

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

*На правах рукописи*



**ШЕЛОМОВ**  
Михаил Дмитриевич

**ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ  
ИЗ ДРОЖЖЕЙ: ПОЛУЧЕНИЕ И  
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ  
ИССЛЕДОВАНИЯ**

1.5.4 – Биохимия  
1.5.6 – Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

**Научные руководители:** профессор, доктор химических наук,

**Тишков Владимир Иванович**

кандидат химических наук,

**Атрошенко Денис Леонидович**

**Официальные оппоненты:** **Мирошников Константин Анатольевич**

член-корреспондент РАН, доктор химических наук  
главный научный сотрудник лаборатории молекулярной  
биоинженерии Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки «Институт  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН» (ИБХ РАН).

**Зверева Мария Эмильевна**

доктор химических наук

профессор кафедры химии природных соединений  
химического факультета Федерального  
государственного бюджетного образовательного  
учреждения высшего образования «Московский  
государственный университет имени  
М.В. Ломоносова».

**Демидюк Илья Валерьевич**

доктор химических наук,

профессор Российской академии наук, доцент,  
заведующий лабораторией функциональной  
энзимологии Федерального государственного  
бюджетного учреждения Национальный  
исследовательский центр «Курчатовский институт».

Защита диссертации состоится **«16» мая 2023 года в 15 часов** на заседании диссертационного совета МГУ.014.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 116, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.4/2490>

Автореферат разослан «\_\_\_» апреля 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат химических наук



И.К. Сакодынская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3.) – это фермент, специфично окисляющий D-аминокислоты в соответствующие кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония. Фермент содержит молекулу кофактора FAD в активном центре. DAAO играет важные и разнообразные роли в биохимических процессах в живых организмах и имеет широкое практическое применение.

В микроорганизмах DAAO участвует в метаболизме D-аминокислот, которые могут быть использованы в качестве источника углерода и азота. В млекопитающих роль оксидазы D-аминокислот намного более разнообразна, так как D-аминокислоты выполняют роль нейромедиаторов и регуляторов гормонов. Так, например, D-Ser и D-Ala являются коагонистами NMDA-рецепторов: пониженный уровень D-Ser коррелирует с развитием шизофрении, а повышенный уровень D-Ala коррелирует с развитием болезни Альцгеймера. Накопление D-Asp в хрящевой ткани и дентине коррелирует с возрастом. Также была установлена статистически значимая корреляция между уровнем D-Phe и развитием гестационного диабета у беременных женщин.

Оксидаза D-аминокислот находит широкое применение в различных областях биотехнологии. В первую очередь стоит отметить использование DAAO в биферментном биокаталитическом крупнотоннажном производстве 7-аминоцефалоспоровой кислоты (7-АЦК) из цефалоспориона С, которая является прекурсором для полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков различных поколений. Также стоит отметить синтез  $\alpha$ -кетокислот, получение из смеси рацематов неприродных L-аминокислот, различные области аналитической биотехнологии (определение биологически важных субстратов, микробное заражение), и медицинскую диагностику.

Однако существуют проблемы, препятствующие широкому применению оксидазы D-аминокислот на практике. Во-первых, широкая субстратная специфичность DAAO мешает определению одного субстрата в присутствии другого, что часто встречается при анализе биологических образцов. До настоящего времени было охарактеризовано малое количество оксидаз D-аминокислот. Поэтому для определения некоторых практически важных субстратов до сих пор нет подходящего фермента. Во-вторых, все известные на данный момент дрожжевые DAAO имеют разные pH-профили активности и стабильности. Это приводит к тому, что фермент является либо малостабильным в операционных условиях, либо малоактивным в условиях его максимальной стабильности. Также существует проблема невысокой температурной и химической стабильности и недостаточной активности изученных ферментов в реакции окисления цефалоспориона С – наиболее значимого промышленного процесса с использованием DAAO.

Существует несколько путей решения данных проблем: один из них — это поиск и изучение новых ферментов из различных организмов. Развитие технологий высокопродуктивного секвенирования позволило определить последовательности десятков (даже сотен) тысяч геномов самых разных микроорганизмов. Эти последовательности создали базу для поиска новых генов, кодирующих оксидазы D-аминокислот. Другой путь – это получение мутантных форм уже известных ферментов с улучшенными свойствами в требуемых условиях.

### **Степень разработанности темы исследования.**

Дрожжевые оксидазы D-аминокислот являются малоизученными ферментами, для некоторых практически важных субстратов до сих пор нет подходящего фермента. Два фермента - TvDAAO и RgDAAO, имеют многолетнюю историю изучения и практическое

применение. Проводились работы по белковой инженерии этих ферментов, в том числе и для их адаптации к биотехнологическим процессам, однако для многих случаев их свойства остаются неудовлетворительными. Поиск новых оксидаз D-аминокислот затруднен из-за низкой гомологии ферментов, исторически гены оксидаз D-аминокислот в микроорганизмах находили путем микробиологического скрининга при росте культур на D-аминокислотах.

**Цели и задачи исследования.** Целью данной работы является получение оксидаз D-аминокислот с заданными свойствами.

Задачи исследования:

1. Поиск, получение и характеристика новых оксидаз D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1.
2. Разработка метода поиска новых оксидаз D-аминокислот по геномным данным и предсказание их субстратной специфичности.
3. Получение мутантов оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* с одновременно улучшенными свойствами в реакции окисления цефалоспоринона С, повышенной температурной и химической стабильностью.

**Научная новизна.** В ходе выполнения данной работы впервые в мире были клонированы и изучены шесть генов, кодирующих оксидазы D-аминокислот, из одного организма. Изученные ферменты обладают уникальными свойствами - как субстратной специфичностью, так и рН-профилями активности и стабильности. С рядом практически значимых субстратов многие новые ферменты обладают лучшими каталитическими параметрами среди всех известных DAAO. Полученные данные являются существенным вкладом в более глубокое понимание взаимосвязи структура-функция и биологической роли оксидазы D-аминокислот в дрожжах.

Разработан биоинформационно-структурный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот. Добавление к известной методике поиска новых генов в геномах организмов по гомологии аминокислотных последовательностей стадии структурного анализа отобранных кандидатов позволяет отличить гены оксидаз D-аминокислот от генов других похожих ферментов, а также предсказать их субстратную специфичность.

Показано, что объединение аминокислотных замен с различным характером улучшающих эффектов имеет аддитивный эффект, что приводит к одновременному улучшению свойств фермента, как в случае каталитических параметров, так и температурной и химической стабильности.

#### **Практическая значимость работы.**

Изученные оксидазы D-аминокислот из дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1 обладают наилучшими каталитическими параметрами по ряду субстратов. Также некоторые из них обладают высокой температурной стабильностью, что делает их интересными для применения на практике.

Разработанный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот позволяет проводить поиск DAAO по геномным данным и предсказывать их субстратную специфичность по структурным данным, что значительно упрощает проблему получения оксидаз D-аминокислот с заданными свойствами.

Полученные биокатализаторы на основе оксидазы D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis* одновременно обладают самыми высокими каталитическими параметрами в реакции окисления цефалоспоринона С и самыми высокими стабильностями к инактивации под действием температуры и пероксида водорода, что делает эти ферменты перспективными

для использования в биокаталитическом промышленном процессе получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты.

**Методология и методы исследования.** В рамках данной работы были использованы следующие методы и подходы: биоинформатика (поиск последовательностей по базам данных, построение множественных выравниваний аминокислотных последовательностей, конструирование праймеров), структурная биология (построение модельных структур, докинг, молекулярная динамика); методы генетической инженерии (полимеразная цепная реакция, рестрикция, лигирование, выделение ДНК, получение плазмид); методы молекулярной биологии (трансформация, экспрессия рекомбинантных белков в клетках *E. coli*); хроматографические методы (ионообменная хроматография, гель фильтрация); аналитические методы (спектрофотометрия, ВЭЖХ), химическая энзимология (выделение и очистка белков, гель-электрофорез, методы ферментативной кинетики).

**Личный вклад автора.** Экспериментальные результаты, представленные в диссертации, получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах работы под руководством проф., д.х.н. Тишкова В.И. и к.х.н. Атрошенко Д.Л. Автор самостоятельно изучил современные литературные данные по теме исследования и на их основании составил обзор литературы. Соискатель самостоятельно определил цели и задачи, составил план работы, принимал активное участие в проведении исследований и анализе полученных результатов. Автором была проведена значительная работа над текстом опубликованных статей, а также представление их в редакции журналов. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

**Положения, выносимые на защиту.**

1. В геноме дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1 имеются шесть генов, кодирующих оксидазы D-аминокислот. Все OpaDAAO обладают уникальными спектрами субстратной специфичности, что обуславливается строением их активных центров.
2. Добавление стадии структурного анализа к биоинформационному поиску по гомологии позволяет однозначно идентифицировать DAAO в геномах микроорганизмов. Анализ модельных структур активных центров и их сравнение с активными центрами уже известных ферментов позволяет предсказать их субстратную специфичность.
3. Объединение мутаций TvDAAO имеет аддитивный эффект и приводит к одновременному улучшению каталитических параметров фермента в реакции с цефалоспорином C, повышению температурной и окислительной стабильности.

**Степень достоверности и апробация работы.** Достоверность данных экспериментов обеспечена использованием современных методов исследования, проведением ряда независимых экспериментов с использованием положительных и отрицательных контролей. Все эксперименты проводили на сертифицированном оборудовании в трех и более независимых повторах, для анализа данных использовали современные методы статистической обработки.

Основные результаты работы были представлены на Международных и Российских конгрессах и конференциях: 6th International Conference on Catalysis and Chemical Engineering (Дубай, ОАЭ, 2022), IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция "Химия, физика, биология: пути интеграции" (Москва, Россия, 2022), Международные научные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2022, 2021, 2019, 2017), VII Междисциплинарная конференция МОБИ-ХимФарма 2021 (Москва, Россия, 2021), IX Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука

и практика» (Крым, Россия, 2021), XX Международная конференция молодых учёных «Леса Евразии – Карельские Леса» (Петрозаводск, Россия, 2021), XXXVI Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике (Московская обл., Россия, 2019), 43rd and 42nd FEBS Congress, (Прага, Чехия, 2018, Иерусалим, Израиль, 2017), Biocatalysis-2017: Fundamentals & applications (Москва, Россия, 2017).

**Публикации.** По материалам работы опубликовано 6 статей в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами Web of Science и Scopus, 16 тезисов конференций (из них 2 публикации в журналах из списка Web of Science и Scopus).

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, и списка цитируемой литературы. Диссертационная работа изложена на 132 страницах и содержит 34 рисунка, 32 таблицы и 131 ссылку.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

### Поиск, получение и характеристика новых оксидаз D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1

#### Поиск генов потенциальных OpaDAAO

В официальной аннотации генома дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1, имеющегося в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/871575/>), указаны гены трех оксидаз D-аминокислот, из которых две были аннотированы как D-аспартат оксидазы. Нами был проведен более тщательный анализ этого генома с помощью программы BLASTp, используя в качестве шаблона последовательности уже известных оксидаз D-аминокислот. Данный анализ показал наличие шести генов потенциальных DAAO. Позже мы подтвердили каталитическую активность с D-аминокислотами у всех найденных ферментов. Такое большое количество паралогичных генов оксидаз D-аминокислот в одном организме описано впервые. Оказалось, что официальная аннотация была проведена неверно, так как гены, аннотированные, как D-аспартат оксидазы, оказались оксидазами D-аминокислот с широкой субстратной специфичностью.

