

ИССЛЕДОВАНИЕ ДОСТУПНОСТИ T2/T3 ЦЕНТРА ДВУХДОМЕННОЙ ЛАККАЗЫ ИЗ *STREPTOMYCES GRISEOFLOAVUS* AC-993

Тищенко С.В.¹, Костарева О.С.¹, Михайлина А.М.¹, Лисов А.А.², Коляденко И.А.¹,
Габдулхаков А.Г.¹

¹Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: sveta@vega.protres.ru

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН

проспект Науки, 5, г. Пущино, 142290, РФ

Поступила в редакцию: 13.06.2018

Аннотация. Лакказы (ЕС 1.10.3.2) – широко распространённые в природе «голубые» медьсодержащие оксидоредуктазы, являются перспективным объектом для биотехнологической индустрии. Субстратами этих ферментов являются различные фенольные соединения, лакказы обнаружены в высших растениях, некоторых насекомых, грибах и бактериях. Лакказы содержат четыре атома меди, организованные в 3 сайта: T1, T2 и T3. В бактериях, наряду с трёхдоменными лакказами, имеются двухдоменные лакказы (2DLac), которые имеют ряд функциональных преимуществ. 2DLac активны в нейтральных и щелочных значениях pH, обладают повышенной термостабильностью и устойчивы к действию различных ингибиторов. Каталитический механизм двухдоменных лакказ интенсивно изучается, однако, принципы субстрат/продуктного транспорта до сих пор не вполне понятны. В данной работе представлен сравнительный анализ каталитической активности и кристаллических структур рекомбинантной 2DLac из *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 и её мутантных форм с заменами His165 на Phe и Ala. Консервативный для 2DLac His165 принадлежит второй координационной сфере и располагается близко к поверхности белка. Мы предполагаем, что движение имидазольного кольца His165 может «открывать» или «закрывать» один из субстрат-продуктных каналов, ведущих к T2/T3 центру лакказы *S. griseoflavus*.

Ключевые слова: двухдоменные лакказы, *Streptomyces griseoflavus*, кристаллические структуры, T2/T3 центр, субстратные каналы.

ВВЕДЕНИЕ

Лакказы катализируют окисление различных соединений молекулярным кислородом. В результате происходит восстановление кислорода до воды. Ферменты используются при трансформации ксенобиотиков, делигнификации и окислении субстратов, имеющих промышленное значение (например, краски для текстиля), в косметике и медицине.

Активный центр лакказ имеет 4 иона меди: T1 центр, содержащий один ион меди (Cu1) и медьсодержащий T2/T3 кластер, который состоит из T2 центра (Cu2) и двух ионов меди T3 центра (Cu3_α и Cu3_β) [1]. T1 центр принимает электроны от субстрата, а T2/T3 центр связывает молекулу кислорода и восстанавливает её до воды [2]. Трёхдоменные лакказы представляют собой мономер, состоящий из 3 доменов. 2DLac состоят из двух доменов и образуют функциональный тример, причём, T2/T3 центр локализован в интерфейсе между мономерами [3].

Ранее мы определили кристаллические структуры двух рекомбинантных 2DLac рода *Streptomyces* – лакказы из *S. viridochromogenes* Ac-629 [4] и из *S. griseoflavus* Ac-993 [5]. Сравнительный структурный анализ окружения, а T2/T3 центра большинства 2DLac и трёхдоменных лакказ показал отличия в сети каналов, соединяющих этот центр с поверхностью белка. В структуре трёхдоменных лакказ явно видны широкие каналы, обеспечивающие доступ кислорода к каталитическому центру, в 2DLac возможные каналы явно неопределены.

Целью наших исследований является поиск каналов, соединяющих T2/T3 центр 2DLac с поверхностью белка. Мы предположили, что гистидин 165, принадлежащий второй координационной сфере T2/T3 центра лакказы *S. griseoflavus* (SgfSL) может играть роль «ворот» одного из каналов для транспорта кислорода к каталитическому центру. Согласно нашим предположениям, замена гистидина на аланин должна открыть «ворота», а замена на гидрофобный фенилананин – закрыть.

Анализ структур SgfSL и двух мутантных форм (His165Phe SgfSL и His165Ala SgfSL) показал, что изменения наблюдаются только в местах замен аминокислотных остатков. Каталитическая активность His165Ala SgfSL повысилась по сравнению с активностью белка дикого типа, а активность His165Phe SgfSL значительно снизилась.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение SgfSL и мутантных форм.

