

## ВЛИЯНИЕ ГЛИКОЗИЛИРОВАНИЯ НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАККАЗ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

К.В. Моисеенко<sup>1</sup>, К.М. Поляков<sup>2</sup>, Т.В. Федорова<sup>3</sup>, О.А. Глазунова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева, Москва, Россия

<sup>2</sup>ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

<sup>3</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия

Лакказы (*n*-дифенол:кислород оксидоредуктаза, ЕС 1.10.3.2) – это голубые мультимедные оксидазы, которые катализируют окисление широкого спектра фенольных и нефенольных ароматических соединений с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды [1]. Будучи экологически чистыми «зелеными катализаторами» с широкой субстратной специфичностью, лакказы могут применяться в самых разных областях [3–5]: целлюлозно-бумажная, фармацевтическая, пищевая, косметическая и текстильная промышленности, детоксификация ксенобиотков, органический синтез, биоремедиация, биоконверсия сельскохозяйственных и лесных отходов, производство биосенсоров и нанобиотехнология [2]–[5]. В течение длительного времени различные базидиальные грибы считались основным источником лакказ, имеющим биотехнологическое значение [6]. В настоящее время хорошо известно, что типичный геном базидиального гриба может кодировать до 17 изоферментов лакказ; пост-трансляционная модификация которых (например, гликозилирование) может приводить к появлению ещё большего количества изоформ лакказ [7], [8]. Следовательно, изучение различных изоферментов и изоформ лакказ из разных источников и их физико- и биохимическая характеристика могут помочь подобрать ферменты с различными характеристиками, соответствующими конкретным биотехнологическим приложениям. В данном исследовании были очищены и биохимически охарактеризованы в нативной и дегликозилированной форме лакказы различных грибов семейства Polyporaceae, в том числе, семь новых лакказ из семи штаммов *Steccherinum ochraceum*; определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих эти лакказы; и оценено влияние гликозилирования на их каталитические свойства.

В настоящем исследовании были получены нативные и дегликозилированные формы мажорных изоферментов лакказ грибов *Trametes hirsuta*, *Antrodia faginea* и *Steccherinum murashkinskyi*. Для всех трех лакказ была ранее установлена методом рентгено-структурного анализа пространственная структура, а также определены сайты гликозилирования [9], [10]. У всех трех лакказ различалось количество и расположение сайтов гликозилирования. Один из сайтов гликозилирования присутствовал у всех четырех лакказ – при Asn436 (нумерация по лакказе *T. hirsuta*). Сайт гликозилирования при Asn54 присутствовал только у лакказы *T. hirsuta*. У лакказы *S. murashkinskyi* было выявлено всего два занятых сайта гликозилирования.

По данным ДДС-электрофореза в ПААГ лакказы *A. faginea* и *S. murashkinskyi* удалось полностью дегликозилировать, в то время как лакказа *T. hirsuta* была дегликозилирована лишь на 70%. Сохранение вторичной структуры лакказ после процедуры дегликозилирования было подтверждено данными спектроскопии кругового дихроизма, а по данным масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой содержание меди в образцах лакказ не изменилось. Для нативных и дегликозилированных препаратов лакказ *T. hirsuta*, *A. faginea* и *S. murashkinskyi* было проведено сравнение термостабильности и каталитических констант окисления АБТС и 2,6-диметоксифенола. Время полуинактивации при 60°C не изменилось у образца дегликозилированной лакказы *T. hirsuta* по сравнению с образцом нативной лакказы. Таким образом, 30% углеводов достаточно, чтобы лакказа *T. hirsuta* сохраняла свою стабильность. В то же время термостабильность полностью дегликозилированных лакказ *A. faginea* и *S. murashkinskyi* значительно упала. Время полуинактивации при 70°C дегликозилированной лакказы *A. faginea* составило 22 минуты, что в три раза меньше, чем у нативной лакказы. Время полуинактивации при 70°C дегликозилированной лакказы *S. murashkinskyi* составило 80 минут, что в 2,3 раза меньше, чем для нативной лакказы.

Дегликозилирование отрицательно сказалось на каталитических константах ( $k_{cat}$ ) окисления АБТС и 2,6-диметоксифенола в случае всех трех лакказ (Таблица 1). Это может быть связано с увеличением подвижности петель, окружающих центр T1, из-за чего увеличивается его доступность к растворителю и, как следствие, понижается его окислительно-восстановительный потенциал [10].