**Таблица 1.**

Соответствие сокращений и кодов доступа в базах данных GenBank, NCBI и UniProt.

| Номер GenBank                 | Номер гена NCBI | UniProt номер | Название |
|-------------------------------|-----------------|---------------|----------|
| XM_014077242,<br>XP_013932717 | HPODL_02914     | W1Q8E7        | OpaDAAO1 |
| XM_014081785,<br>XP_013937260 | HPODL_02165     | W1QLN4        | OpaDAAO2 |
| XM_014079341,<br>XP_013934816 | HPODL_00899     | W1QG04        | OpaDAAO3 |
| XM_014081749,<br>XP_013937224 | HPODL_05094     | W1QJE0        | OpaDAAO4 |
| XM_014081694,<br>XP_013937169 | HPODL_02082     | W1QJ82        | OpaDAAO5 |
| XM_014076703,<br>XP_013932178 | HPODL_02400     | W1Q6P2        | OpaDASPO |

#### Получение рекомбинантных OpaDAAO

Генетические конструкции, содержащие найденные гены в плазмиде pET24a, были получены и любезно предоставлены нам Михаилом Анатольевичем Эльдаровым (Центр биоинженерии ФИЦ БИОТЕХНОЛОГИИ РАН). Клонирование проводилось по стандартной

методике с помощью полимеразной цепной реакции, все гены не содержали интронов. Изначально предоставленные генетические конструкции содержали аффинные таги His<sub>6</sub> (His-tag), однако от них было решено отказаться во избежание влияния дополнительных шести остатков гистидина на свойства изучаемых ферментов. Полученные плазмиды с генами *opadaao* без His-tag были секвенированы для подтверждения отсутствия случайных мутаций, и использованы для трансформации бактерий с последующим культивированием.

Экспрессию ферментов проводили по стандартной методике для экспрессии TvDAAO, разработанной в нашей лаборатории. Мы использовали штамм *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/rLysS, трансформированный соответствующей плазмидой с геном целевой OpaDAAO. Пять из шести ферментов были успешно экспрессированы в растворимой и активной форме с выходом 17-36 мг целевого фермента с литра среды (Таблица 2). Разница значений выходов активного фермента связана с разной активностью по субстратам. OpaDAAO5 экспрессировалась в виде телец включения. Оптимизация условий культивирования и попытки рефолдинга не привели к получению растворимой формы этого фермента. Была изучена субстратная специфичность новых DAAO и подобраны наилучшие субстраты для проведения измерений. Оказалось, что все ферменты проявляют максимальную активность с разными субстратами. OpaDAAO1 проявил максимальную активность с D-Ala, OpaDAAO2 – с D-Phe, OpaDAAO3 – с D-Met, OpaDAAO4 – с D-Pro, OpaDASPO соответственно с D-Asp. В случае с OpaDAAO5 удалось качественно определить его активность с D-Ser и D-Lys, а также в меньшей степени с другими D-аминокислотами.

**Таблица 2.**

Наилучшие субстраты для определения активности и результаты экспрессии OpaDAAO.

|                 | <b>D-АК для определения активности</b> | <b>Выход активного фермента, Ед/л среды</b> | <b>Выход активного фермента, мг/л среды</b> |
|-----------------|--|---|---|
| <b>OpaDAAO1</b> | D-Ala                                  | 7100  | 17  |
| <b>OpaDAAO2</b> | D-Phe                                  | 600   | 24  |
| <b>OpaDAAO3</b> | D-Met                                  | 6200  | 36  |
| <b>OpaDAAO4</b> | D-Pro                                  | 330   | 17  |
| <b>OpaDASPO</b> | D-Asp                                  | 2200  | 20  |

Экспрессия OpaDASPO приводила к частичному лизису клеток *E. coli* после индукции. Это может быть связано с нарушением метаболизма отрицательно заряженных D-аминокислот, входящих в состав клеточной стенки бактерий, поэтому OpaDASPO может быть протестирована в качестве антибактериального агента дрожжей.

Для каждого фермента была разработана индивидуальная стратегия очистки (Таблица 3). В большинстве случаев использовали ионообменную хроматографию в одну или две стадии. Соотношение  $A_{280}/A_{455}$ , характеризующее чистоту полученных препаратов DAAO, было в диапазоне от 7.3 до 9.1, что является стандартным для оксидаз D-аминокислот, полученных в чистом виде. Также мы изучили олигомерную форму полученных нами ферментов при концентрации 30 мкг/мл. Оказалось, что OpaDAAO1, OpaDAAO4 и OpaDASPO при данной концентрации являются мономерами, а OpaDAAO2 и OpaDAAO3 – димерами.

Таблица 3.

Некоторые свойства и результаты очистки ОpaDAAO.

|                              | ОpaDAAO1                                       | ОpaDAAO2  | ОpaDAAO3  | ОpaDAAO4  | ОpaDASPO   |
|------------------------------|--|---|---|---|--|
| Схема очистки                | Катионообменная хроматография<br>Обессоливание | Двойная анионообменная хроматография<br>Обессоливание | Двойная анионообменная хроматография<br>Обессоливание | Двойная анионообменная хроматография<br>Обессоливание | Фракционирование $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$<br>Диализ<br>Двойная анионообменная хроматография<br>Обессоливание |
| Степень очистки              | 80   | 50  | 30  | 50  | 700  |
| $A_{280}/A_{455}$            | 8,2  | 8,2   | 9,1   | 7,3   | 8,0  |
| Выход после очистки, %       | 17   | 12  | 11  | 18  | 40   |
| Теоретическая масса мономера | 37600  | 37800   | 38900   | 36000   | 38500  |
| Олигомерная форма            | Мономер  | Димер   | Димер   | Мономер   | Мономер  |

## Изучение влияния pH на активность и стабильность

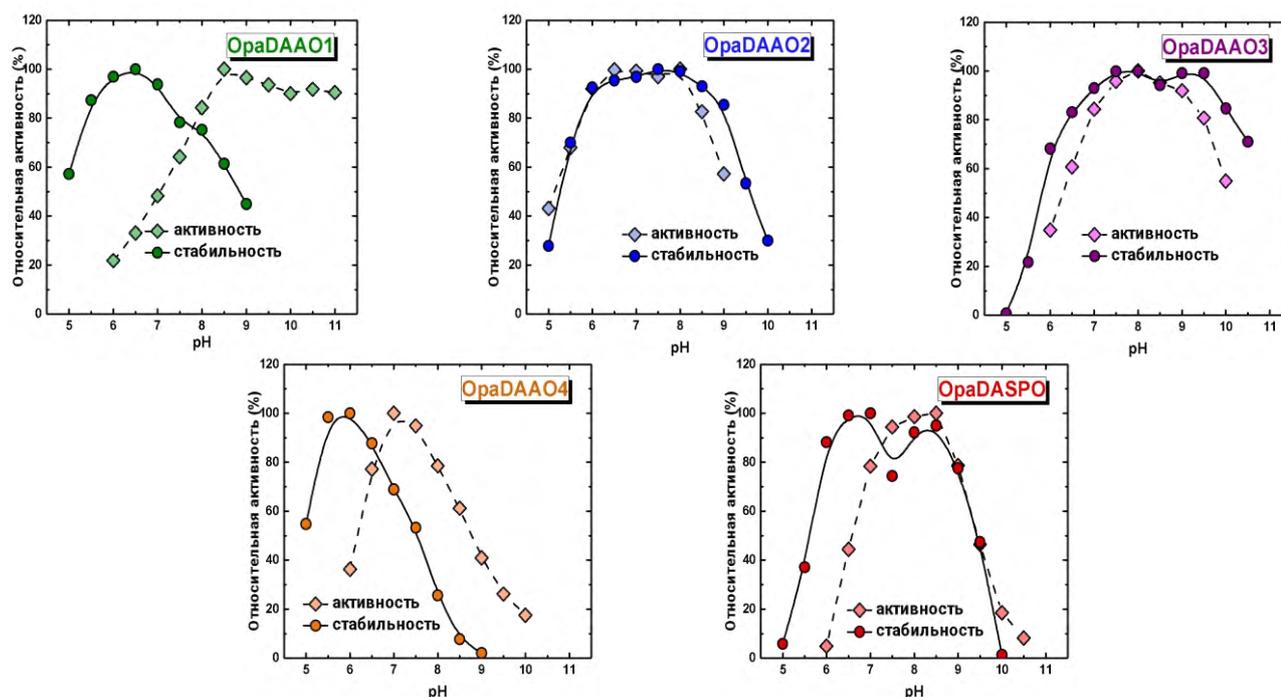


Рис. 1. Влияние pH на активность и стабильность ОpaDAAO.

Как было сказано во введении, все известные на данный момент дрожжевые оксидазы D-аминокислот обладают различающимися pH-профилями стабильности и активности, что является одной из проблем применения DAAO на практике. В случае ОpaDAAO1 мы получили именно такие зависимости, однако для остальных ферментов, в особенности ОpaDAAO2, ОpaDAAO3 и ОpaDASPO, оказалось, что pH-профили их стабильности и активности практически совпадают. В случае ОpaDAAO4 максимум стабильности оказался смещен в

более кислую область рН, данный фермент способен сохранять максимум стабильности при рН = 5,5 (Рис. 1).

Изучение влияние концентрации буферов на свойства полученных ферментов показало, что повышение концентрации буфера незначительно снижает активность и стабильность за исключением ОpaDASPO, стабильность которой заметно падает с ростом концентрации буфера (Рис. 2).

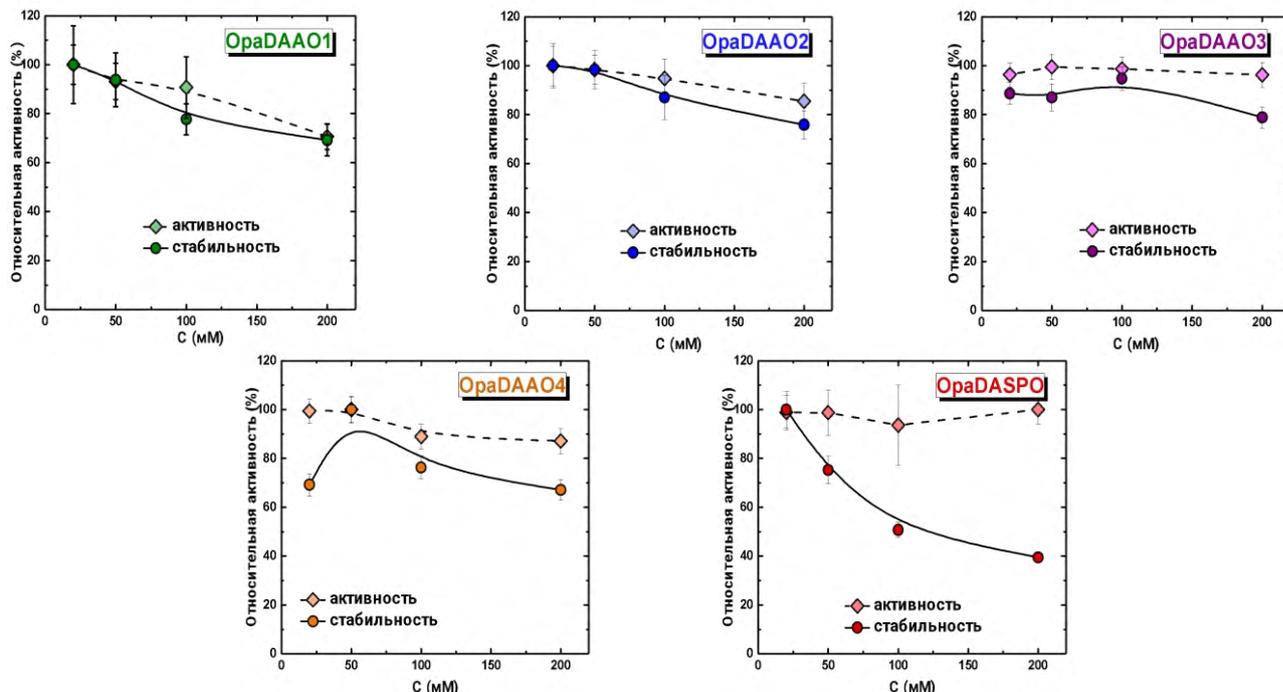


Рис. 2. Влияние концентрации буфера на активность и стабильность ОpaDAAO.

