

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Алтайский государственный университет»
Институт биологии и биотехнологии
Кафедра экологии, биохимии и биотехнологии

**ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ РЕКОМБИНАНТНОЙ
ФОСФОЛИПАЗЫ С**

выпускная квалификационная работа
(бакалаврская работа)

Выполнил: студент
4 курса, группы 781
Черданцев Даниил Витальевич

Научный руководитель:
канд.биол. наук, доцент
Шарлаева Елена Анатольевна

Допустить к защите:
зав. кафедрой Соколова Г.Г.

Выпускная квалификационная
работа защищена

Оценка _____

Председатель ГЭК
Мочалова О.В.

Барнаул 2022

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БСА – бычий сывороточный альбумин
ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
ПААГ – полиакриламидный гель
DAG – диацилглицерин
DHAP – дигидроксиацетонфосфат
GPCR – G-белок-связанного рецептора
IP3 – инозитолтрифосфат
PH – домен плекстрина
PIP2 – гидролизуетфосфатидилинозитол
PLA – фосфолипаза A
PLC – фосфолипаза C
PLD – фосфолипаза D
S1P – сфингозин-1-фосфат
TIM – триозофосфатизомераз

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ С ФОСФОЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ	5
1.1. Номенклатура и разнообразие фосфолипаз.....	5
1.2. Структура, свойства и механизм действия фосфолипазы С.....	13
1.3. Области применения фосфолипазы С	17
1.4. Получение рекомбинантных ферментов фосфолипазы С	19
1.5. Очистка белков методом Ni-аффинной хроматографии	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1. Материалы исследования	23
2.2. Методы исследования.....	23
ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С В СИСТЕМЕ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	29
3.1. Нарботка целевого белка в системе <i>B. subtilis</i> и его очистка	24
3.2. Оценка содержания фосфолипазы С	45
ВЫВОДЫ.....	49
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	50

ВВЕДЕНИЕ

Белки – одна из четырех основных макромолекул, управляющих жизнью. Множество биохимических реакций осуществляются только при наличии белков. Они ответственны не только за проведение химических реакций нашего организма, но также являются его основной структурой. У данных веществ имеется множество функций, которые зависят от их уникального строения.

Для решения многих фундаментальных и прикладных задач в современной биологии необходимо знание структуры белков, физических, химических свойств, а также их комплексов с другими белками, нуклеиновыми кислотами и липидами. Как правило, для этих целей необходим «чистый» белок, с ненарушенной структурой, проявляющий свои биологические свойства. Для этого используются различные методы выделения и очистки белков из различных систем, основанные на физико-химических свойствах этих веществ. К таким методам можно отнести: гомогенизацию, осаждение белков центрифугированием, хроматографией, электрофорезом, диализом и т.д. Для получения очищенных белковых препаратов с необходимыми свойствами важно правильно подобрать метод очистки, условия его использования и т.д (Березов, 1998).

Фосфолипазы – ферменты, катализирующие гидролитическое расщепление связей в фосфолипидах. Они обнаружены почти у всех организмов. Наибольший интерес вызывают фосфолипазы микробного происхождения. Популярность бактериальных ферментов обусловлена их огромным разнообразием и технологическими свойствами: высокой удельной активностью, термостабильностью, широкой субстратной специфичностью. Получение рекомбинантных бактериальных фосфолипаз и их совершенствование остаются актуальными задачами, для решения

которых необходимы углубление и систематизация знаний о ферментах данной группы (Данилова, 2020).

Актуальность данной работы заключается в получении микробной качественной фосфолипазы С, которая будет иметь выше описанные свойства, и которую можно использовать в различных сферах деятельности человека.

Цель настоящей работы – получение рекомбинантной фосфолипазы С в системе *B. subtilis*.

Основные задачи:

1. Нарботать целевой белок в системе *B. subtilis*, трансформированной плазмидами рНТ255-PLC-6His и рBsu-PLC-6His.
2. Получить препараты фосфолипазы С, очищенные с использованием Ni-аффинной хроматографии.
3. Оценить содержание целевого белка в полученных препаратах.

ГЛАВА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ С ФОСФОЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

1.1. Номенклатура и разнообразие фосфолипаз

Фосфолипазы – ферменты класса гидролаз, участвующие в метаболизме фосфолипидов, действуя на поверхности раздела “липид–вода”, фосфолипазы выступают биокатализаторами межфазного катализа (Aloulou, 2012).

Существует 4 основные семейства фосфолипаз: А, В, С и D, каждое из которых гидролизует определенную связь в фосфолипиде. Широкая представленность фосфолипаз в живых организмах обусловлена, прежде всего, важностью функции фосфолипаз, а именно поддержании и регулировании липидов мембран, мембранного состава, передачи сигнала, пищеварении, регуляции воспалительного процесса. По мере развития технологий, возрастает значение фосфолипаз в таких сферах как: медицина и химия, пищевая промышленность, а также агропромышленность.

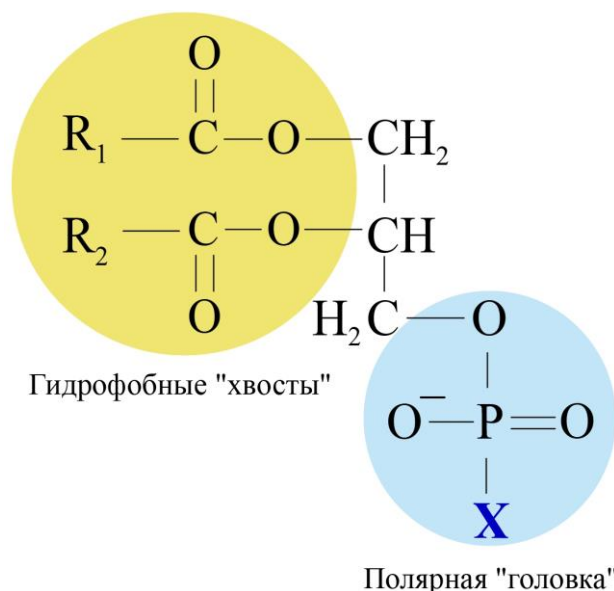


Рис. 1. Общее строение фосфолипидов (Меркульева, 2021)

