

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

---

*На правах рукописи*

Поварова Наталья Владимировна

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

специальность – 03.01.03 (молекулярная биология)

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
член-корреспондент РАН  
доктор биологических наук  
Лукьянов Константин Анатольевич

Москва - 2019

# Содержание

1	Введение .....	5
2	Обзор литературы .....	6
2.1	Формирование спикул губок .....	6
2.1.1	Внутриклеточное формирование спикул.....	7
2.1.2	Радиальный рост спикул .....	9
2.1.3	Внеклеточная фаза формирования спикул .....	10
2.2	Сборка филаментов .....	10
2.2.1	Мультимеризация силикатеинов .....	11
2.2.2	Образование филаментов смешанного состава .....	16
2.3	Конденсация кремния .....	18
2.3.1	Полимеризация соединений кремния .....	18
2.3.2	Полимеризация кремнезема без участия силикатеинов.....	33
2.4	Заключение.....	35
3	Материалы и методы исследования.....	36
3.1	Методы работы с нуклеиновыми кислотами .....	36
3.1.1	Выделение и очистка плазмидной ДНК .....	36
3.1.2	Электрофорез в агарозном геле .....	36
3.1.3	Клонирование .....	36
3.1.4	Мутагенез.....	40
3.2	Трансформация бактерий .....	45
3.2.1	Химическая трансформация .....	45
3.2.2	Электрическая трансформация.....	45
3.2.3	Проверка генетических конструкций.....	45
3.3	Методы работы с белками .....	46
3.3.1	Выделение и очистка белков.....	46

3.3.2	Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле.....	47
3.4	Измерение спектра кругового дихроизма .....	48
3.5	Синтез субстратов силикатеина .....	48
3.6	Методы детекции силикатеиновой активности.....	48
3.6.1	Получение частиц аморфного кремнезема.....	48
3.6.2	Сканирующая электронная микроскопия (SEM) и элементный анализ .....	49
3.6.3	Колориметрическое определение содержания силиката .....	50
3.7	Анализ цитотоксичности .....	51
3.8	Компьютерная обработка данных.....	52
4	Цели и задачи .....	53
4.1	Цель.....	53
4.2	Задачи .....	53
5	Результаты и обсуждение.....	54
5.1	Выбор субстрата .....	54
5.1.1	Активность силикатеина А1 с различными субстратами .....	55
5.1.2	Стабильность субстратов в водных растворах.....	57
5.1.3	Токсичность субстратов .....	58
5.2	Свойства силикатеина А1 .....	59
5.2.1	Кинетика полимеризации кремнезема .....	60
5.2.2	Эффект от образования дисульфидных связей .....	64
5.2.3	Зависимость активности силикатеина от концентрации субстрата .....	64
5.2.4	Зависимость эффективности реакции от концентрации белка.....	66
5.2.5	Зависимость полимеризации кремнезема от рН .....	66
5.2.6	Зависимость полимеризации кремнезема от температуры .....	68
5.2.7	Сравнение субстратов в оптимальных условиях .....	69
5.3	Анализ активности силикатеина А1 и родственных белков .....	70

5.3.1	Выбор позиций для мутагенеза .....	71
5.3.2	Анализ мутантов силикатеина A1 и катепсина L <i>L. oparinae</i> .....	73
5.3.3	Анализ силикатеиновой активности катепсина L человека .....	74
6	Выводы.....	84
7	Список работ, опубликованных по теме диссертации .....	85
8	Список сокращений .....	86
8.1	Реактивы .....	86
8.2	Белки .....	86
9	Список литературы .....	87

# 1 Введение

В мире насчитывается около 8000 видов губок. 90% известных видов имеют скелет из спикул, образованных белковыми фибриллами и диоксидом кремния. Кремниевые спикулы отличаются по размеру, форме, физическим и оптическим свойствам. И в то время как технологии для полимеризации оксида кремния требуют экстремально высоких температур и давления, а также продолжительного времени, образование спикул внутри губок происходит при нейтральном или слабощелочном pH за короткий срок.

Органический и неорганический компоненты спикул активно изучались исследователями по всему миру, особенно последние 20 лет. Авторы описывали особенности строения полимеризованного кремнезема, идентифицировали вовлеченные в образование спикул биомолекулы и изучали их свойства. Особое внимание исследователей привлекал механизм каталитической активности биологических полимеров - что именно позволяет конденсировать оксид кремния быстро и в мягких условиях?

В разных работах предложены разные механизмы этого процесса. Различаются и полимеры, вовлеченные в катализ, и сами реакции, которые осуществляет органический компонент спикул. Несмотря на значительные разногласия, на основе предложенных моделей были синтезированы катализаторы, осуществляющие полимеризацию кремнезема в нейтральных условиях. С использованием белков губок были получены различные наноматериалы.

Понимание механизмов, обеспечивающих образование частиц кремнезема, позволит контролировать и направлять синтез наноматериалов, и получать кристаллический кремнезем с необходимыми свойствами и формой при физиологических условиях.

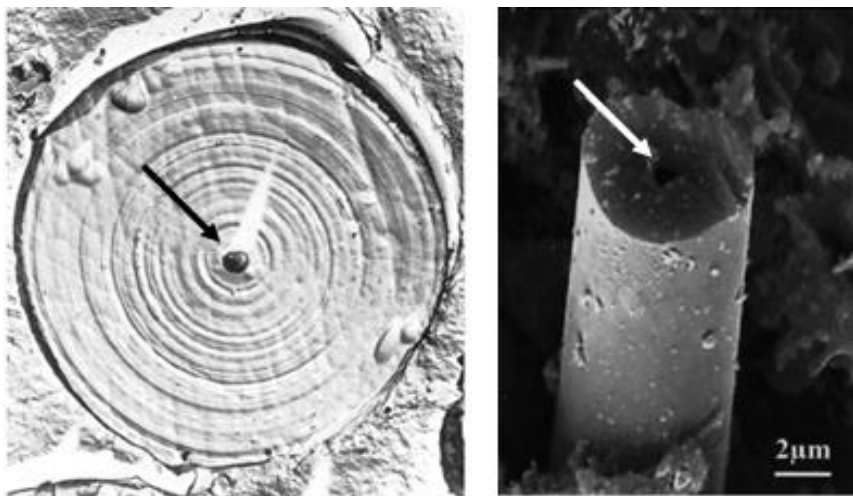
В данной работе изучены свойства силикатеина A1 - основного белка, участвующего в образовании спикул обыкновенной губки *Latrunculia oparinae*. Предложены кремний-содержащие субстраты фермента, определены оптимальные условия его активности. Также проведен мутационный анализ аминокислотных остатков, вовлеченных в полимеризацию кремнезема согласно существующим моделям ферментативной активности силикатеина. Оценена силикатеиновая активность двух родственных белков - катепсина *L. oparinae* и катепсина L человека, а также мутантных вариантов этих белков.

## 2 Обзор литературы

### 2.1 Формирование спикул губок

Губки (тип Porifera, в том числе Обыкновенные губки Demospongiae и Стеклянные губки Hexactinellida) являются старейшим таксоном многоклеточных животных, существующим в наши дни. Обыкновенные и стеклянные губки имеют минеральный скелет, состоящий из разнообразных по форме структур - спикул. Образование спикул в кремниевых губках включает процесс ферментативной поликонденсации диоксида кремния, или кремнезема. Этот неорганический полимер синтезируется ферментом силикатеином [1,2].

Силикатеины относятся к семейству цистеиновых папаин-подобных протеаз, особенно велика гомология с катепсинами L. Между белками консервативны положения остатков активного центра и остатков цистеина, вовлеченных в образование дисульфидных связей [1,2]. Как и катепсины, силикатеины обладают протеолитической активностью [3,4,5]. Основным отличием силикатеинов считается различие в активном центре белка. Каталитическую триаду катепсина L образуют остатки Cys-His-Asp, у силикатеинов же каталитический Cys заменен остатком Ser. [1,6]. Еще одним отличием силикатеина от катепсина является наличие полисеринового тракта - участка, обогащенного остатками серина - его продолжительность варьирует у разных видов губок и составляет от 5 до 7 остатков. И в целом содержание гидроксикаминокислот в силикатеинах значительно выше, чем в катепсинах. [1,7,8].



**Рисунок 1.** Электронная микрофотография поперечного среза спикулы губки *Acarnus erithacus* [14] (слева) и сломанной спикулы губки *Crambe crambe* (справа) [15]. Стрелкой отмечен осевой канал, в котором располагается аксиальный филамент.

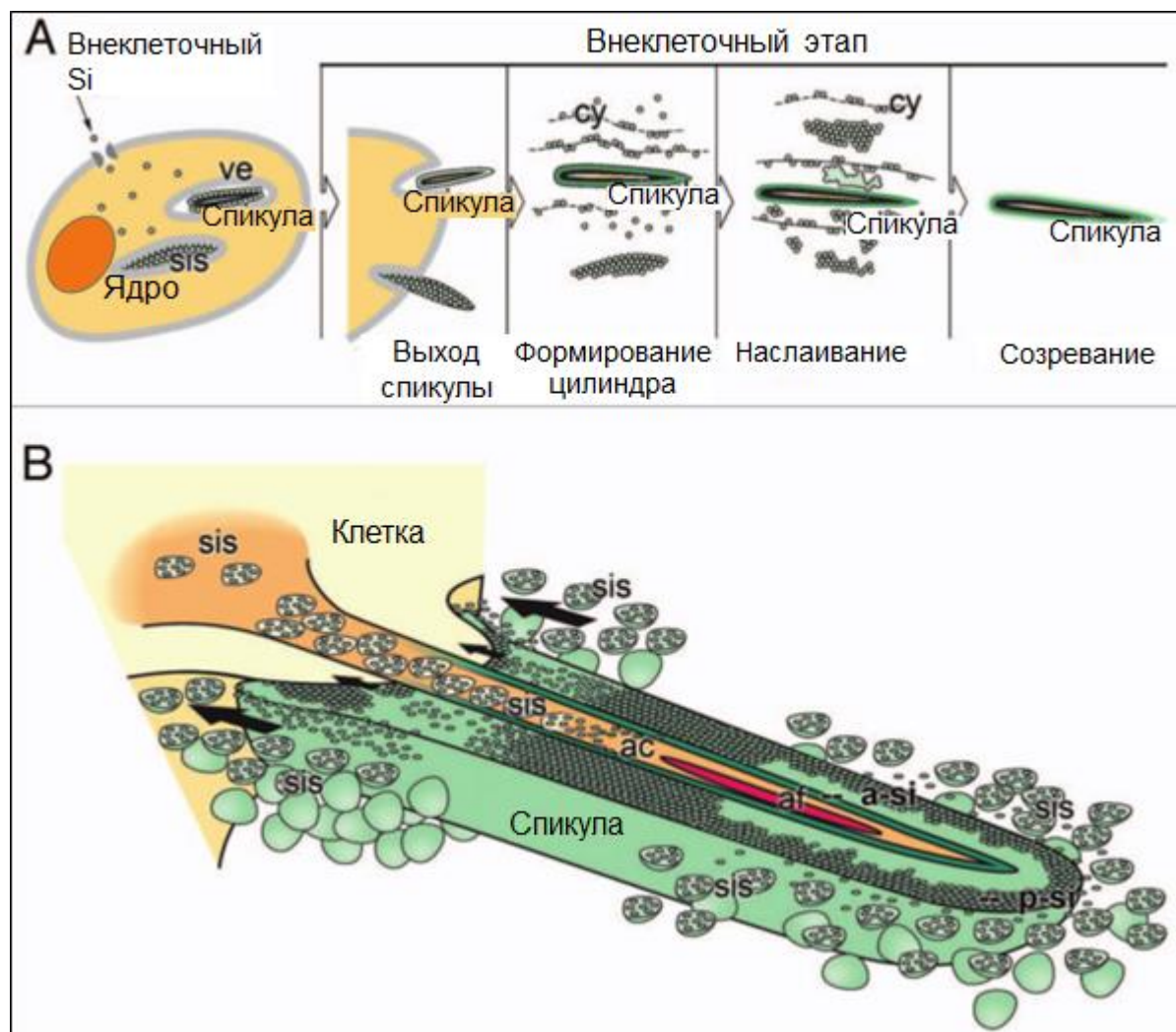
Силикатеин расположен в центральном осевом канале спикулы (рис. 1), где он образует мультимеры. [4,9]. Стабилизация этих мультимеров часто достигается дополнительными белками [10–12], вместе с силикатеином образующими органический компонент спикулы - аксиальный филамент. После того, как силикатеин был описан в качестве основного компонента аксиального филамента, фермент также обнаружили вне спикул [1,13]. Расположенные внутри и снаружи спикулы молекулы фермента обеспечивают и направляют рост спикулы.

### 2.1.1 Внутриклеточное формирование спикул

Одним из основных объектов изучения формирования спикул *in vivo* стала губка *Suberites domuncula* [13]. До недавнего времени определение типов клеток в губках представляло проблему [16], но затем стали использоваться молекулярные маркеры, позволяющие различить некоторые этапы дифференциации стволовых клеток линии склероцитов. Так, клетки, которые участвуют в образовании спикул, экспрессируют силикатеин [17]. В этих клетках спикулы формируются либо внутри ядра клетки [18], либо внутри определенных органелл, силикасом. Впервые такое формирование спикул было описано у *S. domuncula*, и впоследствии было подтверждено для *Corticium candelabrum* [13,19,20]. Очевидно, что не все спикулы, большинство из которых имеют размеры более 100 мкм, могут образовываться внутриклеточно. После достижения размеров около 7 мкм спикулы экструдируются из склероцитов во внеклеточное пространство, где происходит окончательное формирование спикул [13,19,20].

Общая схема образования спикул представляется следующей. Силикаты активно поглощаются ко-транспортером  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-[\text{Si}(\text{OH})_4]$  и концентрируются в цитоплазме, окружающей зону роста спикулы [15]. Силикатеин сначала синтезируется как про-фермент с массой 36,3 кДа (сигнальный пептид-пропептид-фермент) и через форму с массой 34,7 кДа (пропептид-зрелый фермент) переходит в зрелый фермент с массой 23 кДа. Отщепление пропептида происходит, вероятно, автокаталитически, внутри силикасомы [21]. При транспортировке через эндоплазматический ретикулум и комплекс Гольджи силикатеин подвергается фосфорилированию и переносится в везикулы, где он образует нити, будущие аксиальные филаменты (рис 2а). После сборки на нити образуется первый слой кремнезема. После достижения размера около 7 мкм незрелые спикулы экструдируются из склероцитов (рис.2а) [13]. Далее полимеризация

кремнезема происходит в двух направлениях: вдоль длинной оси спикулы и в радиальном направлении, что приводит к увеличению длины и толщины спикулы.



**Рисунок 2.** Схема формирования спикулы *S. domuncula*. (А) Первичная спикула образуется в везикулах (ve). Ортосиликат (Si) поглощается клетками и транспортируется в эти везикулы, также называемые силикасомами (sis). Спикула затем высвобождается во внеклеточное пространство, где она растет за счет активности цилиндрических слоев (cy) с высоким содержанием ортосиликата, которые концентрически расположены вокруг растущей спикулы. Ортосиликат полимеризуется и наслаивается на белковый стержень, в результате чего формируется зрелая спикула. (В) Процесс осевого роста спикулы через эвагинацию клеточного выступа и полимеризацию кремнезема. Клетка (склероцит) формирует осевой канал и высвобождает силикасомы (sis). В осевом канале (ac) силикасомы (sis) образуют центральные слои кремнезема (a-si), путем поликонденсации ортосиликата, которую катализирует силикатеин. Внешние силикасомы, которые секретируются клетками, окружают растущую спикулу, выделяют ортосиликат и силикатеин, которые образуют периферические слои кремнезема (p-si). Наконец, два кремниевых цилиндра сливаются вместе и образуют один сплошной стержень. Стрелки отмечают направление действия силы, которая возникает в результате роста спикулы, что приводит к транслокации растущей спикулы наружу из синтезирующей клетки [18].



Неожиданным стало открытие, что именно клеточные выступы направляют рост спикул [22]. До этого предполагалось, что осевой рост направляется за счет полярности в строении аксиального филамента [4]. Применение системы приморфов - трехмерной клеточно-тканевой культуры, позволило впервые провести исследование в контролируемых лабораторных условиях. Раньше, используя неповрежденных животных, такой процесс эвагинации не наблюдали, так как рост спикул был слишком быстрым [19]. При исследовании пресноводной губки *Ephydatia muelleri* было показано, что спикула длиной 200-350 мкм и толщиной 15 мкм полностью образуется в течение одного дня. Использование системы приморфов позволило исследовать срезы клеточных выступов с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Было обнаружено, что аксиальный филамент формируется и удлиняется внутри выступа одной клетки, заполняя пространство между поверхностью клетки и внутренней поверхностью осевого канала (рис.2В) [22].

Сформированные внутри клеток первичные спикулы экструдируются из клеток посредством (рис 2b), которая, по-видимому, обусловлена гидромеханическими силами. Эти силы являются результатом различий в силе сопротивления клеточной мембраны и осмотического давления. Ферментативная полимеризация кремнезема вызывает растяжение мембраны. Взаимодействия между клеткой и спикулой приводят к отталкиванию спикулы и клетки в противоположных направлениях. Таким образом, этот механизм позволяет полимеризовать кремнезем и параллельно направлять миграцию спикулообразующих клеток в сторону от растущей спикулы, растущей теперь в необходимой ориентации [22].

### 2.1.2 Радиальный рост спикул

Силикатная оболочка спикулы синтезируется с двух сторон. Сначала образуется внутренний слой вокруг аксиального филамента. Радиальный рост спикулы происходит путем образования органических цилиндров, расположенных телескопически вокруг первичной спикулы [11,13]. Внеклеточные молекулы силикатеина вместе с галектином или коллагеном, и мембранами силикасом [20] составляют концентрические цилиндры, внутри которых полимеризуется диоксид кремния. Ортосиликат и необходимые компоненты концентрируются вокруг растущей спикулы в пространстве, образованном псевдоподиями склероцитов [15]. Иммунологический анализ с антителами, меченными золотом, показал, что молекулы силикатеина выстраиваются тяжами, которые

организованы параллельно поверхности спикулы, но кристаллизация кремнезема начинается в регулярно распределенных зонах этих тяжей [11,15,23]. Рост и утолщение спикулы, по-видимому, происходит одновременно в двух направлениях - центробежно и центростремительно. Постепенно внешние слои соединяются с внутренним стержнем [24].

### 2.1.3 Внеклеточная фаза формирования спикул

Морфология спикул губки строго видоспецифична. Это означает, что синтез спикул контролируется генетически. Известно, что повышение концентрации силикатов воде повышает уровень экспрессии силикатеина и коллагена [6].

Идентификация генов и белков, контролирующих специфику формы и размеров спикул, а также определение вовлеченных клеточных компартментов и структур является сложной задачей. В настоящее время охарактеризованы только основные белки, участвующие в ферментативном образовании кремнеземных структур - силикатеины, силинтафин, коллаген и галектин [6,11,18,25,26]. Следующей задачей является определение факторов, которые направляют образование сложных спикул. Данные, полученные на модели *S. domuncula*, предполагают, что тяжи галектина организованы коллагеновыми волокнами в сетчатые структуры [11,18,25]. Весьма вероятно, что коллаген, который высвобождается специализированными клетками, колленцитами, создает платформу для морфогенеза спикул. Также было показано, что после ферментативного образования кремнезем подвергается процессу уплотнения путем образования дополнительных связей внутри полимера и удаления воды [27] Во время этого процесса образуются новые силоксановые связи, которые изменяют структуру и механические свойства биологически синтезированного полимера [26].

## 2.2 Сборка филаментов

Образование аксиальных филаментов, то есть органической основы спикулы, активно изучалось *in vitro*. Большая часть исследований посвящена мультимеризации силикатеинов, некоторые исследования включали также несиликатеиновые белки. Для понимания процесса образования спикул в губках, и для синтеза наноматериалов с желаемыми свойствами, имеют значение обе группы исследований.

### 2.2.1 Мультимеризация силикатеинов

Впервые силикатеин был обнаружен в спикулах обыкновенной губки *Tethya aurantium*. Спикулы составляют 75% сухого веса губки, из них аксиальные филаменты составляют только 0,1%. Длина филамента составляет около 2мм, а диаметр 2 мкм. Силикатеин  $\alpha$  - основной белок, который образует аксиальный филамент. Способность образовывать длинные структурированные фибриллы сразу была отмечена как отличительная особенность силикатеина. [1]

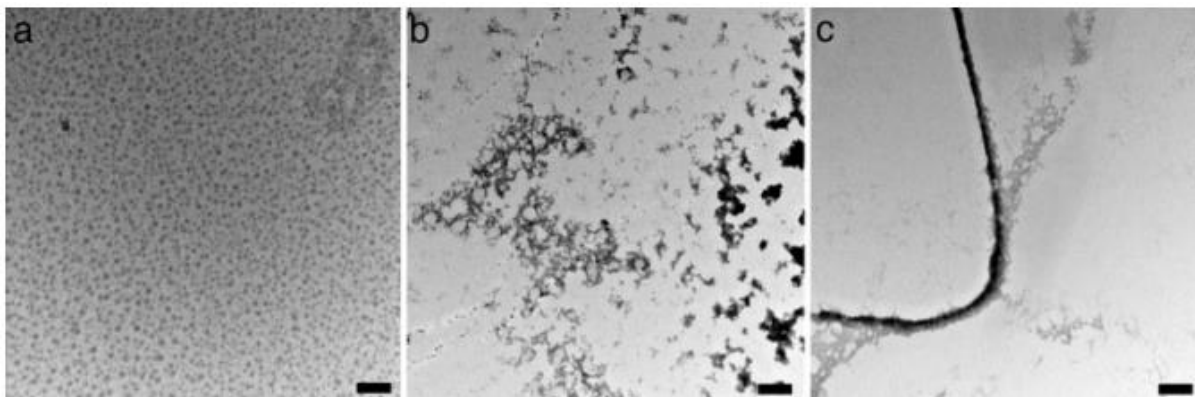
Существует два основных механизма образования белковых фибрилл. В первом мономеры располагаются параллельными нитями. Такой механизм характерен, например, для коллагеновых фибрилл [28]. Во втором глобулярные белки образуют спиральные протофиламенты, которые затем объединяются в структуры более высокого порядка, например, актиновые микрофиламенты или микротрубочки [29,30]. Исследования образования силикатеиновых филаментов показали, что механизм их формирования отличается от ранее описанных.

Одним из первоначальных предположений была олигомеризация молекул силикатеинов за счет гидрофобных взаимодействий. Для поиска гидрофобных областей силикатеин сравнили с белками из семейства катепсинов L. Эта группа катепсинов имеет около 70% сходства с силикатеинами, но не образует филаментов, и в отличие от силикатеинов, катепсины хорошо растворимы в воде. В работе [9] было идентифицировано пять гидрофобных участков, характерных для силикатеина  $\alpha$ .

Анализ светорассеяния разрушенных филаментов губки показал наличие частиц со средним радиусом 7 нм. После добавления DTT радиус частиц уменьшался до 4 нм. Дальнейшего уменьшения частиц не наблюдали. Оба значения значительно превышают теоретически ожидаемый размер 2,3 нм для мономера белка массой 23 кДа. Разницу между теоретическим и наблюдаемым в присутствии DTT радиусом мономера авторы объясняют частичным разворачиванием белка из-за разрушения внутримолекулярных дисульфидных связей. Соответственно, частицы с радиусом 7 нм образованы за счет межмолекулярных дисульфидных связей [9].

Сборку силикатеиновых филаментов наблюдали с помощью электронной микроскопии. Раствор силикатеина фильтровали от крупных филаментов, инкубировали необходимое время, затем аликвоту наносили на сетку для электронной микроскопии и контрастировали белок уранилацетатом. В образцах, зафиксированных через 15 минут инкубации, наблюдали сферы с диаметром 13-17 нм. Через 30 мин в образцах видели

сеть из молекул белка, а через час силикатеин образовывал нить толщиной 70-100 нм (рис. 3) Более крупных филаментов, характерных для живой губки, в экспериментах получить не удалось. При приближении рН исследуемого раствора с изоэлектрической точке белка образование филаментов замедлялось, а морфология нарушалась [9].



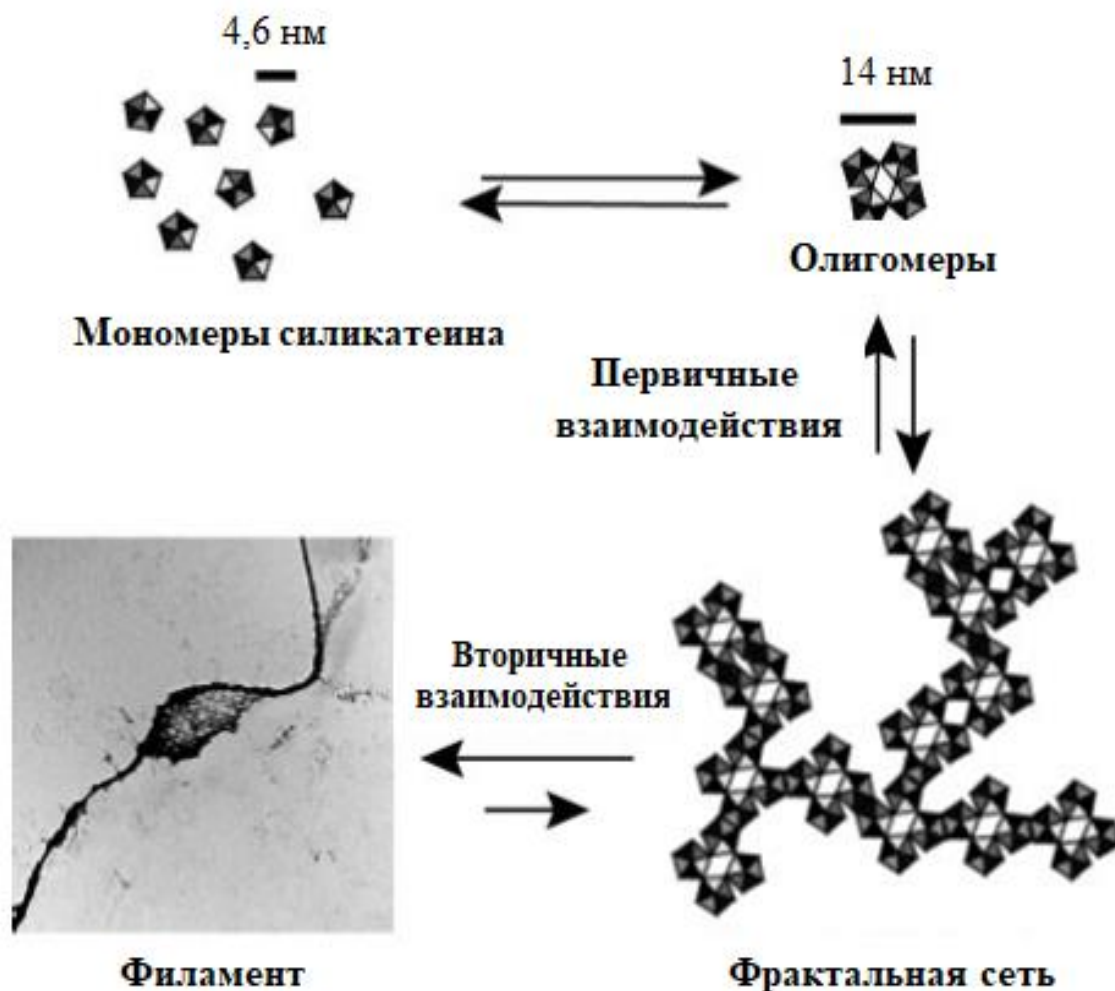
**Рисунок 3.** Просвечивающая электронная микроскопия самосборки филаментов силикатеинов. а - 15 минут инкубации, б - 30 мин, с - 60 мин. Масштабная линейка - 100 нм [9].

Наблюдаемая картина лучше всего описывается моделью агрегации, ограниченной диффузией, предложенной для коллоидных растворов. Ограниченная диффузией агрегация наблюдается в разбавленных растворах или суспензиях, в которых частицы подвержены броуновскому движению до момента столкновения и адгезии с другой частицей. Процесс повторяется много раз и приводит к формированию кластеров. Из-за стерических затруднений, частица с большей вероятностью взаимодействует с внешним краем растущего кластера, чем с его внутренней частью. Такое экранирование внутренней части кластера приводит к формированию разветвленных или древовидных фрактальных структур [9,31].

Существенным отличием силикатеиновых филаментов от предложенной модели является их явная полярность. Но это может быть связано с тем, что одни взаимодействия кластера и частицы предпочтительнее других в силу геометрии самой молекулы силикатеина. Еще одной особенностью формирования филаментов является их независимость от дополнительных факторов, особенно, источников энергии, таких как АТФ. Это означает, что вся необходимая для создания филамента информация содержится в первичной последовательности и пространственной структуре силикатеина [9].

На основе полученных данных авторы предложили модель сборки силикатеиновых филаментов. (рис. 4) Согласно модели, силикатеин образует олигомеры

за счет гидрофобных взаимодействий, стабилизированных дисульфидными связями. Дальнейшие этапы сборки приводят к образованию фрактальных структур, стабилизированных более слабыми, но регулярными взаимодействиями, например, ионными, гидрофобными или ванд-дер-ваальсовыми. Внутри фрактальных структур молекулы мономеров оказываются сближены и определенным образом ориентированы, что позволяет им вступать в дополнительные взаимодействия, приводящие к формированию филамента [9].