### Изучение влияния температуры на стабильность и активность ферментов

Результаты исследования влияния температуры на стабильность и активность ферментов представлены на рисунке 3. Профили температурной стабильности у всех изучаемых ферментов выглядят как типичные сигмоидальные кривые с температурой полуинактивации за 10 мин инкубации  $T_{50}$  (10 мин) равными 48,4, 56,4, 53,7, 58,9 и 48,5 °С для ОpaDAAO1, ОpaDAAO2, ОpaDAAO3, ОpaDAAO4 и ОpaDASPO соответственно. Наименее стабильными оказались ОpaDAAO1 и ОpaDAAO4, наиболее стабильным оказалась ОpaDAAO3 с температурой полуинактивации более чем на 10 градусов выше, чем у ОpaDAAO1 и ОpaDAAO4.

На рисунке 3 также представлены зависимости активности ферментов от температуры. Измерения проводили в течение 30 секунд. Так как при высоких температурах фермент успевает инактивироваться за время определения активности, и при изменении температуры меняется количество растворимого кислорода, мы можем говорить только о скорости накопления субстрата, а не об активности фермента. Однако, данные зависимости имеют практический смысл для понимания влияния температуры на активность изучаемых ферментов и сравнения ферментов между собой.

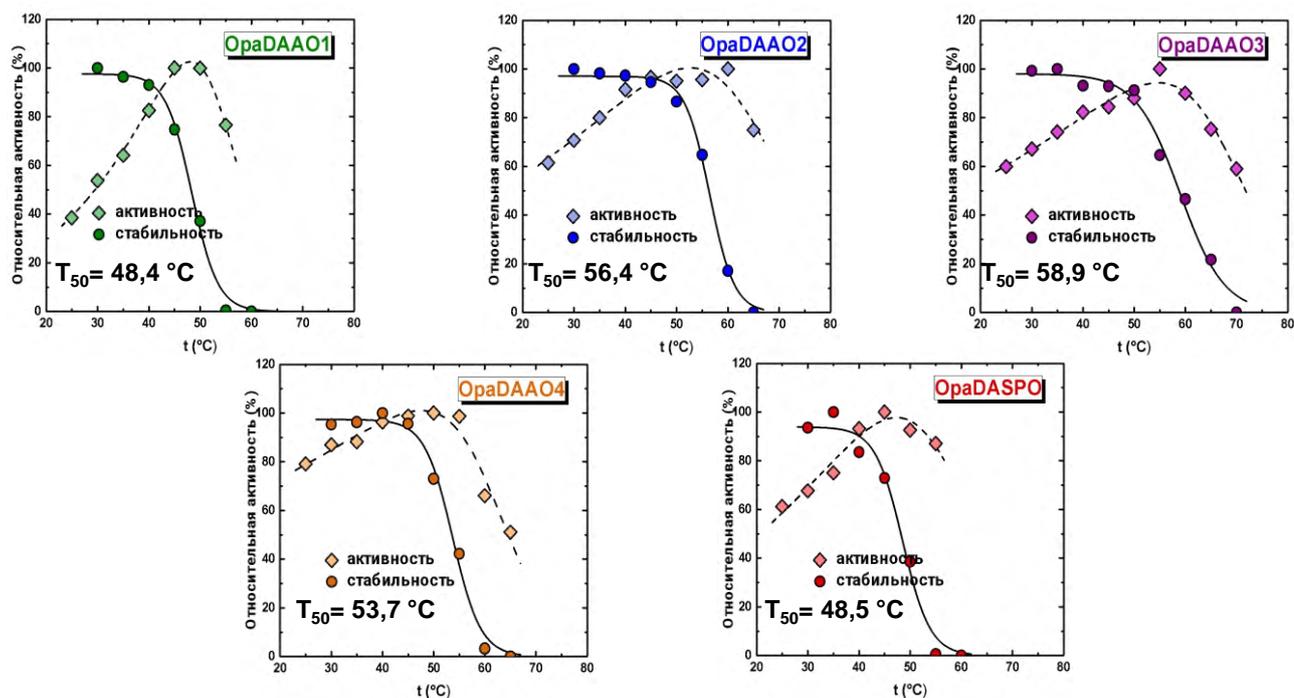


Рис. 3. Влияние температуры на активность и стабильность OpaDAAO.

### Изучение кинетики термоинактивации OpaDAAO1

Мы изучили кинетику термоинактивации двух новых оксидаз с разным олигомерным составом: мономера OpaDAAO1 и димера OpaDAAO3. Исследования проводили при разных температурах, концентрациях ферментов, и в присутствии различных концентраций экзогенного FAD. После анализа полученных данных были сделаны выводы о возможном механизме термоинактивации.

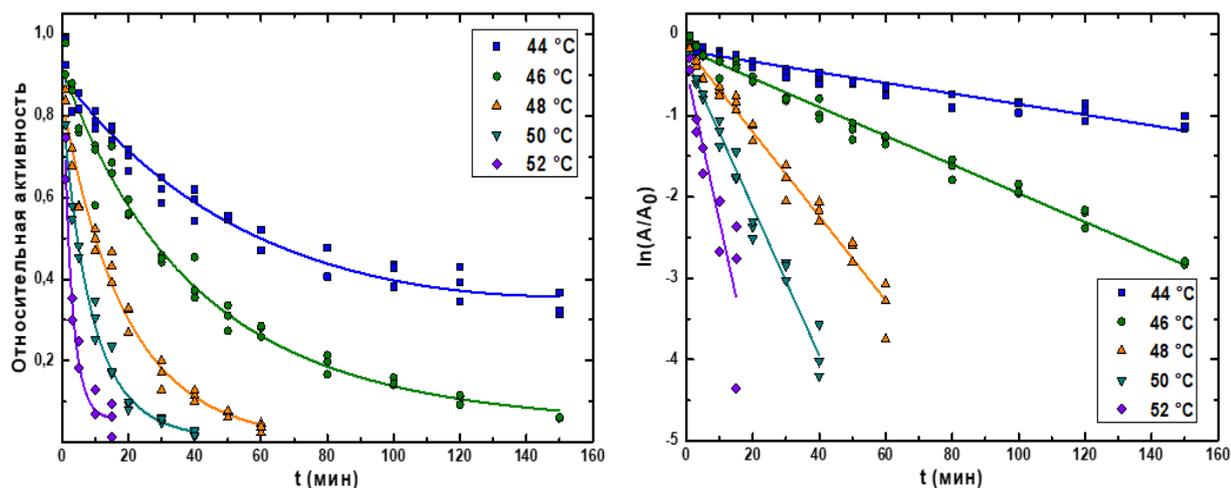
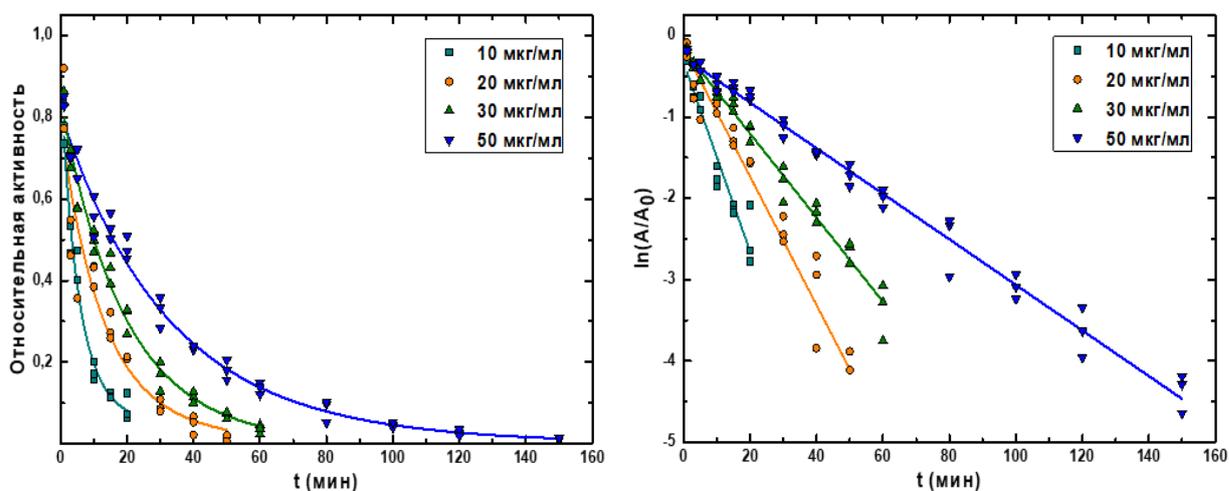


Рис. 4. Зависимость остаточной активности OpaDAAO1 от времени при различных температурах в обычных и полулогарифмических координатах.  $C_E = 30$  мкг/мл.

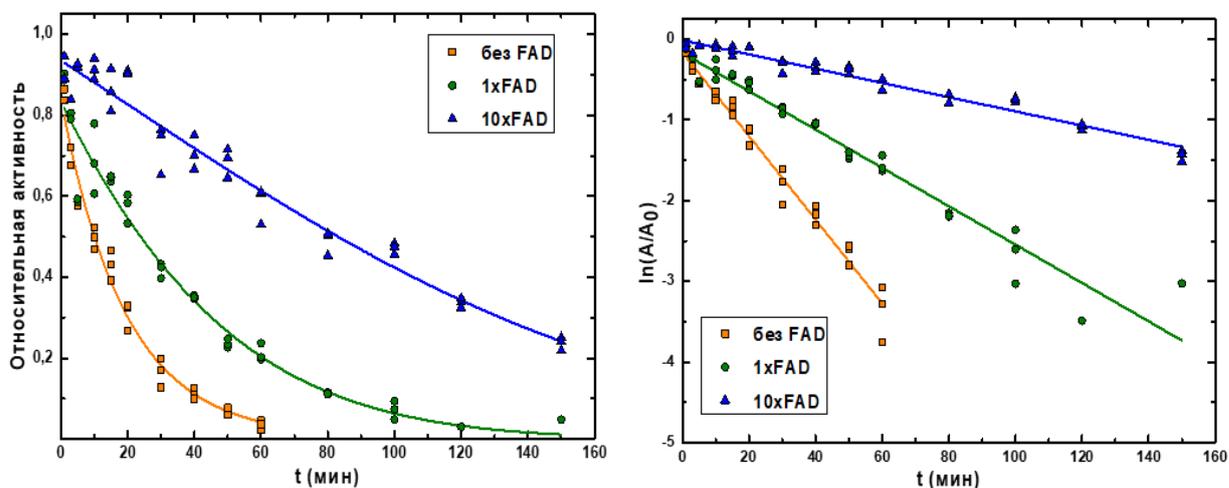
В случае OpaDAAO1 наблюдаемые зависимости остаточной активности от времени при разных температурах плохо аппроксимировались моноэкспоненциальной функцией и гораздо лучше описывались суммой двух экспонент, что подтвердилось с помощью критерия Фишера. В полулогарифмических координатах, несмотря на то что график не имеет характерного для биэкспоненциальной зависимости излома, линеаризованные зависимости

не выходят из нуля (Рис. 4). Все это свидетельствует о наличии сложного механизма термоинактивации данного фермента. Это может быть связано с быстрым установлением равновесия между разными формами ОраDAAO1 во время инактивации.



