

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Факультет харчових технологій та біотехнологій

Кафедра біотехнологій та радіології

КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на здобуття освітнього ступеня магістра

на тему: «Дослідження стійких до інгібування хлоридами
високопотенціальних лак аз аскоміцетів»

Виконала: студентка 2 курсу,
групи 1, спеціальності
162 Біотехнології та біоінженерія
Вантук А.А.

Керівник: к.с.-г. наук, с.н.с., доцентка
кафедри біотехнології та радіології
Сварчевська О.З.

Рецензент: к.с.-г. наук, доцент кафедри
технології виробництва і переробки
продукції дрібних тварин Періг Д.П.

Робота заслухана на засіданні кафедри біотехнології та радіології і
рекомендована до захисту в ЕК, протокол № від 2023 р.

Завідувач кафедри біотехнології та радіології,
професор, доктор с.-г. наук

Буцак В.І.

Львів – 2023

ЗМІСТ

	стор.
АНОТАЦІЯ	4
ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	9
1.1. Лакази: визначення та класифікація	9
1.2. Структурна характеристика лаказ	10
1.2.1. Первинна структура лаказ	10
1.2.2. Дослідження лаказ за використання методу рентгеноструктурного аналізу	12
1.2.3. Третинна структура та доменна організація лаказ	15
1.3. Структури мутантних форм лаказ	18
1.4. Характеристика лакази з аскоміцету BOTRAL	19
РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ	22
2.1. Реактиви	22
2.2. Препарати лакази з аскоміцету BOTRAL, використання в роботі (об'єкт дослідження)	22
2.3. Визначення активності лаказ	24
2.4. Визначення концентрації протеїну в розчині	24
2.5. Гель-фільтрація ензимів	25
2.6. Зафарбовування SDS-PAGE гелів за вуглеводною частиною	26
2.7. Кристалізування лакази, одержаної з BOTRAL методом дифузії пари	26
2.8. Одержання комплексів лакази з BOTRAL методом вимочування кристалів	27
2.9. Збір дифракційних даних та вирішення структур	28
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	32
3.1. Дослідження молекулярних властивостей лаказ, отриманих з аскоміцету BOTRAL та його мутантної форми	32
3.2. Кінетичні властивості лаказ, отриманих з BOTRAL та її мутантного штаму	34

3.3. Визначення первинної структури лакази з BOTRAL	37
3.4. Гель-фільтраційний метод дослідження олігомерного складу лакази з BOTRAL	39
3.5. Результати кристалізації лаказ, отриманих з BOTRAL і з мутантного штаму	42
3.6. Дослідження просторової будови лакази з BOTRAL	45
3.7. Дослідження димерної структури лакази з BOTRAL	46
3.8. Результати, отримані за глікозилювання лакази з BOTRAL	49
3.9. Порівняльна характеристика лакази з BOTRAL із окремими лаказами, отриманими з базидіоміцетів та інших аскоміцетів	53
3.10. Структурні чинники, які впливали на процес інгібування лакази з BOTRAL галогенід-йонами	55
ВИСНОВКИ	59
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	60

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота викладена на 65 сторінках, містить 12 таблиць та 19 рисунків. Бібліографічний покажчик містить 54 джерела літератури. Складається робота з наступних розділів: вступу, огляду літератури, умов та методики проведення досліджень, результатів досліджень, висновків та списку використаної літератури.

Ключові слова: аскоміцети, хлориди, лаказа, *Botrytis aclada*, електрофорез, активність, структура, редокс-потенціал, хлорид-резистентність, активний центр, йони купруму, рентгеноструктурний аналіз, монокристали, деглікозилювання, роздільна здатність.

Актуальність теми. Лаказа — це ензим, каталізуючий окиснення широкого ряду фенольних субстратів та деяких неорганічних йонів із супутнім відновленням молекулярного кисню до води. Лакази є досить поширені у природному середовищі. Зокрема, вони виявлені у бактеріях, археях, грибах і комах.

Лакази з різних джерел детально охарактеризовані з погляду фізико-хімічних та кінетичних властивостей, електрохімічних характеристик, методом рентгеноструктурного аналізу встановлено їхню просторову будову. На даний час у банку даних протеїнових структур доступні структури лаказ, отримані з двадцяти шести організмів.

Лакази залежно від організму-джерела можна поділити на 3 великі групи: рослинні, бактеріальні та грибні. Бактеріальні лакази виявляють найбільшу активність у лужній та нейтральній областях рН. Проте, практичне застосування бактеріальних лаказ утруднене тим, що вони мають низький потенціал Т1-центру. Більшість лаказ грибів має середній або високий редокс-потенціал і виявляє максимальну активність у кислих областях рН. Більшість високопотенційних лаказ виділено з базидієвих грибів. Однак, їх недоліком є висока чутливість до інгібування хлоридами — помітне зниження активності лаказ спостерігається вже за мілімолярних концентрацій хлорид-йонів.

Практичний інтерес представляє пошук стійких до інгібування хлорид-йонами високопотенційних лаказ. Ряд лаказ із грибів-аскоміцетів виявляє стійкість до інгібування хлорид-йонами. Проте, чинники, що визначають відмінності у хлорид-резистентності не встановлено. Одним із підходів до дослідження цього механізму може бути порівняльний аналіз структур лаказ із грибів-аскоміцетів та базидіоміцетів.

Мета і завдання дослідження. Метою даної роботи було одержання і порівняльне структурно-функціональне дослідження лаказ із *Botrytis aclada* та її мутантного штаму.

Для досягнення поставленої мети сформульовано наступні завдання:

- дослідити фізико-хімічні та каталітичні властивості рекомбінантної лакази з *Botrytis aclada* та з її мутантної форми;
- отримати монокристали лаказ із *Botrytis aclada* та її мутанту, придатні для рентгеноструктурного аналізу;
- зібрати набори дифракційних даних високої роздільної здатності на синхронному джерелі для лаказ із *Botrytis aclada* та мутантного штаму, а також для комплексів лакази з *Botrytis aclada* з CuSO_4 і CuCl ;
- вирішити та кристалографічно уточнити структури лаказ із *Botrytis aclada*, її мутанту та комплексів лакази з *Botrytis aclada*;
- провести порівняльний аналіз структур лаказ із *Botrytis aclada* та її мутантної форми для встановлення змін у структурі, які призвели до зміни редокс-потенціалу ензиму;
- провести порівняльний аналіз структури лакази з *Botrytis aclada*, комплексів лакази з *Botrytis aclada* та структур інших лаказ;
- проаналізувати можливі структурні причини хлорид-резистентності лаказ із аскоміцетів.

Об'єкт дослідження. Об'єктом досліджень є позаклітинні лакази з *Botrytis aclada* (BOTRAL) та її мутанту.

Предмет дослідження. Предметом досліджень даної роботи є порівняльний аналіз структур лаказ із *Botrytis aclada* та її мутантного штаму.

Методи дослідження. Використано класичні біохімічні методи очищення та характеристики протеїнів; методи кристалізування протеїнів і метод рентгеноструктурного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Методом рентгеноструктурного аналізу вперше визначено структуру рекомбінантної лакази з *Botrytis aclada* та з її мутанту з високою роздільною здатністю. Подібність структур лаказ із *Botrytis aclada* та з мутантної форми *Botrytis aclada* дозволяє пов'язати виявлені зміни в редокс-потенціалі та кінетичних характеристиках мутантної форми виключно із введенням в аксіальне положення T1-центру атома сульфуру метіоніну.

Вперше було отримано структуру деплекованої за йоном купруму T2-форми лакази з аскоміцетів (T2Д). Вперше для лаказ із аскоміцетів проведено вбудовування йонів купруму в T2-центр T2Д-форми лакази обробкою солями Cu^+ кристалів. Показано можливість зворотної перебудови T2/T3 кластеру за вбудовування йонів купруму.

Вперше проведено аналіз структурних особливостей лаказ із аскоміцетів, які можуть визначати їх стійкість до інгібуючого впливу хлорид-йонів.

Практичне значення одержаних результатів. Результати роботи можуть бути корисними фахівцям, які займаються дослідженнями лаказ та практичним застосуванням цих ензимів.

ВСТУП

Лакази належать до сімейства купрумвмісних оксидаз, до якого також відноситься церулоплазмін, аскорбатоксидаза та білірубіноксидаза. Купрумвмісні оксидази мають складно влаштований активний центр, який містить від чотирьох до семи йонів купруму. Лакази є найпростішими представниками цього сімейства. Вони містять чотири йони купруму на молекулу і становлять інтерес у якості модельних протеїнів при вивченні купрумвмісних оксидаз. Будові та властивостям активного центру лаказ присвячена велика кількість досліджень. Активний центр лаказ вивчався методами рентгеноструктурного аналізу, ЕПР і оптичної спектроскопії.

Чотири йони купруму активного центру лаказ утворюють моноядерний T1-центр, поблизу з яким відбувається окиснення першого субстрату, і триядерний T2/T3-кластер, у якому проходить окиснення молекули кисню до води. Редокс-потенціал T1-центру є важливою характеристикою лаказ, яка визначає спектр окиснюваних субстратів. У залежності від величини редокс-потенціалу лакази поділяються на низько- (менше, ніж 450 мВ), середньо- (450–720 мВ) та високо-потенціальні (більше, ніж 720 мВ). У всіх лаказах йон купруму T1-центру має плоску трикутну координацію одним залишком цистеїну та двома залишками гістидину. T1-центри лаказ розрізняються за типом залишку в аксіальному положенні. Середньо- та високо-потенціальні лакази в аксіальному положенні T1-центру містять залишок фенілаланіну або лейцину, а низько-потенціальні містять залишок метіоніну. До сьогоднішнього часу немає єдиної думки про те, як будова та ближнє оточення T1-центру впливають на його редокс-потенціал.

Лакази цікаві для біотехнології [1]. Одне з практичних застосувань лаказ засноване на їх здатності окиснювати ряд фенольних сполук, таких як гербіциди, азобарвники та інсектициди. Біотехнологія пред'являє до лаказ ряд вимог: високий редокс-потенціал T1-центру, операційна стабільність, стійкість до інгібіторів, широка робоча область рН, низька вартість препарату [2, 3].

Для дослідження нами було обрано лаказу, отриману з аскоміцету *Botrytis aclada* (BOTRAL), яка є стійкою до інгібування хлорид-йонами та володіє високим редокс-потенціалом T1-центру. Рекombінантна форма лакази з BOTRAL була одержана з високим рівнем експресії у дріжджах *P. pastoris*. Для оцінки впливу природи аксіального залишку T1-центру на властивості лакази була отримана мутантна форма з заміною Лей499Мет. Мутантна форма відрізнялась від нативної каталітичними характеристиками та редокс-потенціалом активного центру.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Лакази: визначення та класифікація

Лаказа (пара-дифенол: кисень оксидоредуктаза, К.Ф.1.10.3.2) — це купрумвмісна оксидаза, яка каталізує окиснення широкого ряду органічних та неорганічних субстратів з відновленням кисню до води.

Лаказа відноситься до сімейства блакитних купрумвмісних протеїнів (БКП), які містять від одного до шести атомів купруму в молекулі протеїну. До складу сімейства БКП входять групи малих блакитних протеїнів, блакитних оксидаз і нітратредуктаза (рис. 1.1). Малі блакитні протеїни з молекулярною масою 10,0–16,0 кДа містять по одному атому купруму. Наприклад, аміціанін та рустіціанін (переносники електронів у бактерій), пластоціанін (переносник електронів у фотосинтетичному електрон-транспортному ланцюгу в рослин і водоростей), стеллаціанін (точна функція невідома, поширений в рослин), азурин (переносник електронів у бактерій та деяких рослин) і псевдоазурин (переносник електронів у денітрифікуючих бактерій) [4].



Рис. 1.1. Положення лакази по відношенню до різних груп купрумвмісних протеїнів

Представник БКП з двома атомами купруму — нітритредуктаза [5]. Це ензим, який широко поширений у прокаріот [6]. Нітритредуктаза каталізує відновлення нітриту до монооксиду нітрогену, приймаючи електрон від цитохрому С [7].

Окрім малих блакитних протеїнів, до сімейства БКП входять купрумвмісні (багатокупрумні) оксидази, так звані «блакитні оксидази», до яких і відноситься лаказа. До даної групи відносяться ензими, що містять від чотирьох до шести атомів купруму, організованих у метало центри трьох типів, які володіють характерними спектральними властивостями [8]. Група блакитних оксидаз, окрім лаказ, також включає в себе фероксидазу або церулоплазмін плазми крові ссавців, який містить шість атомів купруму в одному поліпептидному ланцюгу, аскорбатоксидазу, білірубін оксидазу, купрумвмісну оксидазу CueO з *Escherichia coli* та інші ензими й протеїни, що містять по чотири атоми купруму в поліпептидному ланцюгу [8–10].

Лаказа каталізує чотирьохелектронне відновлення молекули кисню до двох молекул води, оминаючи стадію утворення пероксиду водню. При цьому відбувається одноелектронне окиснення широкого спектру субстратів: ароматичних амінів, фенолів, а також неорганічних сполук [11]. З функціональної точки зору, за здатність окиснювати дигідроксифеноли, лаказу відносять до групи поліфенолоксидаз. Разом з катехолоксидазою (орто-дифенол: кисень оксидоредуктаза, К.Ф.1.10.3.1) — ключовим ензимом синтезу меланіну, лаказа становить групу поліфенолоксидаз.

1.2. Структурна характеристика лаказ

1.2.1. Первинна структура лаказ

Як відомо, ідентичність амінокислотних послідовностей у структурах лаказ, отриманих з рослин, грибів та бактерій не є висока. Так, ідентичність амінокислотних послідовностей у лаказ із бактерії *Bacillus subtilis*, вищої

рослини *Rhus vernicifera*, базидіоміцету *Trametes hirsuta* й аскоміцету *Melanocarpus albomyces* перебуває в інтервалі від 20 % (бактерія + вища рослина) до 32% (базидіоміцет + аскоміцет). Посеред охарактеризованих структурно лаказ найменшу довжину в 279 залишків амінокислот мала лаказа, виділена з бактерії *Amicolatopsis sp.* (штам ATCC39116/75iv2) [12], а найбільшу, в 623 залишки амінокислот, мала лаказа з аскоміцету *Melanocarpus albomyces* [13, 14].

Амінокислотна послідовність лаказ складається з одного цистеїну та 10-ти гістидинів, що об'єднані в 4 Cu-зв'язуючі мотиви з високим ступенем консервативності (табл.1.1).

Таблиця 1.1

Порівняння амінокислотних послідовностей 4-х консервативних ділянок лаказ, які містять ліганди йонів купруму [11]

Організм	Код GenBank	Послідовність консервативних ділянок			
Ab	AAA17035	⁸⁰ SIHWHGF ⁸⁶	¹²⁵ WYHSHLS ¹³¹	⁴¹⁵ GAHPFHLHGH ⁴²⁴	⁴⁶⁶ WFLHCHIDWHLEA ⁴⁷⁸
Ap	AAB09228	⁷⁹ TIHWHGV ⁸⁵	¹²⁵ WWHAHSD ¹²⁹	⁵⁶⁰ QNHPMHLHGF ⁵⁶⁹	⁵²¹ WFLHCHFERHTTW ⁵³³
Cc	AAD30964	⁸⁰ SIHWHGL ⁸⁶	¹²⁵ WYHSHFG ¹³¹	⁴¹² GPHPFHLHGH ⁴²¹	⁴⁶⁶ WFFHCHIEFHLMN ⁴⁷⁸
Lt	AAB17191	⁸⁰ TVHWHGI ⁸⁶	¹²⁵ FWHAHFS ¹³¹	⁴⁶⁹ ESHLLHLHGY ⁴⁷⁸	⁵³⁰ WFMHCHFDVHLSW ⁵⁴²
Ma	CAE00180	¹⁴¹ SIHWHGI ¹⁴⁷	¹⁸⁶ WYHSHFS ¹⁹²	⁴⁷⁹ LPHPMHLHGH ⁴⁸⁸	⁵⁴⁹ WLFHCHIAWHVSG ⁵⁶¹
Nt	AAC49536	⁷⁸ SIHWHGI ⁸⁴	¹²⁵ FWHAHIL ¹²⁹	⁴⁵⁵ ENHPHHLHGF ⁴⁶⁴	⁵¹⁷ WFMHCHLEIHTTW ⁵²⁹
Pc	AAC39469	⁸³ SIHWHGF ⁸⁹	¹²⁸ WYHSHLS ¹³⁴	⁴¹⁴ TPHPFHLHGH ⁴²³	⁴⁶⁸ WFLHCHIDFHLEA ⁴⁸¹
PM1	CAA78144	⁶² SIHWHGF ⁶⁸	¹⁰⁶ WYHSHLS ¹¹²	³⁹¹ FPHPFHLHGH ⁴⁰⁰	⁴⁴⁶ WFLHCHIDFHLEA ⁴⁵⁸
Po	CAA84357	⁹⁶ SIHWHGF ¹⁰²	¹⁵¹ WYHSHLS ¹⁵⁷	⁴²⁵ GPHPFHLHGH ⁴³⁴	⁴⁸⁰ WFLHCHIDWHLEI ⁴⁹²
Rv	BAV63411	⁵⁷ TIHWHGV ⁶³	¹⁰² WWHAHSD ¹⁰⁸	⁴³¹ TSHPMHLHGF ⁴⁴⁰	⁴⁹¹ WFLHCHFERHTTE ⁵⁰³
Th	AAA33103	⁸³ SIHWHGF ⁸⁹	¹²⁸ WYHSHLS ¹³⁴	⁵¹⁴ APHPFHLHGH ⁵²³	⁴⁷⁰ WFLHCHIDFHLEA ⁴⁸²
Tl	AAC41686	⁸³ SIHWHGF ⁸⁹	¹²⁸ WYHSHLS ¹³⁴	⁴¹³ APHPFHLHGH ⁴²²	⁴⁷⁰ WFLHCHIDFHLEA ⁴⁸²
Tt	CAC13040	⁸³ SIHWHGF ⁸⁹	¹²⁸ WYHSHLS ¹³⁴	⁴¹³ FPHPFHLHGH ⁴²²	⁴⁶⁷ WFLHCHIDFHLEA ⁴⁷⁹
Tv	AAC49828	⁸² SIHWHGF ⁸⁸	¹²⁷ WYHSHLS ¹³³	⁴¹³ APHPFHLHGH ⁴²²	⁴⁶⁹ WFLHCHIDFHLEA ⁴⁸¹

Примітка: голубим і сірим кольором зафарбовано відповідно залишки Гіс та Цис, які координують йони купруму T1-центру і T2 / T3 кластеру. Ab – *Agaricus bisporus*; Ap – *Acer pseudoplatanus*; Cc – *Coprinus cinereus*; Lt – *Liriodendron tulipifera*; Ma – *Melanocarpus albomyces*; Nt – *Nicotiana tabacum*; Pc – *Psycoropus cinnabarinus*; PM1 – *Basidiomycete spp.*; Po – *Pleurotus ostreatus*;

Rv – *Rhus vernicifera*; Th – *Trametes hirsuta*; Tl – *Trametes villosa*; Tt – *Trametes trogii*; Tv – *Trametes versicolor*

Дослідниками проаналізовано амінокислотні послідовності 65 грибних і 41 рослинної лаказ [15]. У результаті проведеного вирівнювання послідовностей амінокислот Cu-зв'язуючі мотиви розширили до чотирьох неперервних ділянок, що містили 8-24 амінокислотні залишки. Окремими дослідниками було висунуто припущення на рахунок того, що єдиний механізм протікання каталізованої реакції відображається даною консервативністю Cu-зв'язуючих мотивів [16].

