

Московский государственный университет имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Химический факультет

На правах рукописи



ШЕЛОМОВ
Михаил Дмитриевич

**Оксидазы D-аминокислот из дрожжей:
получение и структурно-функциональные
исследования**

1.5.4 – Биохимия
1.5.6 – Биотехнология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
доктор химических наук,
профессор В.И. Тишков
кандидат химических наук,
Д.Л. Атрошенко

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
2.1. Общие сведения об оксидазе D-аминокислот.....	12
2.1.1. Общие сведения	12
2.1.2. Оксидазы D-аминокислот из различных организмов	13
2.1.3. Биологическая роль оксидазы D-аминокислот.....	15
2.1.4. Практическое применение оксидазы D-аминокислот.....	18
2.1.5. Белковая инженерия оксидазы D-аминокислот.....	22
2.1.6. Первичная структура и олигомерный состав.....	25
2.1.7. Третичная структура и механизм действия.....	26
2.2. Свойства оксидаз D-аминокислот из различных источников	31
2.2.1. Каталитические свойства	31
2.2.2. Стабильность.....	36
2.3. Дрожжи <i>Ogataea parapolymorpha</i> (<i>Hansenula polymorpha</i>)	37
2.3.1. Общие сведения о дрожжах <i>O. parapolymorpha</i>	37
2.3.2. Паралогичные гены из дрожжей <i>O. parapolymorpha</i>	38
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
3.1. Материалы	42
3.2. Методы исследования	42
3.2.1. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	42
3.2.2. Выделение ДНК фрагмента из агарозного геля.....	43
3.2.3. Рестрикция и лигирование фрагментов ДНК	43
3.2.4. Трансформация клеток <i>E. coli</i>	44
3.2.5. Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>E. coli</i>	45

3.2.6. Секвенирование ДНК	45
3.2.7. Экспрессия OpaDAAO в клетках <i>E. coli</i>	46
3.2.8. Подготовка клеточного экстракта	47
3.2.9. Хроматография OpaDAAO	47
3.2.10. Белковый форец и аналитическая гель-фильтрация	48
3.2.11. Анализ кофактора	48
3.2.12. Определение активности и концентрации OpaDAAO	49
3.2.13. Определение температурной активности и стабильности	49
3.2.14. Определение рН-зависимостей активности и стабильности	50
3.2.15. Построение 3D моделей структур OpaDAAO и анализ молекулярной динамики	50
3.2.16. Биоинформатический поиск генов потенциальных DAAO	51
3.2.17. Экспрессия TvDAAO клетках <i>E. coli</i>	52
3.2.18. Выделение и очистка TvDAAO	53
3.2.19. Определение концентрации TvDAAO	53
3.2.20. Определение активности TvDAAO	54
3.2.21. Определение каталитических параметров TvDAAO с цефалоспорином С	54
3.2.22. Изучение температурной стабильности TvDAAO	55
3.2.23. Изучение окислительной стабильности TvDAAO	55
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	56
4.1. Поиск генов потенциальных OpaDAAO	56
4.1.1. Множественное выравнивание последовательностей	57
4.2. Клонирование, экспрессия и очистка OpaDAAO	60
4.3. Изучение и сравнительная характеристика новых OpaDAAO	65
4.3.1. Изучение влияния рН на активность и стабильность OpaDAAO	65

4.3.2. Изучение влияния температуры на стабильность и активность OpaDAAO	69
4.3.3. Изучение кинетики термоинактивации OpaDAAO1	71
4.3.4. Изучение кинетики термоинактивации OpaDAAO3	77
4.4. Субстратная специфичность OpaDAAO	82
4.5. Сравнение новых OpaDAAO с DAAO из других источников	86
4.6. Построение и анализ модельных 3D-структур OpaDAAO	91
4.7 Биоинформационно-структурный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот	93
4.7.1. Поиск новых DAAO из экстремофильных бактерий и архей по гомологии	94
4.7.2. Сравнение аминокислотных последовательностей новых DAAO с известными ферментами из бактерий, дрожжей и грибов	95
4.7.3. Построение модельных 3D-структур и их сравнительный анализ с известными структурами	100
4.7.4. Сравнительный анализ структур активных центров DAAO	102
4.8. Получение мутантов оксидазы D-аминокислот из дрожжей <i>Trigonopsis variabilis</i> с улучшенными свойствами	106
4.8.1. Получение многоточечных мутантных TvDAAO	106
4.8.2. Каталитические параметры многоточечных мутантных TvDAAO в реакции с цефалоспорином C	109
4.8.3. Температурная стабильность многоточечных мутантных TvDAAO	110
4.8.4. Стабильность к действию H ₂ O ₂ многоточечных мутантных TvDAAO	111
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
6. ВЫВОДЫ	116
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	117

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

FAD	- флавинадениндинуклеотид
DAAO	- оксидаза D-аминокислот
OpaDAAO	- оксидаза D-аминокислот из дрожжей <i>Ogataea parapolymorpha</i>
TvDAAO	- оксидаза D-аминокислот из дрожжей <i>Trigonopsis variabilis</i>
RgDAAO	- оксидаза D-аминокислот из дрожжей <i>Rhodotorula gracilis</i>
pkDAAO	- оксидаза D-аминокислот из почки свиньи
hDAAO	- оксидаза D-аминокислот из человека
ApDAAO	- оксидаза D-аминокислот из <i>Arthrobacter protophormiae</i>
CbDAAO	- оксидаза D-аминокислот из дрожжей <i>Candida boidinii</i>
ChDAAO	- оксидаза D-аминокислот из гепатопанкреаса карпа
ceDAAO	- оксидаза D-аминокислот из нематоды <i>Caenorhabditis elegans</i>
NhyDAAO	- оксидаза D-аминокислот из бактерии <i>Natronosporangium hydrolyticum</i>
NhaDAAO	- оксидаза D-аминокислот из археи <i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i>
GthDAAO	- оксидаза D-аминокислот из бактерии <i>Gandjariella thermophila</i>
RraDAAO	- оксидаза D-аминокислот из бактерии <i>Rubrobacter radiotolerans</i>
FADP	- флавинадениндинуклеотидфосфат
ИПТГ	- изопропил- β -D-тиогалактопиранозид
ПХ	- пероксидаза из корней хрена
ОДН	- орто-дианизидин
БСА	- бычий сывороточный альбумин
СРС	- цефалоспорин С
ВЭЖХ	- высокоэффективная жидкостная хроматография
7-АЦК	- 7-аминоцефалоспоровая кислота
α -кетoadипил -7-АЦК	- α -кетoadипил-7-аминоцефалоспоровая кислота
глутарил-7- АЦК	- глутарил-7-аминоцефалоспоровая кислота
PDB	- база данных белковых структур (Protein Data Bank)
GLA	- глутарил-7-АЦК ацилаза
GOX	- глицинооксидаза
KPB	- калий-фосфатный буфер

1. ВВЕДЕНИЕ

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 цефалоспоринона C, которая является прекурсором для полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков различных поколений. Также стоит отметить синтез α 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 ДААО имеют разные рН-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 цефалоспориноса С – наиболее значимого промышленного процесса с использованием ДААО.

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 — TvДААО и RgДААО, 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 цефалоспорина C, 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 ДААО. 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. parapolyomorpha* 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 ДААО 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 C 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-аминоцефалоспориновой 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 ОраДААО обладают уникальными спектрами субстратной специфичности, что обуславливается строением их активных центров.
2. Добавление стадии структурного анализа к биоинформационному поиску по гомологии позволяет однозначно идентифицировать ДААО 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 TvДААО имеет аддитивный эффект и приводит к одновременному улучшению каталитических параметров фермента в реакции с цефалоспорином С, 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.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Общие сведения об оксидазе D-аминокислот

2.1.1. Общие сведения

Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) — это фермент класса флавопротеинов, специфично окисляющий D-аминокислоты в соответствующие альфа-кетокислоты с образованием пероксида водорода и иона аммония. Данный фермент содержит флавинадениндинуклеотид (FAD) в активном центре в качестве кофактора, также имеет кислородный канал, по которому молекулы кислорода попадают в активный центр. Отличительной структурной особенностью данного фермента является наличие укладки по Россману во флавинадениндинуклеотид-связывающем домене [1].

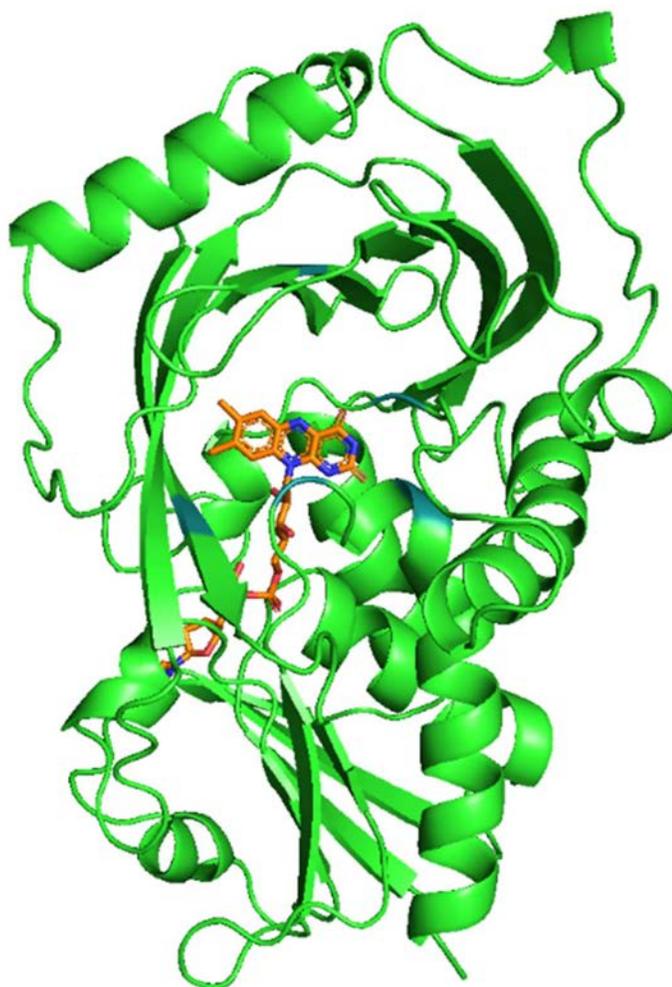


Рис. 2.1. Модельная структура OpaDAAO1.

Впервые оксидаза D-аминокислот была обнаружена и первично охарактеризована Хансом Кребсом в 1935 году в ходе экспериментов по изучению экстрактов из почек свиньи [2]. С тех пор ДААО стала важным модельным объектом для ферментов класса флавопротеинов и активно используется в биотехнологических процессах.

Ферменты класса флавопротеинов объединяют следующие свойства: они используют кислород в окислительно-восстановительной реакции и окисляют субстрат с помощью молекулы флавинадениндинуклеотида или альтернативных кофакторов [3].

В биотехнологических процессах оксидаза D-аминокислот наиболее широко известна в качестве биокатализатора, применяющегося в двухферментном процессе получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты из цефалоспорина C. В данном процессе ДААО катализирует первую стадию – получение глутарил-7-аминоцефалоспоровой кислоты (глутарил-7-АЦК) из цефалоспорина C, который является производным D-аминокислоты. Вторую стадию процесса - получение 7-АЦК из глутарил-7-АЦК катализирует второй фермент глутарил-7-АЦК ацилаза (GLA). Также оксидаза D-аминокислот используется для получения альфа-кетокислот из различных D-аминокислот, получения чистых L-аминокислот из рацематной смеси, аналитического определения D-аминокислот и во многих других областях. Дрожжевые оксидазы D-аминокислот наиболее часто используются в промышленности благодаря их высокой активности и температурной стабильности [4].

Биологическая роль ДААО не до конца изучена, считается, что ДААО в микроорганизмах выполняет функцию катаболизма D-аминокислот, а в животных может выполнять и регуляторную функцию, отвечая за метаболизм гормонов и нейромедиаторов [5].

2.1.2. Оксидазы D-аминокислот из различных организмов

Гены, кодирующие оксидазы D-аминокислот, были обнаружены в геноме организмов из всех царств. Наиболее изученными являются ДААО из дрожжей, так как они обладают наилучшими каталитическими параметрами и находят

непосредственное практическое применение. Также активно изучается DAAO человека, так как она играет важную роль в метаболизме нейромедиатора D-серина – коагониста N-метил-D-аспартат (NMDA) рецепторов [114]. Регуляция ее активности имеет непосредственное медицинское значение, поэтому поиск ее ингибиторов является важной задачей для фармацевтики. Было установлено, что пониженный уровень D-серина коррелирует с развитием шизофрении, а повышенный уровень D-серина наблюдается при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) [6]. Также были охарактеризованы оксидазы из гепатопанкреаса карпа (ChDAAO) [7], нематоды *Caenorhabditis elegans* (ceDAAO) [8] и других организмов.

Особое внимание стоит уделить оксидазам D-аминокислот из микроорганизмов. DAAO были найдены как в бактериях, так и в дрожжах. В бактериях с помощью биоинформатического анализа было найдено более 200 генов, предположительно кодирующих оксидазы D-аминокислот, однако только 11 из них обладают значительной идентичностью аминокислотных последовательностей с дрожжевыми DAAO (в диапазоне от 25 до 31%) [9]. В основном данные гены находятся в грамположительных актинобактериях, так как клеточная стенка бактерий содержит производные D-аланина и D-глутамата, которые DAAO способна окислять, разрушая тем самым клеточную стенку. Также пероксид водорода, который является побочным продуктом реакции DAAO, является токсичным для бактерий из-за отсутствия у них пероксисом для безопасной утилизации высокоактивных форм кислорода (ROS). Поэтому в бактериях для метаболизма D-аминокислот чаще всего встречается FAD-содержащая дегидрогеназа D-аминокислот, которая способна метаболизировать D-аминокислоты без участия кислорода. На данный момент выделены и изучены всего три бактериальные оксидазы: DAAO из актинобактерий *Arthrobacter protophormiae* (ApDAAO) [10], *Rubrobacter xylanophilus* (RxDAAO) [11] и *Streptomyces coelicolor* (ScDAAO) [12].

В эукариотах DAAO встречается намного чаще. Гены, предположительно кодирующие оксидазы D-аминокислот, были найдены почти во всех секвенированных геномах дрожжей. Ферментативная активность DAAO была обнаружена и описана в следующих видах дрожжей: *Rhodotorula gracilis* [13],

Trigonopsis variabilis [14], *Hansenula polymorpha* [15], *Fusarium solani* [16], *Candida boidinii* [17], *Fusarium oxysporum* [18] и *Rasamsonia emersonii* [19].

Столь обширное присутствие ДААО в дрожжах объясняется наличием у них особой органеллы – пероксисомы, в которой могут происходить окислительные процессы с образованием высокоактивных форм кислорода без ущерба для микроорганизма. В структуре дрожжевых ДААО часто присутствует специальная сигнальная последовательность – PTS1 (Ser-(Lys/His/Arg)-Leu), которая связывается с рецепторами, отвечающими за доставку ферментов в пероксисомы. При экспрессии оксидазы D-аминокислот количество и размер пероксисом в дрожжах увеличивается. Это было показано на примере дрожжей *Rhodotorula gracilis* [20] и *Candida boidinii* [15]. Однако не все дрожжевые оксидазы D-аминокислот обладают пероксисомальной сигнальной последовательностью и было обнаружено, что ДААО могут проявлять активность и в цитозоле (на примере дрожжей *Candida boidinii* и *Hansenula polymorpha*) [17]. Экспрессия ДААО индуцируется D-аминокислотами, причем для разных генов наилучшие индукторы отличаются. Например, для ДААО из дрожжей *T. variabilis* лучшими индукторами являются D,L-Met, D,L-Ala, D,L-Leu и D,L-Val, а также индукция может вызываться синтетическими D-аминокислотами, которые не метаболизируются [21].

2.1.3. Биологическая роль оксидазы D-аминокислот

Биологическая роль оксидаз D-аминокислот очень разнообразна и отличается в разных организмах. Чем сложнее организм, тем более разноплановые роли имеют ДААО. Считается, что в микроорганизмах ДААО выполняет функцию метаболизма D-аминокислот, использование их в качестве источника азота и иногда углерода. В млекопитающих же ДААО выполняет чаще регуляторную функцию, отвечая за метаболизм гормонов и нейромедиаторов, которые представляют собой D-аминокислоты [4].

Изменения уровней D-аминокислот имеют большое влияние на организм в целом. Например, было показано, что выключение гена *daao* и повышение концентрации D-аминокислот в тканях мозга мышей улучшают пространственное обучение. Был проведен эксперимент по сравнению скорости обучения мышей с

нокаутом гена *daao* с обычными мышами в лабиринте Морриса, который является тестом на пространственное мышление и память у грызунов. Было обнаружено, что мыши с нокаутом гена *daao* имеют преимущество в данном тесте по сравнению с обычными мышами, что может свидетельствовать о более высокой скорости пространственного обучения [22].

Наиболее активно изучаемой ролью DAAO в млекопитающих является регуляция уровня D-серина. Данная D-аминокислота является нейромедиатором, нейромодулятором рецепторов N-метил-D-аспартат (NMDA) в мозгу. Оксидаза D-аминокислот у человека имеет белок-активатор G72, который регулирует ее активность. Было показано, что мутации в гене данного белка и в гене DAAO коррелируют с развитием шизофрении. Повышение уровня экспрессии белка-активатора G72 приводит к повышению активности DAAO, что в свою очередь приводит к понижению уровня D-серина и, соответственно, активности NMDA-рецепторов, которые выполняют множественные функции в нейронах [23].

Помимо шизофрении нарушения активности DAAO связывают с болезнью Альцгеймера, так как повышенный уровень D-Ala в сером веществе и спинномозговой жидкости коррелирует с развитием этой болезни [24].

Важной физиологической ролью DAAO является регуляция секреции гормонов. Одним из важнейших регуляторов секреции гормонов в млекопитающих является D-аспартат. Данная D-аминокислота регулирует секрецию мелатонина, пролактина, тестостерона, лютеинизирующего гормона и гормона роста. Соответственно, нарушения его метаболизма могут приводить к большому количеству разнообразных заболеваний. Также было показано, что D-аспартат накапливается с возрастом в хрящевой ткани, дентине и белом веществе, что может использоваться в качестве возрастного маркера [91-93].

Была установлена статистически значимая корреляция между уровнем D-Phe в моче беременных женщин и развитием у них гестационного сахарного диабета. Исследования проводились с помощью метода газовой хроматографии и масс-спектрометрии, и каузация данного механизма не была установлена, однако эти данные можно использовать для медицинского анализа и ранней диагностики сахарного диабета у беременных женщин [111].

DAAO способна метаболизировать неканоничные D-аминокислоты в живых организмах. Одним из примеров является нитроаргинин. Данное вещество является ингибитором NO-синтетазы – регулятора артериальной гипертензии. Нитроаргинин существует в клетке в виде смеси L- и D-изомеров: изначально синтезируется нитро-D-аргинин, который затем превращается в биологически активный L-изомер. Данный процесс обеспечивается в том числе и с помощью оксидазы D-аминокислот [94].

Также DAAO предположительно является компонентом антибактериальной системы в нейтрофилах, метаболизирует экзогенные D-аминокислоты в печени и участвует в синтезе пептидных гормонов. Предполагается, что DAAO участвует в метаболизме D-тиазолин-2-карбоксиловой кислоты в печени млекопитающих, которая является частью внутриклеточной сигнальной системы для различных гормонов [25].

В случае немлекопитающих одной из интересных ролей DAAO является регуляция осмотического давления у ракообразных и двустворчатых моллюсков. Было показано, что в условиях солевого стресса, у данных типов организмов в тканях накапливается D-аланин [26].

Таблица 2.1.

Биологическая роль ДААО в различных организмах [5].

Организм	Предполагаемая роль
Бактерии	Использование D-аминокислот в качестве источника углерода, азота и энергии. Удаление избыточных количеств D-аминокислот;
Грибы	Использование D-аминокислот в качестве источника углерода, азота и энергии. Также в качестве источника серы; Защитная роль против токсичного эффекта ароматических D-аминокислот;
Беспозвоночные	Детоксикация полициклических ароматических углеводородов; Биосинтез глазного пигмента; Регуляция осмотического давления с помощью D-аланина; Окисление D-тиазолин-4-карбоксилата в D-люциферин у светлячков;
Рыбы	Метаболизация D-аминокислот;
Птицы	Обеспечение адсорбции D-метионина в кишечнике;
Млекопитающие	Модуляция функциональности NMDA-рецепторов через метаболизм D-серина; Переработка D-аминокислот в печени; Регуляция секреции гормонов через метаболизм D-аспаратат; Регуляция артериальной гипертензии через метаболизм нитро-D-аргинина; Регуляция внутриклеточного уровня оксалата путем окисления D-тиазолидин-2-карбоксиловой кислоты; Компонент антибактериальной системы в нейтрофилах; Участие в синтезе пептидных гормонов.

2.1.4. Практическое применение оксидазы D-аминокислот

Оксидаза D-аминокислот находит очень широкое применение в различных областях человеческой деятельности. В первую очередь стоит отметить, конечно же, промышленное применение оксидазы D-аминокислот для получения 7-аминоцефалоспоровой кислоты, о чем уже было упомянуто ранее.

Ежегодное производство 7-АЦК составляет более 2000 тонн и общий рынок насчитывает более 400 миллионов долларов США [65]. 7-АЦК является прекурсором множества цефалоспориновых антибиотиков различных поколений

включая цефотаксим, цефтриаксон, цефазолин, цефоперазон, цефиксим и др. Общий рынок антибиотиков и антимикробных препаратов оценивается в более 24 миллиардов долларов США, из них половина приходится на бета-лактамы. Изначально 7-АЦК получали с помощью органического синтеза, но этот процесс оказался малоэффективен, не экологичен и получаемый продукт содержал большое количество примесей (до 30%) [27]. Поэтому на смену ему в 1990-х годах был разработан биокаталитический метод. Для получения 7-АЦК из цефалоспорина С используют двухферментную систему из оксидазы D-аминокислот и глутарил-7-АЦК ацилазы. На первой стадии процесса цефалоспорин С окисляется DAAO до α -кетoadипил-7-АЦК, которая далее за счет реакции с пероксидом водорода (продукт первой ферментативной реакции) декарбоксилируется до глутарил-7-АЦК. На второй же стадии глутарил-7-АЦК гидролизуется до 7-аминоцефалоспорованой кислоты глутарил-7-АЦК ацилазой. Полная схема данного процесса представлена ниже на рис. 2.2.

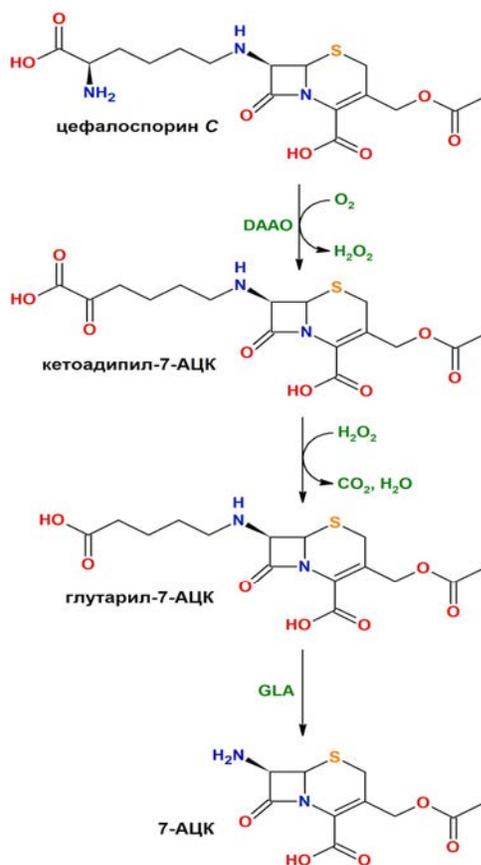


Рис. 2.2 Биокаталитическая схема синтеза 7-аминоцефалоспорованой кислоты.

Данный метод позволил снизить стоимость производства 7-аминоцефалоспоровановой кислоты почти в два раза, а количество неэкологичных отходов производства (в первую очередь потребление органических растворителей) снизилось более чем в 200 раз [28].

Однако данный биотехнологический процесс нуждается в дальнейшей оптимизации. Одной из составляющих стоимости производства является стоимость используемых биокатализаторов на единицу продукта. Данную проблему можно решить несколькими способами: увеличить выход биокатализатора при культивировании штаммов-продуцентов и снизить стоимость его производства или же создать более активный и более стабильный биокатализатор, который можно будет использовать в меньших количествах и более продолжительное время при сохранении объемов выхода продукта.

Помимо синтеза 7-АЦК ДААО используется при получении чистых энантиомеров различных аминокислот. Ярким примером служит получение энантиомеров β -разветвленных α -аминокислот. Данный тип аминокислот может принимать различные ригидные формы и используется в качестве искусственных ингибиторов различных ферментов и антагонистов рецепторов. Оксидаза D-аминокислот используется для дерацемизации продуктов после неселективного синтеза и стереоинверсии β - и γ -заместителей α -аминокислот. Такой метод позволяет добиться более высоких выходов по сравнению с хиральным синтезом [34].

Недавно был предложен биокаталитический способ синтеза L-Эритрулозы с использованием каскада трех иммобилизованных вместе ферментов: ДААО, каталазы и транскетолазы (рис. 2.3.) [63].

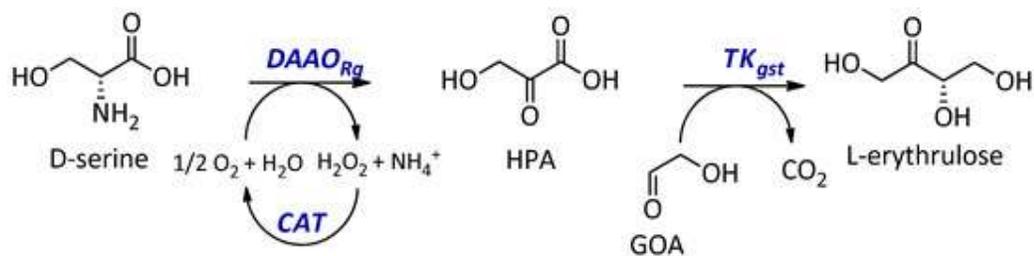


Рис. 2.3. Схема синтеза L-эритрулозы из D-Ser и гликолевого альдегида с использованием каскада ферментов.

Другим примером использования ДААО в синтезе хиральных соединений является синтез L-6-гидроксинорлейцина. L-6-гидроксинорлейцин – это прекурсор ингибиторов вазопептидазы, ангиотензинпревращающего фермента (Омапатрилата), сидерофоров, индоспицина и аналогов пептидных гормонов. Данный препарат синтезируется органическим способом с дальнейшим ферментативным разделением рацематной смеси. Для удаления D-изомера из рацематной смеси используется оксидаза D-аминокислот [35][96].

Кроме синтеза различных соединений ДААО используется для детекции и определения концентрации D-аминокислот в различных условиях. Можно выделить две основные сферы применения ДААО: пищевая промышленность и медицина. В пищевой промышленности ДААО используется для контроля процесса ферментации и детекции бактериального заражения. Так как клеточная стенка бактерий состоит из пептидогликанов, включающих в себя D-аминокислоты, определение свободных D-аминокислот, в первую очередь D-аланина, может являться маркером бактериального лизиса. Одним из примеров биосенсора на основе ДААО, который используется в пищевом производстве, является биосенсор, на основе двухферментной системы ДААО-пируват оксидаза для специфичного определения D-аланина для мониторинга процесса ферментации. Определение концентрации D-аланина осуществляется путем определения изменения концентрации кислорода в реакционной смеси с помощью кислородного электрода, так как и оксидаза D-аминокислот, и пируват-оксидаза используют молекулярный кислород в качестве второго субстрата [36].

В медицине оксидаза D-аминокислот, в основном, используется для двух целей: контроль энантиомерной чистоты стереоселективных лекарственных препаратов и определение уровня D-аминокислот в физиологических жидкостях. Контроль за энантиомерной чистотой препаратов очень важен, так как часто только один из изомеров обладает терапевтическими свойствами. Одним из примеров применения оксидазы D-аминокислот в этой области является контроль за энантиомерной чистотой препарата для лечения нарушений функций щитовидной железы - L-T₄ ((+)-3,3',5,5'-тетрадиодо-L-тиронин). Данный препарат выполняет роль прогормона для L-T₃, в то время как его энантиомер D-T₄, который является

побочным продуктом реакции синтеза L-T₄, не проявляет никакой активности в щитовидной железе. Поэтому для контроля чистоты получаемого препарата используются биосенсоры на основе оксидазы D-аминокислот [37].

Также биосенсоры на основе DAAO используются для детектирования D-пипеколовой кислоты, которая является маркером цирроза печени и хронической печеночной энцефалопатии [38].

Необычный способ применения DAAO был предложен для детекции активности гидролаз, способных дефосфорилировать флавинадениндинуклеотид-фосфат (FADP). Данный способ основан на использовании апо-формы DAAO (формы без кофактора FAD), которая, взаимодействуя с кофактором, приобретает детектируемую ферментативную активность. Таким образом, можно детектировать образование свободного FAD из FADP в результате реакции алкалинфосфатазы и других гидролаз [39].

В настоящее время активно ведутся разработки антиопухолевых препаратов с использованием DAAO. Механизм действия этих препаратов основан на побочном продукте реакции, катализируемой DAAO, - пероксиде водорода. Данный агент является высокоактивной формой кислорода и обладает цитотоксичным действием [123, 124]. Антиопухолевый эффект DAAO был продемонстрирован во многих работах: с помощью конъюгата ПЭГ-рkDAAO [125], на наночастицах Fe₃O₄-3-амино-пропилтриэтоксисилан-DAAO [126], химерного белка DAAO-N-ацетилмурамоил-L-аланин амидаза на магнитных наночастицах для адресной доставки конъюгата непосредственно в раковые клетки [118, 119] и некоторых других.

Даже небольшое рассмотрение областей применения DAAO в данной главе свидетельствует, что большое разнообразие вариантов практического применения оксидаз D-аминокислот создает спрос на изучение и получение новых форм DAAO с более подходящими под конкретные процессы свойствами.

2.1.5. Белковая инженерия оксидазы D-аминокислот

Активно ведутся работы по белковой инженерии DAAO для улучшения ее свойств в практически значимых биокаталитических процессах. Работы ведутся как

в направлении улучшения каталитических параметров, так и для повышения ее стабильности.

Одним из способов значительного повышения стабильности ферментов является иммобилизация. Данный способ был опробован и на оксидазах D-аминокислот. Одной из главных работ в этой области является иммобилизация фермента DAAO из дрожжей *R. gracilis* (RgDAAO) на глиоксил-агарозе, которая привела к более чем 15000 кратному увеличению температурной стабильности фермента. Это объясняется в первую очередь стабилизацией димерной формы RgDAAO в ходе иммобилизации [29]. Стоит отметить, что в случае DAAO из дрожжей *T. variabilis* эффект оказался значительно меньше при иммобилизации на различных носителях. Для RgDAAO также были проведены эксперименты по иммобилизации на различных наноматериалах: наночастицах диоксида кремния, наноматериалах MCF, SBA-15 и MCM-41. Активность и стабильность иммобилизованных вариантов DAAO уменьшалась в ряду: MCF > SBA-15 > MCM-41 [30].

Однако иммобилизация часто приводит к значительному уменьшению активности ферментов. В случае оксидаз D-аминокислот это происходит за счет ухудшения диффузии кислорода к активному центру фермента. Данная проблема актуальна и для нативного фермента. Один из способов решения данной проблемы заключается в получении химерного белка DAAO-гемоглобин, что увеличивает локальную концентрацию молекулярного кислорода в окрестностях фермента за счет связывания кислорода с гемоглобином. Данный способ был продемонстрирован на примере RgDAAO и гемоглобина из бактерии *Vitreoscilla*, в результате чего активность DAAO увеличилась в 12,5 раз [31]. Аналогичный эксперимент был проведен и с TvDAAO, что привело к увеличению ее активности в реакции с цефалоспорином C более чем в два раза [95]. Другой способ получения более активного фермента – белковая инженерия, в первую очередь мутагенез его остатков с целью улучшения связывания кислорода. Данная работа была выполнена на примере RgDAAO методом направленной эволюции, что привело к более чем десятикратному увеличению каталитической константы по кислороду [32].

Альтернативным методом улучшения свойств фермента для определенного технологического процесса является генетическая инженерия. В нашей лаборатории проводились многолетние эксперименты по изучению взаимосвязи структура-функция TvDAAO и были найдены замены, приводящие к значительному улучшению свойств фермента в реакции окисления цефалоспорина *C*, как каталитических параметров, так и температурной и химической стабильности. Наиболее интересными для практического применения оказались остатки: Phe258, Phe54, Cys108, Ser67, Ser105, Met104, Glu32, Phe33 [113].

Остаток Phe258 располагается у входа в активный центр TvDAAO и является конформационно-подвижным, что делает его похожим на «крышку», регулирующую доступ субстрата в активный центр. Были сделаны замены этого остатка на Ala и Ser, которые являются более мелкими остатками и соответственно расширяют вход в активный центр для крупных субстратов вроде цефалоспорина *C*. Это привело к изменению спектра субстратной специфичности фермента, потере активности с небольшими субстратами D-Ala и D-Ser, и улучшению каталитических параметров с D-Phe, D-Tyr и D-Leu – субстратами с объемными боковыми радикалами. Однако каталитические параметры в реакции с цефалоспорином *C* практически не изменились [129].

Другим исследованным остатком был остаток Phe54, находящийся непосредственно в активном центре и участвующий в связывании боковой группы субстрата. Замены этого остатка на Ala, Ser и Tyr привели к беспрецедентному улучшению каталитических параметров по цефалоспорину *C*. Предполагается, что это связано с расширением объема активного центра и лучшим связыванием больших боковых радикалов [102].

Еще одним каталитически важным остатком, роль которого была изучена, является Cys108. Окисление данного остатка приводит к значительному ухудшению активности и стабильности TvDAAO. Были получены мутантные формы TvDAAO с заменами Cys108Ala, Cys108Ser, и Cys108Phe. Замена цистеина на серин привела к ухудшению каталитических параметров и температурной стабильности. Замены цистеина на аланин и фенилаланин, напротив, привели к улучшению

каталитических параметров в реакциях с субстратами с объемными боковыми радикалами, а также улучшили термостабильность [130-131].

Была проведена работа по гидрофобизации альфа-спиралей в TvDAAO. В рамках этой работы остатки Ser, находящиеся в альфа-спиралях, были заменены на гидрофобные остатки Ala. В случае двух мутантов Ser67Ala и Ser105Ala это привело к улучшению температурной стабильности фермента [103].