**Рис. 5.** Зависимость остаточной активности ОраDAAO1 от времени при различных концентрациях фермента в обычных и полулогарифмических координатах.  $t^0 = 48\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

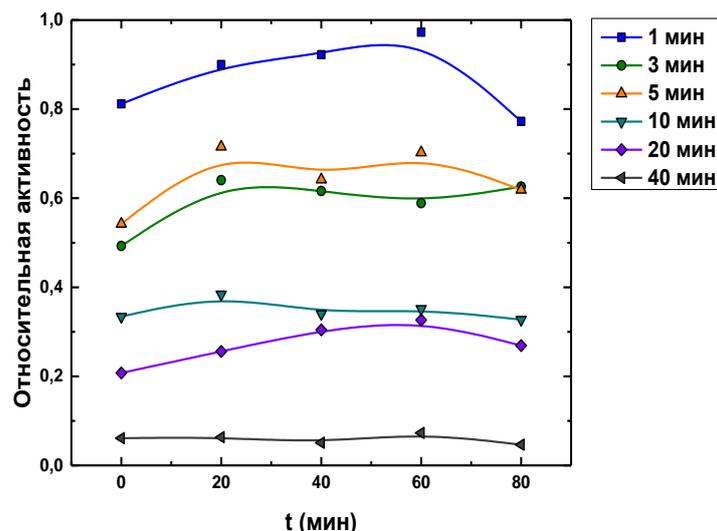
На рис. 5. представлены результаты исследования термоинактивации при постоянной температуре и различных концентрациях ОраDAAO1. Повышение концентрации фермента приводит к увеличению стабильности ОраDAAO1, что может свидетельствовать о наличии обратимой стадии второго порядка. Зависимости в полулогарифмических координатах представляют собой прямые, пересекающие ось  $y$  не в нуле.



**Рис. 6.** Зависимости остаточной активности ОраDAAO1 от времени при различных концентрациях экзогенного FAD в обычных и полулогарифмических координатах.  $C_E = 30\text{ мкг/мл}$ ,  $t^0 = 48\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

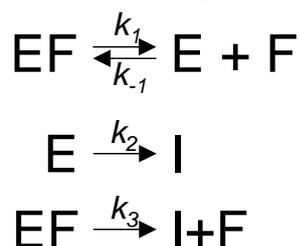
Добавление экзогенного FAD в отношении с ферментом от 1:1 до 10:1 также приводит к повышению температурной стабильности ОраDAAO1 (Рис. 6). Из этого можно сделать предположение, что предложенная выше обратимая стадия второго порядка протекает с участием молекулы FAD.

Нами была изучена реактивация фермента (Рис. 7.). Показано, что ОраDAAO1 способна к частичному восстановлению своей активности.



**Рис. 7.** Исследование реактивации препаратов ОраDAAO1, отобранных после заданного значения времени на стадии термоинактивации.  $t^{\circ} = 48^{\circ}\text{C}$ .  $C_E = 30$  мкг/мл.

Исходя из результатов проведенных экспериментов, был предложен следующий механизм термоинактивации ОраDAAO1 (Рис. 8). В ходе инактивации протекают три конкурирующих процесса: обратимая диссоциация молекулы FAD из глобулы, необратимая денатурация самой глобулы и диссоциация молекулы FAD с денатурацией глобулы.



**Рис. 8.** Предполагаемая схема температурной инактивации ОраDAAO1. EF и E – холо- и форма апоформы ОраDAAO1 соответственно. I – денатурированная форма ОраDAAO1, F – FAD.

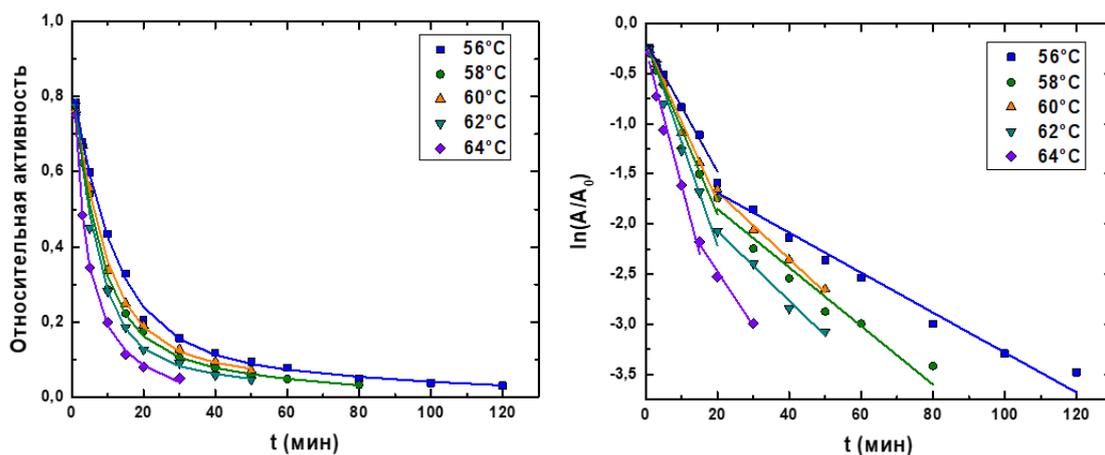
### Изучение кинетики термоинактивации ОраDAAO3

Нами была изучена кинетика термоинактивации димера ОраDAAO3 – наиболее стабильного из изученных нами ферментов. Проведенные эксперименты были аналогичны экспериментам для ОраDAAO1.

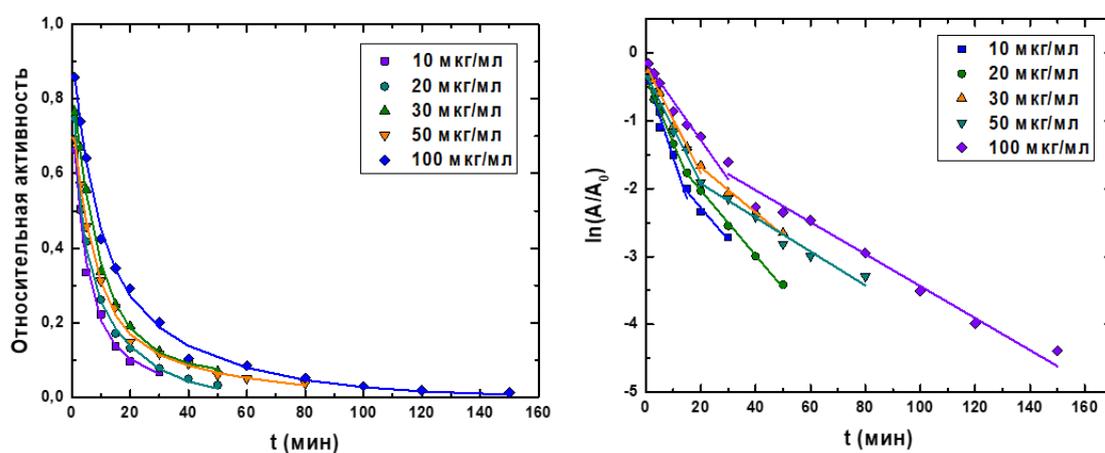
На рис 9 представлены зависимости остаточной активности ОраDAAO3 от времени при различных температурах и при постоянной концентрации фермента. Наблюдаемые зависимости хорошо аппроксимируется биэкспоненциальной функцией, а график зависимости логарифма относительной активности от времени имеет характерный излом.

Также кинетика термоинактивации зависит от концентрации фермента, что может свидетельствовать о наличии стадии второго порядка в процессе инактивации (Рис.10).

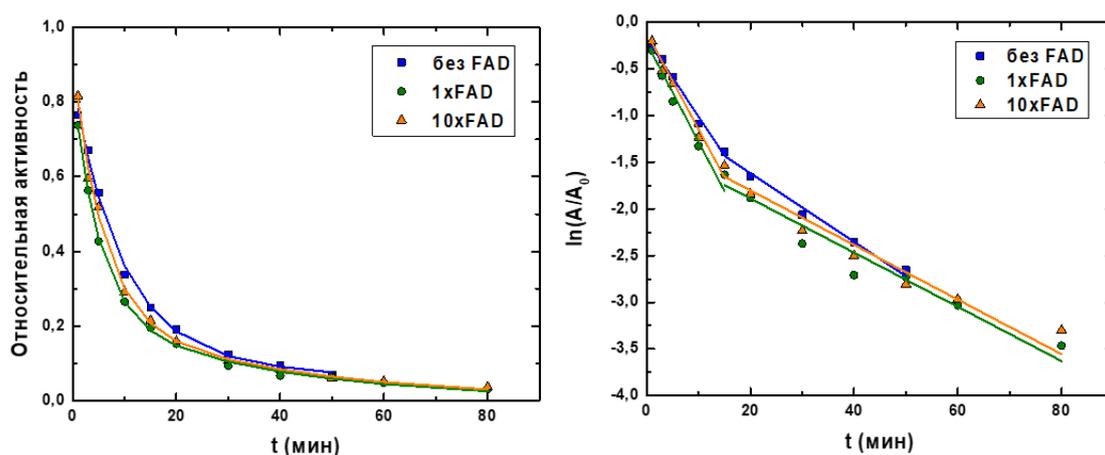
Добавление экзогенного FAD в случае ОраDAAO3 не влияет на кинетику инактивации фермента (Рис. 11). Это означает, что в процессе инактивации ОраDAAO3 кофактор диссоциирует необратимо, без наличия стадии обратимой диссоциации.



**Рис. 9.** Зависимость остаточной активности ОраDAAO3 от времени при различных температурах в обычных и полулогарифмических координатах.  $C_E = 30$  мкг/мл.



**Рис. 10.** Зависимость остаточной активности ОраDAAO3 от времени при различных концентрациях фермента в обычных и полулогарифмических координатах.  $C_E = 30$  мкг/мл.



**Рис. 11.** Зависимость остаточной активности ОраDAAO3 от времени при различных концентрациях экзогенного FAD в обычных и полулогарифмических координатах.  $t^\circ = 60$  °C,  $C_E = 30$  мкг/мл.

Исходя из всех вышеизложенных фактов, мы предлагаем схему термоинактивации OpaDAAO3, аналогичную ранее установленному механизму термоинактивации TvDAAO, которая также является димером. Согласно этой схеме димер обратимо диссоциирует на мономеры и далее необратимо инактивируется с высвобождением FAD из белковой глобулы.



Для подтверждения этого механизма и последующего расчета кинетических констант необходимы дополнительные эксперименты: в частности, необходимо изучить возможное влияние агрегации.

### Субстратная специфичность

Результаты изучения субстратной специфичности ферментов свидетельствуют о том, что все полученные OpaDAAO имеют разный и уникальный профиль субстратной специфичности (Рис.12): например, с D-Ala и D-Met активны все четыре OpaDAAO, а с D-Trp, D-Trp, D-Lys и D-Pro только одна или две. Отдельно стоит отметить необычайно высокую каталитическую константу OpaDAAO1 с D-Ala, которая оказалась минимум в два раза выше, чем  $k_{cat}$  DAAO из дрожжей *Candida boidiini*, которая ранее считалась самым активным с данным субстратом. Также стоит отметить сильно различающиеся значения каталитических констант для разных субстратов, в некоторых случаях различия составляют более чем два порядка. Наличие ферментов с различным спектром субстратной специфичности дает инструмент для разработки методов селективного определения одних D-аминокислот в присутствии других.

