

(регрессионных) зависимостей, претендующих на модели, имеющие физический смысл.

#### Список литературы / References:

1. Власов Ю.А., Смирнов С.М. *От молекулы гемоглобина – к системе микроциркуляции*. Новосибирск: Наука, 1993, 245 с. [Vlasov Yu.A., Smirnov S.M. *From the hemoglobin molecule to the microcirculation system*. Novosibirsk: Nauka, 1993, 245 p. (In Russ.)]
2. Winslow R.M., Swenberg M., Berger R.L. et al. Oxygen equilibrium curve of normal human blood and its evaluation by Adair's. *J. Biol. Chemistry*, 1977, vol. 252, no. 7, pp. 2331-2337.

### ПОВЫШЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ИОНОВ МЕДИ В ЛАККАЗЕ *STREPTOMYCES GRISEOFILAVUS* УВЕЛИЧИВАЕТ ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ БЕЛКА

Костарева О.С., Габдухаков А.Г., Мельник Б.С., Тищенко С.В.

ФГБУН Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пушchino, 142290, РФ

**Аннотация.** Фермент лакказы принадлежит к семейству медь-содержащих оксидаз. Лакказы эукариот состоят из трёх доменов, в бактериях, кроме трёхдоменных, существуют двухдоменные (малые) лакказы. Трёхдоменные лакказы в настоящее время применяются в промышленности, органическом синтезе, косметике и медицине. Двухдоменные лакказы начали исследоваться сравнительно недавно, они имеют более высокую термостабильность и устойчивость к высоким значениям pH, что может способствовать их использованию в различных отраслях производства.

Объектом наших исследований являются малые лакказы рода *Streptomyces* – *Streptomyces griseoflavus* и *S. viridochromogenes*. Несмотря на высокую гомологию, эти белки обладают разной термостабильностью. На основе биоинформатического анализа этих лакказ мы определили аминокислотные остатки, предположительно, влияющие на большую термостабильность лакказы *S. viridochromogenes*. Была получена мутантная форма лакказы *S. griseoflavus* (SgSLmut) с заменой трёх метиониновых аминокислотных остатков на лейцины. Мы предположили, что эти замены приведут к уплотнению гидрофобного ядра молекулы белка и повышению термостабильности лакказы, поскольку в соответствующих положениях более термостабильной лакказы *S. viridochromogenes* вместо метионинов находятся лейцины.

Тем не менее, биофизические исследования показали, что SgSLmut обладает меньшей термостабильностью, чем белок дикого типа. Для контроля данных биофизических исследований нами были получены кристаллы мутантного белка и дифракционные данные с них. Анализ структуры мутантной формы лакказы показал меньшую заселенность ионами меди T2 / T3 центров. Мы предположили, что понижение термостабильности белка может быть связано с дестабилизацией структуры тримера лакказы из-за уменьшения содержания меди в T2 / T3 кластере. Выращивание биомассы штамма-суперпродукента в среде с повышенным содержанием меди привело к насыщению медью T2 / T3 кластера и повышению термостабильности SgSLmut до уровня белка дикого типа.

**Ключевые слова:** лакказы, мутагенез, пространственная структура, медь-содержащие центры.

### INCREASING THE OCCUPANCY OF T2/T3 CENTER LACCASE FROM *STREPTOMYCES GRISEOFILAVUS* BY COPPER IONS ENHANCE THE THERMOSTABILITY OF THE PROTEIN

Kostareva O.S., Gabdulkhakov A.G., Melnik B.S., Tishchenko S.V.

Institute of Protein Research, RAS

Institutskaya st., 4, Pushchino, 142290, Russia

**Abstract.** Laccase belongs to the family of copper-containing oxidases. Eukaryotic laccases consist of three domains, while in bacteria in addition to the three-domain laccases there are two-domain (small laccases). Three-domain laccases have applications in the food industry, organic synthesis, cosmetics and medicine. Two-domain laccases are began to investigate recently, they have a higher thermostability and active in the alkaline pH range. These properties can be useful for different fields of industry.

The objects of our studies are small laccases from *Streptomyces* species – *Streptomyces griseoflavus* and *S. viridochromogenes*. Despite the high sequence homology, the thermostability of proteins differs. Based on bioinformatic analysis we obtained mutant form of laccase from *S. griseoflavus* (SgSLmut) with substitutions of three methionines to leucines like in more thermostable laccase from *S. viridochromogenes*.

