

МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ОКСИДАЗЫ БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ: БИОИНЖЕНЕРИЯ И НАПРАВЛЕННЫЙ ДИЗАЙН

**О.Н. Понаморева¹, Л.И. Трубицина², А.А. Моисеева¹, А.В. Абдуллатыпов^{1,3}, И.В. Трубицин^{1,2},
К.А. Егоров¹, С.В. Алферов¹, А.А. Леонтьевский²**

¹ Тульский государственный университет, Тула, Россия

² Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН – обособленное структурное подразделение
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцино, Россия

³ Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное структурное подразделение
ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пуцино, Россия

Введение. Развитие методов молекулярной биотехнологии и биоинформационного анализа актуализировало многие поставленные ранее задачи, решать которые традиционными методами микробиологии и биохимии слишком сложно и трудоемко. В современной биотехнологии применение генно-инженерных ферментов жизненно необходимо для оптимизации существующих биопроцессов и поиска новых [1]. В последние десятилетия наблюдается повышенный интерес к использованию медьсодержащих оксидаз (МСО), так называемых «голубых» оксидаз, в качестве биокатализаторов для замены традиционных химических процессов в текстильной, целлюлозно-бумажной, фармацевтической промышленности. Структурно медьсодержащие (мультимедные) оксидазы содержат четыре атома меди типа I, II и III, которые различаются по структурной геометрии медного центра, спектральным характеристикам и магнитным свойствам [2]. Три типа атомов меди располагаются в разных местах активного центра в двух формах: моноядерный медный центр (Т1-центр) и трехъядерный медный кластер (Т2/Т3), расположенный на расстоянии 12 Å от Т1-сайта. Спектральные свойства Cu-Т1 определяют голубую окраску этих оксидаз. Медьсодержащие оксидазы – большое семейство ферментов, которые катализируют окисление широкого спектра органических и / или неорганических субстратов путем четырехэлектронного восстановления кислорода до воды. Основными представителями этого семейства, которые нашли широкое биотехнологическое применение и считаются «зелеными» катализаторами, являются лакказы (п-бензендиол: кислород оксидоредуктаза, п-дифенол оксидаза (ЕС 1.10.3.2)) [3], а в некоторых практических приложениях – билирубиноксидазы (БО) (ЕС 1.3.3.5) [4]. Применение МСО в промышленном катализе вызвало большой интерес к конструированию МСО с повышенной стабильностью, активностью или специфичностью, адаптированной к конкретным условиям, для различных областей применения. Особое внимание уделяется термостабильности белков, способности функционировать в нейтральной и щелочной средах и величине редокс-потенциала активного центра ферментов (Т1-центра). Следует отметить, что аннотация медьсодержащих оксидаз, как лакказ, билирубиноксидаз или малых CofA-белков, весьма условна, и зависит не только от степени идентичности аминокислотной последовательности, но и от биохимических свойств фермента. В недавнем исследовании [5] в геноме лакказ-продуцирующего штамма *Acinetobacter* выявлены гены трех лакказоподобных белков, один из которых отнесли к семейству билирубиноксидаз. Авторы исследования считают, что полученная информация о медьсодержащих оксидазах в геноме *Acinetobacter* внесет вклад в развитие синтетической биологии для производства ферментов. Таким образом, задачи по поиску новых МСО актуальны.

За 20 лет было предпринято множество усилий по конструированию медьсодержащих оксидаз и пониманию механизмов их реакции с помощью сайт-направленного мутагенеза, а в последнее время, с помощью вычислительных расчетов и инструментов направленной эволюции [6,7]. Некоторым исследователям удалось осуществить сверхэкспрессию МСО в различных экспрессионных системах. Следует отметить, что экспрессионные системы на основе дрожжей, грамположительных и грамотрицательных бактерий имеют свои достоинства и недостатки.

В последнее время внимание исследователей привлекают бактериальные лакказы рода *Streptomyces*, которые способны функционировать в широком диапазоне pH, обладают необычно высокой устойчивостью к ингибиторам и могут быть использованы для различных коммерческих применений [8]. Структурно малые лакказы актинобактерий имеют небольшой размер и состоят только из двух доменов с гомотримерной организацией. Для поисковых исследований по получению бактериальных ферментов с заданными свойствами используют стандартные экспрессионные системы

