

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

На правах рукописи

Поварова Наталья Владимировна

**Катализ образования кремнезема рекомбинантными
силикатеинами, катепсинами и их мутантными вариантами**

специальность – 03.01.03 (молекулярная биология)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2019

Работа выполнена в лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Лукьянов Константин Анатольевич, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Вейко Владимир Петрович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной инженерии Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук

Митькевич Владимир Александрович, кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»

Защита состоится 20 февраля 2019 г. в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « » 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
В.А. Олейников



Характеристика работы

Актуальность темы исследования.

Наноматериалы из диоксида кремния находят применение в различных областях науки и техники, от получения пленок с различными свойствами до адресной доставки лекарств. Наноматериалы биологического происхождения часто демонстрируют необычные механические или оптические свойства. Кроме того, биосинтез наноматериалов происходит в мягких условиях.

Силикатеины - это группа катепсин-подобных белков, полимеризующих диоксид кремния в водных растворах при физиологическом рН. Силикатеины экспрессируются кремниевыми губками и считаются основными белками, обеспечивающими образование неорганического скелета губок. После открытия этой группы ферментов в 1998 году, многие исследователи предприняли попытки синтеза наноматериалов с помощью силикатеинов. Однако используемый источник диоксида кремния - тетраэтил ортосиликат (ТЭОС) был труднодоступен для белка и затруднял использование силикатеинов для синтеза биоматериалов.

Хотя с помощью силикатеинов были получены материалы с необычными свойствами, из-за плохой растворимости ТЭОС и низкой активности белка в его присутствии механизм активности силикатеинов практически не изучен. Неизвестны также условия оптимальной активности фермента, что затрудняет контроль синтеза наноматериалов с использованием силикатеинов.

Степень разработанности области исследования

Силикатеины были идентифицированы в качестве основных участников полимеризации кремнезема губками в 1998 году. В последующие годы была продемонстрирована полимеризация кремнезема рекомбинантными силикатеином при использовании ТЭОС в качестве источника диоксида кремния, а также проведен мутационный анализ, который показал критическую роль остатков серина и гистидина для полимеризации кремнезема в присутствии ТЭОС.

В ходе дальнейшего исследования силикатеинов была показана возможность полимеризации других, не-кремниевых соединений, например, оксидов титана, циркония и церия. Механизм этих реакций и вовлеченные в реакцию полимеризации аминокислотные остатки не исследовались.

В 2008 году была получена кристаллическая структура химерного белка - катепсина L человека с точечными заменами некоторых остатков на остатки, характерные в этих положениях для силикатеина. Такой химерный белок обладал способностью полимеризовать кремнезем, но только в присутствии силиката натрия, а не ТЭОС. Анализ полученной кристаллической структуры исключает возможность взаимодействия химерного белка с ТЭОС.

Цели и задачи работы.

Целью настоящей работы было изучение биохимических особенностей силикатеинов и родственных белков в контексте их перспективного использования для ферментативного образования кремнезема *in vitro* и *in vivo*.

Для достижения цели были сформулированы следующие задачи: найти и охарактеризовать водорастворимый субстрат для силикатеина; определить оптимальные условия активности силикатеина; провести мутационный анализ силикатеина и родственных белков.

Научная новизна и практическая ценность работы.

В настоящей работе предложены два новых субстрата силикатеинов, значительно более эффективных и доступных для фермента. Определены оптимальные условия активности силикатеина A1.

В ходе выполнения работы также проведен мутационный анализ силикатеина A1 и катепсина L губки *L. oparinae*, а также катепсина L человека. Обнаружена силикатеиновая активность катепсина L человека. Полученные результаты демонстрируют, что ранее предложенный механизм ферментативной активности силикатеина является ошибочным.

Структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 92 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, описания полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 85 ссылок. Диссертация содержит 51 рисунок и 5 таблиц.

Апробация работы и публикации

Основные материалы диссертации были изложены на международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии (Москва, Россия, 2014 г.), а также на международной конференции Global Congress on Biochemistry, Glycomics and Amino Acids (San-Antonio, Texas, USA, 2016 г.).

По теме диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых научных журналах.

Основное содержание работы

Выбор субстрата

Природным субстратом силикатеина считается ортокремниевая кислота. Поэтому в лабораторных условиях при исследовании силикатеинов используются соединения, для которых ортокремниевая кислота является продуктом гидролиза. Чаще всего в качестве предшественника кремниевой кислоты используется тетраэтил ортосиликат (ТЭОС, рис. 1А) — дешевый и широкодоступный, однако плохо растворимый в воде реагент. Для облегчения реакции ТЭОС часто прегидролизуют 50 мМ раствором HCl. Путем полного гидролиза ТЭОС получают метастабильный раствор ортокремниевой кислоты, склонный к самопроизвольной полимеризации, который также использовали в некоторых исследованиях.

Другой субстрат — трис(катехол)ортосиликат калия (рис. 1В) — хорошо растворим в воде, однако токсичен для человека, значительно дороже, чем ТЭОС, а продукты его гидролиза осмолняются (рис. 1С).

Таким образом, актуальной была задача найти недорогой предшественник ортокремниевой кислоты, хорошо растворимый в воде и не образующий токсичных соединений.

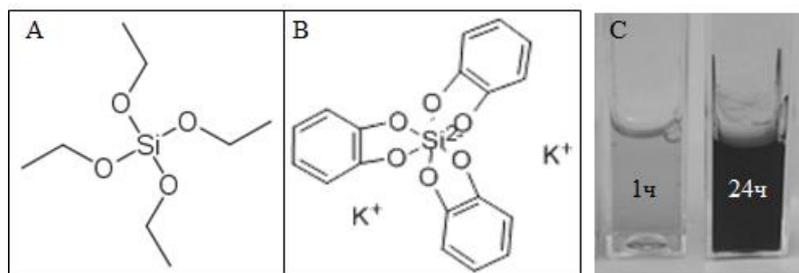


Рисунок 1. Структурные формулы ТЭОС (А) и трис(катехол)ортосиликата калия (В). Кювета с 5 мМ раствором трис(катехол)ортосиликата калия через 1 и 24 часа инкубации.

В качестве новых субстратов были предложены аналогичные ТЭОС алкоксисиланы с более гидрофильными заместителями: ТГЭОС — тетракис(2-гидроксиэтил) ортосиликат, и ТГС — тетраглицерол ортосиликат (рис. 2).

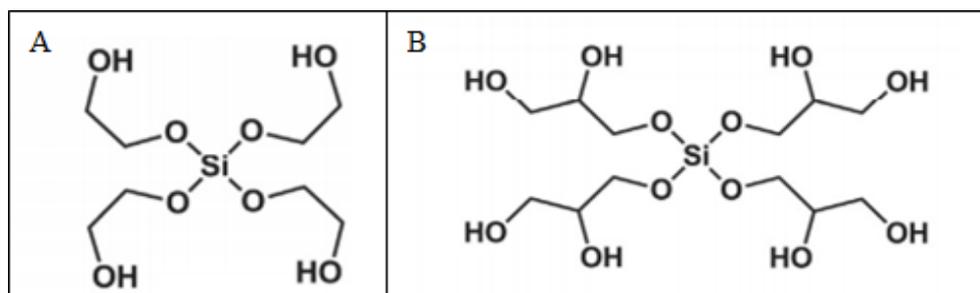


Рисунок 2. Структурные формулы предложенных субстратов А- ТГЭОС и В – ТГС.

Оба субстрата хорошо растворимы в воде, а продуктами гидролиза, кроме ортосиликата, являются этиленгликоль для ТГЭОС и глицерин для ТГС.

Активность силикатеина A1 *L.oparinae* с различными субстратами

Для оценки активности новых субстратов сначала использовали изменение оптической плотности раствора при 600 нм. (рис. 3). Однако этот подход имел ряд ограничений. Во-первых, для видимого помутнения раствора необходима была высокая концентрация белка (0,2 мг/мл). Во-вторых, светорассеяние могло быть

связано не только с образованием частиц кремнезема, но и с денатурацией белка из-за продуктов гидролиза алкоксисиланов, или с агрегацией белка. По этим причинам необходима была более точная оценка эффективности образования частиц диоксида кремния.

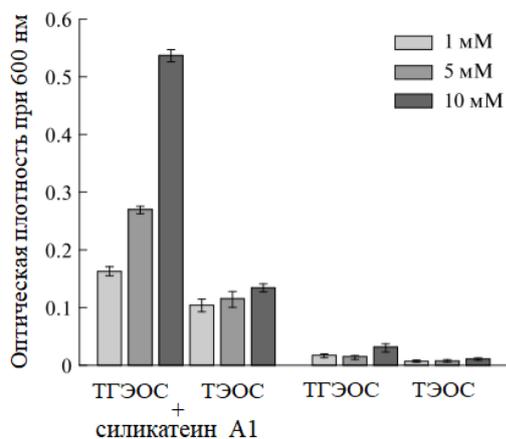


Рисунок 3. Сравнение ТГЭОС и ТЭОС в качестве субстратов для силикатеина А1. Гистограмма показывает оптическую плотность при 600 нм растворов ТГЭОС и ТГС с концентрацией 0,02%, 0,1% и 0,2% после инкубации в присутствии (слева) или в отсутствие (справа) силикатеина А1. Условия: Tris-HCl pH 7,2, 150 мМ NaCl, концентрация белка 0,2 мг/мл, 1 ч, 25°С.