Генетические конструкции His165Phe SgfSL и His165Ala SgfSL получены методом сайт-направленного мутагенеза по протоколу Quick Change. В качестве матрицы для ПЦР использована плаزمида pQE-993nS, в которой последовательность гена SgfSL не содержала последовательности сигнального пептида [13].

Использованы следующие олигонуклеотиды: для His165Ala SgfSL: прямой – 5' TCGGCACGGAAGCGGGCACGGGCGGCAT -3' и обратный – 5' - ATGCCGCCCGTGCCCGCTTCCGTGCCGA -3'; для His165Phe SgfSL: прямой – 5' TCGGCACCGAA TTTGGCACCGCGGCATTCGCAACGG -3' и обратный – 5' - GCCGCCCGTGCCAAATTCCGTGCCGACGACGTGGTC -3', курсивом с подчёркиванием показаны заменённые основания. ПЦР продукты были обработаны DpnI эндонуклеазой и затем трансформированы в компетентные клетки XL1-Blue. Нуклеотидная последовательность новых генетических конструкций подтверждалась секвенированием.

Компетентные клетки *Escherichia coli* M15 (pRep4) (Qiagen) трансформированы соответствующими плазмидами и выращены до оптической плотности $A_{600} = 0,5$ о.е при 37 °C с перемешиванием 150 об/мин. Суперпродукция лакказ индуцировалась добавлением 0,1 мМ ИППГ (ИзоПропил β -D-1-ТеоГалактопиранозид). Одновременно с ИППГ добавляли $CuSO_4$ до конечной концентрации 1 мМ и инкубировали клетки при температуре 18 °C с перемешиванием 50 об/мин. Клетки собирали центрифугированием при 5000 g в течение 15 минут, суспендировали в буфере А (20 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,4, 0,5 М NaCl и 20 мМ имидазола) с 1 мМ ФМСФ (ФенилМетилСульфонил Фторид) и разрушали на гомогенизаторе высокого давления EmulsiFlex-C3 (Avestin). Обломки клеточных мембран удаляли центрифугированием (15000g 30 мин.). Поскольку рекомбинантные белки содержали в N-концевой части шесть остатков гистидина, мы использовали металл-аффинную хроматографию. Клеточный экстракт наносили на колонку HisTrap (V = 5 мл) (GE Healthcare), уравновешенную буфером А. Несвязавшиеся со смолой белки удаляли промывом смолы 20 мл буфера А. Элюцию лакказ проводили буфером А со 150 мМ имидазола. Фракции, содержащие ферменты, были собраны и диализованы против буфера 50 мМ H_3BO_3 -NaOH, pH 9,0, 100 мМ NaCl.

Анализ каталитической активности.

Определение pH-оптимумов активности лакказ проводили в 50 мМ буфера Бриттона-Робинсона (борная кислота/ортофосфорная кислота/уксусная кислота) в области pH от 3,0 до 9,8. В качестве субстратов были использованы АБТС ($\lambda_{\text{макс}} = 420$ нм, $\epsilon_{420} = 36000$ М⁻¹см⁻¹) и 2.6-ДМФ ($\lambda_{\text{макс}} = 469$ нм, $\epsilon_{469} = 49600$ М⁻¹ см⁻¹). Реакции проводили при комнатной температуре при оптимальных для ферментов значениях pH. Полученные данные о кинетике окисления субстратов аппроксимированы с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен, а также посредством линеаризации методом Лайнуивера-Берка в двойных обратных координатах $1/V$ и $1/[S]$, где V – скорость катализируемой реакции, выраженная в единицах удельной активности, и S – концентрация субстрата.

Кристаллизация и кристаллография.

Все эксперименты по кристаллизации проводились, как описано в [5] с небольшими модификациями.

Перед замораживанием кристаллы вымачивали в криорастворе (условия № 17 набора Crystal Screen Cryo, “Hampton Research”, США). Сбор дифракционных данных проводили на линии BL14.1 синхротрона BESSY (Берлин, Германия). Данные обрабатывали в программе XDS [6]. Фазовая проблема решена методом молекулярного замещения в программе Phaser [7], в качестве стартовой модели использовали структуру SgSL дикого типа [9]. Пространственную модель уточняли в программном комплексе Refmac [8], занятость ионов меди в T1-, T2- и T3-центрах определяли в программе Phenix [9]. Ручную правку структуры проводили в программе Coot [10]. Каналы доступа к T2/T3- центру рассчитывали в программе Caver [11], координационную ошибку структур оценивали в программе Scheck [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный структурный анализ каналов, ведущих к T2/T3-центру лакказ

Каналы 2DLac отличаются от каналов трёхдоменных лакказ длиной и шириной [13]. Предположительная роль Cu_2 и Cu_3 ионов состоит в фиксации молекулы кислорода в T2/T3 центре и временное связывание OH- групп перед поступлением протонов и освобождением воды [2]. Канал, ведущий к Cu_2 (T2 канал), может быть ответственным за транспорт протонов к активному центру [14] и удалению молекул воды [3]. В нем же располагается вероятный донор электронов 2DLac - тирозин 109. В структурах трёхдоменных лакказ на месте OH- группы этого аминокислотного остатка находится молекула воды.

