УДК 544.478.3 https://doi.org/10.20914/2304-4691-2024-3-5-8

ДВУХДОМЕННЫЕ БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЛАККАЗЫ: МОДИФИКАЦИЯ И ИММОБИЛИЗАЦИЯ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

С.В. Алферов[1], А.В. Абдуллатыпов[1,2], Л.И. Трубицина[3], К.А. Егоров[1], О.Н. Понаморева[1]

[1] Тульский государственный университет, Тула, Россия
[2] Институт фундаментальных проблем биологии РАН – обособленное структурное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия
[3] Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН – обособленное структурное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино, Россия

Введение. Лакказы (КФ 1.10.3.2, пара-дифенол: кислородоксидоредуктаза) – это фенолокисляющие ферменты, катализирующие ряд реакций окисления ароматических и неароматических соединений. Эти медьсодержащие белки относятся к семейству “голубых” мультимедных оксидаз, содержащих в активном центре четыре атома меди, координированных имидазольными группами остатков гистидина. Группа ферментов включает множество белков с различной субстратной специфичностью и разнообразными биологическими функциями. На основе количества медных доменов лакказы классифицируются как ферменты с двумя (2d), тремя (3d) и шестью доменами (6d). Чаще всего лакказа, найденная у грибов, растений, насекомых, содержит три домена [1, 2]. Конечным акцептором электронов в каталитических реакциях лакказ является кислород, который восстанавливается до воды [3]. Иммобилизация лакказы (адсорбция на носителях, внедрение в сетку, внедрение в микрокапсулы, ковалентное связывание) является основным подходом для преодоления таких ограничений как низкая стабильность фермента, короткий срок службы, трудность повторного использования. Сам же процесс иммобилизации позволяет улучшить устойчивость фермента с точки зрения температуры, pH, хранения и эксплуатации. Особенностью ферментов лакказ является способность восстанавливать кислород, получая электроны непосредственно от электрода, что, в совокупности с применением углеродных наноматериалов для иммобилизации фермента, позволяет разрабатывать катоды для биотопливных элементов [4].

Закрепление лакказы на поверхности электрода позволяет реализовать стратегию прямого переноса электронов (ППЭ) от электрода на фермент. Реакция ППЭ проходит через следующие стадии: восстановление Т1 центра (электрод отдает электрон), внутримолекулярный перенос электрона с Т1 на Т2/Т3 кластер, восстановление молекулы кислорода до воды в Т2/Т3 кластере. Наличие углеродных наноструктур на поверхности графитовых электродов не только увеличивает площадь поверхности, но и обеспечивает подходящую матрицу для иммобилизации молекул, что позволяет использовать их в биотопливных элементах в качестве катодного биокатализатора восстановления кислорода [5]. Таким образом многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) играют важную роль при сопряжении ферментов с электродами.

Двухдоменные бактериальные лакказы обычно обладают низким окислительно-восстановительным потенциалом медного центра (от 0,35 до 0,4 В) [6, 7], что ограничивает их способность окислять субстраты и делает их менее полезными в промышленности. Однако двухдоменные лакказы, в отличие от грибковых трех доменных лакказ [8], являются ферментами с высокой термостабильностью и способны катализировать окисление фенольных соединений при щелочных и нейтральных значениях pH. С этой точки зрения, единственным недостатком лакказ, ограничивающим их применение в биотехнологических процессах, является их низкий окислительно-восстановительный потенциал [9].

Современным подходом к получению лакказ с требуемыми свойствами или улучшенными биокаталитическими характеристиками (окислительно-восстановительный потенциал, специфичность, каталитическую эффективность, стабильность и т. д.) является сайт-направленный мутагенез [10]. Было обнаружено, что природа аксиального лиганда влияет на электронную структуру и перенос электронов в медный участок Т1. В высокопотенциальных и среднепотенциальных грибковых лакказах фенилаланин и лейцин/изолейцин действуют как аксиальные лиганды медного участка Т1 соответственно, в то время как низкопотенциальные растительные и бактериальные лакказы содержат метионин в качестве аксиального лиганда [11].

Недавно в нашей научной группе активно исследовались две новые двухдоменные актинобактериальные лакказы: ScaSL из Streptomyces carpinensis [12] и CjSL из *Catenuloplanes japonicus* [3]. В отличие от других двухдоменных лакказ, эти два фермента обладали средним

окислительно-восстановительным потенциалом (0,47 В и 0,51 В соответственно) и имели аминокислоту метионин в качестве аксиального лиганда Т1-участка меди. Вероятно, существуют другие детерминанты, которые могут способствовать повышению потенциала этих ферментов. В данной работы предпринята попытка оценить влияние одного из остатков аминокислот (H286) не из ближнего окружения ионов меди на потенциал Т1 медного центра лакказы ScaSL из Streptomyces carpinensis.