Частицы, образованные силикатеином А1 (LoSil) при добавлении субстратов, детектировали при помощи сканирующей электронной микроскопии (рис. 4). Эксперименты проводили совместно с лабораторией медицинских нанотехнологий ФНКЦ ФХМ. В присутствии всех трех субстратов силикатеин образовывал частицы аморфного кремнезема. Состав частиц был подтвержден с помощью рентгенофлуоресцентного элементного анализа - частицы состояли преимущественно из кремния, кислорода и азота. Из-за использования графитовой подложки обнаружить углерод в составе частиц было невозможно.

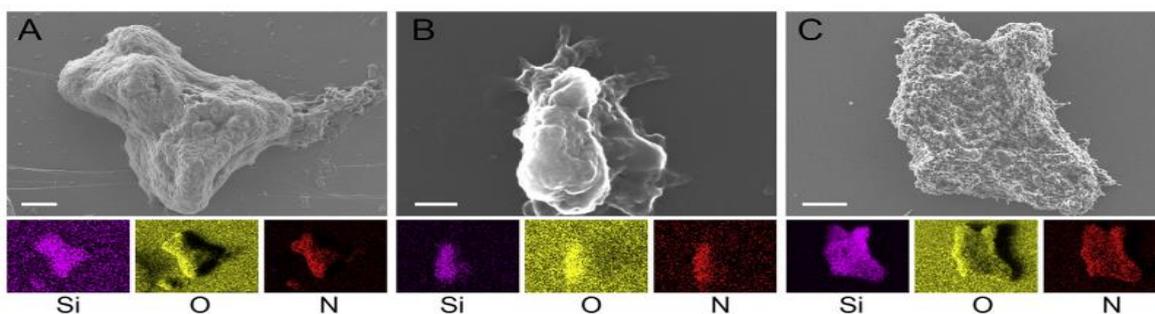


Рисунок 4. Частицы, образованные LoSil в присутствии 0,1% раствора субстратов. А - ТЭОС с 0,2 мг/мл белка (масштабная линейка 2 мкм), В - ТГЭОС с 0,06 мг/мл белка (масштабная линейка 0,2 мкм), С - ТГС с 0,06 мг/мл белка (масштабная линейка 2 мкм). Под электронной микрофотографией приведены результаты элементного анализа. Условия: Tris-HCl pH 7,2, 150 мМ NaCl, 0,1% ТГС, 1 ч, 25°С.

Эффективность образования частиц сравнивали количественно с помощью колориметрического анализа (рис. 5). Частицы кремнезема осаждали центрифугированием и растворяли в щелочи, после чего анализировали содержание силиката в растворе по образованию восстановленной формы кремниймолибденовой гетерополикислоты — окрашенному соединению с максимумом поглощения при 820 нм.

LoSil продемонстрировал примерно одинаковую активность в присутствии ТГЭОС и ТГС, активность с ТЭОС оказалась ниже предела чувствительности метода. По этой причине для получения частиц для сканирующей микроскопии с ТЭОС использовали в два раза большую концентрацию белка.

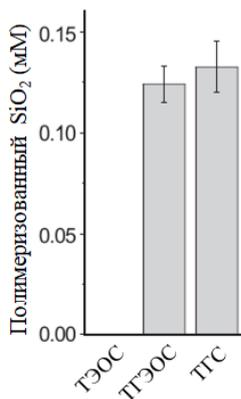


Рисунок 5. Сравнение активности LoSil с разными субстратами. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, концентрация белка 0,1 мг/мл, концентрация субстратов 0,1%, 1 ч, 25°C.

Стабильность субстратов в водных растворах

Мы предположили, что большая эффективность LoSil связана с большей степенью гидролиза новых прекурсоров и оценили уровень самопроизвольной полимеризации кремнезема в растворах прекурсоров (рис. 6). Чем сильнее гидролизуется субстрат, тем активнее происходит самопроизвольная полимеризация ортокремниевой кислоты.

Оказалось, что ТГЭОС гидролизуется значительно эффективнее других соединений. В растворах ТЭОС и ТГС практически не образовывалось крупных частиц, которые можно обнаружить с помощью нашего метода детекции. Неожиданно, при концентрации 0,1% уровень гидролиза ТГС незначительно превышал уровень гидролиза ТЭОС. Но, по-видимому, уровень образования ортосиликата в растворе ТГС достаточен для активной работы силикатеина А1. Возможно, также, что белок непосредственно гидролизует ТГС или взаимодействует с продуктами его частичного гидролиза.

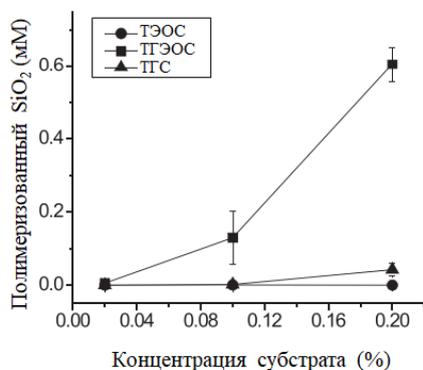


Рисунок 6. Самопроизвольная конденсация кремнезема в растворах ТЭОС, ТГЭОС и ТГС разной концентрации. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, 1 ч, 25°C.

Токсичность субстратов

Для исследования силикатеиновой активности в живых клетках мы оценили токсичность исследуемых соединений и продуктов их гидролиза. Для этого мы проверили выживаемость клеток линии HeLa Kyoto в среде с добавлением субстратов (рис. 7). Как и ожидалось, ТГС оказался наименее токсичным из проверенных субстратов, поскольку глицерин, как продукт гидролиза, является менее токсичным для живых клеток, чем этанол и этиленгликоль, образующиеся при гидролизе ТЭОС и ТГЭОС, соответственно.

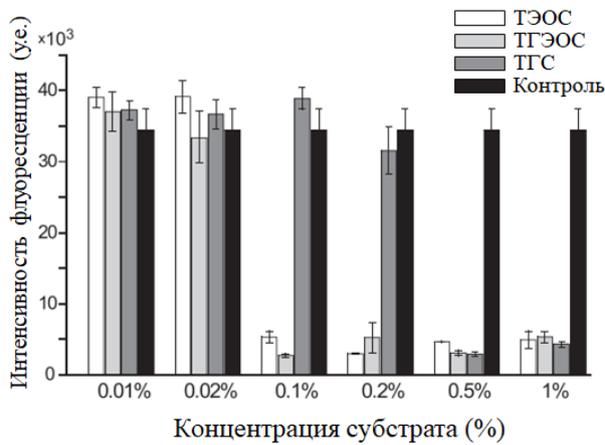


Рисунок 7. Выживаемость клеток линии *HeLa Kyoto* в среде с добавлением различных субстратов, измеренная с помощью реагента AlamarBlue. Клетки инкубировали с субстратами в течение 24 часов при 37°C.

Ортосиликат, который в губках накапливается в мембране особых органелл силикасом, образуется в результате гидролиза любого субстрата, поэтому любой субстрат в некоторой степени токсичен для клеток. Но использование ортосиликата с нетоксичными заместителями позволяет работать с живыми объектами в более широком диапазоне концентраций.

Учитывая высокую активность LoSil с TГС, низкий уровень самопроизвольной полимеризации кремнезема в растворе TГС, а также его меньшую токсичность, мы выбрали TГС для дальнейшей работы с LoSil.

Свойства LoSil

Зрелый LoSil состоит из 218 аминокислотных остатков и имеет массу 23,5 кДа. Первоначально для оценки активности силикатеина были выбраны условия, использованные в предыдущих работах для других силикатеинов¹. Несмотря на сходство ключевых остатков (рис. 8), LoSil значительно отличается от ранее изученных силикатеинов общим зарядом - его изоэлектрическая точка составляет 8,4, в то время как pI силикатеинов альфа *S. domuncula* и *T. aurantium* составляет около 5. Решено было проверить влияние различных параметров реакции на эффективность полимеризации кремнезема.

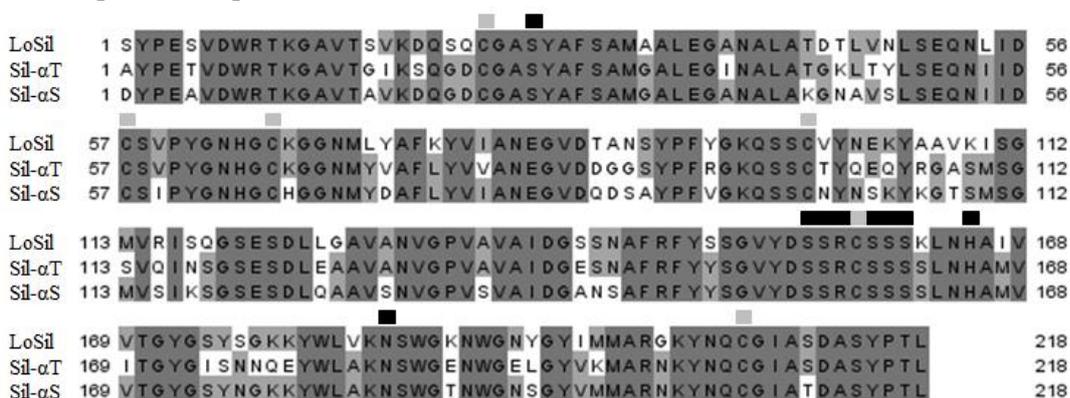


Рисунок 8. Выравнивание последовательностей зрелых силикатеинов *L. oparinae* (LoSil), *T. aurantium* (Sil-αT) и *S. domuncula* (Sil-αS). Черными прямоугольниками отмечены остатки каталитического центра и полисериновый тракт. Серыми прямоугольниками отмечены цистеины, образующие дисульфидные связи. Последовательности идентичны LoSil на 75% и 78%, соответственно.

