

Продуценты, биология, селекция, генетическая инженерия

УДК 573.6.086.83:577.21

Рекомбинантная тирозиназа *Verrucomicrobium spinosum*: выделение, характеристика и использование для производства белка с адгезивными свойствами

© 2017 А.С. АКСАМБАЕВА^{1,*}, Л.Р. ЖАПАРОВА¹, Ж.С. ШАГЫРОВА¹, Е. ЖИЕНБАЙ²,
Т.С. НУРГОЖИН², Е.М. РАМАНКУЛОВ², А.В. ШУСТОВ¹

¹РГП “Национальный центр биотехнологии”, Республика Казахстан, Астана, 010000

²АО “Назарбаев Университет”, Республика Казахстан, Астана, 010000

e-mail: altyn-ai@bk.ru*

Поступила 12.05.2017 г.

Принята в печать 06.10.2017 г.

Рекомбинантная тирозиназа из бактерии *Verrucomicrobium spinosum* была получена с использованием гетерологической экспрессии в клетках *E. coli* и выделена в чистом виде для определения ряда ее биохимических свойств (кинетика ферментативной реакции, действие ингибиторов и активатора, оптимум pH). Коэкспрессия генов тирозиназы и рекомбинантного адгезивного белка мидий в одном штамме-продуценте была использована для введения в молекулу адгезивного белка посттрансляционных модификаций, которые заключались в превращении остатков тирозина в остатки ДОФА, что придает белку способность к молекулярной адгезии в водной среде. Полученный рекомбинантный белок обеспечивал неожиданно высокую адгезионную прочность клеевого соединения металлических пластин – 2,5 МПа, что превышает соответствующие значения для природных адгезивных белков и в десятки раз превосходит адгезионную прочность существующих медицинских клеев на основе фибрина.

Ключевые слова: тирозиназа, ферментативная активность, ДОФА, адгезивный белок, адгезионная прочность, биосовместимый клей.

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-12-27

Тирозиназа – фермент, катализирующий орто-гидроксилирование монофенолов с образованием орто-дифенолов (крезолазная активность) и последующее окисление дифенолов в орто-хиноны (катехолазная активность). Окислителем в обеих реакциях служит молекулярный кислород [1]. Образующиеся хиноны являются высоко реакционноспособными соединениями и обычно вступают в неферментативные реакции полимеризации с образованием коричневых или черных пигментов. Так, наиболее известный природный процесс, начальные этапы которого катализируются

тирозиной – это биосинтез пигмента меланина, окрашивающего кожу и волосы в темные цвета. Аминокислота тирозин, которая является по химической природе монофенолом, под воздействием тирозиназы превращается в 3,4-дигидроксифенилаланин (ДОФА), который далее ферментативно окисляется до хинона (ДОФА-хинон), а последний уже неферментативно превращается в ДОФА-хром и далее – в меланин (рис. 1).

Тирозиназы обнаружены у представителей всех царств живой природы, демонстрируя большое разнообразие в аминокислотной

Список сокращений: ДОФА – 3,4-дигидроксифенилаланин; КЖ – культуральная жидкость; ОП₆₀₀ – оптическая плотность при длине волны 600 нм; среда LB – среда Лурия–Бертани; IMAC (Immobilized Metal ion Affinity Chromatography) – металлоаффинная хроматография; IPTG – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид; NBT – нитросиний тетразолий; PBS – фосфатно-солевой буфер; SDS – додецилсульфат натрия; SDS-PAGE – электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS; SLS – лаурилсаркозинат натрия.

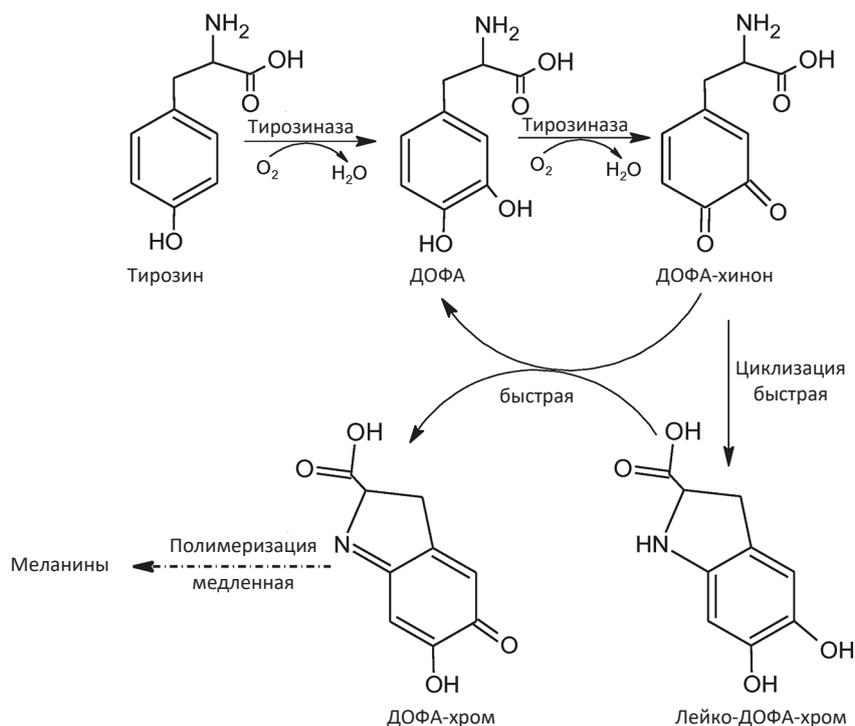


Рис. 1. Схема превращения тирозина в меланин: тирозиназа катализирует первые две реакции (тирозин→ДОФА→ДОФА-хинон), остальные реакции протекают без участия ферментов

Fig. 1. Scheme of conversion of tyrosine to melanin: tyrosinase catalyzes the first two reactions (tyrosine→DOPA→DOPA-quinone); the following are non-enzymatic reactions

последовательности, пространственной структуре и молекулярной массе. Эти ферменты разделяют на несколько типов в зависимости от доменной организации и потребности в так называемом “медном шапероне” – белке, который участвует в доставке ионов меди в активный центр фермента. Тирозиназы типа III (например, из бактерии *Verrucomicrobium spinosum*) не нуждаются в шаперонах и кроме каталитического содержат С-концевой домен, присутствие которого инактивирует тирозиназу [2]. Роль этого домена, вероятно, заключается в том, чтобы фермент оставался неактивным до секреции из клетки.

До последнего времени изучение тирозиназ имело значение в основном для поиска их ингибиторов, которые входят в состав препаратов против загара. Среди реально существующих промышленных процессов с применением тирозиназ – детоксикация сточных вод, почв и других субстратов, загрязненных фенолами [3, 4], обнаружение фенолов с помощью амперометрических биосенсоров [5, 6], получение меланинов для косметологии [7] и синтез ДОФА (препарата для лечения болезни Паркинсона) [8]. У тирозиназ есть перспективы использования в промышленности тонкого органического синтеза.

Относительно недавно тирозиназы стали применяться в неожиданной сфере – в производстве адгезивных (клеяких) материалов. Клеи, применяемые в медицине и ортодонтии, должны обладать специфическими свойствами – биосовместимостью и способностью склеивать влажные поверхности, например, ткани внутри человеческого тела. Технологии создания искусственных биосовместимых клеев и сиапантов получили мощный толчок после раскрытия механизма прикрепления к субстрату мидий (моллюсков из семейства *Mytilidae*) [9]. Мидии фиксируются на поверхностях с помощью так называемых бисусных нитей, содержащих на концах клей белковой природы, компоненты которого получили название “белки ноги мидии” или MFP (mussel foot proteins). Отличительная особенность MFP – большое содержание тирозина, кроме того, существенная доля остатков этой аминокислоты (3–30 молярных процентов) превращена в остатки ДОФА [10]. В природе такая модификация происходит под воздействием тирозиназы или полифенолоксидазы. С использованием MFP созданы клейкие материалы для медицины, имеющие адгезионную прочность, сравнимую с адгезией синтетических клеев [11–15].

Несмотря на растущие перспективы применения в промышленных процессах, набор доступных тирозиназ в настоящее время ограничен единственным ферментом природного происхождения, который выделяют из плодовых тел грибов.

