A., Scozzafava A., Briganti F. 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. Vol. 7, № 1. P. 60.
- 116. Komori H., Sugiyama R., Kataoka K., Miyazaki K., Higuchi Y., Sakurai T. New insights into the catalytic active-site structure of multicopper oxidases // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2014. Vol. 70, № 3. P. 772–779.
- 117. Bento I., Martins L.O., Gato Lopes G., Arménia Carrondo M., Lindley P.F. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective // Dalt. Trans. 2005. Vol. 4, № 21. P. 3507–3513.
- 118. De la Mora E., Lovett J.E., Blanford C.F., Garman E.F., Valderrama B., Rudino-Pinera E. Structural changes caused by radiation-induced reduction and radiolysis: the effect of X-ray absorbed dose in a fungal multicopper oxidase // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2012. Vol. 68. P. 564–577.
- 119. Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Ostergaard P., Shneider P., Svendson A., Davies G.J. Structure of the laccase from *Coprinus cinereus* at 1.68A resolution: evidence for "different type 2 Cu-depleted" isoforms // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2001. Vol. D57. P. 333–336.
- 120. Li X., Wei Z., Zhang M., Peng X., Yu G., Teng M., Gong W. Crystal structures of *E. coli* laccase CueO at different copper concentrations. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. Vol. 354, № 1. P. 21–26.
- 121. Bento I., Silva C., Chen Z. Mechanisms underlying dioxygen reduction in laccases. Structural and modelling studies focusing on proton transfer // BMC Struct. Biol. 2010. Vol. 10, № 28. P. 1–14.
- 122. Graziani M., Morpurgo L., Rotilio G., Mondovì B. Selective removal of type 2 copper from *Rhus vernicifera* laccase // FEBS Lett. 1976. Vol. 70, № 1. P. 0–3.
- 123. Klemens A.S., Mcmillin D.R. New method for removing Type 2 copper from Rhus laccase // J. Inorg. Biochem. 1990. Vol. 38. P. 107–115.
- 124. Koroleva O. V., Stepanova E. V, Gavrilova V.P., Biniukov V.I., Pronin A.M. Comparative characterization of methods for removal of Cu(II) from the active sites of fungal laccases // Biochem. Biokhimiia. 2001. Vol. 66, № 9. P. 960–966.
- 125. Durão P., Chen Z., Fernandes A.T., Hildebrandt P., Murgida D.H., Todorovic S., Pereira M.M., Melo E.P., Martins L.O. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes // J. Biol. Inorg. Chem. 2008. Vol. 13, № 2. P. 183–193.
- 126. Galli I., Musci G., Bonaccorsi di Patti M.C. Sequential reconstitution of copper sites in the multicopper oxidase CueO // J. Biol. Inorg. Chem. 2004. Vol. 9, № 1. P. 90–95.
- 127. Singh S.K., Roberts S.A., McDevitt S.F., Weichsel A., Wildner G.F., Grass G.B., Rensing C., Montfort W.R. Crystal structures of multicopper oxidase CueO bound to copper(I) and

- silver(I): functional role of a methionine-rich sequence // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286, N 43. P. 37849–37857.
- 128. Hakulinen N., Andberg M., Kallio J., Koivula A., Kruus K., Rouvinen J. A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase // J. Struct. Biol. 2008. Vol. 162. P. 29–39.
- 129. Bertrand T., Jolivalt C., Briozzo P., Caminade E., Joly N., Madzak C., Mougin C. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: insights into substrate recognition and correlation with kinetics // Biochemistry. 2002. Vol. 41, № 23. P. 7325–7333.
- 130. Xie T., Liu Z., Liu Q., Wang G. Structural insight into the oxidation of sinapic acid by CotA laccase // J. Struct. Biol. 2015. Vol. 190, № 2. P. 155–161.
- 131. Enguita F.J., Marçal D., Martins L.O., Grenha R., Henriques A.O., Lindley P.F., Carrondo M.A. Substrate and dioxygen binding to the endospore coat laccase from *Bacillus subtilis* // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, № 22. P. 23472–23476.
- 132. Liu Z., Xie T., Zhong Q., Wang G. Crystal structure of CotA laccase complexed with 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) at a novel binding site // Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun. 2016. Vol. 72. P. 328–335.
- 133. Madzak C., Mimmi M.C., Caminade E., Brault A., Baumberger S., Briozzo P., Mougin C., Jolivalt C. Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis // Protein Eng. Des. Sel. 2006. Vol. 19, № 2. P. 77–84.
- 134. Galli C., Gentili P., Jolivalt C. How is the reactivity of laccase affected by single-point mutations? Engineering laccase for improved activity towards sterically demanding substrates // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. P. 123–131.
- 135. Cole J.L., Clark P.A., Solomon E.I. Spectroscopic and chemical studies of the laccase trinuclear copper active site: geometric and electronic structure // J. Am. Chem. Soc. 1990. Vol. 112, № 26. P. 9534–9548.