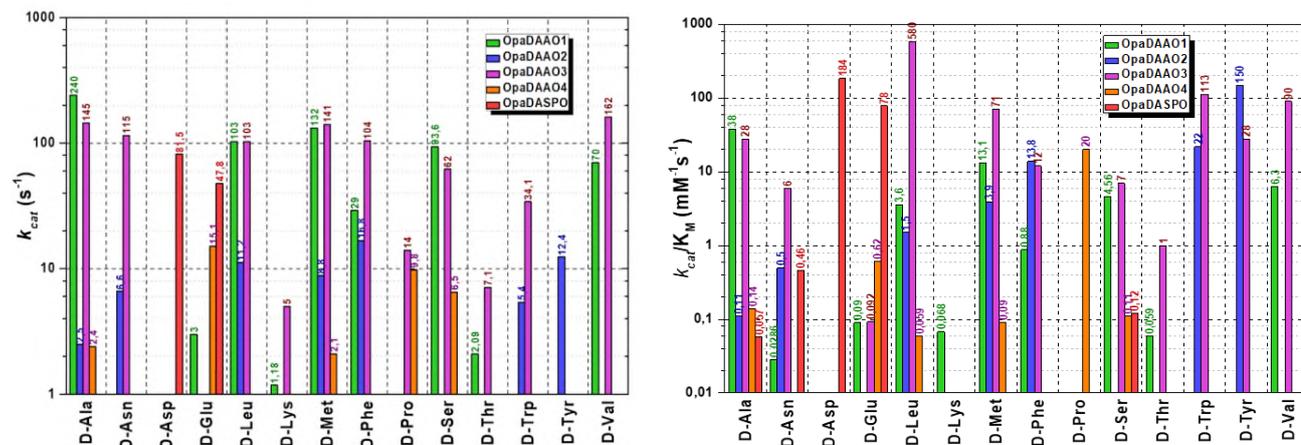


Рис. 12. Каталитические параметры  $k_{cat}$  и  $K_M$  ферментов OpaDAAO в логарифмических координатах с набором D-аминокислот.

### Сравнение каталитических параметров новых OpaDAAO с DAAO из других источников

Мы собрали каталитические параметры наиболее изученных DAAO из различных литературных источников и сравнили их с полученными значениями для новых OpaDAAO. Данные приведены для D-Phe, D-Asp, D-Pro и D-Ser как наиболее практически важных субстратов DAAO (Таблица 4). Соответствующие таблицы для всех изученных D-аминокислот и ферментов приведены в тексте диссертации.

Полученные нами OpaDAAO обладают лучшими каталитическими параметрами для всех практически важных субстратов среди всех известных оксидаз D-аминокислот. В случае

D-Phe и D-Asp каталитическая эффективность OpaDAAO превосходит другие известные ферменты в шесть и более раз.

Таблица 4.

Сравнение каталитических параметров OpaDAAO с другими DAAO.

| D-Phe    |                             |              |   | D-Asp     |                             |             |   |
|----------|-----------------------------|--------------|---|-----------|-----------------------------|-------------|---|
| DAAO     | $k_{cat}$ , с <sup>-1</sup> | $K_M$ , мМ   | $k_{cat}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup> | DAAO      | $k_{cat}$ , с <sup>-1</sup> | $K_M$ , мМ  | $k_{cat}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup> |
| OpaDAAO3 | <b>104</b>                  | <b>0,249</b> | <b>420</b>  | OpaDASPO  | 81.5                        | <b>0,44</b> | <b>184</b>  |
| TvDAAO   | 27                          | 0,37         | 73  | hDASPO    | 70.6                        | 2,14        | 33  |
| OpaDAAO2 | 16,8                        | 1,22         | 13,8  | TdDASPO   | 123                         | 8,77        | 14  |
| pkDAAO   | 16,7                        | 1,4          | 11,9  | ceDASPO-1 | 26,1                        | 5,54        | 4,7   |
| ceDAAO   | 25,1                        | 2,72         | 9,2   | ceDASPO-2 | 9,49                        | 4,2         | 2,2   |

| D-Pro    |                             |             |   | D-Ser    |                             |            |   |
|----------|-----------------------------|-------------|---|----------|-----------------------------|------------|---|
| DAAO     | $k_{cat}$ , с <sup>-1</sup> | $K_M$ , мМ  | $k_{cat}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup> | DAAO     | $k_{cat}$ , с <sup>-1</sup> | $K_M$ , мМ | $k_{cat}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> ·с <sup>-1</sup> |
| OpaDAAO4 | 9,8                         | <b>0,49</b> | <b>20</b>   | OpaDAAO3 | 62                          | 8,7        | <b>7,10</b>                                       |
| pkDAAO   | 10,3                        | 0,56        | 18,5  | OpaDAAO1 | <b>94</b>                   | 20,6       | <b>4,55</b>                                       |
| hDAAO    | 15                          | 1,7         | 8,8   | CbDAAO   | 77,3                        | 33,7       | 2,29  |
| RgDAAO   | 77,3                        | 21,5        | 3,6   | pkDAAO   | 3                           | 12,7       | 0,91  |
| OpaDAAO3 | 14                          | 46          | 0,3   | hDAAO    | 2,8                         | 3,6        | 0,78  |

### Построение и анализ модельных 3D структур

На следующем этапе работы нами были построены модельные структуры полученных OpaDAAO и проанализированы активные центры этих ферментов.

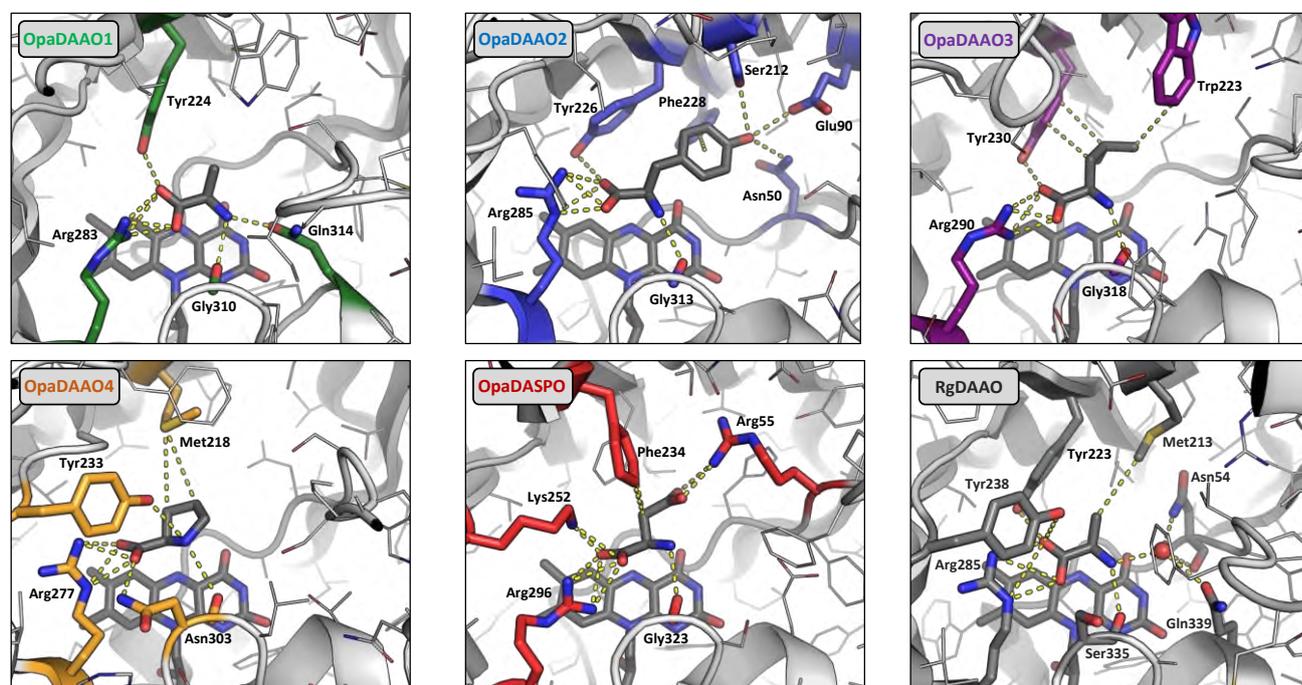


Рис 13. Модели активных центров изучаемых ферментов. На каждом из рисунков показаны остатки, участвующие в связывании субстрата.

Модельные структуры были построены с помощью недавно предложенной программой AlphaFold2. Эта программа на базе искусственного интеллекта с высокой точностью предсказывает пространственную структуру белков. Получение структур высокой точности позволяет

анализировать активные центры ферментов, что может быть полезно при поиске новых ферментов с необходимой субстратной специфичностью на основе секвенированных геномов.

Мы смоделировали структуры OpaDAAO с D-аминокислотами, имеющими минимальные  $K_m$ , а значит наилучшее связывание в активном центре, и выделили остатки, участвующие в связывании этих субстратов. (Рис. 13). Оказалось, что субстрат-связывающие домены всех ферментов уникальны, что объясняет их различную субстратную специфичность.

### Биоинформационно-структурный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот

Стандартная процедура поиска новых ферментов предполагает поиск по гомологии с известными ферментами с данной функцией. В случае оксидаз D-аминокислот данный подход неэффективен из-за их низкой гомологии и существования фермента с похожей функцией – глициноксидаз. Поэтому в дополнение к этой процедуре мы предложили добавить этап построения высокоточных структур кандидатных последовательностей, с помощью программы AlphaFold2, и сравнения их со структурами уже известных ферментов (DAAO и GOX).

#### Поиск новых DAAO из экстремофильных бактерий и архей по гомологии и сравнение последовательностей новых DAAO с известными ферментами

Чтобы апробировать наш подход, мы провели поиск новых DAAO по двум базам секвенированных геномов экстремофильных микроорганизмов: базе NCBI и базе МГУ.

В результате поиска гомологов DAAO в бактериальных геномах, найдено большое количество кандидатных последовательностей, но уровень гомологии не превышал 30%. Ферменты с гомологией менее 24% не обладали рядом признаков, характерных для оксидаз D-аминокислот, поэтому в дальнейшем рассматривались только последовательности с гомологией 24-30%. После проведения анализа по консервативным остаткам были отобраны последовательности, характерные только для DAAO и глициноксидаз (Таблица 5).

Таблица 5.

Источники отобранных последовательностей DAAO и GOX.

| Обозначение                            | Источник                                      | Код белка в базах данных                |
|--|---|---|
| NCBI (GenBank, UniProt)                |   |   |
| Бактерии                               |   |   |
| <b>GthDAAO</b>                         | <i>Gandjariella thermophila</i>               | WP_137812914.1                          |
| <b>CthDAAO</b>                         | <i>Chloracidobacterium thermophilum</i> B     | WP_014099936.1                          |
| <b>RtaDAAO</b>                         | <i>Rubrobacter taiwanensis</i>                | WP_132692836.1                          |
| <b>RraDAAO</b>                         | <i>Rubrobacter radiotolerans</i> DSM 5868     | WP_084263988.1                          |
| <b>RbaDAAO</b>                         | <i>Rhodothermaceae bacterium</i> RA           | ARA94025.1                              |
| <b>PaeGOX</b>                          | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                 | AAP81270                                |
| База геномов МГУ имени М.В. Ломоносова |   |   |
| Бактерии                               |   |   |
| <b>NhyDAAO</b>                         | <i>Natronosporangium hydrolyticum</i> АCPA39  | Icl CP070499.1_prot_Q<br>SB16697.1_2115 |
| <b>NaIGOX</b>                          | <i>Natroglycomyces albus</i> АCPA22           | Icl CP070496.1_prot_Q<br>SB06127.1_824  |
| Археи                                  |   |   |
| <b>NhaDAAO</b>                         | <i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i> AArch4 | 2642575300                              |
| <b>NhaGOX</b>                          | <i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i> AArch4 | 264257558                               |



Таблица 6.

Среднеквадратичное отклонение между структурами оксидаз D-аминокислот и глициноксидаз.