¹ J.N. Cha, K. Shimizu, Y. Zhou, S.C. Christiansen, B.F. Chmelka, G.D. Stucky, D.E. Morse, Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96 (1999) 361–365. doi:10.1073/pnas.96.2.361

Кинетика полимеризации кремнезема

В первых работах с рекомбинантным силикатеином реакцию проводили в течение часа. Мы оценили количество кремнезема, образующееся при разном времени инкубации реакционной смеси, и получили неожиданные результаты (рис. 9А). После достижения максимального значения, количество силиката в анализе со временем уменьшалось, за полтора часа снижаясь почти в два раза.

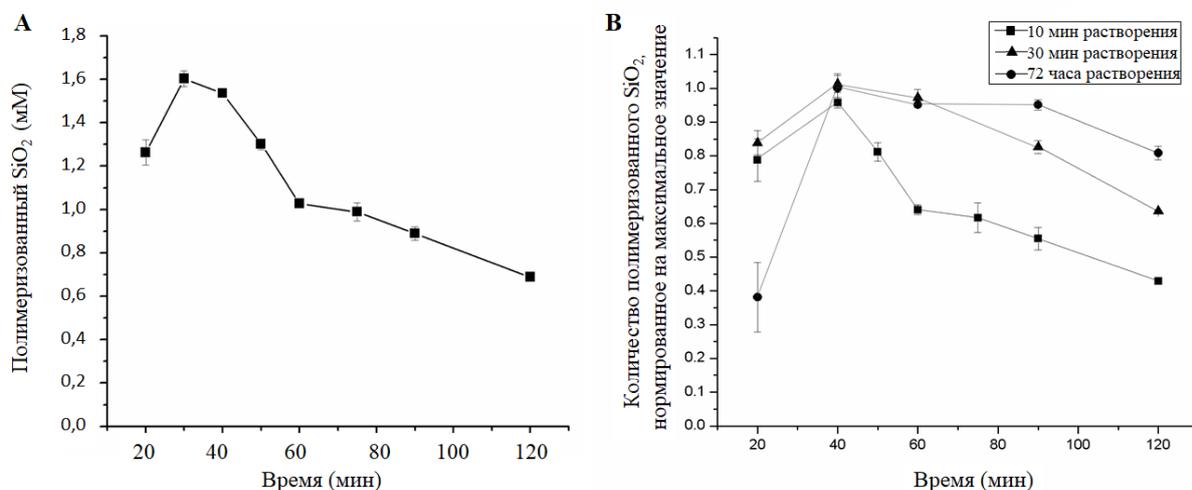


Рисунок 9. А. Зависимость количества полимеризованного кремнезема от времени реакции. *Tris-HCl* pH 7.2, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 25°C. **В.** Зависимость полимеризации кремнезема от времени реакции. Эксперименты проведены в одинаковых условиях, но собранные частицы растворяли в течение разного времени. Условия: *Tris-HCl* pH 7.2, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 25°C.

Мы предположили, что частицы по каким-то причинам перестают детектироваться в нашей системе. Например, для сбора частиц мы использовали центрифугирование. Если частицы становились мельче или менее плотными, они могли перестать оседать при выбранном ускорении. Однако в литературе не описаны подобные эффекты для частиц кремнезема.

Следующий этап нашего анализа - растворение осадка в щелочи. Осадок виден в высушенном виде, но при добавлении гидроксида натрия практически сразу становится незаметен, так что полноту растворения сложно детектировать. Мы предположили, что потери происходят на этом этапе и провели аналогичный эксперимент, в котором высушенные частицы растворяли в течение разного времени (рис. 9В).

На рисунке 9В видно, что с увеличением времени растворения частиц падение количества кремнезема в анализе заметно уменьшилось, что подтверждает нашу гипотезу. Даже за 72 часа количество кремнезема в анализе все еще снижалось, что показывает, что растворимость частиц уменьшалась значительно.

Дифракционный анализ спикул кремниевых губок показал, что кремнезем, полимеризованный силикатеином, имеет поры, но первоначально полимеризованный кремнезем со временем становится более плотным, и размер пор уменьшается². Этот процесс может происходить за счет активности силикатеина или самопроизвольно.

¹ G. Croce, D. Viterbo, M. Milanese, H. Amenitsch, A mesoporous pattern created by nature in spicules from *Thetya aurantium* sponge, *Biophys. J.* 92 (2007) 288–292. doi:10.1529/biophysj.106.094532

²X. Wang, H.C. Schröder, U. Schloßmacher, L. Jiang, M. Korzhev, W.E.G. Müller, Biosilica aging: From enzyme-driven gelation via syneresis to chemical/biochemical hardening, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830 (2013) 3437–3446. doi:10.1016/j.bbagen.2013.02.006.

Мы решили проверить, насколько эффект спекания связан с активностью белка. Для этого мы разрушали белок на 20 и 60 минуте реакции, но продолжали инкубировать частицы до достижения отметки в 120 минут (рис. 10). Для разрушения фермента использовали трипсин или тепловую денатурацию (5 мин при 75°C).

Инактивация трипсином осложняется тем, что трипсин может плохо проникать внутрь частиц кремнезема, а температурную инактивацию нельзя проводить при высокой температуре, потому что высокая температура может вызывать изменения в строении кремнезема. В работе Croce et al. было показано, что структура аморфного кремнезема, образующего спикулы *T. aurantium*, значительно изменяется при нагревании до 250°C в течение 2 часов. Но нельзя исключать, что на частицы, образованные *in vitro*, окажет заметный эффект и меньший нагрев.

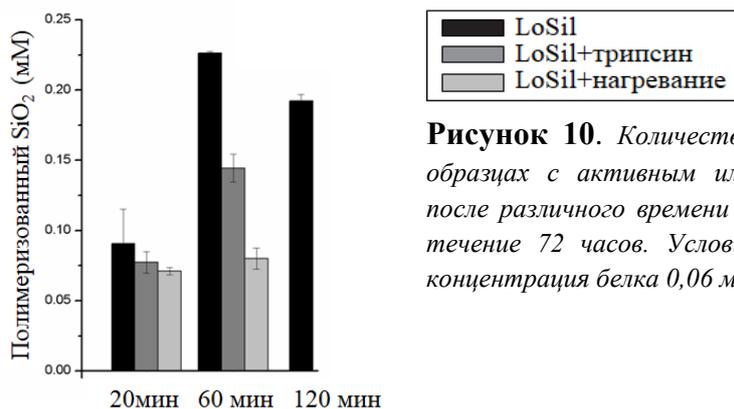


Рисунок 10. Количество растворимого силиката натрия в образцах с активным или инактивированным силикатеином после различного времени инкубации и растворении щелочью в течение 72 часов. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 25°C.

При инактивации силикатеина через 20 минут после начала реакции растворимость частиц не изменялась. То есть дополнительных связей в частицах за оставшиеся 100 минут инкубации не образовывалось. Вероятно, полученный кремнезем имеет не оптимальную структуру для дальнейшей самопроизвольной полимеризации. Но при инактивации белка на 60 минуте реакции, растворимость частиц значительно снизилась и при ферментативной, и при температурной инактивации.

Большее снижение растворимости при температурной инактивации, вероятно, связано с эффектом от нагревания и температурным спеканием кремнезема. Интересно, что при инкубации реакционной смеси в течение с двух часов с активным силикатеином, частицы лучше растворимы. Видимо, силикатеин, направляя полимеризацию, препятствует самопроизвольному образованию новых связей. Возможно также, что при разрушении белка просто заполняются кремнеземом ячейки, прежде занятые молекулами белка.

Таким образом, наши данные позволяют предположить, что одновременно с ферментативным образованием частиц кремнезема происходит их дальнейшее спекание за счет самопроизвольной полимеризации уже без участия силикатеина.

Эффект от образования дисульфидных связей

В молекуле силикатеина образуется 3 внутримолекулярные дисульфидные связи. Кроме того, дисульфидные связи принимают участие в начальных этапах олигомеризации силикатеина¹. Мы решили проверить эффект от присутствия восстанавливающего агента на эффективность полимеризации кремнезема (рис. 11).

¹M.M. Murr, D.E. Morse, Fractal intermediates in the self-assembly of silicatein filaments., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 11657–62. doi:10.1073/pnas.0503968102.