Таблица 1 – Каталитические константы окисления АБТС и 2,6-диметоксифенола нативными (N) и дегликозилированными (HF) формами лакказ *T. hirsuta* (ThL), *A. faginea* (AfL) и *S. murashkinskyi* (SmL).

	ThLN	ThLHF	SmLN	SmHF	AfLN	AfLHF
2,6-ДМФ						
$k_{cat}$	128 ± 11	63 ± 3	121 ± 2	11,7 ± 0,1	300 ± 4	241 ± 2
$K_M$	24 ± 2	32 ± 2	17 ± 1	18 ± 1	22 ± 1	14 ± 1
$k_{cat}/K_M$	5333	1969	7118	650	13636	17214
АБТС						
$k_{cat}$	189 ± 4	107 ± 3	232 ± 2	40 ± 1	427 ± 4	362 ± 5
$K_M$	16 ± 2	15,0 ± 0,5	184 ± 5	90 ± 5	6,3 ± 0,4	10,5 ± 1
$k_{cat}/K_M$	11813	7133	1261	444	67778	34476

Вместе с тем, дегликозилирование по-разному отражается на константе Михаэлиса для разных лакказ и разных субстратов. В случае дегликозилированной лакказы *T. hirsuta* константа Михаэлиса увеличилась для 2,6-диметоксифенола и не изменилась для АБТС. Для дегликозилированной лакказы *S. murashkinskyi* константа Михаэлиса в случае окисления 2,6-диметоксифенола не изменилась, а для АБТС – снизилась практически в два раза. Для дегликозилированной лакказы *A. faginea* константа Михаэлиса для окисления 2,6-диметоксифенола снизилась в полтора раза, а для АБТС – увеличилась в полтора раза. По-видимому, такие разные результаты объясняются различиями в расположении сайтов гликозилирования и различным строением петель субстрат-связывающего кармана.

По сравнению с лакказой *S. murashkinskyi*, лакказа *A. faginea* обладает одним дополнительным сайтом гликозилирования, расположенным непосредственно в петле субстрат-связывающего кармана. По всей видимости, это и объясняет различный эффект от дегликозилирования, оказываемый на сродство данных лакказ к АБТС и 2,6-диметоксифенолу. Помимо того, разные петли субстрат-связывающего кармана у трех исследуемых лакказ обладают различной подвижностью, что также может оказывать влияние на эффективность связывания субстратов в субстрат-связывающих карманах лакказ [11].

Для дальнейшего изучения влияния гликозилирования на каталитические свойства лакказы, были очищены и охарактеризованы семь лакказ, продуцируемых разными штаммами гриба *Steccherinum ochraceum*. Для всех семи лакказ были установлены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих эти белки. Хотя было обнаружено 46 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), почти 70% этих полиморфизмов были расположены в интронах, а все полиморфизмы в экзонных областях привели к синонимичным мутациям, которые не влияли на итоговую аминокислотную последовательность. Тем не менее, каталитические свойства всех лакказ значительно отличались. В частности, константы Михаэлиса для АБТС значительно варьировались от 81 ± 9 до 212 ± 10 мкМ, а для пирокатехина – от 323 ± 25 до 540 ± 22 мкМ, что позволяло предположить, что данные отличия связаны не с аминокислотной последовательностью ферментов, а с их пост-трансляционной модификацией – в частности, с гликозилированием.

Согласно анализу масс-спектров нативных и дегликозилированных форм, лакказы отличались по наличию и длине углеводных фрагментов в трех потенциальных сайтах гликозилирования. Было показано, что у всех семи лакказ два сайта – Asn182 и Asn414 – были гликозилированы углеводными цепочками (Man)<sub>x</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>, где X варьировался от 5 до 8. Такие же цепочки сахаров были обнаружены при Asn436 у лакказ So3120, So3174, So3827, So3398 и So3622; однако в масс-спектрах лакказ So2134 и So3617 гликозилированные пептиды, содержащие Asn436, не были обнаружены. В образцах дегликозилированных лакказ не было обнаружено пептидов с фрагментами (Man)<sub>x</sub>(GlcNAc)<sub>2</sub>, однако остатки N-ацетилглюкозамина были обнаружены при Asn182 и Asn414. Исключением были лакказы So3617 и So3622, для которых пептиды, содержащие Asn182, не были обнаружены.