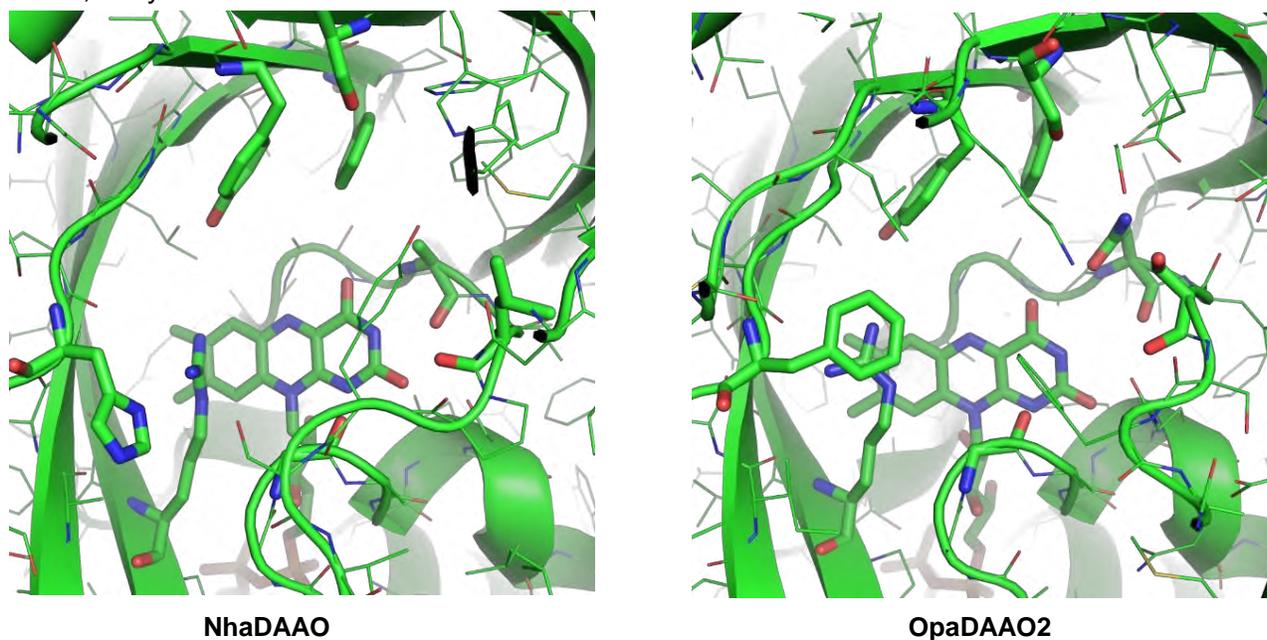
|              | ОpaDAAO1 | ОpaDAAO2 | ОpaDAAO3 | ОpaDAAO4 | ОpaDAAO5 | ОpaDASPO | TvaDAAO_RSA | ОpaDAAO1_RSA | RtoDAAO_1C0P | RemDAAO_7CT4 | hDAAO_2DU8 | pkDAAO_1KIF | GOX_1NG4 | IDA_Ox_6PXS | NhaDAAO | NhyDAAO | NalGOX | NhaGOX | RraDAAO | PaeGOX | RbaDAAO | CthDAAO | RtaDAAO | GthDAAO |
|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-------------|--------------|--------------|--------------|------------|-------------|----------|-------------|---------|---------|--------|--------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|
| ОpaDAAO1     | 0,00     | 0,79     | 0,43     | 1,19     | 1,24     | 1,37     | 0,89        | 0,38         | 0,93         | 1,00         | 1,40       | 1,33        | 6,22     | 7,72        | 3,50    | 0,98    | 2,79   | 3,13   | 1,05    | 4,61   | 1,23    | 0,80    | 0,92    | 1,52    |
| ОpaDAAO2     | 0,79     | 0,00     | 0,71     | 0,81     | 0,74     | 1,06     | 0,66        | 0,82         | 0,84         | 0,79         | 1,46       | 1,34        | 5,51     | 10,29       | 2,22    | 0,91    | 7,72   | 4,31   | 0,80    | 5,66   | 0,87    | 0,86    | 0,79    | 0,96    |
| ОpaDAAO3     | 0,43     | 0,71     | 0,00     | 1,14     | 1,12     | 1,13     | 0,89        | 0,53         | 1,15         | 0,83         | 1,53       | 2,74        | 6,20     | 12,49       | 4,69    | 1,00    | 5,01   | 13,81  | 0,82    | 7,17   | 1,10    | 0,88    | 0,82    | 1,19    |
| ОpaDAAO4     | 1,19     | 0,81     | 1,14     | 0,00     | 0,96     | 1,30     | 1,01        | 1,21         | 1,17         | 1,08         | 2,00       | 2,33        | 3,10     | 21,04       | 2,21    | 1,10    | 3,94   | 2,79   | 0,99    | 3,07   | 1,31    | 1,36    | 1,27    | 1,15    |
| ОpaDAAO5     | 1,24     | 0,74     | 1,12     | 0,96     | 0,00     | 1,45     | 0,97        | 1,16         | 1,20         | 1,07         | 2,99       | 2,96        | 3,31     | 19,18       | 3,90    | 1,14    | 3,72   | 11,66  | 1,04    | 5,26   | 1,53    | 1,12    | 1,16    | 1,70    |
| ОpaDASPO     | 1,37     | 1,06     | 1,13     | 1,30     | 1,45     | 0,00     | 1,19        | 1,36         | 1,01         | 1,15         | 1,58       | 2,30        | 2,85     | 6,44        | 3,24    | 0,95    | 6,71   | 3,98   | 1,00    | 3,76   | 1,14    | 1,18    | 1,04    | 1,03    |
| TvaDAAO_RSA  | 0,89     | 0,66     | 0,89     | 1,01     | 0,97     | 1,19     | 0,00        | 0,78         | 0,88         | 0,73         | 1,98       | 1,94        | 4,33     | 6,27        | 3,54    | 0,95    | 7,32   | 4,60   | 0,84    | 11,75  | 0,98    | 1,21    | 0,96    | 1,05    |
| ОpaDAAO1_RSA | 0,38     | 0,82     | 0,53     | 1,21     | 1,16     | 1,36     | 0,78        | 0,00         | 0,98         | 0,92         | 1,45       | 1,35        | 5,95     | 9,63        | 3,46    | 1,04    | 2,94   | 4,25   | 1,04    | 4,87   | 1,23    | 0,88    | 0,93    | 1,49    |
| RtoDAAO_1C0P | 0,93     | 0,84     | 1,15     | 1,17     | 1,20     | 1,01     | 0,88        | 0,98         | 0,00         | 0,88         | 1,47       | 1,52        | 3,66     | 3,85        | 2,05    | 0,89    | 7,28   | 5,70   | 0,86    | 3,65   | 0,86    | 0,82    | 0,93    | 1,16    |
| RemDAAO_7CT4 | 1,00     | 0,79     | 0,83     | 1,08     | 1,07     | 1,15     | 0,73        | 0,92         | 0,88         | 0,00         | 1,56       | 1,94        | 4,81     | 15,72       | 3,09    | 0,91    | 11,83  | 2,71   | 0,78    | 3,79   | 0,99    | 1,01    | 0,96    | 1,15    |
| hDAAO_2DU8   | 1,40     | 1,46     | 1,53     | 2,00     | 2,99     | 1,58     | 1,98        | 1,45         | 1,47         | 1,56         | 0,00       | 0,41        | 4,50     | 4,52        | 1,96    | 1,09    | 8,68   | 9,48   | 1,16    | 8,13   | 1,10    | 1,38    | 1,12    | 1,12    |
| pkDAAO_1KIF  | 1,33     | 1,34     | 2,74     | 2,33     | 2,80     | 2,30     | 1,94        | 1,35         | 1,52         | 1,94         | 0,41       | 0,00        | 3,78     | 4,22        | 2,83    | 1,05    | 4,76   | 4,67   | 1,08    | 5,36   | 1,07    | 1,31    | 1,05    | 1,07    |
| GOX_1NG4     | 6,12     | 5,51     | 6,20     | 3,10     | 3,31     | 2,85     | 4,33        | 6,11         | 3,66         | 4,81         | 4,50       | 3,78        | 0,00     | 1,33        | 17,38   | 2,31    | 1,24   | 1,01   | 2,15    | 1,21   | 3,29    | 3,56    | 5,44    | 2,78    |
| IDA_Ox_6PXS  | 7,72     | 10,29    | 12,49    | 21,04    | 19,18    | 6,44     | 6,27        | 9,63         | 3,85         | 14,20        | 5,03       | 4,22        | 1,33     | 0,00        | 9,26    | 4,28    | 1,13   | 0,91   | 2,67    | 1,45   | 6,90    | 2,69    | 5,01    | 3,35    |
| NhaDAAO      | 3,50     | 2,25     | 4,69     | 2,21     | 3,90     | 3,24     | 3,54        | 3,46         | 2,05         | 3,09         | 1,96       | 2,83        | 17,38    | 9,26        | 0,00    | 1,19    | 9,48   | 5,26   | 0,88    | 10,28  | 2,59    | 1,67    | 2,01    | 3,00    |
| NhyDAAO      | 0,98     | 0,91     | 1,00     | 1,10     | 1,14     | 0,95     | 0,95        | 1,04         | 0,89         | 0,91         | 1,09       | 1,05        | 2,31     | 4,28        | 1,19    | 0,00    | 1,95   | 3,09   | 0,56    | 2,19   | 0,50    | 0,71    | 0,46    | 0,70    |
| NalGOX       | 2,79     | 7,72     | 5,01     | 3,94     | 3,72     | 6,25     | 7,32        | 2,94         | 7,28         | 12,83        | 8,68       | 4,76        | 1,24     | 1,13        | 16,19   | 1,95    | 0,00   | 1,21   | 3,99    | 1,54   | 1,51    | 2,43    | 3,79    | 5,80    |
| NhaGOX       | 3,13     | 4,31     | 13,81    | 2,79     | 11,66    | 3,98     | 4,60        | 4,25         | 5,70         | 2,71         | 9,48       | 4,67        | 1,01     | 0,91        | 5,26    | 3,09    | 1,21   | 0,00   | 2,95    | 1,16   | 11,37   | 5,12    | 5,19    | 6,13    |
| RraDAAO      | 1,05     | 0,80     | 0,82     | 0,99     | 1,04     | 1,00     | 0,84        | 1,04         | 0,86         | 0,78         | 1,16       | 1,08        | 2,15     | 2,67        | 0,88    | 0,56    | 3,99   | 2,95   | 0,00    | 2,33   | 0,52    | 0,59    | 0,41    | 0,61    |
| PaeGOX       | 4,61     | 5,66     | 7,16     | 3,07     | 5,26     | 3,76     | 11,75       | 4,87         | 3,65         | 3,79         | 8,13       | 5,36        | 1,21     | 1,45        | 10,28   | 2,19    | 1,54   | 1,16   | 2,33    | 0,00   | 3,31    | 3,67    | 3,15    | 2,96    |
| RbaDAAO      | 1,23     | 0,87     | 1,10     | 1,31     | 1,53     | 1,14     | 0,98        | 1,23         | 0,86         | 0,99         | 1,10       | 1,07        | 3,29     | 6,90        | 2,59    | 0,50    | 1,51   | 11,37  | 0,52    | 3,31   | 0,00    | 0,56    | 0,45    | 0,78    |
| CthDAAO      | 0,80     | 0,86     | 0,88     | 1,36     | 1,12     | 1,18     | 1,21        | 0,88         | 0,82         | 1,01         | 1,38       | 1,31        | 3,56     | 2,59        | 1,67    | 0,71    | 2,43   | 5,12   | 0,59    | 3,67   | 0,56    | 0,00    | 0,63    | 0,94    |
| RtaDAAO      | 0,92     | 0,79     | 0,82     | 1,27     | 1,16     | 1,04     | 0,96        | 0,93         | 0,93         | 0,96         | 1,12       | 1,05        | 5,44     | 5,01        | 2,01    | 0,46    | 3,79   | 5,19   | 0,41    | 3,15   | 0,45    | 0,63    | 0,00    | 0,64    |
| GthDAAO      | 1,52     | 0,96     | 1,19     | 1,15     | 1,70     | 1,03     | 1,05        | 1,49         | 1,16         | 1,15         | 1,13       | 1,07        | 2,78     | 3,35        | 3,00    | 0,70    | 5,80   | 6,13   | 0,61    | 2,96   | 0,78    | 0,94    | 0,64    | 0,00    |

структур известных оксидаз D-аминокислот. Тем не менее, несмотря на то что результаты общего сравнения структуры NhaDAAO со структурами других DAAO в целом немного выходят за пределы граничного значения 2 Å, анализ гомологии и сравнение общей структуры позволили отнести этот фермент к оксидазам D-аминокислот. Этот вывод полностью подтверждает результаты сравнения структуры активных центров.