Результаты и обсуждение. Для лакказы ScaSL из Streptomyces carpinensis получены три мутантных белка H286A, H286T с заменой гистидина в положении 286 на аланин и треонин, соответственно. Множественное выравнивание выявило что у низкопотенциальных лакказ в позиции 286 расположена гидрофобная аминокислота аланин. У лакказы CjSL, чей потенциал превышает потенциал лакказы ScaSL, расположена полярная незаряженная аминокислота треонин. Поэтому мы предполагали, что у мутанта H286A величина потенциала будет снижена, у мутанта H286T – повышена. Несмотря на то, что гистидин в позиции 286 не относится ко второй координационной сфере Т1-центра, а также не является аксиальным лигандом атома меди Т1-центра, он расположен на поверхности белка рядом со входом в субстратный туннель, ведущий к Т2/Т3-медному центру. Было высказано предположение, что остаток аминокислоты в положении 286 будет влиять на эффективность связывания и восстановления кислорода, и, опосредованно, на величину редокс-потенциала лакказы в условиях биоэлектрокатализа.

Для организации прямого переноса электронов (ППЭ) расстояние между электродом и окислительно-восстановительным центром фермента не должно превышать 20 Å (2 нм). т. е. в данном случае электрод будет являться субстратом лакказы. ППЭ между поверхностью электрода и лакказой возможен только в том случае, если фермент правильно ориентирован относительно поверхности электрода Т1-центром (рис. 1). Этому в значительной мере способствует применение МУНТ.

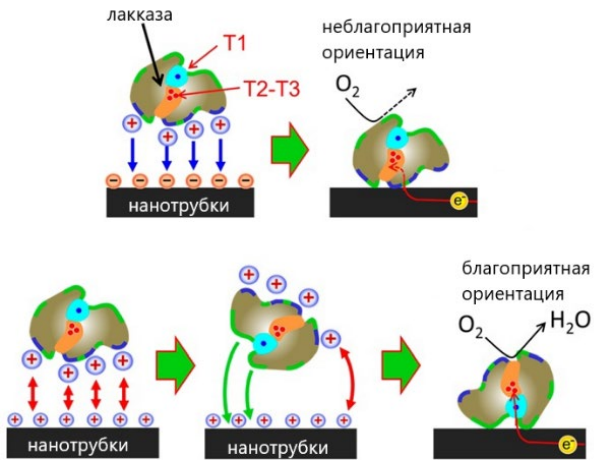

Рисунок 1. Схема прямого переноса электрона и ориентация фермента относительно поверхности электрода, модифицированногонанорубками

Для всех мутантов и белка дикого типа удалось обеспечить ППЭ в биоэлекрокаталитических системах на основе стеклоуглеродных электродов, модифицированных окисленными МУНТок. В данном случает ключевую роль играют именно окисленные нанотрубки, т. к. они имеют преимущественно карбоксильные группы на всей поверхности, благодаря которым поверхность отрицательно заряжена. Чтобы объяснить ориентацию лакказ на поверхности наноструктурирующего материала с помощью программы YASARA Structure было рассчитано распределение электростатического потенциала лакказы при pH 5,0 в водном растворе с 1,17 % NaCl. Отображение рассчитанного электростатического потенциала приведено на рисунке 2.

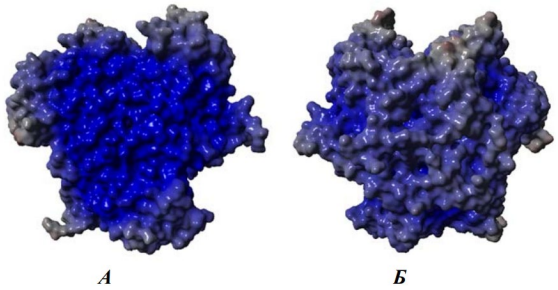

Рисунок 2. Распределение электростатического потенциала для лакказы при pH 5. А – вид со стороны Т1 активного центра, Б – вид с противоположной от Т1 активного центра стороны. Синие участки обозначают положительный потенциал, серые – отрицательный

Как можно видеть лакказа имеет положительный заряд со стороны Т1 центра, который служит акцептором электронов, здесь наблюдается более положительный заряд, чем с противоположной. Исходя из этого благоприятная для прямого переноса электронов ориентация будет достигаться при модификации электрода отрицательно заряженными углеродными нанотрубками.

Для организации биоэлектрокаталитического восстановления кислорода при участии лакказ использовали стеклоуглеродные электроды, поверхность которых модифицировали МУНТок, как описано в работе [13]. Ферменты наносили на торцевую поверхность электродов. На рисунке 3 представлены вольтамперные зависимости стеклоуглеродных электродов, модифицированных МУНТок и затем мутантной лакказой H286T. Аналогичные зависимости получены для остальных белков.