Первинна структура лаказ, отриманих з аскоміцетів на С-кінці має, на відміну від лаказ із інших мікроорганізмів, ще додатковий фрагмент з 8-ми залишків [17].

1.2.2. Дослідження лаказ за використання методу рентгеноструктурного аналізу

Усі тримірні структури лаказ досліджені методом рентгеноструктурного аналізу. Накопичена на даний час інформація стосовно тримірних структур лаказ підсумована в огляді [17]. Першою з досліджених структур була структура лакази з *C. cinereus* [18]. У структурі був відсутнім йон купруму Т2-центру. Таким чином, досліджена структура відповідала неактивній формі ензиму. Одержаний результат автори пояснювали втратою купруму за деглікозилювання ензиму перед його кристалізацією. Також були досліджені структури активних форм грибних лаказ, отриманих з базидіоміцету *Trametes versicolor* [19] і аскоміцету *Melanocarpus albomyces* [14] та структура комплексу лакази з *Trametes versicolor* з ароматичним аміном (ариламіном) [20]. Усі ці структури містили в активному центрі повний набір йонів купруму, тобто відповідали активним каталітично нативним формам ензиму. Після цього було

одержано структури малої лакази з метагеному осаду вугільних заводів [21] і бактеріальних лаказ із *Bacillus subtilis* [22].

Окрім вивчення будови нативних форм лаказ, рентгеноструктурний аналіз використовували для вивчення будови комплексів лаказ із субстратами, процесу відновлення активного центру та впливу мутацій на структуру.

Було досліджено структури:

- нативних та рекомбінантних форм лаказ;
- лаказ із різною поглинутою дозою рентгенівського випромінювання з метою вивчення процесу відновлення купрумних центрів;
- мутантів, які містили заміни в ділянці активного центру;
- різних похідних лаказ, у тому числі й деплекованих за йоном купруму T2 форм (T2Д).

У Банк протеїнових структур депоновано більше ста структур лаказ із роздільною здатністю 0,90–3,45 Å. В таблиці 1.2 представлено коди Банку протеїнових структур для структур різних лаказ. Більша частина охарактеризованих структурно лаказ було виділено з бактерій та базидієвих грибів. Щодо лаказ із аскоміцетів, то для них доступні структури, отримані з 2 грибів: *Thielavia arenaria* [23] та *Melanocarpus albomyces* [14]. Структури лаказ, виділених з комах і рослин на даний час залишаються невідомими.

Таблиця 1.2

**Структури лаказ, які представлено в Банку протеїнових структур
[17]**

Організм	Вільна форма	Структури мутантних форм	Структури комплексів з лігандами біля T1-центру	Структури з різними лігандами в T2/T3 кластері	Похідні
1	2	3	4	5	6
Тридоменні лакази					
<i>Bacillus subtilis</i>	1GSK	2WSD, 4AKO, 4AKP, 4AKQ, 4A66, 4A67, 4A68	1OF0, 1W6W, 1W8E, 3ZDW	1W6L, 2BHF, 2X87, 2X88	
<i>Botrytis aclada</i>	3SQR	3V9E			

Продовження табл. 1.2

1	2	3	4	5	6
<i>Cerrena maxima</i>	2H5U, 3DIV				
<i>Coprinus cinereus</i>	1A65, 1HFU				
<i>Coriolopsis caperata</i>	4JHV				4JHU
<i>Coriolopsis gallica</i>				4A2D, 4A2E, 4A2F, 4A2G, 4A2H	
<i>Corolus zonatus</i>	2HZH				
<i>Lentinus tigrinus</i>	2Q16				
<i>Melanocaprus albomyces</i>	1GW0, 2Q9O	3DKH	3FU7, 3FU8, 3FU9	2IH8, 2IH9	3QPK
<i>Pycnoporus cinnabaris</i>	2XYB				
<i>Rigidoporus lignosis</i>	1V10				
<i>Steccherinum ochraceus</i>	3T6V			3T6W, 3T6X, 3T6Z, 3T71	
<i>Thielavia arenaria</i>	3PPS				
<i>Thermus thermophilus</i>	2XU9			2YAE, 2YAF, 2YAH, 2YAM, 2YAO, 2YAP, 2YAQ, 2YAR	2XVB, 2 XUW, 4AI7
<i>Trametes hirsuta</i>	3PXL, 3FPX			3V9C	
<i>Trametes trogii</i>	2HRH		2HRG		
<i>Trametes versicolor</i>	1GYC		1KYA		
<i>Trametes sp AH28-2</i>	3KW7				
Дводоменні лікази					
<i>Amycolatopsis sp.75iv2</i>	3T9W		3TA4		
<i>Nitrosomona europaea</i>	3G5W				

Продовження табл. 1.2

1	2	3	4	5	6
Streptomyces coelicolor	3CG8	4GXF, 4GY4			3KW8
Streptomyces sviveus	4M3H				
Streptomyces lividans	4GYB			4NB7, 4NAJ	
Streptomyces viridoporus	3TAS, 3TBB		3TBC		
Streptomyces viridochromog enes	4N8U				
Метагеном	2ZWN			4E9V, 4E9W, 4E9X, 4E9Y	

1.2.3. Третинна структура та доменна організація лаказ

У складі мономерів всіх охарактеризованих структурно лаказ містяться 2 або 3 домени (I, II, III), які переважно складаються з β -листів (рис. 1.2) [22, 24]. Також до складу структури лаказ входить невелика кількість α - і 3.10-спіралей. Домени мають схожу β -сандвічеву укладку, вперше виявлену в пластоціаніні та названу купредоксин-подібною. У кожному з доменів міститься 100–200 амінокислотних залишків [17]. Всі охарактеризовані структурно грибні лакази відносяться до тридоменних лаказ.

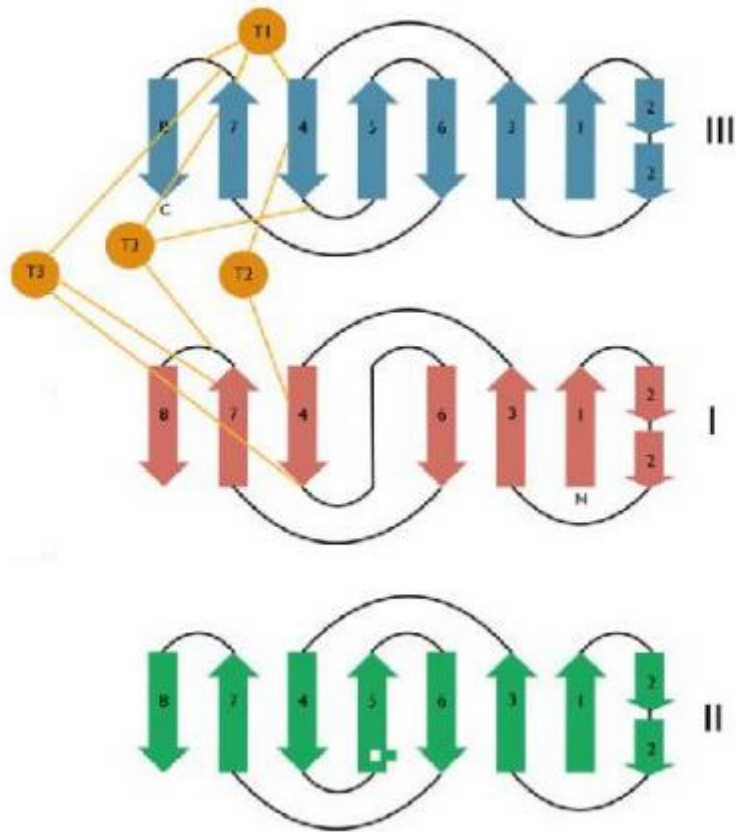


Рис. 1.2. Топологічна схема купредоксин-подібних доменів лакази з *Melanocarpus albomyces* [17]. Вказано розташування залишків, які координують йони купруму

Активний центр лаказ складається з T1-центру, який розташований у домені III, та T2 / T3 кластеру, розміщеного у порожнині між доменами I і II (рис. 1.3). Лігандами T2 / T3 кластеру є залишки гістидину з доменів I та III. Відстань між центрами T1 і T2 / T3 становить приблизно 12,5 Å. У ході реакції електрон передається від T1-центру до T2 / T3 кластеру. Механізм перенесення електрону від T1-центру до T2 / T3 кластеру точно не встановлений [25]. Можна зробити припущення, що найімовірнішим шляхом перенесення електрону від T1-центру до T2 / T3 кластеру є ланцюг з двох водневих і пептидного зв'язків, які з'єднують T1-центр із залишком гістидину, що координує йон купруму T3.

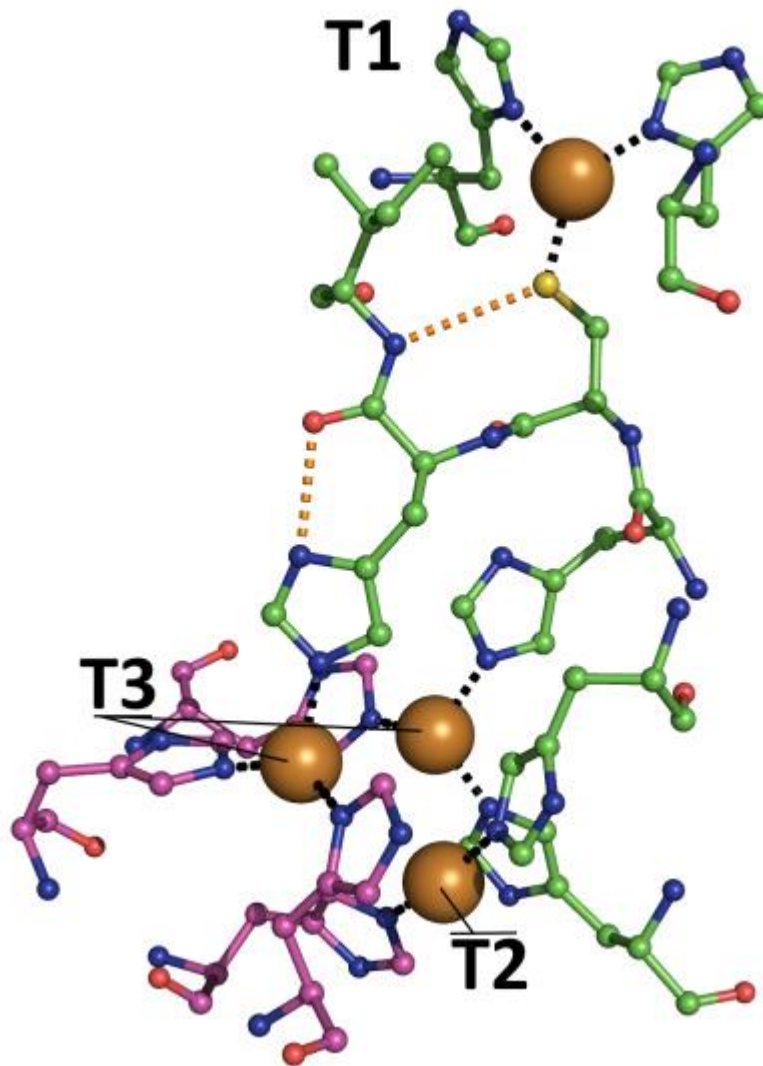


Рис. 1.3. Зв'язок між T1-центром та T2 / T3 кластером у структурі лакази з *Melanocarpus albomyces* [13]. Сферами оранжевого кольору показані йони купруму. Амінокислотні залишки показані у вигляді кулястої стрижневої моделі фіолетового (домен I) та зеленого (домен III) кольорів. Штриховими лініями чорного кольору зображені координаційні зв'язки йонів купруму. Штриховими лініями оранжевого кольору позначені водневі зв'язки, які входять до ймовірного ланцюга перенесення електронів. Оксигенний ліганд між йонами купруму T3 не показаний

У структурі лаказ 2 канали ведуть до поверхні протеїну в напрямку йонів купруму T2 і T3. Ці канали сформовані амінокислотними залишками з доменів I та III. Канал, що веде до T3-центру, в лаказах з аскоміцетів заблокований С-кінцевим тетрапептидом [14].

1.3. Структури мутантних форм лаказ

Широко поширеним методом вивчення ензимів є точкова мутація певного залишку, вибраного на основі відомої структури, з подальшою функціональною характеристикою одержаного мутанту. Ряд подібних досліджень проведено й для лаказ. У таблиці 1.3 перераховано відомі структури мутантних форм лаказ. Усі структурні роботи щодо мутантних форм лаказ присвячені структурно-функціональним дослідженням мутантів із замінами в ділянці T1-центру та T2 / T3 кластеру.

Таблиця 1.3

Мутантні форми лаказ [17]

Організм	Мутація	Роздільна здатність (Å)	PDB код
B. subtilis	Ile494Ala	1.6	2WSD
	Asp116Ala	2.0	4A66
	Asp116Glu	2.1	4A67
	Asp116Asn	2.0	4A68
	Glu498Asp	2.1	4AKQ
	Glu498Leu	1.7	4AKO
	Glu498Thr	2.0	4AKP
M. albomyces	Leu559Ala	2.4	3DKH
S. coelicolor	Tyr108Phe	2.7	4GXF
	Tyr108Ala	2.7	4GY4
Streptomyces sviveus	His99Asn	1.7	4UAH
	His99Gln	1.8	4UAN
	His99Tyr	1.6	4W1T
	Met295Leu	1.8	4WTQ

Досліджено вплив ряду мутацій у ділянці T1-центру і T2 / T3 кластеру для лакази з *Bacillus subtilis* на каталітичні властивості ензиму та його структуру. Для вивчення впливу аксіального залишку на будову та редокс-потенціал лакази застосовувалась заміна аксіального залишку T1-центру Met502Лей, Met502Фен в цій лаказі [26]. Заміну консервативного для всіх лаказ аксіального залишку ізолейцину та гідрофобного залишку лейцину поблизу T1-центру використовували з метою вивчення впливу гідрофобного оточення на редокс-потенціал лакази [27]. Для лакази з *Bacillus subtilis* було досліджено вплив заміни 2-х амінокислотних залишків глутаміну та аспарагіну, розташованих у каналі від T2- і T3-центрів до поверхні, на кінетичні властивості та структуру ензиму [28, 29].

За допомогою мутації залишку лейцину досліджували роль С-кінцевого тетрапептиду в каталізованій реакції для лакази з *Melanocarpus albomyces* [30]. Для дводоменної лакази з *Streptomyces coelicolor* було досліджено вплив заміни залишку тирозину в T2 / T3 кластері [31].

1.4. Характеристика лакази з аскоміцету BOTRAL

Однією з бажаних для біотехнології властивостей лаказ є їхня стійкість до високих концентрацій йонів хлору. Більшість вивчених лаказ, отриманих з бактерій та базидіоміцетів за концентрації йонів хлору понад 100 мМ майже повністю втрачає свою активність [2]. У роботі [2] відзначається негативний вплив хлоридів на ефективність лаказних біопаливних комірок. Причина високої хлоридної резистентності лаказ невідома та вимагає, зокрема, порівняльного структурного аналізу резистентних і нерезистентних до хлорид-йонів лаказ.

Серед патогенних аскоміцетних грибів проведено пошук лаказ, стійких до інгібування йонами хлору. В результаті цього було відібрано найстійкішу до інгібування йонами хлору лаказу з BOTRAL [2]. Рекombінантну форму лакази з

ВОТРАЛ було отримано з високим рівнем експресії в дріжджах *P. pastoris*, очищено та охарактеризовано.