**Рисунок 4.** Модель сборки силикатеиновых филаментов [9].

В природе процесс перехода из фрактальной сети в филамент, вероятно, обеспечивается и другими белками. Так, в спикулах исследуемой *T. aurantium* обнаружено три формы силикатеина -  $\alpha$ ,  $\beta$  и гамма. Дополнительные белки могут усиливать полярность филамента.

Начальные этапы олигомеризации силикатеина изучали также на силикатеине  $\beta$ , основном силикатеине обыкновенной губки *Petrosia ficiformis*. Аналогично

силикатеину  $\alpha$  *T. aurantium*, силикатеин  $\beta$  *P. ficiformi* имеет на поверхности пять гидрофобных участков, которые могут быть вовлечены в олигомеризацию, но вот образование межмолекулярных дисульфидных связей подтвердить не удалось. Белок сохранял димерную форму даже после обработки ДТТ, а масс-спектрометрия не показала изменения массы белков до и после обработки. Этот неожиданный результат означает, что и внутримолекулярных S-S связей данный силикатеин  $\beta$  не образует [32].

Остатки цистеина, вовлеченные в образование дисульфидных связей в катепсине L, консервативны между катепсинами и силикатеинами [1]. Можно было бы предположить, что цистеиновые остатки оказались модифицированы во время жесткой экстракции филаментов из спикул (для растворения неорганического компонента применяется смесь плавиковой кислоты с фторидом аммония), но авторы проверили функциональную активность белка и наблюдали полимеризацию кремния [32]. Отсутствие дисульфидных связей может означать, что силикатеины и катепсины, несмотря на сходство аминокислотной последовательности, имеют сильно различающиеся пространственные структуры.

В работе на силикатеине  $\alpha$  губки *S. domuncula* было показано, что образование мультимеров, устойчивых в обработке восстановительными агентами, связано с экстракцией плавиковой кислотой и не наблюдается в более мягких условиях экстракции буферным раствором Tris-HCl с глицерином. На выделенном в мягких условиях силикатеине наблюдали изменение электрофоретической подвижности мономерной формы при обработке  $\beta$ -меркаптоэтанолом, что свидетельствует о разрушении внутримолекулярных дисульфидных связей [4].

Изучение олигомеризации в этой системе показало, что 15% глицерин влиял на олигомеризацию белка - до удаления глицерина в растворе обнаруживали только димеры силикатеина. Но после удаления глицерина из экстракта через 120 минут инкубации обнаруживали ди-, тетра-, и гексамеры силикатеина. Проверка протеолитической активности белков из двух экстрактов показала, что только мягкая экстракция позволяла получить активный белок, а обработка плавиковой кислотой блокировала протеолитическую активность силикатеина. Полимеризацию кремния в этой работе не исследовали [4].

Все три описанных белка идентичны по первичной структуре более чем на 75%, каталитические остатки и цистеины, предположительно вовлеченные в формирование внутримолекулярных дисульфидных связей, консервативны. Вероятно, различия в полученных результатах связаны с этапом экстракции белка из спикул. Во всех работах

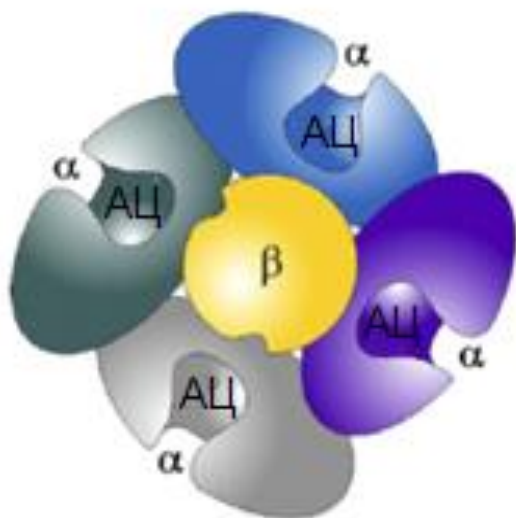
использовали экстракцию плавиковой кислотой. Первая же стадия растворения проводится до “полного растворения спикул” [1,4,32], которое определяется визуально, а время инкубации зависит от формы спикул и подготовки препарата спикул к растворению. Дополнительное время инкубации в смеси 2,5М HF с 8М NH<sub>4</sub>F может оказывать значительное воздействие на белок. Высокая степень гомологии с катепсином L, консервативное положение остатков цистеина, а также обнаруженная в двух из трех работ чувствительность к восстанавливающим агентам [4,9] предполагает, что дисульфидные связи все же вовлечены в поддержание трехмерной структуры и начальные этапы олигомеризации силикатеина.

Интересно, что обработка плавиковой кислотой по-разному влияла на различные активности фермента. Протеолитическая активность силикатеина после обработки HF полностью утрачивалась [4], а способность полимеризовать кремнезем не исчезала [32].

Исследование аксиальных филаментов *S. domuncula* также позволило смоделировать взаимодействие двух форм силикатеинов -  $\alpha$  и  $\beta$ . Ключевыми данными для модели стали количественное соотношение двух форм силикатеинов ( $\alpha$ : $\beta$  как 4:1) и анализ структуры аморфного кремнезема, который показал наличие планарных элементов [4,33].

Исходя из этого была предложена модель, согласно которой четыре молекулы силикатеина  $\alpha$  расположены вокруг одной молекулы силикатеина  $\beta$  (рис. 5). Авторы предположили, что полисериновый тракт каждой молекулы силикатеина  $\alpha$  должен быть направлен в центр олигомера, а активный центр наружу. Авторы не обсуждали, какие именно участки вовлечены во взаимодействие двух форм силикатеинов. Гидрофобные участки в предложенной модели не были картированы [4].

Следует отметить, что ни одно исследование олигомеризации силикатеина не учитывало пост-трансляционные модификации белка. В то время как, например, силикатеин  $\alpha$  *S. domuncula* имеет 5 изоформ, отличающихся степенью фосфорилирования [34], а силикатеин  $\beta$  *P. ficiformis* может быть моно- или бимителирован по N-концевой аминокислоте [32].



**Рисунок 5.** Схема строения олигомера силикатеина. Четыре молекулы силикатеина  $\alpha$  окрашены в серый, голубой, фиолетовый и коричневый, силикатеин  $\beta$  окрашен желтым. АЦ - активный центр [4].

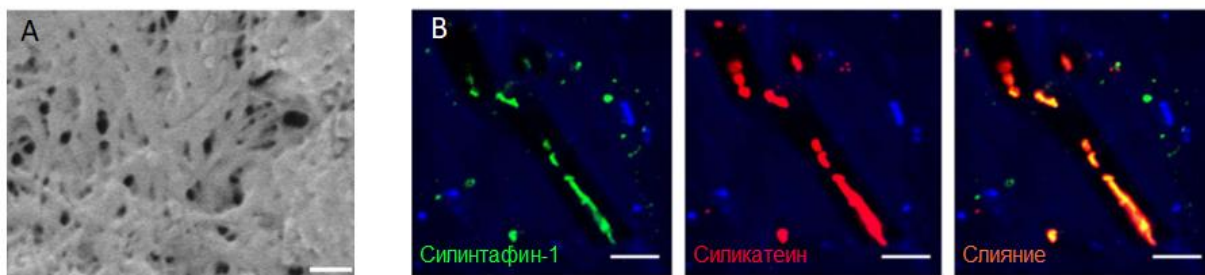
### 2.2.2 Образование филаментов смешанного состава

Методом дрожжевой двугибридной системы были выявлены белки, прямо взаимодействующие с силикатеином и участвующие в формировании аксиальных филаментов *S. domuncula*. Авторы назвали их силинтафин-1 и силинтафин-2.

Силинтафин-1 имеет массу 43 кДа. Авторы не обнаружили значительной гомологии ни с одним известным белком, за исключением участка в середине, представляющего собой РН-домен [10]. Этот домен отвечает за взаимодействие с фосфатидилинозитолом в составе липидов или белков. Также описано связывание доменом фосфорилированных остатков серина, треонина или тирозина [35]. Кроме того, в силинтафине-1 были обнаружены повторы, с большим количеством остатков пролина, полярных и заряженных аминокислотных остатков (РЕVК-сегменты) и несколько менее регулярных повторов [10].

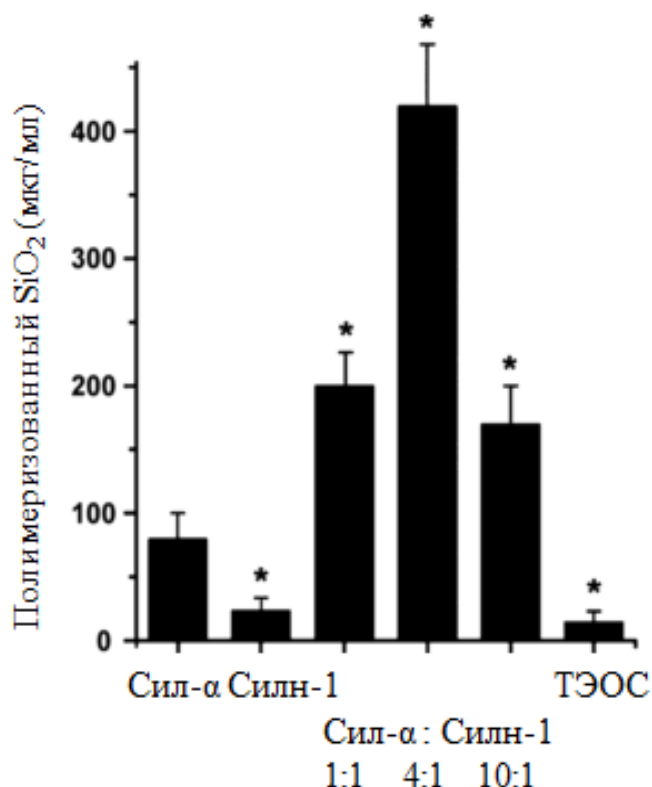
Электронная микроскопия осадка из раствора, содержащего силикатеин  $\alpha$  и силинтафин-1, показала наличие филаментов. Колоколизацию белков внутри аксиального филамента подтвердили с помощью иммунохимического анализа (рис. 6). Силинтафин-1 был обнаружен не только в составе аксиального филамента, но и во внешних слоях спикулы, что означает, что силинтафин-1 участвует также в радиальном росте спикулы [10].





**Рисунок 6.** А. Электронная микрофотография филаментов, образованных силикатеином и силинтафином-1, смешанными в эквимолярной концентрации 7 нМ. Масштабная линейка - 0.2 мкм. В. Продольный срез спикулы *S. domuncula*, окрашенный антителами к силинтафину-1 и силикатеину. Масштабная линейка 6,7 мкм [10].

При исследовании полимеризации кремнезема было обнаружено, что силинтафин-1 значительно увеличивает скорость полимеризации силикатеином, но только в смеси с соотношением 4 к 1 (рис. 7). Механизм этого явления пока не получил объяснения. Не установлены также участки белков, обеспечивающие их взаимодействие. Авторы предполагают, что РН-домен силинтафина-1 взаимодействует с фосфорилированными остатками силикатеина  $\alpha$  [25].



**Рисунок 7.** Полимеризация кремнезема силикатеином  $\alpha$  (Сил- $\alpha$ ), силинтафином-1 (Силн-1) и их смесями. ТЭОС - тетраэтил ортосиликат, использованный в анализе источник ортосиликата [25].

Электронная микроскопия частиц полимеризованного кремнезема показала различия в морфологии, в зависимости от соотношения белков. Только при четырехкратном избытке силикатеина наблюдали образование филаментов, при другом соотношении частицы кремнезема не имели конкретной формы. Диаметр филаментов составлял 20 нм, но длина достигала 5 мкм [25]. Оба параметра значительно уступают размерам аксиального филамента. Вероятно, объединению в более крупную структуру способствуют другие белки или небелковые компоненты.

Второй белок аксиального филамента, непосредственно взаимодействующий с силикатеином, получил название силинтафин-2. Силинтафин-2 - это полипептид с массой 15 кДа, который колокализуется в спикулах с силикатеином- $\alpha$  и обладает  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей активностью. Заметную гомологию силинтафин-2 имеет только с силикатеином  $\alpha$  [23].

Функция силинтафина-2 пока не выяснена. Авторы предполагают, что белок может быть вовлечен в полимеризацию кремнезема за счет прямого взаимодействия с силикатеином. Или же, за счет связывания  $\text{Ca}^{2+}$ , силинтафин-2 может выполнять сигнальную функцию, например, привлекая склероциты к растущей спикуле [23].

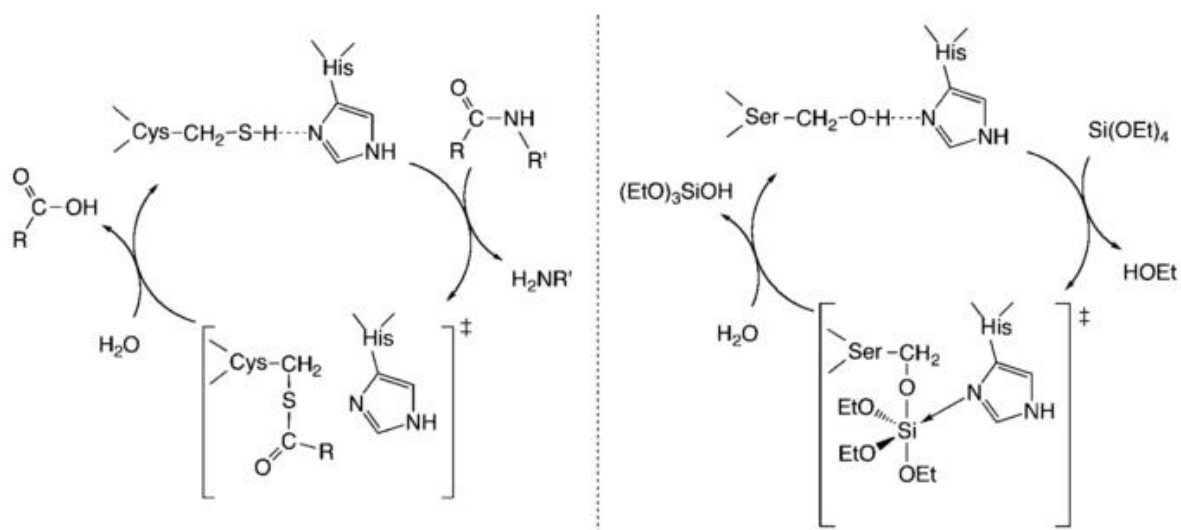
## 2.3 Конденсация кремния

### 2.3.1 Полимеризация соединений кремния

Силикатеин образует аморфный кремнезем, или диоксид кремния. Природным субстратом силикатеина считается ортокремниевая кислота, поскольку именно она присутствует в морской и пресной воде в максимальной концентрации, относительно других кремниевых кислот (до 150 мкМ) [36]. Но *in vitro* силикатеин способен реагировать с разнообразными соединениями кремния - различными силанолами (соединения с группой Si-OH) [37,38], алкоксиланами (общая формула  $\text{Si}(\text{OR})_4$ ) [39] и силиловыми простыми эфирами (соединения с группой Si-O-C) [38,40]. Наиболее популярным субстратом для изучения силикатеина *in vitro* является изначально предложенное соединение ТЭОС - тетраэтоксидортоксилат [2].

Силикатеин полимеризует кремнезем за несколько минут в нейтральных условиях. Обычно такая реакция требует высоких температуры и давления, поэтому механизм катализа с самого начала привлек внимание исследователей.

Первый предполагаемый механизм был основан на сходстве силикатеинов и катепсинов. Считалось, что силикатеин гидролизует предшественники ортосиликата - например, ТЭОС, аналогично гидролизу пептидной связи катепсинами (рис. 8) Водородная связь между боковыми цепями остатков серина и гистидина повышает нуклеофильность атома кислорода, что делает возможной нуклеофильную атаку на атом кремния. В результате этанол отщепляется, и образуется промежуточное соединение Si-O-силикатеин, стабилизированное за счет взаимодействия с имидазолом гистидина. Затем присоединение молекулы воды завершает гидролиз алкоксисилана с формированием силанола. Конденсация силанолов происходит самопроизвольно [2].



**Рисунок 8.** Слева - схема гидролиза пептидной связи катепсином L, справа - схема гидролиза ТЭОС силикатеином [39].

Высказывалось предположение, что гидроксикаминокислоты могут участвовать в конденсации кремнезема. Например, у диатомовых водорослей и высших растений, имеющих кремнезем в составе клеточной стенки, не обнаружено никаких аналогов силикатеина, но в клеточной стенке содержится большое количество сильно гидроксильных пептидов, белков, полисахаридов и полиаминов. Согласно существующей модели, гидроксилы и положительно заряженные группы структурируют молекулы ортосиликата, облегчая последующую конденсацию [34]. Но для силикатеинов участие в полимеризации считали второстепенным, а главным участником катализа считали активный центр [2,39].

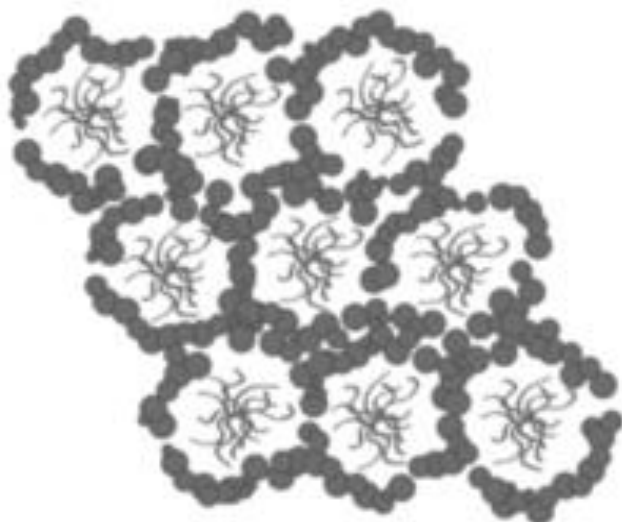
Роль остатков активного центра была подтверждена с помощью точечного мутагенеза. Силикатеин *T. aurantium* с заменой каталитического серина на аланин, или

каталитического гистидина на аланин, не был способен катализировать образование кремнезема в присутствии ТЭОС [41].

Со временем, стали возникать предположения, что силикатеин напрямую вовлечен также в реакцию полимеризации. При масс-спектрометрическом анализе продуктов реакции силикатеина с диметокси диметилсиланом (ДМС) были обнаружены олигомеры, состоящие из 12 мономеров, а в отсутствии белка наблюдали олигомеры максимум из 7 звеньев [37,38]. Однако это нельзя считать прямым доказательством того, что силикатеин участвует в полимеризации, поскольку более активная полимеризация может быть следствием смещения равновесия в самопроизвольной реакции полимеризации за счет повышения концентрации продуктов гидролиза диметокси диметилсилана. Более эффективный гидролиз ДМС силикатеином был продемонстрирован с помощью ЯМР-анализа [37]. Константа Михаэлиса-Ментен для реакции гидролиза составила 22,7 мкМ [38].

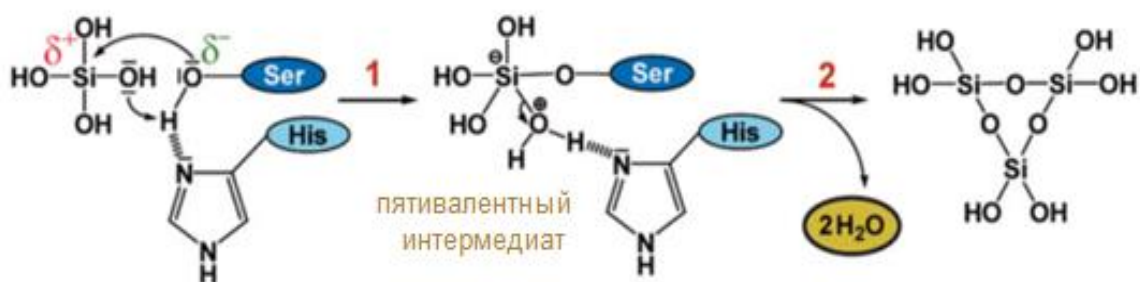
Расчет константы Михаэлиса-Ментен для реакции полимеризации кремнезема представляет собой более сложную задачу. Первая проблема заключается в том, что невозможно разделить процессы ферментативной и самопроизвольной полимеризации. И если эту проблему возможно было бы решить с помощью аккуратных измерений и расчетов, то вторая проблема создает еще больше сложностей. Дифракционный анализ аксиального филамента показал, что даже в органической части спикеры силикатеин оказывается заключен в сеть из полимеризованного кремнезема, причем размер ячейки может вместить только одну молекулу силикатеина (рис. 9) [33]. Получается, что в ходе реакции концентрация фермента уменьшается, что делает невозможным применение уравнения Михаэлиса-Ментен к данной системе.

На основе компьютерного моделирования пространственной структуры силикатеина и последующего докинга был предложен механизм действия белка, объединяющий этапы гидролиза и полимеризации. Согласно этому механизму, силикатеин связывает молекулу ортосиликата и нуклеофильный кислород каталитического серина атакует атом кремния по SN2-типу, образуя пятивалентный интермедиат, который затем атакует следующую молекулу ортосиликата. Образовавшийся интермедиат атакует третью молекулу ортосиликата с образованием циклической ортокремниевой кислоты. Возможно присоединение большего количества звеньев - размер каталитического центра, согласно модели, позволяет вместить до 8 звеньев ортосиликата (рис. 10) [42].



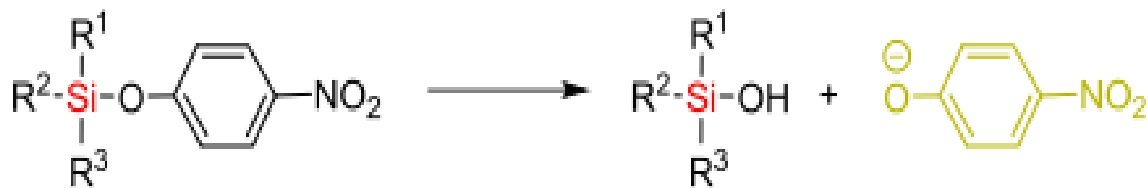
**Рисунок 9.** Схема строения аморфного кремнезема, образованного силикатеином. Ячейки, размером  $282.6 \text{ нм}^3$ , включают в себе одну молекулу силикатеина ( $196 \text{ нм}^3$ ) с водным окружением [33].

Образованные таким образом поликремниевые кислоты активно реагируют между собой, обеспечивая дальнейшие этапы полимеризации. Каталитический гистидин в предложенной схеме повышает нуклеофильность боковой цепи серина и стабилизирует интермедиаты. На каждом этапе вместо ортосиликата участником реакции может быть алкоксисилан или продукт его частичного гидролиза [42]. В дальнейших этапах полимеризации могут также принимать участие несиликатеиновые белки, например, силинтафин-1 [10,42]. Следует заметить, что экспериментальных подтверждений предложенный механизм не имеет.



**Рисунок 10.** Предполагаемый механизм ферментативной активности силикатеина [42].

Очень подробно было изучено взаимодействие рекомбинантного силикатеина A1 *T. aurantium* с силиловыми эфирами - соединениями, имеющими связь Si-O-C. В работе использовали три различных силиловых эфира [40].



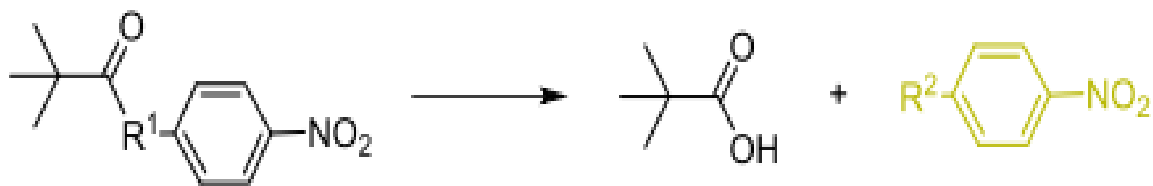
**Рисунок 11.** Схема гидролиза силиловых эфиров силикатеином  $\alpha$ .  $R_1$ ,  $R_2$ , и  $R_3$  представляют собой ацильные заместители [40].

Авторы начали с изучения параметров реакции гидролиза силиловых эфиров. Максимальная эффективность реакции достигалась при pH 10. При таком pH гистидин активного центра должен быть депротонирован, что облегчает реакцию, а повышенная концентрация гидроксид-анионов способствует гидролизу комплекса фермент-субстрат. При закислении авторы наблюдали эффект субстратного ингибирования - при pH 6,5 активность фермента значительно снижалась уже при 0,1 мМ субстрата [40].

Субстратное ингибирование обычно связано с тем, что субстрат аллостерически блокирует фермент, но в данной системе это кажется маловероятным, поскольку в природе не встречается соединений со связью Si-C. Эффект может быть связан с тем, что субстрат переходит в непригодную для фермента форму, но авторы не обнаружили значительных изменений в строении силиловых эфиров при данном pH [40].

Эффективность реакции гидролиза оценивали с помощью спектроскопии, по детекции поглощения нитрофеноксилат-аниона [40]. Однако в данной системе образовавшийся силанол может подвергаться реакции полимеризации с другой молекулой силанола. Поскольку силикатеин, возможно, катализирует и реакцию полимеризации, нельзя утверждать, что фермент осуществляет именно гидролиз силилового эфира. Гидролиз может идти эффективнее из-за смещения равновесия из-за уменьшения концентрации продукта реакции.

Гидролиз пептидной и сложноэфирной связи был показан на других соединениях, которые не могут подвергаться дальнейшей конденсации (рис. 12). Протеолитическая активность белка была показана и ранее [3,4,5], но возможность гидролиза соединений кремния эти активности не подтверждают.



**Рисунок 12.** Схема гидролиза соединений, катализируемая силикатеином. R<sup>1</sup> представляет собой атом О или N [40].

Убедительным доказательством участия силикатеина в катализе гидролиза силиловых эфиров стало изучение катализа обратной реакции. Как известно, катализатор ускоряет прямую и обратную реакцию в равной степени. Лиофилизированный фермент растворяли в октане и проводили реакцию октанола-1 с триметилсиланолом. Образование соответствующего эфира детектировали с помощью ГХ-МС. Через 72 часа наблюдали 20% конверсию силанола в эфир. При отсутствии фермента эффективность конверсии составляла 1,1%, а при использовании денатурированного нагреванием фермента - 3,6% [40].

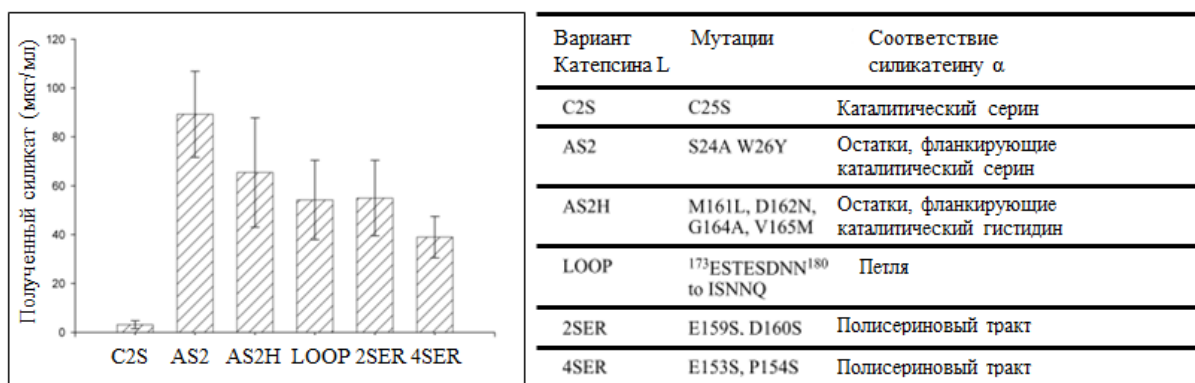
Связывание белка со всеми исследованными силиловыми эфирами было относительно слабым - константы Михаэлиса-Ментен имели значения несколько микромоль. Интересно, что размер заместителей при атоме кремния не коррелировал со значением константы Михаэлиса-Ментен - эфир с более крупным заместителем имел  $K_m$  ниже, чем эфир с небольшими заместителями. Это предполагает, что фермент имеет сложную селективность в отношении связывания субстрата, учитывающую не только общий размер молекулы [40].

Мутантный силикатеин с заменой каталитического серина на аланин демонстрировал только следовую активность, что подтверждает участие данного остатка в реакции. Докинг силиловых эфиров в активный центр фермента показал, что участие в связывании может принимать также остаток Arg (146 положение в силикатеине *α T. aurantium*). Кроме того, компьютерное моделирование показало, что для успешного связывания всех исследованных субстратов в молекуле белка должны происходить значительные конформационные изменения [40].

Пространственная структура силикатеина до сих пор не установлена, но все модели исходят из предположения, что трехмерная структура силикатеина очень близка к трехмерной структуре катепсина L. В одном исследовании авторы попробовали получить силикатеин из катепсина человека - в ген катепсина L человека вводили

остатки, характерные в данном положении для силикатеина. Полученные химеры проверяли на способность полимеризовать кремнезем [43].