на основе *E. coli*. Однако проблема гетерологичной экспрессии МСО в этих бактериях затруднена из-за образования телец включения и из-за недостаточного содержимого ионов меди в клетках хозяина, что необходимо для правильного фолдинга продуцируемых белков. Следовательно, выделение каталитически активных рекомбинантных МСО является нетривиальной задачей. Еще одной проблемой на пути разработки эффективных биокатализаторов на основе МСО является то, что бактериальные лакказы имеют низкий редокс-потенциал и, как следствие, незначительный спектр окисляемых субстратов. Следует отметить, что, в отличие от многих других оксидоредуктаз, МСО способны участвовать в прямом переносе электронов в биоэлектрокаталитических системах, что активно используется при разработке биокатодов в биотопливных элементах [9]. БО устойчивы в физиологических условиях, но по сравнению с бактериальными лакказами имеют более высокий потенциал Т1-центра и способны эффективно окислять билирубин, что используют при разработке биосенсоров [10] и биотопливных элементов [11].

Недавно в нашем научном коллективе обнаружены и исследованы новые двухдоменные лакказы актинобактерий: ScaSL из *Streptomyces carpinensis* [12] и CjSL из *Catenuloplanes japonicus* [13]. В отличие от других двухдоменных лакказ, эти два фермента характеризуются средним редокс-потенциалом (в диапазоне 0,47–0,51 В), но при этом они содержат в Т1-центре метионин в качестве аксиального лиганда (как низкопотенциальные лакказы). Эти результаты стали отправной точкой для поиска новых МСО и направленного дизайна бактериальных лакказ с определенным спектром окисляемых субстратов.

Поиск новых медьсодержащих оксидаз в геномах галотолерантных архей. По результатам анализа геномов галотолерантных архей, геномы которых аннотированы в базе данных NCBI, и штаммы доступны для заказа во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ), выбраны три штамма для поиска медьсодержащих оксидаз *Haloterrigena turkmenica* ВКМ В-1734, *Halorubrum lacusprofundi* ВКМ В-1753 и *Haloferax gibbonsii* ВКМ В-1756. В геномах этих штаммов идентифицировали двенадцать генов МСО.

Для идентифицированных генов МСО провели множественное выравнивание аминокислотных последовательностей с последовательностями охарактеризованных лакказ (CLA из *Coprinus cinereus* (IHFUA), TLA из *Trametes villosa* (AAB47735), MLA из *Melanocarpus albomyces* (CAE00180)) и билирубиноксидаз (БО) (CotA из *Bacillus subtilis* (NP_388511), BOD из *Myrothecium verrucaria* (Q12737)). На основе анализа белковых последовательностей на наличие консервативных медь-связывающих аминокислот установили, что аминокислотные последовательности только шести генов относятся к МСО (по три последовательности – БО и лакказы).

При анализе идентифицированных генов МСО с помощью онлайн-программ InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) и BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) определили количество доменов и наличие сигнальных пептидов для каждого белка, что важно для оптимизации клонируемого гена.

Гетерологичная экспрессия целевых генов лакказ и билирубиноксидаз. После разработки праймеров, амплификации генов и секвенирования ампликонов удалось получить все шесть целевых генов. Для клонирования генов МСО использовали экспрессионный вектор pET-28a (+) и рестриктазно-лигазный метод [14]. Нарботку рекомбинантных плазмид проводили в компетентных клетках *Escherichia coli* DH5 α . Выделенными плазмидами трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3), способные продуцировать целевые белки. Схема индукции экспрессии генов МСО и очистка рекомбинантных белков представлена на рисунке 1.

Наличие шести остатков гистидина на С-конце рекомбинантных белков генов МСО, способных специфически связываться с Ni-NTA-сефарозой, позволило проводить очистку в одну стадию. Анализ результатов индукции и очистки проводили с помощью денатурирующего ПААГ-электрофореза. Большая часть белков генов МСО оказалась в осадке, однако для одной генетической конструкции с геном МСО с обрезанной последовательностью сигнального пептида из штамма *Halorubrum lacusprofundi* ВКМ В-1753 получили активную фракцию растворимого белка (рисунок 2). Темно-зеленая окраска раствора обусловлена реакцией окисления субстрата 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) аммониевая соль (АБТС) лакказой.

Выделенный рекомбинантный белок МСО окислял АБТС в диапазоне pH от 3,0 до 3,5 и 2,6–диметоксифенол (2,6–ДМФ) в щелочной области pH (от 8,0 до 8,5), что соответствует ожидаемой

физиологической способности белка окислять фенольные субстраты, что важно, так как это преимущество бактериальных лакказ по сравнению с грибными лакказами, pH-оптимум которых для фенолов находится при кислых-нейтральных значениях pH (от 3 до 7). Таким образом, полученный белок (предположительно лакказы) из штамма *Halorubrum lacusprofundi* ВКМ В-1753 обладает свойством, востребованным для его последующего технологического применения. Свойства белка, такие как температурный оптимум, термостабильность, спектральные и каталитические свойства будут изучены в дальнейшем.