Аминокислотные остатки Glu33 и Phe33 находятся в FAD-связывающем домене и влияют на связывание кофактора FAD. Была проведена масштабная работа по поиску замен, которые бы приводили к лучшему связыванию FAD, что соответственно влияло бы на температурную стабильность фермента. По результатам этой работы выяснилось, что только двойная замена Glu32Arg/Phe33Asp приводит к значительному улучшению связывания кофактора [103].

Была подробно изучена роль остатков Met для температурной и химической стабильности TvDAAO. Наиболее интересными оказались два остатка Met104 и Met156. Первый остаток был подробно изучен, были получены замены Met104Phe, Met104Tyr и Met104Trp, которые привели к стабилизации фермента, а также повлияли на его субстратную специфичность. Активность с аминокислотами с объемными боковыми радикалами ухудшилась, но значительно выросла активность с D-Ser. В случае Met156 была сделана замена этого остатка на инертный, но похожий по размерам остаток Leu, что привело к очень значительному росту температурной стабильности TvDAAO [113].

2.1.6. Первичная структура и олигомерный состав

Оксидазы D-аминокислот имеют низкие показатели идентичности аминокислотных последовательностей, поэтому поиск новых оксидаз является достаточно сложной научной задачей. Имеется два подхода к решению данной задачи: биоинформатический и экспериментальный. Биоинформатический подход заключается в поиске генов по гомологии последовательностей с генами уже известных DAAO и анализ консервативных участков, соответствующими оксидазам D-аминокислот, по базе секвенированных геномов. Экспериментальный подход

заключается в выращивании микроорганизмов на средах с D-аминокислотами и скрининге оксидазной активности.

Консервативными для оксидаз D-аминокислот участками являются: укладка по Россману FAD-связывающего домена и высококонсервативные аминокислотные остатки, отвечающие за каталитическую активность. Также у дрожжевых оксидаз D-аминокислот часто встречается пероксисомальная сигнальная последовательность PTS1 (Ser-(Lys/His/Arg)-Leu), которая отвечает за транспорт фермента в пероксисомы, так как в результате реакции, которую катализирует DAAO, выделяется пероксид водорода, являющийся высокоактивной формой кислорода. Средняя длина гена дрожжевой DAAO составляет 900–1200 пар нуклеотидов [1].

Олигомерный состав многих DAAO зависит от концентрации фермента и не является фундаментальной характеристикой фермента. Для фермента из дрожжей *T. variabilis* было установлено, что он может находиться как в димерной, так и в тетрамерной форме при больших концентрациях [40, 41]. DAAO из почек свиньи может быть как мономером, так и димером. Человеческая оксидаза D-аминокислот всегда находится в димерной форме, хотя степень идентичности между ней и ркDAAO составляет 84% [42]. Дрожжевая RgDAAO аналогично всегда существует только в димерной форме [43]. Оксидаза из дрожжей *R. emersonii* кристаллизовалась в форме тетрамера [44].

2.1.7. Третичная структура и механизм действия

Оксидаза D-аминокислот является модельным ферментом для всего класса FAD-зависимых оксидаз, поэтому изучение ее структуры и механизма действия имеет особую значимость. Несмотря на появление программ, способных с высокой точностью предсказывать структуры ферментов (Alpha Fold-2, Rosetta Fold), получение экспериментальной структуры все равно сохраняет свою значимость. На данный момент экспериментально получены структуры 5 оксидаз D-аминокислот. Структура ркDAAO была решена первой в 1996 году с разрешением 2.6 Å (PDB ID: 1KIF) [45]. Структура RgDAAO была решена в 2000 году (PDB ID: 1C0K, 1C0L и 1C0P) [46]. Данная структура чаще всего используется в качестве модельной для

Таблица 2.2

Структуры оксидаз D-аминокислот, аннотированные в PDB на апрель 2023 года.

PDB ID	Год	Разрешение	Фермент	Описание*	Ссылка
1KIF	1996	2,6 Å	pkDAAO	D-amino acid oxidase from pig kidney	[45]
1DAO	1997	3,2 Å	pkDAAO	Covalent adduct of D-amino acid oxidase from pig kidney with 3-methyl-2-oxo-valeric acid	[47]
1DDO	1997	3,1 Å	pkDAAO	Reduced D-amino acid oxidase from pig kidney in complex with imino-Trp	[47]
1AN9	1997	2,5 Å	pkDAAO	D-amino acid oxidase complex with <i>o</i> -aminobenzoate	[48]
1EVI	2000	2,5 Å	pkDAAO	Three-dimensional structure of the purple intermediate of porcine kidney D-amino acid oxidase	[49]
1C0K	2000	1,46 Å	RgDAAO	Crystal structure analysis of D-amino acid oxidase in complex with L-lactate	[46]
1C0L	2000	1,73 Å	RgDAAO	D-amino acid oxidase: structure of substrate complexes at very high resolution reveal the chemical reaction mechanism of flavin dehydrogenation	[46]
1C0P	2000	1,2 Å	RgDAAO	D-amino acid oxidase in complex with D-alanine and a partially occupied biatomic species	[46]
1C0I	2002	1,9 Å	RgDAAO	Crystal structure of D-amino acid oxidase in complex with two anthranilate molecules	[50]
1VE9	2004	2,5 Å	pkDAAO	Porcine kidney D-amino acid oxidase	[51]
2DU8	2006	2,5 Å	hDAAO	Crystal structure of human D-amino acid oxidase	[52]
2E48	2007	2,9 Å	hDAAO	Crystal structure of human D-amino acid oxidase: substrate-free holoenzyme	[53]
2E49	2007	3,2 Å	hDAAO	Crystal structure of human D-amino acid oxidase in complex with imino-serine	[53]

2E4A	2007	2,6 Å	hDAAO	Crystal structure of human D-amino acid oxidase in complex with o-aminobenzoate	[53]
2E82	2007	2,7 Å	hDAAO	Crystal structure of human D-amino acid oxidase complexed with imino-DOPA	[53]
3CUK	2008	2,49 Å	hDAAO	Crystal structure of human D-amino acid oxidase: bound to an inhibitor	[54]
3G3E	2009	2,2 Å	hDAAO	Crystal structure of human D-amino acid oxidase in complex with hydroxyquinolin-2(1H)	[55]
3ZNN	2013	1,9 Å	hDAAO	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> inhibition of human D-amino acid oxidase: regulation of D-serine concentration in the brain	[56]
3ZNO	2013	2,3 Å	hDAAO	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> inhibition of human D-amino acid oxidase: regulation of D-serine concentration in the brain	[56]
3ZNP	2013	2,4 Å	hDAAO	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> inhibition of human D-amino acid oxidase: regulation of D-serine concentration in the brain	[56]
3ZNQ	2013	2,75 Å	hDAAO	<i>In vitro</i> and <i>in vivo</i> inhibition of human D-amino acid oxidase: regulation of D-serine concentration in the brain	[56]
3W4I	2013	2,5 Å	hDAAO	Crystal structure of human DAAO in complex with compound 8	[57]
3W4J	2013	2,74 Å	hDAAO	Crystal structure of human DAAO in complex with compound 12	[57]
3W4K	2013	2,86 Å	hDAAO	Crystal structure of human DAAO in complex with compound 13	[57]
3WGT	2014	1,88 Å	pkDAAO	Crystal structure of D-amino acid oxidase mutant	[58]
4QFC	2014	2,4 Å	hDAAO	Co-crystal structure of compound 3 (4-hydroxy-6-[2-(7-hydroxy-2-oxo-4-phenyl-2h-chromen-6-yl)ethyl]pyridazine-3(2h)-one) and FAD bound to human DAAO at 2.4Å	[59]
4QFD	2014	2,85 Å	hDAAO	Co-crystal structure of compound 2 (3-(7-hydroxy-2-oxo-4-phenyl-2H-	[59]

				chromen-6-yl)propanoic acid) and FAD bound to human DAAO at 2,85 Å	
4YJF	2016	2,2 Å	pkDAAO	Crystal structure of DAAO (Y228L/R283G) variant (<i>S</i> -methylbenzylamine binding form)	--**
4YJG	2016	2,5 Å	pkDAAO	Crystal structure of DAAO (Y228L/R283G) variant (<i>R</i> -3-amino 1-phenylbutane binding form)	--
4YJH	2016	2,7 Å	pkDAAO	Crystal structure of DAAO (Y228L/R283G) variant (<i>R</i> -2-phenylpyrrolidine binding form)	--
5WWV	2018	3,2 Å	pkDAAO	Crystal structure of porcine kidney D-amino acid oxidase mutant (I230A/R283G)	--
5WX2	2018	3 Å	pkDAAO	Crystal structure of porcine kidney D-amino acid oxidase mutant (I230A/R283G)	--
5ZJ9	2018	2,6 Å	hDAAO	human D-amino acid oxidase complexed with 5-chlorothiophene-3-carboxylic acid	[60]
5ZJA	2018	2,6 Å	hDAAO	human D-amino acid oxidase complexed with 5-chlorothiophene-2-carboxylic acid	[60]
7CT4	2020	2,0 Å	ReDAAO	Crystal structure of D-amino acid oxidase from <i>R. emersonii</i> strain YA	[44]
7U9S	2022	2,1 Å	hDAAO	Crystal structure of human D-amino acid oxidase in complex with inhibitor	[112]
7U9U	2022	1,66 Å	hDAAO	Crystal structure of human D-amino acid oxidase in complex with inhibitor	[112]
8HY5	2023	2,1 Å	hDAAO	Structure of D-amino acid oxidase mutant R38H	--**

*Описание соответствует заголовку структур с сайта www.rcsb.org

**Публикация на момент написания отсутствует

дрожжевых DAAO. Структура другой известной дрожжевой оксидазы - TvDAAO, была решена в нашей лаборатории в 2007 году с разрешением 1.8 Å. На данный момент никому больше не удалось получить структуру данного фермента. В 2020 году была получена структура новой дрожжевой оксидазы ReDAAO с разрешением 2.0 Å (PDB ID: 7CT4), что свидетельствует о непрекращающемся интересе к изучению структур дрожжевых DAAO [44]. Однако наиболее популярной

является человеческая оксидаза D-аминокислот (hDAAO). Было получено и опубликовано 20 структур hDAAO с различными ингибиторами. Изучение структур данного фермента с ингибиторами помогает в поиске лекарств для лечения заболеваний, вызванных нарушениями функций этого фермента.

Структура RgDAAO 1C0P с субстратом D-Ala является модельной для изучения активного центра DAAO. Можно выделить 5 аминокислотных остатков, непосредственно участвующих в связывании субстрата в активном центре DAAO. Остатки Arg285 и Tyr223 в RgDAAO отвечают за связывание карбоксильной группы D-аминокислоты, остатки Asn54 и Gln339 связывают аминогруппу через молекулу воды. Остаток Ser335 тоже участвует в связывании аминогруппы, но не является консервативным, так как связывание происходит за счет кислорода полипептидной цепи. Мы составили сравнительную таблицу данных остатков для наиболее изученных DAAO (таблица 2.3).

Таблица 2.3.

Остатки, участвующие в связывании карбоксильной и аминогруппы D-аминокислот в структурах RgDAAO, TvDAAO, pkDAAO, ReDAAO и hDAAO.

RgDAAO	TvDAAO	pkDAAO	hDAAO	ReDAAO
Arg285	Arg302	Arg283	Arg283	Arg308
Tyr223	Tyr243	Tyr228	Tyr228	Tyr244
Asn54	Asn50	Leu51	Leu51	Asn53
Gln339	Gln334	Thr317	Thr317	Gln339
Ser335	Gly330	Gly313	Gly313	Gln335

Как видно из таблицы, остатки Arg285 и Tyr223 являются высоко консервативными, остатки Asn54 и Gln339 отличаются в DAAO дрожжей и млекопитающих, причем остатки Leu51 и Thr317 связывают аминогруппу хуже, чем остатки в дрожжевых DAAO.

Остатки, отвечающие за связывание бокового радикала в оксидазах D-аминокислот, не являются консервативными и обеспечивают разную субстратную специфичность у различных DAAO.

Также важной частью структуры некоторых DAAO является петля, которая выполняет функцию крышки для активного центра и замедляет фермент-субстратный обмен. В случае рkDAAO, в структуре которого присутствует данная петля, было показано, что лимитирующей стадией процесса катализа является именно диссоциация продукта иминокислоты из активного центра [61].

Механизм действия оксидазы D-аминокислот основан на использовании кофактора FAD в качестве окислительно-восстановительного агента и протекает в две стадии: на первой стадии гидрид-ион отрывается от α C-атома субстрата и переносится на N(5)-атом изоаллоксазинового кольца FAD с образованием восстановленной формы FAD, на второй стадии происходит окисление восстановленной формы FAD молекулярным кислородом с образованием пероксида водорода (рис. 2.4.).

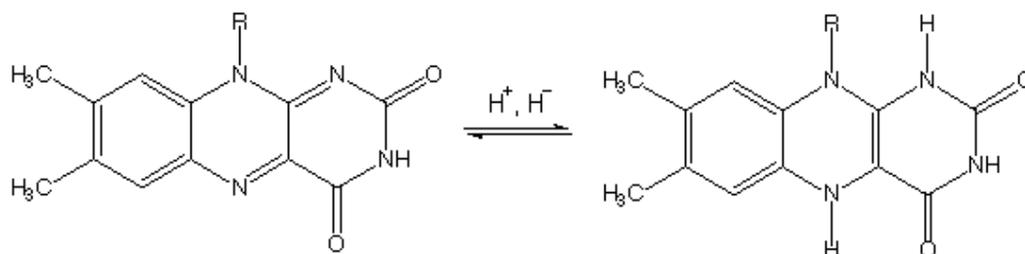


Рис. 2.4. Восстановление изоаллоксазинового цикла FAD.

2.2. Свойства оксидаз D-аминокислот из различных источников

2.2.1. Каталитические свойства

Сравнение свойств оксидаз D-аминокислот из различных источников является сложной задачей, так как в каждой лаборатории используются свои методики определения активности и условия проведения эксперимента. Однако, используя различные допущения, можно составить сравнительную таблицу каталитических параметров.

Мы собрали и проанализировали каталитические параметры наиболее изученных DAAO (табл. 2.4.1.-2.4.8.). Данные представлены для аминокислот

D-аланина, D-аспартата, D-глутамата, D-метионина, D-пролина и D-серина как наиболее изученных D-аминокислот. Максимальная скорость была преобразована в наблюдаемую каталитическую константу с использованием молекулярной массы 40 кДа как средней для большинства DAAO. Если в статье не было значений каталитической эффективности, мы пересчитывали их из констант Михаэлиса и наблюдаемых каталитических констант.

Таблица 2.4.1.

Каталитические параметры различных DAAO для D-аланина

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	83.3	0.8	102	[97]
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	81.3	1	81.3	[28]
ReDAAO	pH 8.0, 55°C	189	2.7	69.9	[19]
CbDAAO	pH 8.0, 30°C	117	4.28	27.4	[64]
pkDAAO	pH 8.3, 25°C	6.5	0.77	8.44	[99]
TvDAAO	pH 8.0, 30°C	109	17	6.54	[33]
hDAAO	pH 8.3, 25°C	5.5	0.9	6.11	[100]
pkDAAO	pH 8.5, 25°C	7.33	1.7	4.33	[28]
hDAAO	pH 8.3, 37°C	3.66	1.08	3.39	[8]
ceDAAO	pH 8.3, 37°C	14.9	6.89	2.17	[8]

Таблица 2.4.2.

Каталитические параметры различных DAAO для D-аспарагина

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
hDASPO	pH 8.3, 37°C	70.6	2.14	33	[8]
TdDASPO	pH 7.5, 60°C	123	8.77	14	[89]
ceDASPO-1	pH 8.3, 37°C	26.1	5.54	4.71	[8]
ceDASPO-2	pH 8.3, 37°C	9.49	4.2	2.26	[8]
ceDASPO-3	pH 8.3, 37°C	2.51	3.81	0.658	[8]
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	0.48	18	0.0267	[97]

Таблица 2.4.3.

Каталитические параметры различных DAAO для D-глутамата

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
TdDASPO	pH 7.5, 60°C	217	2.16	100	[89]
ceDASPO-1	pH 8.3, 37°C	35.4	1.06	33.4	[8]
ReDAAO	pH 8.0, 55°C	90.7	12.1	7.49	[19]
ceDASPO-2	pH 8.3, 37°C	3.01	0.8	3.76	[8]
ceDASPO-3	pH 8.3, 37°C	0.76	0.68	1.12	[8]
hDASPO	pH 8.3, 37°C	5.54	40	0.139	[8]
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	1	77.3	0.0133	[97]

Таблица 2.4.4.

Каталитические параметры различных DAAO для D-метионина

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
ReDAAO	pH 8.0, 55°C	120	0.213	562	[19]
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	76.7	0.2	425	[97]
TvDAAO	pH 8.0, 30°C	81	0.46	176	[33]
pkDAAO	pH 8.3, 25°C	6.83	0.65	10.5	[99]
CbDAAO	pH 8.0, 30°C	127	27.4	4.65	[64]

Таблица 2.4.5.

Каталитические параметры различных DAAO для D-фенилаланина

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
TvDAAO	pH 8.0, 30°C	27	0.37	73	[33]
pkDAAO	pH 8.3, 25°C	16.7	1.4	11.9	[99]
ceDAAO	pH 8.3, 37°C	25.1	2.72	9.21	[8]
hDAAO	pH 8.3, 37°C	9.89	2.59	3.82	[8]

Таблица 2.4.6.

Каталитические параметры различных DAAO для D-пролина

DAAO	Условия измерения	k_{cat}, c^{-1}	К_М, мМ	$k_{cat}/K_M, мМ^{-1}c^{-1}$	Источник
pkDAAO	pH 8.3, 25°C	10.3	0.56	18.5	[99]
hDAAO	pH 8.3, 25°C	15	1.7	8.82	[100]
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	77.3	21.5	3.6	[97]

Таблица 2.4.7.

Каталитические параметры различных DAAO для D-серина

DAAO	Условия измерения	k_{cat}, c^{-1}	К_М, мМ	$k_{cat}/K_M, мМ^{-1}c^{-1}$	Источник
CbDAAO	pH 8.0, 30°C	77.3	33.7	2.29	[64]
pkDAAO	pH 8.3, 25°C	3	3.3	0.909	[99]
hDAAO	pH 8.3, 25°C	2.83	3.6	0.787	[100]
TvDAAO	pH 8.0, 30°C	20	37	0.54	[33]
hDAAO	pH 8.3, 37°C	1.23	6.42	0.191	[8]
ceDAAO	pH 8.3, 37°C	1.51	20	0.075	[8]

Таблица 2.4.8.

Каталитические параметры различных DAAO для цефалоспорина C

DAAO	Условия измерения	k_{cat}, c^{-1}	К_М, мМ	$k_{cat}/K_M, мМ^{-1}c^{-1}$	Источник
pkDAAO	pH 8.5, 25°C	0.65	2.3	0.283	[66]
TvDAAO F54Y	pH 7.5 22 °C	36.7	4.8	7.83	[102]
TvDAAO	pH 7.5 22 °C	6.17	1.6	3.83	[102]
TvDAAO E32R/F33D/F54S/C1 08F/M156L/C298G	pH 8.0 30 °C	0.8	65	79	[33]
TvDAAO E32R/F33D/F54S/C1 08F/M156L	pH 8.0 30 °C	1.6	106	66	[33]
TvDAAO F54S/C108F/M156L	pH 8.0 30 °C	1.9	119	60	[33]

TvDAAO E32R/F33D/F54S/C1 08F/M156L/C298Q	pH 8.0 30 °C	1.4	68	50	[33]
TvDAAO E32R/F33D/F54S/C1 08F	pH 8.0 30 °C	1.9	88	45	[33]
TvDAAO E32R/F33D/F54S/C1 08F/M156L/C298N	pH 8.0 30 °C	2.9	121	42	[33]
TvDAAO C108A	pH 8.0, 30 °C	23	0.71	31.8	[103]
TvDAAO	pH 8.5, 25°C	71.7	2.4	29.8	[66]
TvDAAO C108F	pH 8.0, 30 °C	21	0.99	21.3	[103]
TvDAAO E32R/F33D/C108F	pH 8.0 30 °C	1.15	25.5	22	[33]
TvDAAO F54A	pH 7.5, 22 °C	18.3	1.2	15.7	[102]
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	73.3	4	18.3	[66]
TvDAAO F54S	pH 7.5 22 °C	16.7	0.9	18.3	[102]
TvDAAO	pH 8.0 30 °C	36	1.4	18	[33]
TvDAAO C108S	pH 8.0, 30 °C	10.8	5.6	1.9	[103]
TvDAAO	pH 8.0, 30 °C	19	2.6	7.2	[102]

Исходя из представленных данных видно, что дрожжевые оксидазы в среднем обладают большей каталитической эффективностью, чем DAAO из млекопитающих, с большинством из изученных субстратов. Также DAAO можно поделить на две группы, основываясь на их субстратной специфичности: одни DAAO проявляют наилучшую активность с небольшими неполярными субстратами, такими как D-аланин и D-метионин, вторые склонны к наибольшей активности с D-аминокислотами с большими гидрофобными боковыми радикалами. К первой группе относятся RgDAAO и ReDAAO, ко второй можно отнести TvDAAO и

CbDAAO. Отдельно стоит выделить D-аспаратоксидазы, которые проявляют активность исключительно с D-аминокислотами с отрицательно заряженными боковыми радикалами D-аспаратом и D-глутаматом. Также стоит отметить, что многие оксидазы D-аминокислот проявляют активность и с неканоническими D-аминокислотами. Одним из самых известных неканонических субстратов DAAO является цефалоспорин C. Активность с данным субстратом была обнаружена у RgDAAO и TvDAAO, поэтому данные оксидазы имеют повышенный интерес со стороны исследователей.

2.2.2. Стабильность

Стабильность ферментов в различных условиях является важным параметром и подробно изучается при характеристике фермента. Основными факторами, влияющими на стабильность ферментов, является pH среды и температура. Профили pH-стабильности дрожжевых DAAO схожи и представляют собой колоколообразную зависимость с пиком в диапазоне величин pH от 6 до 8. Такой профиль наблюдается у DAAO из дрожжей *T. variabilis* [62] и *R. gracilis* [13]. DAAO из дрожжей *R. emersonii* имеет максимум стабильности при pH 7-9 [19]. Охарактеризованная DAAO из дрожжей *C. boidinii* имеет высокую стабильность и в сильнощелочных pH вплоть до pH 10.5 [64]. Человеческая DAAO имеет широкий профиль pH-стабильности, она полностью сохраняет свою стабильность в диапазоне величин pH от 4 до 10 [42].

Температурная стабильность у DAAO различается сильнее. Наиболее стабильной из изученных дрожжевых DAAO является DAAO из дрожжей *R. emersonii*. Данный фермент был выделен из термофильных дрожжей и сохраняет половину активности при инкубации при 60 °C в течение 30 минут при концентрации фермента 0.1 мг/мл. Для других изученных оксидаз при тех же концентрациях этот показатель составляет 44 °C, 39 °C, и 54 °C для rkDAAO, RgDAAO и TvDAAO соответственно [19]. В нашей лаборатории была получена мутантная TvDAAO с многоточечными заменами, которая сопоставима по температуре полуинактивации с ReDAAO [65].

Однако напрямую сравнивать температурные стабильности разных ферментов некорректно, так как разные ферменты обладают разными механизмами термоинактивации. На примере TvDAAO и RgDAAO было показано, что температурная стабильность ферментов, существующих в димерной форме, зависит от их концентрации. В нашей лаборатории на основании экспериментальных данных была предложена схема термоинактивации TvDAAO, состоящая из двух стадий и описываемая двумя экспоненциальными функциями: на первой стадии фермент обратимо диссоциирует на субъединицы, которые в последствии необратимо денатурируют [62].



2.3. Дрожжи *Ogataea parapolyomorpha* (*Hansenula polymorpha*)

2.3.1. Общие сведения о дрожжах *O. parapolyomorpha*

Ogataea parapolyomorpha (*Hansenula polymorpha*) - метилотрофные термотолерантные дрожжи, способные расти при температурах выше 50°C, использующие метанол в качестве источника углерода. Данный вид дрожжей является модельным для изучения биохимии пероксисом, так как данная органелла отвечает за метаболизм метанола и многих других источников углерода. Также данный вид активно используется в биотехнологии для получения рекомбинантных белков.

Известны три штамма дрожжей рода *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha*, идентифицированных в 1950-х годах. Они обнаруживаются в образцах почвы, кишечнике насекомых или в испорченных продуктах питания. Они обладают различными свойствами и используются в фундаментальных исследованиях и для производства рекомбинантных белков [66]:

штамм *O. polymorpha* CBS4732 (CCY38-22-2; ATCC34438, NRRL-Y-5445)

штамм *O. parapolyomorpha* DL-1 (NRRL-Y-7560; ATCC26012)

штамм *O. polymorpha* NCYC495 (CBS1976; ATAA14754, NRLL-Y-1798)

Штаммы CBS4732 и NCYC495 скрещиваются между собой, тогда как штамм DL-1 филогенетически далек от остальных и не имеет возможности скрещиваться с ними. Поэтому многие исследователи выделяют этот штамм в отдельный подвид

Ogataea parapolymorpha DL-1 [67]. Данный штамм обладает уникальными свойствами: он резистентен к тяжелым металлам и окислительному стрессу, а также обладает наивысшей термотолерантностью среди штаммов данных дрожжей [68]. Это делает его наиболее подходящим инструментом для биотехнологической промышленности. Вместе со штаммом *O. polymorpha* CBS4732 он используется для получения рекомбинантных белков, а также изучения пероксисом и метаболизма метанола. Штамм *O. polymorpha* NCYC495 используется в основном для изучения ассимиляции нитратов. Геномы штаммов *O. polymorpha* CBS4732 и *O. parapolymorpha* DL-1, как представляющих наибольший интерес для биотехнологии, были полностью секвенированы [67, 69].

Дрожжи *O. polymorpha* являются модельными для изучения метаболизма метанола. Общими для всех метилотрофных дрожжей параметрами при росте на метаноле являются: пролиферация пероксисом, в которых происходит окисление метанола и дальнейших метаболитов, повышенная экспрессия ферментов данного метаболического пути (в первую очередь метанолоксидазы, формиатдегидрогеназы и дигидроксиацетонсинтазы). Интересно, что для родственных видов *C. boidinii* и *Pichia pastoris*, экспрессия этих генов зависит строго от присутствия метанола или его производных, в то время как у *O. polymorpha* уровень экспрессии может повышаться и в условиях глюкозного голодания [70].

Дрожжи *H. polymorpha* и близкородственный ему вид *P. pastoris* имеют много общих ключевых черт: оба вида дрожжей растут до чрезвычайно высокой плотности клеток на простых минеральных средах, и оба могут использовать различные источники углерода. Оба организма могут переносить низкие значения pH и довольно высокие концентрации глюкозы. *H. polymorpha* переносит более высокие температуры (до 50 °C), чем *P. pastoris*. Фундаментальные различия существуют в регуляции сильных промоторов пути утилизации метанола [68].

2.3.2. Паралогичные гены из дрожжей *O. parapolymorpha*

Геном штамма *O. parapolymorpha* DL-1 (предыдущее название *H. polymorpha* DL-1) был секвенирован и расшифрован российскими учеными в Федеральном исследовательском центре “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской

академии наук [67]. Данный штамм является термотолерантным и широко используется в биотехнологии, поэтому он представляет особый интерес для изучения. В ходе аннотации генома обнаружилось присутствие двух генов потенциальных оксидаз D-аминокислот. Столько же генов DAAO и DASPO были найдены и в геноме метилотрофных дрожжей *C. boidinii*. Нами был проведен более тщательный анализ генома. В результате количество генов, предположительно кодирующих оксидазы D-аминокислот, увеличилось до 6. Такое большое количество паралогичных генов нетипично для дрожжей. Было показано, что чаще всего встречается 2-3 паралогичных гена, тогда как 6 паралогичных генов встречаются крайне редко (рис. 2.5) [71].

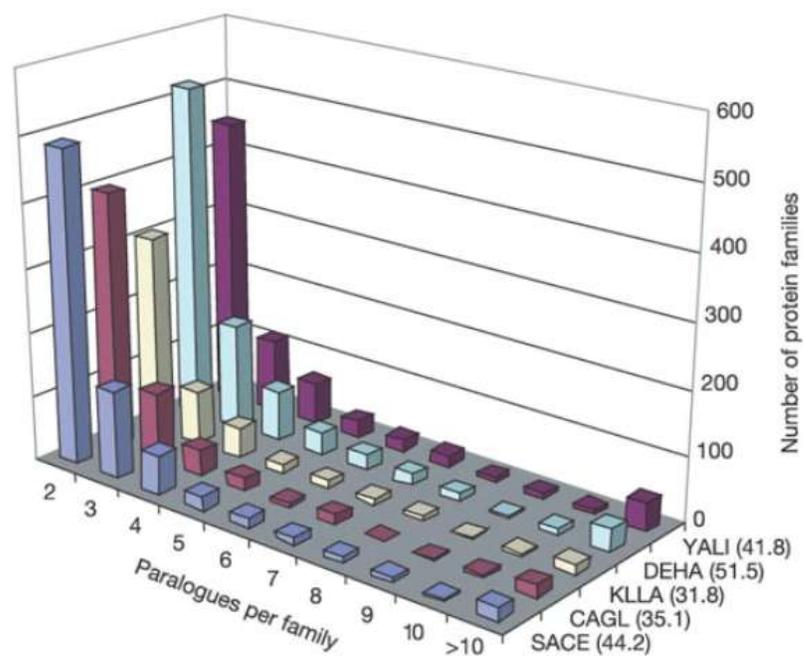


Рис 2.5. Количество паралогичных генов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* (SACE), *Candida glabrata* (CAGL), *Kluyveromyces lactis* (KLLA), *Debaryomyces hansenii* (DEHA) и *Yarrowia lipolytica* (YALI).

Функции паралогичных генов были изучены в разных работах. Паралогичные гены DAAO были обнаружены в микроскопических грибах рода *Cryptococcus*: *Cryptococcus neoformans* и *Cryptococcus gattii*. Было установлено, что данные виды грибов способны использовать D-аминокислоты в качестве единственного источника азота. Был проведен эксперимент по последовательному

нокауту генов DAAO и установлено, что данные ферменты отвечают за рост на разных D-аминокислотах. Однако сами ферменты не были выделены и охарактеризованы [72].

Также были изучены оксидазы из нематод *Caenorhabditis elegans*. Данный вид червей является модельным. В геноме данного вида было обнаружено 4 гена, кодирующих оксидазы D-аминокислот. В ходе изучения выяснилось, что три из этих генов соответствуют D-аспаратоксидазам и один ген кодирует оксидазу D-аминокислот. Была установлена локализация экспрессии всех четырех ферментов. CeDASPO-1 экспрессируется в кишке и гиподермисе, CeDASPO-2 – в кишке, глоточных мышцах и мышцах стенки тела, CeDASPO-3 экспрессируется в мезодермальных клетках головы, гиподермисе, клетках оболочки гонад, семенном пузыре, клетках хвоста и мышцах вульвы. Экспрессия CeDASPO-3 также отличалась в зависимости от пола нематода. CeDAAO экспрессируется исключительно в кишке. Авторы считают, что CeDAAO ответственна за разложение D-аланина, поступающего в организм нематода с пищей. Авторы также показали, что все D-аспаратоксидазы связаны с процессом отложения яиц и играют важную роль на ранних этапах развития нематода, а CeDASPO-1 и CeDASPO-2 активно задействованы в процессах роста и созревания половых клеток [73].

Получены рекомбинантные препараты этих оксидаз D-аминокислот и их биохимические свойства были подробно изучены. Оказалось, что спектр субстратной специфичности DAAO из *C. elegans* отличается от других известных DAAO, данный фермент проявляет наилучшую активность с D-аланином, D-аргинином, D-фенилаланином и D-гистидином. D-аргинин и D-гистидин являются необычными субстратами для DAAO. Также примечательно, что все CeDASPO проявили более высокую активность с D-глутаматом нежели с D-аспаратом [8].

Паралогичные гены, отвечающие за разные функции в организме, в целом не редкость: к примеру, авторы работы [74] обнаружили у *Acropora millepora*, *Aplysia californica*, *Capitella teleta*, *Crassostrea gigas* и *Penaeus monodon* по несколько паралогичных генов рацемаз аминокислот. Авторы считают, что некоторые из них

отвечают за рецемизацию серина, а другие – за рацемизацию аспартата. Однако выделить и охарактеризовать эти рацемазы до сих пор не получилось.

В литературе можно найти много работ, посвященных исследованиям паралогичных генов самых разных ферментов. Среди близких по активности к DAAO ферментов можно выделить работу по изучению паралогичных генов пермеазы D-аминокислот из грибов *Cryptococcus humicola*. Было установлено, что данные ферменты имеют разный спектр субстратной специфичности, один из них (ChAAP-4) отвечает за рост на D- и L аспартате, L-глутамате и L фенилаланине, а второй (ChAAP-5) – за рост на L фенилаланине и L лизине. Также было показано, что ChAAP-4 сильно влияет на процесс индукции экспрессии ChDASPO D-аспартатом [75].

В рамках данной работы нами были обнаружены шесть оксидаз D-аминокислот из дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL 1. Пять из них были экспрессированы в растворимой форме и охарактеризованы. Одна экспрессировалась в нерастворимой форме. Четыре из них оказались рекомбинантными оксидазами с разными спектрами субстратной специфичности (DAAO), и одна из выделенных оксидаз высоко специфично окисляет D-аспартат (DASPO).

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы

Для приготовления культуральных сред использовали дрожжевой экстракт, бактотриптон и агар (“Difco”, США), дигидрофосфат натрия “ч.д.а.”, глюкозу (“РеаХим”, Россия), хлорид магния и хлорид кальция “ultra pure” (“Merck”, Германия), изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ), рибофлавин, хлорамфеникол и канамицин (“Sigma”, США), хлорид натрия “ultra pure”, гидрофосфат калия. Для культивирования клеток *E. coli* использовали модифицированную среду 2YT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1 г/л хлорида натрия, 1,5 г/л дигидрофосфата натрия, 1 г/л гидрофосфата калия, рН 7,5).

Для трансформации и экспрессии плазмид использовали следующие штаммы *E. coli*:

E. coli DH5α: *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

E. coli BL21 (DE3) pLysS Codon Plus: *B^{F-} ompT hsdS(гв⁻ мв⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [pLysS *argU ileY leuW Cam^r*].*

Для очистки и изучения свойств фермента применяли Трис-НСl (трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид) (“Merck”, Германия), рацематы аминокислот (“РеаХим”, Россия и “Reanal”, Венгрия), кроме D-Asp и D-Pro (“Диам”, Россия и “Sigma”, США), пероксидазу из корней хрена (ПХ) (“Диам”, Россия) и (орто-Дианизидин) ОДН (“ХимМед”, Россия). Для электрофореза белков использовали реактивы, произведенные фирмой “Bio-Rad” (США).