Авторы начали с замены каталитического цистеина на серин, но полученный белок не обладал заметной силикатеиновой активностью. Зато последующая замена обоих фланкирующих каталитический серин остатков привела к появлению значительной силикатеиновой активности. Удивительно, но последующие замены не только не увеличили, но даже несколько снизили активность полученной химеры. Не оказало положительного эффекта и добавление полисеринового тракта [43].



**Рисунок 13.** Активность силикатеин-подобных химерных белков. Справа - количество полимеризованного кремнезема, образованного разными вариантами белка. Справа - описание мутаций, сделанных для создания химеры. Каждая следующая мутация добавлена в предыдущий вариант белка. То есть химера 4SER содержит все описанные замены [43].

Полученные данные означают, что из всех остатков, подвергнутых мутагенезу, непосредственно в катализ конденсации кремнезема вовлечены каталитический серин и соседние с ним аминокислотные остатки. Неожиданное отсутствие положительного эффекта от добавления полисеринового тракта может быть связано с тем, что этот участок вовлечен в процессы олигомеризации или взаимодействие с другими белками при формировании аксиального филамента, а не в катализ полимеризации как таковой [43].

Особенностью полученного химерного силикатеина было то, что не удалось обнаружить его активность с ТЭОС. Белок не был способен гидролизовать алкоксисилан, зато эффективно полимеризовал кремнезем в присутствии силиката натрия. Это означает, что силикатеин участвует не только в гидролизе предшественника ортокремниевой кислоты, но и непосредственно в реакции полимеризации [43]. С другой стороны, неспособность связать ТЭОС подразумевает заметные различия в структуре химерного белка и нативного силикатеина [39].

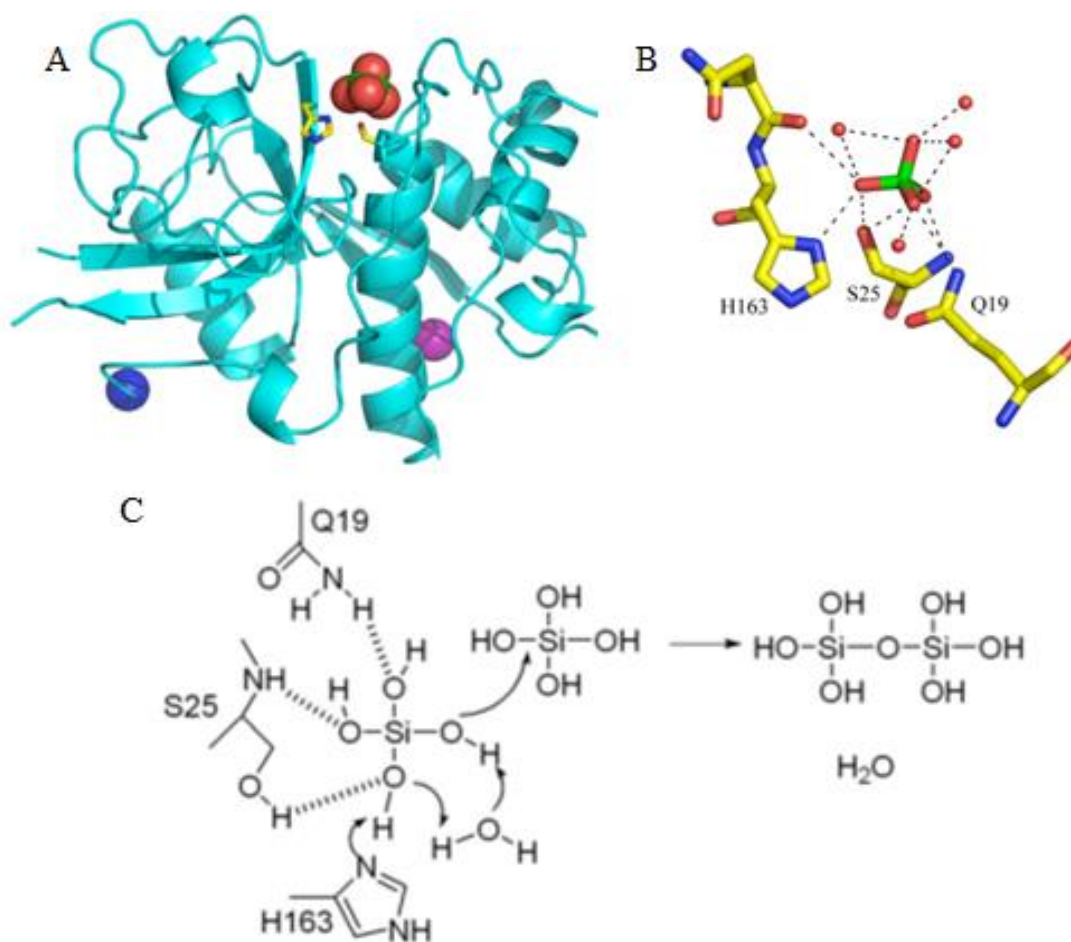


В ходе дальнейшей работы авторы получили кристалл химерного силикатеина 4SER. Связанный активным центром фермента сульфат-ион позволил сделать предположения относительно механизма ферментативной активности (рис. 14А) [43].

Анализ структуры показал, что размер активного центра химеры 4SER слишком мал, чтобы вместить молекулу ТЭОС, вероятно, этим объясняется неспособность 4SER гидролизовать алкоксисилан. Сульфат-ион оказался связан с каталитическими серином и гистидином водородными связями. В связывании также участвует остаток глутамина [43] (рис. 14В).

Полученные данные привели авторов к выводу, что основной вклад силикатеина в катализ полимеризации кремниевой кислоты заключается в ориентации молекулы ортосиликата необходимым для полимеризации образом. Согласно предложенному механизму, каталитический гистидин стабилизирует депротонированную молекулу ортосиликата в активном центре. Водородные связи с другими остатками и ориентированными белком молекулами воды стабилизируют комплекс депротонированного ортосиликата с белком, который в таком состоянии обладает достаточной нуклеофильностью, чтобы атаковать вторую молекулу ортосиликата, что инициирует полимеризацию (рис. 14С) [43].

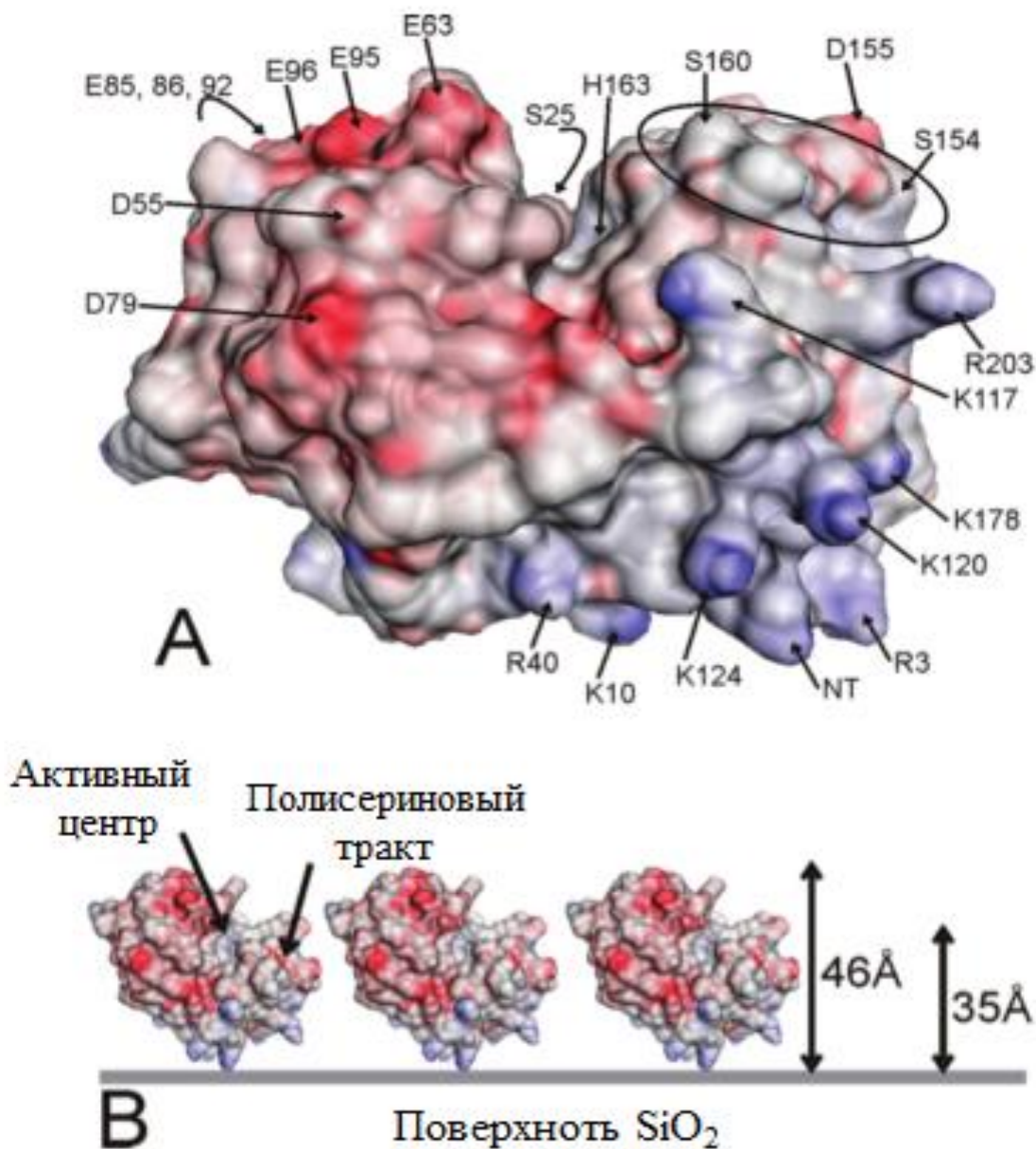
Роль каталитического серина и фланкирующих остатков по мнению авторов заключается образовании кармана необходимого размера и формы, чтобы вместить и стабилизировать молекулу ортосиликата. Силикатеин, таким образом, просто активирует молекулу кремниевой кислоты, тем самым облегчая полимеризацию, и может одновременно являться матрицей для сборки последующего полимера. Такой механизм представляется вполне вероятным, поскольку природным субстратом силикатеина является именно кремниевая кислота, а не алкоксисиланы, а молекулы белка всегда оказываются заключены в полимеризованный кремнезем [33,43].



**Рисунок 14.** А. Третичная структура силикатеин-подобного катепсина L 4SER. В. Сульфат-ион связанный с аминокислотами активного центра 4SER. С. Предполагаемый механизм конденсации ортосиликата силикатеином [43].

Исследования денатурации химерного силикатеина 4SER показали, что при повышении концентрации денатурирующего агента наблюдается два изменения структуры. Первое соответствует утрате  $\alpha$ -спиральных участков и переходу в структурный интермедиат, имеющий только  $\beta$ -слои. Второе изменение соответствует полной денатурации белка. Частичная потеря  $\alpha$ -спиральных участков наблюдается и в водном растворе при изменении pH с 5 до 7 [44]. Авторы не смогли детектировать обратный переход из формы с  $\beta$ -слоями, что говорит либо о необратимости перехода, либо о недостатках экспериментальной системы.

Интересно, что структурный интермедиат стабилизируется при взаимодействии с полимеризованным кремнеземом - при адсорбции силикатной матрицей белок утрачивает  $\alpha$ -спиральные участки. Вероятно, интермедиат либо сохраняет способность полимеризовать кремнезем, либо является матрицей для дальнейшей кристаллизации, поскольку в природе внешние слои силикатеина участвуют в радиальном росте спикулы.



**Рисунок 15.** А. Визуализация распределения электростатического потенциала по поверхности химеры 4SER. Отмечены ключевые аминокислотные остатки и N-конец (NT). Полисериновый тракт выделен овалом. В. Модель адсорбции 4SER на силикатной поверхности. Положительно заряженная область белка ориентирована к отрицательно заряженной поверхности силиката. Модель показывает несоответствие между теоретически ожидаемой толщиной слоя 4SER (46Å, значение основано на размере мономера в кристалле) и реальной толщиной белкового слоя (35Å). Различие указывает на то, что при адсорбции в белке происходят конформационные изменения. [44]

Химерный силикатеин образует на поверхности полисиликата равномерный монослой. Последующие слои не образуются. Авторы предполагают, что этому препятствуют электростатические силы. 4SER ориентирован к отрицательно заряженной поверхности полисиликата своей положительно заряженной областью,

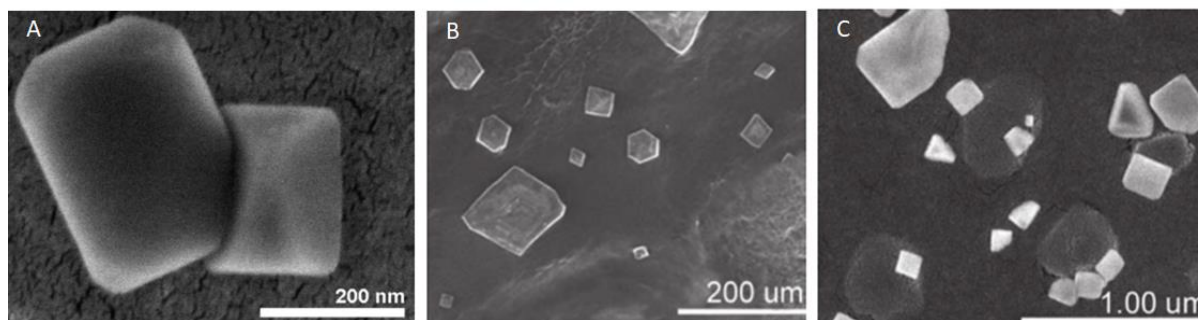
тогда в противоположную сторону обращена отрицательно заряженная часть [44]. Остается непонятным, что препятствует дальнейшему наслаиванию белка за счет электростатического взаимодействия. Вероятно, в образовавшемся интермедиате картина распределения заряда по поверхности белка заметно отличается. Кроме того, непонятно, насколько можно переносить данные о заряде поверхности на силикатеин губок, поскольку меньше половины положительно заряженных аминокислотных остатков консервативны между катепсином и силикатеином.

Высказывались предположения, что полисеринный тракт силикатеинов губок может ориентировать молекулы кремнезема при кристаллизации [39]. Полисеринный тракт свободного белка в растворе не имеет выраженной вторичной структуры. Но вполне возможно, что при переходе в связанную силикатом форму этот участок оказывается структурирован. Каталитический остаток серина и фланкирующие остатки находятся в начале  $\alpha$ -спирали, которая при образовании связанного интермедиата утрачивается, что определенно изменяет геометрию взаимодействия с ортосиликатом и частей белка между собой [44].

Описанная смена структуры при взаимодействии с полисиликатом не уникальна. Например, молекулы полилизина, не имеющие в растворе определенной вторичной структуры, при добавлении силиката переходят в форму  $\alpha$ -спирали и собираются в гексагональные пластинки [44].

При работе с ТЭОС или метастабильным раствором ортосиликата, рекомбинантный силикатеин образовывал аморфный кремнезем [45]. Но в присутствии ТГЭОС - тетраакс(гидроксиэтил)ортосиликата - силикатеин губки *Latrunculia oparinae* образовывал частицы кристаллического кремнезема [46]. Удивительно, что аналогичные частицы образовывал в присутствии ТГЭОС также катепсин этой же губки. Образование кристаллов наблюдали также при добавлении BSA, но морфология кристаллов заметно отличалась - частицы были меньше и имели разнообразную форму, а не гексагональную [47].

Катепсин *L. oparinae* имеет цистеин в активном центре, но полимеризации кремнезема, как оказалось, это не препятствует. ТГЭОС отличается от ТЭОС лучшей растворимостью и меньшей стабильностью в воде. Вероятно, более эффективный самопроизвольный гидролиз обеспечивает большую концентрацию ортосиликата, что облегчает дальнейшую полимеризацию. Активность BSA авторы объясняют тем, что катализ осуществляется неспецифически за счет наличия положительно заряженных аминокислот [47].



**Рисунок 16.** Частицы, образованные при добавлении ТГЭОС. А- силикатеином A1 *L. oparinae* [46], В- катепсином *L. L. oparinae* [47], С - BSA [47].

Интересные результаты были получены при анализе предсказанного катепсина актинии *Nematostella vectensis*. Рекombинантный белок, выделенный из клеток *E.coli*, имел цистеин в активном центре, но обладал силикатеиновой активностью. Мутации, введенные для увеличения сходства исследуемого белка с силикатеином губок - каталитический серин, фланкирующие его аминокислоты, полисериновый тракт, - не изменили силикатеиновую активность.

Для увеличения доступности ТЭОС авторы добавляли в реакцию смесь детергент Triton-X100, и наблюдали увеличение частиц кремнезема. В присутствии детергента диаметр частиц достигал 200 нм, а без детергента не превышал 50 нм [48].

Таким образом, роль остатков каталитической триады, а также механизм катализа полимеризации соединений кремния силикатеинами остается дискуссионным вопросом.

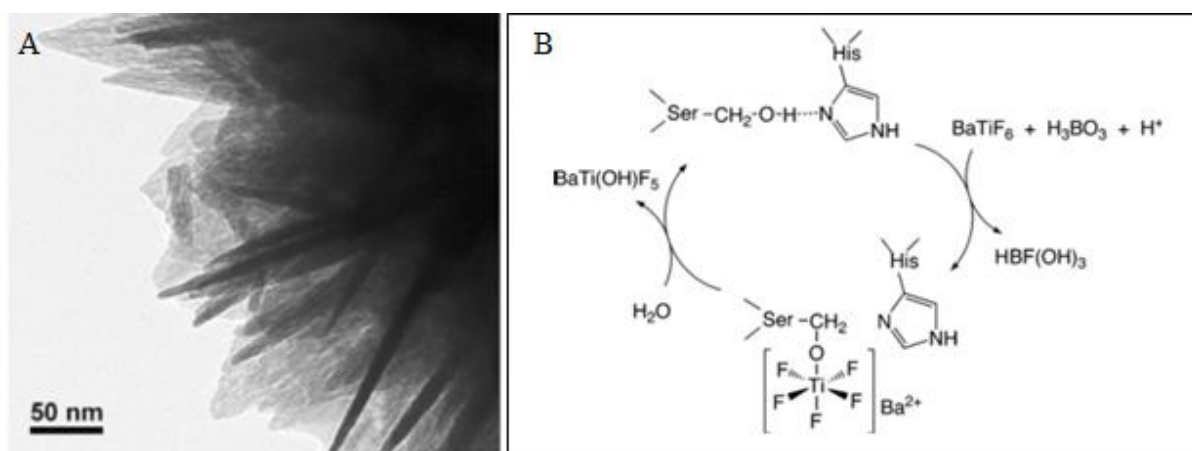
### 2.3.1.1 Полимеризация других соединений

Одним из самых удивительных свойств силикатеинов оказалась способность полимеризовать множество других соединений - оксид титана [49,50], оксид циркония [51], поли(L-лактид) [52], оксотетрафторотитанат бария [53], карбонат кальция [54], серебро [55], оксид церия и смешанные оксиды церия-циркония [56]. Для синтеза наноматериалов использовали и рекombинантный силикатеин, и нативные филаменты. И хотя часто авторы больше внимания уделяли свойствам полученных наноматериалов, в некоторых работах рассматривались особенности силикатеина, которые обеспечивали такое разнообразие катализируемых реакций.

Как и для катализа конденсации ортосиликата, есть две основные версии, объясняющие катализ конденсации не-кремниевых соединений - гидролиз предшественника с последующей самопроизвольной конденсацией или затравление

кристаллизации за счет взаимодействия с поверхностью белка. Однако из-за значительного разнообразия молекул-предшественников, вторая гипотеза пользуется большей популярностью.

Только для гексафтортитаната бария предложен механизм гидролиза, схожий с гидролизом алкоксисиланов (рис. 17). Предполагается, что нуклеофильная боковая цепь каталитического серина инициирует гидролиз  $\text{BaTiF}_6$  в присутствии  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Образовавшийся в результате комплекс  $\text{BaTi}(\text{OH})\text{F}_5$  затем подвергается последовательному гидролизу силикатеином до образования  $\text{BaTi}(\text{OH})_2\text{F}_4$ . Но и в этом случае авторы не исключают участия большого количества гидроксильных групп на поверхности силикатеина в последующей конденсации оксофтортитаната [53].



**Рисунок 17.** А. Кристаллы оксотетрафтортитаната бария, полученные в присутствии филаментов силикатеина. В. Схема гидролиза гексафтортитаната бария молекулой силикатеина [53].

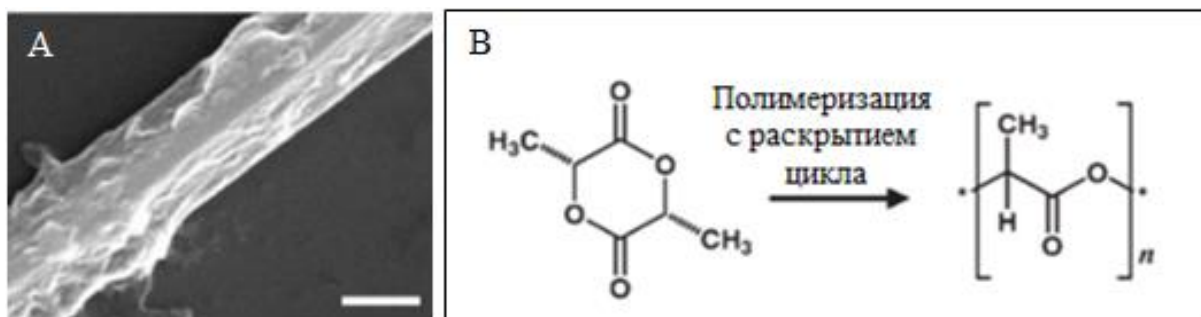
При работе с соединениями титана, в качестве субстрата использовали титан бис(аммоний лактат)дигидроксид. Каталитические серин и гистидин могут облегчать гидролиз предшественника и в этой системе. В результате реакции с белком наблюдали значительные различия в морфологии частиц, образованных силикатеином, и полученных путем основного катализа, поэтому авторы предположили, что силикатеиновые филаменты выполняют также роль матрицы, несущей центры кристаллизации. Интересно, что частицы были образованы как аморфным, так и кристаллическим оксидом титана IV. В случае основного катализа кристаллическая форма образуется при температуре 800 °C [49].

В другой работе авторам удалось получить кристаллический фосфат титана с помощью необычного подхода. Рекombинантный силикатеин был экспонирован на внешней мембране *Escherichia coli*. После добавления бис(аммоний лактат)дигидроксида титана на бактериях откладывались слои кристаллического

фосфата титана, с включениями натрия (фосфат и натрий поступали из буферного раствора). При основном катализе получить материал с включением натрия или фосфата не удалось, образовывался только чистый оксид титана [50].

Эти данные подтверждают, что силикатеин действительно является матрицей для кристаллизации соединений титана, и демонстрируют, что образование филаментов не является необходимым для активности белка *in vitro* [50].

Позже было обнаружено, что нативные филаменты силикатеина способны также образовывать поли-L-лактиды (рис. 18). Неизвестно, принимает ли силикатеин участие в раскрытие цикла, но поверхность филаментов определенно направляет полимеризацию. Авторы предполагают, что использование разных L-лактидов позволит получить материалы с разнообразными свойствами [52].



**Рисунок 18.** А. Поли-L-лактиды на поверхности силикатеинового филамента. Масштабная линейка 4 мкм. В. Схема полимеризации поли-L-лактидов с раскрытием цикла [52].

#### 2.3.1.2 Синтетические аналоги силикатеина

При синтезе наноматериалов с использованием силикатеинов общей проблемой была низкая растворимость белка. Это свойство доставляет неудобства и при выделении силикатеина. Поэтому несколькими группами были предприняты попытки синтеза искусственных соединений, которые могли бы осуществлять катализ по тем же принципам, что и силикатеин.

Первой попыткой в этой области стал синтез блочных полипептидов массой около 3 кДа, состоящих из двух гомополипептидов. В бескислородной среде катализировать полимеризацию кремнезема в присутствии ТЭОС был способен даже просто полицистеин, но в присутствии кислорода наибольшую активность показали полипептиды, имеющие в своем составе катионные блоки [57]. Известно, что поликатионы облегчают взаимодействие с отрицательно заряженным полисиликатом, а также способствуют последующей агрегации частиц [58]. Однако полигистидин

активности не продемонстрировал. Полипептиды, содержащие полианионный блок (например, полиглутамат), вообще не были способны полимеризовать ортосиликат [57].

Самыми активными оказались полипептиды, содержащие полилизин, а если полилизин был соединен с полисеринном или полицистеином, то частицы имели определенную форму. Интересно, что в присутствии полицистеина, только в бескислородной среде образовывались частицы кремнезема сферической формы, а в присутствии кислорода - пластинчатые. Несмотря на то, что 70% сульфгидрильных групп образовывали дисульфидные связи, оставшихся неокисленных групп было достаточно для осуществления катализа. Даже 15% полицистеина в молярном отношении было достаточно, чтобы получить пластинчатые частицы [57].

Таким образом, для полимеризации кремнезема в нейтральных условиях действительно достаточно взаимодействия катиона и нуклеофила. А состав синтетических полипептидов позволяет контролировать форму полученных частиц - длина полилизинового фрагмента определяет эффективность конденсации кремнезема, а нуклеофильный полипептид определяет форму [57][58].

Исследования кинетики образования частиц кремнезема в присутствии полилизина показало, что пептид почти не влияет на ранние этапы полимеризации, но существенно ускоряет агрегацию частиц. Авторы предполагают, что и в природе основная роль полимеров, вовлеченных в конденсацию кремнезема, заключается в агрегации мелких частиц в более крупные [58].

После исследований катализа полипептидами, возникла идея имитировать только активный центр силикатеина. Были проанализированы несколько соединений, в которых две функциональные группы соединены коротким линкером. Самыми очевидными аналогами активного центра были этаноламин и цистеамин. И именно они лучше всего катализировали полимеризацию кремнезема, причем цистеамин был на 40% активнее этаноламина. Образованные частицы имели сферическую форму [59].

И в случае блочных полипептидов, и при исследовании небольших бифункциональных молекул, источником ортосиликата был ТЭОС. Исследования, проведенные с другими предшественниками, привели к несколько другим результатам. Так, была показана конденсация кремнезема полигистидином в присутствии ТМОС - тетраметилортосиликата [60]. Хотя количество полимеризованного кремнезема было ниже, чем при использовании полилизина, все же плохая растворимость ТЭОС помешала обнаружить активность полипептида в предыдущей работе [57].



При использовании триметилэтоксисилана была показана возможность катализа полимеризации ортосиликата декапептидами, образованными только лизином, только гистидином или двумя пентапептидами из тех же аминокислотных остатков [61].

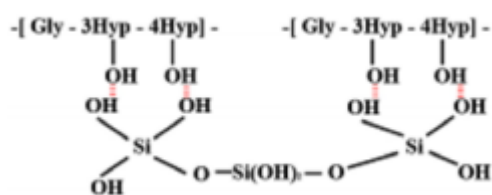
Следует заметить, что катализ полимеризации кремнезема синтетическими аналогами силикатеина, хотя и возможен в нейтральных условиях, но эффективность этого процесса значительно ниже, чем при использовании силикатеина. Требуется на 2-3 порядка большие концентрации катализатора и предшественника ортосиликата, продолжительность реакции на порядок выше, а выход на 1-2 порядка ниже [57,60,61]. В целом, эффективность синтетических катализаторов примерно в миллион раз ниже, чем эффективность силикатеина.

### 2.3.2 Полимеризация кремнезема без участия силикатеинов

Два класса губок образуют кремниевые спиккулы - Обыкновенные губки, включающие более 80% существующих видов губок, и Стекланные губки, к которым относится лишь чуть более 7% видов [62]. Последние представлены исключительно морскими, преимущественно глубоководными формами. И хотя для некоторых стекланных губок показано наличие гена силикатеина, и даже идентифицирован белок [5,12,63], другие представители класса демонстрируют совсем иной механизм конденсации кремнезема.

В 2010 году было обнаружено, что стекланный губка *Hyalonema sieboldi* полимеризует кремнезем без участия силикатеина. Основным компонентом аксиального филламента и катализатором реакции в данном случае является сильно гидроксильированный коллаген. Характерным мотивом коллагена *H. sieboldi* является Gly-3HyP-4HyP, где HyP - это гидроксипролин, гидроксильированный по 3 или 4 положению.