Целью представленной работы было получение рекомбинантной тирозиназы из бактерии *V. spinosum* и изучение некоторых биохимических свойств данного фермента, в частности, его устойчивости к воздействию белок-денатурирующих агентов. Ставилась также задача исследовать применение тирозиназы для получения рекомбинантного адгезивного белка с помощью коэкспрессии генов обоих белков в клетках *E. coli*. Кроме того, была предпринята попытка количественной оценки активности тирозиназы как фермента, кинетика действия которого не описывается уравнением Михаэлиса–Ментен.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы

В работе использовали штаммы *E. coli* DH5 α для создания генно-инженерных конструкций и BL21(DE3) для экспрессии рекомбинантных белков. Штаммы *E. coli* были любезно предоставлены д-ром Murat Saparbayev (Institute Pasteur, Франция).

Синтез генов

Ген тирозиназы *V. spinosum* (без С-концевого инактивирующего домена) и ген адгезивного белка Fp-131 синтезировали *de novo* из олигонуклеотидов. Нуклеотидные последовательности синтетических генов были рассчитаны так, чтобы состав кодонов был оптимален для экспрессии в *E. coli*. Для каждого фрагмента ДНК рассчитывали протяженные (60-мерные) олигонуклеотиды, которые чередовались в порядке “sense→antisense→sense” и т.д. При этом соседствующие праймеры имели перекрывающиеся последовательности и были рассчитаны таким образом, чтобы обладать способностью гибридизоваться друг с другом при расчетной температуре отжига 60 °С (так называемые «внутренние» праймеры). Для каждого синтетического гена совокупность внутренних праймеров перекрывала почти всю последовательность данного гена (за исключением 5'- и 3'-концов). В ходе синтеза использовали также одну пару коротких фланкирующих праймеров (один праймер в смысловой, а другой – в антисмысловой ориентации), которая была нацелена на участки на концах синтезируемого фрагмента ДНК.

Синтез фрагментов ДНК проводили с помощью ПЦР в два раунда. В I раунде ПЦР-амплификации подвергали смесь всех внутренних праймеров. Полученные продукты стохастического синтеза использовали в качестве матрицы в ПЦР II раунда, которую проводили с парой фланкирующих праймеров. Реакционную смесь II раунда разделяли электрофорезом в геле 1%-ной легкоплавкой агарозы (Sigma, США) с использованием камеры для электрофореза HE33-8-1.5 (GE Healthcare). Гель готовили на однократном буфере ТАЕ (40 мМ трис, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА), содержащем дополнительно 0,5 мкг/мл бромистого этидия. После завершения электрофореза гель освещали ультрафиолетовым светом. Фрагмент ожидаемой длины выделяли из геля и клонировали в векторе pGEM-T (Promega). Вставки в полученных клонах секвенировали по обеим цепям для подтверждения соответствия синтетических генов расчетным последовательностям.

Создание экспрессионных конструкций и штаммов-продуцентов

Плазмида для экспрессии тирозиназы *V. spinosum* была сконструирована на основе вектора pRSET B (Invitrogen), содержащего ген устойчивости к ампициллину. Целевая конструкция (pRSET/Tyr) несет синтетический ген тирозиназы, встроенный в вектор по сайтам *NcoI* и *HindIII*. Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) трансформировали плазмидой pRSET/Tyr; трансформантов отбирали на среде с ампициллином (Sanavita Pharmaceuticals) и по положительной реакции на индикаторной среде для выявления активности тирозиназы (см. ниже). Отобранные клоны были обозначены BL21(DE3)/pRSET/Tyr.

Для экспрессии адгезивного белка Trx-Fp-131 использовали созданный в лаборатории вектор pET28/32, который включает векторную часть (ограниченную сайтами *XbaI* и *XhoI*) от pET28c (все исходные векторы приобретены у Novagen, США) и содержит ген устойчивости к канамицину. Кроме того, вектор pET28/32 содержит фрагмент *XbaI*–*XhoI* из плазмиды pET32a (Novagen), несущий ген тиоредоксина (Trx) *E. coli* и полилинкер. Вставка гена адгезивного белка Fp-131 в полилинкер вектора pET28/32 приводила к получению слитого продукта Trx-Fp-131, имеющего на N-конце аминокислотную последовательность тиоредоксина (происходит из плазмиды pET28/32), а на С-конце – последовательность адгезивного белка Fp-131 (закодирована в синтетическом гене).

Клетки штамма BL21(DE3) трансформировали смесью плазмид pRSET/Tyг и pET/Trx-Fp-131 и высевали на агаризованную среду, содержащую ампициллин и канамицин (Sigma). Были отобраны клоны экспрессионного штамма BL21(DE3)/pRSET/Tyг; pET/Trx-Fp-131.

Во всех описанных экспрессионных конструкциях синтетические гены находятся под контролем промотора РНК-полимеразы фага T7, и, следовательно, для их экспрессии требуется хозяйский штамм, синтезирующий РНК-полимеразу T7, например, *E. coli* BL21(DE3).

Выделение и очистка тирозиназы

Культуру трансформированного штамма *E. coli* BL21(DE3)/pRSET/Tyг выращивали в среде LB (Sigma) до $ОП_{600} = 0,8$, добавляли IPTG (Sigma) до 1 мМ концентрации и инкубировали 6 ч при 37 °С и перемешивании (150 об/мин). Клетки штамма-продуцента собирали центрифугированием, полученный осадок ресуспендировали (в объеме до 10% от объема исходной суспензии) в буфере для лизиса (20%-ная сахароза; 20 мМ HEPES, pH 7,5; 5 мМ ЭДТА; 0,1%-ный тритон X-100) (все реактивы производства Sigma) и добавляли лизоцим (1 мг/мл) (Fluka, Германия), ДНКазу I (10 мкг/мл) (Sigma), РНКазу А (100 мкг/мл) (Sigma) и ингибитор протеаз PMSF (0,2 мМ) (Sigma). Смесью инкубировали 1 ч при комнатной температуре и подвергали действию ультразвука с помощью дезинтегратора Omni Ruptor 4000 (OMNI International) (10 импульсов по 20 с, частота 44 кГц, максимальная амплитуда) при охлаждении на льду. Лизат центрифугировали (16500 g, 20 мин, 4 °С). Тирозиназу выделяли из растворимой фракции с помощью металл-аффинной хроматографии (ИМАС). Колонку HiTrap Chelating 5 mL (GE Healthcare) насыщали ионами никеля Ni^{2+} по протоколу производителя и уравновешивали буфером А (20 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4; 500 мМ NaCl; 20 мМ имидазол (Sigma)). Через колонку пропускали осветленный лизат, промывали колонку 25 мл буфера А и присоединяли к хроматографу АКТА Purifier 10 (GE Healthcare). Элюцию проводили градиентом имидазола 20–500 мМ, создаваемым путем смешивания буфера А (см. выше) и буфера В (20 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4; 500 мМ NaCl; 500 мМ имидазол). Фракции с высоким содержанием белка объединяли и диализовали против 2 л PBS (Amresco) при 8 °С в течение ночи. После диализа к препарату тирозиназы добавляли глицерин до 50% (об.) и хранили в аликвотах при –80 °С.

Выделение и очистка адгезивного белка описаны в разделе «Использование тирозиназы для модификации остатков тирозина в рекомбинантном адгезивном белке».

SDS-PAGE

Электрофорез в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях проводили в аппарате Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad). Для приготовления раствора адгезивного белка 100 мкг лиофильно высушенного препарата растворяли в 160 мкл 5%-ной уксусной кислоты (Sigma-Aldrich). Электрофорез проводили при напряжении 100 В, гели окрашивали раствором кумасси R250 (Sigma).

Анализ активности тирозиназы

Активность очищенного фермента определяли с использованием в качестве субстрата L-тирозина (Sigma) по методу, описанному в инструкции компании Sigma (Enzymatic assay of tyrosinase. SPTYRO01.001). За единицу активности (Е) тирозиназы принимали количество фермента, в присутствии которого происходит увеличение $ОП_{280}$ реакционной смеси, содержащей L-тирозин, на 0,001 оптических единиц за 1 мин.