Примечание: заместители R1 и R2 – остатки жирных кислот, X – головная группа: холин, этаноламин, глицерол, инозитол или серин

Фосфолипазы классифицируют в зависимости от сайта расщепления связи в молекуле фосфолипида. Фосфолипазы A1 (PLA1) и A2 (PLA2) гидролизует sn-1 или sn-2 ацильную цепь с высвобождением свободной жирной кислоты и 1-или 2-ацил-лизофосфолипида, соответственно. В случае отщепления обеих жирных кислот говорят о фосфолипазе B (PLB). Фосфолипазы C – это фосфодиэстеразы, которые расщепляют глицерофосфатную связь с образованием диацилглицерина и фосфат-содержащей полярной группы. Фосфолипазы D (PLD) гидролизуют связь между фосфатной и спиртовой группой, в результате этой реакции высвобождаются фосфатидная кислота и спирт (Брокерхофф, 1978).

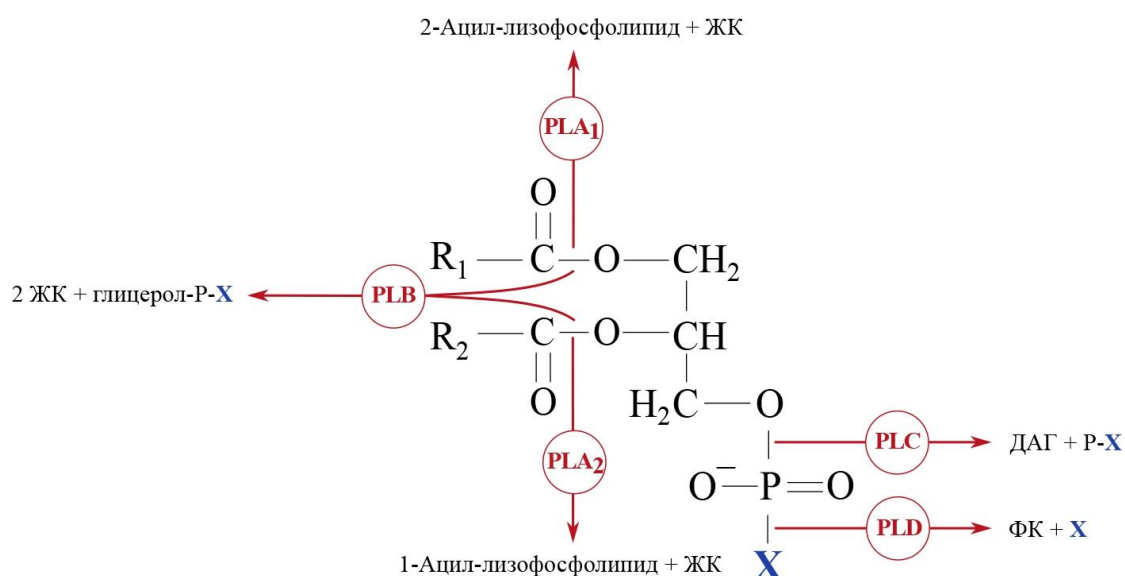


Рис. 2. Реакции, катализируемые фосфолипазами:

ЖК – жирная кислота, ФК – фосфатидная кислота, ДАГ – диацилглицерол, X – головная группа, P-X – фосфорилированная головная группа (Меркульева, 2021)

Фосфолипаза A1 была обнаружена путем измерения гидролиза фосфатидилхолина до лизофосфатидилхолина. Фосфолипазы A1 делятся на

две группы в зависимости от места их локализации: внеклеточные и внутриклеточные фосфолипазы. Общей структурной особенностью внутриклеточных ферментов является консенсусная последовательность липазы, Gly–X–Ser–X–Gly, где X – любая аминокислота (Филькин, 2020).

Внеклеточные ферменты относятся к так называемому «семейству генов липазы поджелудочной железы» и характеризуются наличием нескольких консервативных мотивов, включая консенсусную последовательность липазы, каталитическую триаду Ser–Asp–His, цистеиновые аминокислоты, ответственные за образование дисульфидных связей, и липид-связывающие поверхностные петли. Липид-связывающие поверхностные петли влияют на субстратную специфичность ферментов, ограничивая доступ к каталитическому сайту.

Фосфолипазы A1 выполняют различные биологические функции. Например, внутриклеточный PA-PLA1 участвует в сперматогенезе, KIAA0725p помогает осуществлять везикулярный транспорт от аппарата Гольджи к плазматической мембране клетки, а внеклеточная PS-PLA1 регулирует уровни фосфотидилсерина, участвующего в процессах свертывания крови, апоптоза и активации протеинкиназы C (Richmond, 2011).

Фосфолипазы B впервые были выделены из растений, а также микроорганизмов, яда пчел, и различных тканей млекопитающих. Ферменты этой группы неспецифичны, катализируют гидролиз различных сложноэфирных связей и обладают литическим действием по отношению к биологическим мембранам, в связи с этим и обуславливается их токсичность. Фосфолипазы B не имеют коферментов, также некоторые из них возможно ингибировать при помощи диизопропилфторфосфата (Woolley, 1996).

Фосфолипаза C расщепляет глицерофосфатную связь фосфолипидов. Они катализируют гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата в мембране с образованием вторичных сигнальных молекул диацилглицерина

и 1,4,5-трифосфата. Диацилглицерин и 1,4,5-трифосфат инициируют дальнейшие пути передачи сигнала через активацию протеинкиназы C и внутриклеточного Ca^{2+} (Соссо, 2015).

Члены семейства фосфолипазы C имеют несколько консервативных участков. Структурные области, ответственные за каталитическую активность, состоят из поочередно чередующихся α -спиралей и β -листов, в то время домен активного центра, связывающего ионы Ca^{2+} , представляет собой мотив спираль-поворот-спираль. Изоформы фосфолипазы C вовлечены во множество различных физиологических ролей в различных тканях, включая рост, дифференцировку клеток и экспрессию генов. Фосфолипазы C обнаружены у бактерий родов *Clostridium*, *Bacillus* и *Pseudomonas*, а также в клетках тканей млекопитающих (печень, мозг, поджелудочная железа) (Филькин, 2020).