- 136. Lee S.K., George S.D.B., Antholine W.E., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I. Nature of the intermediate formed in the reduction of O₂ to H₂O at the trinuclear copper cluster active site in native laccase // J. Am. Chem. Soc. 2002. Vol. 124, № 21. P. 6180–6193.
- 137. Palmer A.E., Sang Kyu Lee, Solomon E.I. Decay of the peroxide intermediate in laccase: reductive cleavage of the O-O bond // J. Am. Chem. Soc. 2001. Vol. 123, № 27. P. 6591–6599.
- 138. Zoppellaro G., Sakurai T., Huang H.W. A novel mixed valence form of *Rhus vernicifera* laccase and its reaction with dioxygen to give a peroxide intermediate bound to the trinuclear center // J. Biochem. 2001. Vol. 129, № 6. P. 949–953.
- 139. Augustine A.J., Kragh M.E., Sarangi R., Fujii S., Liboiron B.D., Stoj C.S., Kosman D.J., Hodgson K.O., Hedman B., Solomon E.I. Spectroscopic studies of perturbed T1 Cu sites in the multicopper oxidases *Saccharomyces cerevisiae* Fet3p and *Rhus vernicifera* laccase: allosteric coupling between the T1 and trinuclear Cu sites // Biochemistry. 2008. Vol. 47, № 7. P. 2036–2045.

- 140. Augustine A.J., Quintanar L., Stoj C.S., Kosman D.J., Solomon E.I. Spectroscopic and kinetic studies of perturbed trinuclear copper clusters: the role of protons in reductive cleavage of the O-O bond in the multicopper oxidase Fet3p // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129, № 43. P. 13118–13126.
- 141. Augustine A.J., Kjaergaard C., Qayyum M., Ziegler L., Kosman D.J., Hodgson K.O., Hedman B., Solomon E.I. Systematic perturbation of the trinuclear copper cluster in the multicopper oxidases: the role of active site asymmetry in its reduction of O₂ to H₂O. // J. Am. Chem. Soc. 2010. Vol. 132, № 17. P. 6057–6067.
- 142. Quintanar L., Yoon J., Aznar C.P., Palmer A.E., Andersson K.K., Britt R.D., Solomon E.I. Spectroscopic and electronic structure studies of the trinuclear Cu cluster active site of the multicopper oxidase laccase: nature of its coordination unsaturation // J. Am. Chem. Soc. 2005. Vol. 127, № 40. P. 13832–13845.
- 143. Yoon J., Solomon E. Electronic structure of the peroxy intermediate and its correlation to the native intermediate in the multicopper oxidases: insights into the reductive cleavage of the O-O bond // J. Am. Chem. Soc. 2007. Vol. 129, № 43. P. 13127–13136.
- 144. Shin W., Sundaram U.M., Cole J.L., Zhang H.H., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I. Chemical and spectroscopic definition of the peroxide-level intermediate in the multicopper oxidases: relevance to the catalytic mechanism of dioxygen reduction to water // J. Am. Chem. Soc. 1996. Vol. 118, № 13. P. 3202–3215.
- 145. Chen Z., Durão P., Silva C.S., Pereira M.M., Todorovic S., Hildebrandt P., Bento I., Lindley P.F., Martins L.O. The role of Glu498 in the dioxygen reactivity of CotA-laccase from *Bacillus subtilis* // Dalt. Trans. 2010. Vol. 39, № 11. P. 2875–2882.
- 146. Silva C.S., Durão P., Fillat A., Lindley P.F., Martins L.O., Bento I. Crystal structure of the multicopper oxidase from the pathogenic bacterium *Campylobacter jejuni* CGUG11284: characterization of a metallo-oxidase // Metallomics. 2012. Vol. 4, № 1. P. 37–47.
- 147. Heppner D.E., Kjaergaard C.H., Solomon E.I. Molecular origin of rapid versus slow intramolecular electron transfer in the catalytic cycle of the multicopper oxidases // J. Am. Chem. Soc. 2013. Vol. 135, № 33. P. 12212–12215.
- 148. Horrell S., Antonyuk S. V., Eady R.R., Hasnain S.S., Hough M.A., Strange R.W. Serial crystallography captures enzyme catalysis in copper nitrite reductase at atomic resolution from one crystal // IUCrJ. 2016. Vol. 3. P. 271–281.
- 149. Trofimov A.A., Polyakov K.M., Lazarenko V.A., Popov A.N., Tikhonova T. V, Tikhonov A. V, Popov V.O. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reaction of octahaem cytochrome c nitrite reductase // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2015. Vol. 71, № 5. P. 1087–1094.
- 150. Garman E.F. Radiation damage in macromolecular crystallography: What is it and why do we care? // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2010. Vol. 66, P. 339–351.
- 151. Beitlich T., Kühnel K., Schulze-Briese C., Shoeman R.L., Schlichting I. Cryoradiolytic reduction of crystalline heme proteins: Analysis by UV-Vis spectroscopy and X-ray crystallography // J. Synchrotron Radiat. 2007. Vol. 14, № 1. P. 11–23.