Активность тирозиназы в клетках штамма-продуцента выявляли на индикаторной среде. К 50 мл расплавленной агаризованной среды CR (5 г/л NaCl (Sigma), 0,1 г/л $CaCl_2$ (Sigma), 10 г/л пептона (Fluka), 5 г/л гидролизата казеина (Fluka), 15 г/л бактоагара (Sigma)) добавляли L-тирозин до конечной концентрации 0,01 г/мл (полностью не растворяется), $CuSO_4$ (0,2 М, Sigma) до конечной концентрации иона меди 0,2 мМ, ампициллин (150 мкг/мл) и IPTG (до 0,2 мМ). Полученную индикаторную среду помещали в чашки Петри и на ее поверхность высевали штрихом штамм-продуцент. Рост колоний штамма сопровождался появлением черного гало вокруг колоний. Для контроля специфичности теста на индикаторную среду высевали также нетрансформированный штамм *E. coli* BL21(DE3).

Все эксперименты по анализу зависимости скорости реакции от концентрации субстрата (L-тирозин) проводили при комнатной температуре. Во все реакционные смеси добавляли $CuSO_4$ до конечной концентрации иона меди 0,2 мМ. Активность тирозиназы в различных условиях определяли в трех повторностях. Для всех временных точек вычисляли средние значения оптической плотности, которые использовали для построения кинетических кривых. Обработку результатов выполняли с использованием программного обеспечения OriginPro 9.1 (OriginLab).

Зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации фермента в растворе субстрата

Поглощение реакционной смеси при длине волны 475 нм (один из максимумов поглощения ДОФА-хрома) определяли спектрофотометрически [16]. Готовили растворы тирозина в 50 мМ фосфатном буфере, pH 6,5, так, чтобы концентрация субстрата в реакционной смеси составляла от 0,5 мМ до 3,75 мМ. Готовый раствор субстрата до начала эксперимента насыщали кислородом воздуха путем интенсивного перемешивания с помощью магнитной мешалки в открытой колбе в течение 5 мин. Определяли поглощение смеси до добавления фермента, а затем к раствору субстрата добавляли тирозиназу до конечной концентрации 10 Е/мл, перемешивали раствор и определяли его оптическую плотность ($ОП_{475}$) через определенные интервалы времени.

Определение действия мочевины на скорость ферментативной реакции

Эксперимент по оценке ингибирования тирозиназы *V. Spinosum* в присутствии различных концентраций мочевины проводили с использованием раствора субстрата, содержащего 1,75 мМ L-тирозин в 50 мМ фосфатном буфере, pH 6,5. В реакционную смесь добавляли мочевину до конечной концентрации в диапазоне 1–6 М. Оптическую плотность ($ОП_{475}$) измеряли до добавления фермента, сразу после добавления (10 Е/мл) и через различные интервалы времени.

Определение действия лаурилсаркозината натрия на скорость ферментативной реакции

Эксперимент с использованием лаурилсаркозината натрия проводили в тех же условиях, что и анализ ингибирующей активности мочевины; реакционная смесь содержала 1% или 2% (масса/объем) SLS.

Определение pH-оптимума тирозиназы

Уровень pH поддерживался следующими буферными системами: 50 мМ глицин/HCl – для установления pH в диапазоне 3,0–4,0; 50 мМ ацетат натрия/уксусная кислота – для pH 5,0; 50 мМ Na_2HPO_4 /HCl – для pH 6,0–8,0; 50 мМ глицин/NaOH – для pH 9,0–10,0. Данные буферы использовали для приготовления растворов L-тирозина с конечной концентрацией 1,75 мМ. К реакционной смеси добавляли тирозиназу и измеряли зависимость $ОП_{475}$ от времени.

Использование тирозиназы для модификации остатков тирозина в рекомбинантном адгезивном белке

Культуру штамма *E. coli* BL21(DE3)/pRSET/Tyr; pET/Trx-Fp-131 выращивали в среде LB с ампициллином и канамицином до $ОП_{600} = 0,8$. Затем добавляли IPTG до концентрации 1 мМ и инкубировали 6 ч. Бактериальную биомассу обрабатывали, как описано в разделе “Выделение и очистка тирозиназы”. Нерастворимую фракцию осаждали центрифугированием лизата (16500 g, 20 мин, 4 °C). Осадок промывали водой и ресуспендировали в буфере А для IMAC с добавлением мочевины (20 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4; 500 мМ NaCl; 20 мМ имидазол; 8 М мочевина). Полученный раствор использовали для очистки адгезивного белка с помощью IMAC на колонке NiTrap Chelating 5 mL. Элюцию проводили градиентом имидазола (20–500 мМ) с использованием буфера А (см. выше) и буфера В (20 мМ Na_2HPO_4 pH 7,4; 500 мМ NaCl; 500 мМ имидазол; 8 М мочевина). Фракции, соответствующие хроматографическому пику, объединяли в один препарат, к которому добавляли уксусную кислоту (до 25%), диализовали против 2 л 1%-ной уксусной кислоты в течение ночи и лиофильно высушивали.

Тест на наличие в адгезивном белке продуктов модификации тирозина

ДОФА или ДОФА-хинон в белке обнаруживали с помощью реакции восстановления нитросинего тетразолия (NBT) в щелочном глициновом буфере. Эта реакция приводит к образованию формазана – нерастворимого продукта пурпурного или темно-синего цвета. Лиофильно высушенный белок растворяли в 5%-ной уксусной кислоте. Каплю (2 мкл) раствора белка (1 мг/мл) наносили на полоску из нитроцеллюлозы (HyBond, Amersham). После высыхания капли полоску промывали в воде 5 мин, затем погружали в свежеприготовленный раствор NBT (0,6 мг/мл) в 2 М глициновом буфере, pH 10,0, и инкубировали при 37 °C до появления в месте нанесения адгезивного белка яркого пятна. В качестве отрицательного контроля специфичности теста на полоску наносили каплю раствора лизоцима (1 мг/мл); пятно оставалось неокрашенным.

Измерение адгезионной прочности полученного белка

Адгезионную прочность определяли путем разрыва клеевого соединения методом сдвига (lap shear test). В качестве экспериментального образца

использовали адгезивный белок Tх-Fr-131, в качестве контроля – лизоцим. Для проведения теста склеивали стальные пластины (адгеренты) шириной 2,2 см. Навеску лиофилизованного белка (5 мг) ресуспендировали в 20 мкл 5%-ной уксусной кислоты, и равномерно наносили вязкую эмульсию на поверхность адгерентов у их концов. Затем их накладывали друг на друга «внахлест» так, чтобы обработанные клеем поверхности перекрывались; при этом площадь клеевого соединения составляла 2,2 см². Адгеренты прижимали друг к другу с помощью фотозажимов. Собранный «пакет» из двух склеенных адгерентов выдерживали в термостате при 37 °С в течение 3 ч. Затем пакет фиксировали с одного конца в прочно

закрепленном штативе, а к другому концу подвешивали груз с известной массой. Нагрузку увеличивали до разрыва клеевого соединения. Адгезионную прочность вычисляли как отношение силы тяжести груза в момент разрыва (Н) к площади клеевого соединения (м²) и выражали в мегапаскалях (МПа). Каждое измерение проводили в трех повторностях и вычисляли среднее значение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантной тирозиназы

На рис. 2 приведены нуклеотидная последовательность гена тирозиназы *V. spinosum* и выведенная аминокислотная последовательность



Рис. 2. Фрагмент последовательности экспрессионной плазмиды pRSET/Tyr, включающий ген тирозиназы. Poly – часть открытой рамки считывания от стартового метионина до сайта для NcoI (*NcoI*), которая происходит из полилинкера вектора; tyr – синтетический ген тирозиназы *V. spinosum* (*tyr*); 6xHis – гексахистидиновая метка; CuA, CuB – мотивы первичной структуры, участвующие в формировании медь-связывающих центров. Над нуклеотидной последовательностью показана выведенная аминокислотная последовательность

Fig. 2. A fragment of expression plasmid pRSET/Tyr that includes the tyrosinase gene. Designations: Poly, part of open reading frame (from starting methionine to site for NcoI (*NcoI*)) that derives from the vector polylinker; tyr, synthetic gene for *V. spinosum* tyrosinase (*tyr*); 6xHis, hexahistidine label; CuA and CuB, motifs of primary structure that are involved in the formation of copper-binding centers. A deduced amino acid sequence is shown above the nucleotide sequence

(http://humbio.ru/humbio/tarantul_sl/000004b8.htm) продукта экспрессии. Синтетический ген кодирует так называемый кор тирозиназы (соответствующий остаткам 82–403 последовательности аминокислот, депонированной в базе GenBank под номером WP_081452337). Кор фермента включает каталитический домен, но не содержит С-концевой инактивирующий домен. Вычисленная молекулярная масса рекомбинантной тирозиназы составляет 36,6 кДа.

