Секция «Молекулярная биология»

Исследование доступности T2/T3 центра двухдоменной лакказы из Streptomyces griseoflavus Ac-993

Научный руководитель – Габдулхаков Азат Габдрахманович

Коляденко Илья Андреевич

Аспирант

Институт белка РАН, Пущино, Россия

E-mail: ilya@vega.protres.ru

Лакказа (КФ 1.10.3.2, бензолдиол: кислород оксидоредуктаза) - медьсодержащая оксидоредуктаза, катализирующая окисление широкого спектра фенольных субстратов и некоторых неорганических ионов с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды. Двухдоменные лакказы, по сравнению с хорошо изученными трехдоменными, обладают рядом уникальных свойств: высокой термостабильностью, способностью катализировать окисление фенольных субстратов при щелочных значениях pH, высокой устойчивостью к ингибиторам. Мы исследуем доступность молекулам субстрата (кислорода) функционального медьсодержащего T2/T3 центра двухдоменной лакказы *Streptomyces griseoflavus* методом мутационного анализа. Наш подход заключается в мутагенезе аминокислотных остатков вблизи T2/T3 центра, замены которых могут влиять на прохождение субстрата реакции (кислорода) или продукта (воды).

Анализ структур двухдоменных лакказ показал возможное наличие нескольких каналов, ведущих к T2/T3 центру. Рассчитанные каналы отличаются по размеру, а так же аминокислотному окружению. Мы предположили, что расположенный в области сужения одного из каналов изолейцин 170 может играть критическую роль в доступе к функциональному центру. Для того чтобы проверить нашу гипотезу были получены мутантные формы лакказы *S. griseoflavus* с заменой Ile170 на фенилаланин (I170F SgSL) и на аланин. Определённая нами кристаллическая структура I170F SgSL показала, что боковая группа фенилаланина перекрыла канал, ведущий T2/T3 центру, изменений на других участках молекулы не наблюдалось.

Функциональную активность I170F SgSL определяли по скорости окисления АБТС (pH=4) и 2,6-ДМФ (pH=9). Полученные данные аппроксимированы с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен. Показано, что замена изолейцина на фенилаланин привела к снижению функциональной активности фермента более чем на 2 порядка, как по отношению к АБТС, так и к 2,6-ДМФ. В настоящее время ведутся функциональные и структурные исследования второй мутантной формы лакказы *S. griseoflavus* с заменой Ile170 на аланин.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект № 18-04-00270-а) и Программы «Молекулярная и клеточная биология и постгеномные технологии» Президиума РАН.