Фосфолипаза C, гидролизуя фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой, относится к фосфодиэстеразам, также, как и фосфолипаза D. Фосфолипаза C является ключевым ферментом метаболизма фосфатидилинозитола и липидных сигнальных путей. Она активируется $\text{G}\alpha_q$ или $\text{G}\beta\gamma$ субъединицами G-белка. Таким образом, данный фермент является частью G-белок-связанного рецептора (GPCR) и соответствующего сигнального пути. Кроме того, фосфолипаза C гидролизует фосфатидилинозитол (PIP₂) на два вторичных медиатора – инозитолтрифосфат (IP₃) и диацилглицерин (DAG). Эти медиаторы вовлечены в сигнальные пути активации кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума и протеинкиназы C (Gresset, 2012).

Ферменты фосфолипазы D (PLD) играют важную роль в клетках: они поддерживают целостность клеточных мембран и участвуют в передаче сигналов, миграции и пролиферации клеток. Роль фосфолипаз D заключается в высвобождении фосфатидной кислоты, обладающей уникальной мембрано-связывающей функцией и во взаимодействии с различными молекулами,

например, белком синдрома Вискотта-Олдрича (WASp) или киназами, благодаря чему происходит их активация (Gomez-Cambronero, 2014). Кроме того, существуют исследования, в которых предполагается роль данной фосфолипазы в процессе канцерогенеза и развитии рака (Cho, 2017).

Активная фосфолипаза D была обнаружена у вирусов, бактерий, а также в тканях растений и животных. Фосфолипазы данного семейства и продукты их каталитической активности вовлечены в регулирование различные клеточные процессы, включая воспаление, контроль транспорта внутриклеточной мембраны, нейронную и сердечную стимуляцию, миграцию клеток и химиорезистентность. Фосфолипаза D проявляет, прежде всего, гидролитическую активность, в результате которой идёт расщепление сложноэфирной связи между остатком фосфатидной кислоты и спирта в молекулах фосфолипидов. При этом спирт замещается на водород, но также возможен перенос остатка фосфатидной кислоты на иные различные гидроксилсодержащие акцепторы, что представляет большой интерес для биотехнологии, так как трансфосфотидилирующая активность фосфолипазы D может быть использована для синтеза различных лекарственных препаратов или редких фосфолипидов, например, фосфатидилглицерина и фосфатидилсерина (Nakazawa, 2012).

1.2. Структура, свойства и механизм действия фосфолипазы C

Фосфолипазы C (PLC) представляют собой растворимые многодоменные белки с молекулярной массой от 85 до 150 кДа. Существует тринадцать различных членов семейства фосфолипазы C, которые можно разделить на шесть классов: β , γ , δ , ϵ , η и ζ . Различные изоформы были обнаружены у широкого спектра видов, включая мышей, крыс и у крупного рогатого скота. У млекопитающих были описаны четыре β -, две γ -, четыре δ -изоформы и многочисленные сплайсированные варианты (Ellis, 1998).

Тэфсофолипазы, которые содержатся в дрожжах, слизистых плеснях, нитевидных грибах и растениях, очень напоминают бактериальные фосфолипазы. Также фосфолипазно-подобные изоферменты были обнаружены у *Drosophila melanogaster*, *Glycinemax* (соя), *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* (Gresset, 2012).

В целом, между членами семейства наблюдается низкий уровень сохранности аминокислот; однако сродство доменов плекстрина, доменов Х и Y, а также домена С2, превышает 40-50%. Поскольку эти домены являются общими для всех организмов, они обуславливают минимальные требования для функционирования фосфолипазы (Bill, 2020).

Как уже упоминалось, все члены семейства фосфолипазы имеют N-концевые гомологичные домены плекстрина (РН), которые состоят примерно из 120 аминокислот и являются одиннадцатым наиболее распространенным доменом в геноме человека. Домены РН встречаются в большом количестве в различных семействах белков, которые участвуют в передаче сигнала. Домены РН могут опосредованно привлекать к себе всё семейство фосфолипаз к плазматической мембране при помощи фосфоинозитидов. Компьютерное моделирование и кристаллические структуры домена РН, обнаружены в белках, которые совместно активируют белки адгезии, и показали, что домены РН состоят из 7 бета-листов и альфа-спирали, и что бета-листы связываются с PIP2 сайтом (Bill, 2020).

Фосфолипаза С β содержит 2 домена РН, один на N-конце, а другой на С-конце. Этот домен РН PLC γ уникален, поскольку он разделен между двумя tandemными гомологичными доменами Src. Было обнаружено, что карбокси-концевая область домена РН у PLC β 2 и PLC β 3 контролирует связывание гетеротримерных $\beta\gamma$ -субъединиц G-белка с PLC после активации рецепторов, связанных с G-белком. Связывание G $\beta\gamma$ с доменом РН и связывание G $\beta\gamma$ с Ga являются взаимоисключающими. Следовательно, эта конкуренция за

связывание с $G\beta\gamma$ подразумевает активацию PLC для предотвращения регенерации гетеротримерных G-белков $G\alpha/G\beta\gamma$ (Gresset, 2012).

Таким образом, активация PLC может регулировать передачу сигналов белков, которые включается в ответ на стимуляцию рецепторов, связанных с G-белком. В целом, можно сделать вывод, что домены PH выполняют несколько ролей в регулировании передачи сигналов через PLC.

EF-hand представляют собой спираль-петлю-спираль, присутствующую в ряде белков, связывающих кальций, таких как миозин, кальмодулин, кальретикулин и тропонин. EF-рука были впервые описаны для PLC, когда анализ кристаллической структуры PLC δ 1 выявил характерные её черты. В PLC EF-hand является частью каталитического ядра, которое состоит из самой EF-hand, доменов X и Y и C2. При связывании с Ca^{2+} структура PLC стабилизируется, поскольку EF-hand претерпевает конформационные изменения для активации функций, регулируемых кальцием, путем экспонирования сайтов, которые становятся лигандами для других белков.