Лаказа з ВОТРАЛ є позаклітинним протеїном із молекулярною масою близько 100 кДа. Ізоелектрофокусування очищеного препарату показало наявність однієї смуги з $pI \sim 2.3$. Концентровані препарати мали характерне для лаказ блакитне забарвлення. Коефіцієнт екстинції за довжини хвилі 610 нм становив $3011 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Для лакази з ВОТРАЛ було вивчено рН-залежність активності (рис. 1.4) та кінетичні константи (табл. 1.4) для АБТС і декількох фенольних субстратів. Крива рН-залежності мала сигмоїдну форму для 2,6-ДМФ і АБТС та дзвоноподібну — для інших фенольних субстратів. Кінетичні константи для всіх субстратів були виміряні за оптимального рН.

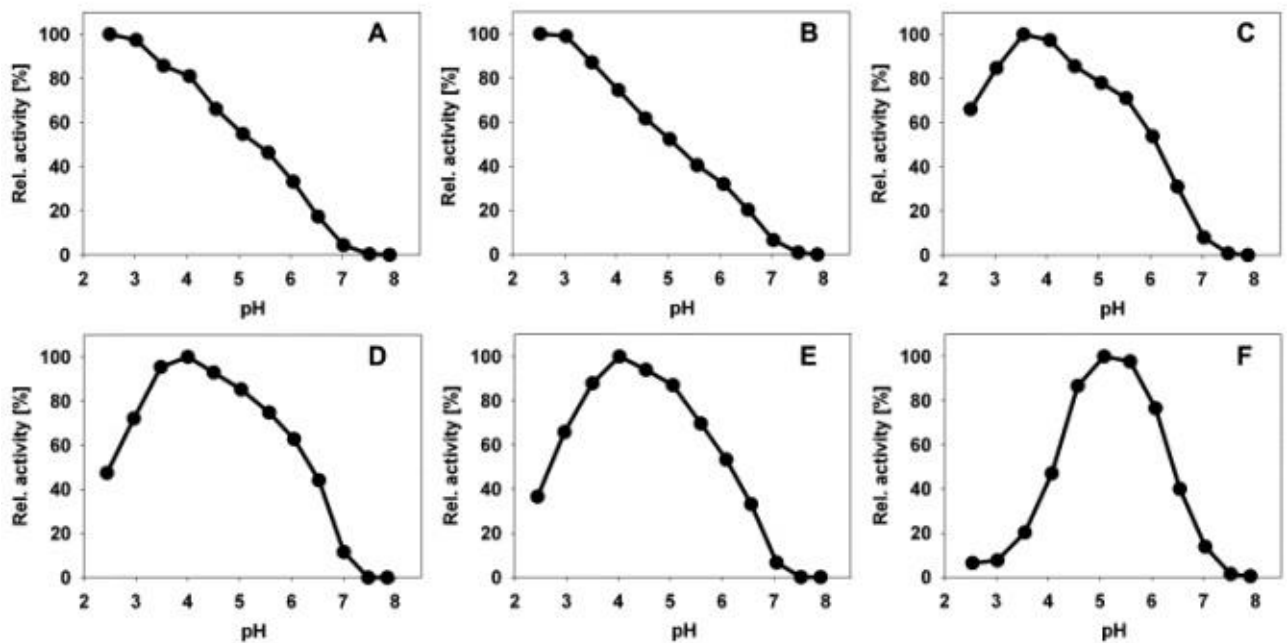


Рис. 1.4. рН-залежність швидкості окиснення, що каталізується лаказою з ВОТРАЛ: А – АБТС, В – 2,6-ДМФ, С – гваяколу, D – пірокатехіну, Е – гідрохінону, F – п-анізидину

У 100 мМ цитраті Na (рН=4) лаказа з ВОТРАЛ зберігає 60,0% від вихідної активності за концентрації більше 1 моль хлориду Na. Як і всі інші лакази, лаказа з ВОТРАЛ помітно пригнічується вже за мікромолярних

концентрацій NaF. У присутності 2,6 μM фториду активність ензиму знижується до 50,0% від вихідної.

Таблиця 1.4

Кінетичні константи реакцій окиснення фенольних та нефенольних субстратів, що каталізуються лаказою з BOTRAL за оптимального рівня рН [2]

Субстрат	рН-оптимум окиснення субстрату	К _м (μM)	k_{cat} (с^{-1})	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ с}^{-1}$)
АБТС	3.0	2.9 \pm 0.4	108 \pm 9	37.2
2,6-ДМФ	3.0	19.2 \pm 1.6	45.6 \pm 1.4	2.4
Гваякол	4.0	73.3 \pm 3.3	29.4 \pm 1.7	0.40
Пірокатехін	4.0	139.1 \pm 8.6	59.3 \pm 4.9	0.43
Гідрохінон	4.0	90.8 \pm 6.5	39.5 \pm 1.0	0.44
п-анізидин	5.0	592 \pm 36.7	112 \pm 2.1	0.19

Лаказа з BOTRAL відноситься до високопотенційних лаказ ($E_{\text{T1}} > 700 \text{ мВ}$) [2].

Лаказа з BOTRAL має середню термостабільність. У 100 мМ цитраті Na (рН=4,5) за температури 4 $^{\circ}\text{C}$ час напівактивації ензиму становить 220 годин. За підвищення температури інактивація ензиму стає помітною за менший проміжок часу: за 45 $^{\circ}\text{C}$ — 23,3 хв., за 55 $^{\circ}\text{C}$ — 7 хв., за 65 $^{\circ}\text{C}$ — 1,2 хв. Стабільність помітно зростає у присутності хлорид-йонів. За температури 37 $^{\circ}\text{C}$ у присутності 120 мМ хлориду Na або хлориду K час інактивації збільшується приблизно в 15 разів.

РОЗДІЛ 2. УМОВИ ТА МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Реактиви

У роботі використовувалися такі реактиви: гліцерин, гліцин Electrophoresis grade, натрію хлорид, амонію персульфат, 2,6-ДМФ, АБТС, ЕДТА, натрію фторид, амонію сульфат, натрію додецилсульфат, етанол, поліетиленгліколи різних молекулярних мас, ортофосфорна кислота, маркери молекулярних ваг Page Ruler Unstained Protein Ruler, барвники Кумасі діамантовий синій R-250 та Кумасі синій G-250, барвник для ідентифікації білкових кристалів Izit Dye, інші солі вітчизняного та зарубіжного виробництва кваліфікації о.с.ч. та Ultrapure.

Усі реагенти мали чистоту «для молекулярної біології» або не менше 99,0%, якщо не вказано інше.

2.2. Препарати лакази з аскоміцету BOTRAL, використані в роботі (об'єкт дослідження)

У роботі використовували препарати лакази з аскоміцету *Botrytis aclada* (BOTRAL), її мутанту, що містить заміну Лей499Мет, та відповідні їм деглікозильовані форми.

Було здійснено гетерологічну експресію лаказ із BOTRAL та мутанту BOTRAL у дріжджах *P. pastoris*, хроматографічне очищення та деглікозилювання отриманих ензимів.

Очищення препаратів лаказ із BOTRAL та мутанту BOTRAL проводилося за методикою [2] у чотири стадії:

- 1) висаджування лакази з клітинного супернатанту амонію сульфатом;
- 2) очищення на гідрофобному сорбенті Phenyl sepharose;
- 3) очищення на гідрофобному сорбенті Phenyl source;
- 4) очищення на гель-фільтраційній колонці Superdex 75.

В отриманих препаратах лаказ було масспектрометрично виміряно вміст йонів купруму за співвідношенням Cu^+ / S згідно з методикою, розробленою у роботі [32] (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

Стартові характеристики препаратів лаказ, використаних у роботі

Назва препарату	Концентрація протеїну, мг/мл	Вміст йонів купруму, моль Cu /моль ензиму	Редокс-потенціал
Лаказа з <i>B. aclada</i>	20	2,6	720
Лаказа з мутанту L499M <i>B. aclada</i>	20	2,5	580
Лаказа з <i>B. aclada</i> деглікозильована	20	не визначали	не визначали
Лаказа з L499M <i>B. aclada</i> деглікозильована	19	не визначали	не визначали

Для кристалізації обидві форми ензиму були деглікозильовані з використанням ендоглікозидази Hf і α -манозидази згідно з рекомендаціями виробників. Очищені препарати лаказ змішували з сумішшю глікозидаз у співвідношенні 20:1 та інкубували три години за кімнатної температури. Очищення деглікозильованих форм від глікозидаз і глікозильованих форм ензиму здійснювали на гель-фільтраційній колонці Superdex 75. Фракції, що містили деглікозильовану форму лакази, об'єднували та концентрували до ~ 20 мг / мл. Концентрація вимірювалась за методом Бредфорда.

Для препаратів лаказ із BOTRAL та мутанту BOTRAL були виміряні потенціали T1-центру методом медіаторного електрохімічного редокс-титрування в анаеробних умовах [33]. Потенціали становили 720 і 580 мВ відповідно для лаказ із BOTRAL та мутанту BOTRAL.

2.3. Визначення активності лаказ

Активність лаказ вимірювали спектрофотометрично в термостатуючій лунці спектрофотометра Cary 100 (Varian, США) за температури 30° С за окисненням 2 мМ АБТС ($\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) або 1 мМ 2,6-ДМФ ($\epsilon_{469} = 49600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) у 100 мМ цитратному буфері, рН = 4,0 [34, 35]. За одиницю ензиматичної активності приймали кількість ензиму, яка необхідна для одержання 1 мкмоль продукту за 1 хвилину.

Були визначені рН-профілі активності для обох субстратів у діапазоні рН 2,0–8,0 у 100 мМ цитрат-фосфатному буфері.

Кінетичні константи були визначені в 100 мМ цитрат-фосфатному буфері за рН 3,0; 4,0; 5,0; 6,0. Концентрації субстратів варіювали в діапазоні 2,0–80,0 мкМ для АБТС і 2,0–200,0 мкМ для 2,6-ДМФ. Усі вимірювання проводили в 3 повторах. Отримані криві були апроксимовані з використанням рівняння Міхаеліса-Ментен методом нелінійної регресії в Origin 8,0.

Концентрації інгібіторів варіювали в діапазоні 1–1000 мкМ для натрію фториду та 10–1000 мМ для натрію хлориду. Величини I50 визначали як концентрації інгібіторів, за яких зберігалось 50% вихідної активності. Інгібування перевіряли за стандартних умов.

2.4. Визначення концентрації протеїну в розчині

Концентрацію гомогенних препаратів ензиму в розчині визначали за поглинанням на 280 нм з використанням розрахованого з амінокислотного складу в програмі Pro Param [36] коефіцієнта молярної екстинції ($\epsilon_{280} \text{ BaL} = 125209 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Нативна форма та мутант мали однаковий коефіцієнт екстинції.

Незалежно та безпосередньо перед кристалізацією вимірювали концентрацію ензиму за методом Бредфорда [37]. Для кожного протеїнового зразку вимірювання виконували в трьох повторах. Концентрацію ензиму

розраховували за калібрувальною кривою, побудованою за бичачим сироватковим альбуміном.

2.5. Гель-фільтрація ензимів

Додаткове очищення протеїнів перед кристалізуванням проводили методом гель-фільтраційної хроматографії на колонці Superdex 200 10 / 300 з використанням хроматографічної системи АСТА FPLC (GE Healthcare, США). Гель-фільтрацію проводили на попередньо зрівноваженій буфером колонці зі швидкістю елюювання 0,5 мл/хв. Для визначення впливу буферу на олігомерний стан лакказ колонку зрівноважували 25 мМ натрію ацетатом, рН = 5,0 або 50 мМ натрію цитратом, рН = 5,5. Окрім очищення, гель-фільтрація використовувалася для визначення молекулярної маси лакказ у розчині.

Молекулярну масу олігомерних форм ензиму розраховували з величини об'єму утримання цільового протеїну за калібрувальною кривою залежності логарифму молекулярної маси від коефіцієнту розподілу K_{av} . Величина K_{av} характеризує долю сорбента з розміром пор більших за розміри протеїну [38]. Коефіцієнт калібрувальної кривої $\lg(M_m) = A \times K_{av} + B$, де M_m – молекулярна маса протеїну, розрахована з експериментальних даних, отриманих для протеїнів з відомою молекулярною масою. Залежність величини K_{av} від об'єму елюації має вигляд:

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

де V_e – об'єм елюента, на якому вийшов протеїн, V_t – повний об'єм колонки і V_o – об'єм елюента, на якому виходить голубий декстрин (молекулярна маса більша, ніж 2 МДа). В якості стандартів при побудові калібрувальної кривої був використаний набір протеїнів для калібрування гель-фільтраційних колонок

(GE Healthcare, США): альдолаза (158 кДа), ферити (440 кДа), овальбумін (43 кДа), кональбумін (75 кДа), рибонуклеаза (13,7 кДа), карбоангідраза (29 кДа).

2.6. Зафарбовування SDS-PAGE гелів за вуглеводною частиною

Гомогенність препаратів лакази контролювали методом денатуруючого електрофорезу в 12,5 %-вому поліакриламідному гелі за Лемлі [39]. Для детекції протеїнових смуг поліакриламідний гель зафарбовували в розчині Кумасі R-250 у 7 %-вій ацетатній кислоті.

Для детекції глікопротеїнів поліакриламідний гель, після завершення розділення, був зафарбований з використанням набору для фарбування глікопротеїнів «Pierce glycoprotein staining kit» (Thermo science, США) згідно з рекомендаціями виробника:

1. Гель відмили 30 хвилин у 50 %-вому етанолі.
2. Два рази відмили гель у 7 %-вій ацетатній кислоті при перемішуванні.
3. На 15 хвилин перенесли гель у розчин окиснювача (періодної кислоти) у 7 %-вій ацетатній кислоті.
4. Гель відмили два рази впродовж 5 хвилин 7 %-вою ацетатною кислотою за умови перемішування.
5. Залишили гель у розчині відновника (фуксин кислий) на 15 хвилин при перемішуванні.
6. Декілька разів відмили гель 7 %-вою ацетатною кислотою.

Глікозильовані протеїни з'явилися на гелі у вигляді фіолетових смуг.

2.7. Кристалізування лакази, одержаної з BOTRAL методом дифузії пари

Пошук умов кристалізування здійснювали методом дифузії пари у варіанті з «сидячою краплею» з використанням автоматизованої системи Rigaku Crystal Trak + Phoenix + Gallery 700 (Rigaku, Японія) та комерційних

наборів для кристалізації протеїнів: Index, Crystal Screen і Peg / Ion (Hampton Research, США). Експерименти з кристалізування проводили з використанням розчинів лаказ із BOTRAL та мутанту BOTRAL з концентрацією 20 мг / мл у 25 мМ натрій ацетатному буфері, рН=5,0 або 50 мМ натрій цитратному буфері, рН=5,0. Крапля складалась з 0,2 мкл антирозчину та 0,2 мкл протеїну.

Оптимізація підібраних умов проводилась вручну методом дифузії пари у варіанті «висяча крапля» за 298 К. Для кристалізування використовували 24-лункові планшети «VDX Plate» (Hampton Research, США). Краплі об'ємом 2 мкл складались з рівних об'ємів протеїнового розчину й антирозчину. Оптимізацію проводили варіюванням концентрації осаджувача (1–2 М амонію сульфату або 10–45 ПЕГ 3350 / 4000) та рН у діапазоні ± 2 від рН вихідних умов. За оптимізації умов кристалізування з антирозчинами, які містять ПЕГ і солі, додатково варіювали концентрацію солі (0,05–0,2 М) та її склад (Li^+ / Na^+ / NH_4^{2+}) (I^- / Cl^- / SO_4^{2-} / SCN^- / ацетат / цитрат).

Утворення та ріст кристалів контролювали за допомогою поляризаційного мікроскопа (Nikon, Японія), оснащеного фотокамерою, яка передає зображення на комп'ютер.

2.8. Одержання комплексів лакази з BOTRAL методом вимочування кристалів

Комплекси лакази з BOTRAL з Cu^+ і Cu^{2+} були отримані шляхом вимочування кристалів лакази з BOTRAL в антирозчині, що додатково містив 0,6 мМ (насичений) CuCl (комплекс лакази BOTRAL Cu^+) або 10 мМ CuSO_4 (комплекс лакази BOTRAL Cu^{2+}). Час настоювання з CuSO_4 становив 1 добу. Вимочування в CuCl погіршувало якість кристалів, що було помітно під час спостереження кристалів у мікроскоп. Тож час настоювання обмежили до 10 хвилин.

Комплекс лакази з BOTRAL з 2,6-ДМФ був отриманий шляхом вимочування кристалів лакази з BOTRAL в антирозчині, який містив 2,6-ДМФ

у насичувальній концентрації 125 мМ. Кристали швидко зафарбовувалися в помаранчевий колір, який поступов ставав інтенсивнішим. Після 30 хвилин подальшої зміни кольору не спостерігалось. Тому час настоювання обмежили до 40 хвилин.

2.9. Збір дифракційних даних та вирішення структур

Для збору дифракційних даних у криогенних умовах кристали були перенесені на 5 секунд до антирозчину, що містив крім осаджувача 20% об. гліцерину, та заморожені до 100 К у струмені нітрогену.

Усі зібрані набори дифракційних даних було оброблено з використанням пакета XDS [40]. Усі кристали належали до просторової групи C2 та мали подібні параметри елементарної комірки (табл. 2.2).

Пошук стартової моделі для вирішення структури методом молекулярного заміщення проводили у програмі BALBES [41] за первинною структурою та дифракційними даними лакази з BOTRAL. Кристали лаказ із мутанту BOTRAL, BOTRAL Cu⁺ та BOTRAL Cu²⁺ були ізоморфними до кристалів лакази з BOTRAL. Усі кристалографічні розрахунки були виконані у пакеті CCP4 [42]. Структури було уточнено з використанням програми REFMAC5 [43]. Заселеність йонів купруму активного центру уточнювалася вручну, оскільки за повної заселеності йонів купруму на картах електронної густини з'являлися піки негативної електронної густини. Поступове зниження заселеності йонів купруму з кроком 0,1 проводилося доти, поки не зникли піки негативної електронної густини. Після уточнення заселеностей йонів купруму температурні фактори йонів купруму та їхніх лігандів зрівнялися. На завершальних етапах уточнення (після корекції заселеностей) проводилося анізотропне уточнення температурних факторів усіх йонів купруму в випадку лаказ із BOTRAL, BOTRAL Cu²⁺ та мутанту BOTRAL.