3.2. Методы исследования

3.2.1. Электрофорез ДНК в агарозном геле.

Для очистки фрагментов ДНК был использован электрофорез в агарозном геле. Гель содержал Трис-ацетат-ЭДТА (ТАЕ) буфер, 1% агарозы и 5 мкг/мл бромистого этидия. В качестве источника тока использовали «LKB Bromma 2297 Macrodrive 5». Электрофорез проводили при следующих ограничениях источника тока: 100 В по напряжению, 100 мА по силе тока и 10 Вт по мощности.

Визуализацию ДНК проводили на УФ-трансиллюминаторе при длине волны 254 или 312 нм.

3.2.2. Выделение ДНК фрагмента из агарозного геля.

После проведения препаративного ДНК-электрофореза в 1% агарозном геле нужные полосы с фрагментами ДНК (после ПЦР или рестрикции) вырезали из геля при освещении УФ-светом на длине волны 312 нм. Куски геля помещали в пластиковые пробирки на 1,5 мл. Выделение ДНК из геля выполняли с помощью коммерчески доступного набора реагентов “DNA extraction kit” фирмы “Thermo Scientific”. К вырезанному кусочку геля добавляли 3-х кратный объем (100 мг \approx 100 мкл) “Binding solution” (содержит перхлорат и ацетат натрия) и инкубировали в термошейкере от 5 до 10 минут при 55 °С и 1400 об/мин до полного растворения геля. Затем смесь переносили в специальные колонки для центрифугирования “GeneJET” и центрифугировали на центрифуге “Eppendorf 5415D” (13000 об/мин, 1 мин). Фильтрат удаляли, в колонки добавляли 500 мкл раствора для промывания (“Wash Solution”) и центрифугировали (13000 об/мин, 1 мин). Для десорбции ДНК с носителя колонки помещали в новые пластиковые пробирки на 1,5 мл, добавляли 30–50 мкл деионизованной воды или “Elution Buffer”, и затем центрифугировали в течение 1-2 мин при 13000 об/мин.

3.2.3. Рестрикция и лигирование фрагментов ДНК

Рестрикцию плазмидной ДНК и ПЦР-фрагментов проводили с использованием уникальных эндонуклеаз рестрикции NcoI (10 Ед/мкл), EcoRI (10 Ед/мкл), Bsp119I (10 Ед/мкл), XhoI (10 Ед/мкл) фирмы “Thermo Scientific” в одно- или двукратном Tango буфере (2X TangoTM: 66 мМ Трис-ацетат (рН 7,9 при 25 °С), 20 мМ ацетат магния, 132 мМ ацетат калия, 0,2 мг/мл БСА) в соответствии с инструкцией производителя. ДНК инкубировали с требуемой парой рестриктаз при 37 °С в течение 1–1,5 часов в термостате “Гном” (“ДНК-Технология”, Россия). Полноту рестрикции контролировали ДНК-электрофорезом в 1% агарозном геле.

Лигирование ПЦР-фрагментов после рестрикции в нужный ДНК-вектор проводили коммерчески доступным набором для лигирования “Rapid DNA Ligation Kit” фирмы “Thermo Scientific” согласно инструкции производителя. В

тонкостенной пластиковой пробирке на 0,5 мл (“SSI”, США) смешивали 4 мкл 5-кратного лигазного буфера (50 мМ Трис-НСl (рН 7,8 при 25°C), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреитол, 1мМ АТФ, 25 мкг/мл БСА), векторную ДНК после рестрикции и встраиваемый ДНК-фрагмент в молярном соотношении 1:3. Объем лигирующей смеси доводили деионизованной водой до 20 мкл. Смесь центрифугировали на центрифуге “Eppendorf 5415D” (13000 об/мин, 30 сек). Затем к смеси добавляли 1 мкл ДНК-лигазы фага Т4 (до 5 ед/мкл), перемешивали и инкубировали 1 час при 22°C. Полученной лигазной смесью (5 мкл) трансформировали клетки *E. coli* DH5 α .

3.2.4. Трансформация клеток *E. coli*

Для приготовления компетентных клеток *E. coli* разбавляли 40 мкл ночной культуры в 100 раз средой 2YT, пробирки помещали в качалку (37°C, 160-180 об/мин) и выращивали в течение 1,5-2,5 часов до достижения поглощения клеток на длине волны 600 нм $A_{600} \approx 0,07-0,10$. Затем 3 мл культуральной жидкости в два приема центрифугировали на центрифуге “Eppendorf 5804R” (5000 об/мин, 5 мин, +4°C). После удаления культуральной жидкости осадок клеток ресуспендировали в 800 мкл стерильного охлажденного 50 мМ раствора CaCl₂ и инкубировали в течение 30–40 мин во льду. Далее клетки осаждали в условиях, описанных выше, ресуспендировали в 100 мкл охлажденного 50 мМ CaCl₂ и оставляли на 3–4 ч при 0°C.

К суспензии клеток добавляли 0,5–1,0 мкл раствора плазмидной ДНК (концентрация ≈ 50 нг/мкл) и инкубировали в течение 40 мин при 0°C. После этого клетки подвергали тепловому шоку при 42°C в водном термостате (точность термостатирования $\pm 0,1^\circ\text{C}$) в течение 1,5–2,0 мин и охлаждали до 0°C (1–2 мин). Затем в пробирку с клетками добавляли 900 мкл среды 2YT, трансформированные клетки далее растили в течение 1,5–2 ч при 37°C при периодическом перемешивании и высевали на чашки Петри с твердой агаризованной средой 2YT (содержание агара 1,2%), которая содержала необходимый антибиотик для контроля. В случае трансформации в штаммы *E. coli* DH5 α использовали канамицин в концентрации 30 мкг/мл, в случае трансформации в штаммы *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus/pLysS – канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (20 мкг/мл).

3.2.5. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора “GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit” фирмы “Thermo Scientific” согласно инструкции производителя. С чашек Петри колонии клеток *E. coli* DH5α, содержащих требуемые плазмиды с генами *tvdaao*, переносили в 4 мл среды 2YT, которая содержала 30 мкг/мл канамицина и инкубировали 12-16 часов при 37 °C при 180 об/мин. Клетки осаждали в два приема по 1,5 мл в 2 мл пробирках на центрифуге “Eppendorf 5804R” (5000 об/мин, 5 мин, +4 °C), супернатант удаляли. Далее все операции проводили при комнатной температуре. Осадок клеток тщательно ресуспендировали пипетированием в 250 мкл раствора для ресуспендирования (“Resuspension Solution”). Затем добавляли 250 мкл лизирующего раствора (“Lysis Solution”) и аккуратно перемешивали, пока раствор не становился прозрачным и вязким. Далее к смеси добавляли 350 мкл нейтрализующего раствора (“Neutralization Solution”) и аккуратно перемешивали. Смесь центрифугировали на центрифуге “Eppendorf 5415D” (14000 об/мин, 5 мин), супернатант переносили в специальные колонки для центрифугирования “GeneJET” и центрифугировали (14000 об/мин, 1 мин). Фильтрат удаляли, в колонки добавляли 500 мкл раствора для промывания (“Wash Solution”) и центрифугировали (14000 об/мин, 1 мин), процедуру повторяли еще один раз. Десорбцию ДНК с колонок осуществляли путем добавления в колонки 40–50 мкл деионизованной воды или буфера для элюирования (“Elution Buffer”) и с последующим центрифугированием в течение 2 мин при 14000 об/мин. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полученные образцы плазмидных ДНК хранили при -20°C.

3.2.6. Секвенирование ДНК

Секвенирование плазмидной ДНК проводили в Центре коллективного пользования ЦКП «Геном» (Институт молекулярной биологии им.В.А.Энгельгардта РАН) с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v.3.1 (“Perkin Elmer Applied Biosystems”, США), который основан на дидезокситерминационном методе, с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвене-

торе ДНК “ABI PRISM 3730 Applied Biosystems”. Для обработки результатов секвенирования использовали программу BioEdit (версия 7.1.3.0) и Ugene (версия 43.0).

3.2.7. Экспрессия OpaDAAO в клетках *E. coli*

Escherichia coli штамм BL21(DE3)CodonPlus/pLysS были трансформированы (Novagen) плазмидами pET24_2400 (OpaDASPO), pET24_2914 (OpaDAAO1), pET24_2165 (OpaDAAO2), pET24_0899 (OpaDAAO3) и pET24_5094 (OpaDAAO4) и выращивались на чашках Петри с агаризованной средой 2YT с фосфатами, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Для культивирования в дальнейшем использовались качалки Innova 44 (New Brunswick Scientific, США) и Multitron II (Infors AG, Германия).

Одиночные колонии переносили в 4 мл среды 2YT с фосфатами, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 34 мкг/мл хлорамфеникола, для получения ночной культуры (не более 14 часов роста) при 37 °C и 180 об/мин.

Ночную культуру пересевали с разбавлением 1:100 в 125-мл или 250 мл в плоскодонные колбы с отбойниками с 10% от объема свежей среды 2YT с фосфатами, содержащей 30 мкг/мл канамицина, и инкубировали при 37°C и 180 об/мин до момента достижения $A_{600} = 1.0$ (обычно 2-3 часа).

Эти культуры разбавляли 1:10 в свежей среде 2YT с фосфатами, содержащей 30 мкг/мл канамицина, и растили в плоскодонных колбах с отбойниками на 1 л при 30 °C и 100 rpm в течение 2 часов. Рибофлавин и D-метионин добавляли в среду до конечной концентрации 80 мг/л и 0.5 мМ соответственно после 1 часа инкубирования. Клетки медленно охлаждали до 22°C и скорость снижали до 90 rpm. Индукцию производили при $A_{600}=1.0$ с помощью изопропил- β -тиогалактозида (ИПТГ) с конечной концентрацией 0.1 мМ (обычно производилось, когда культура полностью охлаждалась до температуры 22°C). Культуру инкубировали 8-10 часов.

Для OpaDASPO наблюдался лизис клеток и культуральная среда сразу использовалась для последующих процедур.

Для других OpaDAAO клетки собирали с помощью центрифугирования на центрифуге Eppendorf 5804R при 6000 оборотов в минуту в течение 5 минут при 4°C

и ресуспендировали 1:4 w/v в буфере для клеточного экстракта (Таблица 3.1). Клеточная суспензия замораживалась и хранилась при -20°C.

Таблица 3.1.

Буферы для очистки, хранения и определения активности ферментов.

Фермент	OpaDAAO1	OpaDAAO2	OpaDAAO3	OpaDAAO4	OpaDASPO
Буфер для хранения клеточной массы и очистки	HEPES 20 мМ pH 7.5	Трис-НСl 20 мМ pH 8.5	Трис-НСl 20 мМ pH 7.5	Трис-НСl 20 мМ pH 7.0	Трис-НСl 20 мМ pH 8.5
Буфер для хранения	20 мМ НФБ pH 6.5	50 мМ НФБ pH 7.0	100 мМ НФБ pH 8.0	50 мМ НФБ pH 6.0	20 мМ НФБ pH 7.0
Буфер для хранения, добавки	10% глицерин 0.01% Triton X-100	10% глицерин	10% глицерин	10% глицерин, 0.5 М сахароза	10% глицерин
Буфер для измерения активности	20 мМ Трис-НСl pH 8.0	50 мМ НФБ pH 8.0	50 мМ НФБ pH 8.0	50 мМ НФБ pH 7.0	50 мМ НФБ pH 8.0

3.2.8. Подготовка клеточного экстракта

Клеточную суспензию гомогенизировали с помощью ультразвука (“Branson Sonifier 250”, Германия) в течение 4-5 минут с охлаждением льдом циклами по 1 минуте. Культуральную среду с клетками от OpaDASPO обрабатывали ультразвуком 10 минут при постоянном охлаждении льдом. Нерастворимые остатки клеток убирали при помощи центрифугирования при 11000 об/мин в течение 30 минут при 4 °С. Супернатант фильтровали через 0.45 мкм и 0.22 мкм фильтры. Образцы хранили при -22°C до использования.

3.2.9. Хроматография OpaDAAO

Ионообменную хроматографию выполняли, используя хроматографы HPLC Azura (“Knauer”, Германия) и FPLC ÄKTA Start (“GE Healthcare”, Швеция). Колонка Mono Q 10/100 GL (“GE Healthcare”, Швеция) использовалась как анионообменник.

SP Sepharose Fast Flow (“GE Healthcare”, Швеция) в 7 мл колонке использовалась как катионообменник. Обессоливание проводилось с помощью хроматографа FPLC ÄKTA Start (“GE Healthcare”, Швеция) через носитель Sephadex G-25 в колонке 10x1 см (“Pharmacia Biotech”, Швеция).

Высаливание при помощи сульфата аммония при 70% от насыщения с 5-кратным концентрированием и диализ против 1 л буфера для клеточного экстракта в ночь использовалось как предварительный шаг для концентрирования и очистки ОраDASPO. Клеточные экстракты ОраDAAO2, ОраDAAO3, ОраDAAO4 и ОраDASPO в буферах для хранения клеточной массы (Таблица 3.1) после диализа наносили на анионообменник и элюировали при помощи линейного градиента 0-500 мМ NaCl в буфере для очистки (Таблица 3.1) (общий объем градиента 10 объемов колонки). Полученные растворы рехроматографировали в аналогичных условиях. Клеточный экстракт ОраDAAO1 наносили на катионообменник и элюировали аналогично. Все очищенные ферменты обессоливали в соответствующий буфер для хранения (Таблица 3.1).

3.2.10. Белковый форез и аналитическая гель-фильтрация

Чистота и молекулярная масса ферментов были определены при помощи 12.5% SDS-PAGE электрофореза при помощи Mini-Protean Tetra System (“Bio-Rad”, Австрия) следуя протоколу производителя с Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standard (“Bio-Rad”, Австрия). Олигомерный состав ферментов определяли при помощи гель-фильтрации на ТоyoPearl HW-55 в 30x1 см колонке. Амилаза (200 кДа), Альдолаза (158 кДа), Алкоголь дегидрогеназа (150 кДа), Коальбумин (75 кДа), БСА (66 кДа), Овальбумин (44 кДа), химотрипсиноген А (25 кДа), РНКазы А (13.7 кДа) использовались как стандарты масс.

3.2.11. Анализ кофактора

Для определения типа кофактора использовали ВЭЖХ. Очищенные белки в концентрации 100 мкг/мл инкубировали в течение 10 минут при 95°C и центрифугировали 25 минут при 15000 об/мин в Eppendorf 5430. После центрифугирования 10 мкл супернатанта было внесено на колонку Diasfer C16 4x125 мм 5.0 мкм (“Хромасс”, Россия). Разделение проводили в изократическом режиме в

5 мМ ацетате аммония рН 6.0 с добавлением 10 % ацетонитрила при скорости потока 0.5 мл/мин и детекцией на 260 нм.

3.2.12. Определение активности и концентрации ОраDAAO

Активность ОраDAAO с D-аминокислотами измеряли при помощи “пероксидазного метода” с ортодианизидином - субстратом пероксидазы хрена. Накопление окисленного продукта ОДН детектировали спектрофотометрически на длине волны 460 нм с коэффициентом экстинкции $\sim 11600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (“Shimadzu UV-1800PC”, Германия). Коэффициент экстинкции в данном буфере измеряли при помощи пероксидазной реакции с определенной концентрацией H_2O_2 , которую определяли спектрофотометрически ($\epsilon (240\text{нм}) = 43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [76]). Реакции производили в буфере для определения активности (Таблица 3.1), 30°C, насыщении воздухом. Ферментативную активность с цефалоспорином C (CPC) определяли по уменьшению пика CPC с ВЭЖХ.

Кажущиеся параметры для кинетической схемы Михаэлиса-Ментен рассчитывали из зависимости начальных скоростей реакций от концентрации субстрата (щ,5-% K_M) при помощи нелинейной регрессии в программе OriginPro 9.1 (“OriginLab Corporation”, США).

Коэффициент поглощения белков были пересчитаны при помощи спектров поглощения белка и кофактора из него. Спектры супернатанта сопоставляли со спектрами возможных кофакторов оксидаз.

3.2.13. Определение температурной активности и стабильности

Для экспериментов по температурной активности активности измерялись при соответствующих температурах.

Для экспериментов по температурной стабильности 0.1 мл раствора каждого из ферментов (в соответствующем буфере для хранения) в концентрации 30 мкг/мл помещали в тонкостенные 0.5 мл Eppendorf tube. Пробирки инкубировали в водном термостате (“VEB MLV Proliferate-WERK”, Германия). Пробирки вытаскивали через 10 минут и сразу охлаждали во льду, после чего измеряли активность. Температуру повышали с шагом в 5 °C. Зависимость остаточной активности от температуры анализировали с помощью OriginPro 9.1 (“OriginLab Corporation”, США).

Уравнение для температурной стабильности:

$$A = A_0 \frac{1}{1 + e^{(-T+T_m) \cdot slope}}$$

где A – активность, A_0 – начальная активность, T – температура, T_m – температура, при которой наблюдается половина активности.

Уравнение для температурной активности:

$$A = K e^{E_a/RT} \frac{1}{1 + e^{(-T+T_m) \cdot slope}}$$

где A – активность, K – предэкспоненциальный коэффициент, T – температура, T_m – температура, при которой наблюдается половина активности, E_a – наблюдаемая энергия активации.

3.2.14. Определение pH-зависимостей активности и стабильности

Для экспериментов по изучению pH-зависимости активности растворы ферментов разбавляли в 50 мМ ацетат-фосфат-Трис-глицин буфере с различными pH и измеряли активность в аналогичном буфере. Эксперименты по изучению pH-зависимости проводились как измерение остаточной активности данных растворов ферментов (30 мкг/мл) после инкубирования в течение 10 минут при 45-50°C в зависимости от температурной стабильности.

3.2.15. Построение 3D моделей структур OraDAAO и анализ молекулярной динамики

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программе UGENE 43.0 [77] с использованием алгоритма MUSCLE [78]. Структуры смоделированы при помощи сервера RoseTTAFold-server [79]. Молекула FAD была добавлена внутрь глобулы основываясь на структуре оксидазы D-аминокислот из *R. gracilis* (PDB ID 1C0P) [46]. Молекулярная динамика производилась с использованием программы NAMD [80] и силового поля CHARMM36 [81]. Параметры силового поля для молекулы FAD подготовлены основываясь на параметрах из CgenFF [82, 83] и его стиле наименования атомов [84, 85]. Структуры подготавливали к молекулярной динамике и вставляли в 15А-бокс из воды с уравновешиванием зарядов с помощью NaCl в программе VMD [86].

Периодические граничные условия с постоянным давлением и температурой применялись при помощи Ланджевиновской динамики и Nose-Hoover Langevin piston pressure control. Twin-range cutoff of 10/14 Å использовали для электростатических взаимодействий и взаимодействий, описываемых потенциалом Леннарда-Джонса. Времена симуляции молекулярных динамик составляли 100 нс.

Докинг субстратов проводили при помощи программы AutoDock с ускорением на GPU [87, 88]. Для проведения докинга использовали следующие параметры: `ga_pop_size = 150`, `ga_num_evals = 25000000`, `ga_run = 20`, `ga_mutation_rate 0.02÷0.08`, Solis-Wets метод. Для отбора результатов докинга ориентировались на положения C α , N и C атомов D-аминокислоты, подходящих для катализа реакции. Соответствующие положения выбирали на основании кристаллических структур RtoDAAO в комплексе с D-аланином/иминопируватом (PDBID 1C0P) и рkDAAO (из почек свиньи) в комплексе с иминотриптофаном (PDBID 1DDO). Положение боковых радикалов D-аминокислот выбирали исходя из потенциально возможных взаимодействий субстрата с DAAO. Параметры силового поля генерировали при помощи сервера CHARMM-GUI Input generator [81]. Расчет RMSD между структурами проводили по C α -атомам, используя команду “align” пакета программ PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0, Schrödinger, LLC). Для расчета RMSD использовали пять циклов отклонений структурных выбросов (параметр “cycles”). Изображение подготовлены в программе PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0, Schrödinger, LLC).

3.2.16. Биоинформатический поиск генов потенциальных DAAO

Поиск новых DAAO по гомологии проводили с помощью программы BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) против базы данных транслированных белковых последовательностей из геномов экстремофильных бактерий. В качестве основной базы использовали базу UniProt NCBI. Также проводили поиск в геномах бактерий и архей, последовательности которых были секвенированы в ходе выполнения работ в рамках Соглашения № 075-15-2021-1396 от 26.10.2021 (Федеральная научно-техническая программа развития генетических

технологий на 2019–2027 годы). Для дальнейшей работы отбирали последовательности, показавшие наиболее высокую гомологию. Множественное выравнивание отобранных последовательностей и ряда известных последовательностей бактерий и дрожжей проводили с помощью программы Clustal X 1.83.

3.2.17. Экспрессия TvDAAO клетках *E. coli*

Экспрессию TvDAAO и ее мутантов проводили в клетках *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Codon Plus. Для получения штамма-продуцента компетентные клетки *E. coli* BL21 (DE3) pLysS Codon Plus трансформировали плазмидной ДНК, несущей ген *tvdaao* и высевали на чашки Петри с агаризованной средой, содержащей канамицин (30 мкг/мл) и хлорамфеникол (25 мкг/мл) или тетрациклин (8 мкг/мл). С чашки отбирали единичную колонию и культивировали в течение ночи на модифицированной среде 2YT в присутствии глюкозы (5 г/л), канамицина (30 мкг/мл) и хлорамфеникола (25 мкг/мл) или тетрациклина (8 мкг/мл) при 37°C и 180 об/мин. Утром клетки пересеивали на свежую среду 2YT (разбавление в 100 раз) и культивировали при 37°C и 180 об/мин до достижения величины поглощения на 600 нм $A_{600} \approx 1,0$. Посевной материал вносили в колбы для культивирования в количестве 10% от общего объема среды, содержащей 30 мкг/мл канамицина и 5 г/л глюкозы. Затем клетки снова пересеивали на свежую среду 2YT (разбавление в 10 раз) в конические колбы с отбойниками объемом 1 л (объем среды составлял не более 15% от объема колбы) и культивировали при 30°C и 90 об/мин. Примерно за 1 час до индукции в среду добавляли рибофлавин и D-метионин до концентрации 80 мг/л и 0,5 мМ соответственно. Затем при поглощении клеток на 600 нм $A_{600} \approx 1,0$ осуществляли индукцию экспрессии гена *tvdaao* добавлением в среду ИПТГ до концентрации 0,1 мМ. После индукции клетки культивировали в течение 8-10 часов при 22 °C и 90 об/мин, каждые 2 часа отбирая пробы по 1,5 мл среды с клетками из каждой колбы. В пробах измеряли величину поглощения на 600 нм, клетки осаждали на центрифуге “Eppendorf 5415D” (1 мин, 6000 об/мин), для контроля за лизисом клеток измеряли активность TvDAAO в культуральной жидкости. Осадок клеток ресуспендировали в 1 мл лизирующего буфера (0,5 мг/мл лизоцим, 0,2% об. Тритон

X-100, 0,1 М КФБ, рН 8,0), замораживали при -20°C в течение 30 минут, затем инкубировали в шейкере в течение 2-3 часов. Осадок разрушенных клеток осаждали центрифугированием и определяли активность TvDAAO в супернатанте (см. раздел 3.2.14). После окончания культивирования колбы помещали в лед, охлаждали 10–20 минут и клетки осаждали на центрифуге “Eppendorf 5804R” (6000 об/мин, 5 мин, $+4^{\circ}\text{C}$). Полученный осадок клеток ресуспендировали в 20 мМ Трис-НСl рН 8,0 в соотношении 1:4 (масс) и помещали на -20°C .

3.2.18. Выделение и очистка TvDAAO

Для выделения TvDAAO из клеток *E. coli* использовали обработку ультразвуком на приборе «Sonifier». Фальконы на 50 мл, содержащие суспензии клеток с одной колбы помещали в лед, перо сонификатора погружали в суспензию на глубину около 1 см. Проводили 5 циклов обработки клеток по 30 с (мощность = 5, периодичность импульсов = 50 %) и перерывами 30 с. После чего суспензию разрушенных клеток центрифугировали на центрифуге “Eppendorf 5804R” (13000 об/мин, 30 минут, $+4^{\circ}\text{C}$). Полученный бесклеточный экстракт фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 и 0,22 мкм. Затем проводили очистку TvDAAO с помощью анионообменной хроматографии на колонке MonoQ HR 10/10 с использованием прибора FPLC “ÄKTA Purifier” фирмы “GE Healthcare” (Великобритания). Раствор фермента наносили на колонку в 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Десорбцию TvDAAO проводили в линейном градиенте 0–300 мМ NaCl, 20 мМ Трис-НСl, рН 8,0 со скоростью 2,0 мл/мин в течение 80 минут, контролируя активность TvDAAO в собранных фракциях. Заключительной стадией очистки являлась гель-фильтрация на колонке 1 x 25 см с носителем Sephadex G-25 (“Pharmacia”, Швеция) в 0,1 М КФБ, рН 8,0. Чистоту мутантных TvDAAO и фермента дикого типа определяли с помощью белкового электрофореза в денатурирующих условиях.

3.2.19. Определение концентрации TvDAAO

Концентрацию TvDAAO определяли по концентрации связанной молекулы окисленного FAD. Использовали коэффициент экстинции $11800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 455 нм.

Измерения проводили на спектрофотометре UV-1601PC или UV-1800PC (“Shimadzu”).

3.2.20. Определение активности TvDAAO

Для определения активности TvDAAO использовали перекрестную реакцию с участием пероксидазы из корней хрена. В качестве субстрата для TvDAAO использовали D-метионин, для пероксидазы из корней хрена – АБТС. В спектрофотометрическую кювету (рабочий объем 1 мл, оптический путь 1 см) добавляли насыщенный воздухом 50 мМ КФБ, рН 8,0 и 100 мМ раствор D-Met в 50 мМ КФБ (в сумме 970 мкл). После термостатирования кюветы в течение 10 минут 30°C в нее добавляли 20 мкл водного раствора АБТС (16 мг/мл) и термостатировали еще 2 минуты. Затем в кювету добавляли 10 мкл раствора пероксидазы в 50 мМ КФБ (5 мг/мл) и пробу TvDAAO (30 мкл). Определение активности проводили по накоплению продукта окисления АБТС на длине волны 414 нм ($\epsilon^{414}=36000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) на спектрофотометре UV-1800 (“Shimadzu”).

3.2.21. Определение каталитических параметров TvDAAO с цефалоспорином С

Для определения кинетических параметров с цефалоспорином С проводили реакцию при 30 °С в пробирках объемом 1,5 мл в термомиксере Thermomixer comfort (“Eppendorf”, Германия) при 1400 об/мин. Общий объем реакционной смеси составлял 500 мкл. В определенные моменты времени отбирали 50 мкл реакционной смеси и смешивали с 50 мкл 0,1 М HCl для остановки реакции. Затем образец разбавляли в подвижной фазе для проведения ВЭЖХ в 5–50 раз в зависимости от концентрации цефалоспоринона С. Для разделения продуктов реакции от цефалоспоринона С использовали ВЭЖХ на колонке Диасфер С16 4x125 мм, размер частиц 5 мкм, размер пор 110 Å (ЗАО “БиоХимМак СТ”, Россия) на блочной системе фирмы KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH (Германия). Разделение проводили при 40 °С и 0,75 мл/мин. В качестве подвижной фазы использовали 0,2 М ацетат натрия рН 5,3 с добавлением 10 об% ацетонитрила. Обработку результатов хроматографий проводили в программе ClarityChrom 3.0.7.662 (KNAUER Wissenschaftliche Geräte GmbH, США). Активность определяли по начальной

скорости убывли пика, соответствующего цефалоспориноу *C*. Для определения значений каталитической константы и константы Михаэлиса ферментов с цефалоспорином *C* варьировали его концентрацию в диапазоне от 0,5 до 5 К_м. Полученные данные обрабатывали методом нелинейной регрессии в программе OriginLab 9.2 согласно уравнению Михаэлиса-Ментен.

3.2.22. Изучение температурной стабильности TvDAAO

Температурная стабильность мутантных TvDAAO и фермента дикого типа изучалась в 0,1 М КФБ, pH 8,0 при различных температурах с шагом 2°C. Для эксперимента готовились серии из тонкостенных пластиковых пробирок объемом 0,5 мл, в которые помещали по 100–110 мкл фермента. Пробирки инкубировали в водном термостате при необходимой температуре (точность термостатирования ±0,1 °C). Через определенные промежутки времени пробирки вынимали, охлаждали в течение 1–2 мин во льду и измеряли активность. Эксперимент останавливали после уменьшения активности фермента до 5-10% от исходной величины. Для расчета кинетических параметров процесса инактивации мутантных TvDAAO строили зависимости остаточной активности от времени и анализировали с помощью программы OriginPro 9.2 (OriginLab Corporation, США) методом нелинейной регрессии.

3.2.23. Изучение окислительной стабильности TvDAAO

Стабильность к действию пероксида водорода для мутантных TvDAAO и фермента дикого типа изучалась в 0,05 М КФБ, pH 8,0 при 30 °C при различных концентрациях пероксида водорода (0,01, 0,05, и 0,1 моль/л). Конечная концентрация фермента при разбавлении и добавлении раствора пероксида водорода составляла 10 мкг/мл. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 100 мкл и добавляли к ним по 50 Ед каталазы (5 мкл раствора каталазы 10000 Ед/мл), после чего измеряли активность TvDAAO учитывая разбавление фермента раствором каталазы. Эксперимент останавливали после уменьшения активности фермента до 5-10% от исходной величины. Для расчета кинетических параметров процесса инактивации мутантных TvDAAO строили зависимости остаточной активности от времени и анализировали с помощью программы OriginPro 9.2 (OriginLab Corporation, США) методом нелинейной регрессии.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

4.1. 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 (табл. 4.1). 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 4.1.

Соответствие сокращений и кодов доступа в базах данных GenBank, NCBI and Uniprot

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

4.1.1. Множественное выравнивание последовательностей

Мы провели множественное выравнивание аминокислотных последовательностей OpaDAAO с другими дрожжевыми DAAO (RgDAAO, TvDAAO, CbDAAO, ChDAAO и ReDAAO). OpaDAAO имеют показатели идентичности от 24% до 64% по отношению к другим дрожжевым DAAO. Высокие показатели идентичности наблюдаются для OpaDAAO3 и CbDAAO (64%), OpaDAAO1 и CbDAAO (53%), OpaDAAO2 и TvDAAO (44%). Между собой OpaDAAO имеют идентичность от 27% до 54% (таблица 4.2.). Наиболее похожи аминокислотные последовательности у OpaDAAO1 и OpaDAAO3 (54% идентичности).

Таблица 4.2.

Показатели идентичности аминокислотных последовательностей OpaDAAO.

	OpaDAAO1	OpaDASPO	OpaDAAO2	OpaDAAO3	OpaDAAO4	OpaDAAO5
OpaDAAO1	100	32	30	54	27	28
OpaDASPO	32	100	32	34	28	29
OpaDAAO2	30	32	100	33	32	35
OpaDAAO3	54	34	33	100	29	28
OpaDAAO4	27	28	32	29	100	30
OpaDAAO5	28	29	35	28	30	100

Нуклеотид-связывающий мотив GXGXXG наблюдается в самом начале N-концевого участка у всех OpaDAAO. Пероксисомальная сигнальная последовательность (PTS1) (PROSITE, PS00342) была найдена только у OpaDAAO5 (Ser/Arg/Leu) и OpaDASPO (Ser/Lys/Leu). На C-конце OpaDAAO2 присутствует последовательность (His/Lys/Leu), которая вероятно также может использоваться для транспорта фермента в пероксисомы. Все OpaDAAO не имеют петли, участвующей в димеризации RgDAAO (петля Ser308-Lys321) [43].

В RgDAAO остатки Arg285 и Tyr223 участвуют в связывании карбоксильной группы D-аминокислоты [50]. Arg285 в RgDAAO соответствует остаткам Arg, имеющимся во всех OpaDAAO. Остатку Tyr223 в RgDAAO есть соответствующие

остатки в OraDAAO1, OraDAAO2, OraDAAO3 и OraDAAO5. Для OraDAAO4 и OraDASPO в похожей позиции находятся остатки Met и Phe.

В RgDAAO карбонильный кислород остатка Ser335 участвует в связывании аминокислоты D-АК. Соответствующими остатками для OraDAAO являются остатки глицина для OraDAAO1, OraDAAO2, OraDAAO3 и OraDASPO, остаток аспарагина для OraDAAO4 и остаток гистидина для OraDAAO5.

Остатки Asn54 и Gln339 связывают D-АК через водородные связи с молекулой воды в качестве посредника в RgDAAO. Остатки, соответствующие Asn54 в RgDAAO, это аспарагин для OraDAAO1, OraDAAO2, OraDAAO3, глутамин для OraDAAO4, гистидин для OraDASPO и фенилаланин для OraDAAO5. Остатки, соответствующие Gln339 в RgDAAO, это глутамин для OraDAAO1, OraDAAO2, OraDAAO3, OraDAAO5, треонин для OraDAAO4 и глутамат для OraDASPO.