В созданной экспрессионной системе рекомбинантная тирозиназа синтезируется как внутриклеточный (цитозольный) белок. Неожиданный феномен заключался в том, что экспрессия гена каталитически активной тирозиназы не приводила к заметному снижению скорости роста штамма-продуцента в жидкой культуре. И это происходило несмотря на то, что данный фермент способен превращать внутриклеточный тирозин в ДОФА, а остатки тирозина в белках – в остатки ДОФА, а также производить кросс-шивку различных клеточных белков по остаткам модифицированного тирозина. В ходе накопления биомассы штамма-продуцента в жидкой культуре после добавления индуктора IPTG происходило быстрое потемнение КЖ; это явление свидетельствует о том, что следовых количеств ионов меди, присутствующих в обычной среде LB, достаточно для активации тирозиназы.

Рекомбинантную тирозиназу очищали из растворимой фракции лизата клеток штамма-продуцента BL21(DE3)/pRSET/Tyr. На рис. 3 показаны

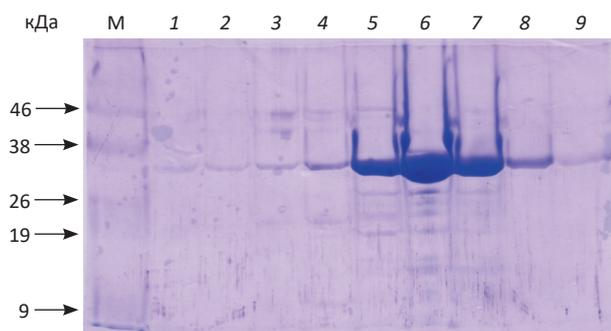


Рис. 3. Электрофорез в денатурирующем полиакриламидном геле фракций (дорожки 1–9), собранных в процессе металлоаффинной хроматографии при элюции тирозиназы градиентом имидазола. Расчетная молекулярная масса рекомбинантной тирозиназы 36,6 кДа. М – маркеры молекулярной массы белков Bluestep broad range (Amresco K973)

Fig. 3. PAGE under denaturing conditions of fractions (lanes 1–9) collected during IMAC with tyrosinase elution by imidazole gradient. Calculated molecular mass is 36.6 kDa. M, protein MM markers (Bluestep broad range, Amresco K973)

результаты SDS-PAGE фракций, собранных в ходе ИМАС, которые свидетельствуют о высокой чистоте полученного белка (не менее 90%).

Из культуры объемом 1 л обычно получали 20 мл раствора очищенного рекомбинантного белка с концентрацией ~1 мг/мл, т.е. продуктивность штамма BL21(DE3)/pRSET/Tyr составляет 20 мг тирозиназы из 1 л культуры. К препарату фермента добавляли глицерин (50% об.) и хранили его при –80 °С. Предварительные эксперименты показали, что хранение тирозиназы при температуре выше –20 °С или без криопротектора приводит к быстрой потере активности (данные не приведены).

Удельная активность полученной тирозиназы, измеренная согласно рекомендациям компании Sigma (см. «Условия эксперимента»), составила 13200 Е/мг, что существенно выше, чем у препаратов тирозиназы, выделенной из природных источников. Например, опубликованные данные по удельной активности для фермента из плодовых тел шампиньонов (*Agaricus bisporus*) варьируют от 50 до 1900 Е/мг (такая вариабельность, по-видимому, объясняется тем, что разные группы исследователей используют различные методы выделения фермента) [17–19]. В работе [20] приведена таблица значений удельной активности грибных тирозиназ; наибольшая из них характерна для фермента из *Pholiota microspora* и составляет 412 Е/мг. Тирозиназы бактерий демонстрируют более высокую удельную активность. Например, фермент, выделенный из культуры почвенной бактерии *Pseudomonas putida* F6, имел удельную активность 2143 Е/мг [21].

В настоящее время единственной коммерчески доступной тирозиназой, как уже говорилось, является препарат, который выделяют из плодовых тел шампиньонов и удельная активность которого, согласно данным поставщика, составляет ~1000 Е/мг (Sigma T3824). В печатной литературе и интернете отсутствуют сведения о промышленном производстве рекомбинантных тирозиназ. В данной статье описывается получение рекомбинантной бактериальной тирозиназы с использованием экспрессии в *E. coli*. Рекомбинантная тирозиназа *V. spinosum* была синтезирована без природного инактивирующего домена; в связи с этим она не нуждается в белках-шаперонах и является каталитически активной без дальнейшей обработки. Продукт экспрессии, меченный гексагистиридиновой меткой, был выделен с использованием одного раунда хроматографии (ИМАС) с высокой чистотой (>90%).

Применение тирозиназ в промышленности, особенно в процессах, не относящихся к основному производственному циклу (например, обработка сточных вод), требует относительно низкой стоимости фермента. На примере получения рекомбинантной тирозиназы продемонстрирована возможность снижения стоимости самих ферментов и организации экономически эффективного промышленного производства.

Демонстрация активности тирозиназы *in vivo* на индикаторной среде

Весьма простой способ выявлять активность тирозиназы в клетках микроорганизмов *in vivo* заключается в выращивании их на индикаторной среде, которая содержит L-тирозин (10 г/л). При наличии активной тирозиназы на индикаторной среде вокруг колоний полученных штаммов-продуктов за несколько часов инкубации образуются меланинсодержащие черные гало (рис. 4).

Зависимость скорости ферментативной реакции от количества субстрата

Первоначальный анализ данных экспериментов показал, что с помощью уравнения

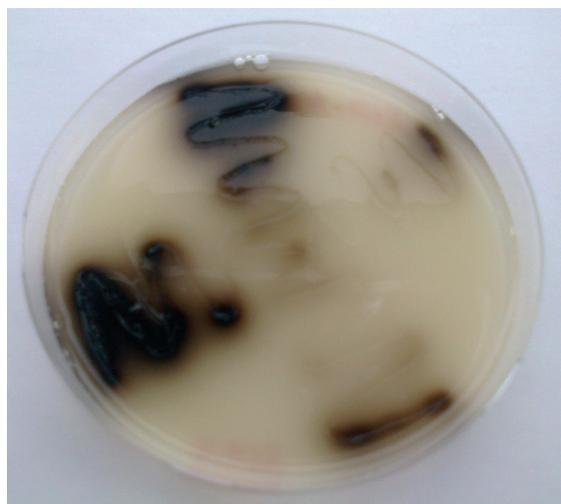


Рис. 4. Тирозиназная активность в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3)/pRSET/Tyr на индикаторной среде, содержащей L-тирозин в качестве субстрата, сульфат меди для активации тирозиназы, а также ампициллин и IPTG для индукции синтеза рекомбинантной тирозиназы. Меланинсодержащие черные гало вокруг растущих колоний демонстрируют активность тирозиназы

Fig. 4. Tyrosinase activity in cells of a *E. coli* BL21(DE3)/pRSET/Tyr strain. The indicator medium contains L-tyrosine as a substrate, copper sulfate for the enzyme activation, and ampicillin and IPTG for the recombinant tyrosinase induction. Black halos are formed around growing colonies due to the melanin synthesis

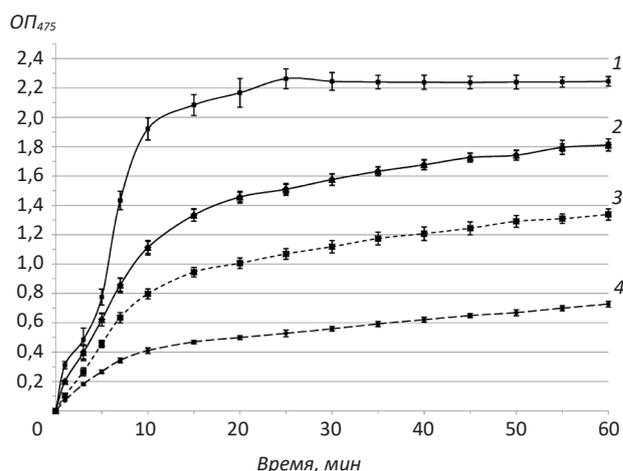


Рис.5. Кинетические кривые реакции, катализируемой полученной рекомбинантной тирозиназой (10 Е/мл), при различных начальных концентрациях субстрата; кривая 1 – 3,25 мМ; кривая 2 – 1,75 мМ; кривая 3 – 1 мМ; кривая 4 – 0,5 мМ. Приведены средние по трем экспериментам значения оптической плотности и отклонения