Візуальне інспектування та ручну перебудову моделі проводили з використанням програми COOT [44]. Молекули розчинника були додані до

структури вручну на основі аналізу різницевих карт електронної густини. Якість фінальних структур перевіряли з використанням програм SFCHECK [45] та PROCHECK [46]. Помилка в координатах визначена по Крушанку [47] в REFMAC5. Аналіз упаковки лакази в кристалі проводили у програмі PISA [48]. Усі ілюстрації було підготовлено з використанням CCP4MG [49] та RYMOL 1.6 (Shrodinger LLC). Аналіз графіку Рамачандрана проводився в MOLPROBITY [50].

Для визначення первинної структури молекулярної маси, коефіцієнта екстинції ϵ_{280} та pI використовувалася програма Prot Param [51]. Вирівнювання амінокислотних послідовностей здійснювали в CLUSTALW2 [52]. Розрахунок r.m.s.d. здійснювали функцією Align в RYMOL.

Таблиця 2.2

Статистичні характеристики наборів дифракційних даних та уточнення структур (у дужках вказані величини для шару з найвищою роздільною здатністю)

	BaL	L499M BaL	BaLCu ⁺	BaLCu ²⁺	BaL+ДМФ
1	2	3	4	5	6
Код PDB	3SQR	3V9E	4X4K	----	----
Просторова група симетрії	C2				
Параметри елементарної комірки (Å; °)	a=69.7, b=113.5, c=79.9, β=108.8	a=69.7, b=113.6, c=80.0, β=108.7	a=69.4, b=113.1, c=79.6, β=109.0	a=70.1, b=113.9, c=80.0, β=108.8	a=70.1, b=114.9, c=79.7, β=107.9
Роздільна здатність (Å)	30–1.66 (1.77–1.66)	30–1.71 (1.80–1.71)	30–2.31 (2.44–2.31)	30–1.83 (1.94–1.83)	30–1.98 (1.98–2.10)
I/σ	16.1 (2.1)	16.1 (2.8)	16.3 (2.3)	20.8 (5.1)	13.4 (2.9)
Повнота набору (%)	96.3 (90.6)	97.4 (95.2)	96.7 (94.6)	96.1 (90.5)	92.0 (72.6)
Загальна кількість відображень	181887 (24180)	199830 (31000)	81583 (12203)	124585 (16545)	102011 (11178)

Продовження таблиці 2.2

1	2	3	4	5	6
Кількість унікальних відображень	65731 (9904)	62839 (9875)	25106 (3913)	50252 (7615)	38357 (4839)
Надлишок	2.8 (2.4)	3.2 (3.1)	3.3 (3.1)	2.5 (2.2)	2.7 (2.3)
R_{max} (%)	4.7(53.1)	6.5(54.0)	7.1(60.0)	3.9 (23.0)	6.9 (42.0)
Уточнення					
R_{sym} (%)	16.6(28.0)	16.5(24.5)	18.1 (27.8)	16.2 (24.1)	18.1 (28.3)
R_{low} (%)	19.1(29.0)	20.0(28.2)	23.3 (34.7)	20.4 (30.2)	22.6 (35.3)
Відхилення від ідеальних значень:					
Довжини зв'язків (Å)	0.021	0.017	0.011	0.016	0.012
Кути між зв'язками (°)	1.91	1.97	1.62	1.92	1.68
Кількість атомів					
Протеїн	4206	4187	4087	4208	4209
Cu	3	3	5	3	3
вода	445	305	155	429	293
інше	197	164	197	197	210
Графік Рамачандрана					
Найбільш сприятлива область (%)	96.8	96.8	96.2	96.8	96.6
Дозволена область (%)	3.2	3.2	3.6	3.2	3.4
Температурні фактори (Å²)					
протеїн	28.3	23.4	38.6	23.3	32.2
Cu	26.7	24.6	38.3	21.2	29.4
вода	34.7	28.1	35.8	29.8	34.8
інше	39.0	35.3	58.9	37.7	50.0

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

де I_{hklj} – інтенсивність j -го спостереження відображення з індексами hkl , $\langle I_{hkl} \rangle$ – середня інтенсивність відображення і n_{hkl} – надмірність відображення з індексами hkl [53].

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Дослідження молекулярних властивостей лаказ, отриманих з аскоміцету BOTRAL та його мутантної форми

Розрахована з амінокислотної послідовності молекулярна маса лакази з BOTRAL дорівнювала наближено 60 кДа. Препарати лакази з BOTRAL та її мутантного штаму за результатами SDS-PAGE електрофорезу в своєму складі містили протеїн, ідентичний за чистотою (94 %) і молекулярною масою (~111 кДа) (рис. 3.1).

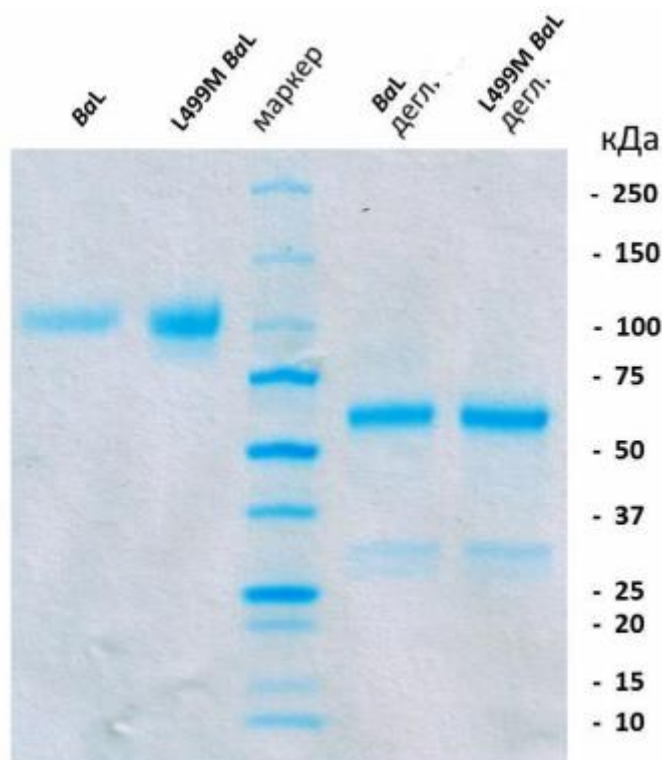


Рис. 3.1. Проявлення у ПААГ після SDS-PAGE електрофорезу смуг лаказ, зафарбованих Кумасі синім: перша – BOTRAL, друга – мутантного штаму, четверта і п'ята – відповідно їх деглікозильованих форм; третя – маркер молекулярних мас

Відмінність між експериментально визначеною та розрахованою з амінокислотної послідовності масами лакази BOTRAL пояснюється

глікозилуванням даного ензиму. Після деглікозилування, як було встановлено в результаті електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов, маса протеїну знизилась з 111 кДа до 71.

У результаті зафарбовування ПААГ після SDS-PAGE електрофорезу щодо глікопротеїнів було показано, що невелика їх кількість залишилась у деглікозилуваних формах лаказ, отриманих з BOTRAL та її мутантного штаму (рис. 3.2).

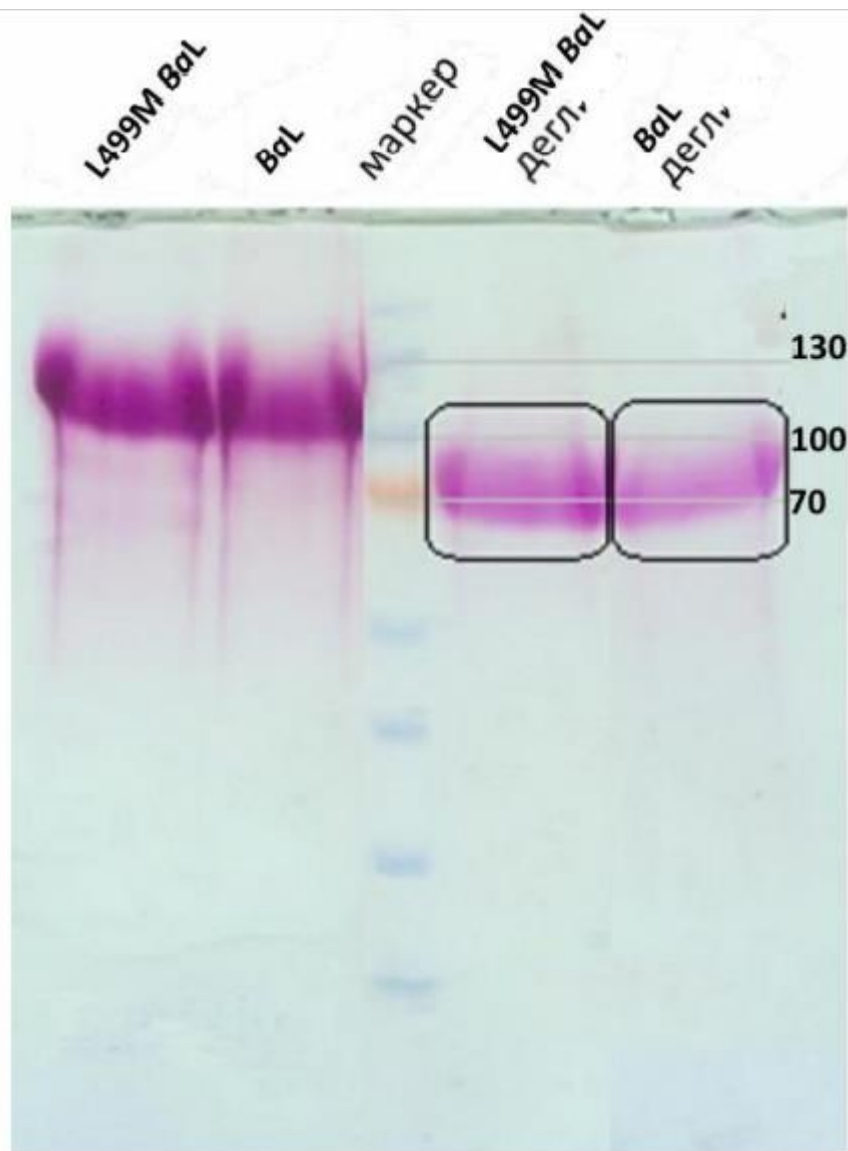


Рис. 3.2. Проявлення у ПААГ після SDS-PAGE, зафарбованому за вуглеводами, смуг лаказ: перша – мутанту BOTRAL, друга – BOTRAL, четверта і п'ята – відповідно їх деглікозилуваних форм; третя – маркер молекулярних мас

Розрахована з даних експериментів маса частини цукрів у лакази, одержаної з BOTRAL склала 39 кДа (39%). У деглікозильованому препараті лакази з BOTRAL та її мутантної форми маса вуглеводів дорівнювала 9 кДа (12%).

3.2. Кінетичні властивості лаказ, отриманих з BOTRAL та її мутантного штаму

Виміряні редокс-потенціали T1-центру лаказ, отриманих з BOTRAL та її мутанту становили відповідно 725 та 585 мВ. Вимірювання проводилося за методом медіаторного спектроелектрохімічного редокс-титрування за анаеробних умов [54]. Лаказа BOTRAL відноситься до високопотенціальних лаказ, що не є характерним для лаказ аскоміцетів.

З метою порівняння каталітичних властивостей лаказ, отриманих з BOTRAL та її мутанту було використано найспецифічніші для лакази з BOTRAL субстрати — 2,6-диметоксифенол і АБТС. З цими субстратами вимірювали рН-залежність питомої активності препаратів лаказ із BOTRAL та її мутантного штаму. Як видно з рис. 3.3, рН-оптимум реакцій окислення 2,6-ДМФ і АБТС, які каталізує лаказа з BOTRAL, а також рН-оптимум реакції окислення АБТС, яку каталізує лаказа з мутанту BOTRAL, знаходяться в кислій ділянці рН. Встановлено, що швидкість даних реакцій наближена до 0 при рН 7,0. Окрім цього, відмічено вищу швидкість реакції окислення субстрату, яку каталізувала лаказа з BOTRAL за рН = 2,0–8,0 порівняно до швидкості реакції, каталізованої лаказою, отриманою з мутантного штаму. Це можна пояснити вищим редокс-потенціалом T1-центру лакази з BOTRAL.

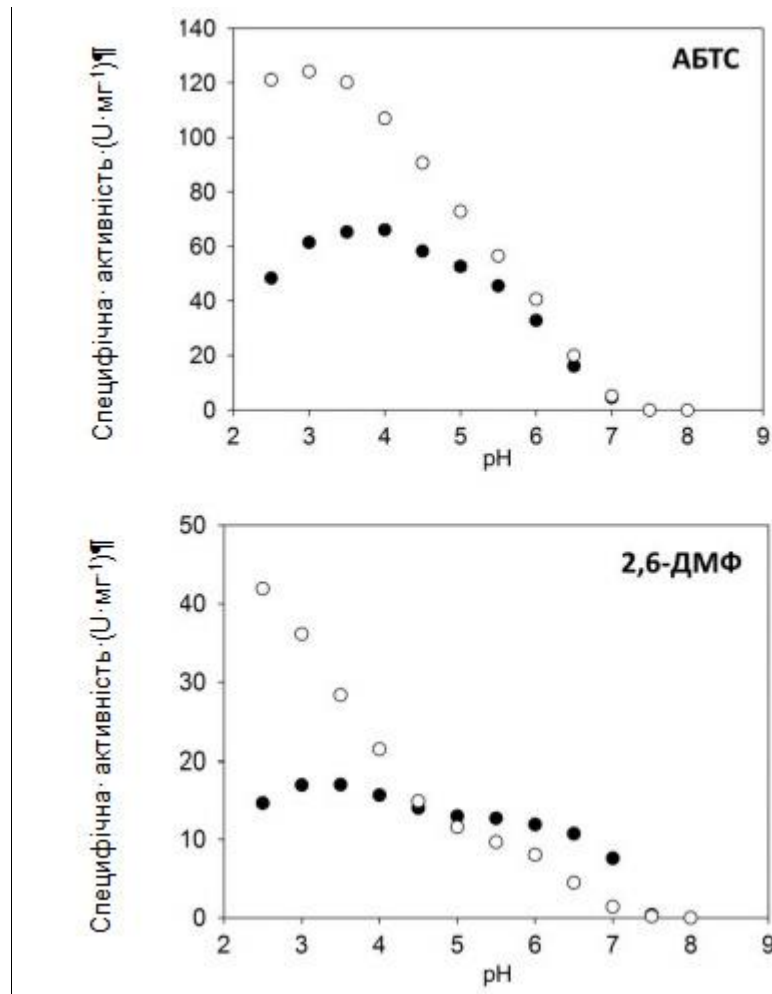


Рис. 3.3. pH-залежність специфічної активності лакказ при застосуванні у якості субстратів 2,6-ДМФ і АБТС: ○ – з BOTRAL, ● – з мутантного штаму

Проте, цілком по-іншому проходила реакція окислення 2,6-диметоксифенолу, яку каталізувала лакказа з мутантного штаму BOTRAL. Динаміка швидкості даної реакції була практично незмінною за умови pH = 2,0–6,0. При цьому, в реакції окислення 2,6-диметоксифенолу спостерігалась вища каталітична активність лаккази, отриманої з мутанту BOTRAL порівняно з активністю лаккази з BOTRAL, за рівня pH вищого, ніж 5,0.

Перевірка дії pH на кінетичні константи V_{max} та K_m за рівня pH – 3,0–6,0 проводилась з метою більш докладного вивчення ролі pH у регулюванні каталітичної активності лакказ, одержаних з BOTRAL та її мутантної форми (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Вплив різного рівня рН на кінетичні константи лаказ, отриманих з
BOTRAL і мутантного штаму за використання як субстратів 2,6-
диметоксифенолу та АБТС**

Субстрат	АБТС						
Фермент		BaL			L499M BaL		
	pH	Км, μM	V_{max} , U мг^{-1}	$V_{\text{max}}/\text{Км} \times 10^6$, $\text{U M}^{-1} \text{ мг}^{-1}$	Км, μM	V_{max} , U мг^{-1}	$V_{\text{max}}/\text{Км} \times 10^6$, $\text{U M}^{-1} \text{ мг}^{-1}$
	3.0	5.3 \pm 0.7	160.4 \pm 4.2	30.3	8.8 \pm 0.5	82.5 \pm 1.2	9.4
	4.0	14.0 \pm 1.0	126.9 \pm 2.6	9.1	19.3 \pm 1.0	74.2 \pm 1.1	3.8
	5.0	45.1 \pm 1.1	81.5 \pm 0.6	1.8	84 \pm 4	61.6 \pm 1.0	0.73
	6.0	148 \pm 4	41.8 \pm 0.5	0.28	500 \pm 19	40.4 \pm 0.6	0.081
Субстрат	2,6-ДМФ						
Фермент		BaL			L499M BaL		
	3.0	41.8 \pm 2.7	52.4 \pm 1.0	1.3	420 \pm 18	27.1 \pm 0.4	0.064
	4.0	8.3 \pm 0.7	37.4 \pm 0.7	4.5	80.8 \pm 2.7	23.6 \pm 0.2	0.29
	5.0	2.2 \pm 0.3	25.0 \pm 0.4	11.4	35.1 \pm 1.4	23.0 \pm 0.2	0.65
	6.0	1.8 \pm 0.2	17.8 \pm 0.2	9.9	34.7 \pm 1.1	22.8 \pm 0.2	0.65

З одержаних даних випливає, що максимальна швидкість реакції, так як і питома активність, знаходиться в залежності від значення рН, адже стандартні концентрації субстратів, які застосовувались для визначення питомої активності, у всій ділянці рН суттєво перевищували значення константи Міхаеліса. Однак, було відмічено, що із зростанням рівня рН Км для 2,6-диметоксифенолу й АБТС змінювались у протилежних напрямках. Зокрема, зі зростанням рівня рН для 2,6-диметоксифенолу константа Міхаеліса знижувалась у 10–22 рази, а для АБТС — підвищувалась у 30–55 разів. Це призводило до монотонного падіння ефективності каталізу ($V_{\text{max}} / \text{Км}$) для АБТС. При цьому, для 2,6-диметоксифенолу вона зростала до рН 5,0 і в

подальшому залишалась без змін у лакази з мутантного штаму або зменшувалась у лакази з BOTRAL.