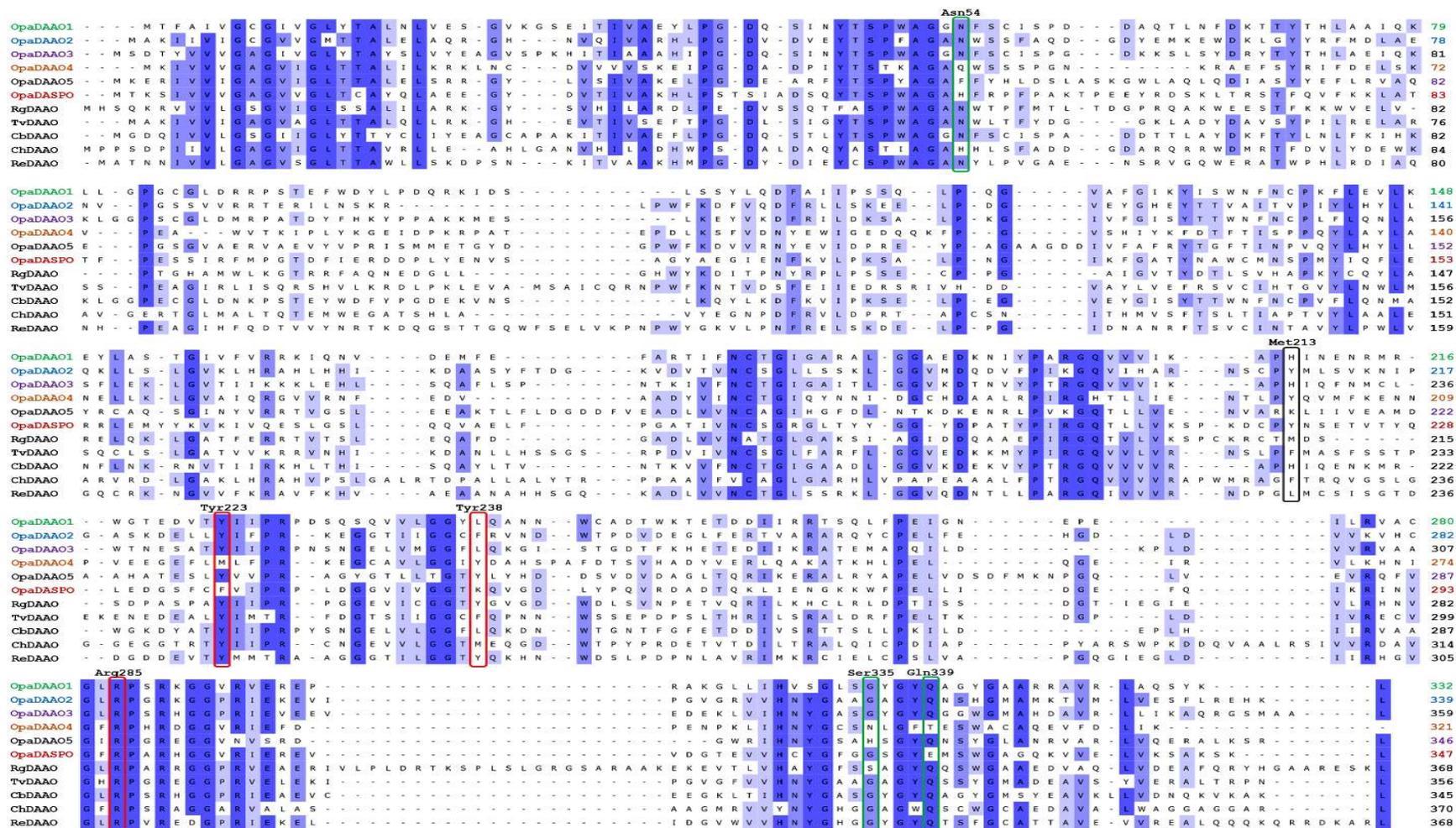


Рис. 4.1 Сравнение аминокислотных последовательностей OpaDAAO с известными DAAO из других источников. Множественное выравнивание OpaDAAO с RgDAAO, TvDAAO, CbDAAO, ChDAAO и ReDAAO.

4.2. Клонирование, экспрессия и очистка 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 His6 (His tag), однако от них было решено отказаться во избежание влияния дополнительных шести остатков гистидина на свойства изучаемых ферментов. Полученные плазмиды с генами opaadao 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/pLysS, 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 4.3.). 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 4.3.

Наилучшие субстраты для определения активности и результаты экспрессии OpaDAAO.

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

Выход ферментов по активности после культивирования сильно различается, в случае OpaDAAO2 и OpaDAAO4 он составил 600 и 330 Ед/л среды соответственно, в случае OpaDAAO1, OpaDAAO3 и OpaDASPO – 7100, 6200 и 2200 Ед/л среды соответственно. OpaDAAO2 и OpaDAAO4 проявили более низкую активность со своими субстратами, чем остальные изученные ферменты. Экспрессия OpaDASPO приводила к частичному лизису клеток *E. coli* после индукции. Подобный эффект наблюдался также при экспрессии DASPO из дрожжей *Thermotusces durontii* в клетках *E. coli* [89]. Это может быть связано с нарушением метаболизма отрицательно заряженных D-аминокислот, входящих в состав клеточной стенки бактерий [90]. Поэтому OpaDASPO может быть протестирована в качестве антибактериального агента дрожжей.

Для очистки каждого фермента была разработана индивидуальная стратегия с учетом величин их изоэлектрических точек. OpaDAAO1 очищали с помощью катионообменной хроматографии с последующей ультрафильтрацией и обессоливанием. Степень очистки составила 80 раз и выход 17%. OpaDAAO2, OpaDAAO3 и OpaDAAO4 очищались с помощью двойной анионообменной хроматографии с различными рН буферов для хроматографии с последующим обессоливанием. Степень очистки составила в диапазоне от 30 до 50 раз и выходы после очистки составили 11–18%.

Таблица 4.4.

Физические параметры ОраDAAO и результаты очистки

	ОраDAAO1	ОраDAAO2	ОраDAAO3	ОраDAAO4	ОраDASPO
Расчетные изoeлектрические точки	7.8	7.2	8.5	5.8	6.8
Схема очистки	Катионо-обменная хроматография Обессоливание	Двойная анионообменная хроматография Обессоливание	Двойная анионообменная хроматография Обессоливание	Двойная анионообменная хроматография Обессоливание	Фракционирование (NH ₄) ₂ SO ₄ Диализ Двойная анионообменная хроматография Обессоливание
Степень очистки	80	50	30	50	700
Выход после очистки, %	17	12	11	18	40
Теоретическая масса мономера	37600	37800	38900	36000	38500
Олигомерная форма	Мономер	Димер	Димер	Мономер	Мономер

Данная схема очистки была выбрана для получения более чистых препаратов фермента, так как после однократной хроматографии оставалось недопустимо большое количество примесных белков. ОраDASPO концентрировали и очищали из культуральной среды из-за лизиса клеток, индуцированного экспрессией ОраDASPO. Степень очистки подобным методом получилась максимальная среди всех ОраDAAO и составила более 700 раз и выход после очистки получился 40%. Чистота всех полученных белков была выше 90% по SDS-PAGE, отношение A_{280}/A_{455} , характеризующее чистоту ферментных препаратов и количество примесных белков, составило 7.3–9.1 для разных ОраDAAO (Таблица 4.4).

Нами была проведена гель-фильтрация для определения олигомерной формы ферментов. При концентрации 0.1 мг/мл ОраDAAO1, ОраDAAO4,

ОраDASPO элюировались с колонки в виде мономерной формы и ОраDAAO2, ОраDAAO3 выходили в виде димерной формы.

Чтобы доказать присутствие нековалентно связанного FAD, нами были изучены спектры нативного и супернатанта инактивированных ферментов, а также спектры ферментов с восстановленной молекулой FAD. Все ферменты имеют типичный для DAAO спектр поглощения с двумя максимумами, соответствующими флавину в видимой области. (Рис 4.3). Спектры в видимой и ультрафиолетовой области и ВЭЖХ анализ супернатанта раствора денатурированного белка, инкубированного 10 минут при 95°C, показывают присутствие свободных молекул FAD, что свидетельствует о нековалентном взаимодействии FAD с белковой глобулой. Коэффициенты экстинкции связанной молекулы FAD внутри глобулы изучаемых ферментов находятся в диапазоне от 10100 до 12900 $M^{-1}cm^{-1}$ при 455 нм (максимуме поглощения FAD). Инкубация с субстратами ведет к исчезновению пиков, соответствующих окисленной форме FAD.

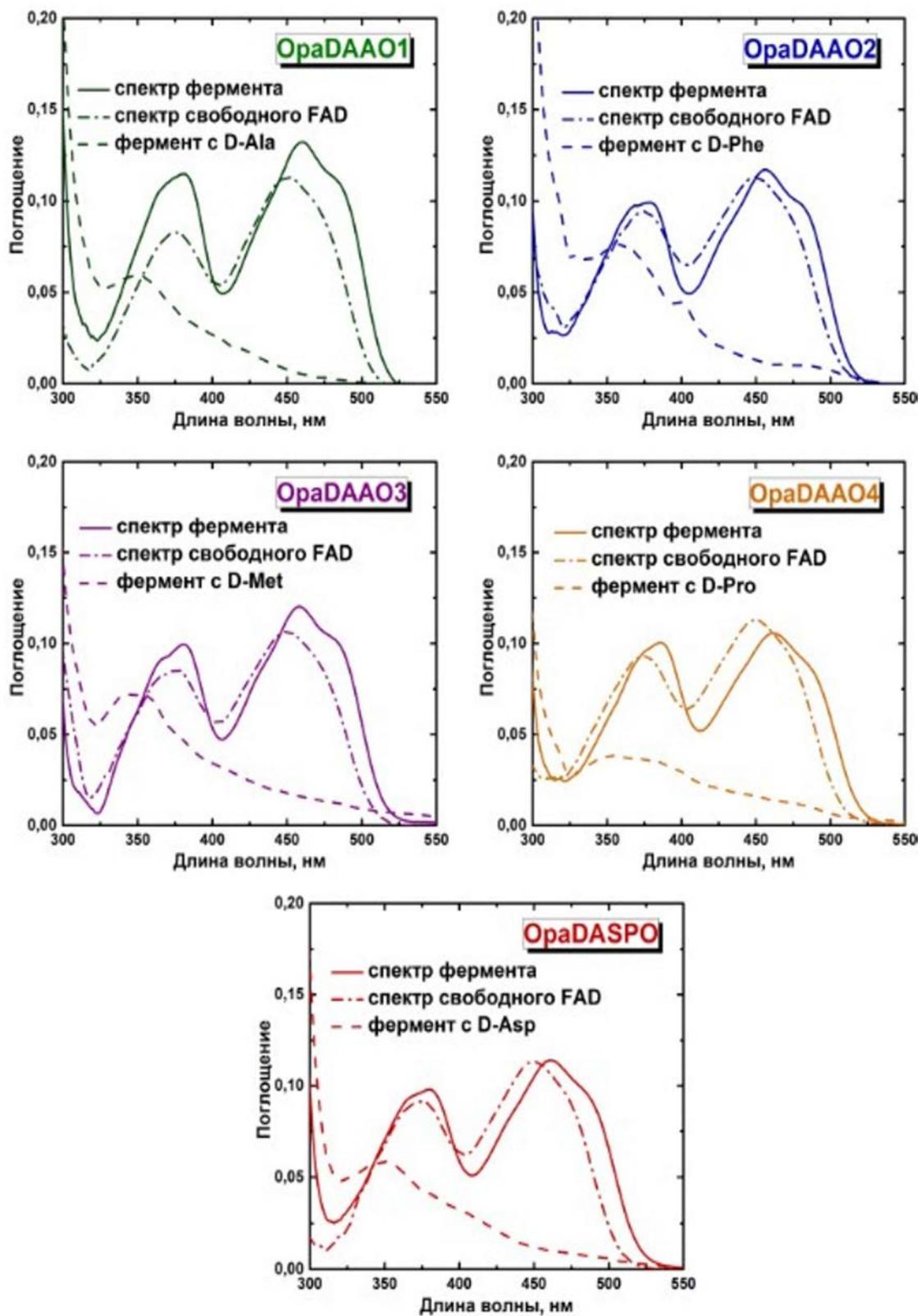


Рис. 4.3. Спектры поглощения OpaDAAO, супернатанта инактивированного белка и фермента с субстратом.

4.3. Изучение и сравнительная характеристика новых ОраDAAO

4.3.1. Изучение влияния рН на активность и стабильность ОраDAAO

Для оптимизации условий хранения и определения активностей необходимо подобрать буферы, в которых ферменты проявляют наибольшую активность и инактивируются меньше всего. На активность и стабильность ферментов влияет рН среды и ионная сила раствора. Нами были изучены зависимости активности и стабильности ферментов от этих параметров. Для всех измерений использовали комбинированный 50 мМ Na-ацетат-фосфат-Трис-глицин буфер, чтобы иметь буферную емкость в максимально широком диапазоне значений рН. После определения величины рН, при котором фермент проявляет максимальную активность, влияние ионной силы изучалось в фосфатных буферах подобранных значений рН различных концентраций. Влияние рН и ионной силы на стабильность ферментов изучали, измеряя активность после инкубации ферментов в различных буферах при высоких температурах в течение 10 минут.

Как было сказано во введении, все известные на данный момент дрожжевые оксидазы D-аминокислот обладают различающимися рН-профилями стабильности и активности, что является одной из проблем применения DAAO на практике. В случае ОраDAAO1 мы получили именно такие зависимости, однако для остальных ферментов, в особенности ОраDAAO2, ОраDAAO3 и ОраDASPO, оказалось, что рН-профили их стабильности и активности практически совпадают (рис. 4.4.).

ОраDAAO1 имеет наивысшую активность при $\text{pH} > 8$, и рН-профиль стабильности ОраDAAO1 сильно отличается от рН-профиля активности, представляя собой колоколообразную зависимость с наивысшей стабильностью при рН 6.5. Профили рН-активности и стабильности ОраDAAO2 практически совпадают и представляют собой стандартную колоколообразную зависимость активности от рН с максимумом в диапазоне от 6.0 до 8.5. В случае ОраDAAO3 профили имеют такую же, но менее широкую колоколообразную зависимость с максимумом в диапазоне 7.5–9.0 с явно выраженным пиком при рН 8.0, причем профиль рН-активности оказался менее широким, чем профиль стабильности. ОраDAAO4 имеет узкие смещенные вправо ассиметричные зависимости похожие друг на друга

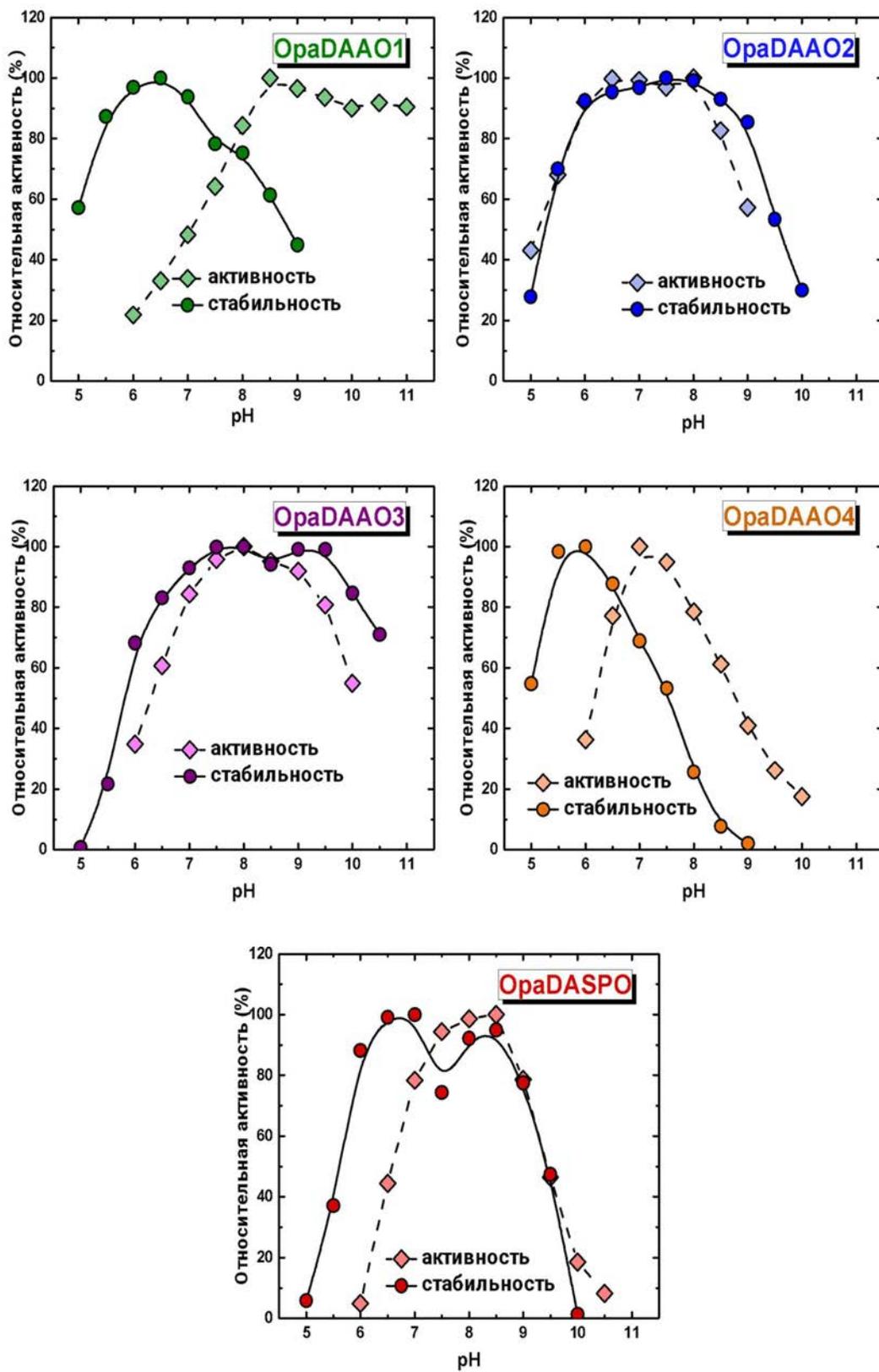


Рис. 4.4. Влияние рН на активность и стабильность OpaDAAO

по форме, но с различающимися максимумами. В случае рН-активности максимум достигается при рН 7.0, в случае рН-стабильности – при рН 6.0. ОраDASPO имеет стандартные колоколообразные зависимости с максимумами при рН 7.0–9.0. Примечательно, что профиль рН-стабильности ОраDASPO имеет ярко выраженный провал при рН 7.5. В случае профиля рН-активности данный эффект не наблюдается.

Далее было изучено влияние концентрации буферов на активности и стабильности изучаемых ферментов. В случае ОраDAAO1 и ОраDAAO2 активность и стабильность ферментов убывает с увеличением концентрации, причем для ОраDAAO1 этот эффект выражен сильнее. В случае ОраDAAO3 в исследуемом диапазоне активность практически не зависит от концентрации буфера, стабильность же незначительно уменьшается при высоких концентрациях. ОраDAAO4 имеет уникальную форму зависимости стабильности от концентрации буфера с пиком при 50 мМ и меньшей стабильностью как при 20 мМ, так и при 100 мМ и 200 мМ. В случае ОраDASPO стабильность сильно падает с увеличением концентрации буфера, активность практически не меняется.

По результатам экспериментов было решено использовать следующие буферы для хранения и измерения активностей (Таблица 4.5). В случае ОраDAAO1 было решено использовать 20 мМ НФБ рН 6.5 для хранения и 20 мМ Трис-НСl рН 8.0 для определения активности. В случае ОраDAAO2 было решено использовать 50 мМ НФБ рН 7.0 для хранения и 50 мМ НФБ рН 8.0 для проведения измерений активности. В случае ОраDAAO3 - 100 мМ НФБ рН 8.0 для хранения и такой же для проведения измерений активности. ОраDAAO4 – 50 мМ НФБ рН 6.0 для хранения и 50 мМ НФБ рН 7.0 для проведения измерений активности. И в случае ОраDASPO использовался 20 мМ НФБ рН 7.0 и 50 мМ НФБ рН 8.0 для хранения и измерения активностей соответственно. Во все буферы для хранения была сделана добавка 10% глицерина для повышения вязкости раствора и дополнительной стабилизации ферментов, также в случае ОраDAAO1 добавлялся 0,01% Triton X-100 для предотвращения агрегации фермента и сорбции на пластике, в случае ОраDAAO4 добавлялось 0.5 М сахарозы по результатам подбора добавок для стабилизации.

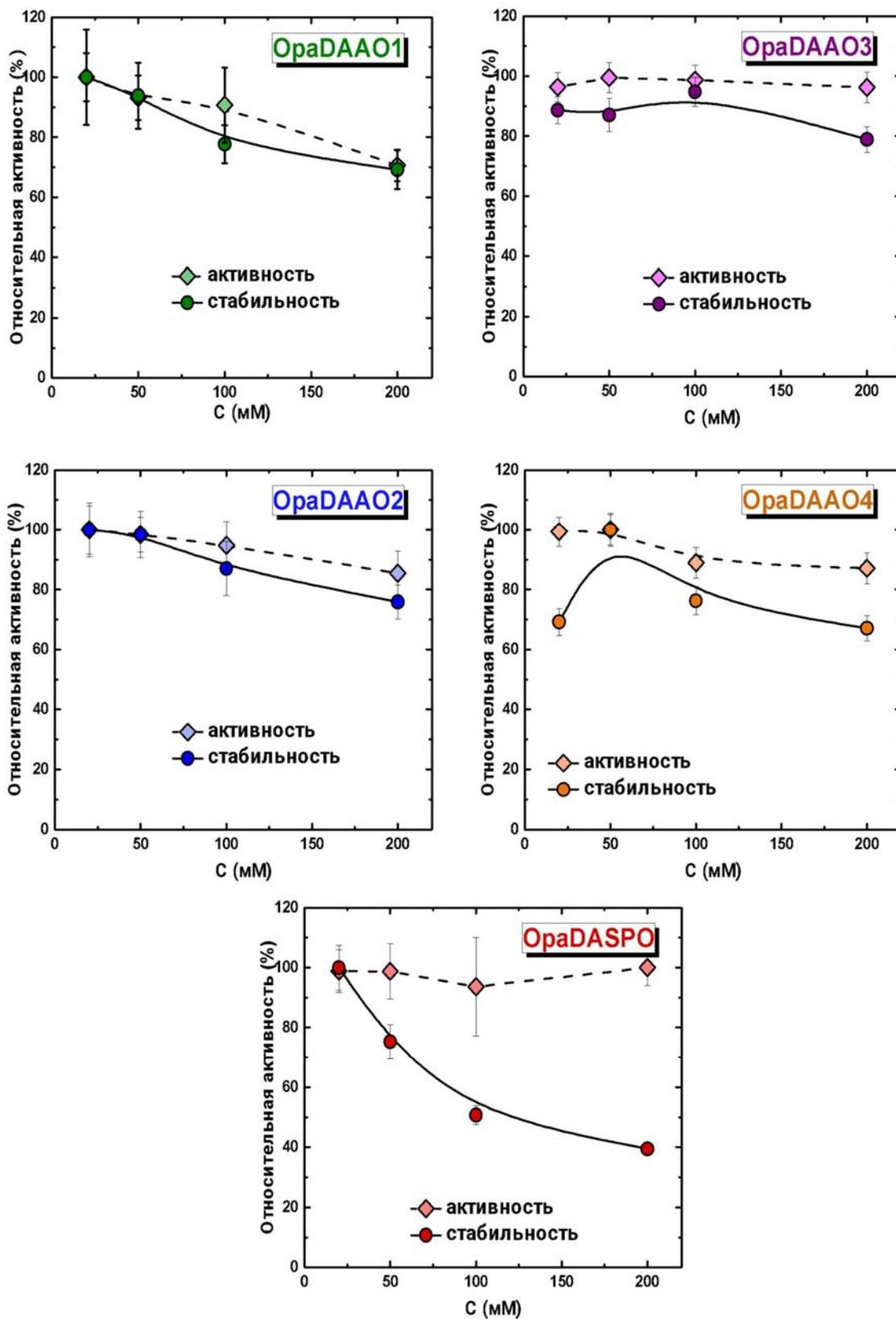


Рис 4.5. Влияние концентрации буфера на активность и стабильность OpaDAAO

Таблица 4.5

Буферы для очистки, хранения и определения активности ферментов.

Фермент	OpaDAAO1	OpaDAAO2	OpaDAAO3	OpaDAAO4	OpaDASPO
Буфер для хранения клеточной массы	HEPES 20 мМ pH 7.5	Трис-НСl 20 мМ pH 8.5	Трис-НСl 20 мМ pH 7.5	Трис-НСl 20 мМ pH 7.0	Трис-НСl 20 мМ pH 8.5
Буфер для хранения	20 мМ НФБ pH 6.5	50 мМ НФБ pH 7.0	100 мМ НФБ pH 8.0	50 мМ НФБ pH 6.0	20 мМ НФБ pH 7.0
Буфер для хранения, добавки	10% глицерин 0.01% Тритон Х-100	10% глицерин	10% глицерин	10% глицерин 0.5 М сахароза	10% глицерин
Буфер для определения активности	20 мМ Трис-НСl pH 8.0	50 мМ НФБ pH 8.0	50 мМ НФБ pH 8.0	50 мМ НФБ pH 7.0	50 мМ НФБ pH 8.0

4.3.2. Изучение влияния температуры на стабильность и активность OpaDAAO

После изучения влияния pH и концентрации буферов на активность и стабильность ферментов мы перешли к изучению влияния температуры на стабильность и активность ферментов (Рис. 4.6).

Профили температурной стабильности у всех изучаемых ферментов выглядят как типичные сигмоидальные кривые с температурой полуинактивации за 10 мин инкубации $T_{50}(10 \text{ мин})$ равными 48,4, 56,4, 53,7, 58,9 и 48,5 °C для OpaDAAO1, OpaDAAO2, OpaDAAO3, OpaDAAO4 и OpaDASPO соответственно. Наименее стабильными оказались ферменты OpaDAAO1 и OpaDAAO4, наиболее стабильным оказался фермент OpaDAAO3 с температурой полуинактивации более чем на 10 градусов выше, чем у OpaDAAO1 и OpaDAAO4.

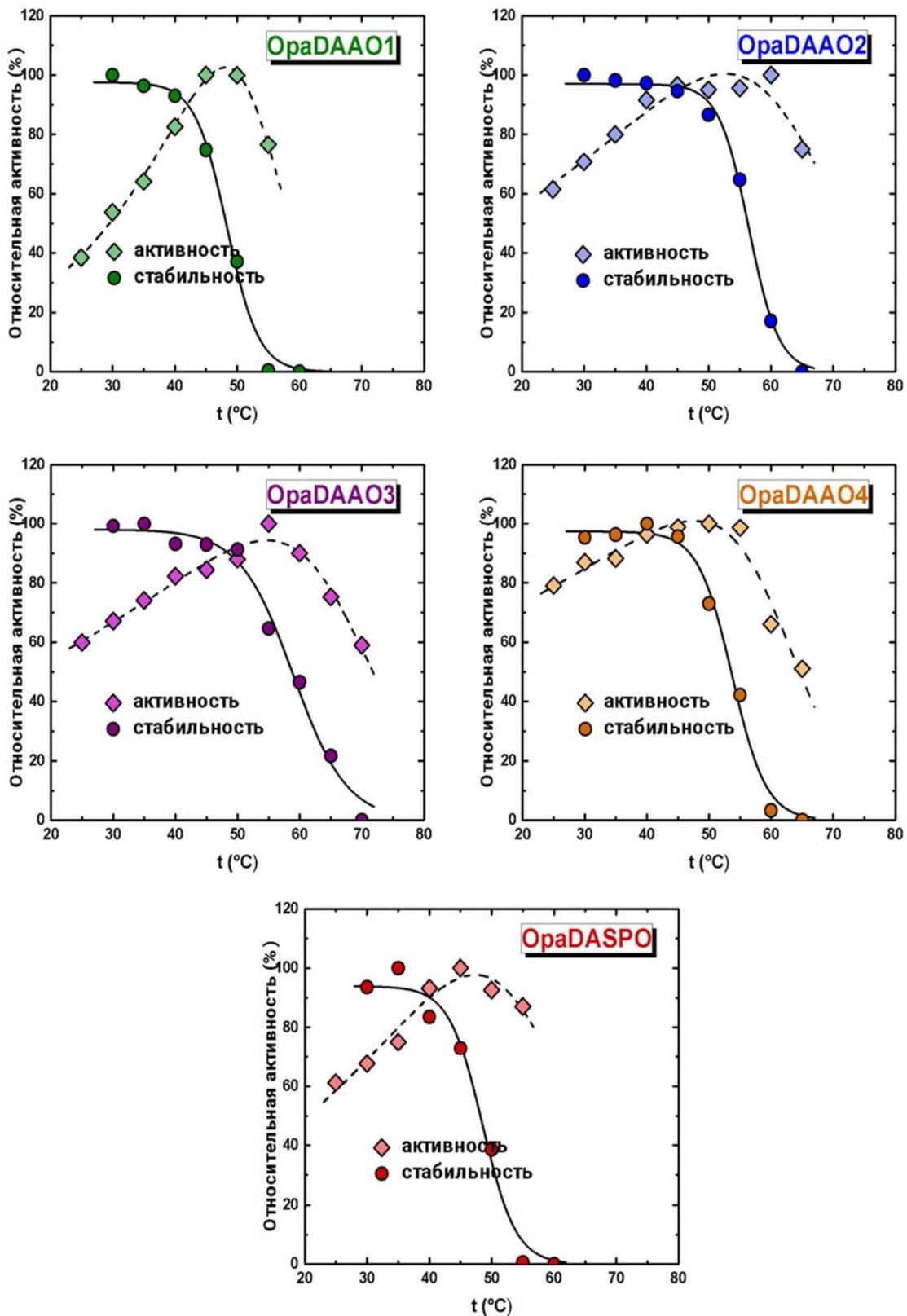


Рис. 4.6. Влияние температуры на активность и стабильность OpaDAAO.

Мы также изучили зависимости активности ферментов от температуры. Измерения проводили в течение 30 секунд. Так как при высоких температурах фермент успевает инактивироваться за время определения активности, также 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.

4.3.3. Изучение кинетики термоинактивации OpaDAAO1

Нами была изучена кинетика термоинактивации двух ферментов, имеющих наибольшую активность со своими субстратами и представляющими наибольший интерес для практического применения – мономера OpaDAAO1 и димера OpaDAAO3.

Для того, чтобы предположить механизм термоинактивации фермента, нами было изучено влияние концентрации фермента на его термостабильность, а также влияние экзогенного FAD. В случае OpaDAAO1 температурную зависимость изучали, варьируя температуру в диапазоне от 44 до 52 °C с шагом 2 °C. Инактивация проводилась до остаточной активности фермента 5-10% от начальной. На рис 4.7.1 представлены зависимости остаточной активности OpaDAAO1 от времени при различных температурах при постоянной концентрации фермента, равной 30 мкг/мл.

Повышение температуры ожидаемо приводит к понижению температурной стабильности фермента. Как правило, для большинства мономерных ферментов термоденатурация происходит по мономолекулярному механизму и зависимость остаточной активности от времени описывает одноэкспоненциальной функцией $y = A \cdot \exp(-k_1 \cdot x)$. Однако при термоинактивации OpaDAAO1 наблюдаемые зависимости в большинстве случаев плохо аппроксимировались моноэкспоненциальной функцией и гораздо лучше описывались суммой двух экспонент.

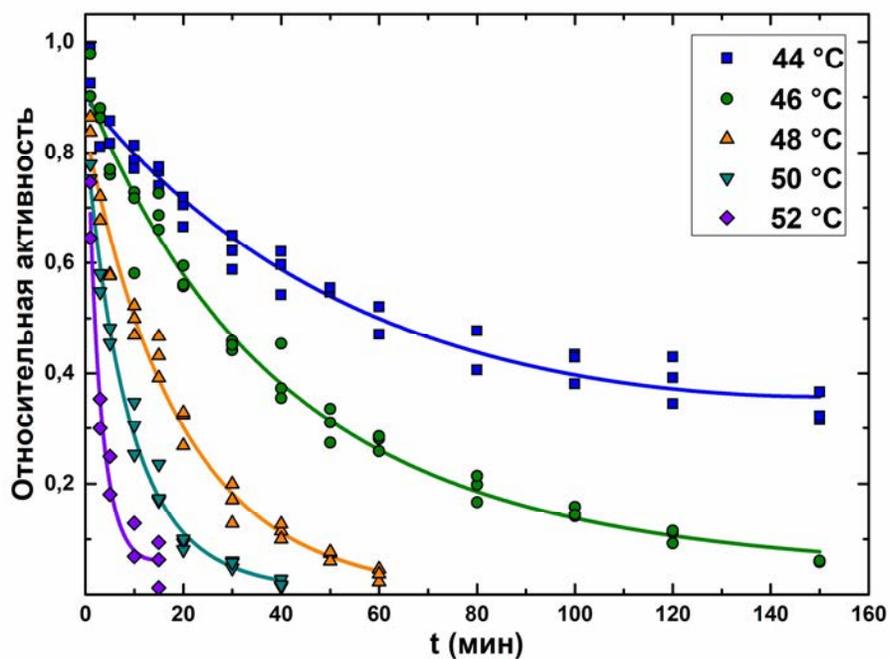


Рис. 4.7.1. Зависимость остаточной активности от времени при различных температурах. $C_E = 30$ мкг/мл, 20 мМ НФБ, рН = 6.5 + 10% (v/v) глицерина.

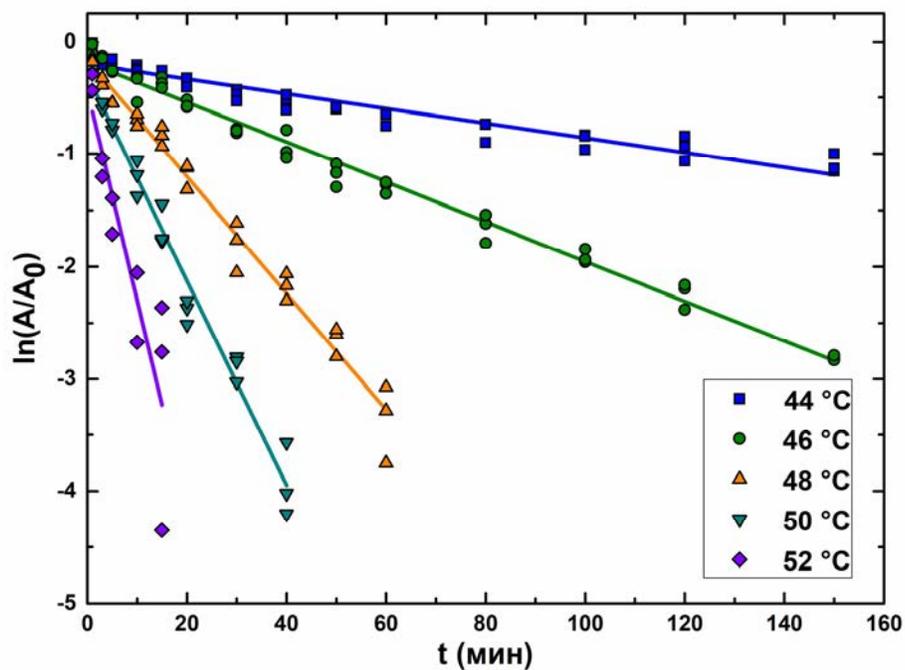


Рис. 4.7.2. Зависимость остаточной активности от времени при различных температурах в полулогарифмических координатах. $C_E = 30$ мкг/мл, 20 мМ НФБ, рН = 6.5 + 10% (v/v) глицерина.