Авторы предполагают, что полимеризация ортосиликата происходит за счет взаимодействия поликремниевой кислоты с гидроксильированными остатками пролина, регулярно расположенными вдоль коллагенового волокна (рис. 19). Первый слой полимеризованного кремнезема располагается таким образом, что его конфигурация облегчает дальнейшую полимеризацию [64]. Подобная матричная конденсация кремнезема ранее была предложена для диатомовых водорослей [65]

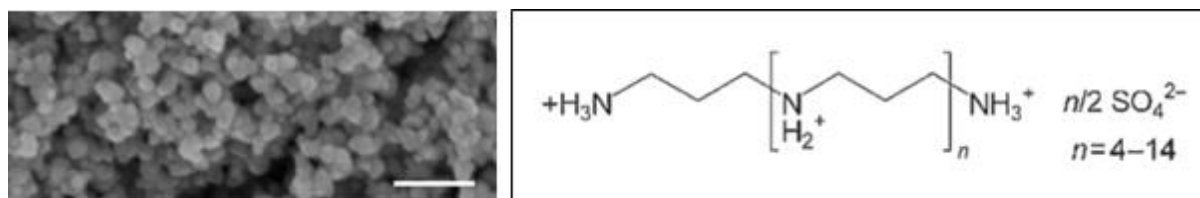


**Рисунок 19.** Взаимодействие фрагмента коллагена *H. sieboldi* с молекулой поликремниевой кислоты [64].

Спустя несколько лет, исследования другой стеклянной губки *Euplectella aspergillum* привели к открытию белка глассин. Глассин является основным водорастворимым белковым компонентом спикул и эффективно катализирует полимеризацию кремния. Главной особенностью этого белка является необыкновенно высокое содержание остатков гистидина - более 30%. Также глассин содержит много гидрокси-аминокислот, но в отличие от силикатеинов, преобладающим остатком является треонин, а не серин. Характерных для силикатеинов остатков цистеина глассин не имеет [66].

Глассин был идентифицирован как основной водорастворимый компонент спикул *E. aspergillum*. Нерастворимый компонент не был подробно проанализирован, но предварительные данные предполагают наличие коллагена и хитина [67,68]. Возможно, *E. aspergillum* экспрессирует и силикатеин - предположение основано на идентификации части гена в образце кДНК губки, но из-за большего содержания гидрофобных остатков силикатеин мог оказаться в нерастворимой фракции [66].

Небелковые компоненты спикул также могут являться активными участниками катализа конденсации кремния. Так, в обыкновенной губке *Axinyssa aculeata* были идентифицированы длинноцепочечные полиамины (рис. 20), способные эффективно катализировать полимеризацию ортосиликата [69].



**Рисунок 20.** Аморфный кремнезем, образованный длинноцепочечными полиаминами *A. aculeata* (масштабная линейка 1 мкм), и структурная формула полиаминов [69].

Авторы исследования предлагают два варианта участия длинноцепочечных полиаминов в образовании спикул - либо длинноцепочечные полиамины сами

участвуют в формировании слоев кремнезема, либо они действуют в этом процессе в составе конъюгатов с другими макромолекулами [69]. Например, при конденсации кремния диатомовыми водорослями длинноцепочечные полиамины конъюгированы с белками-силаффинами [34].

Очевидно, что в образовании спикул, контроле их формы и размера участвует несколько белков и небелковых компонентов. Но остается примечательным сам факт возможности конденсации кремнезема полиминами и белками губок, полностью отличными от силикатеинов по пространственной структуре и аминокислотному составу. И если для глассина может быть предположено наличие активного центра, схожего по свойствам с силикатеином, то для коллагена или полиаминов сложно предположить аналогичный механизм катализа.

## 2.4 Заключение

Основной биомолекулой, вовлеченной в полимеризацию кремнезема у губок, считается силикатеин [1]. Силикатеин обладает протеолитической, эстеразной и полимеразной активностями. Основную роль в катализе играют боковые цепи серина и гистидина, то есть остатки, гомологичные каталитическим остаткам катепсинов [38,40,43]. На основе этого предположения получены синтетические катализаторы, несущие положительно заряженные и нуклеофильные группы [57,60,61].

В то же время, продемонстрирована силикатеиновая активность двух катепсинов [47,48]. Существуют губки, в которых полимеризацию кремнезема осуществляют совсем другие биомолекулы - негомологичные силикатеину белки или полиамины. Наличие положительно заряженных и нуклеофильных групп характерно и для них [64,66,69].

Остаются открытыми вопросы - что отличает силикатеины от катепсинов, какие именно свойства силикатеина позволяют ему осуществлять полимеризацию кремния, и какой именно вклад в этот процесс вносят остатки активного центра силикатеина.

## 3 Материалы и методы исследования

### 3.1 Методы работы с нуклеиновыми кислотами

#### 3.1.1 Выделение и очистка плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК из культуры клеток *E. coli* выделяли с помощью набора для выделения и очистки плазмидной ДНК из культуры *E. coli* Plasmid Miniprep (Evrogen) в соответствии с инструкциями производителя.

#### 3.1.2 Электрофорез в агарозном геле

Электрофорез в агарозном геле проводили для визуализации и очистки фрагментов ДНК. 1% агарозный гель готовили на трис-ацетатном буфере pH 8.0 с добавлением бромистого этидия и ЭДТА. Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза (BioRad) с использованием источника постоянного тока EPS 250 (С.В.С. Scientific Company) при 160 В. Длительность электрофореза составляла 15-25 минут, в зависимости от длины анализируемого фрагмента. В качестве маркера использовали 100 bp DNA Ladder или 1 kb DNA Ladder (СибЭнзим). Для визуализации результатов электрофореза использовали систему гель-документирования G:BOX Chemi (Syngene); при необходимости последующего выделения ДНК из геля использовали УФ-трансиллюминатор с УФ- лампой ( $\lambda=365$  нм).

#### 3.1.3 Клонирование

Последовательности ДНК, кодирующие гены силикатеина A1 (LoSil) и катепсина (LoCath) *L. oparinae* получили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице кДНК губки *L. oparinae*. ПЦР проводили с использованием набора Encyclo Plus PCR kit (Evrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Последовательность праймеров приведена в таблице 1. Температуру отжига праймеров рассчитывали в программе Oligocalc. Последовательность, кодирующую катепсин L человека (CTSL) получили аналогичным образом на матрице кДНК, полученной из культуры клеток HEK293T, праймеры для ПЦР приведены в таблице 1. ПЦР проводили в два этапа. Сначала использовали праймеры, комплементарные нетранслируемым областям гена катепсина, затем использовали праймеры, комплементарные кодирующей

части гена. Внутренние праймеры содержали сайты рестрикции. Все гены получали в зрелой форме, без последовательности пропептида. Последовательности генов приведены в таблице 2.

Продукт ПЦР, очищенный с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard (Evrogen) в соответствии с инструкцией производителя, обрабатывали соответствующими эндонуклеазами рестрикции. Вектор pET 40(b+) обрабатывали рестриктазами BamHI и XhoI для генов *L. oparinae*, BamHI и HindIII для катепсина L человека. После обработки фрагменты очищали с помощью препаративного электрофореза в агарозном геле, затем выделяли из геля с помощью набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Mini (Evrogen) в соответствии с инструкцией производителя. Фрагмент вектора (25нг) и последовательность одного из генов (100 нг) лигировали с использованием T4 ДНК лигазы (Evrogen) в соответствии с инструкцией производителя.

Гены клонировали таким образом, чтобы ген экспрессировался с дополнительными остатками гистидина на С-конце (His-tag).

**Таблица 1.** Праймеры для получения генетических конструкций, кодирующих белки дикого типа.

Конструкция	Описание	Последовательность праймеров*
LoSil-CHis	Силикатеин A1 <i>L. oparinae</i> в векторе pET40(b+)	<b>Forv-A1-Bgl-CHis</b> AAATAGATCTTAATAATGTCCTATCCTGAGTCC <b>Rev-A1-Sal-CHis</b> AAATGTCGACAAGAGTAGGGTAGGAG
LoCath-CHis	Катепсин L <i>L. oparinae</i> в векторе pET40(b+)	<b>Forv-cat-Bgl-CHis</b> AAATAGATCTTAATAATGGTCTGCCCAGAGGAAG <b>Rev-cat-Xho-CHis</b> AAATCTCGAGTATGGTAGTGTACATAGCCTT
CTSL-CHis	Катепсин L человека в векторе pET40(b+)	<b>Forv-cath- BamHI</b> AAATGGATCCCTAGTAATGCCCCCAGATCTGTGG ATTGGAG <b>rev-cath-HindIII</b> AAATAAGCTTCACAGTGGGGTAGCTGGCTGC

		<b>Cath-forv-out</b> AGGCAGGTGATGAATGGCTTTC <b>Cath-rev out</b> GTAGACTGAAGATGAATTCCTC
--	--	---

\*в последовательности праймеров подчеркнуты сайты рестрикции

**Таблица 2.** Нуклеотидные и аминокислотные последовательности генов и белков, использованных в работе

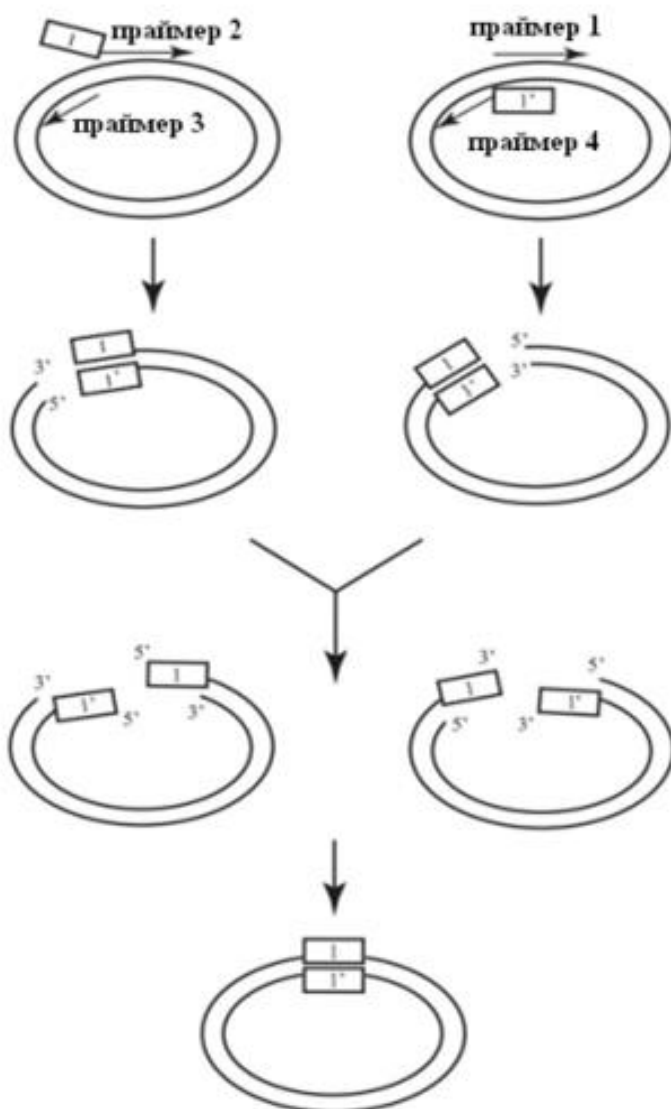
Название	Последовательности
Силикатеин A1 <i>L. oparinae</i>	TCCTATCCTGAGTCCGTGGACTGGAGGACCAAAGGAGCAGTTACTTCTGT CAAAGATCAGAGTCAGTGTGGGGCAAGTTATGCTTTCAGTGCTATGGCAG CTTTGGAAGGAGCCAATGCTTTAGCTACAGACACTCTAGTGAACCTCAGT GAGCAGAACSTTATCGACTGTTTCAGTGCCSTATGGAAACCATGGTTGCAA GGGTGGCAACATGCTCTATGCATTTAAGTATGTGATTGCCAATGAAGGAG TGGATACAGCAAATTCGTACCCTTTCTATGGCAAACAATCTAGCTGTGTC TATAACGAAAAGTATGCTGCAGTGAAGATATCTGGGATGGTGAGGATAAG TCAGGGAAGTGAATCTGACCTTTTGGGAGCAGTGGCTAATGTGGGTCCAG TGGCAGTGGCTATTGATGGTAGCTCTAATGCATTCAGATTTTACTCCAGT GGTGTATATGACTCCTCAAGATGTTCTAGTAGCAAGCTCAACCATGCCAT AGTGGTGACTGGTTATGGCAGCTACAGTGGAAAGAAGTACTGGCTTGTTA AGAACAGCTGGGGCAAGAACTGGGGTAACTATGGCTACATCATGATGGCC AGGGGCAAGTATAATCAGTGTGGGATTGCTAGTGATGCCTCCTACCCTAC TCTTTAG  SYPEVDWRTKGAVTSVKDQSQCGASYAFSAMAALLEGANALATDTLVNLS EQNLIDCSVPYGNHGCKGGNMLYAFKYVIANEGVDTANSYPFYGKQSSCV YNEKYAAVKISGMVRISQSESDLLGAVANVGPVAVVAIDGSSNAFRFYSS GVYDSSRCSSSKLNHAIIVVTGYGSYSGKKYWLKNSWGNWGNYGIMMA RGKYNQCGIASDASYPTL
Катепсин L <i>L. oparinae</i>	GTCTGCCCAGAGGAAGTGGACTGGAGGACTAAGGGAGCCGTATCAGCTGT CAAGGACCAGGGTCGGTGTAAAGAGTTGCTATGCATTTGCAACAACAGCGG CACTAGAAGGGATGCACGCTCTGGCCACGGGCAGGCTAGTGCCACTGAGT GAGCAGAACGTCATAGACTGCTCAGTTCCTATGGCAACCGTGGCTGTAG TGGAGGCTCTCGCATGGCCACCATCATGTATGCCGTGGACAATGGGGGAA TAGACGGCACCTCCTCCTACCATACTGGGGCGACAATATCTGTGCAAG

	<p>TTTACGGAGGAGTCCATAGCAACCGGATGCACAGGGATGGTGCGCATCAA  GAGGGGCAAGGAGCAGGACCTGAAGAAGGCAGTGGCTGTAGTGGGACCGG  TCACTGTGGCAGTCGACTCCAGACACACCTCCTTCCAGTTCTATGCCAGT  GGTATCTATAGTGAGCCTAGTTGCTCCAGGACCAAGCTCACTCACACTCT  CATCATCATTGGCTATGGCTCTAAGAGTGGCCATGACTACTGGCTTCTCA  AGAACAGCTGGGGCACCAGCTGGGGTGAGGACGGCTACATCATGATGTCA  CGTAACTATGCCAACCAGTGTGGCATAGCAACCAAGGCTATGTACACTAC  CATA</p> <p>VCPEEVDWRTKGAVSAVKDQGRCKSCYAFATTAALEGMHALATGRLVPLS  EQNVIDCSVPYGNRGCSGSRMATIMYAVDNGGIDGTSSYPYLGRQYLCK  FTEESIATGCTGMVRIKRGKEQDLKKAVAVVGPVTVAVDSRHTSFQFYAS  GIYSEPSCSRTKLHTLIIIGYGSKSGHDYWLLKNSWGTSWGEDGYIMMS  RNYANQCGIATKAMYTTI</p>
<p><b>Катепсин L</b>  человека</p>	<p>GCCCCAGATCTGTGGATTGGAGAGAGAAAGGCTACGTGACTCCTGTGAA  GAATCAGGGTCAGTGTGGTTCTTGTGGGCTTTTAGTGCTACTGGTGCTC  TTGAAGGACAGATGTTCCGGAAAACCTGGGAGGCTTATCTCACTGAGTGAG  CAGAATCTGGTAGACTGCTCTGGGCCTCAAGGCAATGAAGGCTGCAATGG  TGGCCTAATGGATTATGCTTTCCAGTATGTTTCAGGATAATGGAGGCCTGG  ACTCTGAGGAATCCTATCCATATGAGGCAACAGAAGAATCCTGTAAGTAC  AATCCCAAGTATTCTGTTGCTAATGACACCGGCTTTGTGGACATCCCTAA  GCAGGAGAAGGCCCTGATGAAGGCAGTTGCAACTGTGGGGCCATTTCTG  TTGCTATTGATGCAGGTCATGAGTCCTCCTGTTCTATAAAGAAGGCATT  TATTTTGAGCCAGACTGTAGCAGTGAAGACATGGATCATGGTGTGCTGGT  GGTTGGCTACGGATTTGAAAGCACAGAATCAGATAACAATAAATATTGGC  TGGTGAAGAACAGCTGGGGTGAAGAATGGGGCATGGGTGGCTACGTAAAG  ATGGCCAAAGACCGGAGAAACCATTGTGGAATTGCCTCAGCAGCCAGCTA  CCCCACTGTGTGA</p> <p>APRSVDWREKGYVTPVKNQGCSCWAFSATGALEGQMFRTGRLISLSE  QNLVDCSGPQGNEGCNGGLMDYAFQYVQDNGGLDSEESYPYEATEESCKY  NPKYSVANDTGFVDIPKQEKALMKAVATVGPISVAIDAGHESFLFYKEGI  YFEPDCSSEDMDHGVLVVGYGFESTESDNNKYWLVKNSWGEWGMGGYVK  MAKDRRNHCGIASAASYPTV</p>

### 3.1.4 Мутагенез

Точечные мутации вносили методом самособирающегося клонирования [70]. Для это использовали четыре праймера: два “удлиненных” (2 и 4 на рис. 21) и два “коротких” (1 и 3 на рис. 21). Прямой и обратный “удлиненные” праймеры имели комплементарный участок длиной 12 нуклеотидов с соотношением АТ/ГС 40-60%. Используя “удлиненный” прямой и “короткий” обратный праймеры (и наоборот), проводили две независимые ПЦР на матрице всего вектора. Для уничтожения исходного вектора ПЦР-продукт обрабатывали рестриктазой DpnI (Fermentas). Очищенные ПЦР-продукты смешивали друг с другом, добавляли гибридизационный буфер (состав 4X буфера: 100 мМ Tris-HCl, 500 мМ KCl, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3), после чего денатурировали (95°C — 3 мин) и остужали до 25°C. В результате, в реакционной смеси образовывалось некоторое количество гибридных молекул ДНК, имеющих выступающие комплементарные концы. Температура отжига последовательности длиной 12 нуклеотидов с соотношением АТ/ГС близким к 50% составляет примерно 25°C, поэтому полученные гибридные молекулы ДНК замыкаются в кольцо при комнатной температуре и могут быть непосредственно использованы для химической трансформации бактерий. Сшивка цепей ДНК осуществляется бактериальными ферментами после трансформации.





**Рисунок 21.** Схема самособирающегося клонирования.

Другим методом получения точечных мутаций было AQUA-клонирование [71]. Для этого проводили ПЦР с праймерами, содержащими требуемую замену и имеющими комплементарный участок длиной 16-32 нуклеотидов. Используя эти праймеры амплифицировали весь вектор целиком. Для уничтожения исходного вектора ПЦР-продукт обрабатывали рестриктазой DpnI (Fermentas), специфичной к метилированной ДНК. После очистки ПЦР-продукт растворяли в воде и использовали для электрической трансформации бактерий. Циркуляризация вектора восстанавливалась с помощью рекомбинации коротких гомологичных участков в бактериальной клетке.

Праймеры для проведения мутагенеза представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** Праймеры для мутагенеза генов LoSil, LoCath и CTSL

Название мутанта	Вносимые замены*	Последовательность праймеров (прямой/обратный)
LoSil-19A	Q19A	AGTТАСТТСТGTCAAAGATGCGAGTCAGTGTGG/ACAGAAG ТААСТGCTCCTTTG  CAAAGATGCGAGTCAGTGTGGGGC/CTCGCATCTTTGACAG AAGТААСТGCTCCTTTG
LoSil-25A	S25A	GAGTCAGTGTGGGGCAGCTTATGCTTTСAGTGC/CCACACT GACTCTGATCTTTGAC  GGCAGCTTATGCTTTСAGTGTATG/GCATAAGCTGCCCCA CACTGACTCTGATCTTTGAC
LoSil-25C	S25C	GTGTGGGGCATGCTATGCTTTСAGTGTATGGC/CTGAAAG CATAGCATGCCCCACACTGACTC
LoSil-26W	Y26W	GGGCAAGTTGGGCTTTСAGTGTATGGC/CCATAGCACTGA AAGCCCAACTTGCCCCACAC
LoSil-KSC	G23K, A24S, S25C	GATCAGAGTCAGTGТАAGAGTTGCTATGCTTTСAGTGTAT GGC/GCACTGAAAGCATAGCAACTCTTACACTGACTCTGAT CTTTGACAG
LoSil-163A	H163A	TTCTAGTAGCAAGCTCAACGCTGCCATGGTGGTG/TTGCTA CTAGAACATCTTGAG  GCTCAACGCTGCCATGGTGGTG/GCAGCGTTGAGCTTGCTA CTAGAACATCTTGAG
LoSil-187A	N187A	AAGTACTGGCTTGTTAAGGCCAGCTGGGGCAAG/AAGCCAG ТАСТTCTTTCCACTGTAG  GTTAAGGCCAGCTGGGGCAAGAAC/GCTGGCCTТААСАAGC

		CAGTACTTCTTTCCACTGTAG
LoCath-19A	Q19A	CGTATCAGCTGTCAAGGACGCGGGTTCGGTGTAAAGAG/ACAG CTGATACGGCTCCTTTGGTCC  TGCATTTGCAACAACAGCGG/CCCGCGTCCTTGGGACCAAA GGAGCCGTATCAGCTG
LoCath-25A	C25A	ACCAGGGTCGGTGTAAAGAGTGCCTATGCATTTGCAAC/ACC GACCCTGGTCCTTGACAGCTG  GTAAGAGTGCCTATGCATTTGCAAC/AGGCACTCTTACACC GACCCTGGTCCTTGACAGCTG
LoCath-25S	C25S	GGTGTAAAGAGTAGTTATGCATTTGCAACAAC/CCGCTGTTG TTGCAAATGCATAACTACTCTTACACCGACCC
LoCath-26W	Y26W	GTAAGAGTTGCTGGGCATTTGCAACAACAGCGG/GTTGTTG CAAATGCCAGCAACTCTTACACCGACCC
LoCath-GAS	K23G, S24A, C25S	CCAGGGTCGGTGTGGGGCAAGTTATGCATTTGCAACAACAG CGG/CTGTTGTTGCAAATGCATAACTTGCCCCACACCGACC CTGGTCC
LoCath-163A	H163A	TCCAGGACCAAGCTCACTGCCTCTCTCATCAT/CTTGGTCC TGGAGCAACTAGGCTC  CTCACTGCCTCTCTCATCATCATG/AGAGGCAGTGAGCTT GGTCCTGGAGCAACTAGGCTC
LoCath-187A	N187A	GACTACTGGCTTCTCAAGGCCAGCTGGGGCACCAG/AAGCC AGTAGTCATGGCCACTC  CTCAAGGCCAGCTGGGGCACCAG/GCTGGCCTTGAGAAGCC AGTAGTCATGGCCACTC

CTSL-24A	S24A	CCGTGTGGTGCTTGTTGGGCTTTTAGTGCTACTGGTGCTC/ CTAAAAGCCCAACAAGCACCACACGGACCCTGATTCTTCAC
CTSL-25S	C25S	CCGTGTGGTTCTTGTTGGGCTTTTAGTGCTACTGGTGCTC/ CTAAAAGCCCAACAAGAACCACACGGACCCTGATTCTTCAC
CTSL-26Y	W26Y	CCGTGTGGTTCTTGTTACGCTTTTAGTGCTACTGGTGCTC/ CTAAAAGCGTAACAAGAACCACACGGACCCTGATTCTTCAC
CTSL-AS	S24A, C25S	CCGTGTGGTGCTTCTTGGGCTTTTAGTGCTACTGGTGCTC/ CTAAAAGCCCAAGAAGCACCACACGGACCCTGATTCTTCAC
CTSL-SY	C25S, W26Y	CCGTGTGGTTCTTCTTACGCTTTTAGTGCTACTGGTGCTC/ CTAAAAGCGTAAGAAGAACCACACGGACCCTGATTCTTCAC
CTSL-ASY	S24A, C25S, W26Y	CCGTGTGGTGCTTCTTACGCTTTTAGTGCTACTGGTGCTC/ CTAAAAGCGTAAGAAGCACCACACGGACCCTGATTCTTCAC
CTSL-25A	C25A	CCGTGTGGTTCTGCTTGGGCTTTTAGTGCTACTGGTGCTC/ CTAAAAGCCCAAGCAGAACCACACGGACCCTGATTCTTCAC
CTSL-163A	H163A	TAGCAGTGAAGAGCTGGATCATGGTGTGCTGGTGGTTGG/A CACCATGATCCAGCTCTTCACTGCTACAGTCTGGCTC
CTSL-187A	N187A	ATTGGCTGGTGAAGGCAAGCTGGGGTGAAGAATGGGGCATG /CTTCACCCAGCTTGCCTTCACCAGCCAATATTTATTGTT ATC

\*нумерация остатков основана на катепсине L человека.

## 3.2 Трансформация бактерий

Фасовку компетентных клеток *E.coli* штамма XL1-Blue (Evrogen) или BL21Codon+(DE3) (Zymo Research) размораживали на льду. После этого к суспензии бактериальных клеток добавляли очищенный лигат, плазмидную ДНК или ПЦР-продукт.

### 3.2.1 Химическая трансформация

Компетентные клетки инкубировали с ДНК на льду в течение 30 мин, а затем 120 секунд в термостате при 42°C (тепловой шок). После теплового шока клетки снова помещали в лед на 1-2 минуты, после чего к ним добавляли 400 мкл среды SOB.

### 3.2.2 Электрическая трансформация

Компетентные клетки с ДНК переносили в предварительно охлажденную кювету для электропорации (Bio-Rad). Электропорацию проводили при помощи прибора MicroPulser (BioRad). Сразу после электропорации в кювету добавляли 1 мл среды SOB.

Независимо от метода трансформации суспензию клеток после добавления SOB переносили в стерильную пробирку, инкубировали при 37°C в течение 60 минут при постоянном перемешивании, а затем высевали на чашки Петри с агаризованной средой LB с добавлением селективного антибиотика канамицина (20 мкг/мл). Чашки инкубировали при 37°C в течение ночи (примерно 16 часов).

### 3.2.3 Проверка генетических конструкций

Наличие вставки в плазмиде подтверждали с помощью ПЦР, которую проводили с использованием колонии бактерий в качестве матрицы. Затем колонии, соедержащие вставку, пересевали на жидкую среду LB (4 мл) с содержанием канамицина (20 мкг/мл) и растили при 37°C и постоянном перемешивании в течение 16 часов. Из полученной культуры выделяли плазмидную ДНК. Очищенную плазмидную ДНК секвенировали в компании Evrogen с использованием стандартных праймеров T7uni (T7dir) (TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG) и T7rev (ATG CTA GTT ATT GCT CAG).

### 3.3 Методы работы с белками

#### 3.3.1 Выделение и очистка белков

Выросшие после трансформации плазмидной ДНК колонии бактерий *E. coli* штамма BL21Codon+ использовали для инокуляции жидкой среды LB (Evrogen), содержащей канамицин (20 мкг/мл), хлорамфеникол (40 мкг/мл) и глюкозу (1%). Культуру растили при 37°C и перемешивании в течении 16 часов. Суспензию использовали для инокуляции свежей среды (1 мл ночной культуры на 200 мл свежей среды). К среде добавляли канамицин и хлорамфеникол в тех же концентрациях. Бактериальную культуру растили при 37°C и постоянном перемешивании до достижения оптической плотности при 600 нм 0,4-0,6 (2-3 часа), после чего индуцировали экспрессию гена добавлением IPTG до концентрации 0,1 мМ. Затем культуру инкубировали при 37°C (для белков *L. oparinae*) или на комнатной температуре (катепсин L человека) при постоянном перемешивании около 16 часов. Клетки осаждали центрифугированием, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в растворе 25 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 5мМ DTT, pH 7.2 (20 мл). Бактериальные клетки разрушали при помощи ультразвука (Sonics Vibra-cell®, 5 мин на 200 мл бактериальной культуры, амплитуда 20-40%) в присутствии ингибитора протеаз PMSF в концентрации 1 мМ. Полученный лизат центрифугировали (16 000 g, 30 мин, 4°C), супернатант наносили на колонку, содержащую металло-аффинную смолу (Excell, GE Healthcare Life Sciences), предварительно уравновешенную буферным раствором. Смолу промывали 25 объемами раствора 25 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 5мМ DTT, pH 7.2. Затем белок элюировали раствором 25 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 5мМ DTT, pH 7.2, содержащим 200мМ имидазола. Полученный препарат белка хранили не более 3 дней. Перед анализом белок переносили в требуемый буферный раствор с помощью колонок Merck Millipore или колонок PD-10 (GE Healthcare Life Sciences). Концентрацию белка определяли по оптической плотности при 280 нм. Оптическая плотность растворов с концентрацией 1 г/л для LoSil, LoCath и CTSL составляла 2,1, 1,78 и 1,95, соответственно.