Анализ показал, что добавление DTT уменьшает количество образуемых частиц на 20%, но не предотвращает их образование.

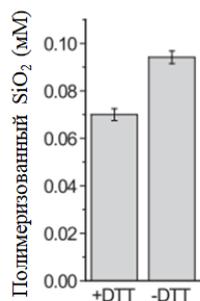


Рисунок 11. Полимеризация кремнезема LoSil в присутствии и без добавления 5 мМ DTT. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 25°C.

Зависимость активности LoSil от концентрации субстрата

Мы оценили эффективность полимеризации кремнезема при разных концентрациях ТГС (рис. 12А). Максимальная эффективность наблюдалась при концентрации 0,4%, после чего активность фермента снижалась. Падение активности может иметь несколько объяснений. Возможно, этот эффект связан с явлением субстратного ингибирования¹. Кроме того, активность может падать из-за увеличения концентрации глицерина (который присутствует в используемом образце ТГС и образуется в результате гидролиз), поскольку ранее было описано, что глицерин препятствует нормальной олигомеризации белка², кроме того, глицерин изменяет вязкость раствора.

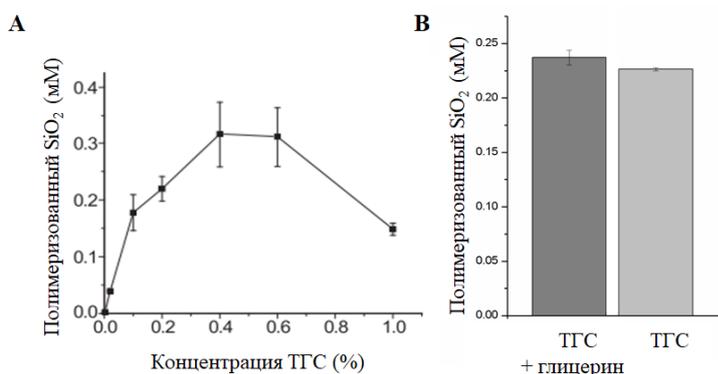


Рисунок 12. А. Активность LoSil при разной концентрации ТГС. Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, 1ч, 25°C. В. Сравнение активности LoSil при добавлении и в отсутствие 1% глицерина. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 25°C.

Мы оценили активность фермента при добавлении 1% глицерина (рис. 12В).

Добавление в реакцию смесь глицерина до концентрации 1% не изменяло активность LoSil. Таким образом, даже несмотря на то, что глицерин образуется в четырехкратном избытке относительно субстрата, при концентрации ТГС 0,1-0,2% негативного влияния на работу белка глицерин не оказывает. Дополнительный глицерин в реакционной смеси также снижает степень самопроизвольного гидролиза ТГС, тем самым снижая количество ортосиликата но, видимо, этот эффект незначителен при использованных концентрациях.

¹M.C. Reed, A. Lieb, H.F. Nijhout, The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions, Bioessays. 32 (2010) 422–429.

²W.E.G. Müller, A. Boreiko, U. Schloßmacher, X. Wang, M.N. Tahir, W. Tremel, D. Brandt, J.A. Kaandorp, H.C. Schröder, Fractal-related assembly of the axial filament in the demosponge Suberites domuncula: Relevance to biomineralization and the formation of biogenic silica, Biomaterials. 28 (2007) 4501–4511. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.06.030.

Зависимость эффективности реакции от концентрации белка

После определения подходящей концентрации субстрата мы проверили зависимость эффективности реакции от концентрации белка (рис. 13). В первых работах силикатеин использовали в относительно высокой для фермента концентрации 0,06 мг/мл (2,6 мкМ)

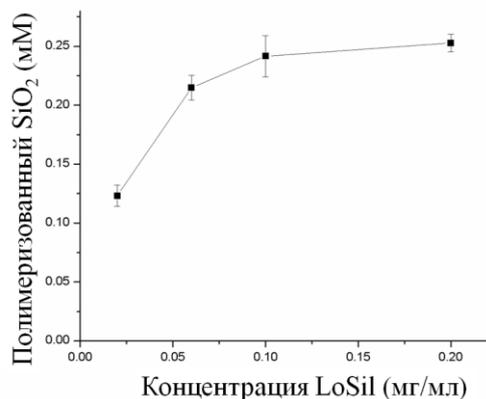


Рисунок 13. Зависимость активности LoSil от концентрации белка. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, концентрация TGC 0,1%, 1ч, 25°C.

Анализ показал, что данная концентрация действительно является оптимальной для проведения анализа при данной концентрации субстрата, поскольку силикатеин демонстрирует максимальную активность.

Зависимость полимеризации кремнезема от pH

Зависимость активности LoSil от pH раствора имела максимум в области 5-5,5, что соответствует области максимальной активности катепсинов¹ (рис. 14).

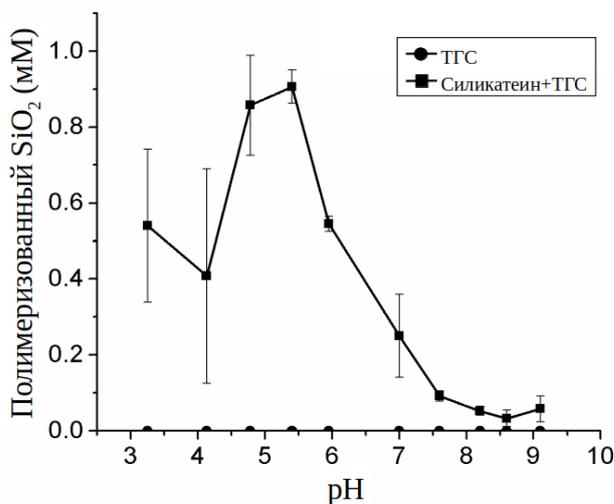


Рисунок 14. Активность LoSil в зависимости от pH раствора. Условия: Концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация TGC 0,1%, 1ч, 25°C.

Изменение pH влияет как на белок, так и на субстрат. В кислой или щелочной среде гидролиз алкоксисиланов происходит более интенсивно², что повышает концентрацию ортосиликата. Однако мы не наблюдали значительного возрастания уровня самопроизвольного гидролиза субстрата. Для силикатеина изменение pH означает изменение заряда гистидина активного центра, а также общего заряда поверхности.

¹V. Turk, V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk, D. Turk, Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers, Biochim. Biophys. Acta. 1824 (2012) 68–88.

²C.C. Egger, M.W. Anderson, G.J.T. Tiddy, J.L. Casci, In situ NMR and XRD studies of the growth mechanism of SBA-1, Phys. Chem. Chem. Phys. 7 (2005) 1845–1855.

Для силикатеина α *T. aurantium* максимум активности наблюдали при pH 10. Исследованные силикатеины не отличаются строением предполагаемого активного центра, но заметно различаются суммарным зарядом белка. Теоретическая pI LoSil составляет 8,4, а силикатеина α — 5. Полученные данные означают, что на активность фермента больше влияет суммарный заряд молекулы, чем протонирование или депротонирование каталитического гистидина. При приближении pH реакционной смеси к изоэлектрической точке силикатеина, образование полимеризованного кремнезема значительно снижалось. Это может быть связано с нарушением образования олигомеров силикатеина, наблюдаемым в предыдущих работах¹ или с частичной денатурацией или агрегацией белка. По результатам этого эксперимента дальнейшие измерения проводили в буфере PBS с pH 5,3.

Зависимость полимеризации кремнезема от температуры

Для определения зависимости эффективности реакции от температуры сначала оценили стабильность белка при разных температурах от 0 до 37°C (рис. 15А). Анализ показал, что инкубация белка в течение часа даже при 37°C не влияет на активность белка.

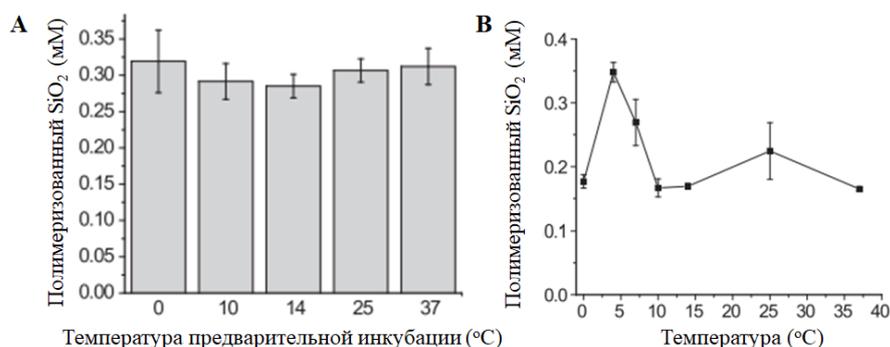


Рисунок 15. А. Количество полимеризованного кремнезема при разной температуре инкубации белка до реакции. PBS pH 5,3, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч. **В.** Активность LoSil в зависимости от температуры. Условия: PBS pH 5,3, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч.

Температурная зависимость активности силикатеина от 0 до 37°C выражена слабо, активность белка в оптимальных условиях увеличивается всего в два раза, наиболее эффективно частицы кремнезема образуются при 4°C (рис. 15В). Вероятно, такая нечувствительность к температуре связана с широким температурным диапазоном, в котором обычно живут губки.