- 152. Hakulinen N., Kruus K., Koivula A., Rouvinen J. 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. № 350. P. 929–934.
- 153. Serrano-Posada H., Centeno-Leija S., Rojas-Trejo S.P., Rodríguez-Almazán C., Stojanoff V., Rudiño-Piñera E. X-ray-induced catalytic active-site reduction of a multicopper oxidase: Structural insights into the proton-relay mechanism and O₂-reduction states // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2015. Vol. 71. P. 2396–2411.
- 154. Komori H., Higuchi Y. Structural insights into the O₂ reduction mechanism of multicopper oxidase // J. Biochem. 2015. Vol. 158, № 4. P. 293–298.
- 155. Piscitelli A., Pezzella C., Lettera V., Giardina P., Faraco V., Sannia G. Fungal laccases: structure, function and applications // Fungal enzymes: progress and prospects / ed. de Lourdes M., Polizeli T. M., Rai, M.: CRC Press, 2013. P. 113–151.
- 156. Pezzella C., Guarino L., Piscitelli A. How to enjoy laccases // Cell. Mol. Life Sci. 2015. Vol. 72, № 5. P. 923–940.
- 157. Strong P.J., Claus H. Laccase: A review of its past and its future in bioremediation // Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 2011. Vol. 41, № 4. P. 373–434.
- 158. Alcalde M., Bulter T., Arnold F.H. Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases // J. Biomol. Screen. 2002. Vol. 7, № 6. P. 547–553.
- 159. Gayosso-Canales M., Rodríguez-Vázquez R., Esparza-García F.J., Bermúdez-Cruz R.M. PCBs stimulate laccase production and activity in *Pleurotus ostreatus* thus promoting their removal // Folia Microbiol. (Praha). 2012. Vol. 57, № 2. P. 149–158.
- 160. Bollag J.-M. Enzymatic binding of pesticide degradation products to soil organic matter and their possible release // Pestic. Transform. Prod. 1991. Vol. 459. P. 122-132 SE 9.
- 161. Bollag J.-M.M., Myers C. Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances // Sci. Total Environ. 1992. Vol. 117–118, № C. P. 357–366.
- 162. Collins P.J., Kotterman M.J.J., Field J.A., Dobson A.D.W. Oxidation of anthracene and benzo[α]pyrene by laccases from *Trametes versicolor* // Appl. Environ. Microbiol. 1996. Vol. 62, № 12. P. 4563–4567.
- 163. Johannes C., Majcherczyk A., Hüttermann A. Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1996. Vol. 46, № 3. P. 313–317.
- 164. Kudanga T., Nyanhongo G.S., Guebitz G.M., Burton S. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review // Enzyme Microb. Technol. 2011. Vol. 48, № 3. P. 195–208.
- 165. Singh Arora D., Kumar Sharma R. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. Vol. 160, № 6. P. 1760–1788.
- 166. Virk A.P., Sharma P., Capalash N. Use of laccase in pulp and paper industry // Biotechnol. Prog. 2011. Vol. 28, № 1. P. 21–32.
- 167. Elegir G., Kindl a., Sadocco P., Orlandi M. Development of antimicrobial cellulose packaging through laccase-mediated grafting of phenolic compounds // Enzyme Microb.

- Technol. 2008. Vol. 43, № 2. P. 84–92.
- 168. Fillat A., Gallardo O., Vidal T., Pastor F.I.J., Díaz P., Roncero M.B. Enzymatic grafting of natural phenols to flax fibres: development of antimicrobial properties // Carbohydr. Polym. 2012. Vol. 87, № 1. P. 146–152.
- 169. Lantto R., Schonberg C., Buchert J., Heine E. Effects of laccase-mediator combinations on wool // Text. Res. J. 2004. Vol. 74, № 8. P. 713–717.
- 170. Hossain K.M.G., González M.D., Juan A.R., Tzanov T. Enzyme-mediated coupling of a bi-functional phenolic compound onto wool to enhance its physical, mechanical and functional properties // Enzyme Microb. Technol. 2010. Vol. 46, № 3–4. P. 326–330.
- 171. Zhang Y.Y., Dong A., Wang Q., Fan X., Cavaco-Paulo A., Zhang Y.Y. Conductive cotton prepared by polyaniline in situ polymerization using laccase // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. Vol. 174, № 2. P. 820–831.
- 172. Pereira L., Bastos C., Tzanov T., Cavaco-Paulo A., Guebitz G.M. Environmentally friendly bleaching of cotton using laccases // Environ. Chem. Lett. 2005. Vol. 3, № 2. P. 66–69.
- 173. Tzanov T., Basto C., Gübitz G.M., Cavaco-Paulo A. Laccases to improve the whiteness in a conventional: bleaching of cotton // Macromol. Mater. Eng. 2003. Vol. 288, № 10. P. 807–810.