Фосфолипазы C расщепляют глицерофосфатную связь фосфолипидов. Они катализируют гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата в мембране с образованием вторичных сигнальных молекул диацилглицерина и 1,4,5-трифосфата. Диацилглицерин и 1,4,5-трифосфат инициируют дальнейшие пути передачи сигнала через активацию протеинкиназы C и внутриклеточного Ca^{2+} (Pokotylo, 2013). Члены семейства фосфолипазы C имеют несколько консервативных участков. Структурные области, ответственные за каталитическую активность, состоят из чередующихся α -спиралей и β -листов, тогда как домен активного центра, связывающего ионы Ca^{2+} , представляет собой мотив спираль-поворот-спираль.

Пока что, были кристаллизованы и проанализированы структуры только PLC δ 1 и PLC β 2. Домены X и Y состоят примерно из 300 аминокислот и лежат на C-конце EF-hand. Эти домены состоят из чередующихся α -спиралей и β -листов, которые образуют $\alpha\beta\alpha\beta$ бочкообразную структуру

триозофосфатизомеразы (TIM). X-область, содержит все каталитические остатки аминокислот, которые присутствуют у всех членов семейства PLC. В пределах X-области находятся остатки гистидина, которые поддерживают образование 1,2-циклического инозитола 4,5-бисфосфата. Каталитическая активность этого домена возрастает по мере повышения концентрации Ca^{2+} с 0,01 мкМ до 10 мкМ. Анализ мутантной PLC крысы показал, что гистидин311 и гистидин356, которые имеют решающее значение для катализа гидролиза PIP₂, играют важную роль в домене X.

Структурно Y-домен образует другую половину архитектуры. Эта восьмикратная бочкообразная структура почти всегда обнаруживается внутри фермента, регулирующего обмен веществ. Y-домен важен для распознавания субстрата и регулирует предпочтение PLC для PIP₂, PIP и PI.

Домены C2 образуются примерно из 120 аминокислот и могут быть найдены в более чем 40 различных белках. Эти мотивы имеют несколько связывающих мишеней и участвуют в передаче сигнала мембранных взаимодействиях. Домены C2, обнаруженные в семействе PLC, и образованы восьмицепочечным антипараллельным β -сэндвичем. Среди членов семейства PLC δ имеется от трех до четырех доменов C2. В сочетании с Ca^{2+} домен C2 опосредует связывание PLC δ 1 с анионными фосфолипидами для опосредования передачи сигнала и переноса через мембрану. Домены C2 принадлежат к непрерывным сайтам связывания Ca^{2+} , в которых карманы, связывающие Ca^{2+} , находятся далеко друг от друга в аминокислотной последовательности.

Изоформы фосфолипазы C вовлечены во множество различных физиологических ролей в различных тканях, включая рост, дифференцировку клеток и экспрессию генов. Фосфолипаза C, гидролизующая фосфодиэфирную связь между глицериновым остатком фосфолипида и полярной фосфатной группой, относится к фосфодиэстеразам, также, как и фосфолипаза D. Фосфолипаза C является ключевым ферментом метаболизма

фосфатидилинозитола и липидных сигнальных путей. Фосфолипаза С активируется $G\alpha_q$ или $G\beta\gamma$ субъединицами G-белка. Таким образом, она является частью G-белок-связанного рецептора (GPCR) и соответствующего сигнального пути. Кроме того, фосфолипаза С гидролизует фосфатидилинозитол (PIP₂) на два вторичных медиатора – инозитолтрифосфат (IP₃) и диацилглицерин (DAG). Эти медиаторы вовлечены в сигнальные пути активации кальциевых каналов эндоплазматического ретикулума и протеинкиназы С (Schümperli, 2013).

1.3. Области применения фосфолипазы С

Фосфолипаза С используются для исследования механизмов активации арахидоновой кислоты и протеинкиназы С. Также она может выступать в качестве реагента для изучения структуры клеточных мембран, например, мембран эритроцитов. В отличие от многих бактериальных токсинов, для PLC не требуется интернализация (освоения внешних структур, в результате которого они становятся внутренними регуляторами) белка, что может быть использовано для доставки лекарственных средств. PLC, может быть связанна с подходящим антителом и составлять основу активного цитотоксического агента. На сегодняшний день фосфолипаза С считается одним из ключевых ферментов системы доставки лекарств по пути эндоцитоза, поскольку может катализировать мембранное слияние между клеточными мембранами и фосфолипидами средств доставки – липосом (Shimanouchi, 2013).

PLC также имеет терапевтический потенциал при тромбогеморрагическом синдроме, так как способна инактивировать тромбопластин, который запускает процесс свертывания крови. Гемолитическая фосфолипаза С или α -токсин *Clostridium perfringens* играет основную роль в патогенезе газовой гангрены, в связи с чем выступает

перспективным компонентом вакцины против данного заболевания (Pokotylo, 2013).

В пищевой промышленности фосфолипаза С используется для рафинирования масел: подсолнечного, пальмового, соевого, рапсового и других видов растительных масел. Неочищенное растительное масло обычно состоит из триглицеридов, но также может содержать в себе до 3% фосфолипидов, которые вызывают порчу масла при хранении. Для удаления фосфолипидов при рафинировании используют фосфолипазы. Участие PLC в процессе рафинирования не приводит к образованию свободных жирных кислот, которые необходимо удалять. Это позволяет сократить потери сырья, поэтому использование PLC предпочтительнее, нежели PLA (Borrelli, 2015).

Фосфолипазу С применяют для предварительной обработки масла для получения биодизельного топлива. При одновременном использовании PLC и лизофосфолипаз наблюдается эффект синергии, который делает ферментативный процесс производства биодизельного топлива более экономичным и экологичным. Сочетание рафинирования и трансэтерификации высвободившихся жирных кислот в этом процессе возможно осуществить при одновременном использовании фосфолипаз и жидкой липазы CalleraTrans L (Меркульева, 2021).