Fig. 5. Progress curves of a reaction catalyzed by the obtained recombinant tyrosinase (10 U/mL) at various starting substrate concentrations; curve 1, 3.25 mM; curve 2, 1.75 mM; curve 3, 1 mM; curve 4, 0.5 mM. Mean values of optical densities and deviations for three experiments are represented

Михаэлиса–Ментен не удается адекватно моделировать реакцию, катализируемую тирозиназой. Измеряемый параметр (оптическая плотность реакционной смеси) изменяется в результате нескольких связанных реакций (см. рис. 1), которые сложно моделировать. Однако зависимость накопления продукта от времени, графически представленная кинетическими кривыми (progress curves), отражает закономерности, характерные для большинства ферментов, а именно: 1) скорость накопления продукта максимальна в начале реакции; 2) на плато кинетической кривой концентрация продукта зависит от его исходной концентрации (рис. 5).

Количественное описание результатов экспериментов в варьирующих реакционных условиях было проведено с помощью феноменологического подхода. Для этого использовали моделирование экспериментально полученных кинетических кривых с применением различных видов нелинейных зависимостей. В частности выяснилось, что зависимость оптической плотности от времени в реакциях, катализируемых рекомбинантной тирозиназой, хорошо описывается уравнением Хилла:

$$ОП = ОП_{\max} \frac{t^n}{t_{1/2}^n + t^n}, \quad (1)$$

где $ОП$ (измеряемая величина) – оптическая плотность раствора в момент времени t ; $ОП_{max}$ (параметр уравнения) – максимально достижимая оптическая плотность (соответствует исчерпанию субстрата и завершению реакции); t – время (измеряемая величина), прошедшее от начала реакции, мин; $t_{1/2}$ (параметр уравнения) – время, за которое достигается оптическая плотность, равная 50% $ОП_{max}$, мин; n (параметр уравнения) – коэффициент Хилла.

Данные графиков (см. рис. 5) были использованы для вычисления величин $ОП_{max}$, $t_{1/2}$ и n с помощью нелинейного оценивания. Одновременно вычисляли коэффициент детерминации (R^2) (качество соответствия теоретической зависимости экспериментальным показаниям), который представляет собой долю дисперсии зависимой переменной ($ОП$), объясняемой уравнением (1). В табл. 1 приведены значения оцененных параметров.

Нелинейный характер аппроксимированных уравнений (n отличается от единицы) не позволяет в данном случае воспользоваться классической моделью Михаэлиса–Ментен. Высокие значения R^2 (выше 0,98) подтверждают эффективность использованного способа для описания зависимости $ОП$ от времени в реакции с участием тирозиназы (см. табл. 1).

Нелинейное оценивание параметров уравнения Хилла оказалось также применимо для моделирования реакции в присутствии различных концентраций мочевины и SLS.

Ингибирование активности тирозиназы в присутствии мочевины

В ходе продолжающихся исследований мы используем тирозиназу для модификации остатков тирозина в полипептидах, в том числе в плохо растворимых белках. В связи с этим для нас особый интерес представлял эффект химических веществ,

которые способны денатурировать белки и удерживать денатурированные белки в растворе, на активность изучаемого фермента. Одним из наиболее часто используемых реагентов для обратимой денатурации и солюбилизации плохо растворимых белков является мочевины. Мы исследовали зависимость $ОП$ от времени в реакционных смесях, содержащих фиксированные концентрации L-тирозина и различные концентрации (0–6 М) мочевины (рис. 6). Видно, что при одинаковой

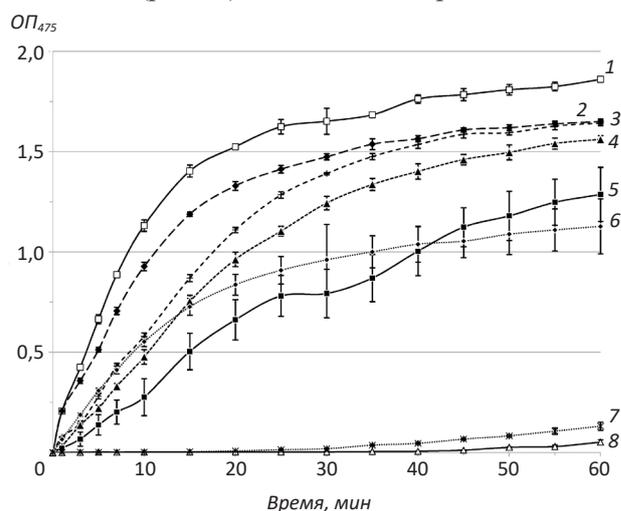


Рис. 6. Кинетическая зависимость скорости реакции, катализируемой полученной рекомбинантной тирозиназой (10 Е/мл) при начальной концентрации субстрата 1,75 мМ, от содержания мочевины; кривая 1 – 0 М; кривая 2 – 1 М; кривая 3 – 2 М; кривая 4 – 3 М; кривая 5 – 4 М; кривая 6 – 4,5 М; кривая 7 – 6 М; кривая 8 – 5 М. Приведены средние по трем экспериментам значения оптической плотности и отклонения

Fig. 6. Kinetic dependency of rate of reaction catalyzed by the obtained recombinant tyrosinase (10 U/mL) at starting substrate concentration of 1.75 mM on urea content; curve 1, 0 M; curve 2, 1 M; curve 3, 2 M; curve 4, 3 M; curve 5, 4 M; curve 6, 4.5 M; curve 7, 6 M; curve 8, 5 M. Mean values of optical densities and deviations for three experiments are represented

Таблица 1

Параметры модели для описания кинетики ферментативной реакции с участием тирозиназы в зависимости от исходной концентрации субстрата

Parameters of model describing kinetics of tyrosinase enzymatic reaction depending on starting substrate concentration

Начальная концентрация, мМ	$ОП_{max}$	$t_{(1/2)}$, мин	n	R^2
0,50	0,97552	17,98281	0,76740	0,99207
1,00	1,46071	9,49209	1,14904	0,99580
1,75	1,95445	8,58044	1,21476	0,99698
2,50	1,95787	8,57465	1,21139	0,99696
3,25	2,24961	5,68897	2,56744	0,98120

начальной концентрации субстрата в реакционных смесях выход продукта ферментативной реакции зависел от количества ингибитора (мочевины).

Рекомбинантная тирозиназа *V. spinosum* сохраняла энзиматическую активность при содержании мочевины до ~ 4,5 М. Более высокие концентрации мочевины полностью подавляли активность тирозиназы, что выражалось в увеличении $t_{1/2}$ до более чем 100 мин (табл. 2).

Активация тирозиназы в присутствии лаурилсаркозината натрия

SLS является поверхностно-активным веществом, которое используется для солюбилизации белков из телец включения. Добавление SLS в реакционную смесь в концентрации 1% или 2% стимулирует активность тирозиназы (рис. 7, табл. 2), что проявляется в уменьшении $t_{1/2}$ с 8,6 мин (в отсутствие SLS) до 4,4 мин (2% SLS).

Определение рН-оптимума рекомбинантной тирозиназы

Кинетические кривые, характеризующие влияние рН среды на активность тирозиназы *V. spinosum*, представлены на рисунке 8а.

В эксперименте (см. рис. 8b) использовали количественную характеристику активности, которую определяли по формуле (2):

$$A = \frac{ОП_{\max}}{t_{1/2}} \quad (2)$$

Видно (см. рис. 8b), что тирозиназа *V. spinosum* наиболее активна при нейтральном рН.