- 174. Tian L., Branford-White C., Wang W., Nie H., Zhu L. Laccase-mediated system pretreatment to enhance the effect of hydrogen peroxide bleaching of cotton fabric // Int. J. Biol. Macromol. 2012. Vol. 50, № 3. P. 782–787.
- 175. Ren X., Buschle-Diller G. Oxidoreductases for modification of linen fibers // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2007. Vol. 299, № 1–3. P. 15–21.
- 176. Polak J., Jarosz-Wilkolazka A. Structure/Redox potential relationship of simple organic compounds as potential precursors of dyes for laccase-mediated transformation // Biotechnol. Prog. 2012. Vol. 28, № 1. P. 93–102.
- 177. Polak J., Jarosz-Wilkołazka A. Whole-cell fungal transformation of precursors into dyes // Microb. Cell Fact. 2010. Vol. 9, № 1. P. 51.
- 178. Forte S., Polak J., Valensin D., Taddei M., Basosi R., Vanhulle S., Jarosz-Wilkolazka A., Pogni R. Synthesis and structural characterization of a novel phenoxazinone dye by use of a fungal laccase // J. Mol. Catal. B Enzym. 2010. Vol. 63, № 3–4. P. 116–120.
- 179. Bruyneel F., Enaud E., Billottet L., Vanhulle S., Marchand-Brynaert J. Regioselective synthesis of 3-hydroxyorthanilic acid and its biotransformation into a novel phenoxazinone dye by use of laccase // European J. Org. Chem. 2008. № 1. P. 72–79.
- 180. Bruyneel F., Payen O., Rescigno A., Tinant B., Marchand-Brvnaert J. Laccase-mediated synthesis of novel substituted phenoxazine chromophores featuring tuneable water solubility // Chem. Eur. J. 2009. Vol. 15, № 33. P. 8283–8295.
- 181. Setti L., Giuliani S., Spinozzi G., Pifferi P.G. Laccase catalyzed-oxidative of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazone and methoxyphenols // Enz. Microb. Tech. 1999. Vol. 25. P. 285–289.

- 182. Martorana A., Bernini C., Valensin D., Sinicropi A., Pogni R., Basosi R., Baratto M.C. Insights into the homocoupling reaction of 4-methylamino benzoic acid mediated by *Trametes versicolor* laccase // Mol. Biosyst. 2011. Vol. 7, № 11. P. 2967.
- 183. Enaud E., Trovaslet M., Bruyneel F., Billottet L., Karaaslan R., Sener M.E., Coppens P., Casas A., Jaeger I.J., Hafner C., Onderwater R.C.A., Corbisier A.M., Marchand-Brynaert J., Vanhulle S. A novel azoanthraquinone dye made through innovative enzymatic process // Dye. Pigment. 2010. Vol. 85, № 3. P. 99–108.
- 184. Labat E., Morel M.H., Rouau X. Wheat gluten phenolic acids: Occurrence and fate upon mixing // J. Agric. Food Chem. 2000. Vol. 48, № 12. P. 6280–6283.
- 185. Tanriöven D., Ekşi A. Phenolic compounds in pear juice from different cultivars // Food Chem. 2005. Vol. 93, № 1. P. 89–93.
- 186. Minussi R.C., Pastore G.M., Durán N. Potential applications of laccase in the food industry // Trends Food Sci. Technol. 2002. Vol. 13, № 6–7. P. 205–216.
- 187. Minussi R.C., Rossi M., Bologna L., Rotilio D., Pastore G.M., Durán N. Phenols removal in musts: Strategy for wine stabilization by laccase // J. Mol. Catal. B Enzym. 2007. Vol. 45, № 3–4. P. 102–107.
- 188. Ritter G., Maier G., Schoepplein E., Dietrich H. The application of polyphenoloxidase in the processing of apple juice // Bull. Liaison Groupe Polyphenols. 1992.
- 189. Cantarelli C., Giovanelli G. Stabilization of pome and grape juice against phenolic deterioration by enzymic treatments // Internationale Fruchtsaft-Union, Wissenschaftlich-Technische Commission. 1990. Vol. 21. P. 35–57.
- 190. Gassara-Chatti F., Brar S.K., Ajila C.M., Verma M., Tyagi R.D., Valéro J.R. Encapsulation of ligninolytic enzymes and its application in clarification of juice // Food Chem. 2013. Vol. 137, № 1–4. P. 18–24.
- 191. Es-Safi N.-E., Ghidouche S., Ducrot P.H. Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity // Molecules. 2007. Vol. 12, № 9. P. 2228–2258.
- 192. Shumakovich G., Kurova V., Vasil'Eva I., Pankratov D., Otrokhov G., Morozova O., Yaropolov A. Laccase-mediated synthesis of conducting polyaniline // J. Mol. Catal. B Enzym. 2012. Vol. 77. P. 105–110.