Роль канала, ведущего к T3 центру (T3 канал), по-видимому, заключается в транспорте молекулярного кислорода [15, 16]. Таких T3 каналов может быть несколько. Мы предположили существование T3 канала, ведущего через межсубъединичное пространство от His165 по направлению к Cu_3 . Этот путь является кратчайшим для доступа кислорода с поверхности белка к T2/T3 центру (рис.1). Гистидин 165 занимает положение, соответствующее Glu498 в структуре трёхдоменной лакказы CotA *Bacillus subtilis*. Боковая цепь глутамина направлена внутрь T3 канала CotA. По этому каналу, предположительно, осуществляется доступ кислорода к каталитическому центру. Известно, что замены Glu498 на Asp, Thr и Leu приводили к резкому падению активности мутантных белков.

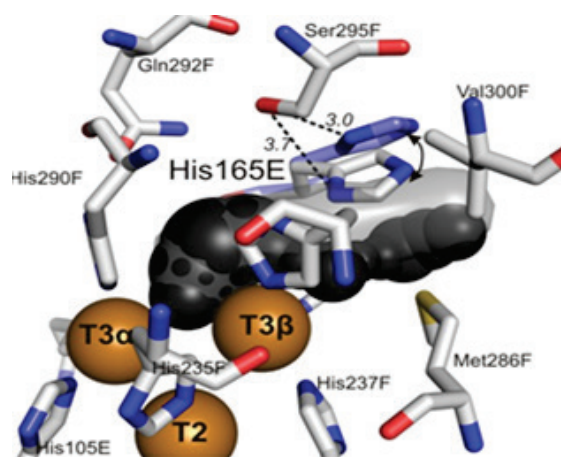


Рисунок 1. Предположительный Т3-канал, His 165 в «закрытом» и «открытом» положении. Буквами Е и F отмечены аминокислотные остатки, принадлежащие к разным молекулам тримера лакказы. Цифрами показано расстояние между имидазольным кольцом гистидина и сериновым остатком соседнего мономера в «закрытом» (3,7 Å) и «открытом» (3,0 Å) состоянии

Несмотря на то, что укорочение длины боковой цепи в случае замен на аспаратат и треонин расширяет канал и повышает доступность Т2/Т3 центра, данные мутации значительно снижали активность фермента, что, вероятно, свидетельствовало о том, что Glu498 в трёхдоменных лакказах является переносчиком протонов, а не «воротами» данного канала. Видимо, роль аминокислотных остатков, расположенных в каналах, ведущих к Т2/Т3 центру, отличается у трёхдоменных и двухдоменных лакказ. Мы предполагаем, что роль переносчика протонов у 2DLac может выполнять глутамин (Gln291 у SgSL).

В структурах 2DLac SgfSL (PDB ID 5LHL) и лакказы *S. viridochromogenes* (PDB ID 4N8U) гистидин165 находится только в «закрытом» положении и минимальный радиус канала составляет всего $0,71 \pm 0,09$ Å. Расчёт стерически разрешённых состояний боковой цепи His165 показал, что имидазольное кольцо может смещаться и формировать водородную связь с серином 295 соседнего мономера (рис. 1), что расширяет канал до минимального радиуса в 1,28 Å. Этой ширины канала может быть достаточно для прохождения молекулы кислорода. Таким образом, расчёты свидетельствуют о возможности движения имидазольного кольца гистидина 165 в SgfSL, что позволяет рассматривать этот аминокислотный остаток как «ворота» Т3-канала лакказы.

Влияние замен гистидина 165 на активность SgfSL.

Для того чтобы подтвердить или опровергнуть гипотезу о наличии Т3-канала, «открытие» или «закрытие» которого обеспечивается мобильностью имидазольного кольца His165, были созданы мутантные формы His165Phe SgfSL и His165Ala SgfSL. Белки выделены, очищены, закристиализованы, их структуры определены с высоким разрешением 1,95 Å и 2.3 Å, соответственно. Структуры депонированы в банк данных белковых структур: His165Phe SgfSL – PDB код 6FC7, His165Ala SgfSL - PDB код 6FDJ.