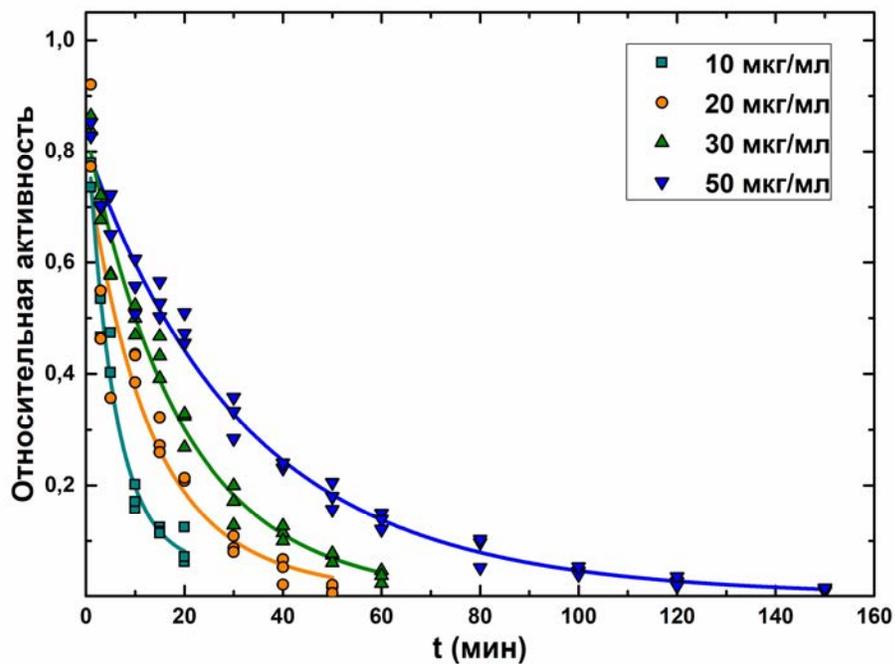


Рис. 4.7.3. Зависимость остаточной активности от времени при различных концентрациях, $t = 48^\circ\text{C}$, 20 мМ НФБ, $\text{pH} = 6.5 + 10\%$ (v/v) глицерина.

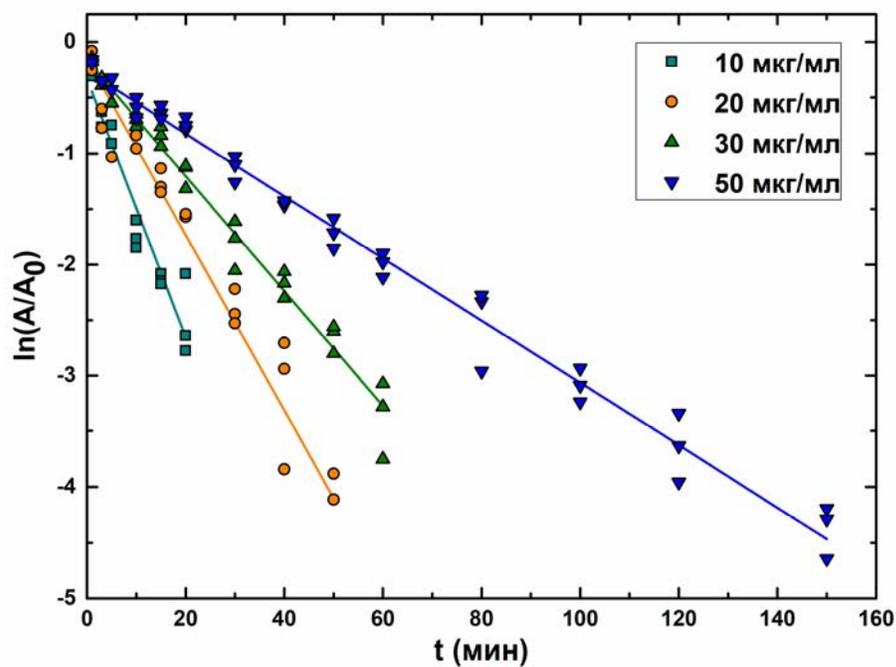


Рис. 4.7.4. Зависимость остаточной активности от времени при различных концентрациях в полулогарифмических координатах, $t = 48^\circ\text{C}$, 20 мМ НФБ, $\text{pH} = 6.5 + 10\%$ (v/v) глицерина.

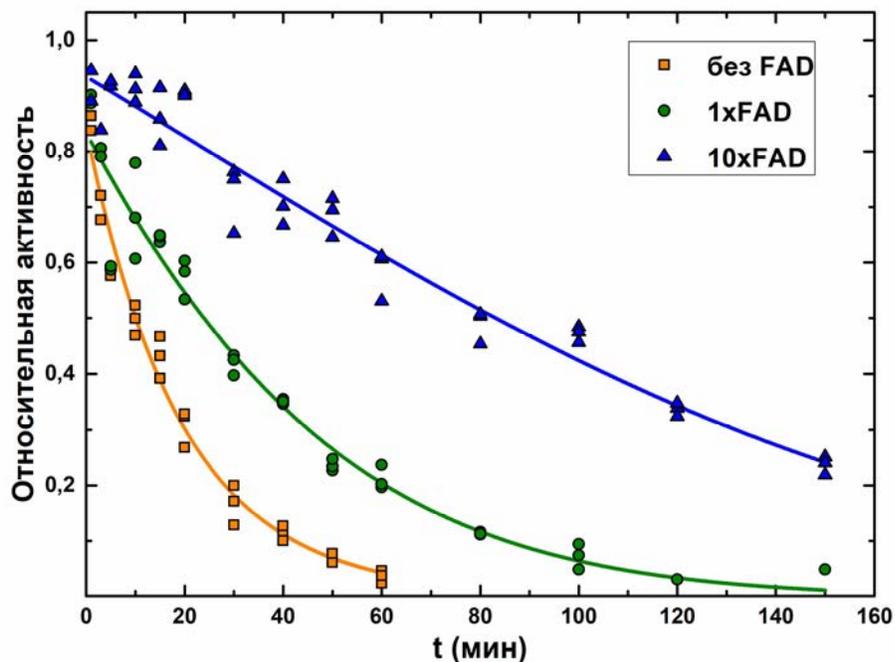


Рис. 4.7.5. Зависимости остаточной активности OraDAAO1 от времени при различных концентрациях экзогенного FAD. 20 мМ Na-фосфатный буфер, pH 6,5 с добавлением 10% (v/v) глицерина. $t^\circ = 48^\circ \text{C}$.

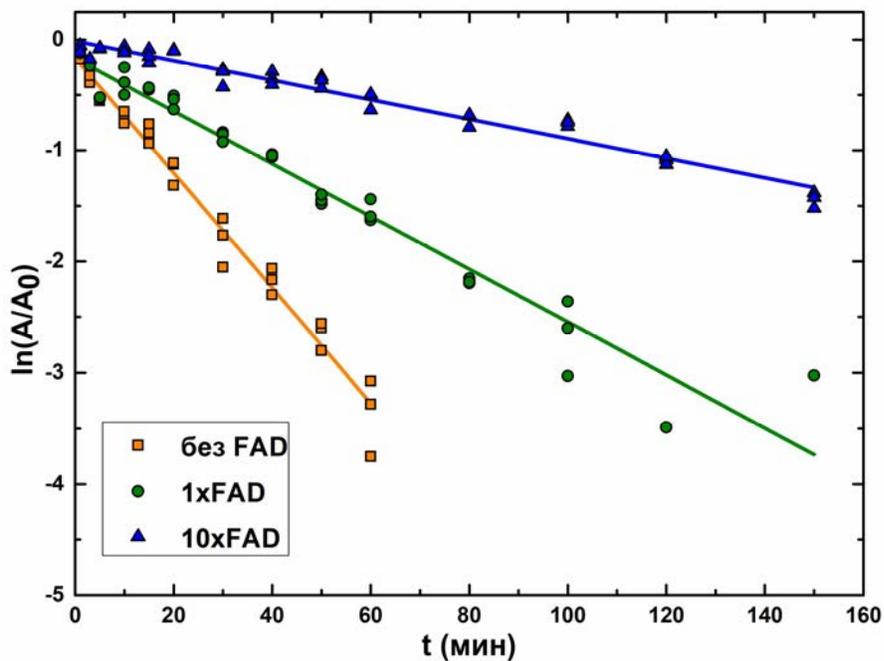


Рис. 4.7.6. Зависимости остаточной активности OraDAAO1 от времени при различных концентрациях экзогенного FAD в полулогарифмических координатах. 20 мМ Na-фосфатный буфер, pH 6,5 с добавлением 10% (v/v) глицерина. $t^\circ = 48^\circ \text{C}$.

Также, в случае полулогарифмических координат, несмотря на то что график зависимости логарифма относительной активности от времени не имеет характерного для биэкспоненциальной зависимости излома, линеаризованные зависимости не выходят из нуля. Все это свидетельствует о наличии сложного механизма термоинактивации данного фермента. Это может быть связано с быстрым установлением равновесия между разными формами фермента во время инактивации.

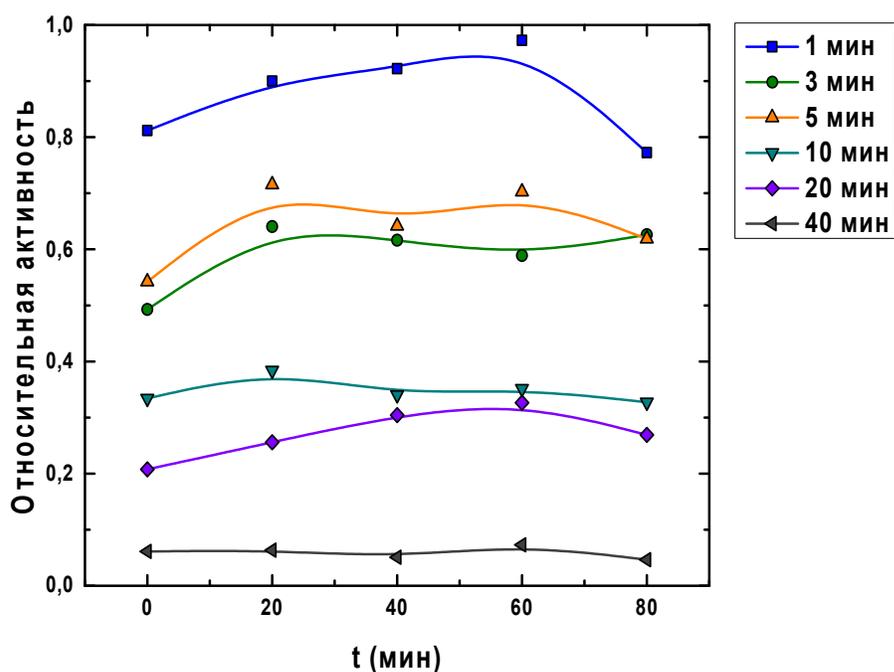


Рис. 4.7.7. Исследование реактивации препаратов ОраDAAO1, отобранных после заданного значения времени на стадии термоинактивации при 48 °С. 20 мМ Na-фосфатный буфер pH 6,5 с добавлением 10% (v/v) глицерина. Начальная концентрация фермента $[E]_0 = 30$ мкг/мл.

На рис. 4.7.3. представлены результаты исследования термоинактивации при 48 °С при различных концентрациях ОраDAAO1. Повышение начальной концентрации фермента приводит к увеличению стабильности фермента, что может свидетельствовать о наличии обратимой стадии второго порядка. Зависимости в полулогарифмических координатах представляют собой прямые, пересекающие ось y не в нуле.

Добавление экзогенного FAD в отношении с ферментом от 1:1 до 10:1 также приводит к повышению температурной стабильности фермента (рис. 4.7.5). Из этого

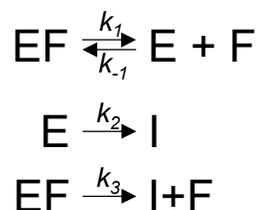
можно сделать предположение, что предложенная выше обратимая стадия второго порядка протекает с участием молекулы FAD. Зависимости в полулогарифмических координатах представляют собой прямые, пересекающие ось y не в нуле в отсутствие FAD и при отношении $[FAD]:[OpaDAAO1] = 1:1$. Однако при отношении $[FAD]:[OpaDAAO1] = 10:1$ отсекаемый на оси y отрезок достоверно нельзя отличить от нуля с учетом ошибки эксперимента. Это может свидетельствовать о смещении равновесной стадии в сторону активной формы OpaDAAO1.

Исходя из предположения о наличии при инактивации равновесной стадии диссоциации FAD можно ожидать, что при остановке воздействия повышенной температуры активность OpaDAAO1 будет восстанавливаться вследствие смещения равновесия в сторону исходного состояния фермента. Нами была изучена реактивация фермента (рис. 4.7.7.). Для этого фермент после инкубации при повышенной температуре переносили в лед и проводили определение его активности через определенные промежутки времени (0, 20, 40, 60 мин реактивации). В результате действительно оказалось, что фермент склонен к частичному восстановлению своей активности.

По результатам проведенных экспериментов можно сделать следующие выводы:

1. OpaDAAO1 в растворе находится в виде мономера.
2. Схема термоинактивации OpaDAAO1 включает в себя обратимую стадию второго порядка.
3. Эта обратимая стадия протекает с участием FAD.

Исходя из этих выводов мы сделали предположение, что инактивация OpaDAAO1 протекает по механизму, представленному на рис 4.7.8. Холоформа фермента EF представляет собой активную форму OpaDAAO1, $[E]_0$ – это начальная концентрация OpaDAAO1. В таком случае отношение $[EF]/[E]_0$ равно значению остаточной активности A/A_0 . Данная схема инактивации также объясняет процесс реактивации фермента, который заключается в переходе апоформы фермента в холоформу при остановке термоинактивации. Это происходит вследствие существенного уменьшения значений констант k_1 , k_2 , k_3 при охлаждении, что приводит к смещению равновесия в сторону исходной холоформы OpaDAAO1.



Предполагаемая схема температурной инактивации OpaDAAO1. EF и E – холо- и форма апоформы OpaDAAO1 соответственно. I – денатурированная форма OpaDAAO1, F – молекула FAD.

4.3.4. Изучение кинетики термоинактивации OpaDAAO3

Нами была изучена кинетика термоинактивации наиболее стабильного фермента – димера OpaDAAO3. Для того, что предположить механизм термоинактивации фермента, нами были проведены те же эксперименты, что и в случае OpaDAAO1. Температурную зависимость изучали, варьируя температуру в диапазоне от 56 до 64 °C с шагом 2 °C. Инактивация проводилась до остаточной активности фермента 5-10% от начальной.

На рис 4.8.1 представлены зависимости остаточной активности OpaDAAO3 от времени при различных температурах при постоянной концентрации фермента, равной 30 мкг/мл. Наблюдаемые зависимости хорошо аппроксимируется биэкспоненциальной функцией, а график зависимости логарифма относительной активности от времени имеет характерный излом.

Данный излом может свидетельствовать о наличии двух стадий процесса термоинактивации ферментов. Нами было установлено ранее методом гель-фильтрации, что OpaDAAO3 находится в димерной форме при концентрациях 0.1 мг/мл. Соответственно, можно предположить, что первой стадией процесса инактивации является диссоциация фермента на субъединицы, а второй стадией - его необратимая денатурация.

Из графика на рис. 4.8.3 видно, что кинетика термоинактивации зависит от концентрации фермента, что может свидетельствовать о наличии стадии второго порядка в процессе инактивации.

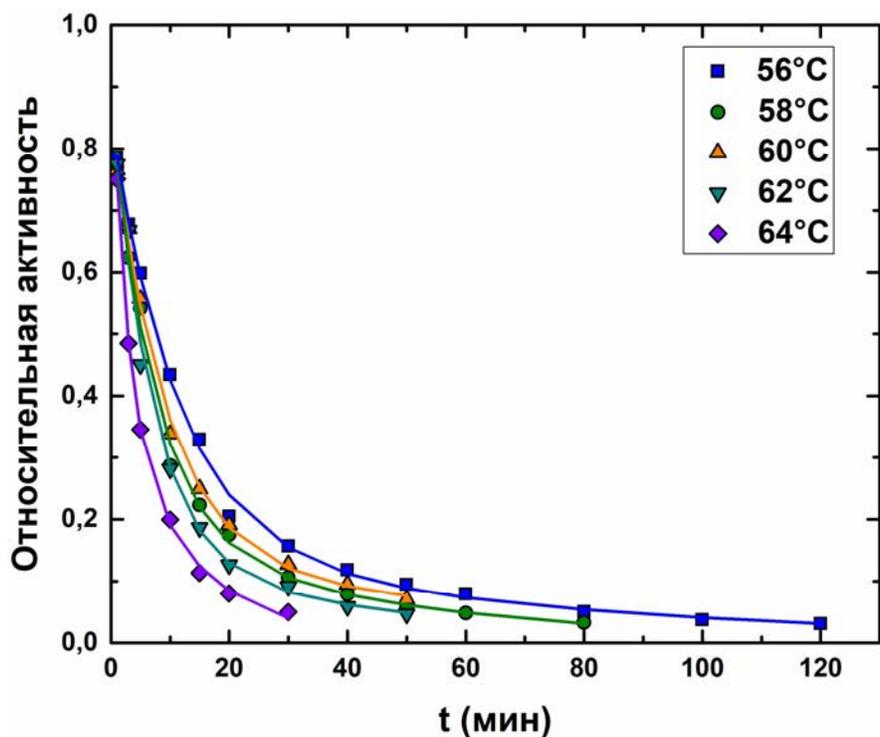


Рис. 4.8.1. Зависимость остаточной активности от времени при различных температурах. $C_E = 30$ мкг/мл, 50 мМ НФБ, pH = 8.0.

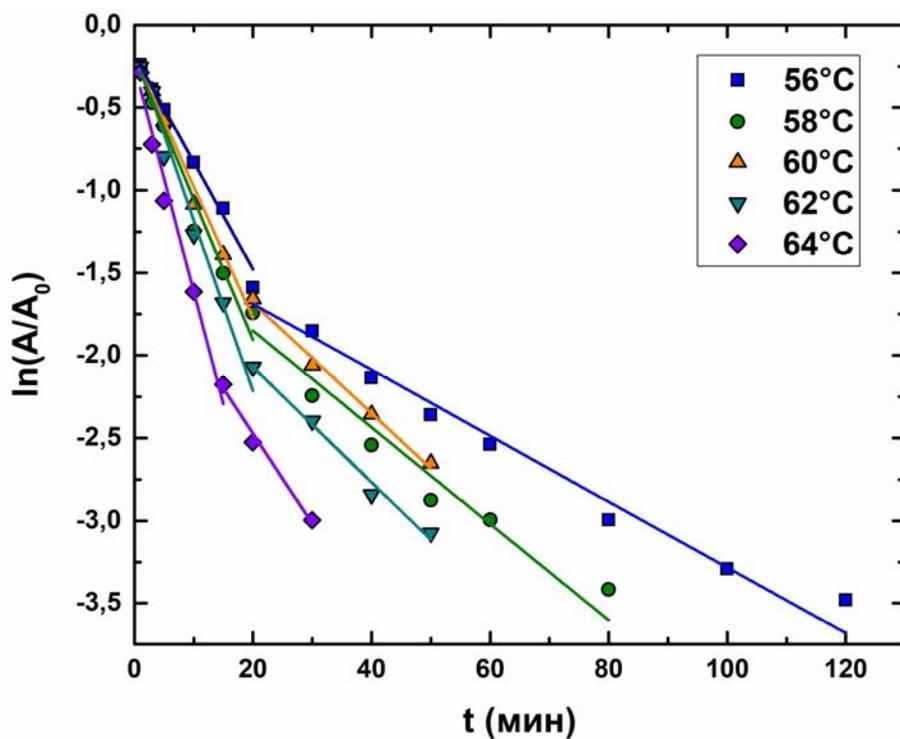


Рис. 4.8.2. Зависимость остаточной активности от времени при различных температурах в полулогарифмических координатах. $C_E = 30$ мкг/мл, 50 мМ НФБ, pH = 8.0.

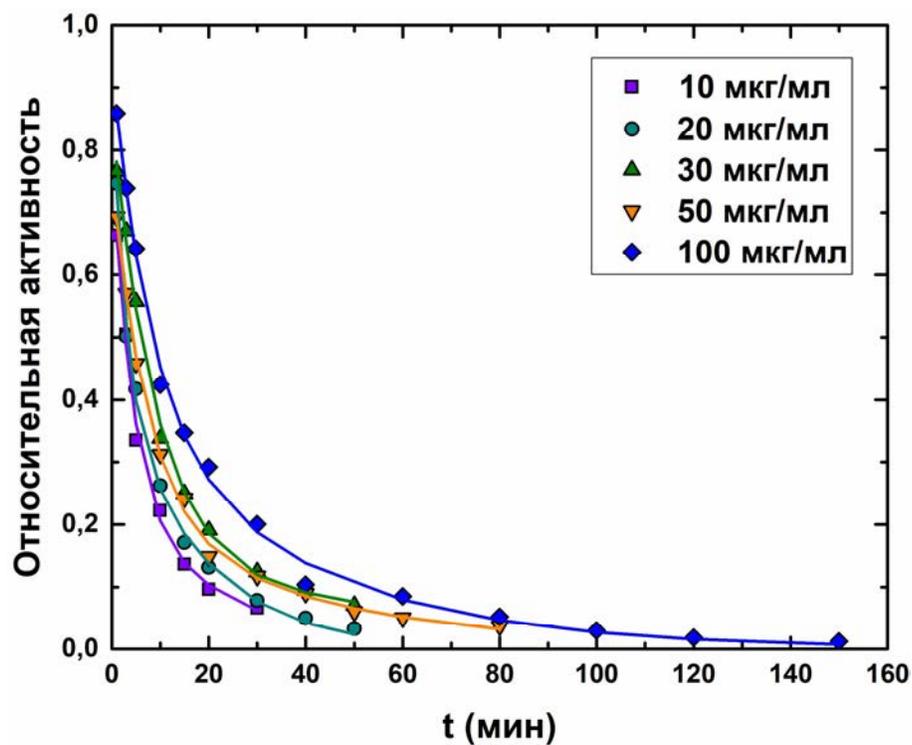


Рис. 4.8.3. Зависимость остаточной активности от времени при различных концентрациях, $t = 60^{\circ}\text{C}$, 50 мМ НФБ, $\text{pH} = 8.0$.

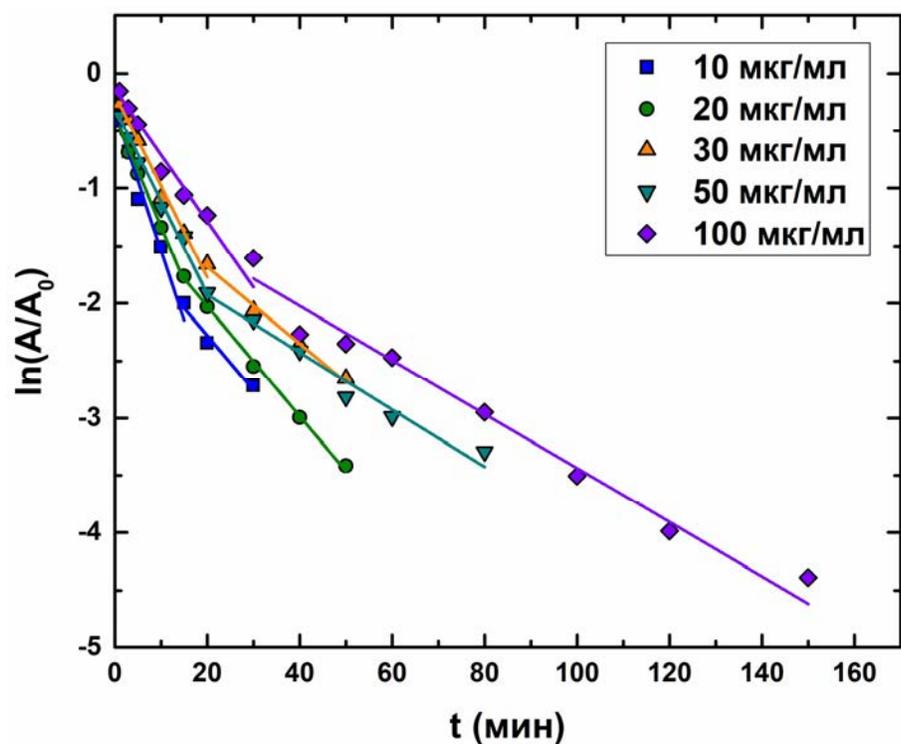


Рис. 4.8.4. Зависимость остаточной активности от времени при различных концентрациях в полулогарифмических координатах, $t = 60^{\circ}\text{C}$, 50 мМ НФБ, $\text{pH} = 8.0$.

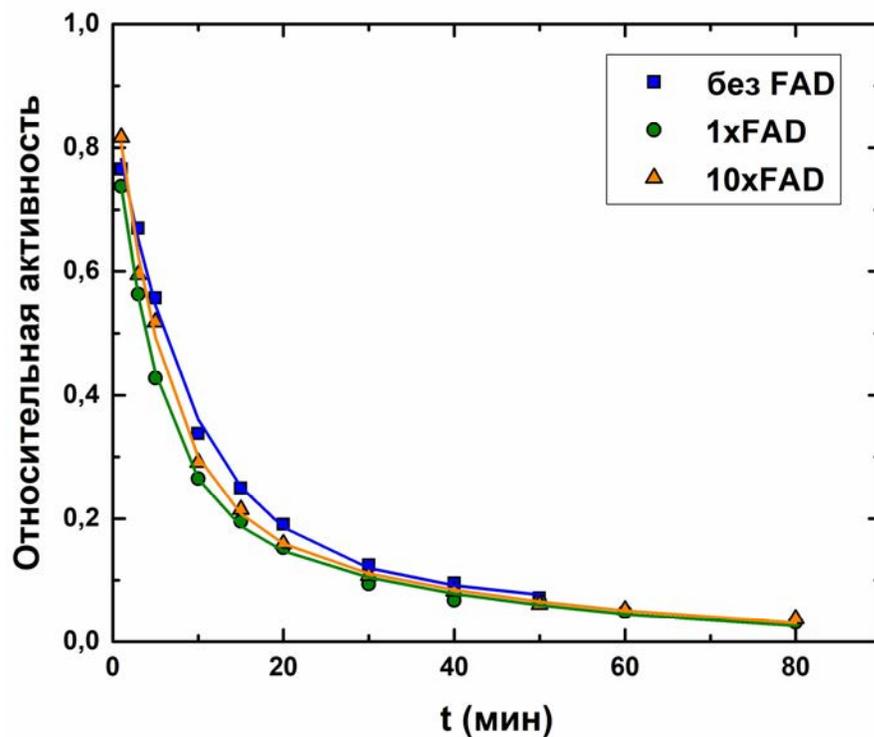


Рис. 4.8.5. Зависимость остаточной активности от времени при различных концентрациях FAD, $t^{\circ} = 60^{\circ}\text{C}$, $C_E = 30$ мкг/мл, 50 мМ НФБ, pH = 8.0.

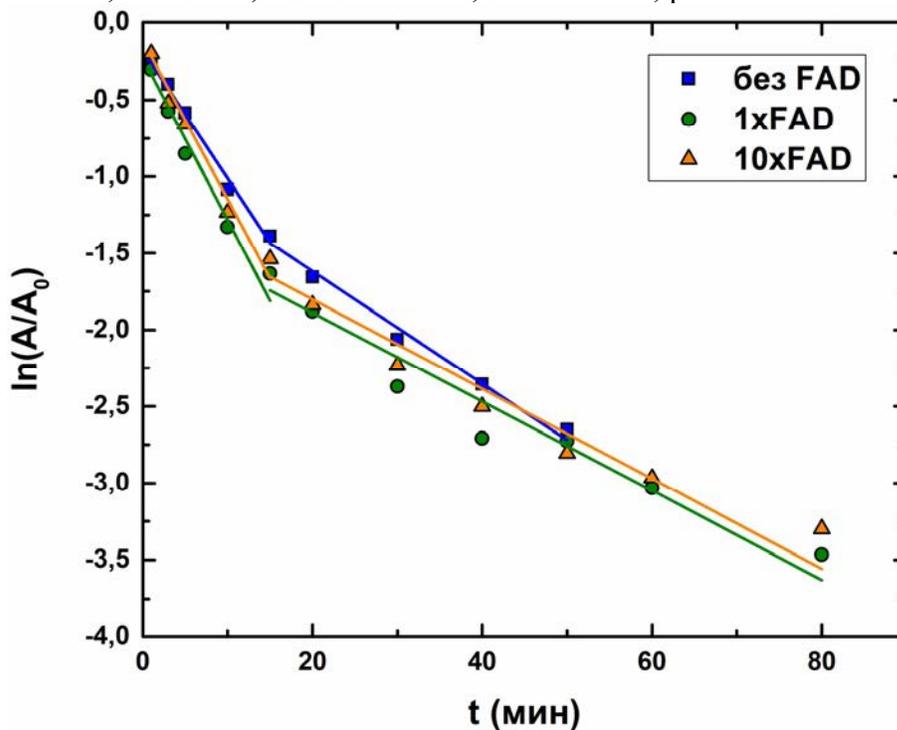


Рис. 4.8.6. Зависимость остаточной активности от времени при различных концентрациях FAD в полулогарифмических координатах, $t^{\circ} = 60^{\circ}\text{C}$, $C_E = 30$ мкг/мл, 50 мМ НФБ, pH = 8.0.

Нами было изучено влияние экзогенного кофактора FAD на кинетику термоинактивации. Часто у различных DAAO наблюдается стадия обратимой диссоциации FAD из белковой глобулы в процессе инактивации фермента. В таком случае добавление FAD в раствор фермента влияет на его термостабильность.

Оказалось, что в случае ОраDAAO3 добавление экзогенного FAD не влияет на кинетику инактивации фермента (Рис. 4.8.6.). Это означает, что в процессе инактивации ОраDAAO3 кофактор FAD либо не диссоциирует, либо диссоциирует только необратимо, без наличия стадии обратимой диссоциации.

Для того, чтобы установить присутствие стадии диссоциации FAD, нами был проведен эксперимент по гель-фильтрации образцов ОраDAAO3 различной степени инактивации (рис.4.8.7.).

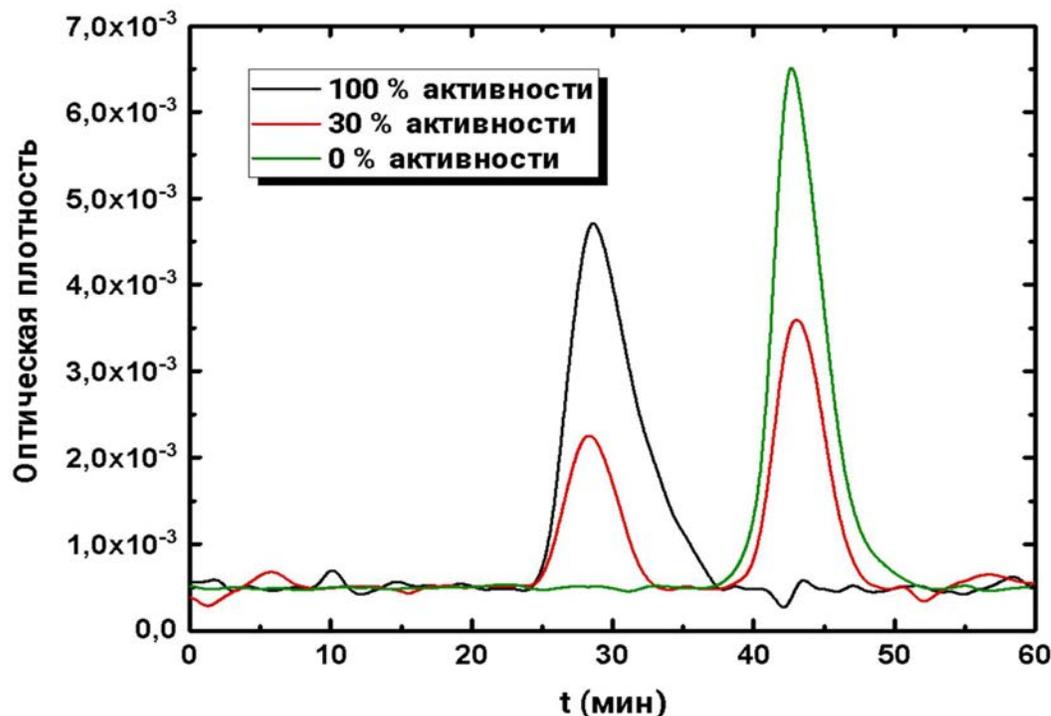


Рис. 4.8.7. Хроматограмма гель-фильтрации образцов ОраDAAO3 различной степени инактивации.

На рис. 4.7.5. черным цветом представлена хроматограмма нативного фермента, красным - фермента после инактивации, сохранившего 30% своей активности и зеленым цветом представлена хроматограмма полностью инактивированного фермента. Как видно, хроматограмма частично

инактивированного фермента содержит пик, соответствующий пику свободного FAD, что свидетельствует о наличии диссоциации FAD в процессе инактивации.

Исходя из всех вышеизложенных фактов, мы предлагаем следующую схему термоинактивации: 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.

4.4. Субстратная специфичность OpaDAAO

Все исследуемые OpaDAAO имеют разный профиль субстратной специфичности (Рис. 4.9). Все полученные ферменты показывают для всех D-аминокислот типичную зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, соответствующую схеме Михаэлиса-Ментен. Мы определили кинетические параметры ферментов с различными D-АК. Для OpaDAAO1 наибольшие каталитические константы (k_{cat}) наблюдались для субстратов D-Ala, D-Met, D-Leu, D-Ser, D-Val (240, 130, 103, 93.6, 70 s^{-1} соответственно). Для OpaDAAO2 наибольшие k_{cat} наблюдались для D-Phe, D-Tyr, D-Leu, D-Met (16.8, 12.4, 11.2, 8.8 s^{-1} соответственно). Для OpaDAAO3 наибольшие k_{cat} наблюдались для D-Val, D-Ala, D-Met, D-Asn, D-Phe (162, 145, 141, 115, 104 s^{-1} соответственно). Для OpaDAAO4 наибольшие k_{cat} наблюдались для D-Glu, D-Pro, D-Ser (15.1, 9.8, 6.5 s^{-1} соответственно). Для OpaDASPO наибольшие k_{cat} наблюдались для D-Asp, D-Glu (81.5, 47.8 s^{-1} соответственно).

Для OpaDAAO1 наименьшая константа Михаэлиса (K_M) наблюдалась для D-Ala, D-Met, D-Val (6.3, 10.1, 11 мМ соответственно). Для OpaDAAO2 наименьшая константа Михаэлиса (K_M) наблюдалась для D-Tyr and D-Trp (0.08 и 0.25 мМ соответственно). Для OpaDAAO3 наименьшая константа Михаэлиса (K_M) наблюдалась для D-Leu, D-Phe, D-Trp (0.178, 0.249, 0.3 мМ соответственно). Для OpaDAAO4 наименьшая константа Михаэлиса (K_M) наблюдалась для D-Pro (0.49 мМ). Для OpaDASPO наименьшая константа Михаэлиса (K_M) наблюдалась для

D-Asp and D-Glu (0.44 и 0.61 мМ соответственно). Только у ОраDAAO2 обнаружилась активность с цефалоспорином C ($k_{cat} = 13.2 \text{ с}^{-1}$, $K_M = 1.3 \text{ мМ}$).