- 193. George P.M., Lyckman A.W., Lavan D.A., Hegde A., Leung Y., Avasare R., Testa C., Alexander P.M., Langer R., Sur M. Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics // Biomaterials. 2005. Vol. 26, № 17. P. 3511–3519.
- 194. Mikolasch A., Hessel S., Salazar M.G., Neumann H., Manda K., Gördes D., Schmidt E., Thurow K., Hammer E., Lindequist U., Beller M., Schauer F. Synthesis of new Nanalogous corollosporine derivatives with antibacterial activity by laccase-catalyzed amination // Chem. Pharm. Bull. (Tokyo). 2008. Vol. 56, № 6. P. 781–786.
- 195. Mikolasch A., Schauer F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2009. P. 605–624.
- 196. Mikolasch A., Hammer E., Jonas U., Popowski K., Stielow A., Schauer F. Synthesis of 3-

- (3, 4-dihydroxyphenyl)-propionic acid derivatives by N-coupling of amines using laccase // Tetrahedron. 2002. Vol. 58, № 38. P. 7589–7593.
- 197. Mikolasch A., Niedermeyer T.H.J., Lalk M., Witt S., Seefeldt S., Hammer E., Schauer F., Gesell M., Hessel S., Jülich W.-D. Novel penicillins synthesized by biotransformation using laccase from Trametes spec. // Chem. Pharm. Bull. 2006. Vol. 54, № 5. P. 632–638.
- 198. Fontana G, Baldelli E, Riva S D.B. Process for the preparation of bisindole alkaloid derivatives: pat. WO 2009153025 A1 USA. 2009.
- 199. Sagui F., Chirivì C., Fontana G., Nicotra S., Passarella D., Riva S., Danieli B. Laccase-catalyzed coupling of catharanthine and vindoline: an efficient approach to the bisindole alkaloid anhydrovinblastine // Tetrahedron. 2009. Vol. 65, № 1. P. 312–317.
- 200. Herter S., Michalik D., Mikolasch A., Schmidt M., Wohlgemuth R., Bornscheuer U., Schauer F. Laccase-mediated synthesis of 2-methoxy-3-methyl-5-(alkylamino)-and 3-methyl-2, 5-bis (alkylamino)-[1, 4]-benzoquinones // J. Mol. Catal. B Enzym. 2013. Vol. 90. P. 91–97.
- 201. Wang H.X., Ng T.B. Purification of a novel low-molecular-mass laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the mushroom *Tricholoma giganteum* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004. Vol. 315, № 2. P. 450–454.
- 202. Zhang G.-Q., Chen Q.-J., Wang H.-X., Ng T.B. A laccase with inhibitory activity against HIV-1 reverse transcriptase from the mycorrhizal fungus *Lepiota ventriosospora* // J. Mol. Catal. B Enzym. 2013. Vol. 85. P. 31–36.
- 203. Sun J., Wang H., Ng T.B. Isolation of a laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from fresh fruiting bodies of the *Lentinus edodes* (Shiitake mushroom). NISCAIR-CSIR, India, 2011.
- 204. Sun J., Chen Q.-J., Cao Q.-Q., Wu Y.-Y., Xu L.-J., Zhu M.-J., Ng T.-B., Wang H.-X., Zhang G.-Q. A laccase with antiproliferative and HIV-I reverse transcriptase inhibitory activities from the mycorrhizal fungus *Agaricus placomyces* // Biomed Res. Int. 2012. Vol. 2012.
- 205. Wu X., Huang C., Chen Q., Wang H., Zhang J. A novel laccase with inhibitory activity towards HIV-I reverse transcriptase and antiproliferative effects on tumor cells from the fermentation broth of mushroom *Pleurotus cornucopiae* // Biomed. Chromatogr. 2014. Vol. 28, № 4. P. 548–553.
- 206. Zhao S., Rong C.-B.B., Kong C., Liu Y., Xu F., Miao Q.-J.J., Wang S.-X.X., Wang H.-X.X., Zhang G.-Q.Q. A novel laccase with potent antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from mycelia of mushroom *Coprinus comatus* // Biomed Res. Int. 2014. Vol. 2014.
- 207. Xu L., Wang H., Ng T. A laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the broth of mycelial culture of the mushroom *Lentinus tigrinus* // Biomed Res. Int. 2012. Vol. 2012.
- 208. Ho Wong J., Bun Ng T., Jiang Y., Liu F., Cho Wing Sze S., Yanbo Zhang K. Purification and characterization of a laccase with inhibitory activity toward HIV-1 reverse transcriptase and tumor cells from an edible mushroom (*Pleurotus cornucopiae*) // Protein Pept. Lett. 2010. Vol. 17, № 8. P. 1040–1047.

- 209. Fu J., Nyanhongo G.S., Gübitz G.M., Cavaco-Paulo A., Kim S. Enzymatic colouration with laccase and peroxidases: recent progress // Biocatal. Biotransformation. 2012. Vol. 30, № 1. P. 125–140.