Сравнение субстратов в оптимальных условиях

Предыдущие эксперименты показали, что оптимальными условиями для белка являются: pH 5,0-5,5, 4°C, концентрация белка 0,06 мг/мл, время реакции - 40 мин. Оптимальная концентрация ТГС составляла 0,4%, но для ТГЭОС уже при концентрации 0,2% наблюдали значительный уровень самопроизвольной полимеризации кремнезема, поэтому в качестве рабочей концентрации выбрали 0,1%. Оптимальным временем реакции выбрали 1 час, поскольку для ТГС разница еще не значима, а для заметной активности ТЭОС лучше было увеличить продолжительность реакции. Результаты сравнения всех трех субстратов представлены на рисунке 16.

¹M.M. Murr, D.E. Morse, Fractal intermediates in the self-assembly of silicatein filaments., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 11657–62. doi:10.1073/pnas.0503968102

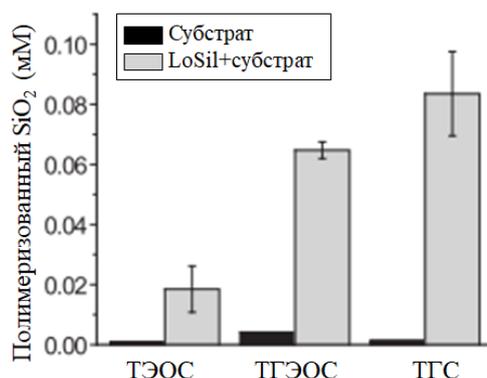


Рисунок 16. Сравнение активности силикатина с ТЭОС, ТГЭОС и ТГС в оптимальных условиях. Условия: PBS pH 5,3, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация субстратов 0,1%, 1 ч, 4°С.

LoSil в четыре раза более активен с ТГС, чем с ТЭОС. Образование частиц кремнезема относительно самопроизвольной полимеризации увеличивается в 24, 16 и 64 раза для ТЭОС, ТГЭОС и ТГС, соответственно.

ТГС оказался хорошо растворимым в воде и наименее токсичным субстратом, с которым силикатин демонстрирует высокую активность за короткое время в мягких условиях. Поэтому ТГС был выбран для последующего анализа мутантных вариантов силикатина.

Анализ активности LoSil и родственных белков

Спикулы губок очень разнообразны по форме, а также механическим и оптическим свойствам. Возможность осуществлять синтез аналогичных материалов в физиологических условиях с самого начала привлекала большое внимание исследователей. И несмотря на определенные успехи в практическом применении силикатеинов, механизм работы фермента до сих пор остается дискуссионным вопросом. Нет однозначных ответов на следующие ключевые вопросы: что является субстратом фермента, какие реакции катализирует фермент, каков механизм катализа? Ответ хотя бы на один из этих вопросов позволит лучше контролировать синтез наноматериалов или получить наноматериалы с новыми свойствами. Поэтому мы решили использовать новый субстрат ТГС, чтобы проверить, как замены в аминокислотных остатках, вовлеченных в полимеризацию кремнезема согласно существующим моделям, повлияют на активность белка.

Выбор позиций для мутагенеза

Было известно, что катепсин L *L.oparinae* (LoCath) демонстрировал силикатеиновую активность с ТГЭОС¹. Мы сравнили способность белков образовывать частицы в присутствии ТГС (рис. 17). Оба белка образовывали частицы аморфного кремнезема, аналогичные по элементному составу. После этого решено было провести мутагенез белков, чтобы определить, какие остатки вовлечены в полимеризацию.

¹D.G. Kamenev, Y.N. Shkryl, G.N. Veremeichik, V.A. Golotin, N.N. Naryshkina, Y.O. Timofeeva, S.N. Kovalchuk, I.V. Semiletova, V.P. Bulgakov, Silicon Crystals Formation Using Silicatein-Like Cathepsin of Marine Sponge *Latrunculia oparinae*, J. Nanosci. Nanotechnol. 15 (2015) 10046–10049.

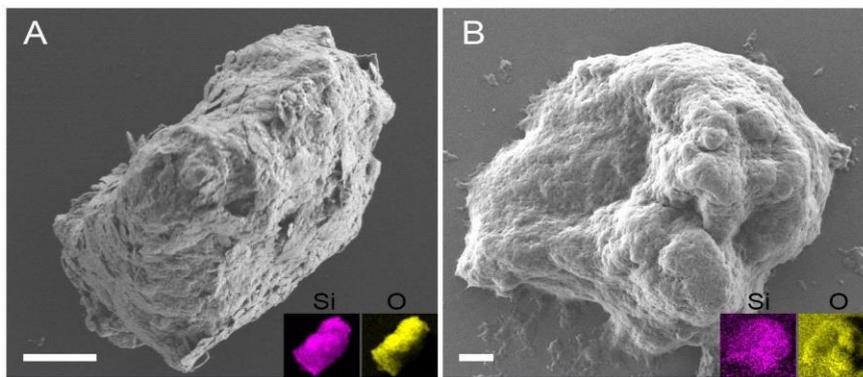


Рисунок 17. Сканирующая электронная микроскопия частиц кремнезема. Показаны репрезентативные частицы, образованные LoSil (A) и LoCath (B) в присутствии ТГС. Во вставках показаны карты рентгено-флуоресцентного анализа. Кремний — пурпурный, кислород — желтый. Масштабная линейка 1 мкм. Условия: Tris-HCl pH 6.8, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 25°C.

Силикатеины обладают высокой гомологией с цистеиновыми протеазами, особенно катепсинами L, в том числе, катепсином L человека (CTSL)¹. Во всех работах, посвященных механизму образования аморфного кремнезема силикатеинами, позиции для мутагенеза выбирали исходя из различий между силикатеинами и CTSL, поскольку, как считалось ранее, катепсин человека не способен полимеризовать кремнезем. В нашей работе мы проанализировали последовательности наиболее изученных силикатеинов *T. aurantium* и *S. domuncula*, катепсина L (LoCath) и силикатеина (LoSil) губки *L. oparinae* и катепсина L человека (рис. 18).

CTSL	1	-APRSVDWREKGYVTPVKNQGGCGSCWAFSATGALEGQMFRTGRLISLSEQNLVD	55
LoCath	1	VCPEEVDWRTKGAVS AVKDDQGRCKSCYAFATTAAL EGMHALATGRLVPLSEQNVID	56
LoSil	1	SYPESVDWRTKGAVTSVKDQSQCGASYAFSAMAAL EGANALATDTLVNLSEQNLID	56
Sil-αS	1	DYPEAVDWRTKGAVTAVKDDQGGCGASYAFSAMAAL EGANALAKGNAVSLSEQNIID	56
Sil-αT	1	AYPETVDWRTKGAVTGIKSQGGCGASYAFSAMAAL EGINALATGKLTYLSEQNIID	56
CTSL	56	CSGPQGGNEGCGNGLMDYAFQYVQDNGGLDSEESYPYEATEESCKYNPKYSVANDTG	111
LoCath	57	CSVPYGNRGCSGGSRMATIMYAVDNGGIDGTSSYPYLGRQYLCKFTEESIATGCTG	112
LoSil	57	CSVPYGNHGCKGGNMLYAFKYVIANEGVDTANSYPFYGKQSSCVYNEKYAAVKISG	112
Sil-αS	57	CSIPYGNHGCHGGNMYDAFLYVIANEGVDQDSAYPFVKGQSSCNYNYSKYKGTSMSSG	112
Sil-α	57	CSVPYGNHGCKGGNMYVAFLYVVANEGVDDGGSYPFVRGKQSSCTYQEQYRGASMSG	112
CTSL	112	FVDIPKQEKALMKAVATVGPISVAIDAGHESFLFYKEGIFYEPDCSSSEDMDHGVL	166
LoCath	113	MVRIKRGKEQDLKKA VAVVGPVTVAVDSRHTSFQFYASGIYSEPCSRKLTHTLI	168
LoSil	113	MVRIISGSESDDLGA VAVVGPVAVAVIDGSSNAFRFYSSGVYDSSRCSSSKLNHAIIV	168
Sil-αS	113	MVSIKSGSESDDLQA AVSNVGPVSVAVIDGANSAFRFYSSGVYDSSRCSSSSLNHAMV	168
Sil-α	113	SVQINSGSESDDLEAA VAVVGPVAVAVIDGESNAFRFYSSGVYDSSRCSSSSLNHAMV	168
CTSL	167	VVGYGFESTESDNNKYWL VKNSWGEWGMGGYVKMAKDRRNHCGIASAASYPTV	220
LoCath	169	IIGYG...SKSGHDYWL LKNSWGTSWGEDGYIMMSRNYANQCGIATKAMYTTI	218
LoSil	169	VTGYG...SYSGKKYWL VKNSWGNWGNVGYIMMARGKYNQCGIASDASYPTL	218
Sil-αS	169	VTGYG...SYNGKKYWL AKNSWGTNWGNSGYVMMARNKYNQCGIATDASYPTL	218
Sil-α	169	ITGYG...ISNNQEYWL AKNSWGENWGEELGYVKMARNKYNQCGIASDASYPTL	218

Рисунок 18. Выравнивание последовательностей силикатеина-альфа *Tethya aurantium* (Sil-αT), силикатеина-альфа *Suberites domuncula* (Sil-αS), силикатеина *All Latrunculia oparinae* (LoSil), катепсина *L. oparinae* (LoCath) и катепсина L человека (CTSL). Позиции, выбранные для мутагенеза, отмечены сверху черными прямоугольниками.