Тот факт, что тирозиназа *V. spinosum* имеет высокую активность в присутствии 1% или 2% SLS позволяет использовать данный фермент для превращения остатков L-тирозина в ДОФА в белках, находящихся в составе телец включения и плохо растворимых при физиологических значениях рН. Такие белки могут быть извлечены из телец включения в буфер с рН ~7, содержащий SLS, и полученный раствор может быть обработан тирозиназой. В ходе предварительных экспериментов подобный процесс был использован для формирования остатков ДОФА в рекомбинантном адгезивном белке, который синтезировали клетки штамма-производителя в отсутствие эндогенной тирозиназы (данные не приведены). Ниже описан эксперимент, в ходе которого

Таблица 2

Параметры модели ферментативной реакции с участием тирозиназы в присутствии различных концентраций мочевины и SLS

Model parameters for tyrosinase enzymatic reaction in the occurrence of urea and SLS in various concentrations

Концентрация	$ОП_{\max}$	$t_{1/2}$, мин	n	R^2
Мочевина, М				
1,0	1,84817	9,8114	1,22900	0,99626
2,0	1,83082	15,2377	1,65844	0,99182
3,0	1,85110	19,0919	1,51971	0,99941
4,0	2,13995	42,8441	1,21419	0,99399
4,5	1,27248	12,2036	1,26102	0,99965
5,0	–	205,8750	–	0,96870
6,0	–	102,2980	–	0,99820
SLS, % (об./масса)				
0	1,95445	8,58044	1,21476	0,99698
1	2,15906	7,19642	0,97535	0,98556
2	2,08482	4,35250	1,15683	0,99159

Примечание: при концентрации мочевины 5 М или 6 М период времени $t_{1/2}$ существенно превосходит длительность эксперимента, поэтому полученные значения следует рассматривать как дальние экстраполяции. Пригодность уравнения Хилла для предсказания кинетических кривых по экстраполированным временным точкам не исследовали, поэтому для концентраций мочевины 5 М и 6 М оценки $ОП_{\max}$ и n не приведены.

Footnote: the $t_{1/2}$ periods for the urea concentrations of 5 M and 6 M are significantly longer than the time of observation; therefore, the obtained values should be regarded as long-range extrapolations. The validity of the Hill equation for the prediction of kinetic curves on extrapolated time points has not been investigated; therefore, the OD_{\max} and n values for the urea concentrations of 5 M and 6 M are not shown.

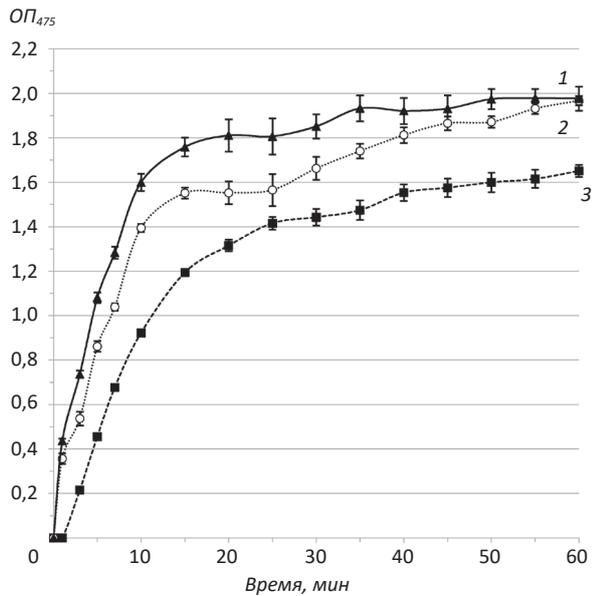


Рис. 7. Активность рекомбинантной тирозиназы *V. spinosum* при начальной концентрации субстрата 1,75 мМ в присутствии детергента лаурилсаркозината натрия (SLS) в различных концентрациях; кривая 1 – 2%; кривая 2 – 1%; кривая 3 – 0%. Приведены средние по трем экспериментам значения оптической плотности и отклонения

Fig. 7. The activity of recombinant tyrosinase *V. spinosum* at an initial substrate concentration of 1.75 mM in the presence of sodium lauryl sarcosinate detergent (SLS) in various concentrations; curve 1, 2%; curve 2, 1%; curve 3, 0%. Mean values of optical densities and deviations for three experiments are represented

рекомбинантный адгезивный белок и тирозиназа одновременно синтезируются в клетках штамма-продуцента.

Копродукция адгезивного белка и тирозиназы

Рекомбинантный адгезивный белок Fr-131 впервые описан в работе [16]. Центральная часть белка Fr-131 совпадает по аминокислотной последовательности с белком MFP-3, который является одним из основных белковых компонентов прикрепительных дисков биссусных нитей [10]. MFP-3 обладает выраженной способностью «покрывать» (т.е. образовывать мономолекулярный слой из плотно уложенных молекул) поверхности различных материалов и тем самым придавать им свойство слипаться друг с другом [12]. На N- и C-концах Fr-131 присутствуют тандемные повторы (по 6 повторов на каждом конце) мотива АКPSYPPTYК (в последовательности белка мидий MFP-1 указанный мотив повторяется 80 раз). Наличие указанного данного мотива улучшает растворимость Fr-131 [22].

Синтетический ген Fr-131 был клонирован в составе гибридного гена, кодирующего слитый адгезивный белок (Trx-Fr-131), у которого на N-конце дополнительно присутствует последовательность тиоредоксина *E. coli* (рис. 9). Расчетная молекулярная масса белка Trx-Fr-131 равна 37,9 кДа.

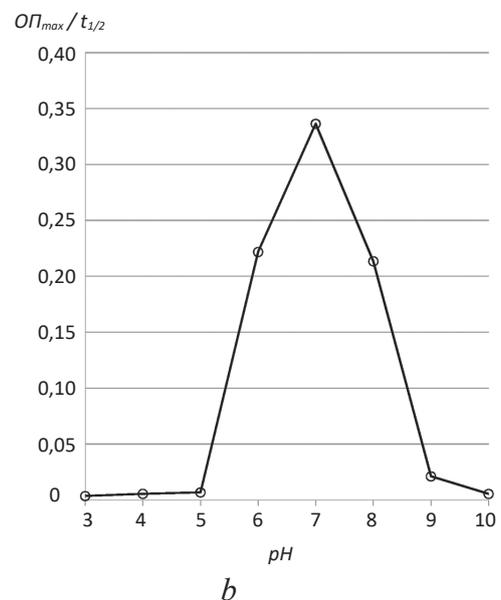
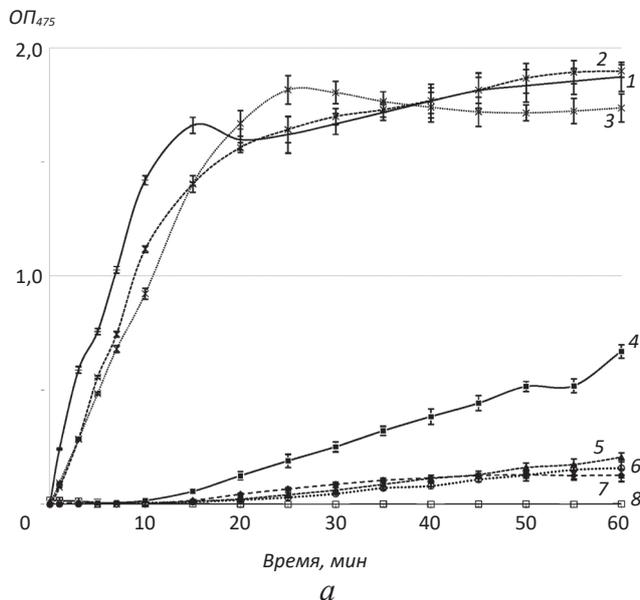


Рис. 8. Определение pH-оптимума рекомбинантной тирозиназы *V. spinosum*: a – кинетические кривые реакции с участием тирозиназы при различных pH; b – активность тирозиназы, вычисленная по формуле (2). Кривая 1 – pH 7; кривая 2 – pH 6; кривая 3 – pH 8; кривая 4 – pH 9; кривая 5 – pH 5; кривая 6 – pH 10; кривая 7 – pH 4; кривая 8 – pH 3. Приведены средние по трем экспериментам значения оптической плотности и отклонения

Fig. 8. pH optimum for *V. spinosum* recombinant tyrosinase: (a) - kinetic curves of the tyrosinase reaction at various pH values; (b) - tyrosinase activity calculated from formula (2). Curve 1, pH 7; curve 2, pH 6; curve 3, pH 8; curve 4, pH 9; curve 5, pH 5; curve 6, pH 10; curve 7, pH 4; curve 8, pH 3. Mean values of optical densities and deviations from three experiments are represented