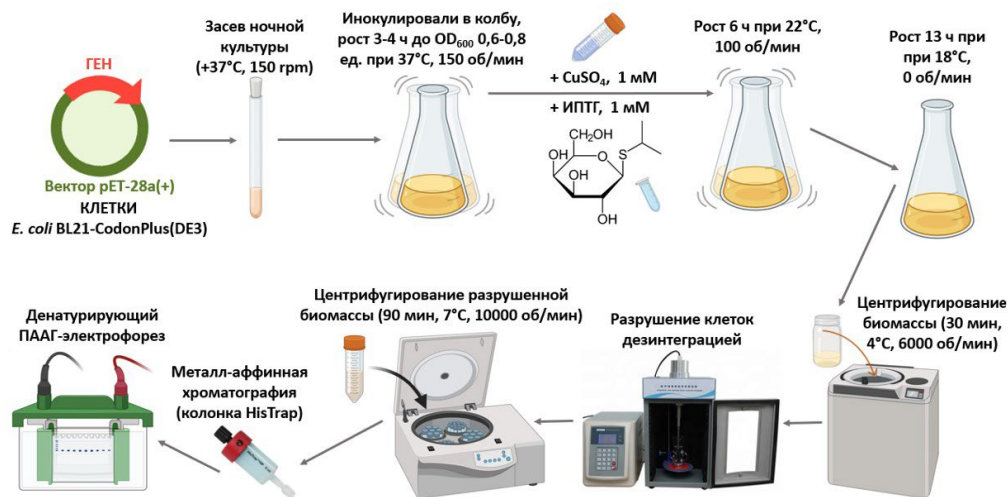


Рисунок 1 – Схема эксперимента индукции экспрессии генов МСО и очистки рекомбинантных белков

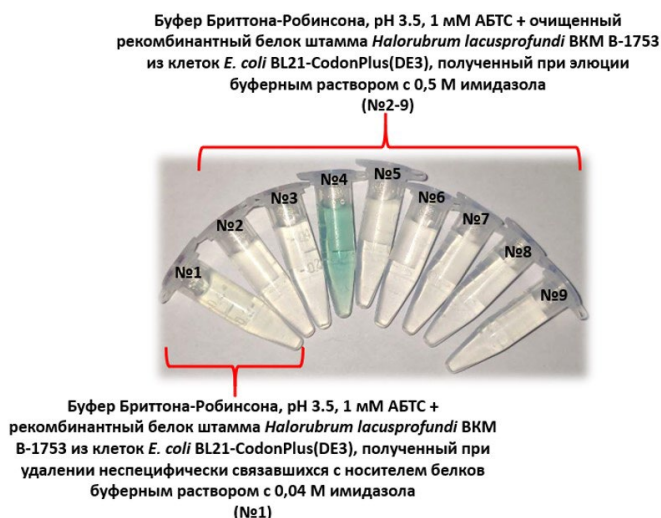


Рисунок 2 – Проверка очищенных фракций белка из штамма *Halorubrum lacusprofundi* ВКМ В-1753 на наличие активности из клеток *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3) при внесении 30 мкл фермента к 500 мкл буферного раствора Бриттона-Робинсона (pH 3.5) с 1 мМ АБТС

Сайт-направленный мутагенез двухдоменной лакказы и характеристика мутантного фермента. Каталитическая активность МСО связана с восстановительным потенциалом атома меди Т1-центра. Считается, что этот центр отвечает за межэлектронный перенос от субстрата к ферменту с последующим внутриэлектронным переносом от Т1-центра к трехядерному кластеру. Аминокислотные остатки, координированные с медным сайтом, являются наиболее значимыми и определяющими восстановительный потенциал. Поскольку цистеин и два гистидиновых остатка в основном консервативны в Т1-центре МСО, только аксиальный остаток метионина влияет на внутримолекулярный перенос электронов и снижает эффективность поступления электрона от субстрата к ферменту. Присутствие аксиального метионина в бактериальных лакказах, к сожалению,

приводит к пониженному редокс-потенциалу T1-центра у этих ферментов (низкопотенциальные лакказы). Как уже отмечали выше, нам удалось охарактеризовать две новые двухдоменные лакказы как среднепотенциальные [12, 15]. Таким образом, существуют определенные аминокислоты не в ближайшем окружении медного центра, которые могут способствовать повышению редокс-потенциала этих ферментов и увеличению их способности окислять широкий спектр субстратов.

