

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт белка Российской академии наук

Программа подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре
06.06.01 Биологические науки
Направленность (профиль) – Молекулярная биология



Коляденко Илья Андреевич

**Влияние точечных аминокислотных замен на
каталитические свойства двухдоменной лакказы
*Streptomyces griseoflavus***

Аннотация научно-квалификационной работы

Научный руководитель: к.ф.-м.н. Габдулхаков А.Г

Выпускник: Коляденко И.А

Пушино
2021

Ферменты – сложные органические молекулы, ускоряющие химические реакции за счет снижения энергии активации и стабилизации промежуточных состояний субстратов. Ферментами являются молекулы белков, РНК или РНК-белковые комплексы. Они давно и активно применяются в различных областях жизнедеятельности человека. Например, в медицине, пищевой и целлюлозно-бумажной промышленности, биотехнологии и органическом синтезе, науке и тд. На сегодняшний день трендом становится снижение антропогенного воздействия на окружающую среду. Разрабатываются “экологически чистые” технологии добычи полезных ископаемых, производства продуктов питания и одежды. Помимо разработки “экологически чистых” технологий добычи и тд, пристальное внимание уделяют утилизации уже накопленных загрязняющих окружающую среду веществ: пластик, синтетические красители, масла и тд. Одним из ферментов, который применяется практически во всех направлениях биотехнологии, является лакказа.

Лакказа (ЕС 1.10.3.2, п-дифенол - кислород оксидоредуктаза) медьсодержащий фермент, который относится к классу оксидоредуктаз. Катализирует окисление различных соединений с сопутствующим восстановлением кислорода до воды. Лакказы открыты и исследуются с 19-го века, незадолго после открытия первых ферментов (пепсин, инвертаза и др). Лакказы обладают широкой субстратной специфичностью - катализируют реакцию окисления множества веществ с различной структурой. На сегодняшний день данные ферменты применяются в текстильной промышленности для обесцвечивания красителей, в медицине для создания биосенсоров, и многих других областях.

В природе найдены трехдоменные (3D) и двухдоменные (2D) лакказы. Первые активно изучаются ввиду их высокой активности по отношению ко многим субстратам. Вторые открыты намного позже, слабо изучены из-за более низкой активности и субстратной специфичности. Несмотря на низкую активность, 2D лакказы превосходят 3D лакказы в термостабильности, способны функционировать в кислых и щелочных условиях среды, а также на их активность практически не влияют классические ингибиторы 3D лакказ. 2D лакказы продуцируются только некоторыми видами бактерий. Основным продуцентом 2D лакказ являются бактерии рода *Streptomyces*. Из бактерии вида *Streptomyces griseoflavus* выделена самая активная на сегодняшний день 2D лакказа, которая и является объектом исследования в данной работе. Для данного объекта известна кристаллическая структура, показано, что координирование ионов меди активного центра идентично таковому для 3D лакказ, однако их аминокислотное окружение кардинально отличается. Предложен механизм каталитической реакции, однако а.к остатки, влияющие на различные аспекты данного процесса, мало изучены.

Цель работы - комплексные структурно-функциональные исследования 2D лакказы бактерии вида *Streptomyces griseoflavus*. Изучение роли аминокислотных остатков, определяющих на наш взгляд специфику данного фермента.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать пространственную структуру 2D лакказы бактерии вида *Streptomyces griseoflavus*. На основе анализа выбрать потенциально важные для функционирования фермента а.к остатки.
2. Произвести сайт направленные мутагенез гена лакказы бактерии вида *Streptomyces griseoflavus*. Получить генетические конструкции, несущие ген лакказы с внесенными мутациями.
3. Получить штаммы - суперпродуценты сконструированных мутантных форм фермента. Выделить ферменты в препаративных количествах с чистотой, пригодной для кристаллизации и биохимических исследований.
4. Измерить ферментативную активность полученных мутантных форм и фермента дикого типа. Определить константы ферментативной активности по отношению к различным типам субстратов. Выяснить влияние внешних факторов (температура, рН) и ингибиторов на активность полученных белковых препаратов.
5. Произвести поиск условий кристаллизации полученных белковых препаратов. Получить кристаллы, собрать дифракционные данные, решить и уточнить пространственные структуры мутантных форм фермента.
6. На основании пространственных структур и биохимических данных, предложить роль потенциально важных а.к остатков в функционировании фермента.

В работе использовали следующие методы: сайт-направленный мутагенез, биохимические методы очистки и выделения рекомбинантных белков, спектрофотометрические методы анализа физико-химических свойств белков, кристаллизация и рентгеноструктурный анализ. В результате анализа структуры 2D лакказы бактерии вида *Streptomyces griseoflavus* выбраны 5 потенциально - важных для ферментативной активности а.к. остатков. Получены генетические конструкции и штаммы - суперпродуценты 5-ти одиночных и 4-х двойных мутантных форм. В препаративных количествах получены белковые препараты 5-ти одиночных и 4-х двойных мутантных

форм. Для каждой мутантной формы проведены комплексные исследования влияния замены а.к остатка на ферментативную активность фермента, а также определены их пространственные структуры. На основании сравнения кристаллических структур мутантных форм и анализа их биохимической активности, предложены роли выбранных а.к остатков в ферментативной активности лакказы бактерии вида *Streptomyces griseoflavus*. Поставленные в работе задачи выполнены в полной мере. Проведены комплексные исследования 2D лакказы бактерии вида *Streptomyces griseoflavus*.