Мы бы хотели отметить самые примечательные каталитические эффективности (k_{cat}/K_M). Для ОраDAAO1 наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Ala, D-Met, D-Val и D-Ser (38, 13.1, 6.3, 4.56 $\text{с}^{-1} \text{ мМ}^{-1}$ соответственно). Для ОраDAAO2 наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Tyr, D-Trp, D-Phe and CPC (150, 22, 13.8, 10 $\text{с}^{-1} \text{ мМ}^{-1}$ соответственно). Для ОраDAAO3 наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Leu, D-Phe, D-Trp, D-Val и D-Met (580, 420, 113, 90, 71 $\text{с}^{-1} \text{ мМ}^{-1}$ соответственно). Для ОраDAAO4 наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Pro и составило 20 $\text{с}^{-1} \text{ мМ}^{-1}$. Для ОраDASPO наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Asp и D-Glu (184, 78 $\text{с}^{-1} \text{ мМ}^{-1}$ соответственно).

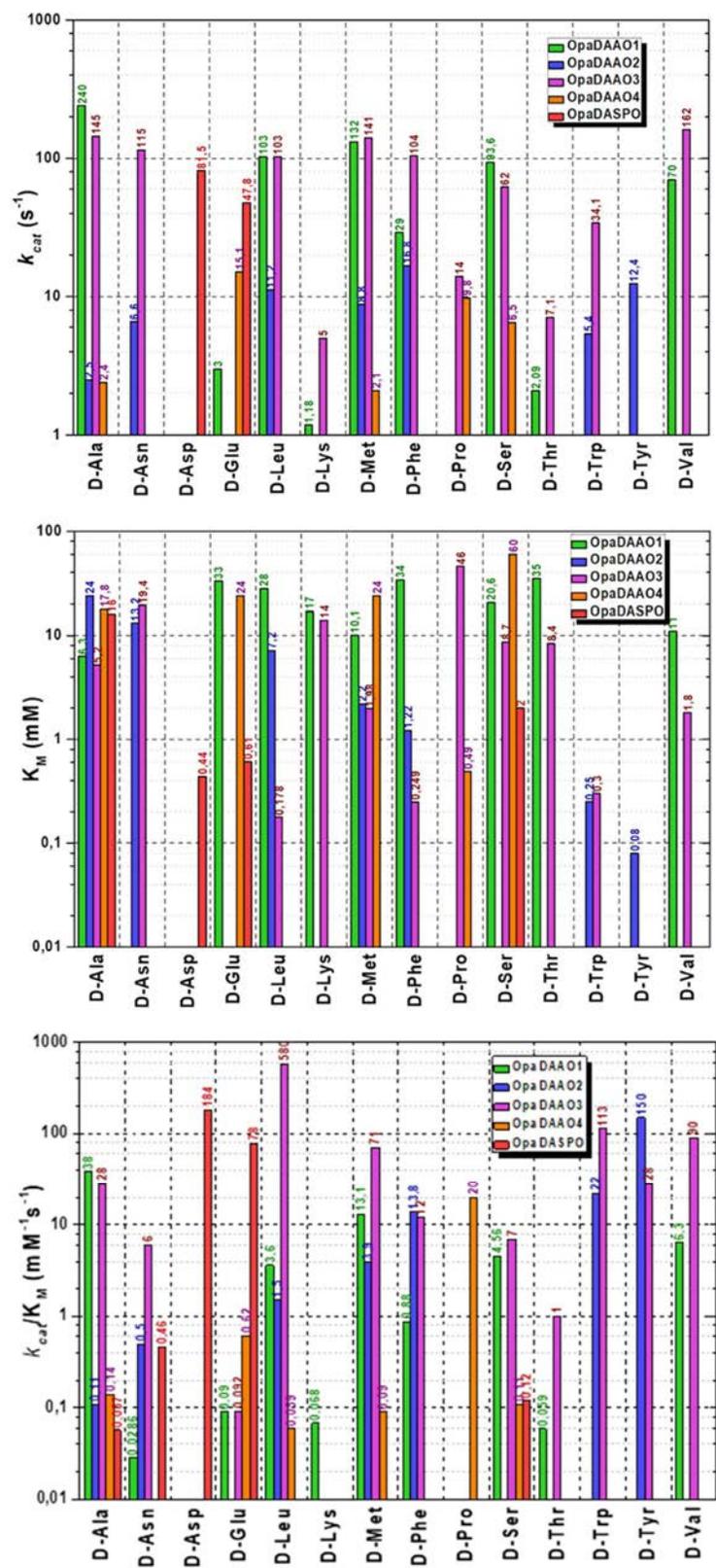


Рис. 4.9. Каталитические параметры k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M ферментов OpaDAAO с набором D-аминокислот.

Таблица 4.6.1.

Параметры k_{cat} для ОраDAAO.

D-АК	ОраDAAO1	ОраDAAO2	ОраDAAO3	ОраDAAO4	ОраDASPO
D-Ala	240±6	2.5±0.2	145±5	2.4±0.4	0.93±0.08
D-Asn	н.д.	6.6±0.5	115±6	н.д.	н.д.
D-Asp	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	81.5±1
D-Glu	3±0.4	н.д.	н.д.	15.1±1.3	47.8±0.9
D-Leu	103±5	11.2±0.8	103±4	н.д.	н.д.
D-Lys	1.18±0.1	н.д.	5±0.4	н.д.	н.д.
D-Met	132±4	8.8±0.4	141±6	2.1±0.3	н.д.
D-Phe	29±3	16.8±0.7	104±4	н.д.	н.д.
D-Pro	н.д.	н.д.	14±4	9.8±0.4	н.д.
D-Ser	93.6±1.4	н.д.	62±3	6.5±1.7	0.242±0.008
D-Thr	2.09±0.17	н.д.	7.1±0.4	н.д.	н.д.
D-Trp	н.д.	5.4±0.5	34.1±1.7	н.д.	н.д.
D-Tyr	н.д.	12.4±1.8	н.д.	н.д.	н.д.
D-Val	70±6	н.д.	162±6	н.д.	н.д.
CPC	н.д.	13.2±1.3	н.д.	н.д.	н.д.

Таблица 4.6.2.

Параметры K_M для ОраDAAO.

D-АК	ОраDAAO1	ОраDAAO2	ОраDAAO3	ОраDAAO4	ОраDASPO
D-Ala	6.3±0.5	24±5	5.2±0.5	17.8±1.4	16±4
D-Asn	н.д.	13.2±1.9	19.4±1.7	н.д.	н.д.
D-Asp	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	0.44±0.03
D-Glu	33±9	н.д.	н.д.	24±4	0.61±0.06
D-Leu	28±3	7.2±1.3	0.178±0.017	н.д.	н.д.
D-Lys	17±4	н.д.	14±3	н.д.	н.д.
D-Met	10.1±0.7	2.2±0.4	1.98±0.18	24±5	н.д.
D-Phe	34±6	1.22±0.15	0.249±0.017	н.д.	н.д.
D-Pro	н.д.	н.д.	46±19	0.49±0.1	н.д.
D-Ser	20.6±1.1	н.д.	8.7±1	60±30	2±0.3
D-Thr	35±7	н.д.	8.4±1.6	н.д.	н.д.
D-Trp	н.д.	0.25±0.08	0.3±0.05	н.д.	н.д.
D-Tyr	н.д.	0.08±0.03	н.д.	н.д.	н.д.
D-Val	11±3	н.д.	1.8±0.14	н.д.	н.д.
CPC	н.д.	1.3±0.4	н.д.	н.д.	н.д.

Таблица 4.6.3.

Параметры k_{cat}/K_M для OpaDAAO

D-АК	OpaDAAO1	OpaDAAO2	OpaDAAO3	OpaDAAO4	OpaDASPO
D-Ala	38±3	0.11±0.03	28±3	0.14±0.03	0.057±0.013
D-Asn	0.0286±0.0014	0.5±0.08	5.9±0.6	н.д.	0.46±0.03
D-Asp	н.д.	н.д.	н.д.	н.д.	184±10
D-Glu	0.09±0.03	н.д.	0.092±0.012	0.62±0.1	78±7
D-Leu	3.6±0.4	1.5±0.3	580±60	0.059±0.008	н.д.
D-Lys	0.068±0.015	н.д.	0.37±0.07	н.д.	н.д.
D-Met	13.1±0.9	3.9±0.6	71±7	0.09±0.03	н.д.
D-Phe	0.88±0.18	13.8±1.7	420±30	н.д.	н.д.
D-Pro	н.д.	н.д.	0.29±0.15	20±4	н.д.
D-Ser	4.56±0.19	н.д.	7.1±0.9	0.11±0.06	0.12±0.017
D-Thr	0.059±0.012	н.д.	0.84±0.16	н.д.	н.д.
D-Trp	н.д.	22±7	113±17	н.д.	н.д.
D-Tyr	н.д.	150±60	28±3	н.д.	н.д.
D-Val	6.3±1.4	н.д.	90±7	н.д.	н.д.
CPC	н.д.	10±3	н.д.	н.д.	н.д.

4.5. Сравнение новых OpaDAAO с DAAO из других источников

Мы собрали каталитические параметры наиболее изученных DAAO из различных литературных источников и сравнили их с полученными нами OpaDAAO. Данные собраны для D-аланина, D-аспартата, D-глутамата, D-метионина, D-пролина и D-серина как для наиболее изученных субстратов DAAO.

Таблица 4.7.1.

Каталитические параметры различных DAAO для D-аланина

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	83.3	0.8	102	[97]
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	81.3	1	81.3	[28]
ReDAAO	pH 8.0, 55°C	189	2.7	69.9	[19]
ОраDAAO1	pH 8.0, 30°C	240	6.3	38	Эта работа
ОраDAAO3	pH 8.0, 30°C	145	5.2	28	Эта работа
CbDAAO	pH 8.0, 30°C	117	4.28	27.4	[64]
pkDAAO	pH 8.3, 25°C	6.5	0.77	8.44	[99]
TvDAAO	pH 8.0, 30°C	109	17	6.54	[33]
hDAAO	pH 8.3, 25°C	5.5	0.9	6.11	[100]
pkDAAO	pH 8.5, 25°C	7.33	1.7	4.33	[28]
hDAAO	pH 8.3, 37°C	3.66	1.08	3.39	[8]
ceDAAO	pH 8.3, 37°C	14.9	6.89	2.17	[8]
ОраDAAO4	pH 7.0, 30°C	2.4	17.8	0.14	Эта работа
ОраDAAO2	pH 8.0, 30°C	2.5	24	0.11	Эта работа
ОраDASPO	pH 8.0, 30°C	0.93	16	0.057	Эта работа

Таблица 4.7.2.

Каталитические параметры различных DAAO для D-аспарагина

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
ОраDASPO	pH 8.0, 30°C	81.5	0.44	184	Эта работа
hDASPO	pH 8.3, 37°C	70.6	2.14	33	[8]
TdDASPO	pH 7.5, 60°C	123	8.77	14	[89]
ceDASPO-1	pH 8.3, 37°C	26.1	5.54	4.71	[8]
ceDASPO-2	pH 8.3, 37°C	9.49	4.2	2.26	[8]
ceDASPO-3	pH 8.3, 37°C	2.51	3.81	0.658	[8]
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	0.48	18	0.0267	[97]

Таблица 4.7.3.

Каталитические параметры различных DAAO для D-глутамата

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
TdDASPO	pH 7.5, 60°C	217	2.16	100	[89]
ОраDASPO	pH 8.0, 30°C	47.8	0.61	78	Эта работа

ceDASPO-1	pH 8.3, 37°C	35.4	1.06	33.4	[8]
ReDAAO	pH 8.0, 55°C	90.7	12.1	7.49	[19]
ceDASPO-2	pH 8.3, 37°C	3.01	0.8	3.76	[8]
ceDASPO-3	pH 8.3, 37°C	0.76	0.68	1.12	[8]
ОраDAAO4	pH 7.0, 30°C	15.1	24	0.62	Эта работа
hDASPO	pH 8.3, 37°C	5.54	40	0.139	[8]
ОраDAAO3	pH 8.0, 30°C	н.д.	н.д.	0.092	Эта работа
ОраDAAO1	pH 8.0, 30°C	3	33±9	0.09	Эта работа
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	1	77.3	0.0133	[97]

Таблица 4.7.4.

Каталитические параметры различных DAAO для D-метионина

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	К _м , мМ	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
ReDAAO	pH 8.0, 55°C	120	0.213	562	[19]
RgDAAO	pH 8.5, 25°C	76.7	0.2	425	[97]
TvDAAO	pH 8.0, 30°C	81	0.46	176	[33]
ОраDAAO3	pH 8.0, 30°C	141	1.98	71	Эта работа
ОраDAAO1	pH 8.0, 30°C	132	10.1	13.1	Эта работа
pkDAAO	pH 8.3, 25°C	6.83	0.65	10.5	[99]
CbDAAO	pH 8.0, 30°C	127	27.4	4.65	[64]
ОраDAAO2	pH 8.0, 30°C	8.8	2.2	3.9	Эта работа
ОраDAAO4	pH 7.0, 30°C	2.1	24	0.09	Эта работа

Таблица 4.7.5.

Каталитические параметры различных DAAO для D-фенилаланина

DAAO	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	К _м , мМ	k_{cat}/K_m , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
ОраDAAO3	pH 8.0, 30°C	104	0.249	420	Эта работа
TvDAAO	pH 8.0, 30°C	27	0.37	73	[33]
ОраDAAO2	pH 8.0, 30°C	16.8	1.22	13.8	Эта работа
pkDAAO	pH 8.3, 25°C	16.7	1.4	11.9	[99]
ceDAAO	pH 8.3, 37°C	25.1	2.72	9.21	[8]
hDAAO	pH 8.3, 37°C	9.89	2.59	3.82	[8]
ОраDAAO1	pH 8.0, 30°C	29	34	0.88	Эта работа

Таблица 4.7.6.

Каталитические параметры различных DAAO для D-пролина

ДААО	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	К _М , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
ОраДААО4	pH 7.0, 30°C	9.8	0.49	20	Эта работа
ркДААО	pH 8.3, 25°C	10.3	0.56	18.5	[99]
hДААО	pH 8.3, 25°C	15	1.7	8.82	[100]
RgДААО	pH 8.5, 25°C	77.3	21.5	3.6	[97]
ОраДААО3	pH 8.0, 30°C	14	46	0.29	Эта работа

Таблица 4.7.7.

Каталитические параметры различных ДААО для D-серина

ДААО	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	К _М , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
ОраДААО3	pH 8.0, 30°C	62	8.7	7.1	Эта работа
ОраДААО1	pH 8.0, 30°C	93.6	20.6	4.56	Эта работа
CbДААО	pH 8.0, 30°C	77.3	33.7	2.29	[64]
ркДААО	pH 8.3, 25°C	3	3.3	0.909	[99]
hДААО	pH 8.3, 25°C	2.83	3.6	0.787	[100]
TvДААО	pH 8.0, 30°C	20	37	0.54	[33]
hДААО	pH 8.3, 37°C	1.23	6.42	0.191	[8]
ОраДААО	pH 8.0, 30°C	0.242	2	0.12	Эта работа
ОраДААО4	pH 7.0, 30°C	6.5	60	0.11	Эта работа
сеДААО	pH 8.3, 37°C	1.51	20	0.075	[8]

Таблица 4.7.8.

Каталитические параметры различных ДААО для цефалоспорина С

ДААО	Условия измерения	k_{cat} , с ⁻¹	К _М , мМ	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	Источник
TvДААО E32R/F33D/F54S/ C108F/M156L/C2 98G	pH 8.0 30 °C	0.8	65	79	[33]
TvДААО E32R/F33D/F54S/ C108F/M156L	pH 8.0 30 °C	1.6	106	66	[33]
TvДААО F54S/C108F/M15 6L	pH 8.0 30 °C	1.9	119	60	[33]
TvДААО E32R/F33D/F54S/ C108F/M156L/C2 98Q	pH 8.0 30 °C	1.4	68	50	[33]

TvDAAO E32R/F33D/F54S/ C108F	pH 8.0 30 °C	1.9	88	45	[33]
TvDAAO E32R/F33D/F54S/ C108F/M156L/C2 98N	pH 8.0 30 °C	2.9	121	42	[33]
TvDAAO C108A	pH 8.0 30 °C	23	0.71	31.8	[103]
TvDAAO	pH 8.5 25C	71.7	2.4	29.8	[66]
TvDAAO E32R/F33D/C108 F	pH 8.0 30 °C	1.15	25.5	22	[33]
TvDAAO C108F	pH 8.0 30 °C	21	0.99	21.3	[103]
RgDAAO	pH 8.5 25C	73.3	4	18.3	[66]
TvDAAO F54S	pH 7.5 22 °C	16.7	0.9	18.3	[103]
TvDAAO	pH 8.0 30 °C	36	1.4	18	[33]
TvDAAO F54A	pH 7.5 22 °C	18.3	1.2	15.7	[103]
OpaDAAO2	pH 8.0 30 °C	13.2	1.3	10	Эта работа
TvDAAO F54Y	pH 7.5 22 °C	36.7	4.8	7.83	[103]
TvDAAO	pH 8.0 30 °C	19	2.6	7.2	[102]
TvDAAO	pH 7.5 22 °C	6.17	1.6	3.83	[102]
TvDAAO C108S	pH 8.0 30 °C	10.8	5.6	1.9	[102]
pkDAAO	pH 8.5 25C	0.65	2.3	0.283	[66]

На основе собранных данных можно сделать вывод, что OpaDAAO1 обладает лучшей каталитической константой по D-аланину и D-серину среди всех изученных DAAO. OpaDAAO3 и OpaDAAO1 обладают лучшими каталитическими константами по D-метионину и D-фенилаланину. OpaDASPO обладает лучшими K_M по D-аспартату и D-глутамату среди всех известных DASPO. OpaDAAO3 обладает лучшей K_M по D-фениланину, OpaDAAO4 – по D-пролину. OpaDASPO является безусловным лидером в каталитической эффективности по D-аспарагину, обладая более чем в 5 раз большей каталитической эффективностью, чем следующая за ней человеческая DAAO. OpaDAAO3 обладает лучшей каталитической эффективностью по D-фенилаланину среди всех изученных DAAO. OpaDAAO4 обладает лучшей каталитической эффективностью по D-пролину среди всех изученных DAAO. OpaDAAO3 и OpaDAAO1 обладают лучшими каталитическими эффективностями по D-серину среди всех изученных DAAO.

4.6. Построение и анализ модельных 3D-структур OpaDAAO

Нами были построены модельные структуры изученных OpaDAAO и проанализированы активные центры этих ферментов. Модельные структуры были построены с помощью недавно созданной программы AlphaFold2 – это программа на базе искусственного интеллекта, разработанная Google DeepMind, которая выполняет предсказания протранственной структуры белков [105]. Данная программа набрала более 90 баллов в конкурсе по предсказанию структур белков CASP в 2020 году, что является абсолютным рекордом за все время проведения конкурса (100 баллов соответствует полному совпадению предсказанной и экспериментальной структуры). Использование данной программы позволяет анализировать активные центры ферментов, что может быть полезно при поиске новых ферментов с необходимой субстратной специфичностью на основе секвенированных геномов.

Мы смоделировали OpaDAAO с D-АК, имеющими минимальную K_M , а значит наилучшее связывание в активном центре (Рис 4.10). Полученные структуры сравнивали со структурой RgDAAO в качестве модельной. Во всех случаях мы наблюдаем остатки Arg в положении, соответствующем связыванию карбоксильной группы D-АА (Arg283 для OpaDAAO1, Arg285 для OpaDAAO2, Arg290 для OpaDAAO3, Arg277 для OpaDAAO4, Arg296 для OpaDASPO). Для OpaDAAO1, OpaDAAO2 и OpaDAAO3 остаток тирозина также участвует в связывании карбоксильной группы D-АА (Tyr224 для OpaDAAO1, Tyr226 для OpaDAAO2 и Tyr230 для OpaDAAO3). Для всех OpaDAAO атом кислорода полипептидной цепи участвует в связывании аминогруппы D-АА (Gly310 для OpaDAAO1, Gly313 для OpaDAAO2, Gly318 для OpaDAAO3, Asn303 для OpaDAAO4, Gly323 для OpaDASPO).

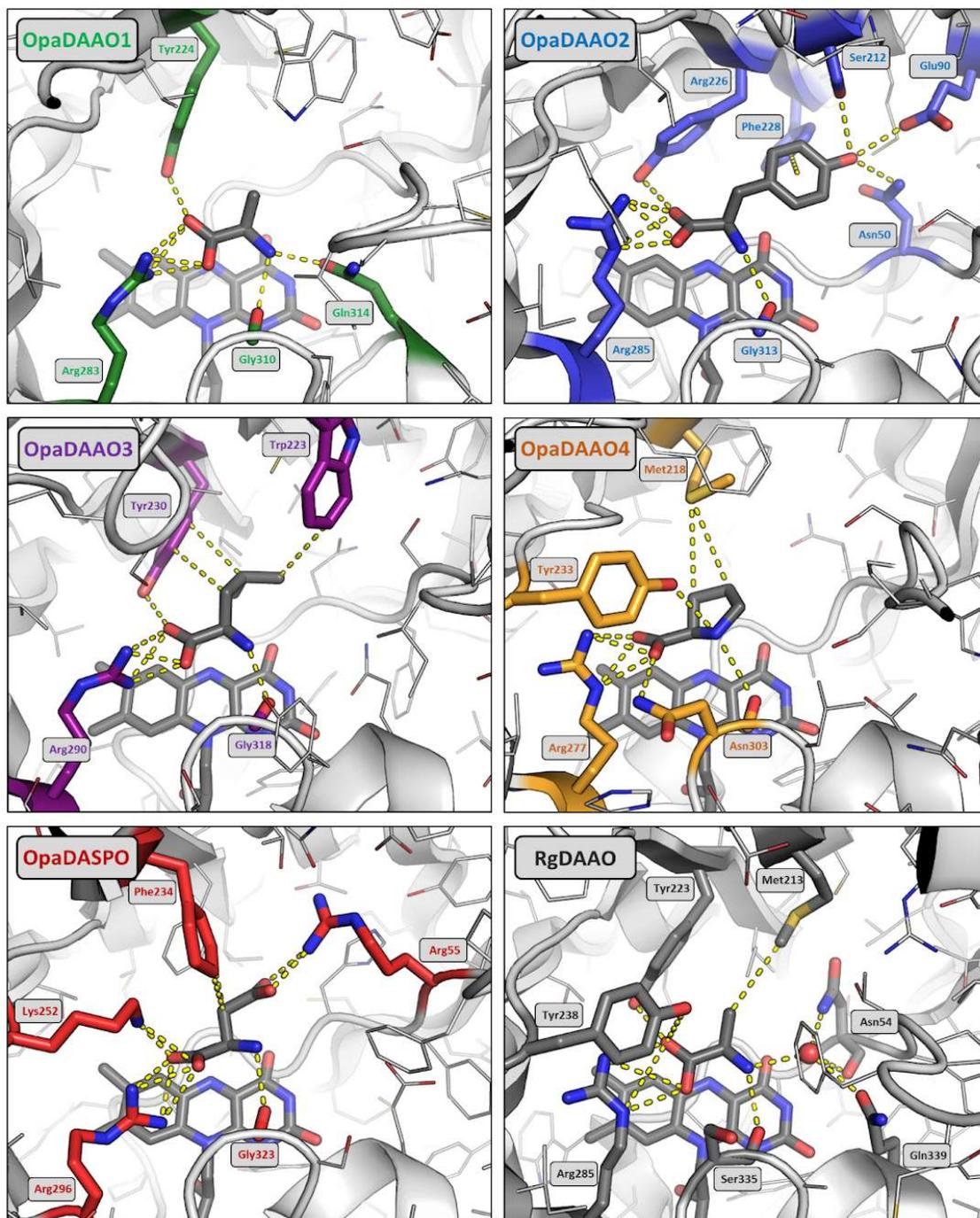
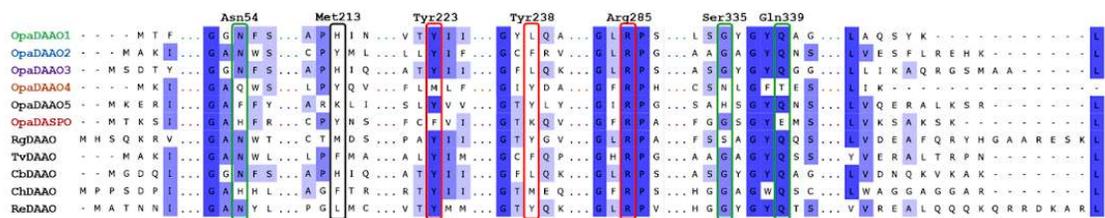


Рис 4.10. Модели активных центров изучаемых ферментов. На каждом из рисунков показаны остатки, участвующие в связывании субстрата.

В RgDAAO Arg285 и Tyr223 участвуют в связывании карбоксильной группы D-АК [50]. Arg285 в RgDAAO соответствует остаткам аргинина, имеющимся во всех OpaDAAO. У остатка Tyr223 в RgDAAO есть соответствующие остатки в OpaDAAO1, OpaDAAO2, OpaDAAO3 и OpaDAAO5. В случае OpaDAAO4 и OpaDASPO в похожей позиции находятся остатки метионина и фенилаланина.

В RgDAAO карбонильный кислород Ser335 участвует в связывании аминокислоты D-АК. Соответствующими остатками в случае OpaDAAO являются Gly для OpaDAAO1, OpaDAAO2, OpaDAAO3 и OpaDASPO, Asn для OpaDAAO4 и His для OpaDAAO5.

Asn54 и Gln339 связывают D-аминокислоты через водородные связи с молекулой воды как посредником в RgDAAO. Остатки, соответствующие Asn54 в RgDAAO это Asn для OpaDAAO1, OpaDAAO2, OpaDAAO3, Gln для OpaDAAO4, His для OpaDASPO и Phe для OpaDAAO5. Остатки, соответствующие Gln339 в RgDAAO это Gln для OpaDAAO1, OpaDAAO2, OpaDAAO3, OpaDAAO5, Thr для OpaDAAO4 и Glu для OpaDASPO.

Для OpaDAAO1 не наблюдались взаимодействия с метильной группой D-Ala. Для OpaDAAO2 D-Tyr наблюдается стекинговое взаимодействие с Phe228 и водородные связи гидроксильной группы с Asn50, Glu90 и Ser212. Для OpaDAAO3 D-Leu входит в гидрофобное взаимодействие с Tyr230 и Trp223. Для OpaDAAO4 Met218 участвует в связывании D-Pro. Для OpaDASPO Phe234 и Arg55 участвуют в связывании боковой цепи D-Asp.

4.7 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).

4.7.1. Поиск новых ДААО из экстремофильных бактерий и архей по гомологии

Таблица 4.8.

Источники отобранных последовательностей ДААО и GOX.

№	Обозначение	Источник	Код белка в базах данных
NCBI (GeneBank, UniProt)			
Бактерии			
1	GthDAAO	<i>Gandjariella thermophila</i>	WP 137812914.1
2	CthDAAO	<i>Chloracidobacterium thermophilum B</i>	WP 014099936.1
3	RtaDAAO	<i>Rubrobacter taiwanensis</i>	WP 132692836.1
4	RraDAAO	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> DSM 5868	WP 084263988.1
5	RbaDAAO	<i>Rhodothermaceae bacterium</i> RA	ARA94025.1
6	RxyDAAO	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	BAP18969.1
7	MycDAAO	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WP 003899072
8	SavDAAO	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	BAC69383
9	ScoDAAO	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	CAB40690
10	AprDAAO	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	AY306197
11	PaeGOX	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AAP81270
Грибы и дрожжи			
12	TvaDAAO	<i>Trigonopsis variabilis</i>	AY514426
13	NcrDAAO	<i>Neurospora crassa</i>	EAA33029
14	FsoDAAO	<i>Fusarium solani</i>	BAA00692
15	RemDAAO	<i>Rasamsonia emersonii</i>	BBH51408
16	CboDAAO	<i>Candida boidinii</i>	BAB12222
17	PpaDAAO	<i>Pichia pastoris</i> CBS7435	SCV12162
18	SpoDAAO	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP 001342883
19	RgdDAAO	<i>Rhodosporidium toruloides</i>	U60066
20	OpaDAAO1	<i>Ogataea parapolymorpha</i> DL-1	XP 013932717
21	OpaDAAO2	<i>Ogataea parapolymorpha</i> DL-1	XP 013937260
22	OpaDAAO3	<i>Ogataea parapolymorpha</i> DL-1	XP 013934816
23	OpaDAAO4	<i>Ogataea parapolymorpha</i> DL-1	XP 013937224
24	OpaDAAO5	<i>Ogataea parapolymorpha</i> DL-1	XP 013937169
25	OpaDASPO	<i>Ogataea parapolymorpha</i> DL-1	XP 013932178
База геномов МГУ имени М.В. Ломоносова			
Бактерии			
26	NhyDAAO	<i>Natronosporangium hydrolyticum</i> АСРА39	lcl CP070499.1_prot QSB16697.1 2115
27	NalGOX	<i>Natroglycomyces albus</i> АСРА22	lcl CP070496.1_prot QSB06127.1 824
Археи			
28	NhaDAAO	<i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i> AArch4	2642575300
29	NhaGOX	<i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i> AArch4	264257558

Чтобы апробировать наш подход, мы провели поиск новых DAAO по двум базам секвенированных геномов экстремофильных микроорганизмов: базе UniProt NCBI для бактериальных геномов и российской совместной базе секвенированных геномов экстремофильных микроорганизмов МГУ имени М.В. Ломоносова и ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

В качестве референсных использовали аминокислотные последовательности ферментов из дрожжей *R. toruloides* (более известных как *R. gracilis*), *T. variabilis*, *C. boidinii*, изученные нами *O. parapolyomorpha* DL-1 (пять DAAO и одна DASPO) и бактерий *A. protophormiae*, *R. xylanophilus* и *S. coelicolor*. Подробная информация об источниках последовательностей DAAO, рассмотренных в данной работе, представлена в табл. 4.8.

В случае бактерий использовали последовательности только тех ферментов, для которых была точно показана оксидазная активность. В первую очередь новые ферменты сравнивали с наиболее хорошо изученными DAOO из *R. toruloides*, *T. variabilis* и полученными нами OpaDAAO. В результате поиска гомологов DAAO в бактериальных геномах, депонированных в UniProt NCBI, 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 глицинооксидаз.

4.7.2. Сравнение аминокислотных последовательностей новых DAAO с известными ферментами из бактерий, дрожжей и грибов

На рис. 4.11 представлена часть результатов множественного выравнивания найденных последовательностей (названия новых ферментов выделены полужирным курсивом) и последовательностей референсных DAAO. Мы оставили только найденные последовательности пяти DAAO из экстремофильных микроорганизмов и не привели данные для глицинооксидаз. Однако проведено также множественное выравнивание последовательностей глицинооксидаз и построены модельные структуры, по результатам анализа которых они и были отнесены к GOX. Из базы геномов МГУ и ФИЦ Биотехнологии РАН после экспертной оценки были

отобраны четыре последовательности – по одной из бактерий *Natronosporangium hydrolyticum* АСРА39 [106] и *Natroglycomyces albus* АСРА22 [107] (этот фермент в результате оказался глициноксидазой), и две из археи *Natrarchaeobius halalkaliphilus* АArch4 [108]. Кроме того, в выравнивании представлены последовательности из двух патогенов – *Mycobacterium tuberculosis* (MycDAAO) и *Pseudomonas aeruginosa* (PaeGOX), также найденные нами в результате поиска по гомологии. Белок *P. aeruginosa* в базе NCBI аннотирован как DAAO. Множественное выравнивание отобранных последовательностей проводили с помощью программы Clustal X 1.83. Использование этой программы обусловлено тем, что она сама выстраивает иерархию в гомологии заданных последовательностей. Результаты такого выравнивания дали достаточно ожидаемые результаты. Как следует из рис. 4.11, в зависимости от источника ферменты четко разделены на две группы – вверху находятся бактериальные DAAO, за ними следуют ферменты дрожжей и грибов, сразу за ними – DAAO из архей, а затем глициноксидазы. Вторым интересным моментом является то, что наиболее высокую гомологию с бактериальными DAAO имеет широко применяемая и хорошо изученная TvDAAO, в то время как вторая, даже более полно изученная RgDAAO, находится в самом конце списка перед археями.

Как уже было сказано, трудности в поиске оксидаз D-аминокислот по геномным данным связаны с низкой гомологией данного фермента даже у близкородственных организмов, а также с малым количеством консервативных остатков, что в свою очередь объясняется тем, что аминокислотные остатки в данном ферменте связывают довольно большую и разнообразную группу субстратов и не участвуют в катализе напрямую. Однако, так как катализ происходит с участием кофактора FAD, у ферментов данного типа всегда присутствует характеристическая (fingerprint) последовательность, участвующая в связывании кофактора – GxGxxG [1]. Для связывания карбоксильной группы аминокислоты считалось обязательным наличие в активном центре остатков аргинина и тирозина (R285 и Y223 в RtoDAAO и R302 и Y243 в TvaDAAO). Аналогичные остатки присутствуют и в ферментах млекопитающих [1].

Однако расширение выборки сравниваемых последовательностей свидетельствует, что консервативными остаются только характеристическая последовательность в FAD-связывающем домене и остаток аргинина, участвующий в связывании субстрата за счет взаимодействия с карбоксильной группой. Подвижность этого остатка Arg сильно ограничивает соседний консервативный остаток пролина (пара ArgPro, рис. 4.11, четвертый ряд выравнивания). Остаток тирозина (рис. 4.11, третий ряд выравнивания, середина) консервативным не является – в двух из шести оксидаз OraDAAO, а также в двух бактериальных ферментах – MucDAAO и GthDAAO, в этом положении находятся отличающиеся по своим свойствам остатки Met, Phe, Ala и Cys. Кроме того, указанная пара признаков не может использоваться для аннотации фермента в качестве DAAO, поскольку эта же пара (характеристическая последовательность и пара консервативных остатков ArgPro) присутствует во всех глициноксидазах.