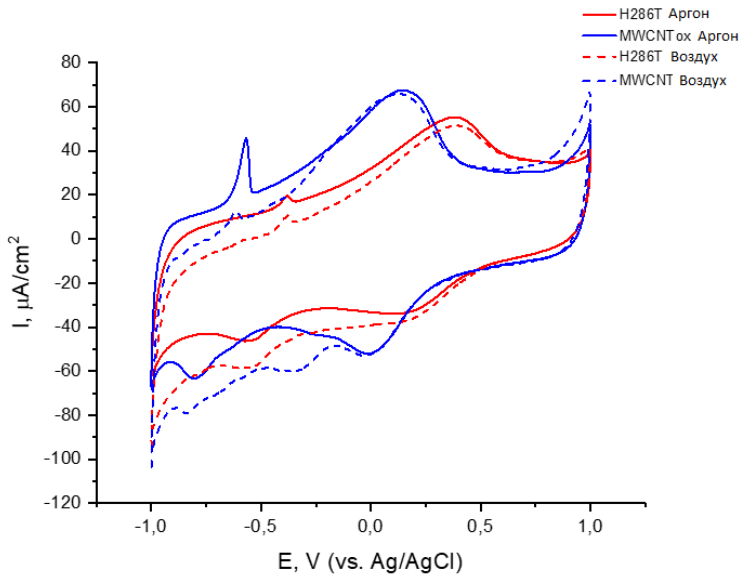

Рисунок 3. Вольтамперограммы стеклоуглеродных электродов, модифицированных МУНТок и затем мутантной лакказой H286T

При потенциалах выше 0 В (относительно Ag/AgCl) в электрохимической системе на основе модифицированного МУНТок стеклоуглеродного электрода не регистрируются токи восстановления кислорода (поляризационные волны восстановления в среде аргона и при продувке воздухом не отличаются) (Рис. 3, синие сплошная и пунктирная кривые). В присутствии лакказы уже при потенциалах 0,5 В можно заметить увеличение тока восстановления в среде с кислородом (Рис. 3, красная пунктирная кривая), что обусловлено вкладом процесса восстановления молекулярного кислорода при участии лакказы (прямой перенос электронов). Для других исследуемых ферментов получили похожие результаты: наблюдали появление тока восстановления кислорода в интервале 0,3–0,5 В.

ППЭ термодинамически возможен, когда редокс-потенциал лакказы больше потенциала, поданного на электрод [14]. Потенциал, при котором ток восстановления кислорода не наблюдается, можно считать редокс-потенциалом лакказы в этих условиях. Для оценки значения редокс-потенциала лакказ применили метод хроноамперомерии, который недавно позволил охарактеризовать двухдоменную лакказу CjSL как среднепотенциальную оксидазу [13]. На рисунке 4 представлены хроноамперометрические зависимости мутантного белка H286T, закрепленного на электроде, модифицированном МУНТок при различных потенциалах.

На полученных хроноамперограммах после подачи кислорода (включение мешалки) значение тока увеличивается при потенциалах +0,1, +0,2 В против Ag/AgCl. Однако дальнейшее увеличение приложенного потенциала приводит к уменьшению тока восстановления кислорода до полного его отсутствия. На основе проведенных хроноамперометрических исследований нами были определены редокс-потенциалы ScaSL и мутантов по H286 в биоэлектрохимической системе с МУНТок, которые составили соответственно: 0,47 В для дикого белка, 0,45 для H286A и 0,50 для H286T.

Таким образом, как и предполагалось, у мутанта H286A величина потенциала снизилась, но повысилась его стабильность при pH 9 и 11, у мутанта H286T потенциал увеличился, однако снизилась термостабильность. Однако все лакказы (дикий тип и мутанты) практически не различались по эффективности биоэлектрокатализа, т. е. замена H286 на аланин и треонин практически не повлияли на эффективность биоэлектрокаталитического восстановления кислорода на электродах, модифицированных МУНТок.

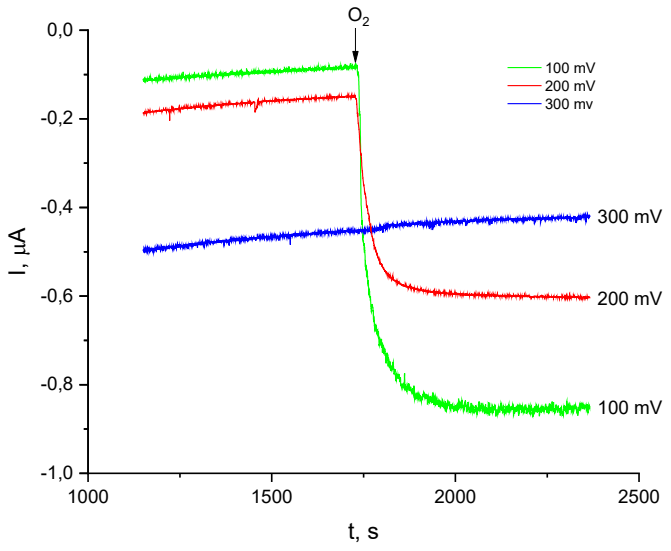

Рисунок 4. хроноамперометрические зависимости мутантного белка H286T на модифицированном МУНТок электроде при потенциалах +0.1, +0.2, +0.3 В против Ag/AgC