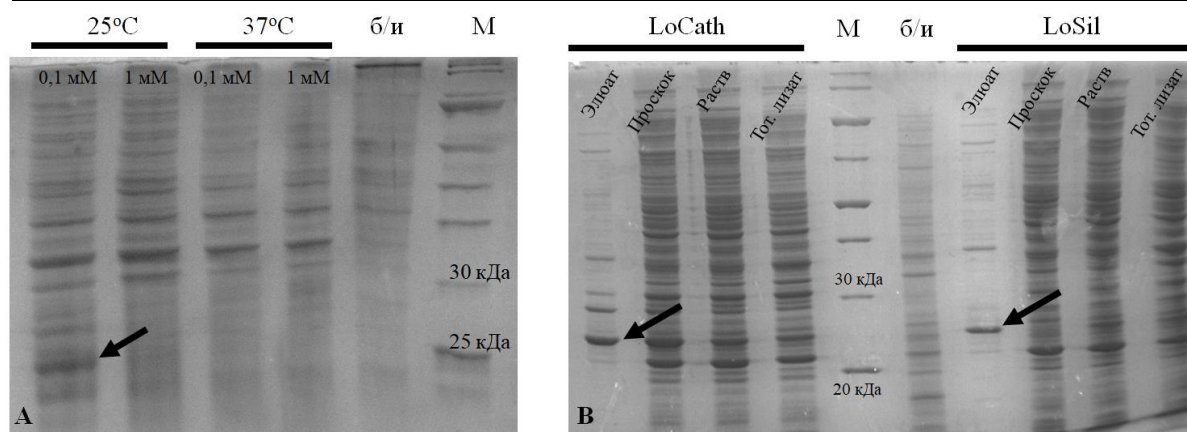
Оптимальные условия для индукции и экспрессии белков были проверены с помощью электрофореза. Результаты представлены на рисунке 22.

### 3.3.2 Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле

Экспрессию, а также чистоту выделенных рекомбинантных белков оценивали при помощи вертикального денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли [72]. Состав геля приведен в таблице 4.

**Таблица 4.** Состав геля для электрофоретического разделения белков.

Компонент	Разделяющий гель	Концентрирующий гель
Вода	1,75 мл	1,8 мл
30% Акриламид/бисакриламид (29:1)	2 мл	0,4 мл
1,5M Tris-HCl pH 8.8	1,25 мл	-----
0,5M Tris-HCl pH 6.8	-----	0,75 мл
10% SDS	-----	30 мкл
20% PSA	30 мкл	15 мкл
TEMED	3 мкл	3 мкл



**Рисунок 22.** Проверка экспрессии белков. **А.** Экспрессия катепсина L человека при разной температуре с разной концентрацией индуктора IPTG. На дорожки наносили растворимую фракцию тотального лизата клеточной культуры после индукции экспрессии и инкубации культуры при перемешивании в течение 16 часов. М-маркер длин, б/и - лизат культуры без индукции экспрессии. **В.** Экспрессия катепсина и силикатина губки *L. oparinae*. Все образцы получены после индукции экспрессии 0,1 mM IPTG и инкубации культуры при перемешивании в течение 16 часов. Тот.лизат - тотальный лизат бактериальной культуры, Раств - растворимая фракция тотального лизата, Проскок - фракция тотального лизата после инкубации с металло-афинной

смолой, Элюат - препарат белка, элюированный со смолы при добавлении имидазола, М-маркер длин, б/и - лизат культуры без индукции экспрессии. Черной стрелкой отмечен целевой белок.

### 3.4 Измерение спектра кругового дихроизма

Эксперименты проводили совместно с лабораторией искусственного антителогенеза ФНКЦ ФХМ. Для измерения спектров кругового дихроизма белков использовали спектрофотометр Chirascan (Applied Photophysics, UK), оснащенного термостатическим держателем кюветы, с кварцевыми кюветами с длиной оптического пути 0,05 см при 20 °С. Концентрация белка составляла 0,08 мг/мл в буфере PBS pH 5.5. Сканирование проводили с шагом в 1 нм и временем сканирования 1 с. Для каждого образца проводили два повторных сканирования, которые впоследствии усредняли. Из каждого спектра вычитали базовую линию (спектр пустого буферного раствора). Деконволюцию спектров кругового дихроизма выполнили с помощью программного обеспечения CDNN (версия 2.1, Applied Photophysics, UK) в диапазоне 205-260 нм (LoCath-GAS) или области 195-260 нм (все остальные белки), так как в этой области анализ показал наиболее достоверные результаты (т. е. общая сумма элементов вторичной структуры была ближе всего к 100%).

### 3.5 Синтез субстратов силикатеина

К смеси тетраэтоксисилана (10.4 г, 0.05 моль) и соответствующего спирта (этиленгликоля или глицерина, 0.2 моль) добавляли катионообменную смолу DOWEX 50 WX 8 (H<sup>+</sup>форма, 100 мг) и перемешивали при температуре 90°C в течение 10 ч. Полученную смесь отфильтровывали и сушили на роторном испарителе от остаточных количеств этилового спирта. Полученную бесцветную маслянистую жидкость (выход 90%) использовали в дальнейших экспериментах без дополнительной очистки.

### 3.6 Методы детекции силикатеиновой активности

#### 3.6.1 Получение частиц аморфного кремнезема

Предварительный гидролиз TEOS проводили путем добавления 50 мМ HCl и инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Концентрация TEOS в эмульсии составляла 10% (об/об). Раствор



ТГЭОС и ТГС готовили путем разбавления буфером Tris-HCl pH 7.2 до концентрации 10%. Растворы готовили непосредственно перед анализом.

Для получения частиц кремнезема аликвоту белка растворяли в буферном растворе, затем к раствору белка добавляли раствор субстрата. Для последующего колориметрического анализа готовили 600 мкл раствора белка необходимой концентрации, затем к нему добавляли 1 мл раствора субстрата. Для анализа частиц с помощью электронной микроскопии готовили 198 мкл раствора белка, в который добавляли 2 мкл 10% раствора субстрата. Реакцию останавливали центрифугированием (10 мин, 16000 g), частицы трижды промывали 96% этанолом и высушивали на воздухе.

Условия проведения каждого конкретного эксперимента приведены в подписи к рисунку с результатами эксперимента. В каждом анализе любая экспериментальная точка была получена в 3 повторностях. Каждый анализ проводили не менее 3 раз.

Для определения зависимости активности белка от pH использовали набор 50мМ буферов с pH от 3.5 до 9.0 с шагом 0.5 (цитратные буферы для pH 3.5-4.5, фосфатные буферы для pH 5.0- 7.5 и боратные буферы для pH 8.0-9.0).

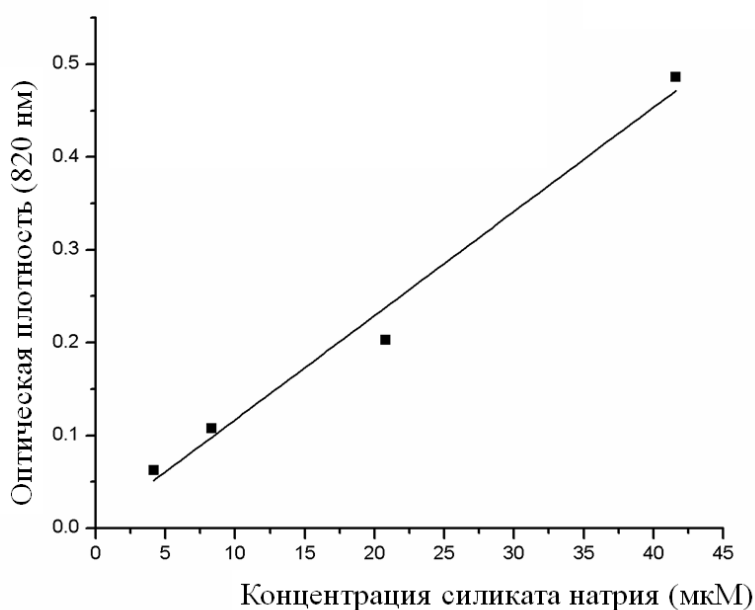
### 3.6.2 Сканирующая электронная микроскопия (SEM) и элементный анализ

Эксперименты проводили совместно с лабораторией медицинской нанотехнологий ФНКЦ ФХМ. Частицы кремнезема промывали 200 мкл 6М гуанидинхлорида, затем 1 раз промывали водой, 3 раза 70% спиртом, затем высушивали на воздухе. Промытые частицы растворяли в 200 мкл деионизированной воды и тщательно ресуспендировали. 10 мкл суспензии наносили на подложку из свежесколотого высокоориентированного пиролитического графита (ZYB, NT-MDT, Россия) на одну минуту. Оставшуюся жидкость удаляли потоком азота или испаряли при пониженном давлении. Прикрепившиеся к подложке частицы анализировали без дальнейшей модификации. Энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (EDS) проводили с помощью сканирующего электронного микроскопа (Zeiss MERLIN, эмиссионный электронный микроскоп, совместимый с ESEM) с использованием детектора Silicon Drift Detector (SDD) X-MaxN 150мм<sup>2</sup> (Oxford Instruments, Великобритания) соединенного с электронным микроскопом, и программного обеспечения AZtecEnergy EDS Software (Version 3.0) для получения изображений. Рабочее расстояние составляло 8,5 мм, а ускоряющее напряжение 15 кэВ, что позволяло получать и изображения SEM, и карты элементного анализа. Изображения с высоким

разрешением получили с использованием детектора InLens при 1-2 кВ и 100-200 пА. Параметры получения изображения настраивали таким образом, чтобы время получения изображения не превышало 1 минуты.

### 3.6.3 Колориметрическое определение содержания силиката

Анализ основан на методике определения количества молибденовой гетерополикислоты кремния, описанной в работе Brzezinski et al [73]. Частицы кремнезема растворяли в 200 мкл 2М NaOH не меньше 10 минут, затем добавляли 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> до достижения pH 1,6-1,8 (115-130 мкл). Образец разбавляли деионизированной водой до объема 1,46 мл и добавляли 135 мкл 5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>. Полученный раствор инкубировали 15 минут. Затем в раствор добавляли 135 мкл 10% винной кислоты. Если раствор приобретал желтую окраску, образец разбавляли аналогичной смесью 2М NaOH, 2М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, воды, 5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> и 10% винной кислоты до исчезновения окраски. После разбавления в раствор добавляли 135 мкл 1% аскорбиновой кислоты и инкубировали образцы при комнатной температуре в течение 2 часов. Количество силиката определяли по оптической плотности раствора при 820 нм с использованием калибровочной прямой. Образцы для получения калибровочной прямой готовили параллельно с анализируемыми образцами из известного количества силиката натрия. Молярный коэффициент экстинкции составлял 11000-20000 л\*см/моль. Предел детекции анализа составлял 1 мкМ. Пример калибровочной прямой приведен на рисунке 23.



**Рисунок 23.** Пример калибровочной прямой для колориметрического определения содержания силиката в образце. Уравнение прямой  $y=kx+b$ ,  $k=0.011\pm 9.9\cdot 10^{-4}$ ;  $b=0.004\pm 0.02355$ .

Количество самопроизвольно полимеризованного кремнезема вычитали из количества кремнезема, полимеризованного с помощью белков.

### 3.7 Анализ цитотоксичности

В работе использовали культуру эукариотических клеток линии HeLa Kyoto. Для культивации клеток использовали среду DMEM (ПанЭко), дополненную 2мМ глутамина (ПанЭко), смесью антибиотиков (пенициллин и стрептомицин, ПанЭко), содержащую 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, Thermo Scientific). Культуры растили в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C и пересевали раз в 2-3 дня.

Для анализа клетки вырастили в 96-луночной планшете до формирования сплошного монослоя. Затем среду сменили на раствор ТЭОС, ТГЭОС или ТГС в среде для культивирования с 50 мМ HEPES. После 24 часов инкубации оценили количество живых клеток с помощью реагента alamarBlue™ Cell Viability Reagent (Thermo-Fisher Scientific, cat# DAL1025) в соответствии с инструкциями производителя.

### 3.8 Компьютерная обработка данных

Анализ последовательностей (результатов секвенирования или выравнивания последовательностей из баз данных) выполняли с помощью программы Unipro UGENE [74]. Изображения выравниваний последовательностей были получены с помощью программы JalView.

Пространственные структуры белков анализировали с помощью программы Chimerae [75].

Для определения изоэлектрической точки и коэффициента экстинкции белков использовали сервис ExPASy ProtParam [85].

Статистическую обработку результатов измерений проводили в программе OriginPro 8. На графиках с результатами экспериментов показаны средние значения и стандартные отклонения по результатам трех экспериментов. Достоверность различий определяли с помощью двухвыборочного t-теста.

## 4 Цели и задачи

### 4.1 Цель

Изучение биохимических особенностей силикатеинов и родственных белков в контексте их перспективного использования для ферментативного образования кремнезема *in vitro* и *in vivo*.

### 4.2 Задачи

1. Найти и охарактеризовать водорастворимый субстрат для силикатеина
2. Определить оптимальные условия активности силикатеина
3. Провести мутационный анализ силикатеина и родственных белков

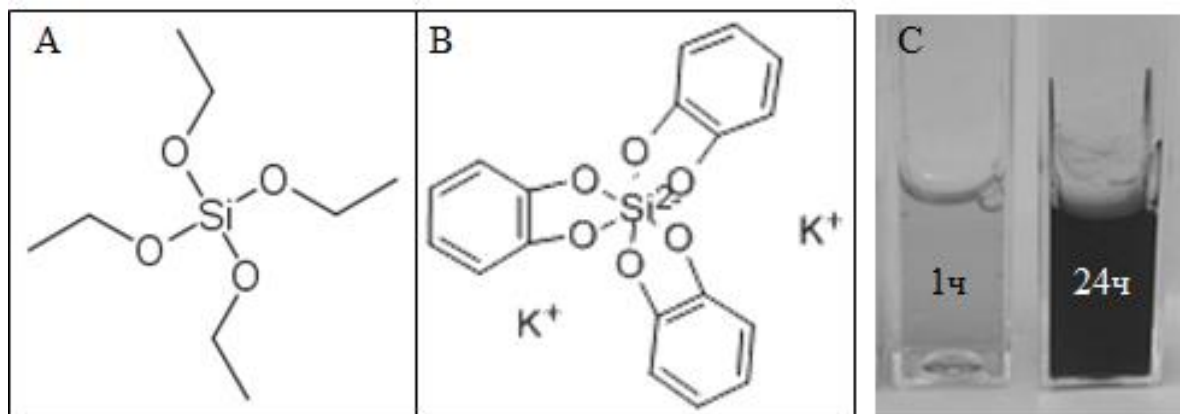
## 5 Результаты и обсуждение

### 5.1 Выбор субстрата

Природным субстратом силикатеина считается ортокремниевая кислота. Поэтому в лабораторных условиях при исследовании силикатеинов используются соединения, для которых ортокремниевая кислота является продуктом гидролиза. Чаще всего в качестве предшественника кремниевой кислоты используется тетраэтил ортосиликат (ТЭОС, рис. 24А) - дешевый и широкодоступный, однако плохо растворимый в воде реагент. Для облегчения реакции ТЭОС часто прегидролизуют 50 мМ раствором HCl. Путем полного гидролиза ТЭОС получают метастабильный раствор ортокремниевой кислоты, склонный к самопроизвольной полимеризации, который также использовали в некоторых исследованиях [39].

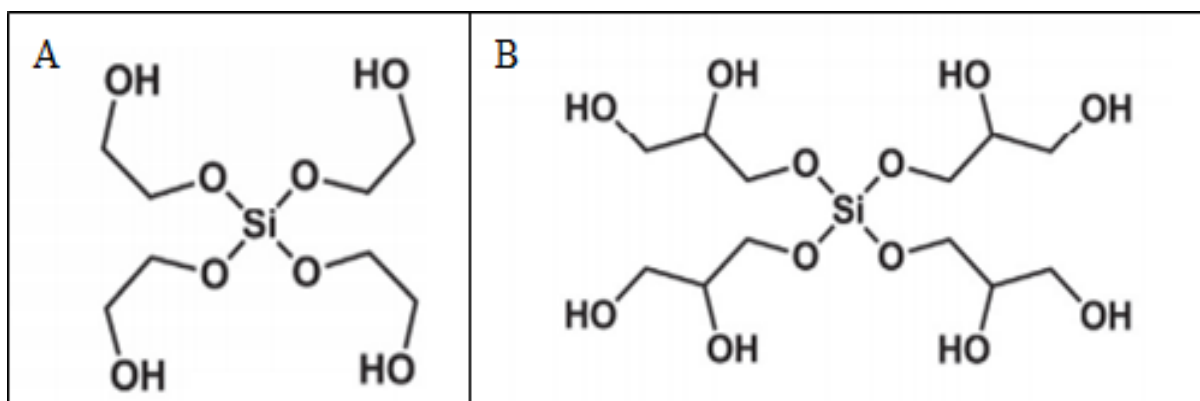
Трис(катехол)ортосиликат калия (рис 24В) хорошо растворим в воде, однако опасен для человека, значительно дороже, чем ТЭОС, а продукты его гидролиза осмоляются (рис 24С).

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



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

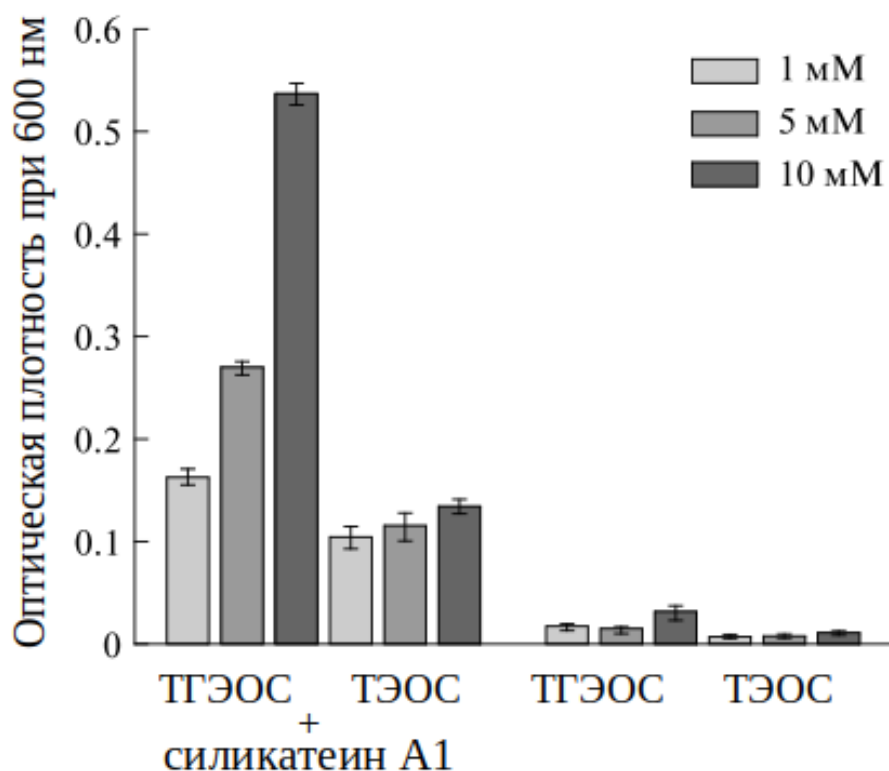
В качестве новых субстратов были предложены аналогичные ТЭОС алкоксисиланы с более гидрофильными заместителями: ТГЭОС — тетракис(2-гидроксиэтил) ортосиликат - и ТГС - тетраглицерол ортосиликат (рис. 25).



**Рисунок 25.** Структурные формулы предложенных субстратов А- ТГЭОС и Б - ТГС

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

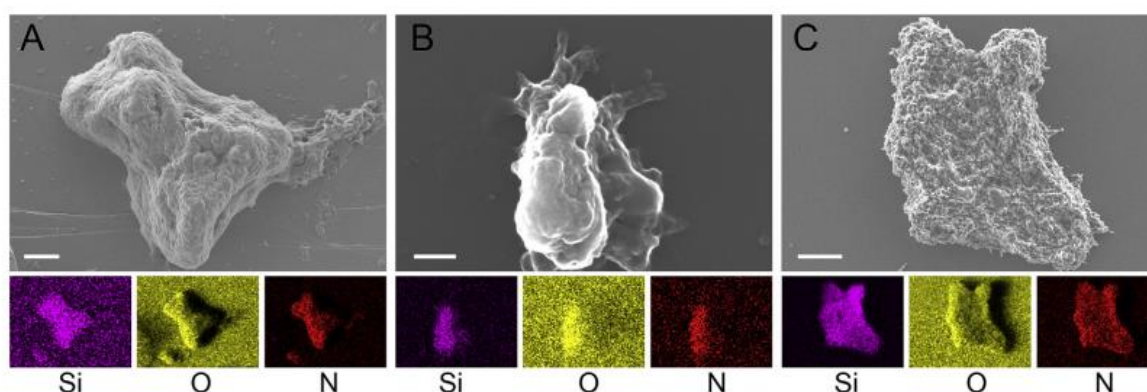
### 5.1.1 Активность силикатеина А1 с различными субстратами



**Рисунок 26.** Сравнение ТГЭОС и ТЭОС в качестве субстратов для силикатеина А1. Гистограмма показывает оптическую плотность при 600 нм растворов ТГЭОС и ТЭОС с концентрацией 0,02%, 0,1% и 0,2% после инкубации в присутствии (слева) или в отсутствие (справа) силикатеина А1. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, концентрация белка 0.2 мг/мл, 1 ч, 25°C.

Для оценки активности новых субстратов сначала использовали изменение оптической плотности раствора при 600 нм. (рис. 26). Однако этот подход имел ряд ограничений. Во-первых, для видимого помутнения раствора необходима была высокая концентрация белка (0,2 мг/мл). Во-вторых, светорассеяние могло быть связано не только с образованием частиц кремнезема, но и с денатурацией белка из-за продуктов гидролиза алкоксисиланов, или с агрегацией белка. По этим причинам необходима была более точная оценка эффективности образования частиц диоксида кремния.

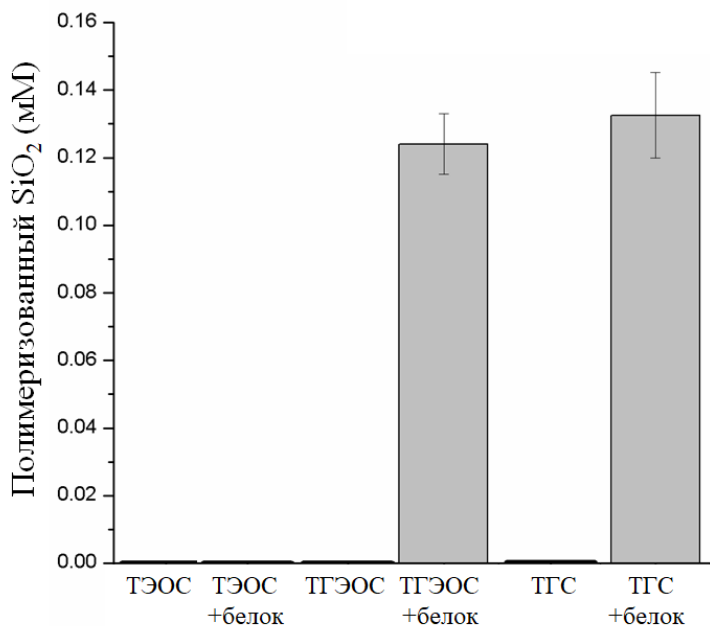
Частицы, образованные силикатеином А1 при добавлении субстратов, детектировали при помощи сканирующей электронной микроскопии (рис. 27). Эксперименты проводили совместно с лабораторией медицинских нанотехнологий ФНКЦ ФХМ. В присутствии всех трех исследованных субстратов силикатеин образовывал частицы аморфного кремнезема. Состав частиц был подтвержден с помощью элементного анализа - частицы состояли преимущественно из кремния, кислорода и азота. Из-за использования графитовой подложки обнаружить углерод в составе частиц было невозможно.



**Рисунок 27.** Частицы, образованные силикатеином А1 в присутствии 0,1% раствора субстратов. А - ТЭОС с 0,2 мг/мл белка (масштабная линейка 2 мкм), В - ТГЭОС с 0,06 мг/мл белка (масштабная линейка 0,2 мкм), С - ТГС с 0,06 мг/мл белка (масштабная линейка 2 мкм). Под электронной микрофотографией приведены результаты элементного анализа. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 0,1% ТГС, 1 ч, 25°C.

Эффективность образования частиц сравнивали количественно с помощью колориметрического анализа (рис. 28). Частицы кремнезема осаждали центрифугированием и растворяли в щелочи, после чего определяли содержание силиката в растворе по образованию восстановленной формы кремнемолибденовой гетерополикислоты — окрашенному соединению с максимумом поглощения при 820 нм.





**Рисунок 28.** Сравнение активности силикатеина А1 с разными субстратами. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,1 мг/мл, концентрация субстратов 0,1%, 1 ч, 25°C.

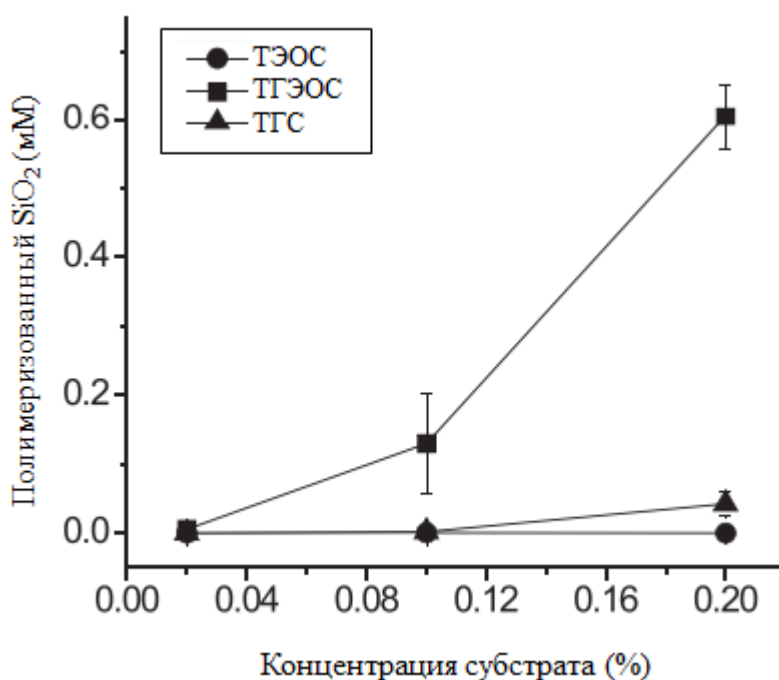
Силикатеин А1 продемонстрировал примерно одинаковую активность в присутствии ТГЭОС и ТГС, активность с ТЭОС в данных условиях мы не обнаружили. По этой причине для получения частиц для сканирующей микроскопии с ТЭОС использовали в два раза большую концентрацию белка.

### 5.1.2 Стабильность субстратов в водных растворах

Мы предположили, что большая эффективность силикатеина А1 связана с большей степенью гидролиза новых субстратов. Поскольку ортокремниевая кислота склонна к самопроизвольной полимеризации, в менее стабильных растворах прекурсоров ортокремниевой кислоты самопроизвольное образование частиц кремнезема должно происходить эффективнее. Мы оценили уровень самопроизвольной полимеризации кремнезема в растворах прекурсоров (рис. 29). Чем сильнее гидролизуется субстрат, тем активнее происходит самопроизвольная полимеризация ортокремниевой кислоты.

Оказалось, что ТГЭОС гидролизуется значительно эффективнее других соединений. В растворах ТЭОС и ТГС практически не образовывалось крупных частиц, которые можно обнаружить с помощью нашего метода детекции. Неожиданно, при концентрации 0,1% уровень гидролиза ТГС незначительно превышал уровень гидролиза ТЭОС. Но, по-видимому, уровень образования ортосиликата в растворе ТГС достаточен

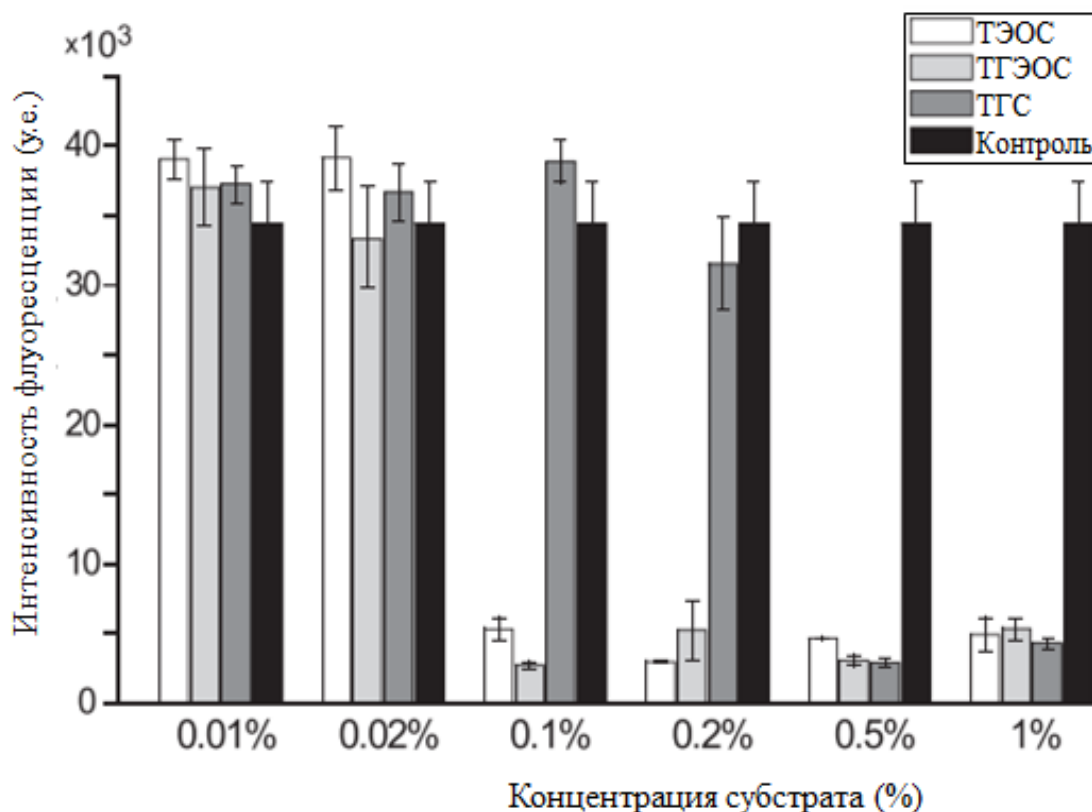
для активной работы силикатеина A1. Возможно, также, что белок непосредственно гидролизует ТГС или взаимодействует с продуктами его частичного гидролиза.