### Сравнительный анализ структур активных центров DAAO

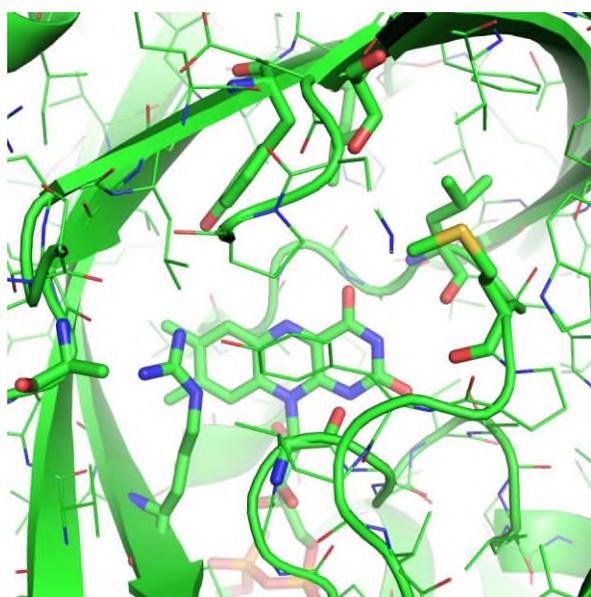
Мы провели сравнение структур активных центров новых DAAO с активными центрами известных оксидаз D-аминокислот. Получение и характеристика пяти новых оксидаз D-аминокислот из дрожжей *O. parapolymorpha*, проведенные в рамках данной работы, значительно расширяют набор DAAO для сравнения, а тот факт, что все изученные DAAO обладают уникальным спектром субстратной специфичности, позволяет проводить такое сравнение еще более эффективно.

Наиболее наглядно эффективность такого сравнения видна на примере NhaDAAO из архей. Результаты сравнения активных центров свидетельствуют, что NhaDAAO и OpaDAAO2 имеют практически идентичные активные центры (рис. 15). В субстрат-связывающем домене обоих ферментов остатки Tyr и Phe находятся практически в идентичном положении. На основе данного сравнения, по аналогии с OpaDAAO2, можно сделать предположения о субстратной специфичности NhaDAAO – данный фермент может проявлять активность с D-Phe, D-Tyr и D-Leu.

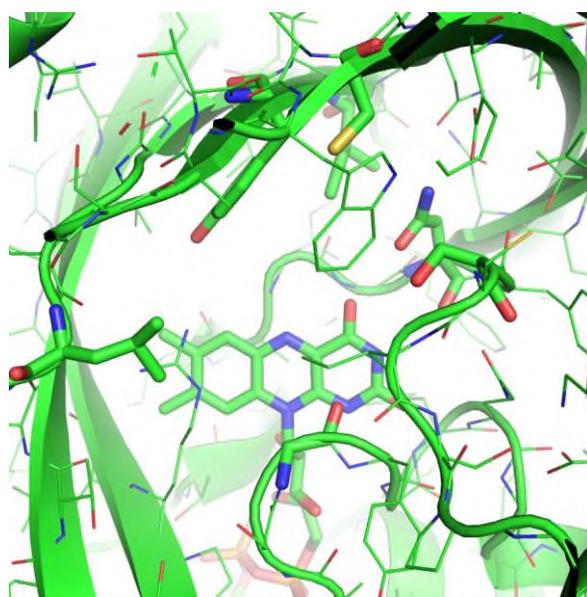


**Рис. 15.** Модельные структуры активных центров NhaDAAO из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 и OpaDAAO2 из метилотрофных дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1.

Был проведен также сравнительный анализ активных центров NhyDAAO и OpaDAAO3 (Рис. 16). Активные центры данных ферментов менее похожи, чем активные центры предыдущей пары, однако все равно можно говорить о некоем соответствии. У обоих ферментов присутствует остаток Tyr, а на месте остатка Cys в OpaDAAO3 в NhyDAAO находится похожий на него остаток Ser. Соответственно можно предположить похожую субстратную специфичность данных ферментов, в первую очередь активность с D-Phe и D-Leu.



**NhyDAAO**



**OpaDAAO3**

**Рис. 16.** Модельные структуры активных центров NhyDAAO из галофильных бактерий *N. hydrolyticum* АСРА39 и OpaDAAO3 из метилотрофных дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1.

В нашей лаборатории ген NhyDAAO был клонирован и фермент был получен в активной и растворимой форме. Исследования его субстратной специфичности показало, что он действительно проявляет максимальную активность с предсказанными нами субстратами. Данные результаты подтверждают применимость нашего подхода к поиску новых оксидаз D-аминокислот с заданной субстратной специфичностью.

Подводя итоги первых двух частей работы, отметим, что нами впервые были найдены и охарактеризованы шесть оксидаз D-аминокислот в одном микроорганизме. Все изученные ферменты обладали уникальным спектром субстратной специфичности. На основе полученных данных был разработан биоинформационно-структурный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот. Впервые найдены гены, кодирующие оксидазы D-аминокислот в археях. Успешно предсказана субстратная специфичность оксидазы D-аминокислот по структурным данным.

### **Получение мутантов оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* с улучшенными свойствами**

Поиск новых ферментов является не единственным способом получения ферментов с заданными свойствами. Альтернативный метод – белковая инженерия уже известных ферментов и получение мутантных ферментов с улучшенными свойствами. Основным промышленным применением DAAO является процесс окисления цефалоспорина С и получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты – предкурсора цефалоспориновых антибиотиков. Оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* является самой активной из известных оксидаз D-аминокислот с этим субстратом. В нашей лаборатории проводились многолетние эксперименты по получению мутантных TvDAAO с повышенной температурной стабильностью, химической стабильностью и улучшенными каталитическими параметрами с цефалоспорином С.

В рамках данной работы мы провели объединение изученных ранее мутаций и получили мутантные оксидазы D-аминокислот с многоточечными заменами. Используемые нами замены представлены на рис. 17.

Было получено шесть мутантных TvDAAO с многоточечными заменами: один фермент с двойной заменой F54S/M156L (SL), один фермент с тройной заменой F54S/C108F/M156L (SFL), один фермент с пятью заменами E32R/F33D/F54S/C108F/M156L (RDSFL) и три фермента с шестью заменами E32R/F33D/F54S/C108F/M156L/C298G (RDSFLG), E32R/F33D/F54S/C108F/M156L/C298N (RDSFLN) и E32R/F33D/F54S/C108F/M156L/C298Q (RDSFLQ). Первые два фермента были получены и полностью охарактеризованы автором работы, в случае остальных ферментов автор принимал участие в характеристике этих ферментов.

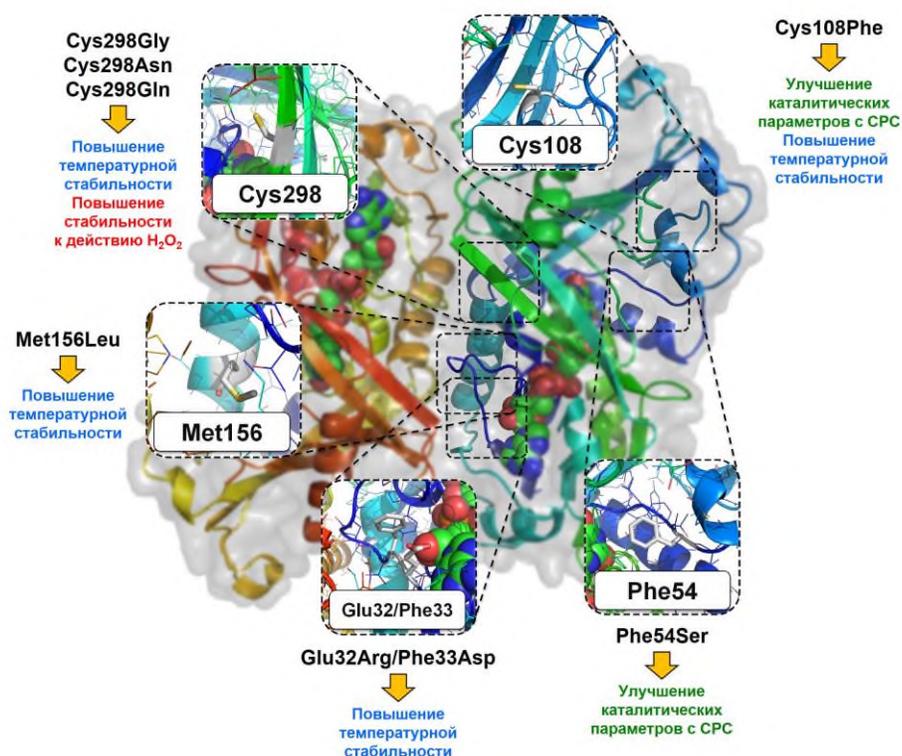


Рис. 17. Структура TvDAAO с выделенными заменами, приводящими к улучшению свойств фермента.

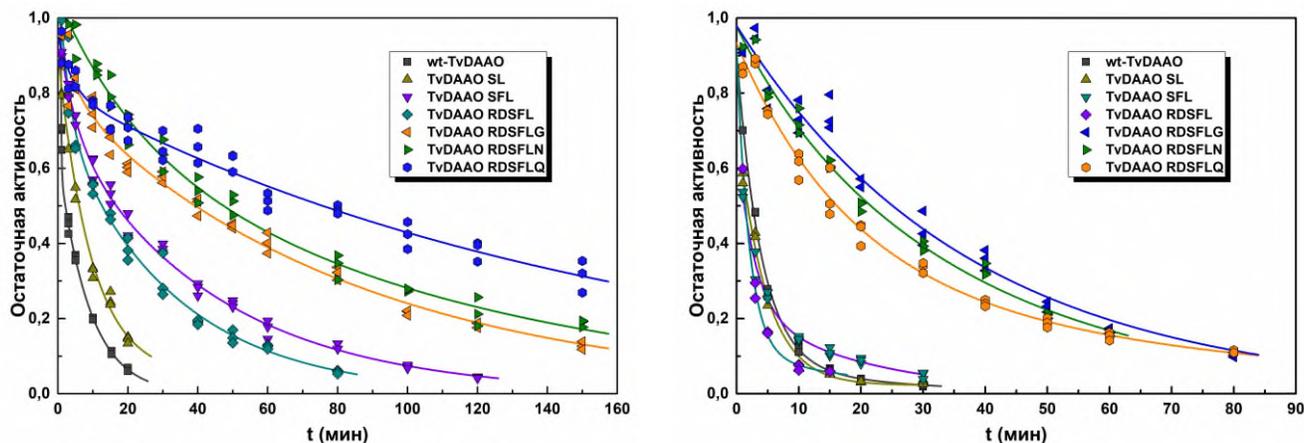
Таблица 7.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с цефалоспорином С.

| Форма TvDAAO | $K_M$ , мМ     | $k_{cat}$ , с <sup>-1</sup> | $k_{cat}/K_M$ , с <sup>-1</sup> мМ <sup>-1</sup> |
|--------------|----------------|-----------------------------|--|
| дикий тип    | 1,4±0,4        | 26±3                        | 18±5   |
| SL           | 2,3±0,9        | <b>55±6</b>                 | 20±10  |
| SFL          | 1,9±0,6        | <b>119±7</b>                | <b>60±20</b>                                     |
| RDSFL        | 1,6±0,3        | <b>106±9</b>                | <b>66±12</b>                                     |
| RDSFLG       | <b>0,8±0,2</b> | <b>65±5</b>                 | <b>79±15</b>                                     |
| RDSFLN       | 2,9±0,5        | <b>121±15</b>               | <b>42±8</b>                                      |
| RDSFLQ       | 1,4±0,3        | <b>68±5</b>                 | <b>50±9</b>                                      |

Каталитические параметры полученных мутантных TvDAAO в реакции окисления цефалоспорина С представлены в таблице 7. Оказалось, что объединение замен в большинстве случаев не приводит к ухудшению константы Михаэлиса и значительно улучшает каталитическую константу. В итоге получились ферменты как с улучшенной каталитической константой (замены SFL, RDSFL, RDSFLN) по сравнению с TvDAAO дикого типа, так и с улучшенной каталитической эффективностью (замены RDSFLG).