Як відомо з літературних джерел, для лаказ грибів *Myceliophthora thermophila* та *Trametes villosa* за зростання рівня рН встановлено зниження константи Міхаеліса фенольних субстратів і підвищення її у нефенольних субстратів. Подібну залежність від рН можна пояснити редокс-властивостями та особливостями субстрату, що окислюється. Так, редокс-потенціалу нефенольних субстратів не властива залежність від рН середовища, а фенольних, навпаки, вона властива. Крім цього, окислення лаказою фенольних субстратів може включати в себе залежну від рН стадію протонування даного субстрату або продукту, що утворився. За умови ж окислення нефенольних субстратів протонування не передбачається. Як буде показано далі, лакази, отримані з BOTRAL та її мутантного штаму мають ідентичну структуру. З цього випливає, що різниці в залежності активності від рН між даними лаказами можуть бути пов'язані з відмінностями в редокс-потенціалі Т1-центру. Зміна залежності каталітичної ефективності лакази з мутанту BOTRAL від рівня рН, аналогічно з малими білками-переносниками електронів, очевидно, пояснюється відмінністю редокс-потенціалів Т2 / Т3 кластеру та Т1-центру, а також взаємозв'язком редокс-потенціалу Т1-центру і ліганду Т1-центру.

Залежність значення V_{max} від рН, як і в лаказ, одержаних з базидієвих грибів, найімовірніше можливо пояснити тим, що відбувається порушення внутрішньомолекулярного перенесення електронів між Т2 / Т3 кластером та Т1-центром, спричинене з'єднанням з йоном купруму Т2 ОН⁻.

3.3. Вивчення первинної структури лакази з BOTRAL

У таблиці 3.2 представлено ідентичність первинної структури лакази, отриманої з BOTRAL з найгомологічнішими представниками лаказ з бактерій та грибів, які є охарактеризовані структурно. Лаказа з аскоміцету *Melanocarpus*

albomyces була найідентичнішою (41 %) з лаказою, отриманою з BOTRAL з поміж інших лаказ, структури яких були відомі. Для лаказ із базидіоміцету *Trametes hirsuta* та з бактерії *Bacillus subtilis* ідентичність послідовностей з лаказою з BOTRAL дорівнювала відповідно 37 і 29 %.

Таблиця 3.2

Показники ідентичності первинної структури лакази, отриманої з BOTRAL до лаказ з відомими просторовими структурами

Організм	Кількість амінокислотних залишків	Ідентичність, %
<i>B. aclada</i>	542	100
<i>M. albomyces</i>	558	41
<i>B. subtilis</i>	501	29
<i>T. hirsuta</i>	498	37

Вирівнювання амінокислотних послідовностей лакази, отриманої з BOTRAL і лаказ із базидіоміцету *Trametes hirsuta*, аскоміцету *Melanocarpus albomyces*, бактерії *Bacillus subtilis* представлено на рис. 3.4. Амінокислотну послідовність лакази, одержаної з BOTRAL зображено зі сигнальним пептидом. Відщеплення сигнального пептиду при дозріванні білку проходить через пептидний зв'язок між залишками амінокислот серину та аланіну. Амінокислотна послідовність лакази, отриманої з BOTRAL містить чотири $C\alpha$ -з'єднувальні мотиви. В позиціях амінокислотної послідовності, що є відповідними до апікальних положень T1-центру в білків-гомологів розміщені варіабельний (Лей 499) і консервативний (Іле 491) амінокислотні залишки. С-кінцевий пептид у структурі лакази, отриманої з BOTRAL є гомологом такому ж пептиду лакази, яка отримана з *Melanocarpus albomyces*. Заміни в цьому тетрапептиді впливають на кінетичні властивості лакази з *M. albomyces*. Окрім цього, в амінокислотній послідовності лакази з BOTRAL виявлено 9 потенційних сайтів N-глікозилювання з амінокислотою послідовністю.

Позначеними на рисунку (див. рис. 3.4) є лише залишки аспарагіну, що в своїй структурі містять зв'язані вуглеводні ланцюги.

```

B.aclada -----SCANSATSRSCWGE-YSIDTNWYDVTP-TGVTREYW--LSVENSTITPDGYTR-SAMTFNGTVPGPAIIADWGD----NLI IHVTNNL
M.albomyces -----EPTC-NTPSNRACWSGDFDINTDYEVSTPDTGVTQSYVFNLT EVDNWMGPDGVVKEKVMILINGNIMGPNIIVANWGD----TVEVTVINNL
T.hirsuta -----A-VGPFAD----LTITDAAVSPDGF SR-QAVVVGVTGPGPLVAGNIGDRFQLNVIDNLNHT
B.subtilis TLEKFDALPIPDTLKPV--Q-QSKEKTYEVTM-EECTHQLH--RDLPPTRLW--GY-----NGLFPGPPTIEVKRNE----NVYVKWMNNL

B.aclada -----EHN-----GTSIHWGIRQLGSLEYDGVPGVTQCFIAP-GDTLTY-----KFQV-TQY-----GTTWYHSH---
M.albomyces -----VIN-----GTSIHWGSIQKDTNL-HDGANGVTECP IPPKGGQRTY-----RWRA-RQY-----GTSWYHSH---
T.hirsuta -----MLK-----STSIHWGFFQHG TNWADGPAFINQCPISP-GHSFLY-----DFQVPDQA-----GTFWYHSH---
B.subtilis PSTHFLPIDHTIHEPEVKTVVHLHG-----GVT-----P-DDSDGYPEAWFSKDFEQTPYFKREV-YHPNQQRGAILWYHSHDHPAMA

B.aclada -FSLQYGDGLFGLIINGP-----ATADYDE-DVGVI FLQDWAHESVFEIWDTARLGA--PPALENTLMNGTNTFDCSASTDPNCVGGGKFFELT
M.albomyces -FSAQYGNVGTIQINGP-----ASLPYDI-DLGVFPI TDYYRAADDLVHFTQNN--PPFSDNVLINGT-----AVNPN-TGEQYANVT
T.hirsuta -LSTQYCDGLRGPVVYD PNDPHASRYVDN-DDTVITLADWYHTA-----AKLGRFPFGGADATLINGKG-----RAPSD-----SVAELS
B.subtilis LTRLNVYACLVCAYI IHPKPKR-LKLPSEYDVPLLITDR TINED-----GSLFY--PSAPENPSPPLNPSIVPAFC CETILVNKVDHPYIL

B.aclada -----VPYTT--DTLLIGIQRYDVIVEANAADNYWIR-----GNWG--TTC--STNNEAANATGILRYDSSSI--ANPTSVGTT---P-RGT
M.albomyces -----NAMTV--DSLFLAVGQRYDVVIDASRAPDNYWFN-----VTFGGQAACGSLNPHPA---AIFHYAGAPG--GLPTDEGTP---PVDHQ
T.hirsuta -----QPLEV--DSIQIFAAQRYSFVLDANQAVDNYWIRANPNFNGV--FDG--GIN-----SAILRYDGAPA--VEPTTNTTSVKPLN-E
B.subtilis GSDGGLLPRSVKLSFSLAPAERYDIIIDFTA-----YEGESI IILANSAGCG-----GD

B.aclada CEDE-----PVASLV-----PH-----LALD-----VGGY-SLVDEQVSSAF----TNYFTWTINSSS---LLLD---WSSPTTL
M.albomyces CLDTLDRPVVPRSVVNSFV-----KRPDNTLPVALD-----LTG-----TPLFVWVNGSD---INVD---WGKPIID
T.hirsuta VDLH-----PLVSTP-----VP-----GSPS-----SGG-----VDKAINMAFNFGSNFF---INGAS---FVPP---TVPVLL
B.subtilis VNPE-----TDANIMQFRVTKPL-----AQKDES RPKYLASYPVQHERIQNIR---TLKLAGTQDEYGRPVLLLNKRWHDPVT-

B.aclada KIFN-----NET-IFPTEYNVVALEQ-EEWVVYVIE-DLTG-F-----GIWHPHILHGHDFIV-AQET-D-----VFNSDES--
M.albomyces YILTG-----NTS--YPVSDNIVQVDAVDQWTYLIENDPEGPF-----SLPFPMLHGHDFLVL-GRSP-DVPAASQQR FVDPDAVD--
T.hirsuta QILSGAQT AQD--LLPS-----GSVYVLP-SNAS-IEISFPATAAAGAPHPFHLLHGH TFAVVR SAGS-T-----VYNYD
B.subtilis -----ETPKVGTTEI-----W--SIIN-PTRG-----TPIHLLVLSFRVL-DRRPF D-----IARYQESGE

B.aclada -----PAKFNLVNPPR-----RDVAA--LPGNG-YLAIAFKLDNP--GSWLLHCHTAWHASEGT--AMQFVESQSSI--AVKMTDTAIFEDTCAN
M.albomyces -----LARLNGDNPPR-----RDTTM--LPAGG-WLLAFRTDNP--GAWLFHCHTAWHASEGT--SVDFLERPADLRQRI SQEEDDFNRVUDE
T.hirsuta -----NPIF-----RDVVSTGT PAAGDVTIRFD TNNP--GPWFLHCHTAWHASEGT--AVVMAEDTPDV--KAVNPVQAWSLDCPT
B.subtilis LSYTGPA---VPPPPSEKGWKDTIQ--AHAGE-VLRIAATF-GPYSGRYVWHCHTAWHASEGT--MRPMDITD-----

B.aclada WNAYTPTQLFAEDDSGI
M.albomyces WRAYWPTNPYPKIDSGI
T.hirsuta YDALDPNDQ-----
B.subtilis -----

```

Рис. 3.4. Вирівнювання АК послідовностей лаказ, отриманих з: BOTRAL, *Melanocarpus albomyces*, *Trametes hirsuta*, *Bacillus subtilis*. Ліганди центрів позначено кольорами: Т1-центру – червоним, Т2-центру – зеленим, Т3-центру – синім. Апікальні залишки Т1-центру позначено рожевим кольором. С-кінцевий пептид позначений сірим. Сайти N-глікозилювання позначені бірюзовим.

3.4. Гель-фільтраційний метод дослідження олігомерного складу лакази з BOTRAL

З метою визначення молекулярної маси лакази, отриманої з BOTRAL у розчині та доочистки препаратів для кристалізування застосовували гель-фільтраційний метод, який проводили на хроматографічній колонці. При цьому, для врівноваження хроматографічної системи в якості буферу

застосовували цитрат Na (50,0 мМ), рН якого становив 5,5 та ацетат Na (25,0 мМ), рН = 5,0.

Як видно з рис. 3.5 а, лаказа з BOTRAL в ацетаті Na знаходилась у димерному стані, молекулярна маса її становила 193,0 кДа. Деглікозильовану форму лакази, отриманої з BOTRAL позначено двома мажорними піками (рис. 3.5 б). Один із піків співвідноситься з високомолекулярними агрегатами, а інший пік — з димером, молекулярна маса якого становить 124,0 кДа.

На рис. 3.5 представлено одержаний результат з гель-фільтрації в 50,0 мМ цитраті Na (рН 5,5) лакази з BOTRAL. При нанесенні на гель-фільтраційну колонку концентрованого препарату лакази, отриманої з BOTRAL (концентрація білку становить 20,0 мг / мл) білок перебував у димерній формі. Молекулярна маса димеру дорівнювала приблизно 190,0 кДа. Якщо початковий препарат лакази з BOTRAL розводили цитратним буфером до концентрації 2,0 мг / мл та інкубували його приблизно 20 хвилин, тоді одержаний препарат сховався із колонки у вигляді суміші димер-мономер. При цьому, молекулярні маси димеру-мономеру становили відповідно 162,0 та 85,0 кДа. За таких умов деглікозильована форма лакази, отриманої з BOTRAL вивільнялась у вигляді мономеру з молекулярною масою 60,0 кДа.

У цитратному буфері лаказа з BOTRAL може існувати у вигляді суміші димер-мономер. Разом з тим, на елюційному профілі деглікозильованої форми лакази, отриманої з BOTRAL помітно, що для цитратного буферу вище відношення мономеру-димеру і високомолекулярних агрегатів, яким відповідним є пік на 7,0 мл. Таким чином, фермент володіє більшою полідисперсністю в цитратному буфері порівняно з ацетатним буфером. Полідисперсність білкових взірців рахується фактором, що ускладнює кристалізування білків. У дійсності, тільки при застосуванні ацетатного буферу вдалось одержати кристали за проведення кристалізації лакази з BOTRAL. За використання цитратного білкового буферу пошук умов кристалізації лакази, отриманої з BOTRAL не мав успіхів.

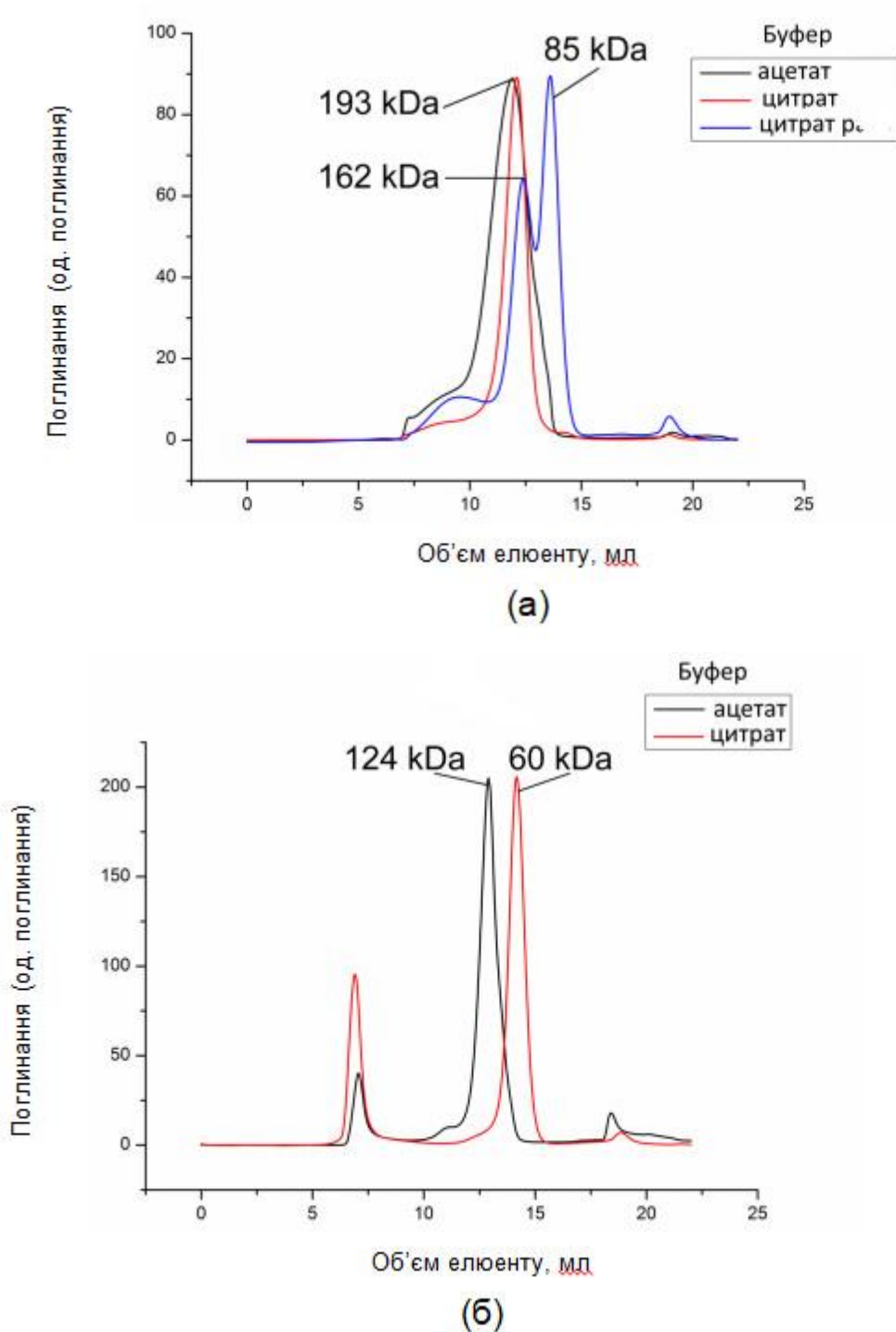


Рис. 3.5. Графік зображення гель-фільтрації лакази, отриманої з BOTRAL з використанням гель-фільтраційної колонки, яку зрівноважено ацетатом Na (25,0 Мм, рН = 5,0) або цитратом Na (50,0 Мм, рН = 5,5): чорні лінії — ацетат Na, червоні лінії — цитрат Na, синя лінія – цитрат р. (препарат лакази з BOTRAL, розбавлений цитратним буфером). Панель згори (а) — лаказа з BOTRAL; знизу (б) — деглікозильована її форма. Молекулярна маса піків визначалась з використанням калібрувальної кривої

3.5. Результати кристалізації лаказ, отриманих з BOTRAL і з мутантного штаму

Виявлено, що глікозильована форма лакази з BOTRAL набула кристалізації у вигляді тоненьких пластинок за застосування протирозчину (рН= 4,5) з вмістом 0,10 М ацетату Na, 0,20 М хлориду Na та 25,0 % поліетиленгліколю. Оптимізувати вказані умови кристалізації з метою одержання більшого розміру кристалів, придатних для здійснення рентгеноструктурного дослідження, не вдалося. Намагання кристалізувати глікозильовану форму лакази з мутантного штаму BOTRAL не було.