Для направленного дизайна двухдоменной лакказы использовали методологию сайт-направленного мутагенеза. Для выбора позиций для мутаций провели множественное выравнивание двухдоменных лакказ со средним и низким потенциалом, а также анализ трехмерной структуры этих ферментов. В качестве потенциальных позиций для мутаций выбрали два аминокислотных остатка фенилаланина (Phe232 и Phe233), которые присутствуют в ScaSL, но отсутствуют в двухдоменных лакказах с низким редокс-потенциалом. Эти остатки расположены в кармане связывания субстрата лакказы и относятся ко второй координационной сфере T1-центра. Наличие двух остатков фенилаланина в кармане связывания субстрата делает его гидрофобным в лакказах со средним потенциалом. Напротив, два аминокислотных остатка тирозина (Tyr), присутствующие в низкопотенциальных лакказах снижают гидрофобность кармана.

К сожалению, сайт-направленный мутагенез лакказы ScaSL по замене остатков Phe232 и Phe233 на Tyr привел к сдвигу активности фермента в кислую область pH без изменения окислительно-восстановительного потенциала, снижению термостабильности и pH-стабильности фермента. Однако мутант F232Y/F233Y более эффективно окислял типичный фенольный субстрат лакказ 2,6-диметоксифенол. Мутантный фермент не разлагал трифенилметановые красители без медиатора, но показал большую степень обесцвечивания азокрасителей в присутствии медиатора (АБТС) и был способен участвовать в прямом переносе электронов (ППЭ) в биоэлектрокаталитической системе с многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) (рисунок 3).

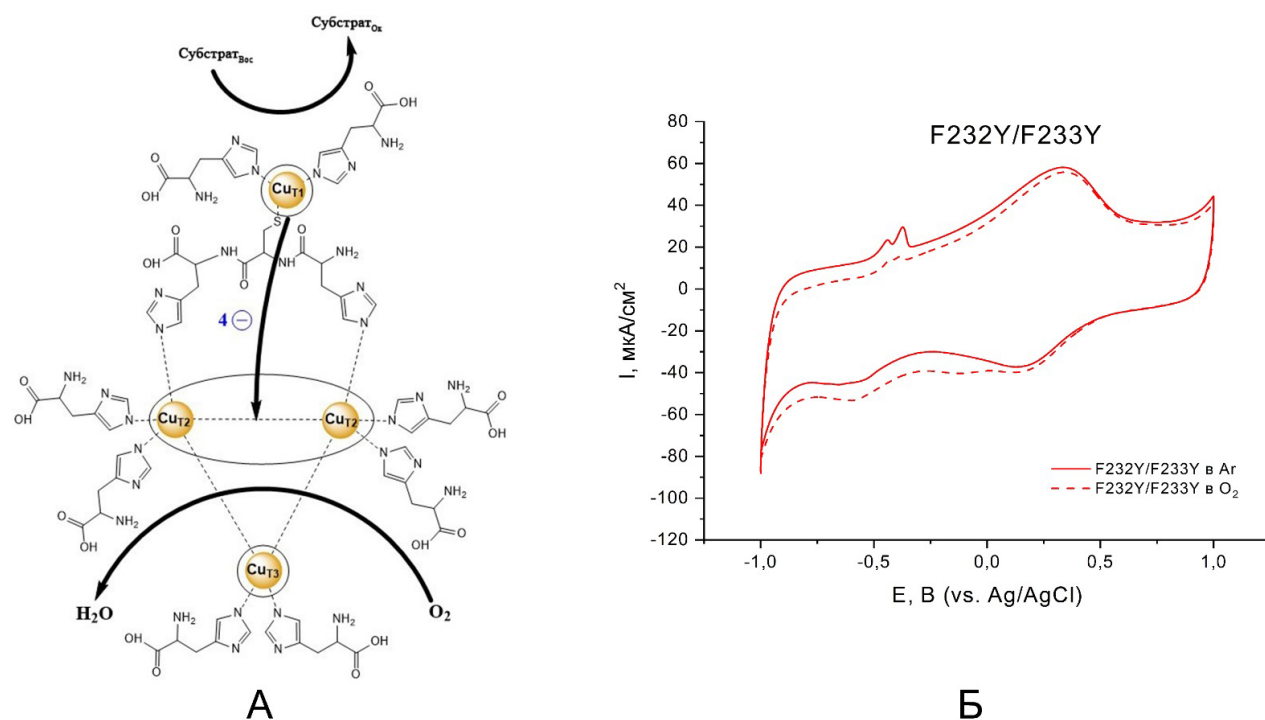


Рисунок 3 – Перенос электронов в системах с лакказами. А – Внутримолекулярный перенос электронов в активном центре лакказы. Б – Вольтамперограммы в среде аргона и в присутствии кислорода (рабочий электрод – стеклоуглеродный, модифицированных МУНТ и мутантной лакказой F232Y/F233Y; электрод сравнения – хлоридсеребряный; вспомогательный электрод – платиновый).