Подобный результат получен ранее Алексеевой с коллег. при изучении биоэлектрокаталитического восстановления кислорода грибковой лакказой с высоким окислительно-восстановительным потенциалом [15]. Известно, что важную роль в организации эффективного переноса электронов играет не только редокс-потенциал, но и другие факторы, такие как, ориентация иммобилизованных на электроде молекул белка или изменение внутреннего переноса электронов [16]. Таким образом, полученные нами результаты (на примере H286 у двухдоменной лакказы ScaSL) показали, что на редокс-потенциал медьсодержащих белков незначительное влияние могут оказывать определенные остатки аминокислот, расположенные не в ближнем окружении ионов меди. Однако эффективность биоэлектрокаталитического восстановления кислорода не зависит напрямую от редокс-потенциала лакказы. Необходимы дальнейшие исследования с участием подобных белков или других аминокислотных детерминант, чтобы прояснить возникшее противоречие.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-20013, https://rscf.ru/project/24-14-20013 и при поддержке Комитета Тульской области по науке и инноватике.

Литература

1. Komori H., Higuchi Y. Structure and molecular evolution of multicopper blue proteins. // Biomol Concepts. 2010, 1; 1(1) : 31–40. doi: 10.1515/bmc.2010.004. PMID: 25961983.

2. Ihssen J. et al. Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in Escherichia coli //Scientific reports. – 2015. – Т. 5. – №. 1. – С. 1–13.

3. 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. – Т. 9. – С. 11646.

4. Bollella P., Katz E. Enzyme-based biosensors: Tackling electron transfer issues // Sensors. – 2020. – Т. 20. – №. 12. – С. 3517

5. Akanda M.R. et al. Recent advances in nanomaterial-modified pencil graphite electrodes for electroanalysis // Electroanalysis – 2016 – V. 28 – №. 3 – P. 408–424.

6. Gunne, M., et al., Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from Streptomyces sviceus. // Febs j, 2014. 281(18): p. 4307–18

7. Trubitsina, L.I., et al., Structural and functional characterization of two-domain laccase from Streptomyces viridochromogenes. // Biochimie, 2015. 112: p. 151–159

8. Upadhyay, P., et al. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. // 3 Biotech, 2016. 6(1): p. 15

9. Dey, B. and T. Dutta, Laccases: Thriving the domain of bio-electrocatalysis. // Bioelectrochemistry, 2022. 146: p. 108144

10. Olbrich AC, Schild JN, Urlacher VB. Correlation between the T1 copper reductionpotential and catalytic activity of a small laccase. // J Inorg Biochem. 2019; 201:110843. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110843. Epub 2019 Sep 9. PMID:31536948.

11. Toscano MD, De Maria L, Lobedanz S, Ostergaard LH. Optimization of a small laccase by active-site redesign. // Chembiochem. 2013 Jul 8; 14(10) : 1209–11. doi: 10.1002/cbic.201300256. Epub 2013 Jun 14.

12. Trubitsina LI, et al. A Novel Two-Domain Laccase with Middle Redox Potential: Physicochemical and Structural Properties. // Biochemistry (Mosc). 2023; 88(10) : 1658–1667. doi: 10.1134/S0006297923100188. PMID: 38105031.

13. Abdullatypov A. et al. Functionalization of MWCNTs for Bioelectrocatalysis by Bacterial Two-Domain Laccase from Catenuloplanes japonicus. // Nanomaterials (Basel). 2023 Nov 25; 13(23) : 3019. doi: 10.3390/nano13233019.

14. A. Ben Tahar, K. Żelechowska, J.F. Biernat, E. Paluszkiewicz, P. Cinquin, D. Martin, A. Zebda. High catalytic performance of laccase wired to naphthylated multiwall carbon nanotubes. // BIOSENSORS & BIOELECTRONICS, 2020, V. 151, 11196

15. Aleksejeva, O. et al., Electrochemistry of a high redox potential laccase obtained by computer-guided mutagenesis combined with directed evolution. Electrochemistry Communications, 2019. 106: p. 106511

16. Milton, R.D. and S.D. Minteer, Direct enzymatic bioelectrocatalysis: differentiating between myth and reality. Journal of The Royal Society Interface, 2017. 14(131): p. 20170253