При формировании структурно-механических свойств молока, а также в процессах созревания сыров важную роль играют фосфолипиды, в связи с чем фосфолипазы находят широкое применение в сыроделии. В настоящее время используют коммерческий препарат PLA1 из *A. oryzae* (YieldMAX® PL, Novozymes), PLC *B. cereus* и PLD *St. chromofuscus*. При производстве сыра большая часть фосфолипидов удаляется вместе с сывороткой. При использовании фосфолипаз в результате гидролиза фосфолипидов удаляется только полярная группа, что позволяет увеличить выход продукта (Borrelli, 2015).

Еще одна перспективная область использования фосфолипазы С – получение диацилглицеридов с определенной энантиомерной структурой, которые находят применение в синтезе стереоспецифичных соединений, а также выступают клеточными медиаторами. Последовательное действие двух классов фосфолипаз С и D может быть использовано, например, для синтеза дигидроксиацетонфосфата (DHAP) – интермедиата тонкого химического синтеза, или такого важного для медицины и фармацевтики биоактивного соединения, как сфингозин-1-фосфат (S1P), – главного регулятора сосудистой и иммунной системы (Gomez-Cambronero, 2014).

Повышение эффективности фосфолипазы С может быть достигнуто путем иммобилизации фермента, так как катализаторы, полученные путем ковалентного присоединения, имеют более высокую удельную активность, а также они пригодны для многократного использования.

1.4. Получение рекомбинантных ферментов фосфолипазы С

В качестве источников получения ферментов могут быть как растения, так животные и микроорганизмы. Но выделять фосфолипазы из растительных или животных источников значительно труднее в техническом плане, что вследствие делает продукт более затратным с финансовой точки зрения. Наиболее эффективными в этом плане могут быть бактерии. Использование *E. coli* позволяет набирать большое количество неактивной формы данного фермента в тельцах включения. Для получения активной формы фермента осуществляются стадии разрушения клеток, очистки, рефолдинга и активации белка, что значительно повышает стоимость конечного продукта (Bill, 2020).

Первая попытка внеклеточного синтеза фосфолипазы С была проведена с использованием системы *Pichia pastoris*. N-Конец фермента объединяли с сигнальным пептидом α -фактора из *Saccharomyces cerevisiae* для секреции и

His₆-тегом, с дальнейшей очисткой после отщепления сигнального пептида. Однако культивирование этого продуцента требует присутствия метанола в качестве индуктора и дорогих сред, что делает его использование невыгодным. Ферментативная активность фосфолипазы С зависит от цинка, однако активность роста продуцента *P. pastoris* ингибируется избытком Zn²⁺ (5 мМ). Учитывая во внимание данный фактор это, а также длительность культивирования *P. pastoris*, для получения PLC в промышленных масштабах предпринимаются попытки использовать экспрессионную систему *B. subtilis*. Как правило, для секреции применяется сигнальная последовательность α-амилазы amyE *B. subtilis* (Bill, 2020).

1.5. Очистка белков методом Ni-аффинной хроматографии

Метод металл-аффинной хроматографии основан на специфическом взаимодействии между ферментом и сорбентом. Сами сорбенты представляют собой различные носители с ковалентно присоединёнными лигандами – определёнными субстратами или ингибиторами, а также их аналогами. В ходе аффинной хроматографии на сорбентах удерживаются только те ферменты, которые имеют определённое сродство к иммобилизованным лигандам. После очищения от несвязанных компонентов и проведение элюции происходит разрушение специфических взаимодействий между сорбентом и ферментом, и получаемый продукт выделяется в относительно чистом виде.

Сама концепция металл-аффинной хроматографии впервые была сформулирована и представлена шведским биохимиком Е.У Поратом (Cheung, 2012). Она была основана на известном сродстве ионов различных переходных металлов, таких как Zn²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ и Co²⁺ к гистидину и цистеину в водных растворах. Впоследствии возникла идея использовать прочно зафиксированные ионы металлов для фракционирования белков.

Реакция образования комплекса иона металла и некоторых функциональных групп (таких как, фосфатных групп) органических молекул, как правило, обратима. Следовательно, иммобилизованные ионы металлов можно использовать как сорбент. Взаимодействие между сорбентом и аналитом зависит от pH среды, поэтому связанные вещества можно элюировать, изменяя pH буферов, уменьшая ионную силу буфера или используя другие хелатирующие вещества, такие как этилендиаминтетрауксусную кислоту или имидазол (Кельцьева, 2013).