- 210. Lavanya C., Dhankar R., Chhikara S., Sheoran S. Degradation of toxic dyes: a review // Int J Curr Microbiol App Sci. 2014. Vol. 3, № 6. P. 189–199.
- 211. Golz-Berner K, Walzel B, Zastrow L D.O. Cosmetic or dermatological preparation with skin-lightening proteins: pat. WO2004017931 USA. 2004.
- 212. Takase T, Narise A S.K. Deodorant composition: pat. WO2011105042 A1 USA. 2011.
- 213. Mano N., Durand F. Laccase of Podospora anserina and uses of same: pat. WO2013175399 A1 USA. 2013.
- 214. Xu F. Applications of oxidoreductases: recent progress // Ind. Biotechnol. 2005. Vol. 1, № 1. P. 38–50.
- 215. Marr C.D. Laccase and tyrosinase oxidation of spot test reagents [commonly used in the taxonomy of Basidiomycetes, Fungi] // Mycotaxon. 1979. Vol. 9. P. 244–276.
- 216. Archibald F.S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B // Appl. Environ. Microbiol. 1992. Vol. 58, № 9. P. 3110–3116.
- 217. Koroleva O. V., Yavmetdinov I.S., Shleev S. V., Stepanova E. V., Gavrilova V.P. Isolation and study of some properties of laccase from the basidiomycete *Cerrena maxima* // Biochem. 2001. Vol. 66, № 6. P. 618–622.
- 218. Koroljova-Skorobogat'ko O. V, Stepanova E. V, Gavrilova V.P., Morozova O. V, Lubimova N. V, Dzchafarova A.N., Jaropolov A.I., Makower A. Purification and characterization of the constitutive form of laccase from the basidiomycete *Coriolus hirsutus* and effect of inducers on laccase synthesis // Biotechnol. Appl. Biochem. 1998. Vol. 28 (Pt 1). P. 47–54.
- 219. Laemmli U. Relevant page on gel electrophoresis // Nature. 1970. Vol. 227. P. 681.
- 220. Королева О.В., Явметдинов И.С., Шлеев С.В., Степанова Е.В., Гаврилова В.П. Выделение и изучение некоторых свойств лакказ из базидиомицета *Cerrena maxima* // Биохимия. 2001. Vol. 66, № 6. Р. 762.
- 221. Park K.M., Park S.-S. Purification and characterization of laccase from basidiomycete *Fomitella fraxinea* // J. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 18, № 4. P. 670–675.
- 222. Rodríguez-Rincón F., Suarez A., Lucas M., Larrondo L.F., De La Rubia T., Polaina J., Martínez J. Molecular and structural modeling of the *Phanerochaete flavido-alba* extracellular laccase reveals its ferroxidase structure // Arch. Microbiol. 2010. Vol. 192, № 11. P. 883–892.
- 223. Fedorova T. V., Vilesov A.S., Kurzeev S.A., Stepanova E. V., Landesman E.O., Koroleva O. V. Development of a novel enzyme-redox-mediator system based on a fungal laccase and ruthenium complexes // Appl. Biochem. Microbiol. 2006. Vol. 42, № 6. P. 550–557.
- 224. Shin K.S., Kim C.J. Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus* // Biotechnol. Lett. 1998. Vol. 20, № 6. P. 569–572.

- 225. Gemeay A.H., Mansour I.A., El-Sharkawy R.G., Zaki A.B. Kinetics and mechanism of the heterogeneous catalyzed oxidative degradation of indigo carmine // J. Mol. Catal. A Chem. 2003. Vol. 193, № 1–2. P. 109–120.
- 226. O'Toole M., Lau K.T., Diamond D. Photometric detection in flow analysis systems using integrated PEDDs // Talanta. 2005. Vol. 66, № 5. P. 1340–1344.
- 227. Kang S.-O., Shin K.-S., Han Y.-H., Youn H.-D., Hah Y.C. Purification and characterisation of an extracellular peroxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* // Eur. J. Biochem. 1993. Vol. 215, № 3. P. 747–752.
- 228. Bourenkov G.P., Popov A.N. Optimization of data collection taking radiation damage into account // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2010. Vol. 66, № 4. P. 409–419.
- 229. Paithankar K.S., Owen R.L., Garman E.F. Absorbed dose calculations for macromolecular crystals: improvements to RADDOSE // J. Synchrotron Radiat. 2009. Vol. 16, № 2. P. 152–162.
- 230. Kabsch W. XDS // Acta Crystallogr. Sect. D. 2010. Vol. 66. P. 125–132.
- 231. Vagin A., Teplyakov A. Molecular replacement with MOLREP // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2010. Vol. 66, № 1. P. 22–25.
- 232. Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A. REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2011. Vol. 67, № 4. P. 355–367.
- 233. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and development of Coot // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2010. Vol. 66, № 4. P. 486–501.