**Рисунок 29.** Самопроизвольная конденсация кремнезема в растворах ТЭОС, ТГЭОС и ТГС разной концентрации. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, 1 ч, 25°C.

### 5.1.3 Токсичность субстратов

Для исследования силикатеиновой активности в живых клетках мы оценили токсичность исследуемых соединений и продуктов их гидролиза. Для этого мы проверили выживаемость клеток линии HeLa Kyoto в среде с добавлением субстратов (рис. 30). Как и ожидалось, ТГС оказался наименее токсичным из проверенных субстратов, поскольку глицерин, как продукт гидролиза, является менее токсичным для живых клеток, чем этанол и этиленгликоль, образующиеся при гидролизе ТЭОС и ТГЭОС, соответственно.



**Рисунок 30.** Выживаемость клеток Hela Kyoto в среде с добавлением различных субстратов, измеренная с помощью реагента AlamarBlue. Клетки инкубировали с субстратами в течение 24 часов при 37°C.

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

Учитывая высокую активность силикатеина А1 с ТГС, низкую самопроизвольную полимеризацию кремнезема в растворе ТГС, а также его меньшую токсичность, мы выбрали ТГС для дальнейшей работы с силикатеином А1.

## 5.2 Свойства силикатеина А1

Зрелый силикатеин А1 состоит из 218 аминокислотных остатков и имеет массу 23,5 кДа. Первоначально для оценки активности силикатеина были выбраны условия, использованные в предыдущих работах для других силикатеинов [2]. Несмотря на сходство ключевых остатков (рис. 31), силикатеин А1 значительно отличается от ранее изученных силикатеинов общим зарядом — его изоэлектрическая точка составляет 8,4,

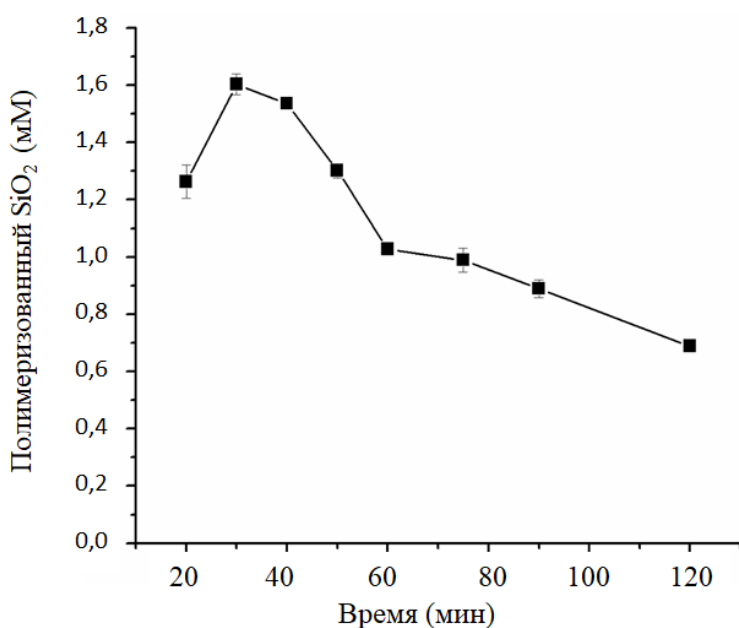
в то время как рI силикатеинов *α S. domuncula* и *T. aurantium* составляет около 5. Решено было проверить влияние различных параметров реакции на эффективность полимеризации кремнезема.



**Рисунок 31.** Выравнивание последовательностей зрелых силикатеинов *L. oparinae* (LoSilA), *T. aurantium* (Sil-αT) и *S. domuncula* (Sil-αS). Черными прямоугольниками отмечены остатки каталитического центра и полисериновый тракт. Серыми прямоугольниками отмечены цистеины, образующие дисульфидные связи. Последовательности идентичны силикатеину A1 на 75% и 78%, соответственно.

### 5.2.1 Кинетика полимеризации кремнезема

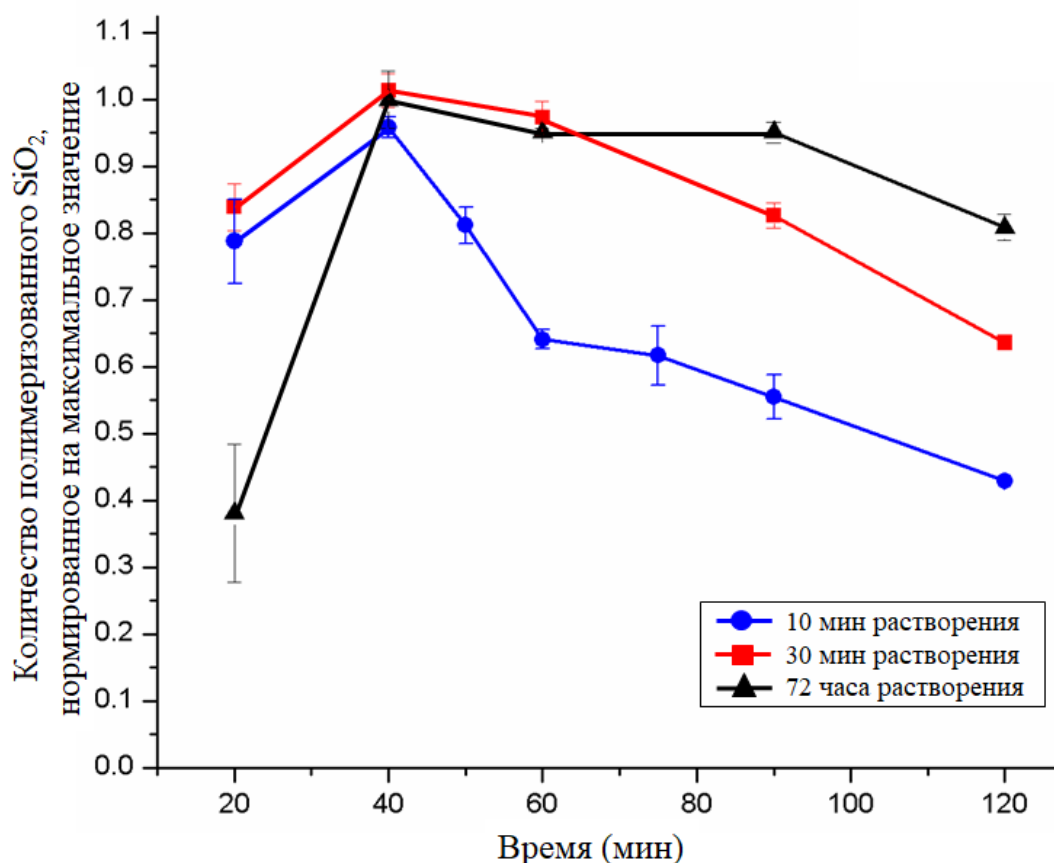
В первых работах с рекомбинантным силикатеином реакцию проводили в течение часа. Мы оценили количество кремнезема, образующееся при разном времени инкубации реакционной смеси, и получили неожиданные результаты (рис. 32). После достижения максимального значения, количество силиката в анализе со временем уменьшалось, за полтора часа снижаясь почти в два раза.



**Рисунок 32.** Зависимость количества полимеризованного кремнезема от продолжительности реакции. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 25°C.

Мы предположили, что частицы по каким-то причинам перестают детектироваться в нашей системе. Например, для сбора частиц мы использовали центрифугирование. Если частицы становились мельче или менее плотными, они могли перестать оседать при выбранном ускорении. Однако в литературе не описаны подобные эффекты для частиц кремнезема, наоборот, со временем образование связей между молекулами может увеличиваться, этот эффект называют также спеканием кремнезема [76].

Следующий этап нашего анализа - растворение осадка в щелочи. Осадок виден в высушенном виде, но при добавлении гидроксида натрия практически сразу становится незаметен, так что полноту растворения сложно детектировать. Мы предположили, что потери происходят на этом этапе, и провели аналогичный эксперимент, в котором высушенные частицы растворяли в течение разного времени (рис. 33).



**Рисунок 33.** Зависимость полимеризации кремнезема от времени. Эксперименты проведены в одинаковых условиях, но собранные частицы растворяли в течение разного времени. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 25°C.

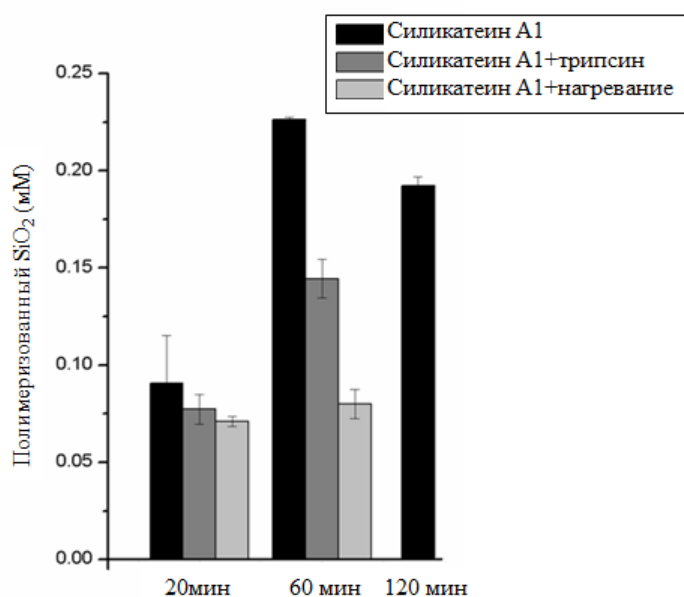
На рисунке 33 видно, что с увеличением времени растворения частиц падение количества кремнезема в анализе заметно уменьшилось, т.е. в первом анализе мы действительно растворили не весь образовавшийся кремнезем. Даже за 72 часа количество кремнезема в анализе все еще снижалось, что показывает, что растворимость частиц уменьшилась значительно.

С помощью дифракционного анализа спикул кремниевых губок было показано, что кремнезем, полимеризованный силикатеином, имеет поры [33]. Первоначально полимеризованный кремнезем со временем становится более плотным и размер пор уменьшается [76]. Этот процесс может быть связан как с активностью силикатеина, так и происходить самопроизвольно.

Мы решили проверить, насколько эффект спекания связан с активностью белка. Для этого мы разрушали белок на 20 и 60 минуте реакции, но продолжали инкубировать частицы до достижения отметки в 120 минут (рис. 34). Для разрушения фермента

использовали трипсин или тепловую денатурацию (5 мин при 75°C). Инактивация трипсином осложняется тем, что трипсин может плохо проникать внутрь частиц кремнезема, а температурную инактивацию нельзя проводить при высокой температуре, потому что высокая температура может вызывать изменения в строении кремнезема сама по себе. В работе Croce et al [33] было показано, что структура аморфного кремнезема, образующего спикулы *T. aurantium*, значительно изменяется при нагревании до 250°C в течение 2 часов. Но нельзя исключать, что на частицы, образованные *in vitro*, окажет заметный эффект и меньший нагрев.

При инаktivации силикатеина через 20 минут после начала реакции растворимость частиц не изменялась. То есть дополнительных связей в частицах за оставшиеся 100 минут инкубации не образовывалось. Вероятно, полученный кремнезем имеет не оптимальную структуру для дальнейшей самопроизвольной полимеризации. Но при инаktivации белка на 60 минуте реакции, растворимость частиц значительно снизилась и при ферментативной, и при температурной инаktivации. Больше снижение растворимости при температурной инаktivации, вероятно, связано с эффектом от нагревания и температурным спеканием кремнезема. Интересно, что при инкубации реакционной смеси в течение с двух часов с активным силикатеином, частицы лучше растворимы. Видимо, силикатеин, направляя полимеризацию, препятствует самопроизвольному образованию новых связей. Возможно также, что при разрушении белка просто заполняются кремнеземом ячейки, прежде занятые молекулами белка.

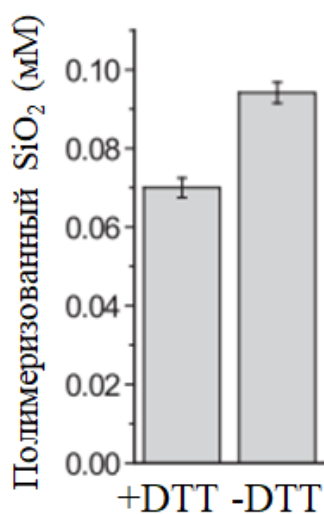


**Рисунок 34.** Количество растворимого силиката натрия в образцах с активным или инаktivированным силикатеином. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 25°C.

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

### 5.2.2 Эффект от образования дисульфидных связей

В молекуле силикатеина образуется 3 внутримолекулярных дисульфидных связи [1]. Кроме того, дисульфидные связи принимают участие в начальных этапах олигомеризации силикатеина [9]. Мы решили проверить эффект от присутствия восстанавливающего агента на эффективность полимеризации кремнезема (рис. 35). Анализ показал, что добавление DTT уменьшает количество образуемых частиц на 20%. Таким образом, полученные результаты согласуются с ранее опубликованными для другого силикатеина данными, что образование внутри- и межмолекулярных дисульфидных связей не является необходимым для полимеризации кремнезема силикатеином [32].



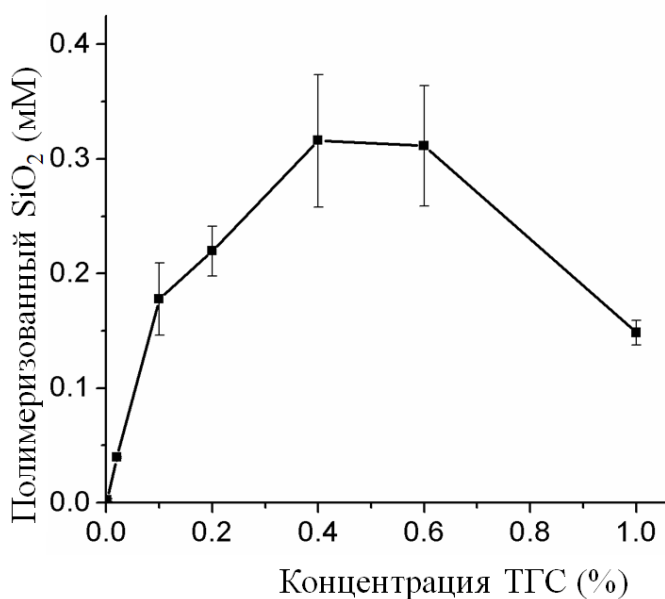
**Рисунок 35.** Полимеризации кремнезема силикатеином А1 в присутствии и без добавления 5 мМ DTT. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 мМ NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 25°C

### 5.2.3 Зависимость активности силикатеина от концентрации субстрата

Мы оценили эффективность полимеризации кремнезема при разных концентрациях ТГС (рис. 36). Максимальная эффективность наблюдалась при концентрации 0,4%, после чего активность фермента снижалась. Падение активности может иметь несколько объяснений. Возможно, этот эффект связан с явлением субстратного ингибирования [77]. Кроме того, активность может падать из-за

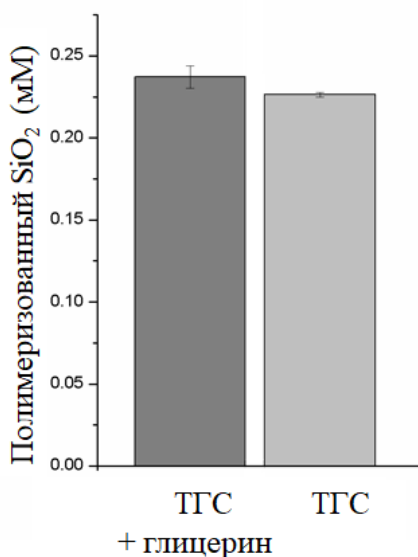


увеличения концентрации глицерина, поскольку ранее было описано, что глицерин препятствует нормальной олигомеризации белка [4]. Также глицерин изменяет вязкость раствора. Глицерин присутствует в растворе ТГС и образуется в результате гидролиза.



**Рисунок 36.** Активность силикатеина A1 *L. oparinae* при разной концентрации ТГС. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, 1ч, 25°C

Мы оценили активность фермента при добавлении 1% глицерина (рис. 37)



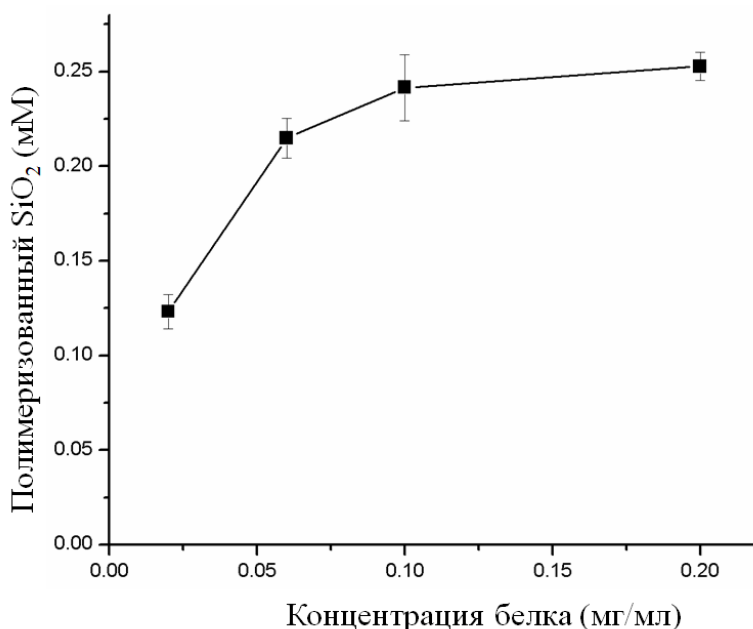
**Рисунок 37.** Сравнение активности силикатеина A1 *L. oparinae* при добавлении и в отсутствии 1% глицерина. Условия: Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 25°C

Добавление в реакционную смесь глицерина до концентрации 1% не изменяло активность силикатеина A1. Таким образом, даже несмотря на то, что глицерин

образуется в четырехкратном избытке относительно субстрата, при концентрации ТГС 0,1-0,2% негативного влияния на работу белка глицерин не оказывает. Дополнительный глицерин в реакционной смеси также снижает степень самопроизвольного гидролиза ТГС, тем самым снижая количество ортосиликата, но, видимо, этот эффект незначителен при использованных концентрациях.

#### 5.2.4 Зависимость эффективности реакции от концентрации белка

После определения подходящей концентрации субстрата, мы проверили зависимость эффективности реакции от концентрации белка (рис. 38). В первых работах на силикатеинах белок использовали в относительно высокой для фермента концентрации 0,06 мг/мл (2,6 мкМ) [2].

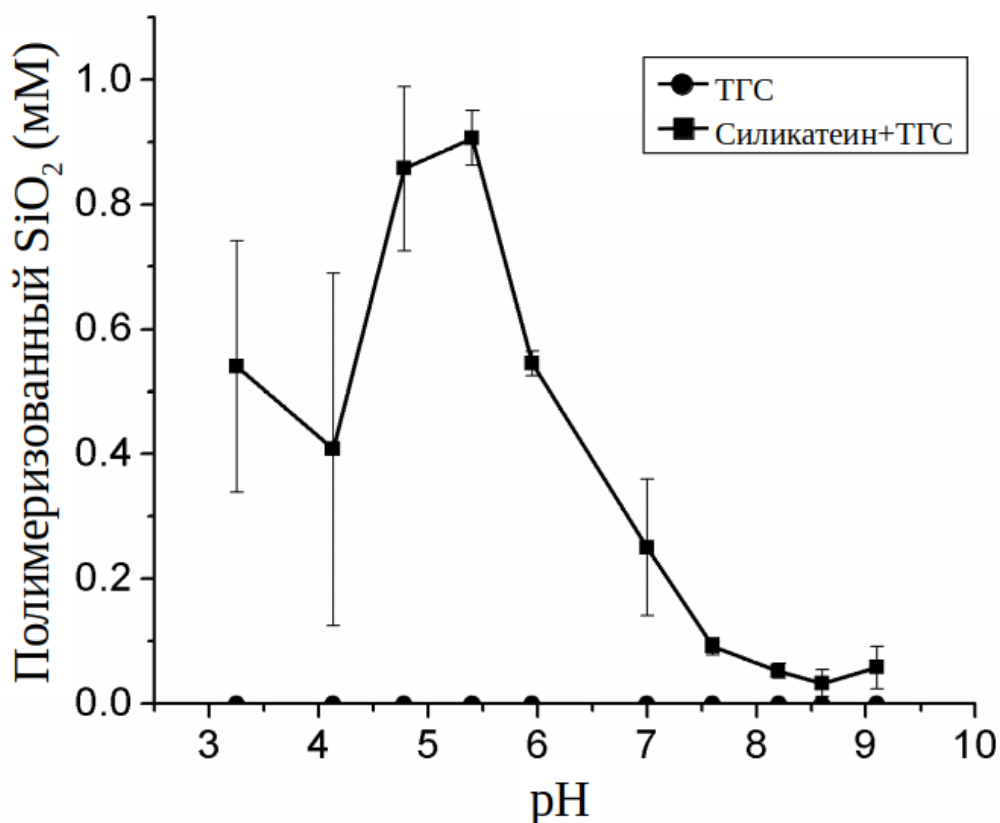


**Рисунок 38.** Зависимость эффективности полимеризации кремнезема от концентрации силикатеина А1. Условия: Tris-HCl pH 7,2, 150 мМ NaCl, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 25°C

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

#### 5.2.5 Зависимость полимеризации кремнезема от pH

Зависимость активности силикатеина А1 от pH раствора имела максимум в области 5-5,5, что соответствует области максимальной активности катепсинов (рис. 39) [78].



**Рисунок 39.** Активность силикатеина А1 в зависимости от pH раствора. Условия: Концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 25°C

Изменение pH влияет как на белок, так и на субстрат. В кислой или щелочной среде гидролиз алкоксисиланов происходит более интенсивно [79], что повышает концентрацию ортосиликата. Однако мы не наблюдали значительного возрастания уровня самопроизвольного гидролиза субстрата. Для силикатеина изменение pH означает изменение заряда гистидина активного центра, а также общего заряда поверхности.

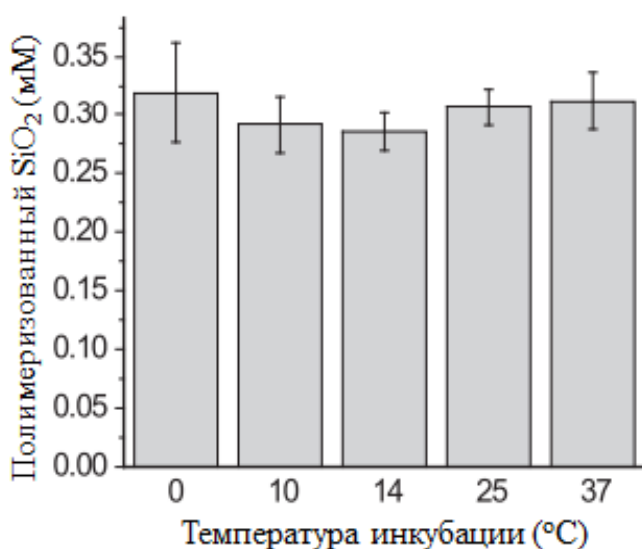
Интересно, что для силикатеина  $\alpha$  *T. aurantium* максимум активности наблюдали при pH 10. Исследованные силикатеины не отличаются строением активного центра, но заметно различаются суммарным зарядом белка. Теоретическая pI силикатеина А1 составляет 8,4, а силикатеина  $\alpha$  5. Полученные данные означают, что на активность фермента больше влияет суммарный заряд молекулы, чем протонирование или депротонирование каталитического гистидина. При приближении pH реакционной смеси к изоэлектрической точке силикатеина образование полимеризованного

кремнезема значительно снижалось. Это может быть связано с нарушением образования олигомеров силикатеина, наблюдаемым в предыдущих работах [9] или просто с частичной денатурацией или агрегацией белка.

По результатам этого эксперимента дальнейшие измерения проводили в буфере PBS с pH 5.3.

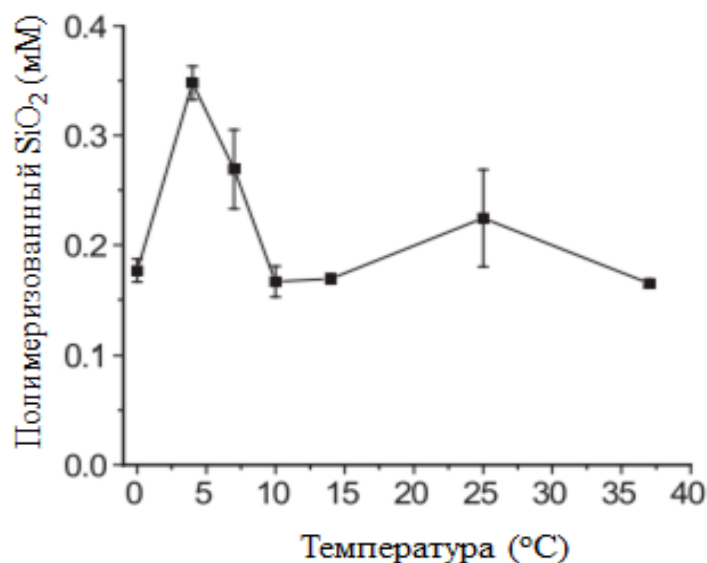
### 5.2.6 Зависимость полимеризации кремнезема от температуры

Для определения зависимости эффективности реакции от температуры сначала оценили стабильность белка при разных температурах (рис. 40). Анализ показал, что инкубация белка в течение часа даже при 37°C не влияет на активность белка.



**Рисунок 40.** Количество полимеризованного кремнезема при разной температуре инкубации белка до реакции. Условия: PBS pH 5.3, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч,

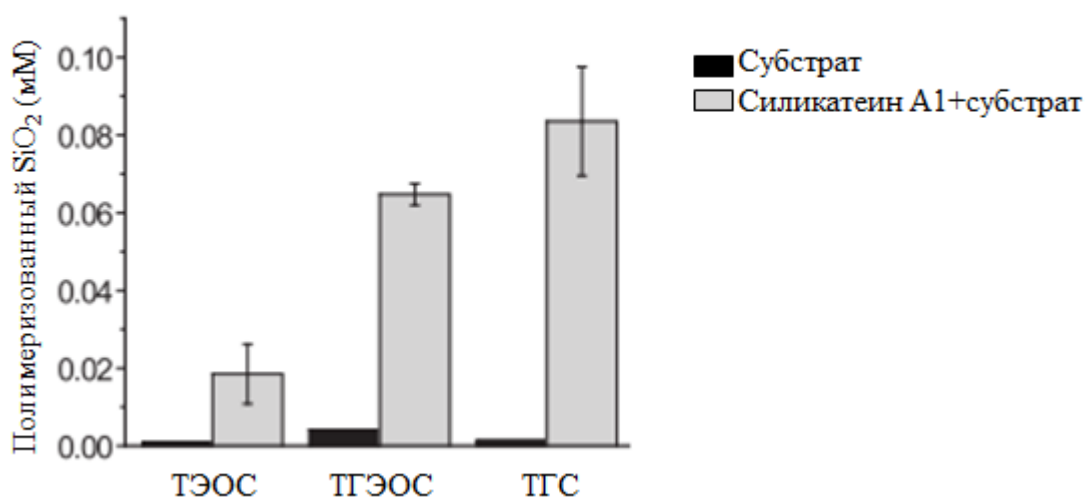
Температурная зависимость активности силикатеина выражена слабо, активность белка в оптимальных условиях увеличивается всего в два раза, наиболее эффективно частицы кремнезема образуются при 4°C (рис. 41). Вероятно, такая нечувствительность к температуре связана с широким температурным диапазоном, в котором обычно живут губки.



**Рисунок 41.** Активность силикатеина A1 в зависимости от температуры реакции. Условия: PBS pH 5.3, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч,

### 5.2.7 Сравнение субстратов в оптимальных условиях

Предыдущие эксперименты показали, что оптимальными условиями для белка являются: pH 5,0-5,5, 4°C, концентрация белка 0,6 мг/мл, время реакции - 40 мин. Оптимальная концентрация ТГС составляла 0,4%, но для ТГЭОС уже при концентрации 0,2% наблюдали значительный уровень самопроизвольной полимеризации кремнезема, поэтому для адекватного сравнения в качестве рабочей концентрации выбрали 0,1%. Оптимальным временем реакции выбрали 1 час, поскольку для ТГС разница еще не значима, а для заметной активности ТЭОС лучше было увеличить продолжительность реакции. Результаты сравнения всех трех субстратов представлены на рисунке 42.