У таблиці 3.3 наведено умови одержання кристалів невеликих розмірів деглікозильованих форм лаказ, отриманих з BOTRAL і мутантного штаму BOTRAL.

Таблиця 3.3

Початкові умови, в яких було одержано кристали лаказ із BOTRAL та її мутанту

Лакази	Препарати лаказ	Склад антирозчину		
		Осаджувач	Буфер	Добавка
1	2	3	4	5
Лаказа з <i>B. allii</i>	20 мг/мл протеїн;	2 М амонію сульфат	0,1 М Тріс, рН 8,5	-
	25 мМ натрію ацетат, рН 5	30% мас. ПЕГ 4000	0,1 М натрію ацетат, рН 4,6	0,2 М амонію ацетат
		2 М амонію сульфат	-	-
		2 М амонію сульфат	0,1 М натрію ацетат, рН 4,6	-
		2 М амонію сульфат	-	5% об. ізопропанол

Продовження табл. 3.3

1	2	3	4	5
Лаказа з L499M <i>B. allii</i>	20 мг/мл протеїн;	30% мас. ПЕГ 4000	0,1 М натрію цитрат, рН 5,6	0,2 М амонію ацетат
	25 mM натрію ацетат, рН 5	25% мас. ПЕГ 4000	0,1 М натрію ацетат, рН 4,6	0,2 М амонію сульфат
		1 М літію сульфат, 0,5 М амонію сульфат	0,1 М натрію цитрат, рН 5,6	-
		25% мас. ПЕГ 3350	0,1 М Біс-Тріс, рН 5,5	0,2 М натрію хлорид

Для того, щоб одержати кристали, які були б придатними у рентгеноструктурних дослідженнях, знайдені умови кристалізації спробували оптимізувати. Придатні для рентгеноструктурного дослідження кристали деглікозильованої форми лакази, отриманої з BOTRAL були одержані при застосуванні як протирозчину водного розчину 1,80 М сульфату амонію (рис. 3.6).

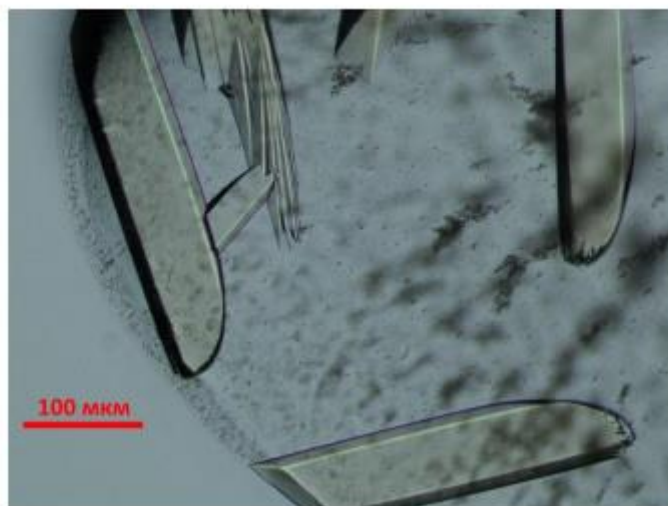


Рис. 3.6. Одержані в 1,80 М розчині сульфату амонію кристали деглікозильованої форми лакази з BOTRAL

Для деглікозильованої форми лакази, отриманої з мутанту BOTRAL монокрystals було одержано з застосуванням як протирозчину 1,0 М сульфату Li, 0,50 М сульфату амонію в 0,10 М цитраті Na (pH = 5,5). В першому і другому випадках поява кристалів спостерігалась на 3-ю добу. При цьому, максимального розміру — $0,1 \times 0,2 \times 0,05$ мм, вони досягли на протязі 1-го місяця росту.

Як видно з рисунків 3.6 та 3.7, кристали деглікозильованої лакази, отриманої з BOTRAL на протязі місяця після їх появи потроху гублять голубуватий колір забарвлення, набуваючи брудно жовтий відтінок. Знебарвлення лаказ, очевидно, може відбуватись за рахунок відновлення T1-центру. Однак, крім лакази з BOTRAL кристалізаційна крапля утримувала в собі тільки сульфат амонію та ацетат Na. Разом з тим, відомо, що препарати лаказ мають здатність до знебарвлення при агрегації також за відсутності відновника у розчині. Як встановлено, при агрегації проходить аутовідновлення лаказ, що й може бути причиною втрати кольору. Виявлено, що знебарвлення кристалів не відбувалось у лакази, отриманої з мутанту BOTRAL.

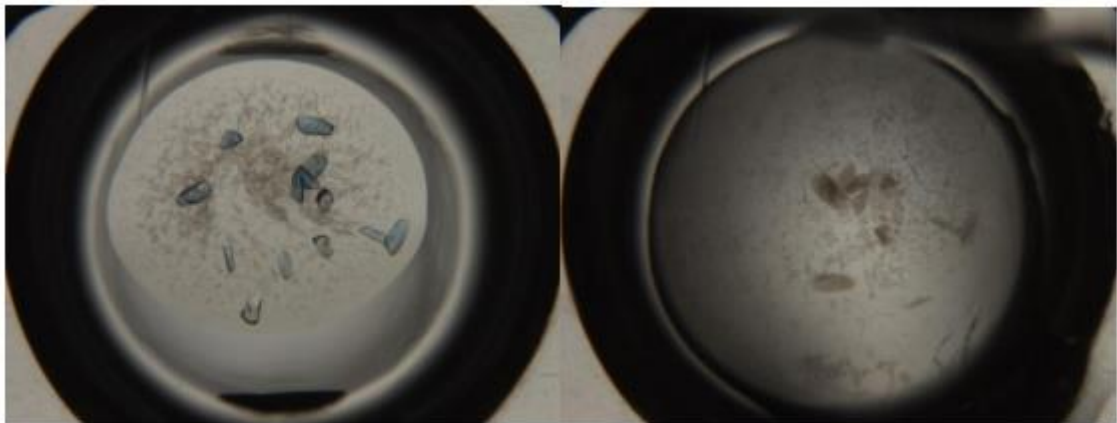


Рис. 3.7. Вирощені в 2,0 М сульфаті амонію та ізопропіловому спирті (5 % об.) монокрystals лакази з BOTRAL. Ліва панель — фото, одержане через три доби з моменту появи кристалів, права панель — фото, одержане через два тижні за цих же умов

3.6. Дослідження просторової будови лакази з BOTRAL

Як відомо, монокристали лакази з BOTRAL і лакази з її мутантного штаму відносяться до однієї просторової групи симетрії C_2 , параметри елементарної комірки яких є схожі (див. табл. 2.2). Структури лаказ із BOTRAL і її мутанту, BOTRAL Cu^+ та BOTRAL Cu^{2+} були вирішені з роздільною здатністю відповідно 1,66 і 1,71, 2,31 та 1,83 Å. При цьому, всі структури подібні на структуру лакази з BOTRAL і можуть поєднуватись з нею по координатах усіх Cu атомів з відхиленням 0,1–0,2 Å. В усіх структурах усі залишки амінокислот знаходились у ділянках роздільної здатності на карті Рамачандрана.

На рисунку 3.8 зображено просторову структуру мономеру лакази, отриманої з BOTRAL. Фермент складається з 543 залишків амінокислот. При цьому, амінокислотні залишки 405–408 не локалізовані на карті електронної щільності в усіх структурах. Структура лакази з BOTRAL містить три купредоксин-подібні домени, зокрема: I (Сер1–Про151), II (Ала152–Лей343) та III (Ала344–Іле543).

Кожний з доменів має схожу β -сандвічеву укладку поліпептидного ланцюга. Укладка поліпептидного ланцюга лакази, отриманої з BOTRAL ідентична до укладки аскорбатоксидази та інших 3-доменних лаказ. В структурі лакази з BOTRAL міститься три атоми купруму, один з яких розташований у T1-центрі, а два інші локалізуються в T3-центрі. T2 / T3 кластер з поверхнею білку з'єднується двома каналами. Ці канали утворено залишками, приналежними до I та III купредоксин-подібних доменів. Аналогічно, як і в структурі лакази з *Torrendia arenaria* та лакази з *Melanocarpus albomyces*, C-кінцевий тетрапептид прикриває канал з боку T3-центру йонів купруму.

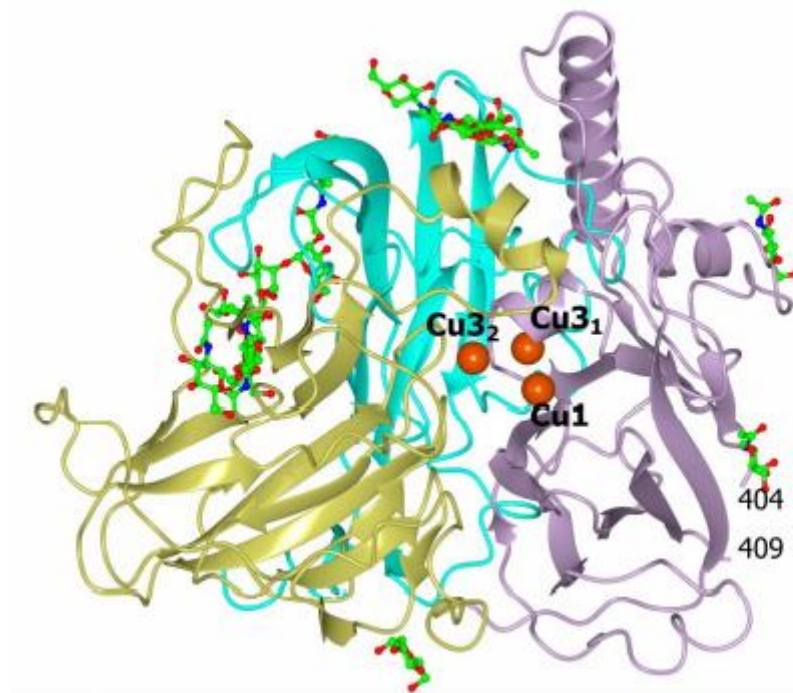


Рис. 3.8. Зображення стрічкової моделі будови лакази, отриманої з BOTRAL. Купредоксин-подібні домени зафарбовано: I – бірюзовим кольором, II – золотистим, III – синім. Йони Cu зображені у формі оранжево забарвлених сфер. Залишки вуглеводів показано кулястими стрижневими моделями, зафарбованими за типом атомів. Номерами вказано залишки, що обмежують петлю не локалізовану на картах електронної щільності

3.7. Дослідження димерної структури лакази з BOTRAL

Аналізування кристалічної упаковки лакази, отриманої з BOTRAL з використанням спеціальної програми показало, що в кристалі наявний міжмолекулярний контакт, який був утворений ділянками 2-х субодиниць, зв'язуючими субстрат. Не зважаючи на те, що програма передбачає нестабільність даного димеру в розчині, проте він становить зацікавленість, оскільки нами була досліджена димеризація лакази з BOTRAL у розчині. Разом з тим, димер-аналог за будовою виявлено в структурах лаказ, отриманих з грибів-аскоміцетів *Melanocarpus albomyces* та *Torrendia arenaria*. На рисунку 3.9 зображено димер лакази з BOTRAL, який було утворено першим контактом.

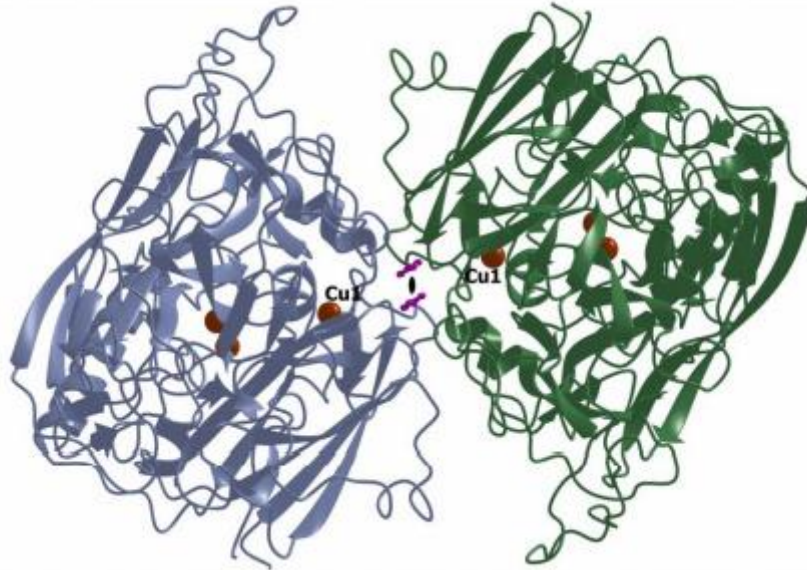


Рис. 3.9. Димерна структура лакази з BOTRAL. У обох субодиницях бічні ланцюги залишків фенілаланіну зображені кулястою стрижневою моделлю, зафарбованою у синій колір. Йони Cu показані оранжево забарвленими сферами. Кристалографічну обертову вісь 2-го порядку, розташовану перпендикулярно до площини рисунку зображено у вигляді чорної лінзи

Як видно з даних таблиці 3.4, димерний контакт у лакази, отриманої з BOTRAL на відміну від лаказ із *Melanocarpus albomyces* і *Torrendia arenaria* володіє більшою енергією сольватації та кількістю в інтерфейсі залишків. Окрім цього, дві субодиниці в димерах лаказ, отриманих з аскоміцетів зв'язуються обертовою віссю 2-го порядку. Ця вісь у структурі лакази з BOTRAL є кристалографічною, а в структурах лакази з *Melanocarpus albomyces* і лакази з *Torrendia arenaria* — некристалографічною.

Таблиця 3.4

Міжмолекулярні контакти-аналоги у кристалах лаказ, отриманих з різних грибів-аскоміцетів

Лакази	Площа контакту, Å ²	Енергія Гіббса утворення димеру, ккал/моль	Кількість залишків у інтерфейсі	Кількість водневих зв'язків
Лаказа з <i>B. allii</i>	1007	-13,1	70	2
Лаказа з <i>M. albomyces</i>	800	-12,2	54	7
Лаказа з <i>T. arenaria</i>	673	-10,7	55	6

Залишки 183–188, 294–303, 359–368, 417–424, 443–445, 468–469 розташовані в міжсубодиничному інтерфейсі димеру (табл. 3.5). Димер лакази з BOTRAL сформований за рахунок гідрофобних взаємозв'язків, взаємодії двох залишків фенілаланіну та двох водневих зв'язків між атомами аспарагіну і треоніну, пов'язаних операцією симетрії молекул ферменту. Залишок фенілаланіну, який ймовірно приймає участь у зв'язуванні субстрату і розташований у димерному інтерфейсі, міститься на відстані 3,6 Å від залишку фенілаланіну сусідньої молекули. Площини бензольних кілець залишків фенілаланіну компланарні, а відстань між нормаллями, які проходять через центр бензольного кільця, становить 1,2 Å. Подібне розташування відповідає найсильнішій взаємодії між цими залишками.

Таблиця 3.5

Амінокислотні залишки, які входять до димерного контакту лакази з BOTRAL

Порядкові номери залишків	Амінокислотна послідовність ділянки
183-188	LGAPPA
294-303	TTCSTNNGAA
359-368	SSAFTNYFTW
417-424	DLTGFGIW
443-445	TDV
468-469	GN

Відмінності в упакованні димерів лаказ, отриманих з BOTRAL, *Melanocarpus albomyces* і *Torrendia arenaria* зумовлені в основному відмінностями в укладці ділянок Тре–Ала, Асп–Трп, Тре–Вал в області сайту зв'язування субстрату біля T1-центру. В результаті цих відмінностей відстань між йонами купруму T1-центрів у димері лакази BOTRAL становить 21 Å, тоді як у відповідних димерах лаказ, отриманих з *Melanocarpus albomyces* і *Torrendia arenaria* 28 Å.

Крім цього, була знайдена порожнина в міждимерному інтерфейсі лакази з BOTRAL. Вона мала сплюснуту форму, лінійні її розміри становили 27×14×7 Å. Така ж порожнина була встановлена в структурі димерів лаказ, отриманих з *Melanocarpus albomyces* і *Torrendia arenaria*. Також відмічено, що через упаковку петель, які є складовими структури лакази з BOTRAL, лінійні розміри її порожнини менші. Внутрішня поверхня даної порожнини в лакази з BOTRAL утворена бічними ланцюгами гідрофобних залишків. Порожнину в структурі лакази, отриманої з *Melanocarpus albomyces* з 2,6-диметоксифенолом займають продукти окислення даного субстрату. При цьому, субстрату чи продуктів окислення не відмічалось у порожнині в димерній структурі лакази, отриманої з BOTRAL з 2,6-диметоксифенолом.