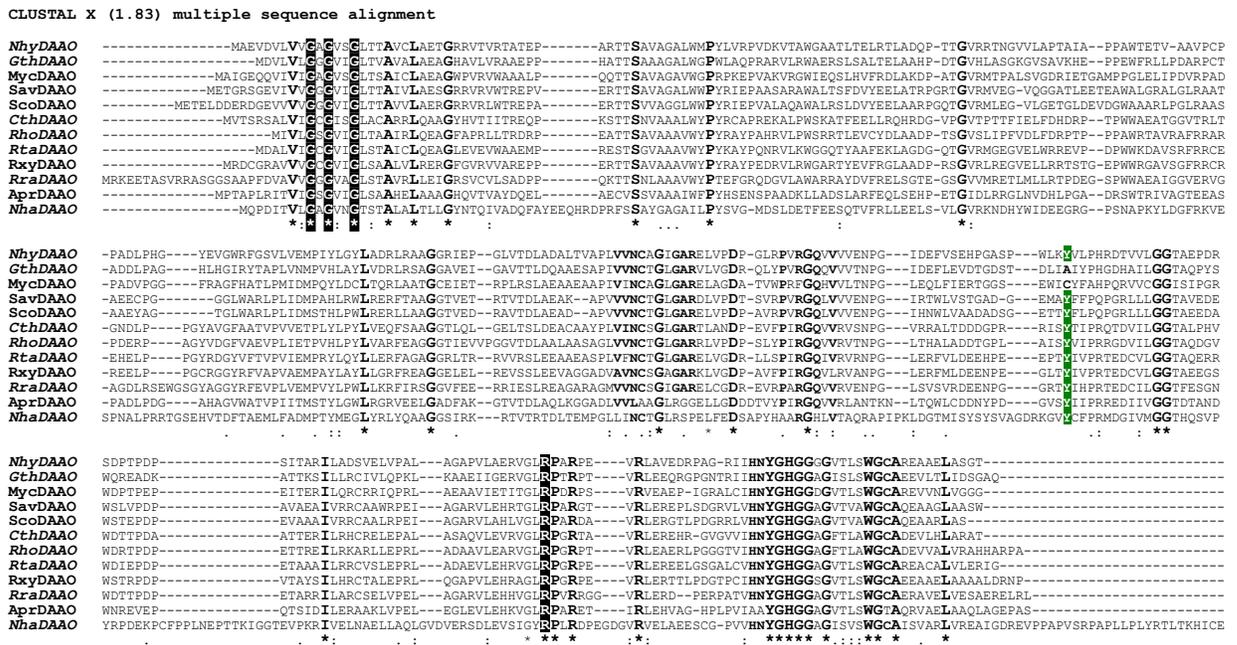


Рис. 4.12. Выравнивание аминокислотных последовательностей оксидаз D-аминокислот из бактерий после отсеивания последовательностей глициноксидаз.

При анализе выравниваний только бактериальных DAAO можно выделить большее число консервативных фрагментов. В первую очередь, пара ArgPro расширяется до последовательности GxRPxR, также появляется новая консервативная последовательность YGHGGxG. Однако, данные последовательности встречаются также и у глициноксидаз.

Одна из найденных последовательностей принадлежит DAAO из археи *N. halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO). Аминокислотная последовательность этого фермента длиннее, чем у бактериальных DAAO. В выравнивании четко выделяются три большие вставки в районе FAD- и субстратсвязывающих доменов, а также на C-конце. Тем не менее, NhaDAAO содержит тот же набор консервативных остатков, что и в DAAO бактерий.

Во втором проанализированном ферменте из *N. halalkaliphilus* AArch4 – глицинооксидазы NhaGOX – положение вставок и делеций очень хорошо совпадает с их положением в GOX из *P. aeruginosa* (рис. 4.10) и других глицинооксидазах. По результатам сравнения аминокислотных последовательностей можно сделать некоторое предположение о типе субстратной специфичности. При сильном различии в размерах субстрата можно легко заметить разницу в длине участков, формирующих субстратсвязывающий домен, уже на стадии выравнивания аминокислотных последовательностей. Например, TvaDAAO, RemDAAO и FsoDAAO имеют более длинные последовательности в районе остатков 100–108 (рис. 4.11, левая часть второго ряда выравнивания). Это обусловлено тем, что эти ферменты способны окислять объемный цефалоспорин C, в то время как остальные DAAO, имеющие в этой части выравнивания делеции, цефалоспорин C не окисляют. Например, SboDAAO специфична к небольшим аминокислотам, в первую очередь к D-Ala [64]. Однако следует отметить, что поиск по гомологии не позволяет отличить классическую DAAO с широким спектром субстратной специфичности от оксидазы D-аминокислот DASPO, специфичной только к D-Asp и D-Glu. Например, OraDAAO1 в аннотации генома *O. parapolyomorpha* DL-1 указана как D-аспаратоксидаза (DASPO), хотя наши экспериментальные данные свидетельствуют, что это абсолютно не так. Результаты наших исследований показали, что фермент имеет широкий спектр субстратной специфичности и по pH-профилям активности и стабильности он идентичен RgDAAO и TvDAAO. Аналогичная ситуация наблюдается и при аннотации генома *Pichia pastoris*. PpaDAAO1, аннотированная в геноме как оксидаза D-аминокислот, в действительности является DASPO, а PpaDAAO2, аннотированная как «гипотетический

белок с низкой гомологией с оксидазой D-аминокислот» (hypothetical protein with low similarity to D-amino acid oxidase), это именно DAAO [110].

4.7.3. Построение модельных 3D-структур и их сравнительный анализ с известными структурами

Мы попытались разработать новый, более точный способ определения субстратной специфичности оксидаз D-аминокислот по геномным данным с помощью компьютерного моделирования 3D-структур данных ферментов. До недавнего времени существовала проблема построения точных модельных структур DAAO, что связано с их низкой гомологией и малым количеством экспериментальных структур, которые можно было бы использовать в качестве шаблона. Однако ситуация сильно изменилась с появлением новой программы, основанной на использовании искусственного интеллекта – AlphaFold2. Данная программа получила 90 баллов на конкурсе CASP, что соответствует 90% средней точности в построении модельных структур. Мы использовали данную программу для моделирования структур 18 белков (в том числе 8 новых). В табл. 4.9 представлены результаты попарного сравнения модельных и экспериментальных структур оксидаз D-аминокислот и глицинооксидаз.

В данном случае набор анализируемых структур DAAO дополнен двумя экспериментальными структурами DAAO млекопитающих – из почки свиньи и человека, и структурами двух глицинооксидаз. Кроме того, для сравнения использовали и собственные предварительные данные рентгеноструктурного анализа TvaDAAO и OraDAAO1. Такой расширенный набор позволяет более точно провести сравнение и повысить достоверность отнесения новых белков к DAAO или GOX. Для удобства восприятия результаты сравнения, приведенные в табл. 4.9, выделены цветом. Зеленым фоном показаны результаты сравнения структур с RMSD до 1 Å, светло-зеленым – с RMSD от 1 до 2 Å, светло-оранжевыми – с RMSD от 2 до 6 Å и оранжевым – с RMSD выше 6 Å. Можно отметить несколько важных и интересных результатов анализа данных табл. 4.9. 1) Последняя модификация алгоритма AlphaFold в версии 2022 года [105] действительно позволяет получить модельные структуры с очень высокой точностью.

Таблица 4.9.

Среднеквадратичное отклонение между структурами оксидов D-аминокислот и глицинооксидаз.

	OpaDAAO1	OpaDAAO2	OpaDAAO3	OpaDAAO4	OpaDAAO5	OpaDASPO	TvaDAAO_RSA	OpaDAAO1_RSA	RtoDAAO_1C0P	RemDAAO_7CT4	hDAAO_2DU8	pkDAAO_1KIF	GOX_1NG4	IDA_OX_6PXS	NhaDAAO	NhyDAAO	NalGOX	NhaGOX	RraDAAO	PaeGOX	RbaDAAO	CthDAAO	RtaDAAO	GthDAAO
OpaDAAO1	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
OpaDAAO2	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
OpaDAAO3	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
OpaDAAO4	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
OpaDAAO5	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
OpaDASPO	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
OpaDAAO1_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

Это хорошо видно при сравнении модельной и экспериментальной структур OpaDAAO1. Среднеквадратичное отклонение между этими структурами составляет всего 0.38 Å. RMSD между модельной и экспериментальной структурами TvaDAAO немного больше – 0.56 Å (в табл. 4.9. не показано), но следует учитывать, что эти ферменты имеют разную олигомерную структуру (OpaDAAO1 – мономер, TvaDAAO – димер). Высокая точность предсказания структуры OpaDAAO1 приводит к тому, что попарное сравнение модельной и экспериментальной структур OpaDAAO1 с модельными и экспериментальными структурами других ферментов дает практически одинаковые значения RMSD (табл. 2, строки 1 и 8). 2) Наблюдается четкая корреляция между функцией и общей структурой оксидаз D-аминокислот и глицинооксидаз. Величина отклонения RMSD между структурами DAAO не превышает 2 Å, в то время как при сравнении структур DAAO и GOX значение RMSD составляет 3 Å и более (до 15–18 Å). Из общей картины выпадают результаты с NhaDAAO из архей – отклонение модельной структуры от структур других DAAO составляет 2.0–3.5 Å (в случае OpaDAAO3 отклонение достигает даже 4.69 Å). В то же время разница в структуре NhaDAAO с глицинооксидазами намного больше – от 9 до 17 Å. Также отметим, что этот фермент имеет общую структуру, близкую к DAAO человека (RMSD всего 1.96 Å). Такие результаты показывают, что для корректного подтверждения, что данный фермент является DAAO, следует использовать как можно более широкую выборку 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.

4.7.4. Сравнительный анализ структур активных центров DAAO

На следующем этапе мы сравнили структуры активных центров новых DAAO с известными оксидазами D-аминокислот. Получение и характеристика пяти новых оксидаз D-аминокислот из дрожжей *O. parapolymorpha*, проведенные в рамках данной работы, значительно расширяет 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. Как отмечено выше, этот фермент имеет заметные отличия от других DAAO как по длине аминокислотной последовательности, так и по общей структуре. Однако результаты сравнения структуры именно активных центров свидетельствуют, что NhaDAAO и OpaDAAO2 имеют практически идентичные активные центры (рис. 4.13).

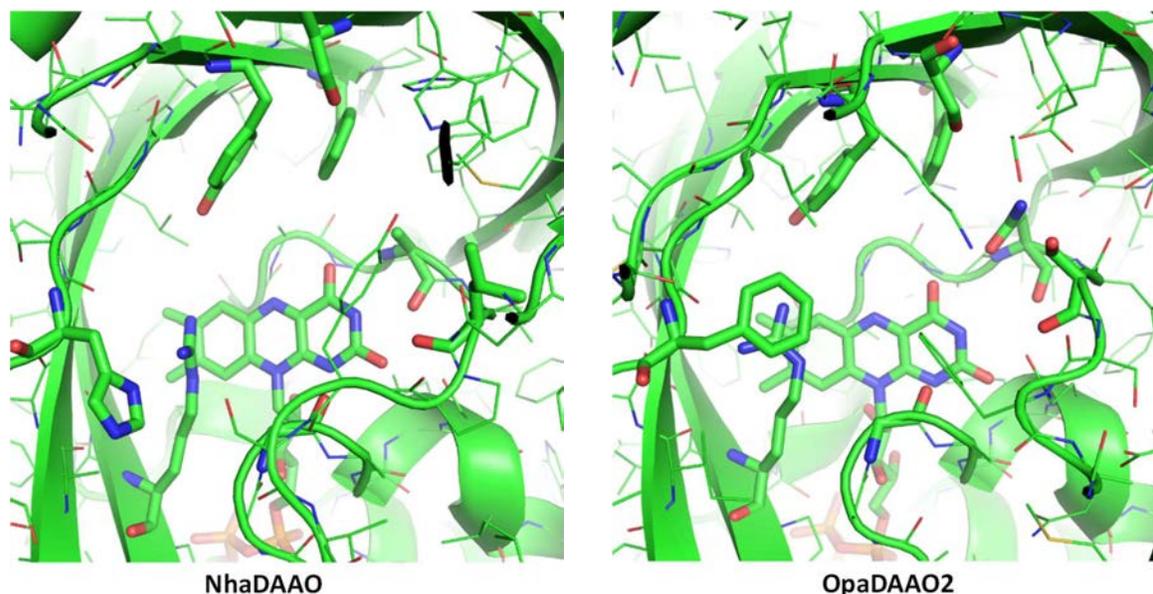


Рис. 4.13. Модельные структуры активных центров NhaDAAO из архей *N.halalkaliphilus* AArch4 и OpaDAAO2 из мезофильных дрожжей *O.parapolymorphia* DL-1.

При выравнивании общих структур по кофактору FAD видно, что в субстратсвязывающем домене помимо консервативного остатка Arg имеются еще два участвующих в связывании субстрата остатка – Tyr и Phe, расположение которых в активных центрах NhaDAAO и OpaDAAO2 практически идентично. Кроме того, результаты моделирования структуры активного центра самой OpaDAAO2 полностью согласуются с экспериментальными данными, согласно которым наилучшими субстратами являются D-аминокислоты с гидрофобными боковыми группами – D-Phe (самая высокая активность), D-Tyr и D-Leu. Поэтому вполне логично предположить, что таким же спектром субстратной специфичности должна обладать и NhaDAAO.

Был проведен также сравнительный анализ активных центров ферментов NhyDAAO и OpaDAAO3 (Рис. 4.14). Активные центры данных ферментов менее похожи, чем активные центры предыдущей пары, однако все равно можно говорить о некоем соответствии. У обоих ферментов присутствует остаток Tug, 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.

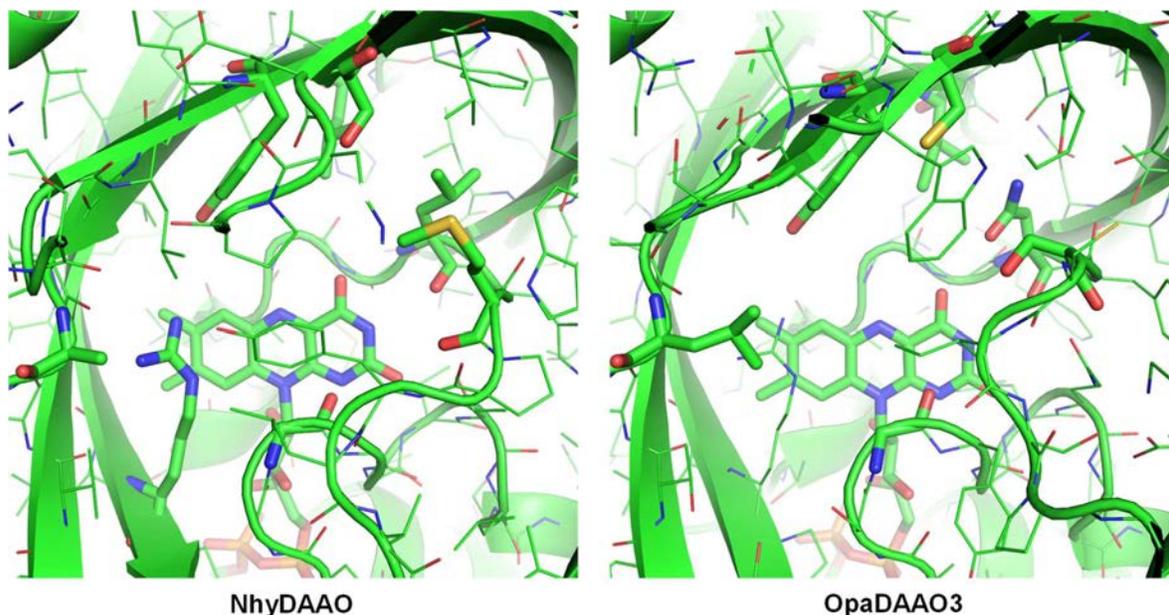


Рис. 4.14. Модельные структуры активных центров NhyDAAO из галофильных бактерий *Natronosporangium hydrolyticum* АСРА39.и OpaDAAO3 из мезофильных дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1.

В настоящее время ген этого фермента клонирован в нашей лаборатории, проводятся работы по его экспрессии в клетках *E. coli*. Предварительные эксперименты подтвердили, что наилучшим субстратом NhyDAAO являются именно D-Leu и D-Phe.

Сравнение структур DAAO показало, что активные центры ферментов из *G. thermophila* (GthDAAO) и из *R. radiotolerans* DSM 5868 (RraDAAO) достаточно уникальны. В GthDAAO в связывании боковых групп субстратов должны принимать участие карбоксильные группы боковых групп остатков Glu202 и Asp204 (рис. 4.15).

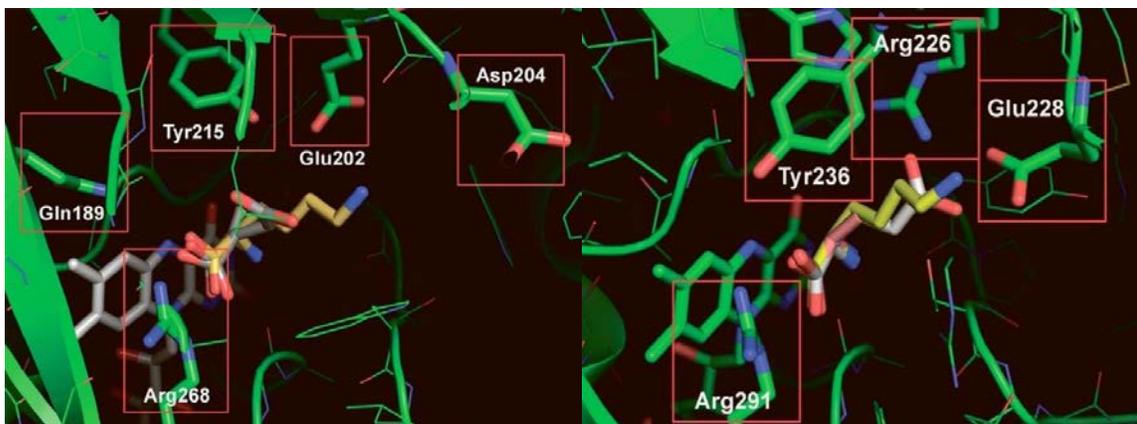


Рис. 4.15. Докинг D-аланина, D-аспартата и D-лизина в активный центр DAAO из *G.thermophila* и D-аланина, D-глутамата и D-лизина в активный центр DAAO из *R.radiotolerans* DSM 5868.

Это предполагает, что данный фермент может быть специфичен к D-Lys и D-Arg, однако докинг различных D-аминокислот свидетельствует, что обе карбоксильные группы остатков Glu202 и Asp204 расположены на довольно большом расстоянии (более 3 Å) от молекулы субстрата. Более интересная картина наблюдается в случае RraDAAO (рис. 4.15). В связывании боковых групп субстрата могут участвовать положительно заряженный остаток Arg226 и отрицательно заряженный остаток Glu228. Докинг в активный центр различных D-аминокислот позволяет предположить, что RraDAAO должна быть специфичной к положительно заряженному D-Lys и потенциально активной с D-Glu. Клонирование гена этого фермента представляет интерес, так как D-Lys является плохим субстратом для всех описанных DAAO.

Результаты проведенных экспериментов позволяют сделать несколько выводов.

1. Введение второго этапа - структурного анализа, при идентификации генов новых оксидаз D-аминокислот после проведения поиска в геномах по гомологии является высокоэффективной и необходимой процедурой. На этом этапе удастся не только однозначно подтвердить принадлежность нового фермента к DAAO, но и сделать предсказание о возможном спектре его субстратной специфичности.

2. Аминокислотные последовательности оксидаз D-аминокислот из бактерий имеют низкую гомологию (не более 30%). В ходе анализа

последовательностей бактериальных DAAO выявлены новые характерные консервативные участки, которые могут быть использованы для идентификации данных ферментов при их поиске в геномах. Присутствие новых консервативных участков показано и в последовательности DAAO из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO).

3. Впервые ген оксидазы D-аминокислот найден в геноме архей. По сравнению с бактериальными DAAO фермент из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO) имеет более длинную аминокислотную последовательность и меньшее сходство общей трехмерной структуры, но результаты структурного анализа однозначно показали, что активный центр NhaDAAO практически идентичен таковому у OpaDAAO2 из метилотрофных дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1. Также в геноме *N. halalkaliphilus* AArch4 идентифицирована глицинооксидаза, которая по своей гомологии наиболее близка к GOX из *P. aeruginosa*.

4.8. 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 цефалоспоринона C и получения 7-аминоцефалоспориновой кислоты – прекурсора 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 C.

4.8.1. Получение многоточечных мутантных TvDAAO

В рамках данной работы мы провели объединение изученных ранее мутаций и получили мутантные оксидазы D-аминокислот с многоточечными заменами. Были отобраны следующие замены аминокислотных остатков (рис. 4.16):

Glu32Arg/Phe33Asp, которая приводила к улучшению температурной стабильности за счет улучшения связей между двумя субъединицами фермента; Phe54Ser, важная замена, найденная и изученная в нашей лаборатории, которая привела к беспрецедентному улучшению каталитических параметров в реакции окисления цефалоспоринона C за счет расширения входа в активный центр; замена Cys108Phe, которая также находится в активном центре и приводит к увеличению температурной стабильности и улучшению каталитических параметров в реакции окисления цефалоспоринона C; замена Met156Leu, которая была сделана в рамках большой работы по изучению влияния остатков метионина на температурную стабильность фермента и которая привела к самому значительному увеличению температурной стабильности из всех изученных замен; замены остатков цистеина Cys298Gly, Cys298Asn и Cys298Gln, который имеет доступ к растворителю и легче всего окисляется пероксидом водорода, замены которого на инертные остатки привели к сильному повышению стабильности к окислению.

Ранее в нашей лаборатории уже проводились эксперименты по созданию многоточечных мутантов, однако выяснилось, что остатки, расположенные рядом, не имеют аддитивного эффекта и не приводят к росту температурной стабильности [104]. Выбранные нами замены находятся в разных частях глобулы, что дает все основания полагать, что аддитивный эффект будет наблюдаться.

Было получено шесть ферментов 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.

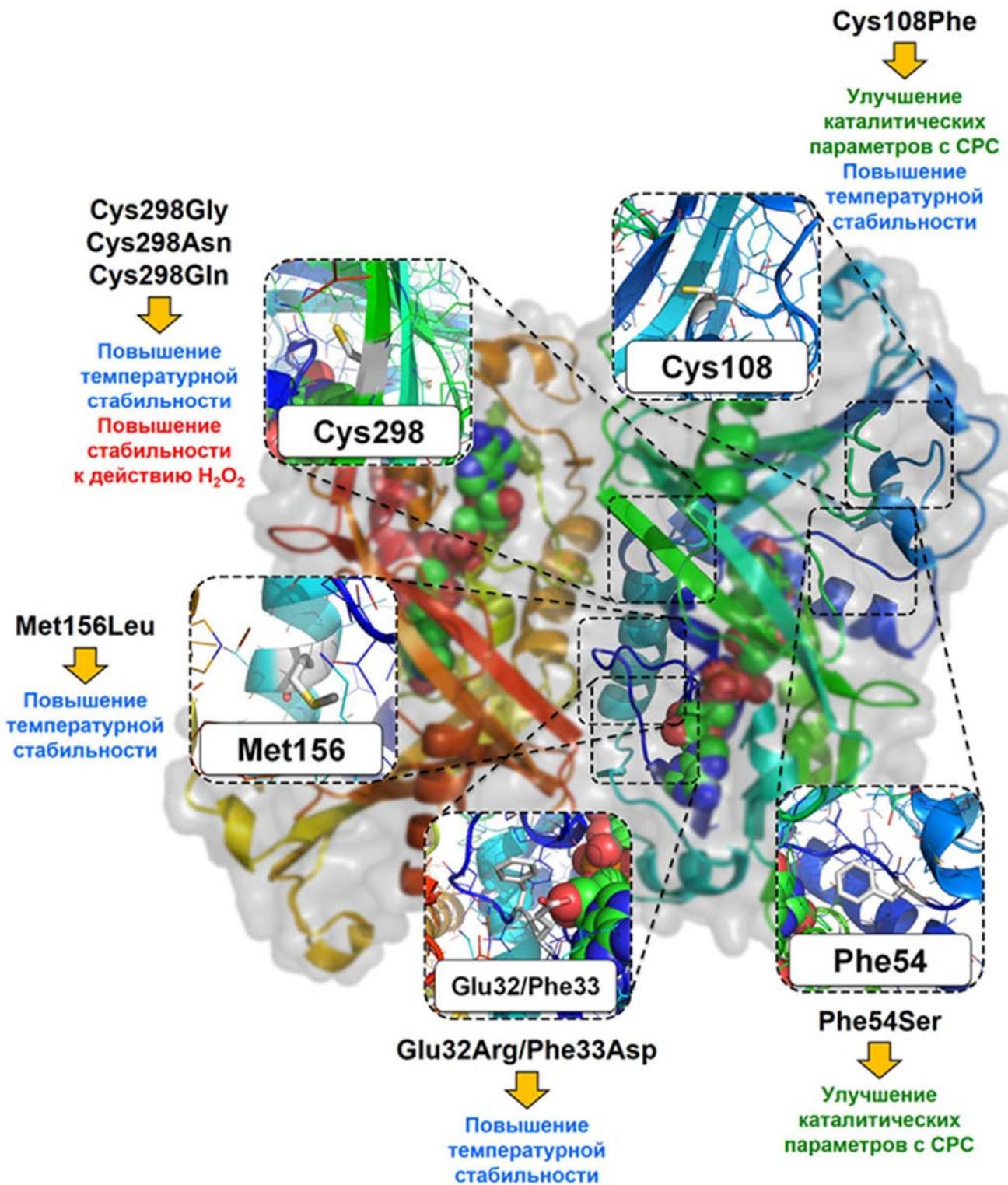


Рис. 4.16. Положения выбранных для замены аминокислотных остатков Glu32, Phe33, Phe54, Cys108, Met156, Cys298.

Так как все гены, содержащие выбранные замены, были получены ранее, наша работа состояла только в объединении этих замен путем рестрикции и

лигирования. Полученные гены были экспрессированы в клетках *E. coli* по стандартной методике, ферменты выделены и очищены. Выходы очистки и удельная активность полученных мутантов представлены в таблице 4.10. Чистота всех ферментов составила более 90% по SDS-PAGE.

Таблица 4.10.
Результаты очистки многоточечных мутантных TvDAAO.

Форма <u>TvDAAO</u>	Выход очистки, %	Удельная активность (по D-Met), <u>Ед/мг</u>
дикий тип	44	140
SL	75	43
SFL	61	63
RDSFL	95	50
RDSFLG	90	55
RDSFLN	72	66
RDSFLQ	82	46

Удельная активность всех полученных ферментов по D-Met оказалась ниже, чем у фермента дикого типа. Это связано с тем, что замены, приводящие к улучшению каталитических параметров с цефалоспорином *C* негативно влияют на каталитические параметры с другими более мелкими по размеру субстратами.

4.8.2. Каталитические параметры многоточечных мутантных TvDAAO в реакции с цефалоспорином *C*

Были определены каталитические параметры полученных мутантных TvDAAO в реакции окисления цефалоспорина *C*. Оказалось, что объединение замен в большинстве случаев не приводит к ухудшению константы Михаэлиса и значительно улучшает каталитическую константу TvDAAO. В итоге получились ферменты как с улучшенной каталитической константой по сравнению с ферментом дикого типа (SFL, RDSFL, RDSFLN), так и с улучшенной каталитической эффективностью (RDSFLG). Результаты представлены в таблице 4.11.

Таблица 4.11.

Кинетические параметры многоточечных мутантных TvDAAO и фермента дикого типа в реакции окисления цефалоспоринона С.

Форма TvDAAO	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , с ⁻¹ мМ ⁻¹
ДИКИЙ ТИП	1,4±0,4	26±3	18±5
SL	2,3±0,9	55±6	20±10
SFL	1,9±0,6	119±7	60±20
RDSFL	1,6±0,3	106±9	66±12
RDSFLG	0,8±0,2	65±5	79±15
RDSFLN	2,9±0,5	121±15	42±8
RDSFLQ	1,4±0,3	68±5	50±9

4.8.3. Температурная стабильность многоточечных мутантных TvDAAO

Была изучена температурная стабильность полученных ферментов. Кинетику термоинактивации изучали в 0,1 М калий-фосфатном буфере pH 8,0 и начальной концентрации фермента 10 мкг/мл (рис. 4.17.).

Все многоточечные мутантные TvDAAO, имеющие стабилизирующие замены, проявили более высокую температурную стабильность, чем фермент дикого типа. Был наглядно продемонстрирован аддитивный эффект замен, приводящих к температурной стабилизации, и ферменты с шестью заменами оказались более чем в 8 раз стабильнее, чем фермент дикого типа при температуре 60 °С.

В случае TvDAAO с пятью и шестью заменами наблюдается эффект изменения механизма термоинактивации, что выражается в аппроксимации кривых термоинактивации одноэкспоненциальной функцией, а не биэкспонентой, как в случае фермента дикого типа. Для димерного фермента TvDAAO характерна диссоциативная схема инактивации, которая заключается в обратимой диссоциации димера на мономеры с последующей инактивацией. Соответственно аппроксимация одноэкспоненциальной функцией в рамках данного механизма может

свидетельствовать об изменении кинетики первой стадии процесса – диссоциации на мономеры, и установлению квазиравновесия с последующей медленной инактивацией.

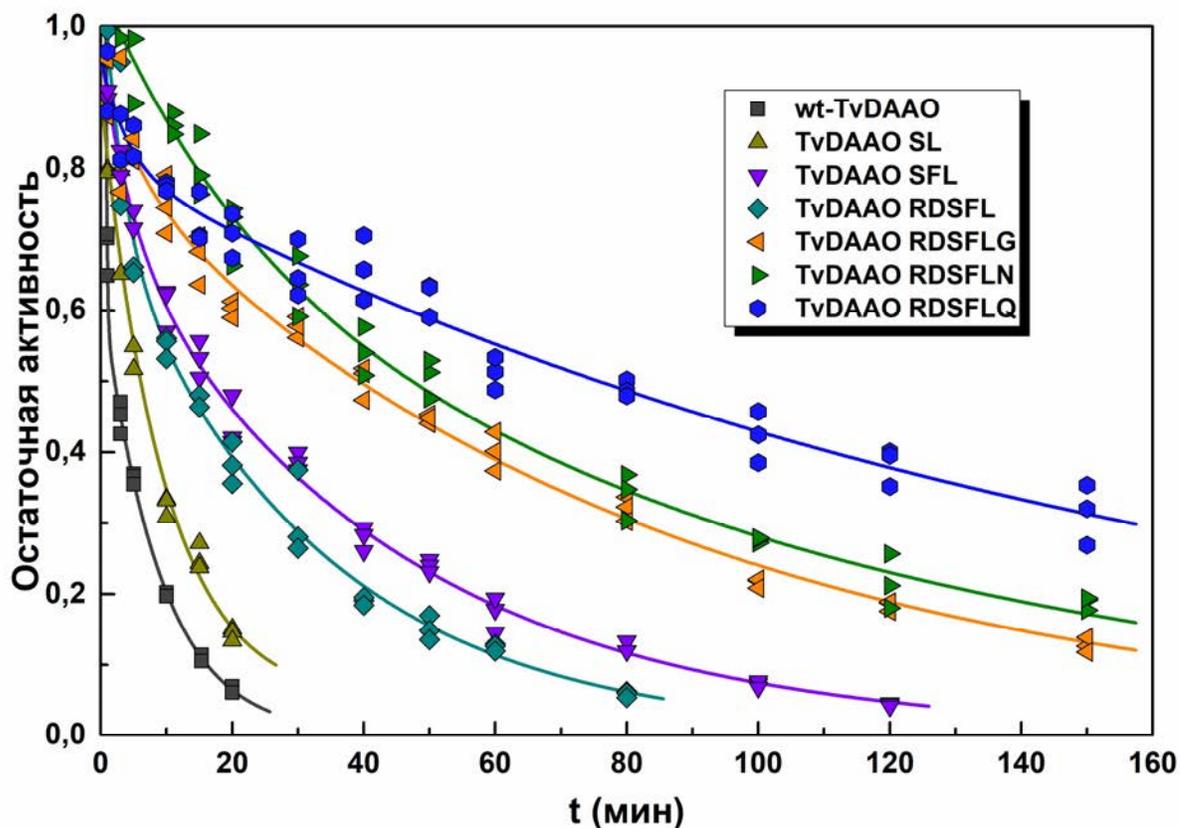


Рис 4.17. Температурная инактивация многоточечных мутантных форм TvDAAO и TvDAAO дикого типа при 60 °С. $C_E = 10$ мкг/мл. 0,1 М КРФ рН 8,0.

4.8.4. Стабильность к действию H_2O_2 многоточечных мутантных TvDAAO

Помимо изучения температурной стабильности ферментов важно изучить и стабильность к действию пероксида водорода, так как он является побочным продуктом реакции окисления субстратов оксидазой D-аминокислот и соответственно находится в реакционной смеси. Кинетику инактивации изучали в 0,1 М растворе H_2O_2 , в 0,1 М калий-фосфатном буфере рН 8,0, начальной концентрации фермента 10 мкг/мл и температуре 30 °С.

Все полученные мутантные формы были изучены, однако в случае ферментов без замен остатка цистеина 298 не наблюдалось никакого улучшения стабильности к окислению пероксидом водорода. Это означает, что именно этот остаток является скоростью-определяющим в данном процессе. Значительное

улучшение окислительной стабильности продемонстрировали ферменты RDSFLG, RDSFLN и RDSFLQ (рис.4.18.). Все они имеют замены остатков цистеина 108 и цистеина 298.

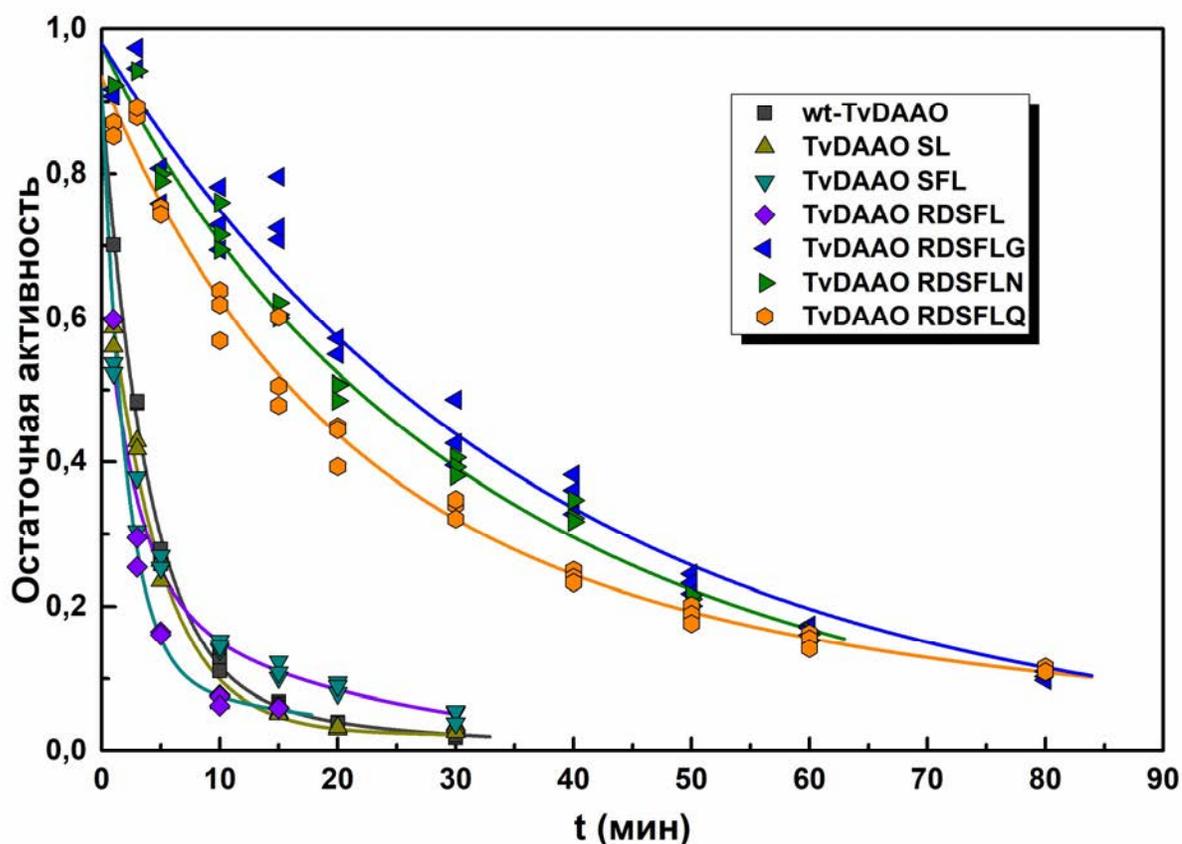


Рис 4.18. Инактивация многоточечных мутантных форм TvDAAO и TvDAAO дикого типа в 0,1 М растворе пероксида водорода. $C_E = 10$ мкг/мл. 0,1 М КРВ pH 8,0. 30 °С.