Мы сделали две группы мутантов. В первой группе остатки заменяли на аланин (аланиновое сканирование), чтобы проверить их роль в полимеризации кремния. Мутанты второй группы имели реципрокные замены — остатки, характерные для силикатеинов, заменяли на остатки, характерные для катепсинов, и наоборот.

¹К. Shimizu, J. Cha, G.D. Stucky, D.E. Morse, Silicatein α: Cathepsin L-like protein in sponge biosilica, Proc. Natl. Acad. Sci. 95 (1998) 6234–6238. doi:10.1073/pnas.95.11.6234.

Самым очевидным кандидатом для мутагенеза является первый остаток каталитической триады – Cys25 у CTSL или соответствующий ему Ser25 у силикатеинов. По этому положению были сделаны как аланиновые, так и реципрокные мутанты. По остальным остаткам каталитической триады были сделаны аланиновые мутанты.

В работе, посвященной созданию химерного силикатеина из катепсина человека, мутагенезу также подвергали остатки, фланкирующие каталитический Ser25. Мы тоже обратили внимание на эти остатки и сделали для них реципрокные замены. Согласно кристаллической структуре химерного силикатеина, в связывании субстрата участвует также остаток Glu19. Мы сделали аланиновых мутантов по этому положению. Кроме того, у LoSil и LoCath сильно различаются остатки, предшествующие каталитическому серину/цистеину, – GAS у силикатеина и KSC у катепсина. Мы сделали реципрокные замены этих участков (рис. 18).

Анализ мутантов LoSil и LoCath

Зрелый LoCath состоит из 218 аминокислотных остатков и имеет массу 23,6 кДа. Анализ активности проводили в условиях, определенных как оптимальные для LoSil, поскольку последовательность LoCath на 57% идентична LoSil, и у них близкое значение pI (8,4 для LoSil и 8,7 для LoCath). Все мутантные варианты одного белка выделяли параллельно и анализировали одновременно. Чистоту белковых препаратов определяли по электрофорезу. (рис. 19).

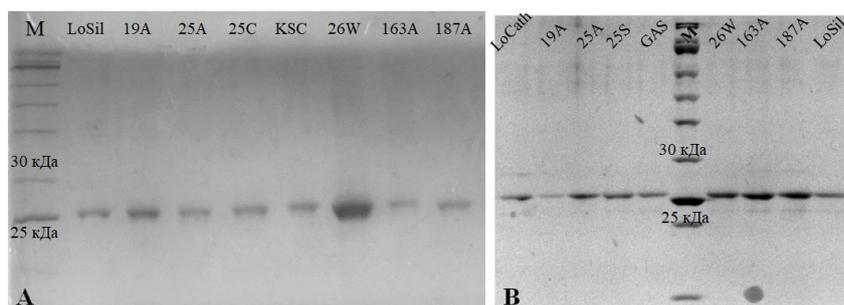


Рисунок 19. А. Электрофорез LoSil и его мутантов. В. Электрофорез LoCath и его мутантов.

Результаты анализа активности мутантов представлены на рисунке 20. Активность белков нормирована на LoSil дикого типа.

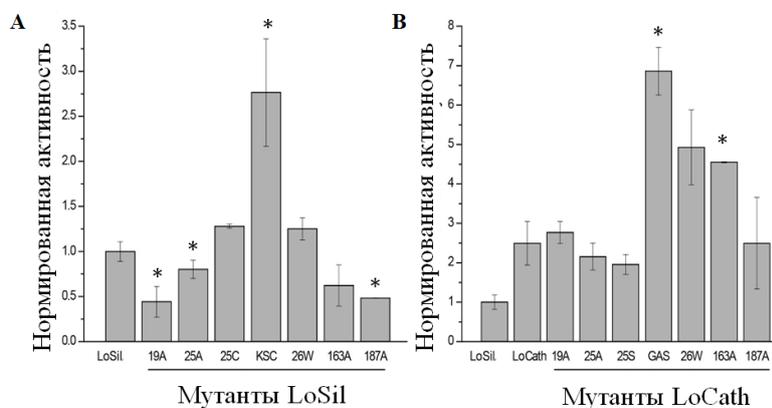


Рисунок 20. Силикатеиновая активность белков *L. oryzae* и их мутантов, нормированная на LoSil дикого типа. А. Мутанты LoSil (абсолютное количество кремнезема, полимеризованного LoSil, составило 0,03 mM). В. Мутанты LoCath (абсолютное количество кремнезема, полимеризованного LoSil составило 0,06 mM). * $p < 0,05$, мутантные формы белков сравнивали с соответствующим белком дикого типа. Условия: PBS pH 5,3, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 0°C.

Все анализируемые белки проявляли силикатеиновую активность. Среди мутантов LoSil аланиновые мутанты по остаткам активного центра продемонстрировали сниженную активность, а вариант LoSil-KSC оказался в 3 раза активнее исходного LoSil. LoCath оказался активнее LoSil дикого типа. Все мутанты LoCath проявляли активность, сопоставимую с белком дикого типа, а мутанты LoCath-26W, LoCath-163A, и LoCath-GAS оказались значительно активнее белка дикого типа. Мутант LoCath-GAS был в 7 раз активнее LoSil.

Эти неожиданные результаты показывают, что при использовании ТГС в качестве субстрата нет существенной разницы между силикатеином и катепсином L *L. oparinae*. Таким образом, не имеет значения, какая аминокислота находится в активном центре белка. Мы предположили, что в таком случае и катепсин L человека (CTSL) может проявлять подобную активность.

Анализ силикатеиновой активности катепсина L человека

Зрелый CTSL состоит из 219 аминокислотных остатков и имеет массу 24 кДа. Сначала мы исследовали смесь CTSL и ТГС с помощью сканирующей электронной микроскопии. Образец готовили в тех же условиях, что и частицы, образованные силикатеином, за исключением буферного раствора. Так как изоэлектрическая точка CTSL составляет 4,84, реакцию проводили в Tris-HCl pH 6,8. В результате были обнаружены частицы аморфного кремнезема. Состав частиц подтвердили с помощью элементного анализа (рис. 22А).

Затем активность катепсина оценили количественно. Кроме белка дикого типа, были также получены мутанты. Первая группа мутантов включала аланиновых мутантов по активному центру белка.

Другую группу мутантов сделали на основе работы, посвященной созданию химерного силикатеина из катепсина L человека¹. В этой работе заметную силикатеиновую активность проявлял белок с заменой каталитического цистеина и фланкирующих аминокислот на серин и соответствующие фланкирующие аминокислоты силикатеина. Мы сделали точечных мутантов по этим остаткам (24A, 25S, 26Y), двойных мутантов (AS, SY) и тройного мутанта ASY.

Белки выделяли одновременно с контрольным LoSil и анализировали параллельно (рис. 21). Белки анализировали и в PBS pH 5,3 и в Tris-HCl pH 6.8 (рис. 23).

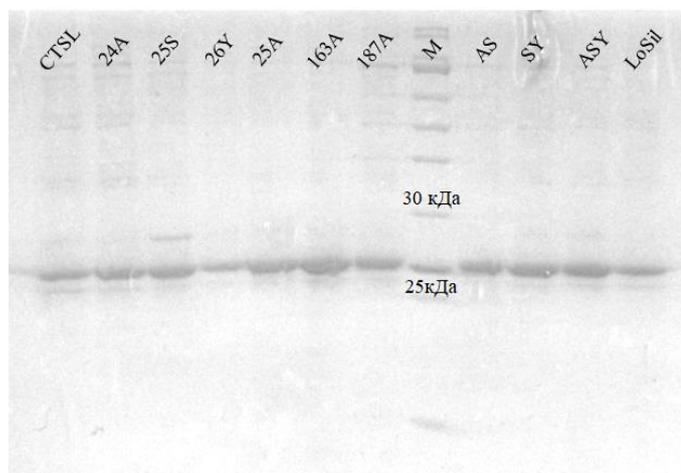


Рисунок 21. Электрофорез CTSL и его мутантов.

¹Fairhead M, Johnson KA, Kowatz T, et al. Crystal structure and silica condensing activities of silicatein alpha-cathepsin L chimeras. *Chem Commun (Camb)*. 2008;(15):1765-1767.

Все проанализированные белки продемонстрировали силикатеиновую активность, включая аланиновые мутанты по остаткам активного центра. Частицы, образованные мутантами 25A и 163A, изучили также с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 22B,C). Морфология частиц не отличалась от частиц, образованных CTSL дикого типа или силикатеином.

В качестве дополнительного контроля в количественном анализе активности мутантов выбрали бычий сывороточный альбумин (BSA) и mKate-His-tag (флуоресцентный белок mKate с 6 остатками гистидина на N-конце). BSA продемонстрировал незначительную активность, которую считают фоновой для любых богатых лизином белков¹. Активность mKate-His-tag была ниже предела чувствительности метода.