3.8. Результати, отримані за глікозилювання лакази з BOTRAL

Як відомо з літературних джерел, для лаказ грибів з роду *Botrytis* характерним є високий рівень глікозилювання. Так як вуглеводна частина може спричиняти перешкоджання для кристалізування, тому нативна та мутантна форми лакази з BOTRAL виявились деглікозильованими. Вуглеводний ланцюг, який за допомогою N-глікозидного зв'язку з'єднаний з залишками аспарагіну, містили 7 з 9 потенційних сайтів глікозилювання. На картах електронної щільності сумарно локалізувалось шість залишків МАН та дев'ять залишків НАГ. По одному залишку НАГ прикріплювалось до п'яти залишків аспарагіну.

При цьому, відмінність структури лакази з BOTAL від лакази з її мутантного штаму полягала у різній довжині вуглеводного ланцюга в залишку аспарагіну.

Як видно з рисунку 3.10, вуглеводний ланцюг при аспарагіні 194 містить шість вуглеводних залишків.

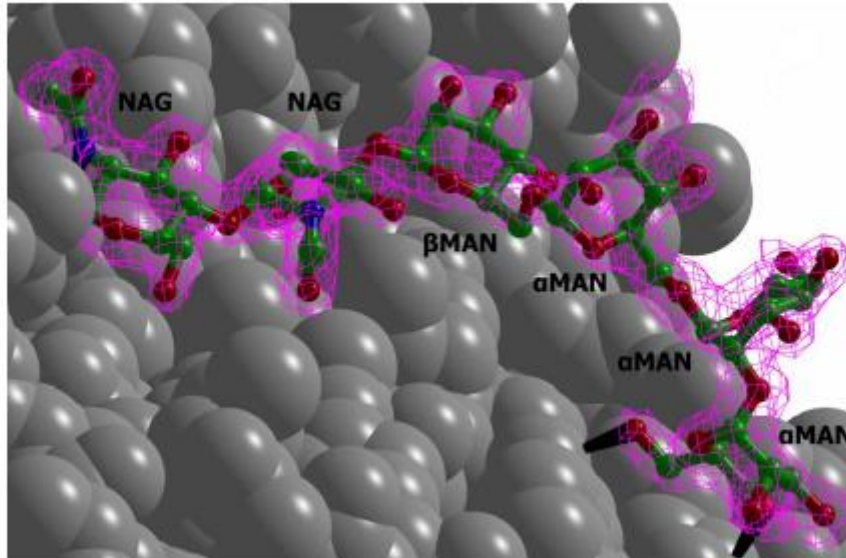


Рис. 3.10. Зображення прикріпленого до аспарагіну 194 вуглеводного ланцюга: куляста стрижнева модель — вуглеводи; куляста сіра модель — поверхня білку; фіолетовим кольором позначено карти електронної щільності; чорні конуси — вуглеводні зв'язки

Кінцевий залишок α -МАН у даному ланцюгу формує два водневих зв'язки. Це призводить до стабілізації положення цього вуглеводу в просторі та може створювати перешкоди для його відщеплення ферментом α -манозидазою. Стійкість у вказаному ланцюгу зв'язку НАГ(β 1- \rightarrow 4) НАГ до деглікозилювання, очевидно, пояснюється сукупністю факторів: розміщенням ланцюга в заглибленні на поверхні білку, стабілізацією його в просторі через формування водневих зв'язків залишку НАГ, який є першим у цьому ланцюгу, з атомами поліпептидного ланцюгу (O3 НАГ-O Вал160). Стабілізація у просторі даного вуглеводного ланцюгу призводить до істотного зниження В-факторів крайніх залишків порівняно з центральними залишками. Аналогічний вуглеводний ланцюг у структурі лакази з мутантного штаму має коротшу довжину, а на

карті електронної щільності розміщені тільки 3 залишки: МАН(β 1->4)НАГ(β 1->4)НАГ(β 1->N δ)Асн194). Як і в разі структури лакази з *Lentinus spp.* вуглеводний ланцюг приймає участь в утворенні додаткових водневих зв'язків між доменами. Домен I з доменом III з'єднуються двома водневими зв'язками N2 НАГ-O Вал162 та O4 МАН-N Глу32 першого й останнього вуглеводного залишку.

Три вуглеводних залишки у ланцюгу МАН(β 1->4)НАГ(β 1->4)НАГ(β 1->N δ)Асн82 містить вуглеводний ланцюг при аспарагіні (рис. 3.11). Він розміщений на поверхні білку в заглибленні. Внаслідок цього доступ до глікозидного зв'язку між залишками НАГ блокується стерично боковими ланцюгами залишків фенілаланіну і одним залишком НАГ, приєднаним до аспарагіну. Наявністю у даному ланцюгу залишку β -МАН можна пояснити те, що фермент, який специфічно розщеплює зв'язок МАН(β 1->4)НАГ не використано у процесі деглікозилювання.

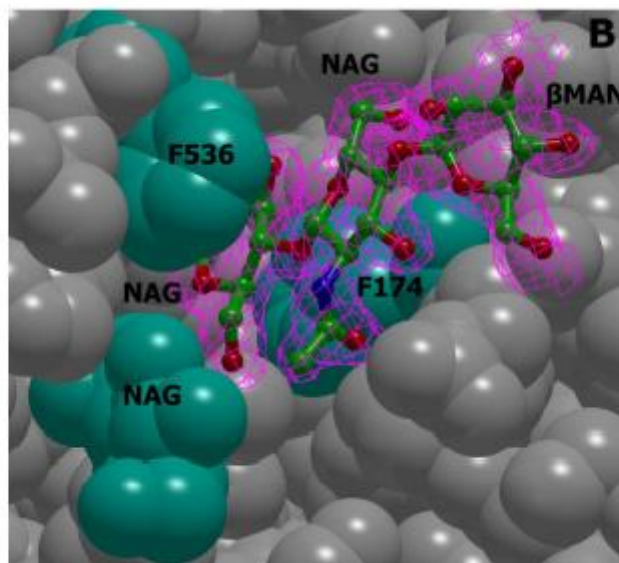


Рис. 3.11. Зображення структури прикріпленого до аспарагіну 82 вуглеводного ланцюга: куляста стрижнева модель — вуглеводи; куляста сіра модель — поверхня білку; бірюзовим кольором позначені залишки фенілаланіну та НАГ, який прикріплений до аспарагіну; фіолетовим виділені карти електронної щільності

На рисунку 3.12 зображено залишок МАН, який приєднаний до залишку серину. Як відомо з літературних джерел, о-глікозилювання для лаказ не характерне. Очевидно воно може бути пов'язано із застосуванням дріжджів *Pichia pastoris* у якості системи експресії.

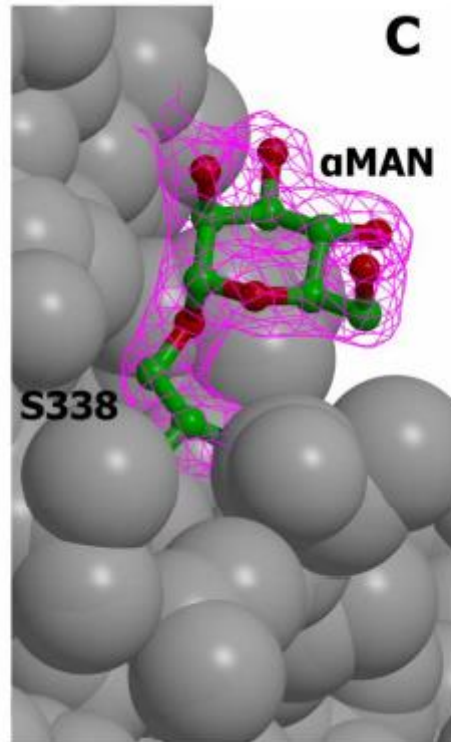


Рис. 3.12. Зображення залишку α -МАН, приєданого до серину: куляста стрижнева модель — МАН і серин; сіра куляста модель — поверхня білку; фіолетовим кольором зафарбовано карту електронної щільності

За рахунок формування міжмолекулярних водневих зв'язків відбувається стабілізація кристалу водневими зв'язками окремих вуглеводних залишків. Залишок НАГ, приєднаний до аспарагіну 55, утворює 4 зв'язки з залишками серину, треоніну і глутаміну сусідньої молекули, яка з'єднана з початковою операціями симетрії $-x$, y , $-z-1$. Залишок НАГ, прикріплений до аспарагіну 389, утворює 2 водневих зв'язки з глутаміном сусідньої молекули, яка з'єднана з початковою операціями симетрії $-x-1$, y , $-z-1$.

3.9. Порівняльна характеристика лакази з BOTRAL із окремими лаказами, отриманими з базидіоміцетів та з інших аскоміцетів

Проводився порівняльний аналіз структури лакази, отриманої з BOTRAL із структурами інших лаказ, отриманих з грибів-аскоміцетів *Melanocarpus albomyces* і *Torrendia arenaria*. Структури лакази з BOTRAL і лакази з *Melanocarpus albomyces* можуть суміщатись по координатах 400 еквівалентних Ca атомів із середньоквадратичним відхиленням 0,6 Å. Як видно з рисунку 3.13, у розміщенні петель, частина з яких локалізована в ділянці, що зв'язує субстрат, відмічаються найсуттєвіші різниці між структурою лакази з BOTRAL і лакази з *Melanocarpus albomyces*.

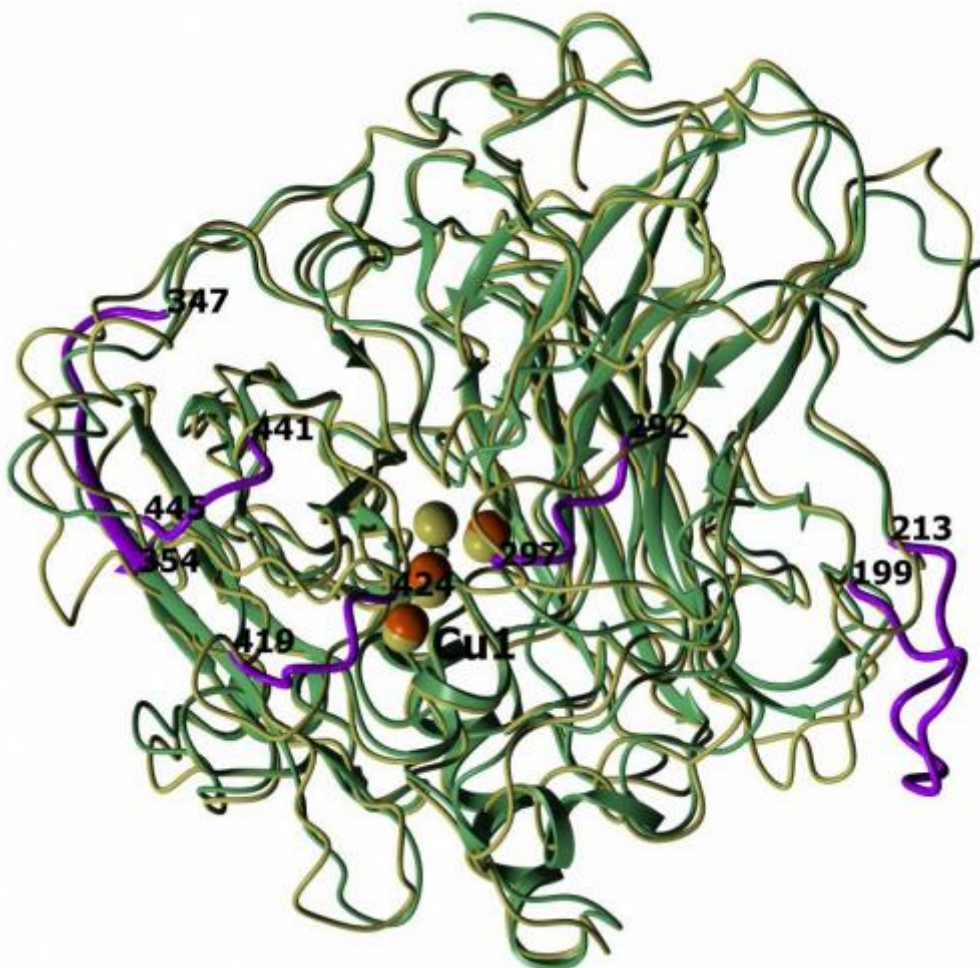


Рис. 3.13. Зображення структур лаказ: зеленим кольором — лаказа з BOTRAL, золотистим — лаказа з *Melanocarpus albomyces*, фіолетовим — петлі лакази з BOTRAL, які найсуттєвіше відрізняються від петель лакази з

Melanocarpus albomyces, цифрами — номери обмежувачих дані петлі залишків; оранжевими сферами позначено йони купруму лакази з BOTRAL, золотистими— йони купруму лакази з *Melanocarpus albomyces*

Окрім цього, ділянка, що зв'язує субстрат у лакази, отриманої з *Melanocarpus albomyces*, була розташована в структурі комплексної сполуки вказаної лакази з 2,6-диметоксифенолом.

Для порівняльного аналізу структури лакази з аскоміцету BOTRAL і лаказ з базидіоміцетів було використано лаказу, отриману з *Trametes hirsuta*. Структури лакази з BOTRAL і лакази з *Trametes hirsuta* можуть бути суміщені по координатах 442 C α атомів із середньоквадратичним відхиленням 0,8 Å. З рисунку 3.14 можна побачити, що найсуттєвіші різниці між структурами вказаних лаказ відмічаються в укладці поліпептидного ланцюга на поверхні білка.

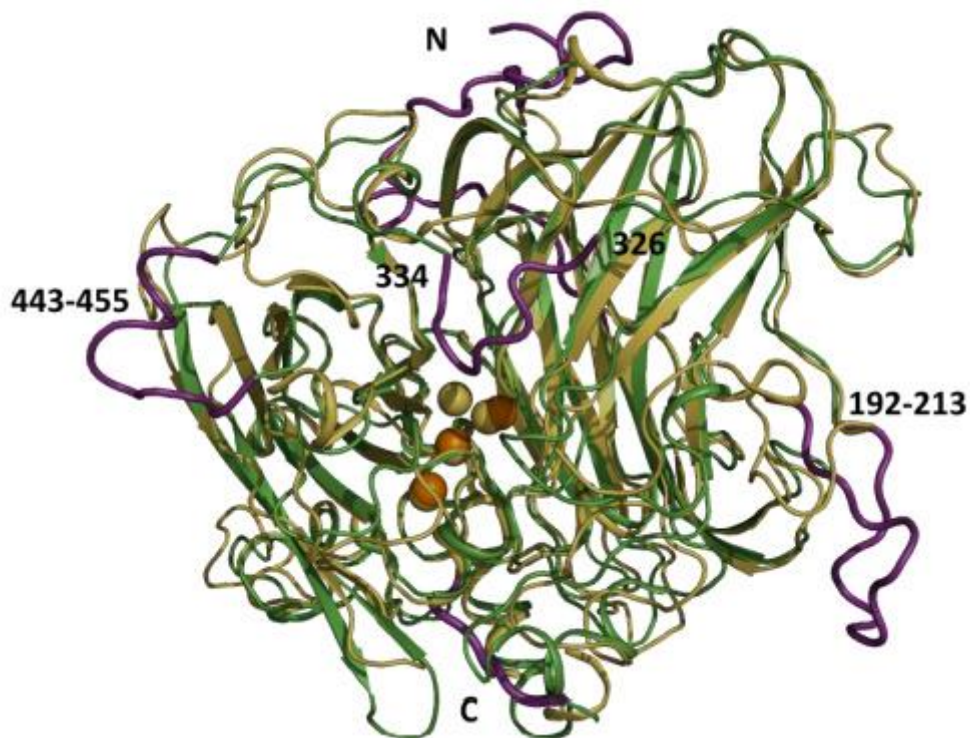


Рис. 3.14. Зображення структур лаказ: зеленим кольором — лаказа з BOTRAL, золотистим — лаказа з *Trametes hirsuta*, фіолетовим — петлі лакази з BOTRAL, які найсуттєвіше відрізняються від петель у лакази з *Trametes hirsuta*, цифрами — номери залишків у лакази з BOTRAL на кінцях цих петель, C і N —

кінцеві ділянки; оранжевими сферами представлено йони купруму в лакази з BOTRAL, золотистими — йони купруму в лакази з *Trametes hirsuta*

Також було виявлено, що поліпептидний ланцюг лакази, отриманої з *Trametes hirsuta* був коротшим з N- і C-кінця відповідно на 28 та 45 залишків порівняно до ланцюга лакази з BOTRAL. У структурі лакази, отриманої з BOTRAL N- та C-кінцеві пептиди перешкоджають доступу до каналів, що з'єднуються з T2 / T3 кластером. Як було встановлено за порівняльного аналізу структур лакази з BOTRAL і лакази з *Trametes hirsuta*, тільки 1 з C-кінцевих дисульфідних зв'язків між доменом I та доменом III має стале положення, інші ж зв'язки розпорошені просторово.

3.10. Структурні чинники, які впливали на процес інгібування лакази з BOTRAL галогенід-йонами

Як відомо, лакази інгібуються галогенід-йонами. T2 / T3 кластер рахується центром зв'язування галогенід-йонів. Найефективнішими пригнічувачами лаказ є фториди. При цьому, величина I50 (F⁻) перебуває у мікромольному діапазоні концентрацій. У випадку хлорид-йонів величина I50 знаходиться у широкому діапазоні та залежить від організму, з якого виділили ензим.