**Рисунок 42.** Сравнение активности силикатеина с ТЭОС, ТГЭОС и ТГС при оптимальных условиях. Условия: PBS pH 5.3, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация субстратов 0,1%, 1 ч, 4°C.

Силикатеин А1 в четыре раза более активен с ТГС, чем с ТЭОС. Образование частиц кремнезема относительно самопроизвольной полимеризации увеличивается в 24, 16 и 64 раза для ТЭОС, ТГЭОС и ТГС, соответственно.

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

### 5.3 Анализ активности силикатеина А1 и родственных белков

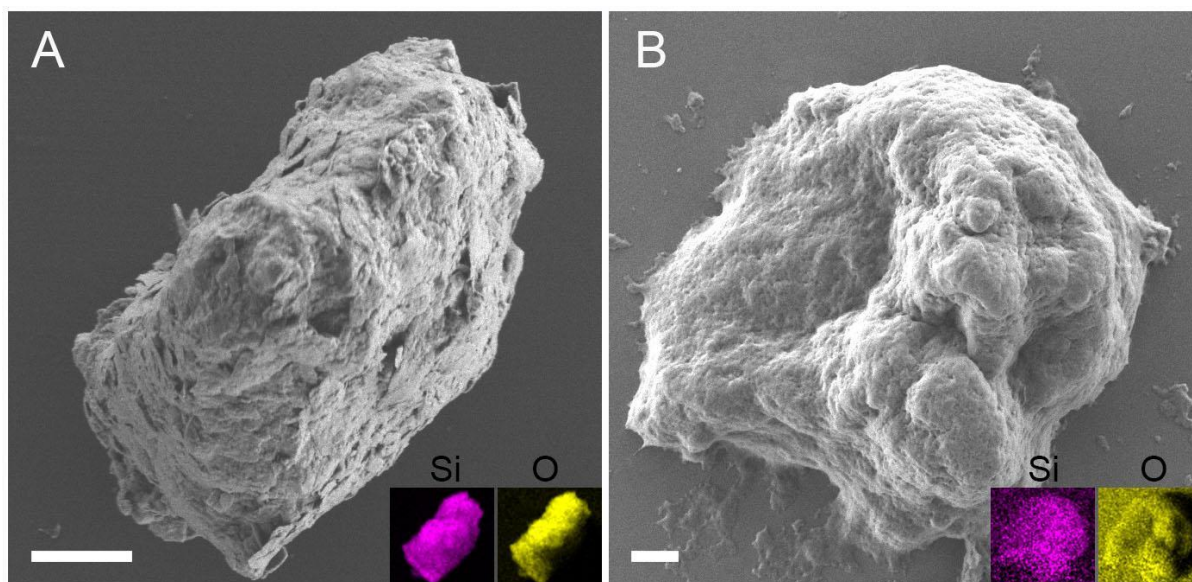
Спикулы губок очень разнообразны по форме, а также механическим и оптическим свойствам. Возможность осуществлять синтез аналогичных материалов в нейтральных условиях с самого начала привлекала большое внимание исследователей. И несмотря на определенные успехи в практическом применении силикатеинов, механизм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

вовлеченных в полимеризацию кремнезема согласно существующим моделям, повлияют на активность белка.

### 5.3.1 Выбор позиций для мутагенеза

Ранее было показано, что катепсин L *L. oparinae* способен полимеризовать кремнезем в присутствии ТГЭОС [47]. Этот факт плохо согласуется с существующими гипотезами о механизме катализа конденсации кремнезема, поскольку катепсин имеет в активном центре остаток цистеина, а не серина. Ранее считалось, что остаток серина в активном центре является ключевым для катализа [1].

Сначала мы проверили образование частиц силикатеином A1 (LoSil) и катепсином губки (LoCath) *L. oparinae* в присутствии ТГС (рис. 43). Оба белка образовывали аморфный кремнезем, аналогичный по элементному составу. После этого решено было провести мутагенез белков.



**Рисунок 43.** Сканирующая электронная микроскопия частиц кремнезема. Показаны репрезентативные частицы, образованные LoSil (A) и LoCath (B) в присутствии ТГС. Во вставках показаны карты рентгено-флуоресцентного анализа. Кремний - пурпурный, кислород - желтый. Масштабная линейка 1 мкм. Условия: Tris-HCl pH 6.8, 150 mM NaCl, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 25°C

Силикатеины обладают высокой гомологией с цистеиновыми протеазами, особенно катепсинами L, в том числе, катепсином L человека (CTSL) [1]. Во всех работах, посвященных механизму образования аморфного кремнезема силикатеинами, позиции для мутагенеза выбирались исходя из различий между силикатеинами и CTSL, поскольку считалось, что катепсин не способен полимеризовать кремнезем. Как правило, силикатеины сравнивали с катепсином L человека, поскольку этот катепсин не

считали способным полимеризовать кремнезем. В нашей работе мы проанализировали последовательности наиболее изученных силикатеинов *T. aurantium* и *S. domuncula*, катепсина (LoCath) и силикатеина (LoSil) губки *L. oparinae* и катепсина L человека (рис. 44).



**Рисунок 44.** Выравнивание последовательностей силикатеина- $\alpha$  *Tethya aurantium* (Sil- $\alpha$ T), силикатеина- $\alpha$  *Suberites domuncula* (Sil- $\alpha$ S), силикатеина A1 *L. oparinae* (LoSil), катепсина *L. oparinae* (LoCath) и катепсина L человека (CTSL). Позиции, выбранные для мутагенеза, отмечены черными прямоугольниками.

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

Самым очевидным кандидатом для мутагенеза является первый остаток каталитической триады - Ser25 у силикатеинов или Cys25 у катепсинов. По этому остатку были сделаны как аланиновые, так и реципрокные мутанты. По остальным остаткам каталитической триады были сделаны аланиновые мутанты.

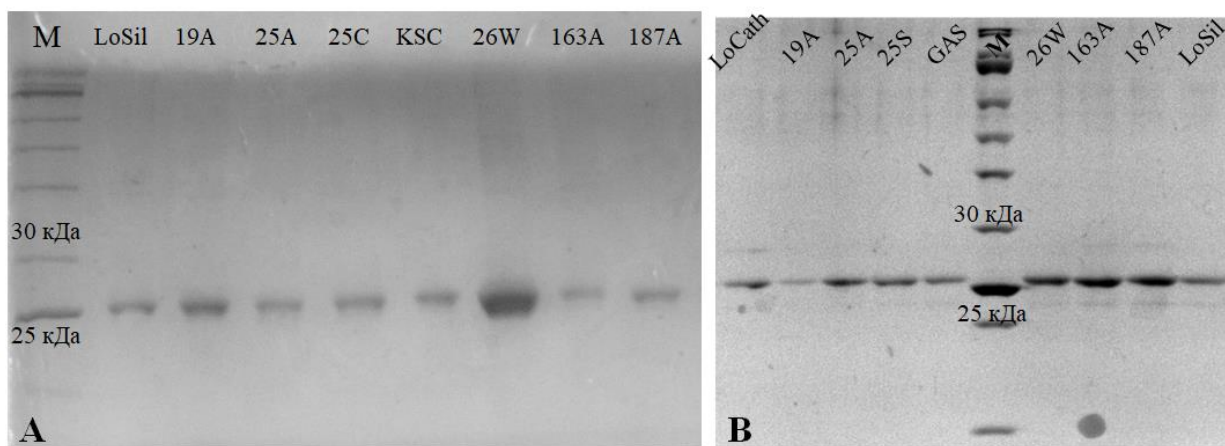
В работе, посвященной созданию химерного силикатеина из катепсина человека, мутагенезу также подвергали остатки, фланкирующие каталитический Ser25 [43]. Мы тоже обратили внимание на эти остатки и сделали для них реципрокные замены. Согласно кристаллической структуре химерного силикатеина, в связывании субстрата участвует также остаток Glu19. Мы сделали аланиновых мутантов по этому положению. Кроме того, у LoSil и LoCath сильно различаются остатки,



предшествующие каталитическому серину/цистеину, - GAS у силикатеина и KSC у катепсина. Мы сделали реципрокные замены этих участков (рис. 44).

### 5.3.2 Анализ мутантов силикатеина A1 и катепсина L *L. oparinae*

Зрелый LoCath состоит из 218 аминокислотных остатков и имеет массу 23,6 кДа. Анализ активности проводили в условиях, определенных как оптимальные для силикатеина A1, поскольку последовательность LoCath на 57% идентична силикатеину, и у них близкое значение pI (8,4 для LoSil и 8,7 для LoCath). Все мутантные варианты одного белка выделяли параллельно и анализировали одновременно. Чистоту белковых препаратов определяли по электрофорезу. (рис. 45).



**Рисунок 45.** (А) Электрофорез LoSil и его мутантов. (В) Электрофорез LoCath и его мутантов.

Результаты анализа активности мутантов представлены на рисунке 46. Активность белков нормирована на силикатеин A1 дикого типа LoSil.

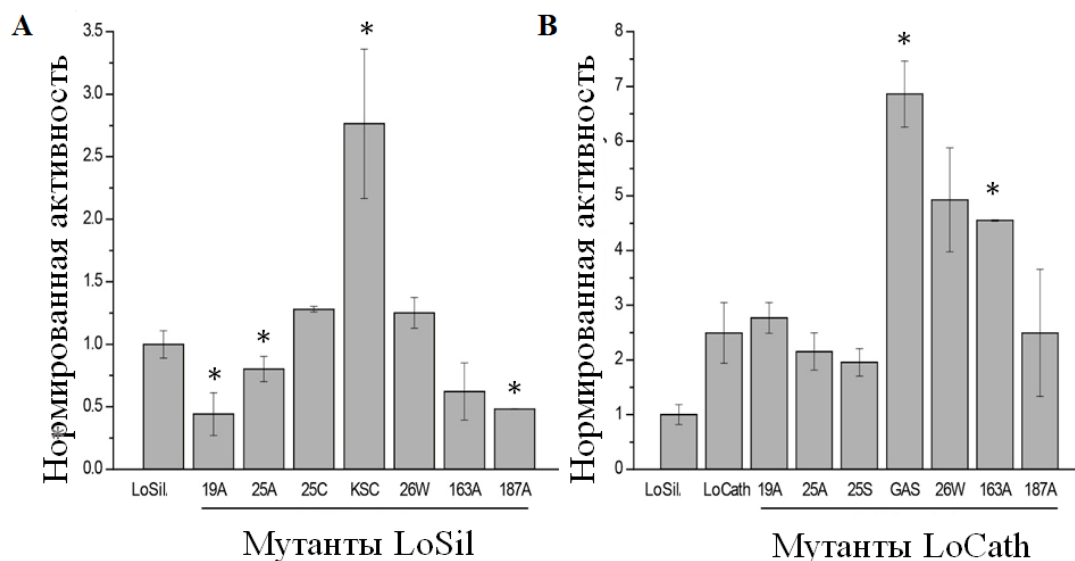


Рисунок 46. Силикатеиновая активность белков *L. oparinae* и их мутантов, нормализованная на LoSil дикого типа. (А) Мутанты LoSil (абсолютное количество кремнезема, полимеризованного LoSil, составило 0.03 mM). (В) Мутанты LoCath (абсолютное количество кремнезема, полимеризованного LoSil составило 0.06 mM). \* $p < 0,05$ , мутантные формы белков сравнивали с соответствующим белком дикого типа. Условия: PBS pH 5.3, концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 0°C

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

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

### 5.3.3 Анализ силикатеиновой активности катепсина L человека

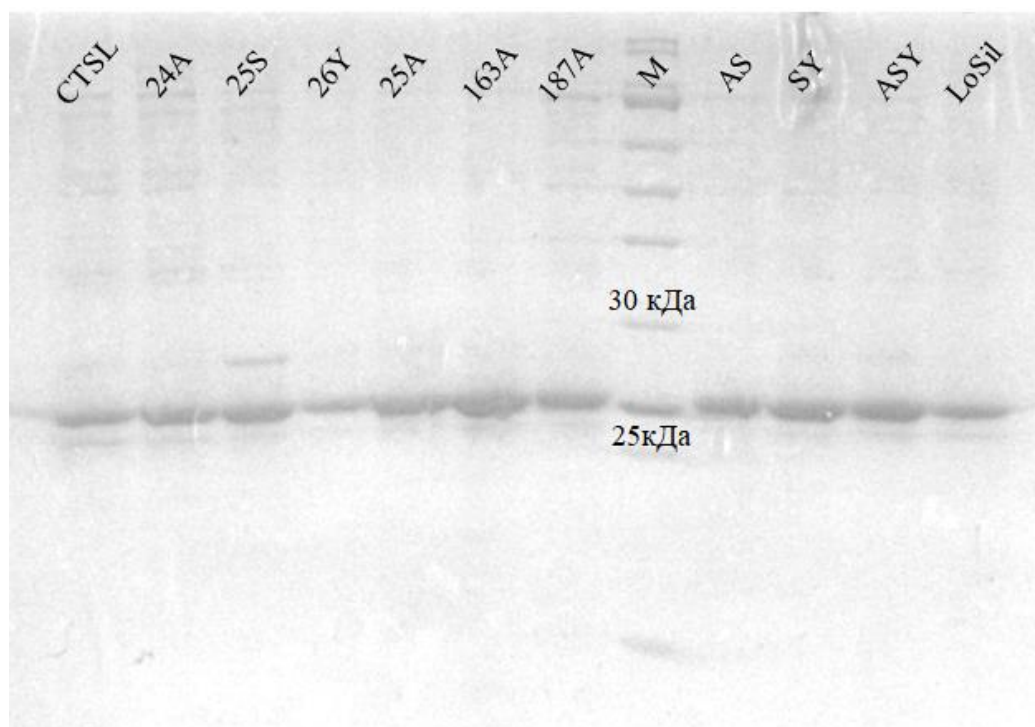
Зрелый CTSL состоит из 219 аминокислотных остатков и имеет массу 24 кДа. Сначала мы исследовали смесь CTSL и ТГС с помощью сканирующей электронной микроскопии. Образец готовили в тех же условиях, что и частицы, образованные силикатеином, за исключением буферного раствора. Так как изоэлектрическая точка

CTSL составляет 4,84, реакцию проводили в Tris-HCl pH 6,8. В результате были обнаружены частицы аморфного кремнезема. Состав частиц подтвердили с помощью элементного анализа (рис. 48А).

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

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

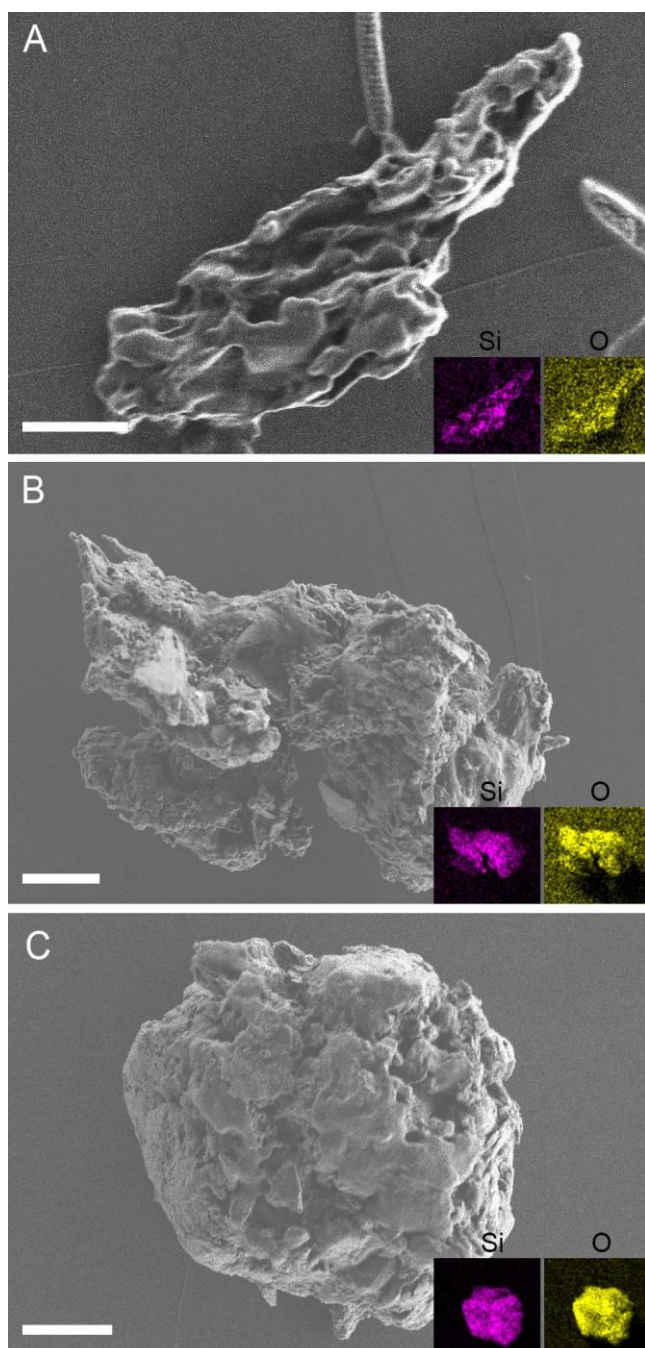
Белки выделяли одновременно с контрольным LoSil и анализировали параллельно (рис. 47). Белки анализировали и в PBS pH 5.3, и в Tris-HCl pH 6.8 (рис. 49).



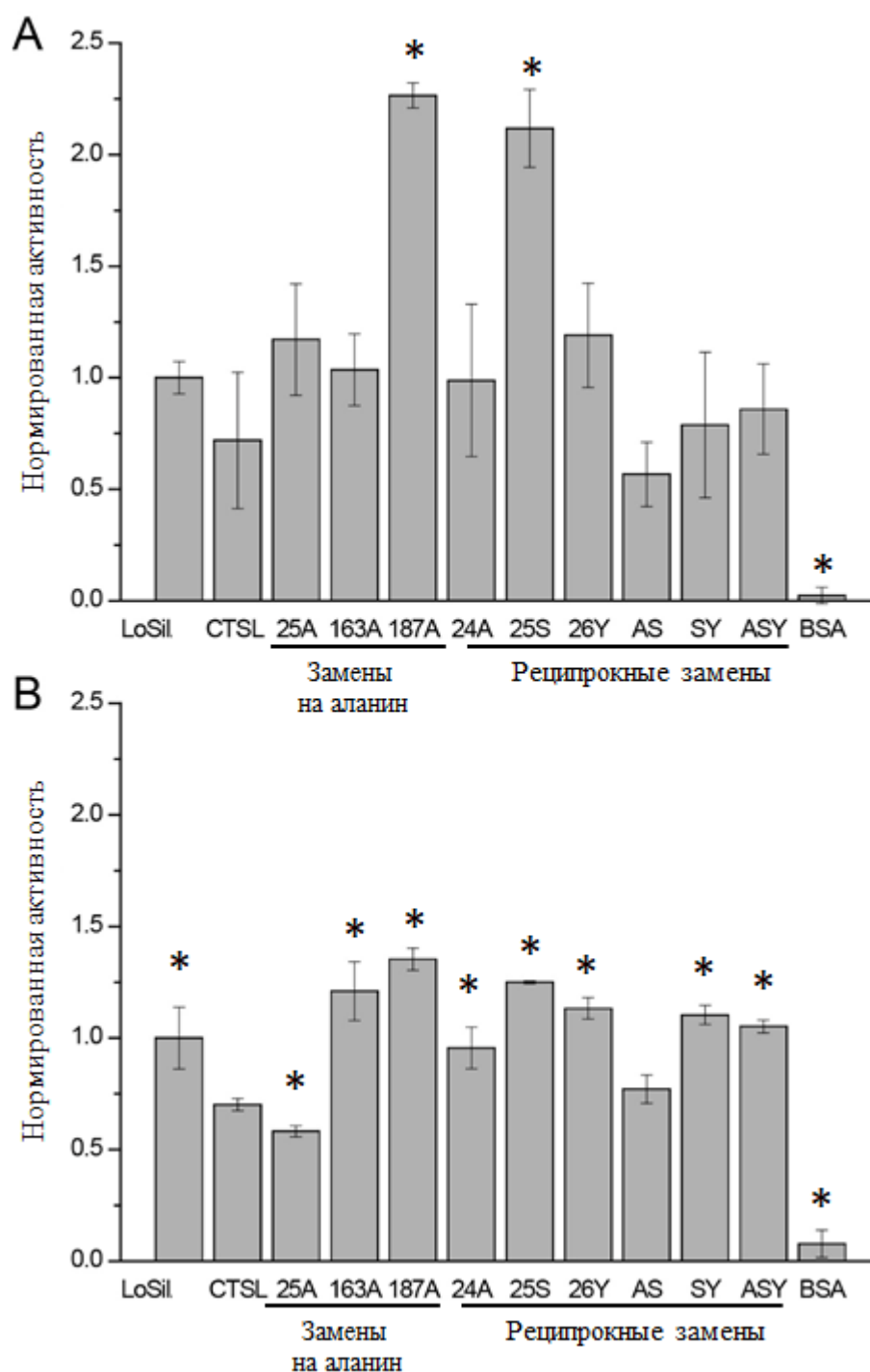
**Рисунок 47.** Электрофорез CTSL и его мутантов.

Все проанализированные белки продемонстрировали силикатеиновую активность, включая аланиновых мутантов по остаткам активного центра. Частицы, образованные мутантами 25А и 163А, изучили также с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 48В,С). Морфология частиц не отличалась от частиц, образованных CTSL дикого типа или силикатеином.

В качестве дополнительного контроля в количественном анализе активности мутантов выбрали бычий сывороточный альбумин (BSA) и mKate-His-tag (флуоресцентный белок mKate с 6 остатками гистидина на N-конце). BSA продемонстрировал незначительную активность, которую считают фоновой для любых богатых лизином белков [47]. Количество полимеризованного кремнезема в присутствии mKate-His-tag было ниже предела чувствительности метода.



**Рисунок 48.** Сканирующая электронная микроскопия частиц кремнезема. Показаны репрезентативные частицы, образованные CTSL(A), CTSL-25A(B) и CTSL-163A(C) в присутствии ТГС. Во вставках показаны карты рентгено-флуоресцентного анализа. Кремний - пурпурный, кислород - желтый. Масштабная линейка 2 мкм.



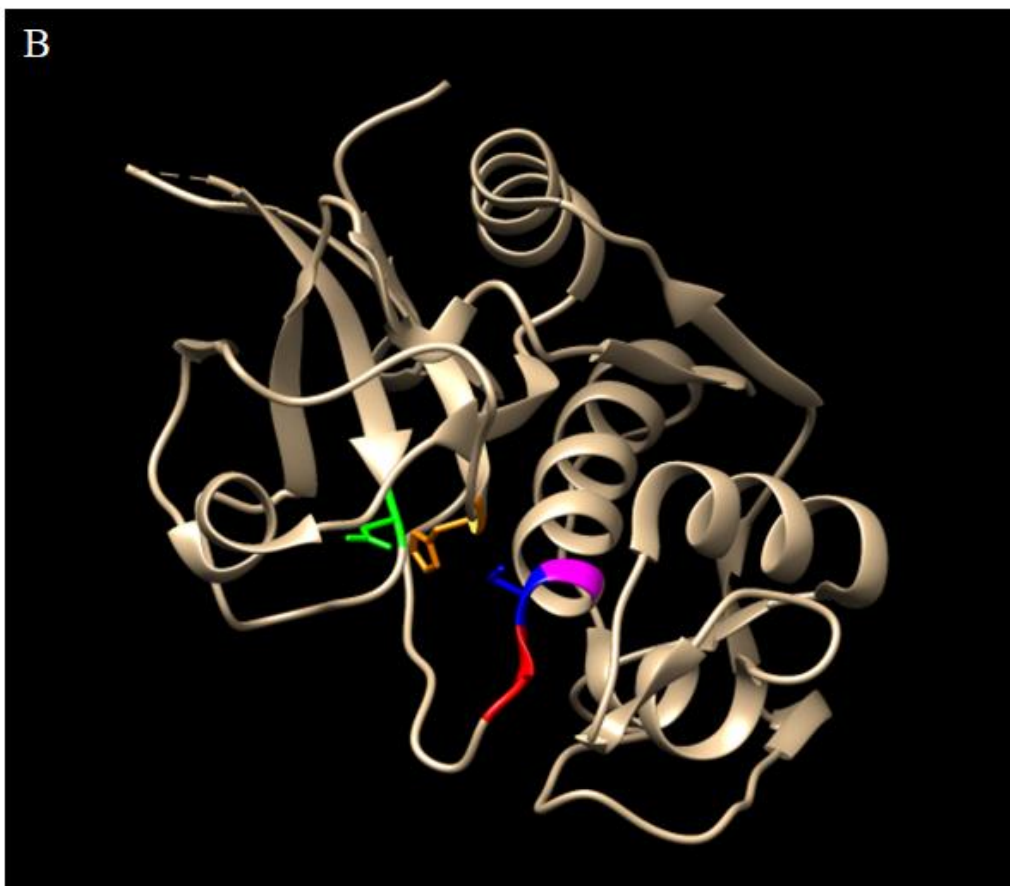
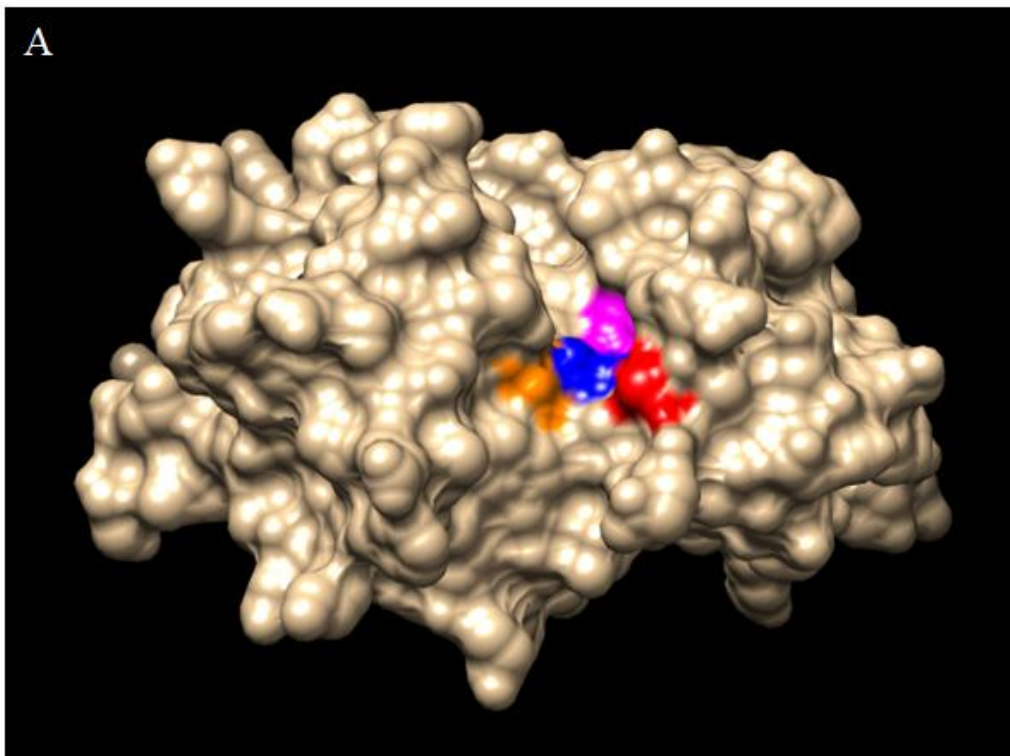
**Рисунок 49.** Силикатеиновая активность катепсина L человека и его мутантов, нормализованная на активность LoSil дикого типа в PBS pH 5.3 при 0°C (A) и Tris-HCl pH 6.8 при комнатной температуре (B). Абсолютное количество кремнезема, полимеризованного LoSil, составило 0.2 мМ и 0.1 мМ в PBS и Tris-HCl, соответственно. \* $p < 0,05$ , мутантные формы белков сравнивали с соответствующим белком дикого типа. Условия: концентрация белка 0,06 мг/мл, концентрация ТГС 0,1%, 1ч, 0°C

Активность CTSL и его мутантов в PBS pH 5.3 (рис. 49A) была сопоставима с активностью LoSil, а мутанты CTSL-187A и CTSL-25S продемонстрировали даже более высокую активность. При анализе в Tris-HCl pH 6.8 CTSL был менее активен, чем LoSil, но все мутанты, кроме CTSL-25A и CTSL-AS, были активнее, чем CTSL дикого типа. Активность BSA относительно LoSil при нейтральном pH была выше, вероятно, это связано с более выраженным зарядом молекул BSA в данных условиях.

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

Ранее в аналогичных исследованиях использовали ТЭОС, очень слабо гидролизуемый субстрат [40,80]. Поэтому при отсутствии гидролитической активности (при замене каталитического серина на аланин) для полимеризации заметного количества кремнезема продуктов самопроизвольного гидролиза могло не хватить. Следует отметить, что авторы наблюдали остаточную активность таких мутантов (10% от активности белка дикого типа), но связывали ее с неспецифическим катализом [40,80].

Наблюдаемая нами нечувствительность силикатеинов и катепсинов к мутациям может объясняться тем, что катализ полимеризации кремнезема осуществляется не с помощью аминокислотных остатков активного центра. Например, катализ может осуществляться поверхностью белка, за счет взаимодействия полярных и заряженных остатков с молекулами ортосиликата (рис. 50A).