Увеличение тока восстановления в присутствии кислорода при потенциале +0,25 в (относительно хлорсеребряного электрода) свидетельствует о способности иммобилизованной лакказы участвовать в электрокаталитическом восстановлении молекулярного кислорода.

Заключение. Оксидоредуктазы, аннотированные в геноме архей как МСО, проявляют лакказную активность в слабощелочной среде, подобно лакказам актинобактерий, и способны участвовать в прямом переносе электронов в биоэлектродокаталитических системах с МУНТ. Полученные результаты подтверждают возможности получения новых биокатализаторов с заданными свойствами путем гетерологичной экспрессии отобранных архейных генов МСО в *E. coli*. Однако выбор эффективной экспрессионной системы необходимо продолжать. Полученные результаты по направленному мутагенезу двухдоменной лакказы ScaSL расширяют представления об аминокислотных детерминантах, способных изменять свойства бактериальных лакказ и подтверждают полученные ранее данные о комплексном влиянии различных факторов на окислительную активность лакказ. Полученные в работе результаты являются дополнением к набору известных аминокислотных детерминант, что вносит значительный вклад в разработку подходов для машинного обучения по направленному дизайну эффективных биокатализаторов на основе двухдоменных бактериальных лакказ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 24-14-20013, <https://rscf.ru/project/24-14-20013> и правительства Тульской области.

Литература

1. Orsi, E., et al., Automated in vivo enzyme engineering accelerates biocatalyst optimization. *Nat Commun*, 2024. 15(1): p. 3447.
2. Solomon, E.I., U.M. Sundaram, and T.E. Machonkin, Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chemical Reviews*, 1996. 96(7): p. 2563–2606.
3. Zerva, A., et al., Applications of Microbial Laccases: Patent Review of the Past Decade (2009–2019). *Catalysts*, 2019. 9(12): p. 26.
4. Mano, N. and L. Edembe, Bilirubin oxidases in bioelectrochemistry: Features and recent findings. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013. 50: p. 478–485.
5. Pooalai, R., et al., Genomic analysis uncovers laccase-coding genes and biosynthetic gene clusters encoding antimicrobial compounds in laccase-producing *Acinetobacter baumannii*. *Scientific Reports*, 2022. 12(1).
6. Mate, D.M. and M. Alcalde, Laccase engineering: From rational design to directed evolution. *Biotechnology Advances*, 2015. 33(1): p. 25–40.
7. Takamura, E., et al., Site-Directed Mutagenesis of Multicopper Oxidase from Hyperthermophilic Archaea for High-Voltage Biofuel Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2021. 193(2): p. 492–501.
8. Kaur, R., R. Salwan, and V. Sharma, Structural properties, genomic distribution of laccases from *Streptomyces* and their potential applications. *Process Biochemistry*, 2022. 118: p. 133–144.
9. Dey, B. and T. Dutta, Laccases: Thriving the domain of bio-electrocatalysis. *Bioelectrochemistry*, 2022. 146: p. 108144.
10. Hooda, V., et al., Bilirubin enzyme biosensor: potentiality and recent advances towards clinical bioanalysis. *Biotechnology Letters*, 2017. 39(10): p. 1453–1462.
11. Torrinha, Á., et al., Microenergy generation and dioxygen sensing by bilirubin oxidase immobilized on a nanostructured carbon paper transducer. *Electrochimica Acta*, 2023. 445: p. 142061.
12. Trubitsina, L.I., et al., A Novel Two-Domain Laccase with Middle Redox Potential: Physicochemical and Structural Properties. *Biochemistry (Moscow)*, 2023. 88(10): p. 1658–1667.
13. Trubitsina, L.I., et al., Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes. *PeerJ*, 2021. 9: p. e11646.
14. Tan, S. – I., I.S. Ng, and Y. – J. Yu, Heterologous expression of an acidophilic multicopper oxidase in *Escherichia coli* and its applications in biorecovery of gold. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017. 4(1): p. 20.
15. Abdullatypov, A., et al. Functionalization of MWCNTs for Bioelectrocatalysis by Bacterial Two-Domain Laccase from *Catenuloplanes japonicus*. *Nanomaterials*, 2023. 13, 1–24.