Анализ каталитической активности SgfSL и её мутантных форм при использовании в качестве субстрата АБТС (оптимум pH = 4,0 для SgfSL и мутантных форм) показал, что замена His165Phe в SgfSL приводит к резкому (более чем на 2 порядка) снижению значения K_{cat}/K_m , а замена His165Ala в 1,4 раза повышает активность SgfSL (табл. 1). His165Phe SgfSL не окисляет 2,6-ДМФ, активность His165Ala SgfSL относительно 2,6-ДМФ (оптимум pH белков = 8,5) практически не меняется (табл. 1).

Таблица 1. Каталитическая активность SgfSL и её мутантных форм. * - активность не наблюдается

		K _m (mM)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
АБТС	SgfSL	0,1±0,008	6,6±0,12	66,28
	SgfSL-H165A	0,12±0,01	10,8±0,21	90
	SgfSL-H165F	0,45±0,03	0,12±0,009	0,26
2,6-ДМФ	SgfSL	5,2	0,8	0,15
	SgfSL-H165A	6,1±0,34	1,1±0,065	0,18
	SgfSL-H165F	*	*	*

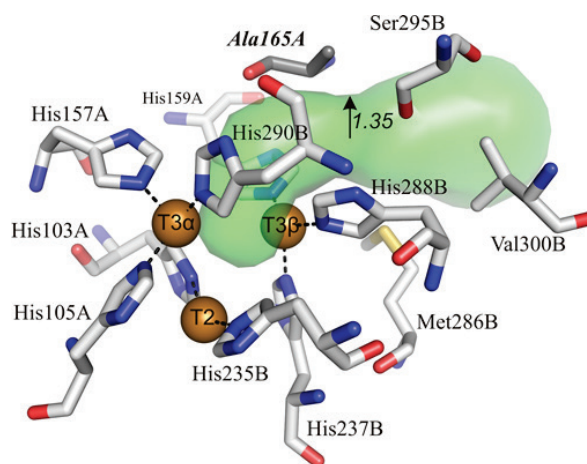


Рисунок 2. Фрагмент структуры His165Ala SgfSL. Указан радиус канала (Å). Пунктиром показаны связи ионов меди T2/T3 центра с гистидинами первой координационной сферы

Изменения в структурах наблюдались лишь в точках мутаций. Боковая группа фенилаланина находится в том же положении, что и имидазольное кольцо гистидина и перекрывает T3 канал, однако, Phe не может быть «воротами» канала, поскольку из-за своих гидрофобных свойств, практически не меняет свое положение. Это приводит к постоянному закрытию канала и, соответственно, существенному снижению каталитической активности. При замене His165 на аланин радиус канала увеличивается до 1,35 Å (рис. 2), T3 всегда находится в «открытом» состоянии, что, по всей видимости, и приводит к некоторому повышению активности фермента. Показано, что заполненность медью функциональных центров лакказы дикого типа и её мутантных форм примерно одинакова, тем самым, отсутствие меди в активных центрах не может быть причиной изменений в функциональной активности мутантных форм SgfSL.

По результатам наших исследований можно сделать вывод о наличии одного из каналов SgfSL, ведущих с поверхности белка к T2/T3 центру, а именно, к T3 β иону меди от His 165.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 18-04-00270-а) и Программы Президиума “Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии” РАН.

Список литературы / References:

1. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.*, 1996, vol. 96, pp. 2563-2606.
2. Bento I., Martins L.O., Gato Lopes G., Arménia Carrondo M., Lindley P.F. Dioxygen reduction by multicopper oxidases; a structural perspective. *Dalt. Trans.*, 2005 vol. 4, p. 3507, DOI:10.1039/b504806k.
3. Skálová T., Dohnálek J., Østergaard L.H., Østergaard P.R., Kolenko P., Dušková J., et al. The Structure of the Small Laccase from *Streptomyces coelicolor* Reveals a Link between Laccases and Nitrite Reductases. *J. Mol. Biol.*, 2009, vol. 385, pp. 165-1178, DOI: 10.1016/j.jmb.2008.11.024.
4. Trubitsina L.I., Tishchenko S.V., Gabdulhakov A.G., Lisov A.V., Zakharova M.V., Leontievsky A.A. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes*. *Biochimie*, 2015, vol. 112, pp. 151-159, DOI: 10.1016/j.biochi.2015.03.005.
5. Tishchenko S., Gabdulhakov A., Trubitsina L., Lisov A., Zakharova M., Leontievsky A. Crystallization and X-ray diffraction studies of a two-domain laccase from *Streptomyces griseoflavus*. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.*, 2015, vol. 71, pp. 1200-1204, DOI: 10.1107/S2053230X15014375.
6. Kabsch W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2010, vol. 66, pp. 133-144, DOI: 10.1107/S0907444909047374.
7. McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.*, 2007, vol. 40, pp. 658-674, DOI: 10.1107/S0021889807021206.
8. Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., et al., REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2011, vol. 67, pp. 355-367, DOI:10.1107/S0907444911001314.
9. Adams P.D., Afonine P.V., Bunkóczi G., Chen V.B., Davis I.W., Echols N., et al. PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2010, vol. 66, pp. 213-221, DOI: 10.1107/S0907444909052925.
10. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and development of Coot, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2010, vol. 66, pp. 486-501, DOI: 10.1107/S0907444910007493.
11. Pavelka A., Sebestova E., Kozlikova B., Brezovsky J., Sochor J., Damborsky J. CAVER: Algorithms for Analyzing Dynamics of Tunnels in Macromolecules, *IEEE. ACM Trans. Comput. Biol. Bioinforma.*, 2016, vol. 13, pp. 505-517, DOI: 10.1109/TCBB.2015.2459680.

12. Vaguine A.A., Richelle J., Wodak S.J., et al. *SFCHECK*: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 1999, vol. 55, pp. 191-205, DOI:10.1107/S0907444998006684.
13. Gabdulkhakov A.G., Kostareva O.S., Kolyadenko I.A., Mikhaylina A.O., Trubitsina L.I., Tishchenko S.V. Incorporation of Copper Ions into T2/T3 Centers of Two-Domain Laccases. *Mol. Biol.*, 2018, vol. 52, DOI:10.1134/S0026893318010041.
14. Jones S.M., Solomon E.I. Electron Transfer and Reaction Mechanism of Laccases. *Cell Mol Life Sci.*, 2015, vol. 72, pp. 869-883, DOI:10.1007/s00018-014-1826-6. Electron.
15. Komori H., Kataoka K., Tanaka S., Matsuda N., Higuchi Y., Sakurai T. Exogenous acetate ion reaches the type II copper centre in CueO through the water-excretion channel and potentially affects the enzymatic activity. *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol. Commun.*, 2016, vol. 72, pp. 558-563, DOI: 10.1107/S2053230X16009237.
16. K.M. Polyakov, S. Gavryushov, S. Ivanova, T. V. Fedorova, O.A. Glazunova, A.N. Popov, et al., Structural study of the X-ray-induced enzymatic reduction of molecular oxygen to water by *Steccherinum murashkinskyi* laccase: insights into the reaction mechanism. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.*, 2017, vol. 73, pp. 388-401, DOI: 10.1107/S2059798317003667.

INVESTIGATIONS OF ACCESSIBILITY OF T2/T3 COPPER CENTRE OF TWO-DOMAIN LACCASE FROM *STREPTOMYCES GRISEOFLAVUS* AC-993

Tishchenko S.V.¹, Kostareva O.S.¹, Mikhaylina A.O.¹, Lisov A.V.², Kolyadenko I.A.¹, Gabdulkhakov A.G.¹

¹Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences

Institutskaya str., 4, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: sveta@vega.protres.ru

²Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences
Nauki dis., 5, Pushchino, 142290, Russia

Abstract. Laccases (EC 1.10.3.2) are "blue" copper-containing oxidoreductases widely distributed and highly important for biotechnology. The substrates of these enzymes are various phenolic compounds. Laccases are found in higher plants, some insects, fungi and bacteria. Laccases contain four copper atoms organized in 3 sites: T1, T2 и T3. In bacteria, along with three-domain laccases, there are two-domain laccases (2DLac), which have a number of functional advantages. 2DLac are active at neutral and alkaline pH values, have increased thermostability and are resistant to the action of various inhibitors. The catalytic mechanism of the two-domain laccase is intensively studied; however, the principles of substrate/product transport are still not fully understood.

This paper presents a comparative analysis of the catalytic activity and crystal structures of recombinant 2DLac from *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 and its mutant forms with His165 substitutions on Phe and Ala. His165 is conservative for 2DLac, it belongs to the second coordination sphere and is located near the surface of the protein. We assume that the movement of the imidazole ring His165 can "open" or "close" one of the substrate-product channels leading to the T2 /T3 center of laccase from *S. griseoflavus*.

Key words: two-domain laccases, *Streptomyces griseoflavus*, crystal structures, T2 / T3 center, substrates channels.