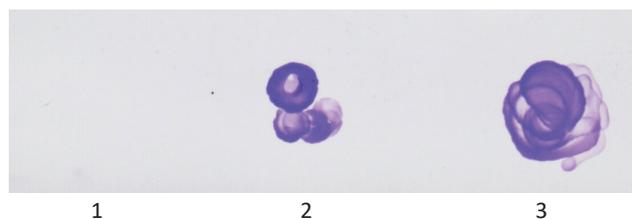


Рис. 11. Результаты NBT-теста на присутствие в адгезивном белке продуктов модификации тирозина, которые образуются в результате действия тирозиназы (ДОФА и ДОФА-хинон). 1 – место нанесения лизоцима (отрицательный контроль); 2 и 3 – места нанесения адгезивного белка Trx-Fp-131

Fig. 11. NBT test for the occurrence of products of tyrosine modification by tyrosinase (DOPA and DOPA-quinone). (1), zone of lysozyme application (negative control); (2) and (3), zones of application of Trx-Fp-131 adhesive protein

с NBT, что доказывает присутствие в продукте посттрансляционных модификаций, аналогичных тем, которые обеспечивают белкам MFP их адгезивные свойства.

Для измерения адгезионной прочности клевого шва, полученного с помощью белка Trx-Fp-131, определяли массу груза, который выдерживали склеенные металлические пластины. Пластины закрепляли на пружинных весах, к свободному концу одной из них подвешивали груз (**Дополнительный материал, рис. S1**)*.

Разрыв клевого соединения происходил после подвешивания груза массой ~26,8 кг. С учетом площади клевого соединения (2,2 см²) адгезионная прочность клевого шва составила ~2,5 МПа. Данное значение соответствует верхней границе значений адгезионной прочности для клеев на основе MFP и в десятки раз превосходит адгезионную прочность традиционных медицинских клеев на основе фибрина, например, сиаланта TISSEEL (9 кПа) [32].

Природные MFP, выделенные из биссуса мидий, демонстрируют адгезионную прочность в диапазоне 0,3–2 МПа, а для рекомбинантных MFP была зафиксирована адгезионная прочность на уровне до 4 МПа [22–24].

В настоящее время сложилось следующее представление о механизме адгезии в водной среде при участии ДОФА, изучение которого привело к появлению новой области применения тирозиназ. Остатки ДОФА в MFP участвуют

в двух фазах молекулярной адгезии. В ходе первой фазы гидроксильные группы остатков ДОФА образуют координационные связи с атомами тяжелых металлов либо с атомами кислорода, присутствующими на поверхности природных твердых субстратов [25]. Если процесс идет в морской воде, остатки ДОФА вытесняют молекулы воды и солей из пограничного слоя между белком MFP и твердой фазой. Данная способность отличает MFP от большинства синтетических клеев, которые характеризуются слабой адгезией в водной среде из-за высоких диэлектрических и сольватационных свойств воды. В ходе второй фазы адгезивный белок за счет высокой реакционной способности ДОФА образует ковалентные связи с другими веществами, в том числе молекулами, прочно адсорбированными на поверхности субстрата [26, 27].

Мы также провели эксперименты по склеиванию с помощью адгезивного белка стальных адгезивов под водой. Адгезивный белок обеспечивал склеивание и в этих условиях, однако адгезионная прочность клевого шва оказалась достоверно меньше (<2 МПа); снижалась также его видимая толщина. Мы предполагаем, что из-за хорошей растворимости адгезивного белка Trx-Fp-131 в воде часть его при нейтральном pH вымывается из места склеивания, что приводит к снижению прочности и толщины шва.

В течение долгого времени практическое применение MFP было ограничено из-за малой доступности таких белков, что связано с необходимостью их выделения из природных источников. Эта проблема была решена с помощью генной инженерии, которая позволяет производить рекомбинантные аналоги природных MFP [28–30]. Адгезивный белок Fp-131, состоящий из последовательностей MFP-1 и MFP-3, был впервые описан в [22]. В нашей работе Fp-131 был получен в варианте слитого с тиоредоксином белка (Trx-Fp-131), так как, по нашим данным, продукция Fp-131 токсична для клеток выбранного штамма-продуцента, а экспрессия гена Trx-Fp-131 не снижает скорость роста культуры штамма-продуцента. Была реализована копродукция белка Trx-Fp-131 и рекомбинантной тирозиназы *V. spinosum* за счет создания штамма, содержащего одновременно две соответствующие экспрессионные плазмиды. Они обуславливают резистентность к двум

*Электронная версия статьи содержит дополнительный материал, доступный безвозмездно на сайте журнала <http://www.biotechnology-journal.ru/>

разным антибиотикам, что позволяет поддерживать штамм-продуцент на среде, содержащей оба эти антибиотика.

В ходе коэкспрессии белок Trx-Fp-131 накапливается в тельцах включения, а тирозиназа остается в растворимой фракции. По-видимому, по этой причине рекомбинантная тирозиназа удаляется в ходе отмывки телец включения и не обнаруживается в качестве существенной примеси в препаратах очищенного Trx-Fp-131.

Однако полученный адгезивный белок Trx-Fp-131 демонстрирует способность восстанавливать NBT с образованием формазана, что доказывает наличие в препарате очищенного белка катехолов и/или хинонов, т.е. продуктов активности тирозиназы, которые придают природным белкам MFP их адгезивные свойства [31].

По литературным данным, адгезивные белки мидий обладают клеящей способностью в отношении различных материалов. В работе [11] продемонстрирована способность MFP покрывать гидрофильную поверхность диоксида кремния (экспонирует атомы кислорода) и слюды (атомы кислорода и катионы K и Na). Та же активность MFP показана и в отношении гидрофобных поверхностей – плексигласа (полиметилметакрилата) (экспонирует карбоксильные группы) и полистирола (фенильные группы). Способность MFP прикрепляться к поверхности материалов с разными физико-химическими свойствами объясняют тем, что аминокислотные остатки в ДОФА-содержащих белках способны взаимодействовать с молекулярными ландшафтами благодаря разнообразным (электростатическим, водородным, *p-p* и *p-катионным*) связям [33].

Таким образом, в нашей работе продемонстрирована возможность получать в практически значимых количествах как рекомбинантную тирозиназу с высокой удельной активностью, так и адгезивный белок в результате коэкспрессии соответствующих генов [34].

Среди новейших и пока еще экспериментальных областей применения тирозиназ – использование их в биоорганическом синтезе и для производства биосовместимых адгезивных материалов.

Высокая адгезионная прочность полученного нами белка Trx-Fp-131 была продемонстрирована в экспериментах по склеиванию стальных пластин на воздухе (2,5 МПа), и в воде (около 2 МПа). В предварительных экспериментах мы наблюдали также прочное склеивание стеклянных адгерентов (данные не приведены).

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки Республики Казахстан №0115PK01798 «Биоадгезивные микрочастицы, выделяющие антимикробные пептиды – новый препарат для профилактики и лечения кариеса».