- 234. Горбатова О.Н., Королёва О.В., Ландесман Е.О., Степанова Е.В., Жердев А.В. Индукция биосинтеза лакказы как способ увеличения потенциала детоксификации базидиомицетами // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Vol. 42, № 4. Р. 468–474.
- 235. Ребриков Д.Н., Степанова Е.В., Королева О.В., Бударина Ж.И., Захарова М.В., Юркова Т.В., Солонин А.С., Белова О.В., Пожидаева З.А., Леонтъевский А.А. Лакказа лигнинолитического гриба *Trametes hirsuta*: очистка и характеристика фермента, клонирование и первичная структура гена // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Vol. 42, № 6. Р. 645–653.
- 236. Moiseenko K. V., Maloshenok L.G., Vasina D. V., Bruskin S.A., Tyazhelova T. V., Koroleva O. V. Laccase multigene families in Agaricomycetes // J. Basic Microbiol. 2016. P. 1–6.
- 237. Okino L.K., Machado K.M.G., Fabris C., Bononi V.L.R. Ligninolytic activity of tropical rainforest basidiomycetes // World J. Microbiol. Biotechnol. 2000. Vol. 16, № 8–9. P. 889–893.
- 238. Pointing S.B. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi // Fungal Divers. 1999. Vol. 2, № March. P. 17–33.
- 239. Camarero S., Ibarra D., Martínez Á.T., Romero J., Gutiérrez A., del Río J.C. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators // Enzyme Microb. Technol. 2007.

- Vol. 40, № 5. P. 1264–1271.
- 240. Claus H., Faber G., König H. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2002. Vol. 59, № 6. P. 672–678.
- 241. Eggert C., Temp U., Dean J.F.D., Eriksson K.-E.L. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase // FEBS Lett. 1996. Vol. 391, № 1–2. P. 144–148.
- 242. Jong E., Field J.A., Bont J.A.M. Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi // FEMS Microbiol. Rev. 1994. Vol. 13, № 2–3. P. 153–187.
- 243. Vasina D. V, Pavlov A.R., Koroleva O. V. Extracellular proteins of *Trametes hirsuta* st. 072 induced by copper ions and a lignocellulose substrate // Bmc Microbiol. 2016. Vol. 16, № 1. P. 1–14.
- 244. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. Multicopper oxidases and oxygenases // Chem. Rev. 1996. Vol. 96, № 7. P. 2563–2606.
- 245. Vasina D. V., Mustafaev O.N., Moiseenko K. V., Sadovskaya N.S., Glazunova O.A., Tyurin A.A., Fedorova T. V., Pavlov A.R., Tyazhelova T. V., Goldenkova-Pavlova I. V., Koroleva O. V. The *Trametes hirsuta* 072 laccase multigene family: Genes identification and transcriptional analysis under copper ions induction // Biochimie. 2015. Vol. 116, № July. P. 154–164.
- 246. Chernykh A.M., Myasoedova N.M., Kolomytseva M., Ferraroni M., Briganti F., Scozzafava A., Golovleva L. Laccase isoforms with unusual properties from the basidiomycete *Steccherinum ochraceum* strain 1833 // J. Appl. Microbiol. 2008. Vol. 105, № 6. P. 2065–2075.
- 247. González M.D., Vidal T., Tzanov T. Electrochemical study of phenolic compounds as enhancers in laccase-catalyzed oxidative reactions // Electroanalysis. 2009. Vol. 21, № 20. P. 2249–2257.
- 248. Yakovleva K.E., Kurzeev S.A., Stepanova E. V., Fedorova T. V., Kuznetsov B.A., Koroleva O. V. Characterization of plant phenolic compounds by cyclic voltammetry // Appl. Biochem. Microbiol. 2007. Vol. 43, № 6. P. 730–739.
- 249. Suatoni J.C., Snyder R.E., Clark R.O. Voltammetric studies of phenol and aniline ring substitution // Anal. Chem. 1961. Vol. 33, № 13. P. 1894–1897.
- 250. Meyer H.W., Treadwell W.D. Über die Redoxpotentiale von einigen Polyoxyanthrachinonen und Küpenfarbstoffen // Helv. Chim. Acta. 1952. Vol. 35, № 5. P. 1444–1460.
- 251. Sun J., Hu Y.Y., Hou B. Electrochemical characteriztion of the bioanode during simultaneous azo dye decolorization and bioelectricity generation in an air-cathode single chambered microbial fuel cell // Electrochim. Acta. 2011. Vol. 56, № 19. P. 6874–6879.
- 252. Maijala P., Mattinen M.-L., Nousiainen P., Kontro J., Asikkala J., Sipilä J., Viikari L. Action of fungal laccases on lignin model compounds in organic solvents // J. Mol. Catal. B Enzym. 2012. Vol. 76, № 0. P. 59–67.
- 253. Dix N.J., Webster J. Fungal Ecology. Dordrecht: Springer Netherlands, 1995. 1–549 p.