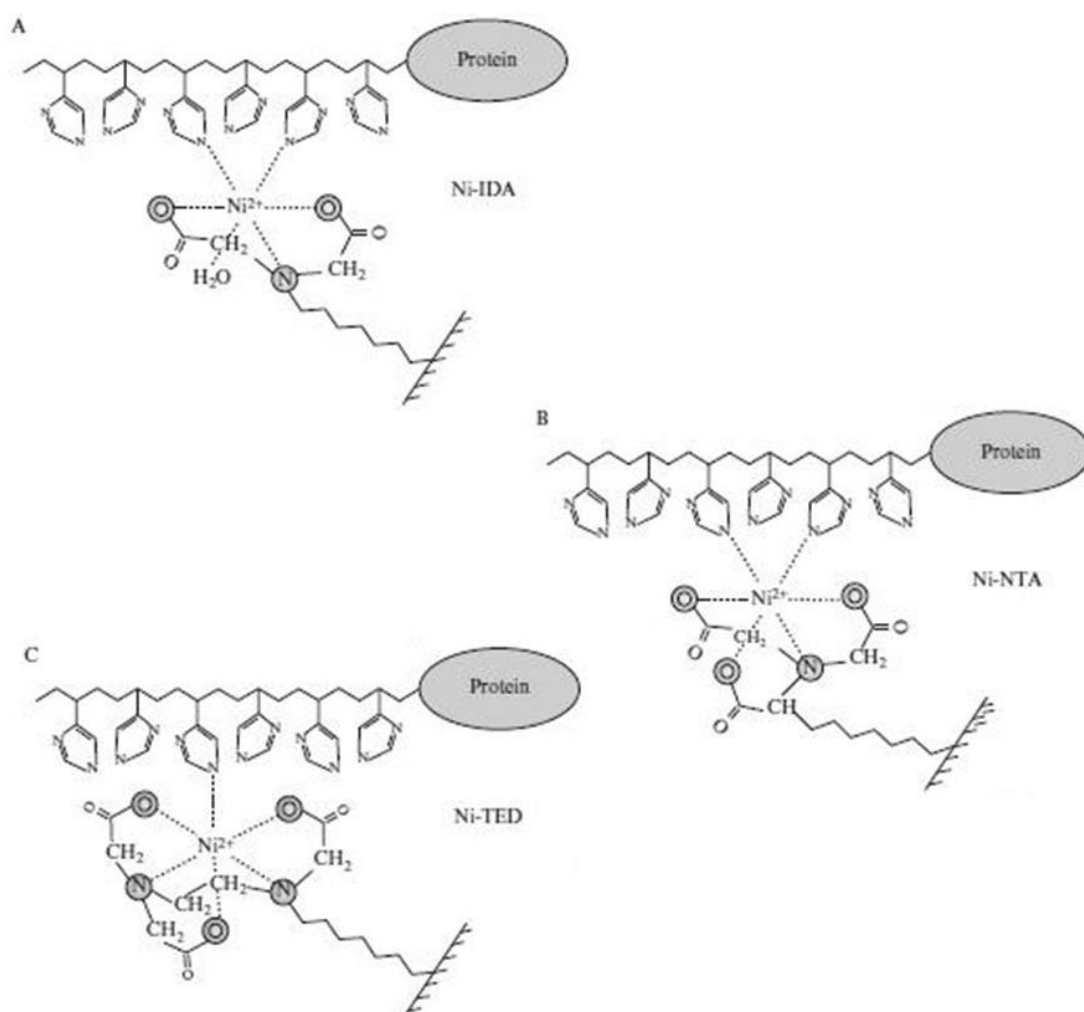


Рис. 3. Модель взаимодействия между остатками гистидина и ионами металлов (Кельцьева, 2013)

Адсорбция белков и пептидов основана на обратимом взаимодействии между аминокислотами, выступающими в качестве доноров электронов, и ионами металлов, хелатированными лигандами, которые иммобилизованы на поверхности твердого носителя. Несмотря на большое количество аминокислот, которые могут участвовать в процессе связывания (в том числе глицин, аргинин, лизин, тирозин, гистидин, цистеин, аспарагиновая кислота), фактически сорбция белка определяется наличием одной аминокислоты – гистидина (Block, 2009).

В металл-хелатной аффинной хроматографии используется свойство белков связываться с иммобилизованными ионами металлов, таких как Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} . Специфическое связывание осуществляется за счет наличия на поверхности белка свободных электронодонорных групп. В условиях нейтральные значения pH и высокие концентрации соли, в качестве потенциальных лигандов в белке могут выступать имидазольная группа гистидина ($\text{pK} \sim 6.7$), тиольная группа цистеина ($\text{pK} \sim 8.5$) и индольная группа триптофана ($\text{pK} \sim 9.41$) (Кельдиева, 2013). В определенных условиях в подобных взаимодействиях могут принимать участие С-концевые аминокислоты ($\text{pK} \sim 7.7$), а также остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот ($\text{pK} \sim 3.9$). По прочности образуемых комплексов эти аминокислоты располагаются в ряду: His, Cys > Asp, Glu >> другие аминокислоты (Сова, 2006).

Было доказано, что наличие остатков гистидина на поверхности белковой молекулы является необходимым и достаточным условием для её сорбции на хелатирующем сорбенте: сорбция требует наличия как минимум двух близко расположенных остатков гистидина, которые могут быть сближены как в первичной, так и в третичной структуре белка. Окружение остатков гистидина является дополнительным фактором, влияющим на координирование белка хелатированными ионами металлов. Вследствие того, что величина pK гистидина зависит в значительной степени от заряда

соседних аминокислотных остатков, некоторые другие остатки (Tyr, Arg, Phe, Lys) могут усиливать первичную сорбцию белков, обусловленную благоприятным расположением и доступностью остатков гистидина (Кельцьева, 2013).

Были разработаны различные подложки для аффинной хроматографии. В обычных условиях в качестве подложки использовался мягкий гель, такой как агароза. Полисахариды, такие как целлюлоза, обладают преимуществом из-за хорошей биологической совместимости. Но они демонстрируют низкую механическую прочность и, следовательно, не могут быть использованы в системах высокого давления. Напротив, неорганическая матрица, такая как диоксид кремния, обладает превосходными механическими свойствами, но имеет недостаток в виде необратимой неспецифической сорбции белков (Дин, 1988).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Сведения изъяты

Сведения изъяты

2.2. Методы исследования

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

ГЛАВА 3. ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ФОСФОЛИПАЗЫ С В СИСТЕМЕ *BACILLUS SUBTILIS*

3.1. Нарботка целевого белка в системе *B. subtilis* и его очистка

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

Сведения изъяты

3.2. Оценка содержания фосфолипазы С

Сведения изъяты

Сведения изъяты

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
2. Биохимия / Под ред. Л.А. Даниловой. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2020. – 333 с.
3. Брокерхофф Х. Липолитические ферменты. – М: Мир, 1978. – 278 с.
4. Горбачева Д.В. Электрофоретическое исследование белков в лабораторной практике. – Гомель: ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2020. – 42 с.
5. Дин П., Джонсон У., Мидл Ф. Аффинная хроматография. – М.: Мир, 1988. – 278 с.
6. Кельдиева О.А. Металл-аффинная хроматография. Основы и применение // Научное приборостроение, 2013. – Т. 23. – № 1. – С. 74–85.
7. Меркульева Ю.А., Щербаков Д.Н., Шарлаева Е.А., Чиркова В.Ю. Фосфолипазы С бактерий рода *Bacillus*: биологическая роль, свойства и области применения // Биоорганическая химия, 2021. – Т. 47. – № 4. – С. 464–471.
8. Сова В.В., Кусайкин М.И. Методическое пособие к практическим занятиям по очистке белков. – Владивосток: Изд-во Дальневост. ун-та, 2006. – 42 с.
9. Филькин С.Ю., Липкин А.В., Федоров А.В. Суперсемейство фосфолипаз: структура, функции и применение в биотехнологии // Успехи биологической химии, 2020. – Т. 60. – С. 369–410.
10. Хисматуллина З.Н. Методы фракционирования смеси белков на индивидуальные белки // Вестник Казанского технологического университета, 2013. – Т. 16. – №21. – С. 212–217.