ЛИТЕРАТУРА

- Hagbreen K., Tan E.W. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. *Anal. Biochem.* 2003, 312, 23–32. PMID: 12479831.
- Fairhead M., Thöny-Meyer L. Role of the C-terminal extension in a bacterial tyrosinase. *FEBS J.* 2010, 277(9), 2083–2095. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07621.x
- Ensunchó L., Alvarez-Cuenca M., Legge R.L. Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2005, 27, 185–191. doi: 10.1007/s00449-005-0400-x.
- Ikehata K., Nicell J.A., Characterization of tyrosinase for the treatment of aqueous phenols. *Bioresour. Technol.* 2000, 74, 191–199. PMID: 11925171.
- Tembe S., Karve M., Inamdar S. Development of electrochemical biosensor based on tyrosinase immobilized in composite biopolymeric film. *Anal. Biochem.* 2006, 349, 72–77. doi:10.1016/j.ab.2005.11.016
- Nistor C., Emneus J., Gorton L. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. *Anal. Chim. Acta.* 1999, 387, 309–326. doi: 10.1016/S0003-2670(99)00071-9
- Irimia-Vladu M. “Green” electronics: biodegradable and biocompatible materials and devices for sustainable future. *Chem. Soc. Rev.* 2014, 43(2), 588–610. doi: 10.1039/C3CS60235D
- Koyanagi T., Katayama T., Suzuki H. Effective production of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) with *Erwinia herbicola* cells carrying a mutant transcriptional regulator TyrR. *J. Biotechnol.* 2005, 115, 303–306. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.08.016
- Lee B.P., Messersmith P., Israelachvili J.N. Mussel-Inspired Adhesives and Coatings. *Annu Rev. Mater. Res.* 2011, 41, 99–132. doi: 10.1146/annurev-matsci-062910-100429
- Lin Q., Gourdon D., Sun C., Holten-Andersen N. Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007, 104(10), 3782–3786. doi: 10.1073/pnas.0607852104
- Lu Q., Danner E., Waite J.H., Israelachvili J.N., et al. Adhesion of mussel foot proteins to different substrate surfaces. *J. R. Soc. Interface.* 2013, 10(79), 56–68. doi: 10.1098/rsif.2012.0759
- Yu J., Kan Y., Rapp M., et al. Adaptive hydrophobic and hydrophilic interactions of mussel foot proteins with organic thin film. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013, 110(39), 15680–15685. doi: 10.1073/pnas.1315015110

13. Clancy S. K., Sodano A., Cunningham D. J., et al. Marine Bioinspired Underwater Contact Adhesion. *Biomacromolecules*. 2016, 17(5), 1869–1874. doi: 10.1021/acs.biomac.6b00300
14. Li A., Mu Y., Jiang W., et al. A mussel-inspired adhesive with stronger bonding strength under underwater conditions than under dry conditions. *Chem. Commun. (Camb)*. 2015, 51(44), 9117–9120. doi: 10.1039/c5cc00101c
15. Jeon E.Y., Hwang B.H., Yang Y.J., et al. Rapidly light-activated surgical protein glue inspired by mussel adhesion and insect structural crosslinking. *Biomaterials*. 2015, 67, 11–19. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.07.014
16. Selinheimo E., NiEidhin D., Steffensen C. Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *J. Biotechnol.*, 2007, 130(4), 471–480. doi: 10.1016/j.jbiotec.2007.05.018
17. Sevastyanov O.V. Properties of tyrosinase of fungi *Agaricus bisporus* and its use for the elimination of chlorinated phenols. *Bulletin Odessa National University. Chemistry*. 2009, 14 (3), 28–35.
18. Kamal U. Z., Ayesha S. A., Sharique A. A., Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom. *Enzyme Research*. 2014, 10, 22–27. doi:10.1155/2014/120739
19. Santos V.P.S. dos, Mendonca C., Pereira P.R., et. al. Comparacao de metodos de extracao e caracterizacao da enzima tirosinase de agaricus bisporus. *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Quimica*. 2015, 2, 603–610. doi: 10.5151/chemeng-cobeq2014-0435-25499-174494
20. Marková E., Kotik M., Křenková A., et. al. Recombinant Tyrosinase from *Polyporus arcularius*: Overproduction in *Escherichia coli*, Characterization, and Use in a Study of Aurones as Tyrosinase Effectors. *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64(14), 2925–2931. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00286
21. Aoife M. M., Evelyn M. D., Sarah B., et.al. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007 (40), 1435–1441. doi: 10.1016/j.enzmitec.2006.10.020
22. Lim S., Choi Y.S., Kang D.G., et al. The adhesive properties of coacervated recombinant hybrid mussel adhesive proteins. *Biomaterials*. 2010, 31(13), 3715–3722. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.063.
23. Choi Y.S., Yang Y.J., Yang B. *In vivo* modification of tyrosine residues in recombinant mussel adhesive protein by tyrosinase co-expression in *Escherichia coli*. *Microb. Cell. Fact.* 2012, 11, 139. doi: 10.1186/1475-2859-11-139
24. Yang B., Kang D.G., Seo J. H., et al. A comparative study on the bulk adhesive strength of the recombinant mussel adhesive protein fp-3. *Biofouling*. 2013, 29(5), 483–490. doi: 10.1080/08927014.2013.782541
25. Yu J., Wei W., Menyo M.S., et al. Adhesion of mussel foot protein-3 to TiO₂ surfaces: the effect of pH. *Biomacromolecules*. 2013, 14(4), 1072–1027. doi: 10.1021/bm301908y
26. Haemers S., Koper G.J., Frens G. Effect of oxidation rate on cross-linking of mussel adhesive proteins. *Biomacromolecules*. 2003, 4(3), 632–640. doi: 10.1021/bm025707n
27. Monahan J., Wilker J.J. Cross-linking the protein precursor of marine mussel adhesives: bulk measurements and reagents for curing. *Langmuir*. 2004, 20(9), 3724–3729. PMID:15875406
28. Zeng H., Hwang D. S., Israelachvili J. N., and Waite J. H. Strong reversible Fe³⁺-mediated bridging between dopa-containing protein films in water. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010, 107, 12850–12853. doi: 10.1073/pnas.1007416107
29. Hwang D.S., Gim Y., Cha H.J. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein type 3A in *Escherichia coli*. *Biotechnol Prog.* 2005, 21(3), 965–970. doi:10.1021/bp050014e
30. Hwang D.S., Yoo H.J., Jun J.H., et al. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein Mgf-5 in *Escherichia coli*. *Appl. Environ Microbiol.* 2004, 70(6), 3352–3359. doi: 10.1128/AEM.70.6.3352-3359.2004
31. Briceno A., Munoz P., Brito P., et al. Aminochrome Toxicity is Mediated by Inhibition of Microtubules Polymerization Through the Formation of Adducts with Tubulin. *NeurotoxRes.* 2016, 29, 381–393. doi: 10.1007/s12640-015-9560-x.
32. Zhou J., Defante A.P., Lin F., et al. Adhesion properties of catechol-based biodegradable amino acid-based poly (ester urea) copolymers inspired from mussel proteins. *Biomacromolecules*. 2015, 16(1), 266–274. doi: 10.1021/bm501456g
33. Jing Yu, Kan Yajing, Rapp M., et al. Adaptive hydrophobic and hydrophilic interactions of mussel foot proteins with organic thin films. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013, 110(39), 15680–15685. doi: 10.1073/pnas.1315015110
34. Axambayeva A.S., Shagyrova Zh.S., Shustov A.V., et.al. Novel material: biocompatible glue for use in biology and medicine – recombinant mussel adhesive proteins. *Eurasian J. Appl. Biotechnol.*, 2016, 3, 24–35.

Recombinant Tyrosinase from *Verrucomicrobium spinosum*: Isolation, Characteristics and Use for Production of Protein with Adhesive Properties

A.S. AKSAMBAYEVA^{1,*}, L.R. ZHAPAROVA¹, Zh.S. SHAGYROVA¹, E. ZHIYENBAY², T.S. NURGOZHIN², E.M. RAMANKULOV², and A.V. SHUSTOV¹

¹The National Center for Biotechnology, 010000, Astana Republic of Kazakhstan

²The Nazarbayev University, 010000, Astana Republic of Kazakhstan

e-mail: altyn-ai@bk.ru*

Received May 12, 2017

Accepted October 10, 2017

Abstract—The recombinant tyrosinase from the *Verrucomicrobium spinosum* bacterium has been obtained using the heterological expression in *E. coli* and isolated in the pure state to determine a number of its biochemical properties (kinetics of the enzymatic reaction, effect of an inhibitor and activator, and pH optimum). Co-expression of the genes for tyrosinase and recombinant adhesive mussel protein in one producer strain was used to introduce post-translational modifications into the adhesive protein. These modifications included the tyrosine transformation into DOPA residues which gives the protein an ability of molecular adhesion in aqueous medium. The resulting adhesive protein showed unexpectedly high adhesion strength of 2.5 MPa, which exceeds the corresponding values for natural adhesive proteins and is by a few tens times superior to the existing medical fibrin-based medical glues.

Key words: tyrosinase, enzymatic activity, DOPA, adhesive protein, adhesion strength, biocompatible glue.

Acknowledgements—The work was supported by the Grant from the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan (0115PK01798) «Bioadhesive Microparticles Releasing Antimicrobial Peptides, a New Preparation for Prophylaxis and Therapy of Caries».

doi: 10.21519/0234-2758-2017-33-6-12-27