Nevertheless biophysical investigations revealed that SgSLmut to be less thermostable comparing to wild type protein. Structural analysis of mutant form of laccase showed that occupancy of T2/T3 center by copper ions in mutant form is lesser than in a wild type protein. We suggested that reduced thermostability of SgSLmut could be result of the destabilization of functional trimer of laccase due to decrease of occupancy by copper ions of T2/T3 center. We have grown cells of strain-superproducent of SgSLmut with increased content of copper in the medium and obtain protein with almost full occupancy T2/T3 center by copper ions. Thermostability of such SgSLmut enhanced to the level of wild type protein.

**Key words:** laccase, mutagenesis, crystal structure, copper-containing center

**Введение.**

Двухдоменные лакказы формируют функциональный тример. В состав активного центра тримера малых лакказ входят 12 атомов меди, которые организованы в металлоцентры трех типов. В мономере T1-центр содержит один атом меди и в ходе катализа участвует в отъеме электронов у окисляемого субстрата. Три атома меди организованы в T2/T3 медь-содержащий центр, который состоит из T2-центра с одним атомом меди и T3-центра с двумя атомами меди. В T2/T3 центре происходит восстановление кислорода до воды, причём, атомы меди T2/T3 центра локализованы между мономерами (см. рис. 1) и координируются боковыми группами гистидинов аминокислотных остатков.

К настоящему времени хорошо изучены структура и свойства двухдоменной лакказы *S. coelicolor* [1]. Мы определили структуры двухдоменных лакказ из *S. viridochromogenes* [2] и *Streptomyces griseoflavus* [3]. Лакказа *S. viridochromogenes* более термостабильна, что показано как биохимическими, так и спектроскопическими методами. Остаточная активность лакказы *S. viridochromogenes* после 1 часа инкубации при 98 °C составляет 40 %, а остаточная активность лакказы *S. griseoflavus* всего 6 %. Для оценки причин различной термостабильности лакказ мы провели анализ аминокислотной последовательности с помощью программы FoldUnfold и молекулярнодинамические исследования. На основе этих данных был получен штамм-суперпродуцент *Escherichia coli* для синтеза лакказы SgSLmut с заменой метионинов в трёх положениях (M54L/M64L/M96L). В данной работе приведены результаты структурного анализа мутантной формы лакказы *S. griseoflavus* и спектроскопический анализ термостабильности белка.

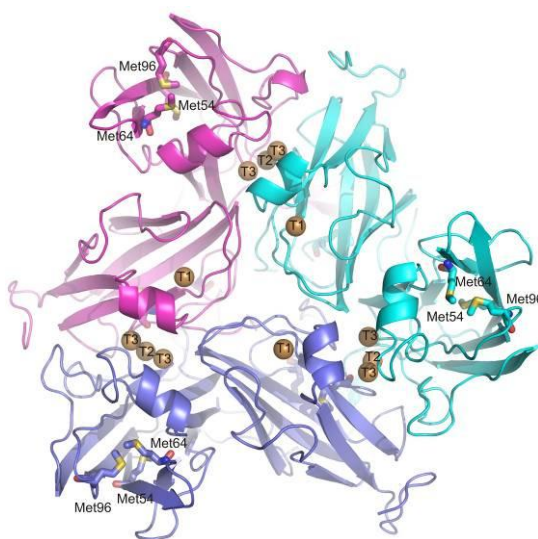


Рисунок 1 – Тример лакказы из *S. griseoflavus*, разными цветами показаны мономеры белка. Отмечены метионины в положениях 54, 64 и 96 и атомы меди активных центров

### Материалы и методы.

#### Получение SgSLmut.

Аминокислотные замены в белок были введены методом quick change. В качестве матрицы для ПЦР была использована плаزمида на основе вектора pQE30, несущая ген лакказы из *S. griseoflavus* без сигнального пептида. Штамм *E. coli* M15(pRep4) (Qiagen) трансформировали плазмидой, несущей ген мутантного белка. Полученную культуру клеток выращивали в среде LB при 37 °C с перемешиванием 150 об/мин до оптической плотности  $A_{600} = 0.5$ . Суперпродукция лакказы индуцировалась добавлением 0,1 мМ изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ). Одновременно с ИПТГ добавляли  $\text{CuSO}_4$  до конечной концентрации 0,25 мМ или 1 мМ и инкубировали клетки при 18 °C с перемешиванием 50 об/мин в течение 18 часов.

Полученную биомассу суспендировали в буфере А (20мМ Na-фосфатный буфер, pH 7.4, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол) с добавлением ДНКазы I и фенилметилсульфонил фторида и инкубировали на холоду в течение часа. Клетки разрушали проточным гомогенизатором высокого давления (Avestin, Канада), клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 15000g в течение 30 минут. Клеточный экстракт наносили на колонку со смолой Ni-NTA agarose, уравновешенную буфером А. После нанесения экстракта колонка промывалась буфером А с 30 мМ имидазола для удаления примесных белков, затем проводилась элюция SgSLmut буфером А со 150 мМ имидазола. Фракции, содержащие белок, объединяли, концентрировали и диализовали в буфер (50 мМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ -NaOH, pH 9.0, 100 мМ NaCl).