**Рисунок 50.** Структура химерного силикатеина PDB\_ID 2VHS. А. Поверхность белка. В. Третичная структура белка. Остатки, подвергнутые мутагенезу, отмечены цветами: Gly23 и Ala24 - красный, Ser25 - синий, Tyr26 - пурпурный, His163 - оранжевый, Asn187 - зеленый.

Однако сделанные мутации совсем не всегда изменяли заряд белка, и не все мутированные остатки находятся на поверхности. Кроме того, если бы катализ действительно зависел только от заряда поверхности, можно было бы ожидать более однозначных эффектов от замены заряженных остатков. В нашей же системе и добавление остатка лизина LoSil, и удаление лизина из LoCath привело к увеличению активности (рис. 50A).

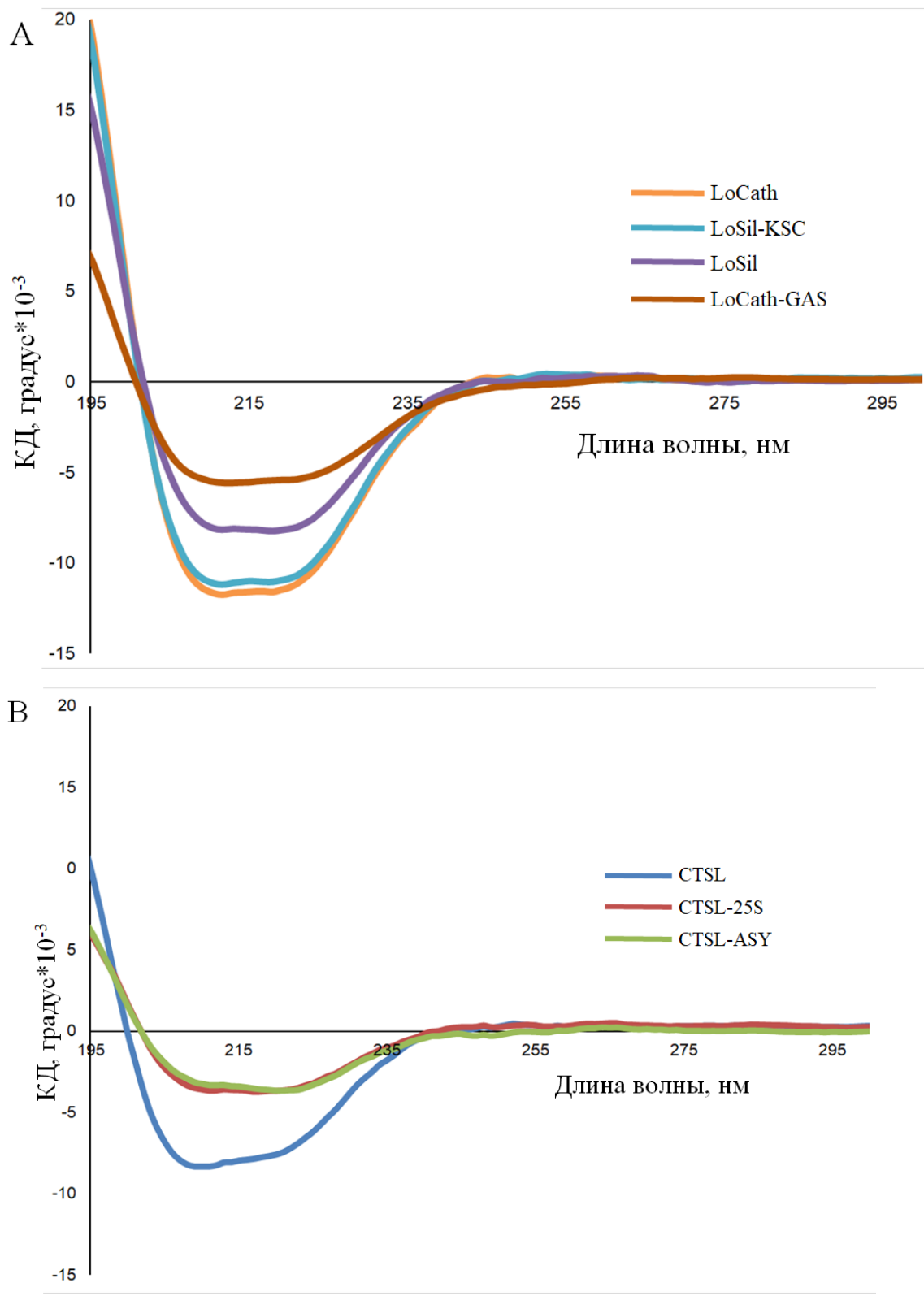
Мутации также могут влиять на олигомеризацию силикатеина. Однако олигомеризация, предположительно, осуществляется за счет взаимодействия гидрофобных остатков на поверхности белка [9], проанализированные же мутации затрагивают область активного центра (рис. 50A). А для CTSL олигомеризация вообще не показана.

Мы считаем, что незначительный эффект от точечных мутаций и заметный эффект тройной замены связан со структурными переходами в белке. В работе Patwardhan et al. было показано, что химерный силикатеин при взаимодействии со слоем кремнезема теряет  $\alpha$ -спиральные участки, переходя в структурный интермедиат, образованный только  $\beta$ -слоями [44]. И в работе на химерном силикатеине, и в нашей работе наибольшие изменения в активности белка связаны с остатками 23-25, которые находятся в начале  $\alpha$ -спирали (рис. 50B), то есть в участке, который претерпевает значительные изменения при взаимодействии с кремнеземом. Введенные замены могут дестабилизировать спираль, облегчая переход в структурный интермедиат, или введенные остатки могут способствовать стабилизации интермедиата.

Согласно анализу вторичной структуры с помощью сервиса GOR IV [81], мотив GAS из силикатеина губок соответствует  $\alpha$ -спирали, а KSC —  $\beta$ -слою, так что для реципроктных мутантов силикатеин-катепсин можно было ожидать значительных изменений в структуре.

Мы проверили, какой эффект введенные мутации оказывают на вторичную структуру белка. Для этого мы сняли спектры кругового дихроизма белков дикого типа, их тройных мутантов и точечного мутанта CTSL-25S (рис. 51). Эксперименты проводили совместно с лабораторией искусственного антителогенеза ФНКЦ ФХМ. В таблице 5 приведен деконволюционный анализ полученных спектров.





**Рисунок 51.** Спектры кругового дихроизма (в области ближнего УФ) белков губок (А) и катепсина L человека (В) и их мутантных вариантов. Условия: концентрация белков 0,08 мг/мл, 0,1М PBS pH 5,5, 20°C.

**Таблица 5.** Содержание элементов вторичной структуры в белках LoSil, LoSil-KSC, LoCath, LoCath-GAS, CTSL, CTSL-ASY, CTSL-25S. Данные получены в результате CDNN деконволюционного анализа, указаны стандартные отклонения.

Элемент вторичной структуры	Белок						
	LoSil	LoSil-KSC	LoCath	LoCath-GAS	CTSL	CTSL-ASY	CTSL-25S
$\alpha$ -спираль (%)	77 $\pm$ 4	86 $\pm$ 2	87 $\pm$ 2	52 $\pm$ 3	63 $\pm$ 6	31 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1
Всего $\beta$ -слоев (%)	3 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	10 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1
$\beta$ -повороты (%)	11 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	14 $\pm$ 1	17 $\pm$ 1	17 $\pm$ 1
Петли (%)	9 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	23 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1	33 $\pm$ 1	32 $\pm$ 1

На рисунке видно, что мутации значительно изменили вторичную структуру белков. Реципрокные мутации между силикатеином и катепсином *L.oparinae* оказали реципрокный эффект на вторичную структуру. LoCath имеет одинаковое содержание  $\alpha$ -спиралей с LoSil-KSC, а вторичная структура LoSil больше схожа с LoCath-GAS. Оба исследованных мутанта CTSL значительно отличаются по вторичной структуре от CTSL дикого типа. Анализ вторичной структуры CTSL дикого типа согласуется с данными литературы [82].

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

Полимеризация кремнезема осуществляется не только обыкновенными губками, но и другими организмами - диатомовыми водорослями, стеклянными губками, высшими растениями. В различных исследованиях показана матричная роль биополимеров в этом процессе [83]. Вероятно, силикатеин выполняет аналогичную роль, ориентируя молекулы ортокремниевой кислоты, что облегчает их дальнейшую

полимеризацию. В работе Smith et al [84] авторы наблюдали конденсацию кремнезема в присутствии папаина. Конденсация происходила значительно менее активно, чем в присутствии силикатеина, однако она не блокировалась ингибиторами протеиназ, что говорит о независимости реакции от остатков активного центра.

Мы считаем, что ранее полученные данные о необходимости остатка серина для конденсации кремнезема основаны на использовании ТЭОС в качестве субстрата. Каталитический серин действительно является необходимым для гидролиза ТЭОС, поэтому замена S25A приводила к снижению эффективности образования частиц кремнезема. Но в присутствии водорастворимого субстрата, способного к самопроизвольному гидролизу, участие белка в гидролизе уже не требуется, и конденсация происходит также эффективно. Присутствие силикатеина в аксиальном филаменте спикул может объясняться его способностью к олигомеризации. Можно предположить, что специфической особенностью силикатеина является способность образовывать пространственные структуры, которые при взаимодействии с другими белками аксиального филамента, обеспечивают формирование спикул необходимого размера и формы.

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

## 6 ВЫВОДЫ

1. Предложены два новых водорастворимых субстрата для силикатеинов - тетраакис(гидроксиэтил) ортосиликат и тетраглицерол ортосиликат; показано, что силикатеин А1 полимеризует кремнезем значительно более активно при взаимодействии с предложенными субстратами, по сравнению с классическим субстратом - тетраэтил ортосиликатом.
2. В модели культур клеток млекопитающих тетраглицерол ортосиликат проявляет приблизительно в десять раз меньшую токсичность, чем другие субстраты силикатеинов.
3. Получены точечные мутантные варианты силикатеина А1 и катепсина губки *Latrunculia oparinae*, кремнезем-полимеризующая активность которых многократно превосходит таковую силикатеина А1 дикого типа.
4. Впервые продемонстрирован катализ полимеризации кремнезема катепсином L человека.
5. Показано, что аминокислотные остатки каталитической триады катепсина и соответствующих остатков силикатеина не являются необходимыми для полимеризации кремнезема.

## 7 Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи

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

### Тезисы

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

## 8 Список сокращений

### 8.1 Реактивы

TEMED - тетраметилэтилендиамин

PSA - персульфат аммония

PMSF - фенилметан сульфонил фторид

IPTG - изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид

DTT - дитиотреитол

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium - среда Игла, модифицированная

Дульбекко

HEPES - 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

ТЭОС - тетраэтил ортосиликат

ТГЭОС - тетракис(2-гидроксиэтил) ортосиликат

ТГС - тетраглицерол ортосиликат

### 8.2 Белки

CTSL - катепсин L человека

LoCath- катепсин L *L. oparinae*

LoSil - силикатеин A1 *L. oparinae*

## 9 Список литературы

1. Shimizu K, Cha J, Stucky GD, Morse DE. Silicatein  $\alpha$ : Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc Natl Acad Sci U S A. National Academy of Sciences*; 1998;95: 6234–6238.
2. Cha JN, Shimizu K, Zhou Y, Christiansen SC, Chmelka BF, Stucky GD, et al. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96: 361–365.
3. Puzer L, Cotrin SS, Alves MFM, Egborge T, Araújo MS, Juliano MA, et al. Comparative substrate specificity analysis of recombinant human cathepsin V and cathepsin L. *Arch Biochem Biophys.* 2004;430: 274–283.
4. Müller WEG, Boreiko A, Schloßmacher U, Wang X, Tahir MN, Tremel W, et al. Fractal-related assembly of the axial filament in the demosponge *Suberites domuncula*: Relevance to biomineralization and the formation of biogenic silica. *Biomaterials.* 2007;28: 4501–4511.
5. Müller WEG, Boreiko A, Schlossmacher U, Wang X, Eckert C, Kropf K, et al. Identification of a silicatein(-related) protease in the giant spicules of the deep-sea hexactinellid *Monorhaphis chuni*. *J Exp Biol.* 2008;211: 300–309.
6. Krasko A, Lorenz B, Batel R, Schröder HC, Müller IM, Müller WEG. Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. *Eur J Biochem. Blackwell Science Ltd*; 2000;267: 4878–4887.
7. Müller WEG, Wang X, Burghard Z, Bill J, Krasko A, Boreiko A, et al. Bio-sintering processes in hexactinellid sponges: Fusion of bio-silica in giant basal spicules from *Monorhaphis chuni*. *J Struct Biol. Elsevier Inc.*; 2009;168: 548–561.
8. Veremeichik GN, Shkryl YN, Bulgakov VP, Shedko SV, Kozhemyako VB, Kovalchuk SN, et al. Occurrence of a silicatein gene in glass sponges (Hexactinellida: Porifera). *Mar Biotechnol.* 2011;13: 810–819.
9. Murr MM, Morse DE. Fractal intermediates in the self-assembly of silicatein filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102: 11657–11662.
10. Wiens M, Bausen M, Natalio F, Link T, Schlossmacher U, Müller WEG. The role of the silicatein- $\alpha$  interactor silintaphin-1 in biomimetic biomineralization. *Biomaterials.* 2009;30: 1648–1656.
11. Schröder HC, Boreiko A, Korzhev M, Tahir MN, Tremel W, Eckert C, et al. Co-expression and functional interaction of silicatein with galectin: matrix-guided formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. *J Biol Chem.* 2006;281: 12001–12009.
12. Müller WEG, Eckert C, Kropf K, Wang X, Schloßmacher U, Seckert C, et al. Formation of giant spicules in the deep-sea hexactinellid *Monorhaphis chuni* (Schulze 1904): Electron-microscopic and biochemical studies. *Cell Tissue Res.* 2007;329: 363–378.
13. Müller WEG, Rothenberger M, Boreiko A, Tremel W, Reiber A, Schröder HC. Formation of siliceous spicules in the marine demosponge *Suberites domuncula*. *Cell Tissue Res.* 2005;321: 285–297.
14. Henderson J a., Lucas JSS. Mechanism of internal stratification of siliceous sponge spicules. *Nature.* 1971;232: 655–657.
15. Uriz MJ, Turon X, Becerro MA. Silica deposition in Demosponges: spiculogenesis in *Crambe*

- crambe. *Cell Tissue Res.* 2000;301: 299–309.
16. Müller WEG. The stem cell concept in sponges (Porifera): Metazoan traits. *Semin Cell Dev Biol.* 2006;17: 481–491.
  17. Müller WEG, Wiens M, Müller IM, Schröder HC. The chemokine networks in sponges: potential roles in morphogenesis, immunity and stem cell formation. *Prog Mol Subcell Biol.* 2004;34: 103–143.
  18. Wang X, Müller WEG. Complex structures - smart solutions: Formation of siliceous spicules. *Commun Integr Biol.* 2011;4: 684–688.
  19. Imsiecke G, Steffen R, Custodio M, Borojevic R, Müller WE. Formation of spicules by sclerocytes from the freshwater sponge *Ephydatia muelleri* in short-term cultures in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1995;31: 528–535.
  20. Schröder HC, Natalio F, Shukoor I, Tremel W, Schloßmacher U, Wang X, et al. Apposition of silica lamellae during growth of spicules in the demosponge *Suberites domuncula*: Biological/biochemical studies and chemical/biomimetical confirmation. *J Struct Biol.* 2007;159: 325–334.
  21. Schröder HC, Wang X, Manfrin A, Yu S-H, Grebenjuk VA, Korzhev M, et al. Acquisition of structure-guiding and structure-forming properties during maturation from the pro-silicatein to the silicatein form. *J Biol Chem.* 2012;287: 22196–22205.
  22. Wang X, Wiens M, Schröder HC, Schloßmacher U, Pisignano D, Jochum KP, et al. Evagination of cells controls bio-silica formation and maturation during spicule formation in sponges. *PLoS One.* 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0020523
  23. Wiens M, Schröder H-C, Wang X, Link T, Steindorf D, Müller WEG. Isolation of the silicatein- $\alpha$  interactor silintaphin-2 by a novel solid-phase pull-down assay. *Biochemistry.* 2011;50: 1981–1990.
  24. Wang X, Wiens M, Schröder HC, Hu S, Mugnaioli E, Kolb U, et al. Morphology of Sponge Spicules: Silicatein a Structural Protein for Bio-Silica Formation. *Adv Eng Mater.* WILEY-VCH Verlag; 2010;12: B422–B437.
  25. Schlossmacher U, Wiens M, Schröder HC, Wang X, Jochum KP, Müller WEG. Silintaphin-1--interaction with silicatein during structure-guiding bio-silica formation. *FEBS J.* 2011;278: 1145–1155.
  26. Wang X, Schloßmacher U, Wiens M, Batel R, Schröder HC, Müller WEG. Silicateins, silicatein interactors and cellular interplay in sponge skeletogenesis: Formation of glass fiber-like spicules. *FEBS J.* 2012;279: 1721–1736.
  27. Müller WEG, Wang X, Wiens M, Schlossmacher U, Jochum KP, Schröder HC. Hardening of bio-silica in sponge spicules involves an aging process after its enzymatic polycondensation: evidence for an aquaporin-mediated water absorption. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1810: 713–726.
  28. Fratzl P. *Collagen: Structure and Mechanics, an Introduction.* Collagen. Springer, Boston, MA; 2008. pp. 1–13.
  29. Gurel PS, Alushin GA. Structure of bare actin filament [Internet]. 2018. doi:10.2210/pdb6bno/pdb
  30. Li H, DeRosier DJ, Nicholson WV, Nogales E, Downing KH. Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure.* 2002;10: 1317–1328.



31. Hentschel HGE, Deutch JM, Meakin P. Dynamical scaling and the growth of diffusion-limited aggregates. *J Chem Phys. American Institute of Physics*; 1984;81: 2496–2502.
32. Armirotti A, Damonte G, Pozzolini M, Mussino F, Cerrano C, Salis A, et al. Primary structure and post-translational modifications of silicatein beta from the marine sponge *Petrosia ficiformis* (Poiret, 1789). *J Proteome Res.* 2009;8: 3995–4004.
33. Croce G, Viterbo D, Milanese M, Amenitsch H. A mesoporous pattern created by nature in spicules from *Thetya aurantium* sponge. *Biophys J.* 2007;92: 288–292.
34. Schröder HC, Wang X, Tremel W, Ushijima H, Müller WEG. Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. *Nat Prod Rep.* 2008;25: 455.
35. Ingley E, Hemmings BA. Pleckstrin homology (PH) domains in signal transduction. *J Cell Biochem. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company*; 1994;56: 436–443.
36. Krasko A, Schröder HC, Batel R, Grebenjuk VA, Steffen R, Müller IM, et al. Iron Induces Proliferation and Morphogenesis in Primmorphs from the Marine Sponge *Suberites domuncula*. *DNA Cell Biol.* 2002;21: 67–80.
37. Wolf SE, Schlossmacher U, Pietuch A, Mathiasch B, Schröder H-C, Müller WEG, et al. Formation of silicones mediated by the sponge enzyme silicatein- $\alpha$ . *Dalton Trans.* 2010;39: 9245–9249.
38. Müller WEG, Schloßmacher U, Wang X, Boreiko A, Brandt D, Wolf SE, et al. Poly(silicate)-metabolizing silicatein in siliceous spicules and silicasomes of demosponges comprises dual enzymatic activities (silica polymerase and silica esterase). *FEBS J.* 2008;275: 362–370.
39. Brutchey RL, Morse DE. Silicatein and the Translation of its Molecular Mechanism of Biosilicification into Low Temperature Nanomaterial Synthesis. *Chem Rev.* 2008;108: 4915–4934.
40. Dakhili SYT, Caslin SA, Faponle AS, Quayle P, de Visser SP, Wong LS. Recombinant silicateins as model biocatalysts in organosiloxane chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences. National Acad Sciences*; 2017;114: E5285–E5291.
41. Zhou Y, Zhou Y, Shimizu K, Shimizu K, Cha JN, Cha JN, et al. Efficient Catalysis of Polysiloxane Synthesis by Silicatein alpha Requires Specific Hydroxy and Imidazole Functionalities. *Angew Chem Int Ed.* 1999;38: 779–782.
42. Schröder HC, Wiens M, Schloßmacher U, Brandt D, Müller WEG. Silicatein-Mediated Polycondensation of Orthosilicic Acid: Modeling of a Catalytic Mechanism Involving Ring Formation. *Silicon Chem. Springer Netherlands*; 2012;4: 33–38.
43. Fairhead M, Johnson KA, Kowatz T, McMahon SA, Carter LG, Oke M, et al. Crystal structure and silica condensing activities of silicatein alpha-cathepsin L chimeras. *Chem Commun.* 2008; 1765–1767.
44. Patwardhan SV, Holt S a., Kelly SM, Kreiner M, Perry CC, van der Walle CF. Silica Condensation by a Silicatein  $\alpha$  Homologue Involves Surface-Induced Transition to a Stable Structural Intermediate Forming a Saturated Monolayer. *Biomacromolecules.* 2010;11: 3126–3135.
45. Otzen D. The role of proteins in biosilicification. *Scientifica.* 2012;2012: 867562.
46. Shkryl YN, Bulgakov VP, Veremeichik GN, Kovalchuk SN, Kozhemyako VB, Kamenev DG, et al. Bioinspired enzymatic synthesis of silica nanocrystals provided by recombinant silicatein from the marine sponge *Latrunculia oparinae*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2016;39: 53–58.

47. Kamenev DG, Shkryl YN, Veremeichik GN, Golotin VA, Naryshkina NN, Timofeeva YO, et al. Silicon Crystals Formation Using Silicatein-Like Cathepsin of Marine Sponge *Latrunculia oparinae*. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015;15: 10046–10049.
48. Ki M-R, Jang E-K, Pack SP. Hypothetical cathepsin-like protein from *Nematostella vectensis* and its silicatein-like cathepsin mutant for biosilica production. *Process Biochem*. 2014;49: 95–101.
49. Sumerel JL, Yang W, Kisailus D, Weaver JC, Choi JH, Morse DE. Biocatalytically Templated Synthesis of Titanium Dioxide. *Chem Mater*. 2003;15: 4804–4809.
50. Curnow P, Bessette PH, Kisailus D, Murr MM, Daugherty PS, Morse DE. Enzymatic synthesis of layered titanium phosphates at low temperature and neutral pH by cell-surface display of silicatein-alpha. *J Am Chem Soc*. 2005;127: 15749–15755.
51. Tahir MN, Théato P, Müller WEG, Schröder HC, Borejko A, Faiss S, et al. Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein. *Chem Commun*. 2005; 5533–5535.
52. Curnow P, Kisailus D, Morse DE. Biocatalytic synthesis of poly(L-lactide) by native and recombinant forms of the silicatein enzymes. *Angewandte Chemie - International Edition*. 2006;45: 613–616.
53. Brutchey RL, Yoo ES, Morse DE. Biocatalytic synthesis of a nanostructured and crystalline bimetallic perovskite-like barium oxofluorotitanate at low temperature. *J Am Chem Soc*. 2006;128: 10288–10294.
54. Natalio F, Corrales TP, Panthöfer M, Schollmeyer D, Lieberwirth I, Müller WEG, et al. Flexible minerals: self-assembled calcite spicules with extreme bending strength. *Science*. 2013;339: 1298–1302.
55. Shkryl YN, Veremeichik GN, Kamenev DG, Gorpenchenko TY, Yugay YA, Mashtalyar DV, et al. Green synthesis of silver nanoparticles using transgenic *Nicotiana tabacum* callus culture expressing silicatein gene from marine sponge *Latrunculia oparinae*. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group; 2017;0: 1–13.
56. Curran CD, Lu L, Jia Y, Kiely CJ, Berger BW, McIntosh S. Direct Single-Enzyme Biomineralization of Catalytically Active Ceria and Ceria–Zirconia Nanocrystals. *ACS Nano*. 2017;11: 3337–3346.
57. Cha JN, Stucky GD, Morse DE, Deming TJ. Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolypeptides. *Nature*. 2000;403: 289–292.
58. Belton D, Paine G, Patwardhan SV, Perry CC. Towards an understanding of (bio)silicification: the role of amino acids and lysine oligomers in silicification. *J Mater Chem*. 2004;14: 2231.
59. Roth KM, Zhou Y, Yang W, Morse DE. Bifunctional small molecules are biomimetic catalysts for silica synthesis at neutral pH. *J Am Chem Soc*. 2005;127: 325–330.
60. Patwardhan SV, Clarkson SJ. Silicification and Biosilicification. Part 6. Poly-L-Histidine Mediated Synthesis of Silica at Neutral pH. *J Inorg Organomet Polym*. Kluwer Academic Publishers-Plenum Publishers; 2003;13: 49–53.
61. Kuno T, Nonoyama T, Hirao K, Kato K. Influence of the charge relay effect on the silanol condensation reaction as a model for silica biomineralization. *Langmuir*. 2011;27: 13154–13158.
62. Hooper JNA, Van Soest RWM. *Systema Porifera. A Guide to the Classification of Sponges*. Systema Porifera. Springer, Boston, MA; 2002. pp. 1–7.

63. Müller WEG, Wang X, Kropf K, Boreiko A, Schloßmacher U, Brandt D, et al. Silicatein expression in the hexactinellid *Crateromorpha meyeri*: The lead marker gene restricted to siliceous sponges. *Cell Tissue Res.* 2008;333: 339–351.
64. Ehrlich H, Deutzmann R, Brunner E, Cappellini E, Koon H, Solazzo C, et al. Mineralization of the metre-long biosilica structures of glass sponges is templated on hydroxylated collagen. *Nat Chem.* 2010;2: 1084–1088.
65. Hecky RE, Mopper K, Kilham P, Degens ET. The amino acid and sugar composition of diatom cell-walls. *Mar Biol. Springer-Verlag;* 1973;19: 323–331.
66. Shimizu K, Amano T, Bari MR, Weaver JC, Arima J, Mori N. Glassin, a histidine-rich protein from the siliceous skeletal system of the marine sponge *Euplectella*, directs silica polycondensation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112: 11449–11454.
67. Travis DF, François CJ, Bonar LC, Glimcher MJ. Comparative studies of the organic matrices of invertebrate mineralized tissues. *J Ultrastruct Res.* 1967;18: 519–550.
68. Ehrlich H, Worch H. Sponges as natural composites: from biomimetic potential to development of new biomaterials. *Porifera Research: Biodiversity, Innovation & Sustainability.* Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brasil; 2007; 217–223.
69. Matsunaga S, Sakai R, Jimbo M, Kamiya H. Long-Chain Polyamines (LCPAs) from marine sponge: Possible implication in spicule formation. *Chembiochem.* 2007;8: 1729–1735.
70. de Jong RN, Daniëls MA, Kaptein R, Folkers GE. Enzyme free cloning for high throughput gene cloning and expression. *J Struct Funct Genomics.* 2006;7: 109–118.
71. Beyer HM, Gonschorek P, Samodelov SL, Meier M, Weber W, Zurbriggen MD. AQUA Cloning: A Versatile and Simple Enzyme-Free Cloning Approach. *PLoS One.* 2015;10: e0137652.
72. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227: 680–685.
73. Brzezinski MA, Nelson DM. A solvent extraction method for the colorimetric determination of nanomolar concentrations of silicic acid in seawater. *Mar Chem.* 1986;19: 139–151.
74. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28: 1166–1167.
75. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25: 1605–1612.
76. Wang X, Schröder HC, Schloßmacher U, Jiang L, Korzhev M, Müller WEG. Biosilica aging: From enzyme-driven gelation via syneresis to chemical/biochemical hardening. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects.* Elsevier B.V.; 2013;1830: 3437–3446.
77. Reed MC, Lieb A, Nijhout HF. The biological significance of substrate inhibition: A mechanism with diverse functions. *Bioessays.* 2010;32: 422–429.
78. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1824: 68–88.
79. Egger CC, Anderson MW, Tiddy GJT, Casci JL. In situ NMR and XRD studies of the growth mechanism of SBA-1. *Phys Chem Chem Phys.* 2005;7: 1845–1855.

80. Zhou Y, Shimizu K, Cha JN, Stucky GD, Morse DE. Efficient Catalysis of Polysiloxane Synthesis. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1999; 779–782.
81. Deléage G. ALIGNSEC: viewing protein secondary structure predictions within large multiple sequence alignments. *Bioinformatics.* 2017;33: 3991–3992.
82. Turk B, Dolenc I, Lenarcic B, Krizaj I, Turk V, Bieth JG, et al. Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *Eur J Biochem.* 1999;259: 926–932.
83. Wysokowski M, Jesionowski T, Ehrlich H. Biosilica as a source for inspiration in biological materials science. *Am Mineral. GeoScienceWorld;* 2018;103: 665–691.
84. Smith GP, Baustian KJ, Ackerson CJ, Feldheim DL. Metal oxide formation by serine and cysteine proteases. *J Mater Chem. The Royal Society of Chemistry;* 2009;19: 8299–8306.
85. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S 'everine, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, editor. *The Proteomics Protocols Handbook.* Totowa, NJ: Humana Press; 2005. pp. 571–607.