- 254. Smirnov S.A., Koroleva O. V., Gavrilova V.P., Belova A.B., Klyachko N.L. Laccases from basidiomycetes: physicochemical characteristics and substrate specificity towards methoxyphenolic compounds // Biochem. 2001. Vol. 66, № 7. P. 774–779.
- 255. Camarero S., Ibarra D., Jesús Martínez M., Martínez N.T. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes // Appl. Environ. Microbiol. 2005. Vol. 71, № 4. P. 1775–1784.
- 256. Рабинович М.Л., Болобова А.В., Кондращенко В.И. Теоретические основа биотехнологии древесных композитов, книга І. Москва: "Наука," 2001.
- 257. Galli C., Madzak C., Vadalà R. Concerted electron/proton transfer mechanism in the oxidation of phenols by laccase // ChemBioChem. 2013. P. 2500–2505.
- 258. Tadesse M., D'Annibale A., Galli C. An assessment of the relative contributions of redox and steric issues to laccase specificity towards putative substrates // Org. Biomol. Chem. 2008. Vol. 6. P. 868–878.
- 259. Gupta R., Jung E., Brunak S. Prediction of N-glycosylation sites in human proteins http://www.cbs.dtu.dk/services.NetNGlyc, 2002.
- 260. Cruickshank D.W.J. Remarks about protein structure precision // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 1999. Vol. 55, № 3. P. 583–601.
- 261. Diederichs K., Karplus P.A. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography // Nat. Struct. Biol. 1997. Vol. 4, № 4. P. 269–275.
- 262. Komori H., Sugiyama R. 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. Vol. 51. P. 1861–1864.
- 263. Sigoillot C., Record E., Belle V., Robert J.L., Levasseur A., Punt P.J., van den Hondel C.A.M.J.J., Fournel A., Sigoillot J.C., Asther M. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004. Vol. 64, № 3. P. 346–352.
- 264. Griffith J.S., Orgel L.E. Ligand-field theory // Q. Rev. Chem. Soc. 1957. Vol. 11, \mathbb{N} 4. P. 381–393.
- 265. Cotton F.A., Wilkinson G. Advanced inorganic chemistry: a comprehensive text. Interscience New York, 1980. Vol. 849.
- 266. Balamurugan R., Palaniandavar M., Gopalan R.S. Trigonal planar copper (I) complex: synthesis, structure, and spectra of a redox pair of novel copper (II/I) complexes of tridentate bis (benzimidazol-2 '-yl) ligand framework as models for electron-transfer copper proteins // Inorg. Chem. 2001. Vol. 40, № 10. P. 2246–2255.
- 267. Reinen D., Friebel C. Cu²⁺ in 5-coordination: a case of a second-order Jahn-Teller effect. II: CuCl53− and other CuIIL5 complexes: trigonal bipyramid or square pyramid? // Inorg. Chem. 1984. Vol. 23, № 7. P. 791–798.
- 268. Wansapura C.M., Juyoung C., Simpson J.L., Szymanski D., Eaton G.R., Eaton S.S., Fox S. From planar toward tetrahedral copper (II) complexes: structural and electron paramagnetic resonance studies of substituent steric effects in an extended class of pyrrolate-imine ligands // J. Coord. Chem. 2003. Vol. 56, № 11. P. 975–993.

- 269. Richardson H.W. Handbook of copper compounds and applications. CRC Press, 1997.
- 270. Raithby P.R., Shields G.P., Allen F.H., Motherwell W.D.S. Structure correlation study of four-coordinate copper (I) and (II) complexes // Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Sci. 2000. Vol. 56, № 3. P. 444–454.
- 271. Abriata L.A. Analysis of copper-ligand bond lengths in X-ray structures of different types of copper sites in proteins // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2012. Vol. 68, № 9. P. 1223–1231.
- 272. Rubino J.T., Franz K.J. Coordination chemistry of copper proteins: how nature handles a toxic cargo for essential function // J. Inorg. Biochem. 2012. Vol. 107, № 1. P. 129–143.
- 273. Gavryushov S., Linse P. Effective interaction potentials for alkali and alkaline earth metal ions in SPC/E water and prediction of mean ion activity coefficients // J. Phys. Chem. B. 2006. Vol. 110, № 22. P. 10878–10887.
- 274. Srnec M., Ryde U., Rulíšek L. Reductive cleavage of the O-O bond in multicopper oxidases: A QM/MM and QM study // Faraday Discuss. 2011. Vol. 148. P. 41–53.
- 275. Solomon E.I., Augustine A.J., Yoon J. O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases // Dalton Trans. 2008. Vol. 9226, № 30. P. 3921–3932.
- 276. Yoon J., Liboiron B.D., Sarangi R., Hodgson K.O., Hedman B., Solomon E.I. The two oxidized forms of the trinuclear Cu cluster in the multicopper oxidases and mechanism for the decay of the native intermediate // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007. Vol. 104, № 34. P. 13609–13614.
- 277. Silva C., Damas J., Chen Z. 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. 2012. Vol. D68. P. 186–193.