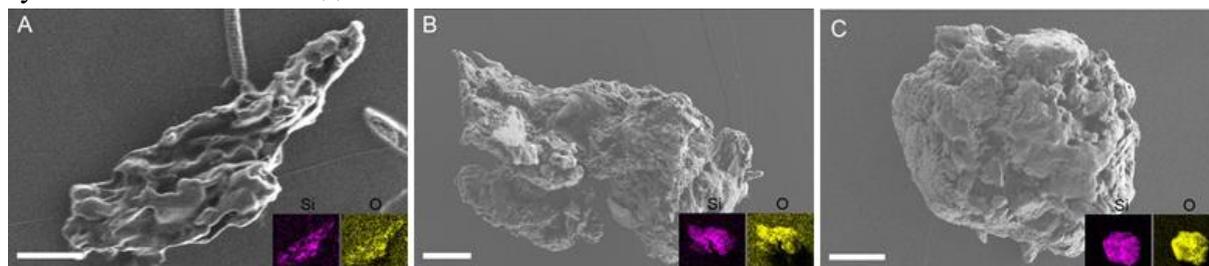


Рисунок 22. Сканирующая электронная микроскопия частиц кремнезема. Показаны репрезентативные частицы, образованные А-CTSL, В-CTSL-25А и С-CTSL-163А в присутствии ТГС. Во вставках показаны карты рентгено-флуоресцентного анализа. Кремний - пурпурный, кислород - желтый. Масштабная линейка 2 мкм.

Активность CTSL и его мутантов в PBS pH 5,3 (рис. 23А) была сопоставима с активностью LoSil, а мутанты CTSL-187А и CTSL-25S продемонстрировали даже более высокую активность. При анализе в Tris-HCl pH 6.8 (рис. 23В) CTSL был менее активен, чем LoSil, но все мутанты, кроме CTSL-25А и CTSL-AS, были активнее, чем CTSL дикого типа. Активность BSA относительно LoSil при нейтральном pH была выше, вероятно, это связано с более выраженным зарядом молекул BSA в данных условиях.

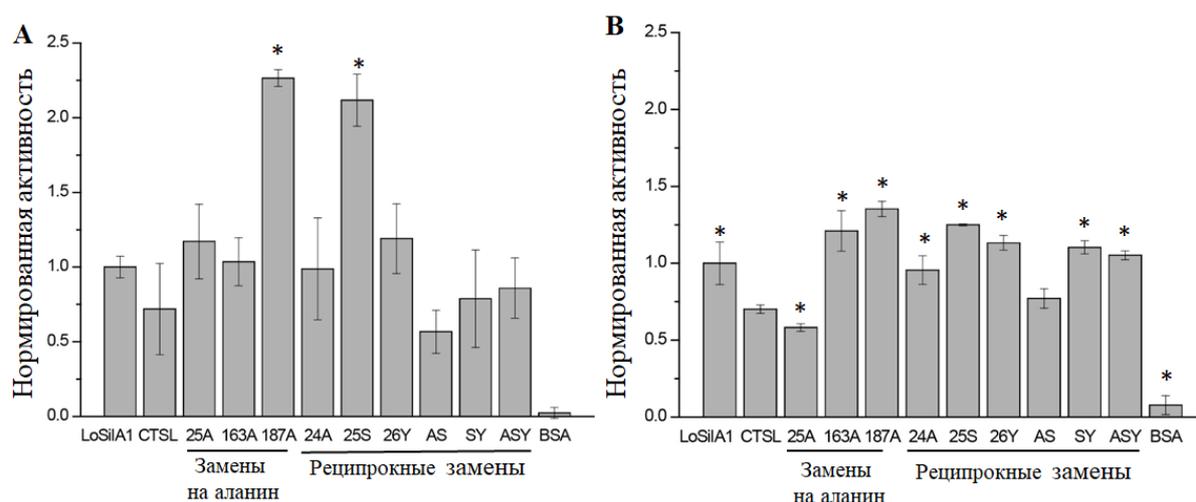


Рисунок 23. Силикатеиновая активность катепсина L человека и его мутантов, нормализованная на активность LoSil дикого типа в А PBS pH 5,3 при 0°C и В Tris-HCl pH 6.8 при комнатной температуре. Абсолютное количество кремнезема, полимеризованного LoSil, составило 0,2 мМ и 0,1 мМ в PBS и Tris-HCl, соответственно. * $p < 0,05$, мутантные формы белков сравнивали с соответствующим белком дикого типа. Условия: Концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 0°C.

¹D.G. Kamenev, Y.N. Shkryl, G.N. Veremeichik, V.A. Golotin, N.N. Naryshkina, Y.O. Timofeeva, S.N. Kovalchuk, I. V. Semiletova, V.P. Bulgakov, Silicon Crystals Formation Using Silicatein-Like Cathepsin of Marine Sponge <i>Latrunculia oparinae</i>, J. Nanosci. Nanotechnol. 15 (2015) 10046–10049. doi:10.1166/jnn.2015.11627.

Важным свойством нашей системы является то, что гидролиз ТГС и полимеризация ортосиликата могут происходить как самопроизвольно, так и при участии белка. И даже если белок лишен гидролитической активности, способность полимеризовать кремнезем может сохраниться, если она осуществляется с помощью других аминокислотных остатков.

Ранее в аналогичных исследованиях использовали ТЭОС, очень слабо гидролизуемый субстрат^{1,2}. Поэтому при отсутствии гидролитической активности (при замене каталитического серина на аланин) для полимеризации заметного количества кремнезема продуктов самопроизвольного гидролиза могло не хватить. Следует отметить, что авторы наблюдали остаточную активность таких мутантов (10% от активности белка дикого типа), но связывали ее с неспецифическим катализом^{1,2}.

Наблюдаемая нами нечувствительность силикатеинов и катепсинов к мутациям может объясняться тем, что катализ полимеризации кремнезема осуществляется не с помощью аминокислотных остатков активного центра. Например, катализ может осуществляться поверхностью белка, за счет взаимодействия полярных и заряженных остатков с молекулами ортосиликата (рис. 24А).

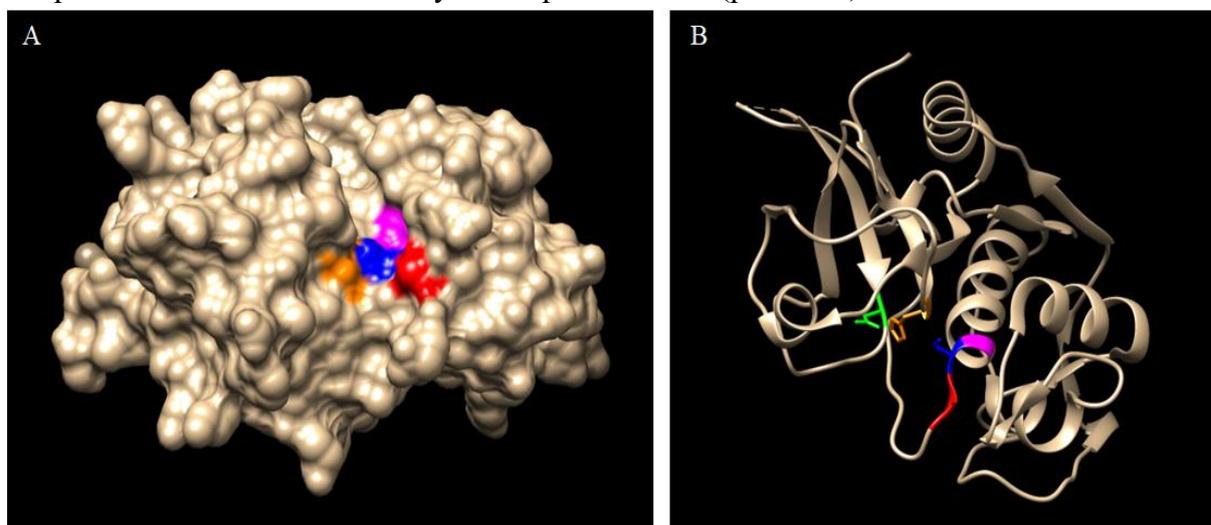


Рисунок 24. Структура химерного силикатеина PDB_ID 2VHS. А. Поверхность белка. В. Третичная структура белка. Остатки, подвергнутые мутагенезу, отмечены цветами: Gly23 и Ala24 - красный, Ser25 - синий, Tyr26 - пурпурный, His163 - оранжевый, Asn187 - зеленый.

Однако сделанные мутации совсем не всегда изменяли заряд белка, и не все мутированные остатки находятся на поверхности. Кроме того, если бы катализ действительно зависел только от заряда поверхности, можно было бы ожидать более однозначных эффектов от замены заряженных остатков. В нашей же системе и добавление остатка лизина LoSil, и удаление лизина из LoCath привело к увеличению активности.

Мутации также могут влиять на олигомеризацию силикатеина. Однако олигомеризация, предположительно, осуществляется за счет взаимодействия гидрофобных остатков на поверхности белка³, проанализированные же мутации затрагивают область активного центра (рис. 24А).