#### Измерения спектров флуоресценции.

Измерения спектров флуоресценции белков проводились на спектрофлуориметре «Cary Varian 100» (Австралия) в стандартной кварцевой кювете с длиной пути 1 см. Кривые плавления записывались при  $\lambda = 310$  и 350 нМ при концентрации белка 0,1 мг/мл,  $\lambda_{\text{возбуждения}} = 280$  нМ.

#### Кристаллизация и структурный анализ.

Кристаллизация SgSLmut велась в условиях, близких к условиям кристаллизации белка дикого типа [3]. 3 мкл раствора с белка с концентрацией 20-30 мг/мл в 0,1M NaCl, 0,05M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>-NaOH, pH 9,0 смешивали с 0,5 мкл 20% ПЭГ 6К, 0,1M Бицин, pH 9,0. Противораствор содержал 23% ПЭГ 4К, 0,05M Tris-HCl, pH 8,0.

Перед замораживанием кристаллы вымачивали в криорастворе (№17 Crystal Screen Cryo). Сбор дифракционных данных проводился на линии ID 29 синхротрона ESRF (Гренобль, Франция). Обработка данных осуществлялась в программе XDS [4]. Фазовая проблема решена методом молекулярного замещения в программе Phaser [5], в качестве стартовой модели использовалась структура лакказы из *S. griseoflavus* дикого типа с разрешением 2,0 Å [3]. Уточнение пространственной модели проводилось в программном комплексе Refmac [6], занятость ионов меди в T1, T2 и T3 центрах определялась в программе Phenix [7]. Ручная правка структуры происходила в программе Coot [8].

#### Результаты и их обсуждение.

Биоинформатический анализ показал, что замена трёх метиониновых остатков в лакказе *S. griseoflavus* на лейциновые (как в последовательности более термостабильной лакказы *S. viridochromogenes*) может привести к повышению термостабильности вследствие уплотнения гидрофобного ядра молекулы. Были выделены белки как из биомассы штамма-суперпродуцента, выращенной в обычных условиях (0,25 mM CuSO<sub>4</sub>), так и в присутствии избыточного количества меди (1 mM) – SgSLmut +Cu<sup>2+</sup>. Получены пригодные для рентгеноструктурного анализа кристаллы SgSLmut и SgSLmut +Cu<sup>2+</sup> (см. рис. 2), структуры определены с высоким разрешением 1,9 и 2,1 Å, соответственно. Оказалось что содержание меди в T2 / T3 центре SgSLmut сильно снижено (см. табл. 1), а спектроскопические исследования показали, что мутантный белок обладает не большей, а меньшей термостабильностью (T<sub>пл</sub> = 72 °C), чем белок дикого типа (T<sub>пл</sub> = 80 °C). При том, что метиониновые остатки в положениях 54, 64 и 96 расположены вдали от функциональных центров и их замены не должны оказывать явного влияния на связывание ионов меди в T2 / T3 центрах лакказы.

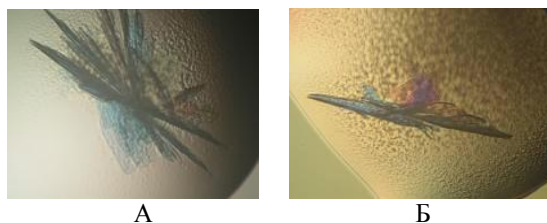


Рисунок 2 – Кристаллы белка SgSLmut (А), SgSLmut +Cu<sup>2+</sup> (Б)

Медь в T2 центре наиболее лабильна, её отсутствие наблюдалось и ранее, как в структуре трёхдоменных [9], так и двухдоменных лакказ [2]. Ион меди T2 центра координирован меньшим количеством гистидиновых остатков, по сравнению с ионами меди T3 центра, что является вероятной причиной его низкой заселенности в структуре лакказ. При этом известно, что активность трёхдоменных лакказ и их синтез в грибах повышается в присутствии меди в среде [10].

