

**Структурно- функциональные исследования влияния сочетанных мутаций в двухдоменной лакказе *Streptomyces griseoflavus***

**Научный руководитель – Габдулхаков Азат Габдрахманович**

*Щербакова А.Е.<sup>1</sup>, Коляденко И.А.<sup>2</sup>*

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биотехнологический факультет, Москва, Россия, *E-mail: nas.scherbakova99@bk.ru*; 2 - Институт белка РАН, Пущино, Россия, *E-mail: ilya@vega.protres.ru*

Лакказы (ЕС 1.10.3.2) - медь - содержащая оксидоредуктаза, способная окислять различные соединения в присутствии кислорода с одновременным его восстановлением до воды. Лакказы применяются для делигнификации древесины, детоксикации веществ, содержащихся в почве и воде и др. Активный центр всех лакказ содержит четыре иона меди, благодаря чему они способны окислять широкий спектр химических соединений, например, красители, использующиеся в промышленности. В природе широко распространены трехдоменные лакказы (3D), синтезирующиеся грибами, растениями и бактериями. Также встречаются двухдоменные лакказы (2D), которые продуцируются некоторыми видами бактерий [2].

Благодаря структурно-функциональным особенностям, 2D-лакказы, по сравнению с 3D, способны функционировать как в кислых, так и в щелочных условиях среды. 2D лакказы более термостабильны, устойчивы к воздействию ингибиторов, а также методика их получения значительно проще и дешевле. Однако скорость окисления различных субстратов 2D лакказами уступает таковой для 3D [2].

Ранее нами были получены одиночные мутантные формы 2D - лакказы из бактерии *Streptomyces griseoflavus* (SgfSL) с одиночными заменами H165A и M199G. Замены данных аминокислот привели к существенному увеличению активности лакказы, а в случае замены в 165 положении дополнительно к увеличению устойчивости к ингибитору NaN<sub>3</sub> [1].

Целью данной работы является получение двойной мутантной формы (H165A/M199G) лакказы бактерии SgfSL для исследования эффекта влияния сочетания мутаций на фермент. Сайт - направленный мутагенез проводился методом перекрывающихся праймеров. Экспрессия гена мутантной формы фермента осуществлялась с использованием экспрессионного штамма *E. Coli* BL21(DE3) / Rosetta, с последующим выделением и очисткой фермента металл-аффинной хроматографией. Каталитическая активность, термостабильность, устойчивость к ингибиторам двойной мутантной формы фермента исследовали спектрофотометрическим методом. Также проведена оценка эффективности обесцвечивания двух типов красителей. Показано, что термостабильность H165A/M199G ниже, чем у H165A. При этом устойчивость к ингибиторам H165A/M199G эквивалентна H165A. Однако, активность H165A/M199G выше активности фермента дикого типа, но ниже активности M199G. Таким образом, суммирование эффектов мутаций наблюдается лишь по некоторым свойствам.

Работа выполнена в группе макромолекулярных комплексов ИБ РАН, при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №19-34- 90121.

**Источники и литература**

- 1) A. G. Gabdulkhakov et al. Investigations of Accessibility of T2/T3 Copper Center of Two-Domain Laccase from *Streptomyces griseoflavus* Ac-993 // International Journal of Molecular Sciences, 2019.

- 2) L.I. Trubitsina et al. Structural and functional characterization of two-domain laccase from *Streptomyces viridochromogenes* // *Biochimie* 112 (2015).