Було охарактеризовано інгібування лакази з BOTRAL йонами фтору та хлору за рівнів рН 3, 4,5 і 6, за яких ензим проявляє каталітичну активність (табл. 3.6). Встановлено, що лаказа з BOTRAL, як і інші лакази з аскоміцетів, украй стійка до пригнічення хлорид-йонами. Йони хлору за рівня рН вищого, ніж 4,6 практично не впливають на активність лакази. На величини I50 (F⁻) та I50 (Cl⁻), а також їх рН-залежність вплинула мутація в T1-центрі Лей499Met. За рН=3 стійкість мутантного штаму до інгібування фторид-йонами зросла в 25–115 разів, а стійкість до хлорид-йонів знизилась у 2–5 разів. Стійкість мутантного штаму до інгібування фторид-йонами за рН=6 знизилась у 4 рази в

реакції окислення АБТС, але залишилась без змін у реакції окислення 2,6-диметоксифенолу. Відмінності у значеннях I50 між лаказою з BOTRAL та лаказою з її мутанту, очевидно, пояснюються підвищенням величини $E_{T2/T3}$ – E_{T1} у лакази з мутанту BOTRAL. Із підвищенням рівня рН величини I50 (F^-) та I50 (Cl^-) зростають для обох форм ензимів. Це, можливо, пояснюється конкурентним інгібуванням галогенід-йонами та OH^- активності лаказ.

Таблиця 3.6

Виміряні за різного рівня рН величини I50 для інгібування лаказ із BOTRAL та її мутанту хлоридом і фторидом

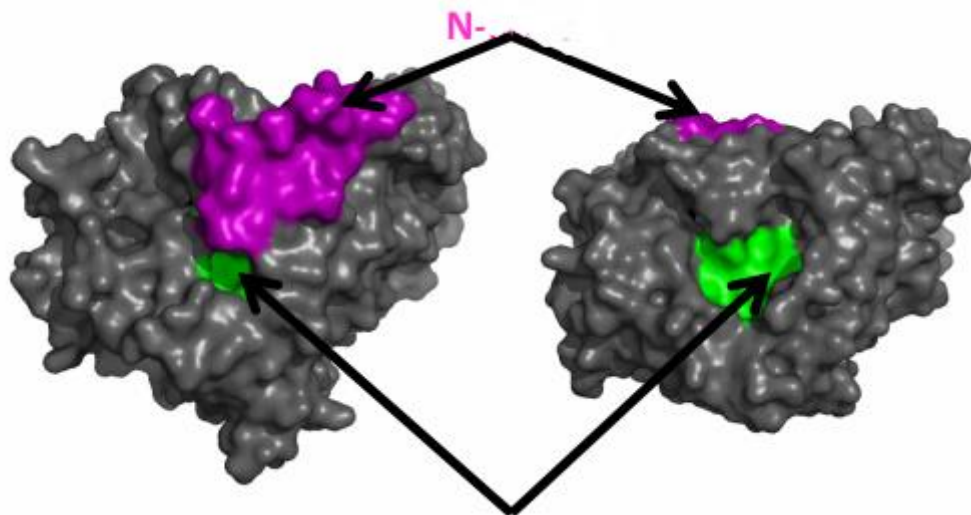
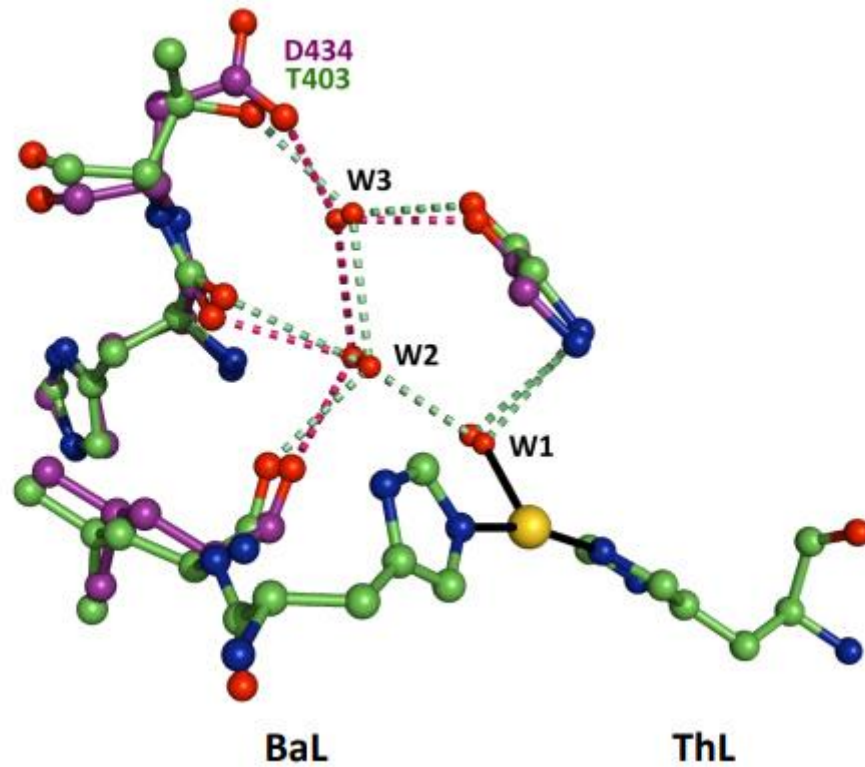
Фермент	I50(F^-), μM				I50(Cl^-), мМ			
	BaL		L499M BaL		BaL		L499M BaL	
Субстрат рН	АБТС	2,6-ДМФ	АБТС	2,6-ДМФ	АБТС	2,6-ДМФ	АБТС	2,6-ДМФ
3	0.5	0.07	9	9	251	131	95	28
4.5	50	189	169	120	>1000	>1000	508	1207
6	1085	257	371	293	Н	Н	Н	Н

Примітка: Н – не інгібує

Для пояснення відмінностей в ефективності інгібування лаказ з базидіоміцетів і аскоміцетів було залучено структурні дані.

На прикладі лаказ, отриманих з *Melanocarpus albomyces* і *Rhus vernicifera* за використання методів ЕПР спектроскопії та рентгеноструктурного аналізу показано, що хлорид- і фторид-йони можуть зв'язуватись з йоном Cu T2-центру, заміщуючи з'єднану з ним молекулу води. Відмінності у будові та амінокислотному складі цього каналу можуть пояснити виявлені різниці між величинами I50 (Cl^-) для лаказ, отриманих з базидіоміцетів і аскоміцетів.

Канал, що веде до T2-центру, в структурі всіх лаказ заповнений ланцюгом з'єднаних водневими зв'язками молекул води (рис. 3.15).



Устя каналу до йону купруму

Рис. 3.15. Верхня панель: фіолетовим кольором позначена координація консервативної води в каналі, який з'єднує йон купруму Т2-центру з поверхнею білка в структурі лакази з BOTRAL, зеленим — лакази з *Trametes hirsuta*. Нижня панель: зеленим кольором позначено вхід у канал, який з'єднує йон купруму Т2-центру з поверхнею білка в структурі лаказ із BOTRAL і *Trametes hirsuta*, фіолетовим — поверхню ділянки Ала1–Тре27

Ділянка каналу, яка містить молекули води W1–W2, має однакову будову в усіх 3-доменних лаказ. Відмінності спостерігаються у типі залишку, який утворює водневий зв'язок з молекулою води W3. У всіх відомих структурах лаказ, отриманих з аскоміцетів водневий зв'язок з молекулою води W3 утворює залишок аспарагіну. В структурі лаказ, отриманих з бактерій та базидіоміцетів молекула води W3 зв'язана відповідно з залишком серину або з залишком треоніну. В ряді випадків положення залишку аспарагіну може займати гідрофобний залишок. Можливо припустити, що депротонування залишку аспарагіну та відштовхування між негативно зарядженими йонами, яке виникає внаслідок нього, і депротонованою карбоксильною групою залишку аспарагіну може пояснити хлорид-резистентність лаказ, отриманих з аскоміцетів.

Другим чинником, який визначає високу хлорид-резистентність лаказ, отриманих з аскоміцетів може бути N-кінцева частина поліпептидного ланцюга. В лакази з BOTRAL вона на 26 амінокислотних залишків довша, ніж у лакази з *Trametes hirsuta*. В структурі всіх лаказ, отриманих з аскоміцетів N-кінцева частина упакована в безпосередній близькості від входу в канал, що веде до T2-центру. В результаті цього в лаказ, отриманих з аскоміцетів канал, який веде до T2-центру є довшим, що накладає додаткові обмеження на заряд та розмір йонів, які поступають по ньому.

ВИСНОВКИ

Одержані результати дозволяють зробити наступні висновки:

1. Структури лаказ із BOTRAL, її мутантного штаму, комплексів BOTRAL з CuSO_4 та CuCl визначені й уточнені з роздільною здатністю відповідно 1,66, 1,71, 1,83 і 2,31 Å.
2. Структури лаказ, отриманих з BOTRAL та її мутанту в T2-центрі не містили купруму.
3. Йон купруму в T2-центр деплекованої форми лакази з BOTRAL вбудовувався тільки за умови застосування солей купруму.
4. Відмінність структури лакази з BOTRAL від структури лакази з її мутантного штаму полягала у різній будові T1-центру, тому зменшення редокс-потенціалу T1-центру може бути пов'язано зі заміщенням апікального залишку Лей на Met.
5. При вивченні каталітичних властивостей лаказ, отриманих з BOTRAL та її мутанту встановлено, що мутантна форма лакази менш активна, ніж лаказа з BOTRAL, що корелює з нижчим значенням редокс-потенціалу T1-центру мутанту.
6. Хлорид-резистентність лаказ, отриманих з аскоміцетів можна пояснити особливостями будови каналу, що веде від поверхні до йону купруму T2-центру.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry // Trends Biotechnol. 2006. Vol. 24, № 5. P. 219–226.
2. Kittl R. et al. A chloride tolerant laccase from the plant pathogen ascomycete *Botrytis aclada* expressed at high levels in *Pichia pastoris* // J. Biotechnol. 2012. Vol. 157, № 2. P. 304–314.
3. Mate D.M. et al. Blood Tolerant Laccase by Directed Evolution: article // Chem. Biol. 2013. Vol. 20, № 2. P. 223–231.
4. Nersissian A.M., Shipp E.L. Blue copper-binding domains // Advances in Protein Chemistry. 2002. Vol. 60. P. 271–340.
5. Adman E.T., Murphy M.E.P. Copper nitrite reductase. In: Handbook of Metalloproteins. 2001. Vol. 2. P. 1381–1390.
6. La Croix L.B., Shadle S.E., Wang Y., Averill B.A., Hedman B., Hodgson K.O., Solomon E.I. Electronic structure of the perturbed blue copper site in nitrite reductase: spectroscopic properties, bonding, and implications for the entatic/rack state // Journal of the American Chemical Society. 1996. Vol. 118, № 33. P. 7755–7768.
7. Martinez-Espinoza R.M., Richardson D.J., Butt J.N., Bonete M.J. Respiratory nitrate and nitrite pathway in the denitrifier haloarchaeon *Haloferax mediterranei* // Biochemical Society Transactions. 2006. Vol. 34, № 1. P. 115–117.
8. Messerschmidt A., Huber R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modeling and structural relationships // European Journal of Biochemistry. 1990. Vol. 187, № 2. P. 341–352.
9. Calabrese L., Carbonaro M., Musci G. Presence of coupled trinuclear copper cluster in mammalian ceruloplasmin is essential for efficient electron transfer to oxygen // The Journal of Biological Chemistry. 1989. Vol. 264, № 11. P. 6183–6187.

10. Grass G., Rensing C. CueO is a multi-copper oxidase that confers copper tolerance in *Escherichia coli* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001. Vol. 286. № 5. P. 902–908.
11. Morozova O.V., Shumakovych H.P., Horbacheva M.A., Shleev S.V., Yaropolov A.I. «Blue» laccases // *Biochemistry*. 2007. Vol. 72. № 10. P. 1396–1412.
12. Majumdar S. et al. Roles of small laccases from *Streptomyces* in lignin degradation // *Biochemistry, United States*, 2014. Vol. 53, № 24. P. 4047–4058.
13. Hakulinen N. et al. A near atomic resolution structure of a *Melanocarpus albomyces* laccase. *J. Struct. Biol.* 2008. Vol. 162, № 1. P. 29–39.
14. Hakulinen N. et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site. // *Nat. Struct. Biol. United States*, 2002. Vol. 9, № 8. P. 601–605.
15. Kumar S.V.S. et al. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family: Comparative Study, Evaluation Studies, Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't. *Biotechnol. Bioeng. United States*, 2003. Vol. 83, № 4. P. 386–394.
16. Alcalde M. Chapter 26 Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. *Structure*. 2007. P. 461–476.
17. Hakulinen N., Rouvinen J. Three-dimensional structures of laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72, № 5. P. 857–868.
18. Ducros et al. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution // *Nat. Struct. Biol.* 1998. Vol. 5, № 6. P. 310–316.
19. Piontek K., Antorini M., Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90 Å resolution containing a full complement of coppers // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 40. P. 37663–37669.
20. Bertrand T. et al. 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.

21. 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.
22. Enguita F.J. et al. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component: a laccase with enhanced thermostability properties // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 21. P. 19416–19425.
23. Kallio J.P. et al. Crystal structure of an ascomycete fungal laccase from *Thielavia arenaria* — common structural features of asco-laccases // *FEBS J.* 2011. Vol. 278, № 13. P. 2283–2295.
24. Polyakov K.M. et al. Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2009. Vol. 65, № 6. P. 611–617.
25. Roberts S. et al. Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99, № 5. P. 2766–2771.
26. Durão P. et al. Perturbations of the T1 copper site in the CotA laccase from *Bacillus subtilis*: Structural, biochemical, enzymatic and stability studies // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2006. Vol. 11, № 4. P. 514–526.
27. Durão P. et al. Proximal mutations at the type 1 copper site of CotA laccase: spectroscopic, 102 redox, kinetic and structural characterization of I494A and L386A mutants // *Biochem. J.* 2008. Vol. 412, № 2. P. 339–346.
28. Chen Z. et al. The role of Glu498 in the dioxygen reactivity of CotA-laccase from *Bacillus subtilis* // *Dalton Trans.* 2010. Vol. 39, № 11. P. 2875–2882.
29. Silva C.S. et al. The role of Asp116 in the reductive cleavage of dioxygen to water in CotA laccase: assistance during the proton-transfer mechanism. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. United States*, 2012. Vol. 68, № Pt 2. P. 186–193.
30. Andberg M. et al. Essential role of the C-terminus in *Melanocarpus albomyces* laccase for enzyme production, catalytic properties and structure: *Journal*

Article, Research Support, NonU.S. Gov't // FEBS J. England, 2009. Vol. 276, № 21. P. 6285–63.

31. Gupta A. et al. Involvement of Tyr108 in the enzyme mechanism of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* // J. Am. Chem. Soc. United States, 2012. Vol. 134, № 44. P. 18213–18216.

32. Hann S. et al. SEC-ICP-DRCMS and SEC-ICP-SFMS for determination of metal-sulfur ratios in metalloproteins: article // J. Anal. At. Spectrom. The Royal Society of Chemistry, 2004. Vol. 19, № 1. P. 74–79.

33. Christenson A. Spectroelectrochemistry of Redox Enzymes Department of Analytical Chemistry. 2006.

34. Hoffmann P., Esser K. The phenol oxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. XII. Affinity of laccases II and III to substrates with different substitution patterns: Journal Article // Arch. Microbiol. 1977. Vol. 112, № 1. P. 111–114.

35. Childs R.E., Bardsley W.G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen: Journal Article // Biochem. J. 1975. Vol. 145, № 1. P. 93–103.

36. The Proteomics Protocols Handbook / под ред. Walker J.M. Totowa, NJ: Humana Press, 2005.

37. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.

38. Skoups R. Metoda ochystky belkov: Per. s anhl. Moskva: Myr, 1985. 358 s.

39. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage 107 T4: Journal Article // Nature. 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680–685.

40. Kabsch W. XDS: article // Acta Crystallogr. Sect. D. 2010. Vol. 66, № 2. P. 125–132.

41. Long F. et al. BALBES: a molecular-replacement pipeline // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2008. Vol. 64, № Pt 1. P. 125–132.
42. Winn M.D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2011. Vol. 67, № Pt 4. P. 235–242.
43. Murshudov G.N., Vagin A.A., Dodson E.J. Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method: article // *Acta Crystallogr. Sect. D*. 1997. Vol. Vol. 53, № 3. P. 240–255.
44. Emsley P. et al. Features and development of Coot: article // *Acta Crystallogr. Sect. D*. 2010. Vol. 66, № 4. P. 486–501.
45. Vagin A.A., Richelle J., Wodak S.J. SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model.: Journal Article, Research Support, Non-U.S. Gov't, Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr*. 1999. Vol. 55, № Pt 1. P. 191–205.
46. Laskowski R.A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures: article // *J. Appl. Crystallogr*. 1993. Vol. 26, № 2. P. 283–291.
47. Cruickshank D.W.J. in the Refinement of Macromolecular structures Proceedings of CCP4 Study weekend // *Proc. CCP4 Study Weekend*. 1996. P. 11–22.
48. Krissinel E., Henrick K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // *J. Mol. Biol. England*, 2007. Vol. 372, № 3. P. 774–797.
49. McNicholas S. et al. Presenting your structures: the CCP4mg molecular-graphics software: article // *Acta Crystallogr. Sect. D*. 2011. Vol. 67, № 4. P. 386–394.
50. Chen V.B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2010. Vol. 66, № Pt 1. P. 12–21.

51. The Proteomics Protocols Handbook / Walker J.M. Totowa, NJ: Humana Press, 2005.

52. McWilliam H. et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI // Nucleic Acids Res. 2013. Vol. 41, № W1. P. W597–W600.

53. Diederichs K., Karplus P.A. Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography: Journal Article // Nat. Struct. Biol. 1997. Vol. 4, № 4. P. 269–275.

54. Christenson A. et al. Redox potentials of the blue copper sites of bilirubin oxidases. // Biochim. Biophys. Acta. 2006. Vol. 1757, № 12. P. 1634–1641.