11. Adamski F.M., Timms K.M., Shieh B.H. A unique isoform of phospholipase C β 4 highly expressed in the cerebellum and eye. // *Biochim Biophys Acta*, 1999. – Vol. 1444. – No. 1. – P. 55–60.
12. Adjobo-Hermans M.J., Crosby K.C., Putyrski M, Bhageloe A, van Weeren L., Schultz C., Goedhart J., Gadella T.W. PLC β isoforms differ in their subcellular location and their CT-domain dependent interaction with G α_q // *Cell Signal*, 2013. – Vol. 861. – No. 1. – P. 255–263.
13. Aloulou A., Ali Y.B., Bezzine S., Gargouri, Y., Gelb M.H. Phospholipases: an overview. In *Lipases and phospholipases // Methods in Molecular Biology*, 2012. – Vol. 25. – P. 63–85.
14. Anthonsen T., D'Arrigo P., Pedrocchi-Fantoni G., Secundo F., Servi S., Sundby E. Phospholipids hydrolysis in organic solvents catalyzed by immobilized phospholipase C // *J. Mol. Catal. B Enzym*, 1999. – Vol. 6. – P. 125–132.
15. Bill Colin A., Charlotte M. Phospholipase C // *Advances in experimental medicine and biology*, 2020. – Vol. 1131. – P. 215–242.
16. Block H., Maertens B., Spriestersbach A. Immo-bilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review // *Methods Enzymol.*, 2009. – Vol. 463. – P. 439–473.
17. Borrelli G.M., Trono D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications // *Int. J. Mol. Sci.*, 2015. – Vol. 16. – P. 20774–20840.
18. Bruntz R.C., Lindsley C.W., Brown H.A. Phospholipase D signaling pathways and phosphatidic acid as therapeutic targets in cancer // *Pharmacological Reviews*, 2014. – Vol. 66. – P. 1003–1079.
19. Bruzik K.S, Tsai M.D. Toward the mechanism of phosphoinositide-specific phospholipases C // *Bioorg Med Chem*, 1994. – Vol. 2. – P. 49–72.
20. Burgdorf C., Schäfer U., Richardt G., Kurz T. U73122, an aminosteroid phospholipase C inhibitor, is a potent inhibitor of cardiac phospholipase D by a

PIP2-dependent mechanism // J Cardiovasc Pharmacol., 2010. – Vol. 55. – P. 555–559.

21. Casado V., Martín D., Torres C., Reglero G. Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. – New York: Springer, 2012. – Vol. 861. – P. 495–523.

22. Cass B., Pham O.L., Kamen A., Durocher Y. Purification of recombinant proteins from mammalian cell culture using a generic double-affinity chromatography scheme // Protein Expr. Purif., 2005. – Vol. 40. – P. 77–85.

23. Cesarini S., Haller R.F., Diaz P., Nielsen P.M. Combining phospholipases and a liquid lipase for one-step biodiesel production using crude oils // Biotechnol. Biofuels., 2014. – Vol. 7. – P. 1–12.

24. Cheung R.Ch.F., Wong J.H., Ng T.B. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2012. – Vol. 96. – P. 1411–1420.

25. Cho J.H., Han J.S. Phospholipase D and its essential role in cancer // Molecules and Cells, 2017. – Vol. 40. – P. 805.

26. Cocco L., Follo M.Y., Manzoli L. Phosphoinositidespecific phospholipase C in health and disease // Journal of Lipid Research, 2015. – Vol. 56. – P. 1853–1860.

27. De Maria L., Vind J., Oxenboll K.M., Svendsen A., Patkar S. Phospholipases and their industrial applications // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007. – Vol. 74. – P. 290–300.

28. De Maria L., Vind J., Oxenbøll K.M., Svendsen A., Patkar S. Phospholipases and their industrial applications // Applied Microbiology and Biotechnology, 2007. – Vol. 74. – P. 290–300.

29. Durban M.A., Silbersack J., Schweder T., Schauer F., Bornscheuer U.T. High level expression of a recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis* // Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007. – Vol. 47. – P. 634–639.

30. Ellis M.V., Carne A., Katan M. Structural requirements of phosphatidylinositol-specific phospholipase C δ 1 for enzyme activity // *Eur J Biochem.*, 1993. – Vol. 213. – P. 339–347.
31. Ellis M.V., James S.R., Perisic O., Downes C.P., Williams R.L., Katan M. Catalytic domain of phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC). Mutational analysis of residues within the active site and hydrophobic ridge of *plc δ 1*. // *J Biol Chem.*, 1998. – Vol. 273. – P. 11650–11659.
32. Friedman E.J., Temple B.R., Hicks S.N., Sondek J., Jones C.D., Jones A.M. Prediction of protein-protein interfaces on G-protein β subunits reveals a novel phospholipase C β 2 binding domain // *J Mol Biol.*, 2009. – Vol. 392. – P. 1044–1054.
33. Gomez-Cambronero J. Phospholipase D in cell signaling: from a myriad of cell functions to cancer growth and metastasis // *Journal of Biological Chemistry*, 2014. – Vol. 289. – P. 22557–22566.
34. Gresset A., Sondek J., Harden T.K. The phospholipase C isozymes and their regulation // *Subcell Biochem.*, 2012. – Vol. 58. – P. 61–94.
35. Gresset A., Sondek J., Harden, T.K. The phospholipase C isozymes and their regulation / In *Phospho inositides I: Enzymes of Synthesis and Degradation*, 2012. – Vol. 58. – P. 61–94.
36. Guo Y., Philip F., Scarlata S. The Pleckstrin homology domains of phospholipases C- β and - δ confer activation through a common site // *J Biol Chem.*, 2003. – Vol. 278. – P. 29995–30004.
37. Helmy M., Lombard S., Piéroni G. Ricin RCA60: evidence of its phospholipase activity // *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1999. – Vol. 258. – P. 252–255.
38. Ishiguro S., Kawai-Oda A., Ueda J., Nishida I., Okada K. The defective in anther dehiscence gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther

dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis* // *Plant Cell.*, 2001. – Vol. 13. – P. 2191–2209.

39. Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Heuvel M., Misset O. Bacterial lipases // *FEMS Microbiology Reviews*, 1994. – Vol. 15. – P. 29–63.

40. Karray A., Gargouri Y., Verger R., Bezzine S. Phospholipase A2 purification and characterization: a case study. In *Lipases and Phospholipases*. – 2012. – Vol. 861. – P. 283–297.

41. Kent C., Evers A., Haun S.S.L. Diacylglycerol metabolism in phospholipase C-treated mammalian cells // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986. – Vol. 250. – P. 519–525.

42. Khatoon H., Mansfeld J., Schierhorn A., Ulbrich-Hofmann R. Purification, sequencing and characterization of phospholipase D from Indian mustard seeds // *Phytochemistry*, 2015. – Vol. 117. – P. 65–75.

43. Markovic M., Ben-Shabat S., Keinan S., Aponick A., Zimmermann E.M., Dahan A. Molecular Modeling-Guided Design of Phospholipid-Based Prodrugs // *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. – Vol. 20. – P. 2210.

44. Martin S.F., Spaller M.R., Hergenrother P.J. Expression and Site-directed mutagenesis of the Phosphatidylcholine-preferring phospholipase C of *Bacillus cereus*: probing the role of the active site Glu146 // *Biochem.*, 1996. – Vol. 35. – P. 12970–12977.

45. Matos A.R., Pham-Thi A.T. Lipid deacylating enzymes in plants: old activities, new genes // *Physiology and Biochemistry*, 2009. – Vol. 47. – P. 491–503.

46. Matsumoto Y., Mineta S., Murayama K., Sugimori D. A novel phospholipase B from *Streptomyces* sp. NA684 – purification, characterization, gene cloning, extracellular production and prediction of the catalytic residues // *FEBS Journal*, 2013. – Vol. 280. – P. 3780–3796.

47. Morigaki E., Miura Y., Takahata K., Tada M., Nakajima S., Baba N. Enzymatic preparation of sphingosine. 1-phosphate // J. Chem. Res., 1998. – Vol. 12. – P. 774–775.
48. Murayama K., Kano K., Matsumoto Y., Sugimori D. Crystal structure of phospholipase A1 from *Streptomyces albidoflavus* NA297 // Journal of Structural Biology, 2013. – Vol. 182. – P. 192–196.
49. Nakazawa Y. Streptomyces phospholipase D cloning and production // Methods in molecular biology, 2012. – Vol. 861. – P. 179–200.
50. Otnaess A.B., Little C., Sletten K., Wallin R., Johnsen S., Flengsrud R., Prydz H. Some characteristics of phospholipase C from *Bacillus cereus* // Eur. J. Biochem., 1977. – Vol. 79. – P. 459–468.
51. Parkinson E.K. Phospholipase C mimics the differential effects of phorbol-12-myristate-13-acetate on the colony formation and cornification of cultured normal and transformed human keratinocytes // Carcinogenesis, 1987. – Vol. 8. – P. 857–860.
52. Pokotylo I., Pejchar P., Potocký M., Kocourková D., Krčková Z., Ruelland E., Kravets V., Martinec J. The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signaling // Prog. Lipid Res., 2013. – Vol. 52. – P. 62–79.
53. Pokotylo I., Kolesnikov Y., Kravets V., Zachowski A., Ruelland, E., Plant phosphoinositide-dependent phospholipases C: variations around a canonical theme // Biochimie, 2014. – Vol. 96. – P. 144–157.
54. Pokotylo I., Pejchar P., Potocký M., Kocourková D., Krčková Z., Ruelland E., Kravets V., Martinec J. The plant non-specific phospholipase C gene family. Novel competitors in lipid signaling // Progress in lipid research, 2013. – Vol. 52. – P. 62–79.
55. Richmond G.S., Smith T.K. Phospholipases A1 // International Journal of Molecular Sciences, 2011. – Vol. 12. – P. 588–612.

56. Schaloske R.H., Dennis E.A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system // *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006. – Vol. 1761. – P. 1246–1259.
57. Scherer G.F.E., Ryu S.B., Wang X., Matos A.R., Heitz T. Patatin-related phospholipase A: nomenclature subfamilies and functions in plants // *Trends in Plant Science*, 2010. – Vol. 15. – P. 693–700.
58. Schümperli M., Pellaux R., Panke S. Chemical and enzymatic routes to dihydroxyacetone phosphate // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2007. – Vol. 45. – P. 33–45.
59. Shimanouchi T., Kawasaki H., Fuse M., Umakoshi H., Kuboi R. Membrane fusion mediated by phospholipase C under endosomal pH conditions. // *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2013. – Vol. 103. – P. 75–83.
60. Szumiło M., Rahden-Staroń I. Biological role of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in mammalian cells // *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2008. – Vol. 62. – P. 593–598.
61. Verlotta A., Liberatore M.T., Cattivelli L., Trono D. Secretory Phospholipases A2 in Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.): Gene Expression, Enzymatic Activity, and Relation to Drought Stress Adaptation // *International Journal of Molecular Sciences*, 2013. – Vol. 14. — P. 5146–5169.
62. Woolley P., Petersen S.B. Lipases: their structure, biochemistry and application // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1996. – Vol. 28. — P. 831–832.

ПОСЛЕДНИЙ ЛИСТ ВКР

Выпускная квалификационная работа выполнена мной совершенно самостоятельно. Все использованные в работе материалы и концепции из опубликованной научной литературы и других источников имеют ссылки на них.

«___» _____ 20__ г.

(подпись выпускника)

(Ф.И.О.)