Изучены температурная и химическая стабильности полученных ферментов. Объединение мутаций, повышающих температурную стабильность, привело к аддитивному эффекту и в случае фермента с шестью заменами RDSFLQ период полуинактивации при температуре 60 °С увеличился более чем в 8 раз. Химическая стабильность полученных мутантных форм с заменами остатка цистеина в 298-ом положении также возросла в 5-6 раз по сравнению с TvDAAO дикого типа (Рис. 18).



**Рис. 18.** Температурная инактивация многоточечных мутантных форм TvDAAO и TvDAAO дикого типа при 60 °С. Инактивация многоточечных мутантных форм TvDAAO в 0,1 М растворе пероксида водорода.  $C_E = 10$  мкг/мл, 0,1 М КРВ, pH 8,0.

## Выводы

1. Найдены шесть генов, кодирующих оксидазы D-аминокислот у дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1. Такое большое количество генов DAAO в одном организме описано впервые. Гены клонированы, проведена экспрессия, очистка и характеристика полученных ферментов. Построены модельные структуры. Все изученные ферменты обладают уникальным спектром субстратной специфичности.
2. Разработан биоинформационно-структурный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот. Впервые найдены гены, кодирующие оксидазы D-аминокислот в археях. Успешно предсказана субстратная специфичность оксидазы D-аминокислот по структурным данным.
3. Получены биокатализаторы на основе TvDAAO с многоточечными заменами. Данные ферменты одновременно обладают самыми высокими каталитическими параметрами в реакции окисления цефалоспорина С и самыми высокими стабильностями к инактивации под действием температуры и пероксида водорода.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Список статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

1. Tishkov V.I., **Shelomov M.D.**, Pometun A.A., Savin S.S., Atroshenko D.L. Physiological Role of D-amino Acids and Bioanalytical Potential of D-amino Acid Oxidases. // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2023. V. 78, № 1. P. 1-9. doi.org/10.3103/S0027131423010066  
Тишков В.И., **Шеломов М.Д.**, Пометун А.А., Савин С.С., Атрошенко Д.Л. Физиологическая роль D-аминокислот и биоаналитический потенциал оксидаз D-аминокислот. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2023. Т. 64, № 2. С. 72-84. [IF Scopus = 0,8]
2. Кошкина М.А., Сергеев Е.П., Федоров Т.А., **Шеломов М.Д.**, Пометун А.А., Савин С.С., Тишков В.И., Атрошенко Д.Л. Кинетика термоинактивации оксидазы D-аминокислот OpaDAAO1 из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2023. Т. 64, № 2. С. 41-51. [IF Scopus = 0,8]
3. Atroshenko D.L., Golovina D.I., Sergeev E.P., **Shelomov M.D.**, Elcheninov A.G., Kublanov I.V., Chubar T.A., Pometun A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. Bioinformatics-structural approach to the search for new D-amino acid oxidases. // *Acta Naturae*. 2022. V. 14, №4(55). P. 57-68. doi.org/10.32607/actanaturae.11812. [IF Scopus = 3,0]  
Атрошенко Д.Л., Головина Д.И., Сергеев Е.П., **Шеломов М.Д.**, Ельченинов А.Г., Кубланов И.В., Чубарь Т.А., Пометун А.А., Савин С.С., Тишков В.И. Биоинформационно-структурный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот. // *Acta Naturae*. 2022, Т. 14, № 4 (55). С. 4-15.
4. Atroshenko D.L., **Shelomov M.D.**, Zarubina S.A., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. Multipoint TvDAAO mutants for cephalosporin C bioconversion. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2018. V. 20. Paper 4412. doi.org/10.3390/ijms20184412. [IF Scopus = 6,9]
5. Tishkov V.I., Pometun A.A., Stepashkina A.V., Fedorchuk V.V., Zarubina S.A., Kargov I.S., Atroshenko D.L., Parshin P.D., **Shelomov M.D.**, Kovalevski R.P., Boiko K.M., Eldarov M.A., D'Oronzo E., Facheris S., Secundo F., Savin S.S. Rational design of practically important enzymes. // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2018. V. 73, № 1. P. 1-6. doi.org/10.3103/S0027131418020153  
Тишков В.И., Пометун А.А., Степашкина А.В., Федорчук В.В., Зарубина С.А., Каргов И.С., Атрошенко Д.Л., Паршин П.Д., **Шеломов М.Д.**, Ковалевский Р.П., Бойко К.М., Эльдаров М.А., Д'Оронцо Э., Секундо Ф., Савин С.С. Рациональный дизайн практически важных ферментов. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2018. Т. 59, № 2. С. 70-77. [IF Scopus = 0,8]
6. Atroshenko D.L., Zarubina S.A., **Shelomov M.D.**, Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. Preparation and characterization of multipoint yeast D-amino acid oxidase mutants with improved stability and activity. // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2017. V.72, № 5. P. 218-223. doi.org/10.3103/S0027131417050030  
Атрошенко Д.Л., Зарубина С.А., **Шеломов М.Д.**, Голубев И.В., Савин С.С., Тишков В.И. Получение и характеристика многоточечных мутантов оксидазы D-аминокислот с улучшенной стабильностью и активностью. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2017. Т. 58, № 5. С. 257-263. [IF Scopus = 0,8]

### Публикации по докладам на конференциях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus:

1. Atroshenko, D., **Shelomov, M.**, Zhgun, A., Avdanina, D., Eldarov, M., Pometun, A., Chubar, T., Savin, S., Tishkov, V. Preparation and characterization of wild-type and mutant D-amino acid oxidases from *Hansenula polymorpha* and *Trigonopsis variabilis*. // *FEBS Open Bio*. 2018. V. 8, № S1. P. 190–190. doi.org/10.1002/2211-5463.12453. [IF Scopus = 3,9]
2. Tishkov V.I., Atroshenko D.L., Zarubina S.A., **Shelomov M.D.**, Karnaukhov V.K., Pometun A.A., Savin S.S. Structure-function relationship and chemical stability of yeast D-amino acid oxidase. // *FEBS Journal*. 2017. V. 284, № S1. P. 199-200. doi.org/10.1111/febs.14174. [IF Scopus = 9,3]

### СПИСОК ДОКЛАДОВ НА КОНФЕРЕНЦИЯХ ПО ТЕМЕ РАБОТЫ

1. Tishkov V., Sergeev E., **Shelomov M.**, Golovina D., Boiko K., Savin S., Atroshenko D. New D-amino acid oxidases (Приглашенный). *6th Int. Conf. on Cat. and Chem. Engineering*, Дубай, ОАЭ, 9-10 ноября 2022.
2. Сергеев Е.П., Атрошенко Д.Л., **Шеломов М.Д.**, Савин С.С., Тишков В.И. Влияние pH на каталитические параметры оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (Устный) IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция "Химия, физика, биология: пути интеграции", ФИЦ ХФ РАН, Россия, 20-22 апреля 2022.
3. Кошкина М.К., Атрошенко Д.Л., **Шеломов М.Д.**, Савин С.С., Тишков В.И. Изучение кинетики термоинактивации оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (OpaDAAO1)

(Устный) IX Всероссийская научная молодежная школа-конференция "Химия, физика, биология: пути интеграции", ФИЦ ХФ РАН, Россия, 20-22 апреля 2022.

4. Кошкина М.К., Атрошенко Д.Л., **Шеломов М.Д.**, Савин С.С., Тишков В.И. Изучение кинетики термоинактивации оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (ОраDAAO1) (Устный). XXIX международная научная конференция Ломоносов-2022», Москва, Россия, 11-22 апреля 2022.
5. Атрошенко Д.Л., **Шеломов М.Д.**, Ушакова Ю.А., Сергеев Е.П., Савин С.С., Тишков В.И. Новые оксидазы D-аминокислот из метилотрофных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (Стендовый). VII Междисциплинарная конференция МОБИ-ХимФарма 2021, Москва, Россия, 12-14 октября 2021.
6. Атрошенко Д.Л., **Шеломов М.Д.**, Ушакова Ю.А., Савин С.С., Тишков В.И. Изучение механизма термоинактивации оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL1 (Стендовый). IX Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика», (п. Мисхор, Крым), Россия, 20-24 сентября 2021.
7. Ушакова Ю.А., **Шеломов М.Д.**, Атрошенко Д.Л., Тишков В.И. Экспрессия, очистка и характеристика рекомбинантной оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1 (Устный). XXVIII Международная научная конференция "Ломоносов-2021", Москва, Россия, 12-23 апреля 2021.
8. Атрошенко Д.Л., **Шеломов М.Д.**, Ушакова Ю.А., Эльдаров М.А., Тишков В.И. Новые оксидазы D-аминокислот термотолерантных дрожжей (Устный). XX Международная конференция молодых учёных «Леса Евразии – Карельские леса», Петрозаводск, Россия, 22-27 марта 2021.
9. Атрошенко Д.Л., **Шеломов М.Д.**, Тишков В.И., Чубарь Т.А., Эльдаров М.А. Получение и характеристика новых оксидаз D-аминокислот (Устный) Международная научная конференция «Ломоносов-2019», Москва, Россия, 11 апреля 2019.
10. Атрошенко Д.Л., **Шеломов М.Д.**, Эльдаров М.А., Тишков В.И. Кинетические свойства и стабильность новых дрожжевых оксидаз D-аминокислот (Устный) XXXVI Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике, пос. Поведники, Московская обл., Россия, 18-21 марта 2019.
11. **Шеломов М.Д.**, Атрошенко Д.Л. Экспрессия, очистка и характеристика оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Hansenula polymorpha* (Стендовый). XXXVI Всероссийский симпозиум молодых ученых по химической кинетике, пос. Поведники, Московская обл., Россия, 18-21 марта 2019.
12. **Shelomov M.D.**, Tishkov V.I., Atroshenko D.L., Savin S.S. Multipoint mutants of D amino acid oxidase with increased thermal stability and activity with Cephalosporin C (Стендовый) *Biocatalysis-2017: Fundamentals & applications*. Истра, Россия, 25-30 июля 2017.
13. Atroshenko D.L., **Shelomov M.D.**, Karnaukhov V.K., Kotova E.Yu, Savin S.S., Golubev I.V., Tishkov V.I. Mutants of D amino acid oxidase with increased resistance to hydrogen peroxide (Устный) *Biocatalysis-2017: Fundamentals & applications*. Истра, Россия, 25-30 июля 2017.
14. **Шеломов М.Д.**, Атрошенко Д.Л. Получение мутантных оксидаз D-аминокислот с многоточечными заменами (Устный) XXIV Международная научная конференция "Ломоносов – 2017", МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, 20 апреля 2017.