¹Y. Zhou, K. Shimizu, J.N. Cha, G.D. Stucky, D.E. Morse, Efficient Catalysis of Polysiloxane Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 38 (1999) 779–782.

²S.Y.T. Dakhili, S.A. Caslin, A.S. Faponle, P. Quayle, S.P. de Visser, L.S. Wong, Recombinant silicateins as model biocatalysts in organosiloxane chemistry, *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 114 (2017) E5285–E5291.

³M.M. Murr, D.E. Morse, Fractal intermediates in the self-assembly of silicatein filaments., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 11657–62. doi:10.1073/pnas.0503968102.

Мы считаем, что незначительный эффект от точечных мутаций и заметный эффект тройной замены связан со структурными переходами в белке. В работе Patwardhan et al. было показано, что химерный силикатеин при взаимодействии со слоем кремнезема теряет альфа-спиральные участки, переходя в структурный интермедиат, образованный только бета-слоями¹. И в работе на химерном силикатеине, и в нашей работе наибольшие изменения в активности белка связаны с остатками 23-25, которые находятся в начале альфа-спирали (рис. 24В), то есть в участке, который претерпевает значительные изменения при взаимодействии с кремнеземом. Введенные замены могут дестабилизировать спираль, облегчая переход в структурный интермедиат, или введенные остатки могут способствовать стабилизации интермедиата.

Мы проверили, какой эффект введенные мутации оказывают на вторичную структуру белка. Для этого мы сняли спектры кругового дихроизма белков дикого типа, их тройных мутантов и точечного мутанта CTSL-25S (рис. 25). Эксперименты проводили совместно с лабораторией искусственного антителогенеза ФНКЦ ФХМ. В таблице 1 приведен деконволюционный анализ полученных спектров.

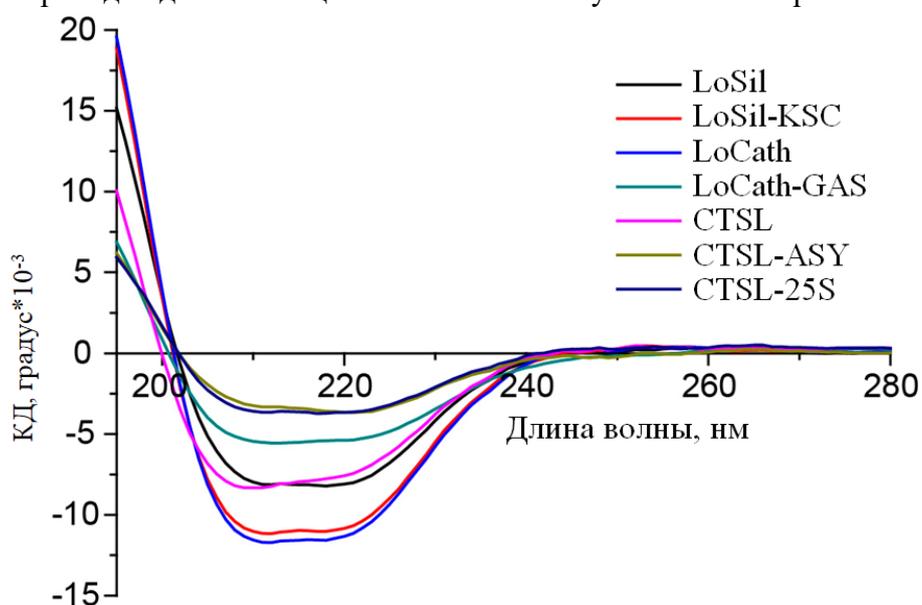


Рисунок 25. Спектры кругового дихроизма белков (в области ближнего УФ). Условия: концентрация белков 0,08 мг/мл, 0,1М PBS pH 5,5, 20°C.

На рисунке видно, что мутации значительно изменили вторичную структуру белков. Реципрокные мутации между силикатеином и катепсином L *L. oparinae* оказали реципрокный эффект на вторичную структуру. LoCat имеет одинаковое содержание α -спиралей с LoSil-KSC, а вторичная структура LoSil больше схожа с LoCat-GAS. Оба исследованных мутанта CTSL значительно отличаются по вторичной структуре от CTSL дикого типа. Анализ вторичной структуры CTSL дикого типа согласуется с данными литературы².

¹S.V Patwardhan, S.A. Holt, S.M. Kelly, M. Kreiner, C.C. Perry, C.F. van der Walle, Silica Condensation by a Silicatein α Homologue Involves Surface-Induced Transition to a Stable Structural Intermediate Forming a Saturated Monolayer., *Biomacromolecules*. 11 (2010) 3126–35. doi:10.1021/bm100932e.

²Turk, B., Dolenc, I., Lenarčič, B., Križaj, I., Turk, V., Bieth, J. G. and Björk, I. (1999), Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *European Journal of Biochemistry*, 259: 926-932. doi:10.1046/j.1432-1327.1999.00145.x

Таблица 1. Содержание элементов вторичной структуры в белках LoSil, LoSil-KSC, LoCath, LoCath-GAS, CTSL, CTSL-ASY, CTSL-25S. Данные получены в результате деконволюционного анализа, указаны стандартные отклонения.

Элементы вторичной структуры	Белки						
	LoSil	LoSil-KSC	LoCath	LoCath-GAS	CTSL	CTSL-ASY	CTSL-25S
α -спирали(%)	77 \pm 4	86 \pm 2	87 \pm 2	52 \pm 3	63 \pm 6	31 \pm 1	33 \pm 1
Всего β -слоев (%)	3 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 1	10 \pm 1	8 \pm 1	18 \pm 1	18 \pm 1
β -повороты(%)	11 \pm 1	8 \pm 1	8 \pm 1	14 \pm 1	14 \pm 1	17 \pm 1	17 \pm 1
Петли (%)	9 \pm 1	4 \pm 1	4 \pm 1	23 \pm 1	16 \pm 1	33 \pm 1	32 \pm 1

Интересно, что оба тройных мутанта белков губок превосходят соответствующие белки дикого типа в способности катализировать конденсацию кремнезема. Получается, что и приобретение, и утрата дополнительных α -спиральных участков могут увеличивать силикатеиновую активность белков. Но в любом случае значительное изменение вторичной структуры связано с сильными изменениями в трехмерной структуре белка. Соответственно, такие изменения затрагивают и поверхность белка, на которой может осуществляться конденсация кремнезема, и расположение неких активных остатков, если таковые существуют.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что остатки каталитической триады не являются необходимыми для полимеризации кремнезема. Для выяснения механизма полимеризации кремнезема белками губок, а также для определения границ между двумя классами белков - силикатеинами и катепсинами, требуются дальнейшие исследования.

Выводы

1. Предложены два новых водорастворимых субстрата для силикатеинов-тетракис(гидроксиэтил) ортосиликат и тетраглицерол ортосиликат; показано, что силикатеин A1 полимеризует кремнезем значительно более активно при взаимодействии с предложенными субстратами, по сравнению с классическим субстратом - тетраэтил ортосиликатом.
2. В модели культур клеток млекопитающих тетраглицерол ортосиликат проявляет приблизительно в десять раз меньшую токсичность, чем другие субстраты силикатеинов.
3. Получены точечные мутантные варианты силикатеина и катепсина губки *Latrunculia oparinae*, кремнезем-полимеризующая активность которых многократно превосходит таковую силикатеина дикого типа.
4. Впервые продемонстрирован катализ полимеризации кремнезема катепсином L человека.
5. Показано, что аминокислотные остатки каталитической триады катепсина и соответствующих остатков силикатеина не являются необходимыми для полимеризации кремнезема.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Н.В. Поварова**, М.С. Баранов, С.Н. Ковальчук, И.В. Семилетова, К.А. Лукьянов, В.Б. Кожемяко. Новый водорастворимый субстрат для силикатеинов. **Биоорганическая химия** 2015, 41, 380–382. doi:10.7868/S0132342315030070
2. **Povarova N.V.**, Markina N.M., Baranov M.S., Barinov N.A., Klinov D.V., Kozhemyako V.B., Lukyanov K.A. A water-soluble precursor for efficient silica polymerization by silicateins. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 2018, 495, 2066-2070. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.12.075.
3. **Povarova N.V.**, Barinov N.A., Baranov M.S., Markina N.M., Varizhuk A.M., Pozmogova G.E., Klinov D.V., Kozhemyako V.B., Lukyanov K.A. Efficient silica synthesis from tetra(glycerol)orthosilicate with cathepsin- and silicatein-like proteins. **Scientific Reports** 2018, 8:16759. doi: 10.1038/s41598-018-34965-9.

Тезисы

1. Новые кремнийорганические субстраты для силикатеинов. **Н.В. Поварова**, К.А. Лукьянов, В.Б. Кожемяко. Материалы Международной конференции, посвящённая 55-летию ИБХ РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова, 15-19 сентября 2014 года, Москва, Россия.
2. Novel water-soluble silica precursor for silicateins. **Natalia V Povarova**, Mikhail S Baranov, Valery B Kozhemyako and Konstantin A Lukyanov. Biochem Congress 2016, December 08-09, 2016, San-Antonio, Texas, USA. Biochem Anal Biochem, Volume 5 Issue 5(Suppl), p.44

Для заметок