Таблица 1 – Заселённость атомами меди функциональных центров SgSLmut

центр	T1	T3(1)	T3(2)	T2
медь	содержание (%)	содержание (%)	содержание (%)	содержание (%)
SgSLmut	0,99	0,91	0,32	0,19
SgSLmut +Cu <sup>2+</sup>	1,00	1,00	1,00	0,60

Практически полное заполнение медью T2 / T3 кластера происходит лишь при выращивании биомассы суперпродуцента SgSLmut в среде с повышенным (1 mM) содержанием меди. И как следствие термостабильность мутантного белка повышается до уровня белка дикого типа (T<sub>пл</sub> = 80°C). По всей видимости, снижение содержания ионов меди в T2 / T3 кластере, расположенном в междоменной области белка, влияет на стабильность тримера. Определение пространственной структуры SgSLmut позволило установить причины пониженной термостабильности белка. Мутантная форма лакказы с заменой трёх метиониновых остатков на лейциновые и с полным заполнением медью T2 / T3 центра обладает такой же термостабильностью, как белок дикого типа. Таким образом, повышение плотности гидрофобного ядра молекулы лакказы, по всей видимости, не оказывает значительного влияния на её термостабильность.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 15-04-03002-а), Министерства Образования и Науки Российской Федерации (соглашение №14.607.21.0013, RFMEFI60714X0013) и Программы Президиума МКБ РАН.

1. Skálová T., Dohnálek J., Østergaard L.H., Østergaard P.R., Kolenko P., Dušková J., Štěpánková A., Hašek J. The structure of the small laccase from *Streptomyces coelicolor* reveals a link between laccases and nitrite reductases. *J Mol Biol.*, 2009. vol. 385, pp. 1165-1178.
2. Trubitsina L.I., Tishchenko S.V., Gabdulkhakov 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.
3. Tishchenko S., Gabdulkhakov 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. F Biol. Commun.*, 2015, vol. 71, pp.1200-1204.
4. Kabsch W. Integration, Scaling, Space-Group Assignment and Post-Refinement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, vol. 66 (2), pp. 133-144.
5. McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D., Winn M.D., Storoni L.C., Read R.J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.*, 2007, vol. 40, pp. 658-674.
6. Murshudov G.N. [et al.] REFMAC5 for the Refinement of Macromolecular Crystal Structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2011, vol. 67 (4), pp. 355-367.
7. Adams P.D. [et al.] PHENIX: A Comprehensive Python-Based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, vol. 66 (2), pp. 213-221.
8. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and Development of Coot. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2010, vol. 66 (4), pp. 486-501.
9. Ducros V., Brzozowski A.M., Wilson K.S., Brown S.H., Ostergaard P., Schneider P., Yaver D.S., Pedersen A.H., Davies G.J. *Nat Struct Biol.*, 1998, vol. 5, pp. 310-316.
10. Galhaup C., Haltrich D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, vol. 56, pp. 225-232.

#### АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДОМЕНА I АРХЕЙНОГО РИБОСОМНОГО БЕЛКА L1 СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ФРАГМЕНТАМИ РНК

Михайлина А.О., Костарева О.С., Никонова Е.Ю., Тищенко С.В.

ФГБУН Институт белка РАН

ул. Институтская, 4, г. Пущино, 142290, РФ

e-mail: alisamikhaylina15@gmail.com

**Аннотация.** Двухдоменный рибосомный белок L1 является составной частью L1-выступа рибосомы и регулятором собственного синтеза и синтеза рибосомных белков, гены которых находятся в том же опероне, что и собственный ген белка L1. Хорошо изучена регуляция L11 оперона *Escherichia coli* (включает гены рибосомных белков L11 и L1) и L1 оперона архей рода *Methanococcus* (включает гены рибосомных белков L1, L10 и L12). Ранее нами было показано, что домен I бактериального рибосомного белка L1 *Thermus thermophilus* (TthL1dI) обладает регуляторными свойствами целого белка и взаимодействует с рибосомной РНК прочнее, чем с мРНК. В данной работе получена генетическая конструкция, выделен и очищен изолированный домен I рибосомного белка L1 архей *Methanococcus jannaschii* (MjaL1dI). Методом поверхностного плазмонного резонанса определены кинетические константы взаимодействия MjaL1dI со специфическими фрагментами рибосомной и матричной РНК. Показано, что домен I архейного рибосомного белка L1, также как целый белок, взаимодействует с рРНК прочнее, чем с мРНК. В сопряженной системе транскрипции-трансляции *E.coli in vitro* MjaL1dI ингибирует синтез рибосомного белка L1. Сделан вывод, что MjaL1dI, также как TthL1dI, может обладать регуляторными свойствами целого белка L1. Таким образом, полученные данные позволяют предположить консервативность регуляторных свойств домена I рибосомного белка L1 как в бактериях, так и в археях.

**Ключевые слова:** рибосомный белок L1, регуляция трансляции, РНК-белковые взаимодействия, поверхностный плазмонный резонанс.