Оценка каталитических свойств четырех дегликозилированных лакказ с наиболее отличающейся углеводной частью с использованием пирокатехина и АБТС в качестве субстратов показала снижение их каталитической активности ( $V_{\max}$ ) после дегликозилирования. Предположительно, это снижение можно объяснить частичной инактивацией фермента, приводящей к снижению концентрации активного фермента. Важно отметить, что после дегликозилирования первоначальные различия в значениях  $K_M$  исследуемых лакказ исчезли – все дегликозилированные лакказы показали одинаковые, в пределах погрешности, значения  $K_M$  для обоих тестируемых субстратов (около  $528 \pm 25$  мкМ для пирокатехина и  $208 \pm 16$  мкМ для АБТС).

В настоящей работе было показано, что гликозилирование играет важную роль в сохранении термостабильности лакказ, а также оказывает значительное влияние на каталитическую активность данных ферментов. В настоящее время модификация существующих ферментов для их «тонкой настройки» становится актуальной тенденцией в биотехнологической промышленности. Поэтому крайне важно, как с фундаментальной, так и с практической точки зрения дальнейшее изучение роли гликозилирования лакказ, поскольку это может регулировать функционирование фермента и должно учитываться при разработке новых, более эффективных биокатализаторов.

#### Литература

1. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. Multicopper oxidases and oxygenases // Chem. Rev. 1996. V. 96. № 7. P. 2563–2606. doi: 10.1021/cr950046o.
2. Mate D.M., Alcalde M. Laccase engineering: From rational design to directed evolution // Biotechnol. Adv. 2015. V. 33. № 1. P. 25–40. doi: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.007.
3. Viswanath B., Rajesh B., Janardhan A., Kumar A.P., Narasimha G. Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation // Enzyme Res. 2014. V. 2014. P. 1–10. doi: 10.1155/2014/163242.
4. Senthivelan T., Kanagaraj J., Panda R.C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review // Biotechnol. Bioprocess Eng. 2016. V. 21. № 1. P. 19–38. doi: 10.1007/s12257-015-0278-7.
5. Pezzella C., Guarino L., Piscitelli A. How to enjoy laccases // Cell. Mol. Life Sci. 2015. V. 72. № 5. P. 923–940. doi: 10.1007/s00018-014-1823-9.
6. Upadhyay P., Shrivastava R., Agrawal P.K. Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase // 3 Biotech. 2016. V. 6. № 1. P. 1–12. doi: 10.1007/s13205-015-0316-3.
7. Kilaru S., Hoegger P.J., Kües U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies // Curr. Genet. 2006. V. 50. № 1. P. 45–60. doi: 10.1007/s00294-006-0074-1.
8. Savinova O.S., Glazunova O.A., Moiseenko K.V., Shakhova N.V., Fedorova T.V. Evolutionary Relationships Between the Laccase Genes of Polyporales: Orthology-Based Classification of Laccase Isozymes and Functional Insight From *Trametes hirsuta* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. P. 152. doi: 10.3389/fmicb.2019.00152.
9. Polyakov K.M., Gavryushov S., Ivanova S., Fedorova T.V., Glazunova O.A., Popov A.N., Koroleva O.V. Structure of native laccase from *Trametes hirsuta* at 1.8 Å resolution // Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 2009. V. 65. Pt 6. P. 611–617. doi: 10.1107/S0907444909011950.
10. Glazunova O.A., Polyakov K.M., Moiseenko K.V., Kurzeev S.A., Fedorova T.V. Structure-function study of two new middle-redox potential laccases from basidiomycetes *Antrodia faginea* and *Steccherinum murashkinskyi* // Int. J. Biol. Macromol. 2018. V. 118. P. 406–418. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.038.
11. Glazunova O.A., Trushkin N.A., Moiseenko K.V., Filimonov I.S., Fedorova T.V. Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: redox potential versus substrate-binding pocket structure // Catalysts. 2018. V. 8. № 4. P. 152. doi: 10.3390/catal8040152.