В данной части работы были получены 6 многоточечных мутантных форм TvDAAO в активном и высокоочищенном виде. Были определены кинетические параметры цефалоспорина *C*. Оказалось, что объединение замен в большинстве случаев не приводит к ухудшению константы Михаэлиса и значительно улучшает каталитическую константу TvDAAO. Наибольшими значениями каталитических констант обладали многоточечные мутантные TvDAAO SFL, TvDAAO RDSFL, TvDAAO RDSFLN (119 ± 7 , 106 ± 9 и 121 ± 15 с⁻¹ соответственно). В итоге получились ферменты как с улучшенной каталитической константой по сравнению с ферментом дикого типа (SFL, RDSFL, RDSFLN), так и с улучшенной каталитической эффективностью (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-м положении также возросла в 5–6 раз по сравнению с TvDAAO дикого типа.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении перечислим основные результаты, полученные в рамках данной работы.

Проведен анализ генома метилотрофных термотолерантных дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1. Обнаружено шесть паралогичных генов, кодирующих оксидазы D-аминокислот и D-аспартатоксидазу в геноме дрожжей *Ogataea parapolymorpha* DL-1.

Пять из шести ферментов были успешно экспрессированы в растворимой и активной форме. Фермент OraDAAO5 экспрессировался виде телец включения. Была изучена субстратная специфичность полученных ферментов и подобраны наилучшие субстраты для проведения измерений. OraDAAO1 проявил максимальную активность с D-Ala, OraDAAO2 – с D-Phe, OraDAAO3 – с D-Met, OraDAAO4 – с D-Pro, OraDASPO соответственно с D-Asp. В случае с OraDAAO5 удалось качественно определить его активность с D-Ser и D-Lys.

Была разработана индивидуальная стратегия очистки полученных ферментов с учетом их изоэлектрических точек. Чистота всех полученных белков была выше 90% по SDS-PAGE, отношение A280/A455, характеризующее чистоту ферментных препаратов и количество примесных белков, составило 7.3–9.1 для разных OraDAAO

Проведена гель-фильтрация для определения олигомерной формы ферментов. При концентрации 0.1 мг/мл OraDAAO1, OraDAAO4, OraDASPO элюировались с колонки в виде мономерной формы и OraDAAO2, OraDAAO3 выходили в виде димерной формы.

Были изучены зависимости активности и стабильности ферментов от pH среды и ионной силы раствора. Все исследованные DAAO имеют разные профили pH-активности и pH-стабильности

Изучено влияние концентрации буферов на активности и стабильности изучаемых ферментов и подобраны буферы для хранения и определения активностей.

Изучены профили температурной стабильности OpaDAAO. Наименее стабильными оказались ферменты OpaDAAO1 и OpaDAAO4, наиболее стабильным оказался фермент OpaDAAO3 с температурой полуинактивации более чем на 10 градусов выше, чем у OpaDAAO1 и OpaDAAO4.

Изучены профили субстратной специфичности ферментов. Можно отметить самые примечательные каталитические эффективности (k_{cat}/K_M). Для OpaDAAO1 наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Ala, D-Met, D-Val и D-Ser (38, 13.1, 6.3, 4.56 $\text{с}^{-1} \text{мМ}^{-1}$ соответственно). Для OpaDAAO2 наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Tyr, D-Trp, D-Phe and CPC (150, 22, 13.8, 10 $\text{с}^{-1} \text{мМ}^{-1}$ соответственно). Для OpaDAAO3 наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Leu, D-Phe, D-Trp, D-Val и D-Met (580, 420, 113, 90, 71 $\text{с}^{-1} \text{мМ}^{-1}$ соответственно). Для OpaDAAO4 наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Pro и составило 20 $\text{с}^{-1} \text{мМ}^{-1}$. Для OpaDASPO наибольшее значение k_{cat}/K_M наблюдалось для D-Asp и D-Glu (184, 78 $\text{с}^{-1} \text{мМ}^{-1}$ соответственно).

Построены модельные структуры и изучены аминокислотные остатки, участвующие в связывании субстратов в активных центрах. Проведено сравнение моделей активных центров с моделью RgDAAO.

Собраны литературные данные каталитических параметров наиболее изученных DAAO для ряда субстратов. На основе собранных данных можно сделать вывод, что OpaDAAO1 обладает лучшими значениями каталитической константы по D-аланину и D-серину среди всех изученных DAAO. OpaDAAO3 и OpaDAAO1 обладают лучшими каталитическими константами по D-метионину и D-фенилаланину. OpaDASPO обладает лучшими K_M по D-аспартату и D-глутамату среди всех известных DASPO. OpaDAAO3 обладает лучшей K_M по D-фенилаланину, OpaDAAO4 - по D-пролину. OpaDASPO является безусловным лидером в

каталитической эффективности по D-аспарагину, обладая более чем в 5 раз большей каталитической эффективностью, чем следующая за ней человеческая DAAO. OpaDAAO3 обладает лучшей каталитической эффективностью по D-фенилаланину среди всех изученных DAAO. OpaDAAO4 обладает лучшей каталитической эффективностью по D-пролину среди всех изученных DAAO. OpaDAAO3 и OpaDAAO1 обладают лучшими каталитическими эффективностями по D-серину среди всех изученных DAAO.

Предложен новый биоинформационно-структурный подход к поиску генов оксидаз D-аминокислот в секвенированных геномах микроорганизмов.

В ходе анализа последовательностей бактериальных DAAO выявлены новые характерные консервативные участки, которые могут быть использованы для идентификации данных ферментов при их поиске в геномах. Присутствие новых консервативных участков показано и в последовательности DAAO из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO).

Впервые ген оксидазы D-аминокислот найден в геноме архей. По сравнению с бактериальными DAAO фермент из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO) имеет более длинную аминокислотную последовательность и меньшее сходство общей трехмерной структуры, но результаты структурного анализа однозначно показали, что активный центр NhaDAAO практически идентичен таковому у OpaDAAO2 из метилотрофных дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1.

Получены и охарактеризованы многоточечные мутантные TvDAAO. Все ферменты с многоточечными заменами обладали улучшенными кинетическими параметрами в реакции окисления цефалоспорина C. Наибольшими значениями каталитических констант обладали мутантные TvDAAO SFL, TvDAAO RDSFL, TvDAAO RDSFLN (119 ± 7 , 106 ± 9 и 121 ± 15 с⁻¹ соответственно). Все ферменты с многоточечными заменами, кроме TvDAAO SL, обладали значительно увеличенной температурной стабильностью. При 60 °C TvDAAO RDSFLG, TvDAAO RDSFLN и TvDAAO RDSFLQ проявляют в 15–30 раз более высокую температурную стабильность в сравнении с TvDAAO дикого типа.

Новые многоточечные мутантные TvDAAO по своим свойствам превосходят все ранее описанные в литературе мутанты этого фермента. Получены

многоочечные мутантные формы TvDAAO, перспективны для использования в биотехнологии. В частности, TvDAAO RDSFLN обладает в 4 раза более высокой каталитической константой в реакции окисления цефалоспорина *C*, в 8 раз более высокой стабильностью к окислению пероксидом водорода и в 20 раз более высокой температурной стабильности по сравнению с ферментом дикого типа.

6. 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 многоочечными заменами. Данные ферменты одновременно обладают самыми высокими каталитическими параметрами в реакции окисления цефалоспорина *C* и самыми высокими стабильностями к инактивации под действием температуры и пероксида водорода.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V. I., Khoronenkova S. V. D-Amino acid oxidase: structure, catalytic mechanism, and practical application // *Biochemistry (Mosc)*. 2005. Jan. T. 70, № 1. C. 40-54.
2. Krebs H. A. Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids // *Biochem J*. 1935. Jul. T. 29, № 7. C. 1620-44.
3. Massey V., Hemmerich P. Active-site probes of flavoproteins // *Biochem Soc Trans*. 1980. Jun. T. 8, № 3. C. 246-57.
4. Khoronenkova S. V., Tishkov V. I. D-amino acid oxidase: physiological role and applications // *Biochemistry (Mosc)*. 2008. Dec. T. 73, № 13. C. 1511-8.
5. Pollegioni L., Piubelli L., Sacchi S., Pilone M. S., Molla G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans // *Cell Mol Life Sci*. 2007. Jun. T. 64, № 11. C. 1373-94.
6. Sacchi S., Cappelletti P., Murtas G. Biochemical Properties of Human D-amino Acid Oxidase Variants and Their Potential Significance in Pathologies // *Front Mol Biosci*. 2018. T. 5. C. 55.
7. Sarower M. G., Okada S., Abe H. Molecular characterization of D-amino acid oxidase from common carp *Cyprinus carpio* and its induction with exogenous free D-alanine // *Archives of biochemistry and biophysics*. 2003. T. 420, № 1. C. 121-129.
8. Katane M., Saitoh Y., Seida Y., Sekine M., Furuchi T., Homma H. Comparative characterization of three D-aspartate oxidases and one D-amino acid oxidase from *Caenorhabditis elegans* // *Chemistry & Biodiversity*. 2010. T. 7, № 6. C. 1424-1434.
9. Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M. S. Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008. Feb. T. 78, № 1. C. 1-16.
10. Geueke B., Weckbecker A., Hummel W. Overproduction and characterization of a recombinant D-amino acid oxidase from *Arthrobacter*

- protophormiae* // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007. Apr. T. 74, № 6. C. 1240-7.
11. Takahashi S., Furukawara M., Omae K., Tadokoro N., Saito Y., Abe K., Kera Y. A Highly Stable D-Amino Acid Oxidase of the Thermophilic Bacterium *Rubrobacter xylanophilus* // *Appl Environ Microbiol*. 2014. T. 80, № 23. C. 7219-29.
 12. Saito Y., Takahashi S., Kobayashi M., Abe K., Kera Y. D-Amino acid oxidase of *Streptomyces coelicolor* and the effect of D-amino acids on the bacterium // *Annals of Microbiology*. 2014. T. 64, № 3. C. 1167-1177.
 13. Simonetta M. P., Vanoni M. A., Casalin P. Purification and properties of d-amino-acid oxidase, an inducible flavoenzyme from *Rhodotorula gracilis* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1987. T. 914, № 2. C. 136-142.
 14. Kubicek-Pranz E., Röhr M. D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis* // *Journal of applied biochemistry*. 1985. T. 7, № 2. C. 104-113.
 15. Sulter G., Waterham H., Goodman J., Veenhuis M. Proliferation and metabolic significance of peroxisomes in *Candida boidinii* during growth on D-alanine or oleic acid as the sole carbon source // *Archives of microbiology*. 1990. T. 153, № 5. C. 485-489.
 16. Isogai T., Ono H., Ishitani Y., Kojo H., Ueda Y., Kohsaka M. Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani* // *The Journal of Biochemistry*. 1990. T. 108, № 6. C. 1063-1069.
 17. Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. Physiological role of the d-amino acid oxidase gene, DAO1, in carbon and nitrogen metabolism in the methylotrophic yeast *Candida boidinii* // *Yeast*. 2000. T. 16, № 13. C. 1217-1227.
 18. Gabler M., Fischer L. Production of a new D-amino acid oxidase from the fungus *Fusarium oxysporum* // *Applied and environmental microbiology*. 1999. T. 65, № 8. C. 3750-3753.

19. Shimekake Y., Furuichi T., Abe K., Kera Y., Takahashi S. A novel thermostable D-amino acid oxidase of the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* strain YA // *Scientific Reports*. 2019. T. 9, № 1. C. 1-12.
20. Perotti M., Pollegioni L., Pilone M. Expression of D-amino acid oxidase in *Rhodotorula gracilis* under induction conditions: a biochemical and cytochemical study // *European journal of cell biology*. 1991. T. 55, № 1. C. 104-113.
21. Horner R., Wagner F., Fischer L. Induction of the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* // *Applied and environmental microbiology*. 1996. T. 62, № 6. C. 2106-2110.
22. Maekawa M., Watanabe M., Yamaguchi S., Konno R., Hori Y. Spatial learning and long-term potentiation of mutant mice lacking D-amino-acid oxidase // *Neuroscience research*. 2005. T. 53, № 1. C. 34-38.
23. Korostishevsky M., Kaganovich M., Cholostoy A., Ashkenazi M., Ratner Y., Dahary D., Bernstein J., Bening-Abu-Shach U., Ben-Asher E., Lancet D. Is the G72/G30 locus associated with schizophrenia? Single nucleotide polymorphisms, haplotypes, and gene expression analysis // *Biological psychiatry*. 2004. T. 56, № 3. C. 169-176.
24. Cheng Y.-J., Lin C.-H., Lane H.-Y. d-Amino Acids and pLG72 in Alzheimer's Disease and Schizophrenia // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. T. 22, № 20. C. 10917.
25. Fitzpatrick P. F., Massey V. Thiazolidine-2-carboxylic acid, an adduct of cysteamine and glyoxylate, as a substrate for D-amino acid oxidase // *Journal of Biological Chemistry*. 1982. T. 257, № 3. C. 1166-1171.
26. Abe H., Yoshikawa N., Sarower M. G., Okada S. Physiological function and metabolism of free D-alanine in aquatic animals // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005. T. 28, № 9. C. 1571-1577.
27. Bayer T. 7-Aminocephalosporanic acid—chemical versus enzymatic production process // *Asymmetric catalysis on industrial scale: challenges, approaches and solutions*. 2004. C. 117-130.

28. Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M. S. Catalytic Properties of d-Amino Acid Oxidase in Cephalosporin C Bioconversion: A Comparison between Proteins from Different Sources // *Biotechnology progress*. 2004. T. 20, № 2. C. 467-473.
29. Betancor L., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Mateo C., Rodríguez V., Fuentes M., López-Gallego F., Fernández-Lafuente R., Guisan J. M. Use of physicochemical tools to determine the choice of optimal enzyme: Stabilization of d-amino acid oxidase // *Biotechnology progress*. 2003. T. 19, № 3. C. 784-788.
30. Wang M., Qi W., Xu H., Yu H., Zhang S., Shen Z. Affinity-binding immobilization of d-amino acid oxidase on mesoporous silica by a silica-specific peptide // *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2019. T. 46, № 11. C. 1461-1467.
31. Khang Y. H., Kim I. W., Hah Y. R., Hwangbo J. H., Kang K. K. Fusion protein of Vitreoscilla hemoglobin with d-amino acid oxidase enhances activity and stability of biocatalyst in the bioconversion process of cephalosporin C // *Biotechnology and bioengineering*. 2003. T. 82, № 4. C. 480-488.
32. Rosini E., Molla G., Ghisla S., Pollegioni L. On the reaction of d-amino acid oxidase with dioxygen: O₂ diffusion pathways and enhancement of reactivity // *The FEBS journal*. 2011. T. 278, № 3. C. 482-492.
33. Atroshenko D. L., Shelomov M. D., Zarubina S. A., Negru N. Y., Golubev I. V., Savin S. S., Tishkov V. I. Multipoint TvDAAO Mutants for Cephalosporin C Bioconversion // *International Journal of Molecular Sciences*. 2019. Sep 2. T. 20, № 18.
34. Roff G. J., Lloyd R. C., Turner N. J. A versatile chemo-enzymatic route to enantiomerically pure β -branched α -amino acids // *Journal of the American Chemical Society*. 2004. T. 126, № 13. C. 4098-4099.
35. Hanson R. L., Schwinden M. D., Banerjee A., Brzozowski D. B., Chen B.-C., Patel B. P., McNamee C. G., Kodersha G. A., Kronenthal D. R., Patel R.

- N. Enzymatic synthesis of L-6-hydroxynorleucine // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 1999. T. 7, № 10. C. 2247-2252.
36. Inaba Y., Mizukami K., Hamada-Sato N., Kobayashi T., Imada C., Watanabe E. Development of a D-alanine sensor for the monitoring of a fermentation using the improved selectivity by the combination of D-amino acid oxidase and pyruvate oxidase // *Biosensors and Bioelectronics*. 2003. T. 19, № 5. C. 423-431.
37. Stefan R.-I., Bokretzion R. G., van Staden J. F., Aboul-Enein H. Y. Simultaneous determination of L- and D-carnitine using a sequential injection analysis/amperometric biosensors system // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2003. T. 33, № 2. C. 323-328.
38. Stefan R.-I., van Staden J. F., Aboul-Enein H. Y. Biosensors for the enantioselective analysis of pipecolic acid // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2003. T. 94, № 3. C. 271-275.
39. Rabin B. R., Harbron S., Eggelte H. J., Hollaway M. R. Amplification assay for hydrolase enzymes // *Google Patents*, 1995.
40. Szwajcer E., Mosbach K. Isolation and partial characterization of a D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from the yeast *Trigonopsis variabilis* // *Biotechnology letters*. 1985. T. 7, № 1. C. 1-7.
41. Schröder T., Andreesen J. Studies on the inactivation of the flavoprotein-D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* // *Applied microbiology and biotechnology*. 1996. T. 45, № 4. C. 458-464.
42. Molla G., Sacchi S., Bernasconi M., Pilone M. S., Fukui K., Pollegioni L. Characterization of human D-amino acid oxidase // *FEBS letters*. 2006. T. 580, № 9. C. 2358-2364.
43. Piubelli L., Caldinelli L., Molla G., Pilone M. S., Pollegioni L. Conversion of the dimeric D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis* to a monomeric form. A rational mutagenesis approach // *FEBS Lett*. 2002. T. 526, № 1-3. C. 43-8.
44. Shimekake Y., Hirato Y., Funabashi R., Okazaki S., Goto M., Furuichi T., Suzuki H., Kera Y., Takahashi S. X-ray structure analysis of a unique

- d-amino-acid oxidase from the thermophilic fungus *Rasamsonia emersonii* strain YA // *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Communications*. 2020. T. 76, № 11. C. 517-523.
45. Mattevi A., Vanoni M. A., Todone F., Rizzi M., Teplyakov A., Coda A., Bolognesi M., Curti B. Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996. T. 93, № 15. C. 7496-7501.
46. Umhau S., Pollegioni L., Molla G., Diederichs K., Welte W., Pilone M. S., Ghisla S. The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. T. 97, № 23. C. 12463-12468.
47. Todone F., Vanoni M. A., Mozzarelli A., Bolognesi M., Coda A., Curti B., Mattevi A. Active site plasticity in D-amino acid oxidase: a crystallographic analysis // *Biochemistry*. 1997. T. 36, № 19. C. 5853-5860.
48. Miura R., Setoyama C., Nishina Y., Shiga K., Mizutani H., Miyahara I., Hirotsu K. Structural and mechanistic studies on D-amino acid oxidase· substrate complex: Implications of the crystal structure of enzyme· substrate analog complex // *The Journal of Biochemistry*. 1997. T. 122, № 4. C. 825-833.
49. Mizutani H., Miyahara I., Hirotsu K., Nishina Y., Shiga K., Setoyama C., Miura R. Three-dimensional structure of the purple intermediate of porcine kidney D-amino acid oxidase. Optimization of the oxidative half-reaction through alignment of the product with reduced flavin // *The Journal of Biochemistry*. 2000. T. 128, № 1. C. 73-81.
50. Pollegioni L., Diederichs K., Molla G., Umhau S., Welte W., Ghisla S., Pilone M. S. Yeast D-amino acid oxidase: Structural basis of its catalytic properties // *Journal of Molecular Biology*. 2002. T. 324, № 3. C. 535-546.
51. Mizutani H., Miyahara I., Hirotsu K., Nishina Y., Shiga K., Setoyama C., Miura R. Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid

- oxidase at 3.0 Å resolution // *The Journal of Biochemistry*. 1996. T. 120, № 1. C. 14-17.
52. Kawazoe T., Tsuge H., Pilone M. S., Fukui K. Crystal structure of human D-amino acid oxidase: context-dependent variability of the backbone conformation of the VAAGL hydrophobic stretch located at the si-face of the flavin ring // *Protein science*. 2006. T. 15, № 12. C. 2708-2717.
53. Kawazoe T., Tsuge H., Imagawa T., Aki K., Kuramitsu S., Fukui K. Structural basis of D-DOPA oxidation by D-amino acid oxidase: alternative pathway for dopamine biosynthesis // *Biochemical and biophysical research communications*. 2007. T. 355, № 2. C. 385-391.
54. Sparey T., Abeywickrema P., Almond S., Brandon N., Byrne N., Campbell A., Hutson P. H., Jacobson M., Jones B., Munshi S. The discovery of fused pyrrole carboxylic acids as novel, potent D-amino acid oxidase (DAO) inhibitors // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008. T. 18, № 11. C. 3386-3391.
55. Duplantier A. J., Becker S. L., Bohanon M. J., Borzilleri K. A., Chrnyk B. A., Downs J. T., Hu L.-Y., El-Kattan A., James L. C., Liu S. Discovery, SAR, and pharmacokinetics of a novel 3-hydroxyquinolin-2 (1 H)-one series of potent d-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors // *Journal of medicinal chemistry*. 2009. T. 52, № 11. C. 3576-3585.
56. Hopkins S. C., Heffernan M. L., Saraswat L. D., Bowen C. A., Melnick L., Hardy L. W., Orsini M. A., Allen M. S., Koch P., Spear K. L. Structural, kinetic, and pharmacodynamic mechanisms of D-amino acid oxidase inhibition by small molecules // *Journal of medicinal chemistry*. 2013. T. 56, № 9. C. 3710-3724.
57. Hondo T., Warizaya M., Niimi T., Namatame I., Yamaguchi T., Nakanishi K., Hamajima T., Harada K., Sakashita H., Matsumoto Y. 4-Hydroxypyridazin-3 (2 H)-one derivatives as novel D-amino acid oxidase inhibitors // *Journal of medicinal chemistry*. 2013. T. 56, № 9. C. 3582-3592.
58. Yasukawa K., Nakano S., Asano Y. Tailoring D-amino acid oxidase from the pig kidney to R-stereoselective amine oxidase and its use in the

- deracemization of α -methylbenzylamine // *Angewandte Chemie*. 2014. T. 126, № 17. C. 4517-4520.
59. Terry-Lorenzo R. T., Chun L. E., Brown S. P., Heffernan M. L., Fang Q. K., Orsini M. A., Pollegioni L., Hardy L. W., Spear K. L., Large T. H. Novel human D-amino acid oxidase inhibitors stabilize an active-site lid-open conformation // *Bioscience reports*. 2014. T. 34, № 4.
60. Kato Y., Hin N., Maita N., Thomas A. G., Kurosawa S., Rojas C., Yorita K., Slusher B. S., Fukui K., Tsukamoto T. Structural basis for potent inhibition of d-amino acid oxidase by thiophene carboxylic acids // *European journal of medicinal chemistry*. 2018. T. 159. C. 23-34.
61. PORTER D. J., DJT P., JG V. Mechanistic features of the D-amino acid oxidase reaction studied by double stopped flow spectrophotometry // 1977.
62. Khoronenkova S., Tishkov V. Recombinant D-amino acid oxidase with improved properties // *Chinese Journal of Biotechnology*. 2008. T. 24, № 12. C. 2125-2126.
63. Świętochowska, D., Łochowicz, A., Ocal, N., Pollegioni, L., Charmantray, F., Hecquet, L., & Szymańska, K. Co-Immobilization of D-Amino Acid Oxidase, Catalase, and Transketolase for One-Pot, Two-Step Synthesis of L-Erythrulose. // *Catalysts*. 2023. T. 13. №. 1. C. 95.
64. Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. Characterization and high-level production of D-amino acid oxidase in *Candida boidinii* // *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2001. T. 65, № 3. C. 627-633.
65. Barber, M. S., Giesecke, U., Reichert, A., Minas, W. Industrial enzymatic production of cephalosporin-based β -lactams // *Molecular Biotechnology of Fungal beta-Lactam Antibiotics and Related Peptide Synthetases*. 2004. C. 179-215.
66. Chang J., Bei J., Shao Q., Wang H., Fan H., Yau T. O., Bu W., Ruan J., Wei D., Gao S. Full-Length Genome of an *Ogataea polymorpha* Strain CBS4732 *ura3* Δ Reveals Large Duplicated Segments in Subtelomeric Regions // *Frontiers in microbiology*. 2022. C. 861.

67. Ravin N. V., Eldarov M. A., Kadnikov V. V., Beletsky A. V., Schneider J., Mardanov A. V., Smekalova E. M., Zvereva M. I., Dontsova O. A., Mardanov A. V. Genome sequence and analysis of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* DL1 // *BMC genomics*. 2013. T. 14, № 1. C. 1-20.
68. Kunze G., Kang H. A., Gellissen G. *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*): biology and applications // *Yeast biotechnology: diversity and applications*. 2009. C. 47-64.
69. Ramezani-Rad M., Hollenberg C. P., Lauber J., Wedler H., Griess E., Wagner C., Albermann K., Hani J., Piontek M., Dahlems U. The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis // *FEMS yeast research*. 2003. T. 4, № 2. C. 207-215.
70. Kang H. A., Gellissen G. *Hansenula polymorpha* // *Production of Recombinant Proteins*. 2005. C. 111-142.
71. Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., De Montigny J., Marck C., Neuvéglise C., Talla E. Genome evolution in yeasts // *Nature*. 2004. T. 430, № 6995. C. 35-44.
72. Chang Y. C., Khanal Lamichhane A., Bradley J., Rodgers L., Ngamskulrungrong P., Kwon-Chung K. J. Differences between *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in the molecular mechanisms governing utilization of D-amino acids as the sole nitrogen source // *PLoS One*. 2015. T. 10, № 7. C. e0131865.
73. Saitoh Y., Katane M., Kawata T., Maeda K., Sekine M., Furuchi T., Kobuna H., Sakamoto T., Inoue T., Arai H. Spatiotemporal localization of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidases during development in *Caenorhabditis elegans* // *Molecular and cellular biology*. 2012. T. 32, № 10. C. 1967-1983.
74. Uda K., Abe K., Dehara Y., Mizobata K., Sogawa N., Akagi Y., Saigan M., Radkov A. D., Moe L. A. Distribution and evolution of the serine/aspartate racemase family in invertebrates // *Amino Acids*. 2016. T. 48, № 2. C. 387-402.

75. Imanishi D., Kera Y., Takahashi S. Identification of an acidic amino acid permease involved in d-aspartate uptake in the yeast *Cryptococcus humicola* // *Microorganisms*. 2021. T. 9, № 1. C. 192.
76. Noble R. W., Gibson Q. H. The Reaction of Ferrous Horseradish Peroxidase with Hydrogen Peroxide // *Journal of Biological Chemistry*. 1970. T. 245, № 9. C. 2409-2413.
77. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // *Bioinformatics*. 2012. T. 28, № 8. C. 1166-7.
78. Edgar R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity // *BMC Bioinformatics*. 2004. T. 5. C. 113.
79. Baek M., DiMaio F., Anishchenko I., Dauparas J., Ovchinnikov S., Lee G. R., Wang J., Cong Q., Kinch L. N., Schaeffer R. D., Millan C., Park H., Adams C., Glassman C. R., DeGiovanni A., Pereira J. H., Rodrigues A. V., van Dijk A. A., Ebrecht A. C., Opperman D. J., Sagmeister T., Buhlheller C., Pavkov-Keller T., Rathinaswamy M. K., Dalwadi U., Yip C. K., Burke J. E., Garcia K. C., Grishin N. V., Adams P. D., Read R. J., Baker D. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network // *Science*. 2021. T. 373, № 6557. C. 871-+.
80. Phillips J. C., Hardy D. J., Maia J. D. C., Stone J. E., Ribeiro J. V., Bernardi R. C., Buch R., Fiorin G., Henin J., Jiang W., McGreevy R., Melo M. C. R., Radak B. K., Skeel R. D., Singharoy A., Wang Y., Roux B., Aksimentiev A., Luthey-Schulten Z., Kale L. V., Schulten K., Chipot C., Tajkhorshid E. Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD // *Journal of Chemical Physics*. 2020. T. 153, № 4.
81. Jo S., Kim T., Iyer V. G., Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM // *J Comput Chem*. 2008. T. 29, № 11. C. 1859-65.
82. Yu W. B., He X. B., Vanommeslaeghe K., MacKerell A. D. Extension of the CHARMM general force field to sulfonyl-containing compounds and its

- utility in biomolecular simulations // *Journal of Computational Chemistry*. 2012. Dec 5. T. 33, № 31. C. 2451-2468.
83. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., MacKerell A. D. CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-Like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields // *Journal of Computational Chemistry*. 2010. T. 31, № 4. C. 671-690.
84. Vanommeslaeghe K., MacKerell A. D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: Bond Perception and Atom Typing // *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012. T. 52, № 12. C. 3144-3154.
85. Vanommeslaeghe K., Raman E. P., MacKerell A. D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: Assignment of Bonded Parameters and Partial Atomic Charges // *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012. T. 52, № 12. C. 3155-3168.
86. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // *Journal of Molecular Graphics & Modelling*. 1996. T. 14, № 1. C. 33-38.
87. Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S., Olson A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility // *J Comput Chem*. 2009. T. 30, № 16. C. 2785-91.
88. Santos-Martins D., Solis-Vasquez L., Tillack A. F., Sanner M. F., Koch A., Forli S. Accelerating AutoDock4 with GPUs and Gradient-Based Local Search // *J Chem Theory Comput*. 2021. T. 17, № 2. C. 1060-1073.
89. Takahashi S., Osugi K., Shimekake Y., Shinbo A., Abe K., Kera Y. Characterization and improvement of substrate-binding affinity of d-aspartate oxidase of the thermophilic fungus *Thermomyces dupontii* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019. T. 103, № 10. C. 4053-4064.
90. Osborn M. J. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall // *Annu Rev Biochem*. 1969. T. 38. C. 501-38.

91. Man E. H., Sandhouse M. E., Burg J., Fisher G. H. Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain // *Science*. 1983. T. 220, № 4604. C. 1407-1408.
92. Ohtani S., Matsushima Y., Ohhira H., Watanabe A. Age-related changes in D-aspartic acid of rat teeth // *Growth, Development, and Aging: GDA*. 1995. T. 59, № 1-2. C. 55-61.
93. Helfman P. M., Bada J. L. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975. T. 72, № 8. C. 2891-2894.
94. Poinar H. N., Höss M., Bada J. L., Pääbo S. Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA // *Science*. 1996. T. 272, № 5263. C. 864-866.
95. Wang Q., Zheng H., Tao R., Li Q., Jiang Y., Yang S. *Vitreoscilla hemoglobin* enhances the catalytic performance of industrial oxidases in vitro // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2022. C. 1-11.
96. Patel R. N. Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug // *Biomolecular Engineering*. 2001. T. 17, № 6. C. 167-182.
97. Sacchi S., Lorenzi S., Molla G., Pilone M. S., Rossetti C., Pollegioni L. Engineering the Substrate Specificity of d-Amino-acid Oxidase // *Journal of Biological Chemistry*. 2002. T. 277, № 30. C. 27510-27516.
98. Boselli A., Piubelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M. S., Ghisla S., Pollegioni L. On the mechanism of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: role of the active site serine 335 // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2004. T. 1702, № 1. C. 19-32.
99. Setoyama C., Nishina Y., Mizutani H., Miyahara I., Hirotsu K., Kamiya N., Shiga K., Miura R. Engineering the substrate specificity of porcine kidney D-amino acid oxidase by mutagenesis of the “active-site lid” // *Journal of biochemistry*. 2006. T. 139, № 5. C. 873-879.
100. Kawazoe T., Tsuge H., Pilone M. S., Fukui K. Crystal structure of human D-amino acid oxidase: context-dependent variability of the backbone

- conformation of the VAAGL hydrophobic stretch located at the si-face of the flavin ring // *Protein science*. 2006. Т. 15, № 12. С. 2708-2717.
101. Bakke M., Setoyama C., Miura R., Kajiyama N. Thermostabilization of porcine kidney d-amino acid oxidase by a single amino acid substitution // *Biotechnology and bioengineering*. 2006. Т. 93, № 5. С. 1023-1027.
102. Wong K.-S., Fong W.-P., Tsang P. W.-K. A single Phe54Tyr substitution improves the catalytic activity and thermostability of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase // *New biotechnology*. 2010. Т. 27, № 1. С. 78-84.
103. Комарова Н.В. Инженерия каталитических свойств и стабильности оксидазы D-аминокислот // Дис.канд.хим.наук. М. МГУ. 2012. 166 с.
104. Голубев И.В. Структурно-функциональные исследования дрожжевой оксидазы D-аминокислот методом рационального дизайна // Дис.канд.хим.наук. М. МГУ. 2014. 246 с.
105. Jumper J., Hassabis D. Protein structure predictions to atomic accuracy with AlphaFold// *Nat. Methods*. 2022. Т. 19. С. 11-12.
106. Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Khijniak T.V., Zaharycheva A.P., Boueva O.V., Ariskina E.V., Bunk B., Sproer C., Evtushenko L.I., Kublanov I.V., Hahnke R.L. *Natronosporangium hydrolyticum* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic polyhydrolytic actinobacterium from a soda solonchak soil in Central Asia// *Applied Microbiology*. 2022. Т. 45, № 3. С. 126307
107. Sorokin D.Y., Khijniak T.V., Zakharycheva A.P., Elcheninov A.G., Hahnke R.L., Boueva O.V., Ariskina E.V., Bunk B., Kublanov I.V., Evtushenko L.I. *Natronoglycomyces albus* gen. nov., sp. nov., a haloalkaliphilic actinobacterium from a soda solonchak soil // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2021. Т. 71, №5. С. 04804.
108. Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Bale N.J., Sinnighe Damste J.S., Khijniak T.V., Kublanov I.V. *Natrarchaeobius chitinivorans* gen. nov., sp. nov., and *Natrarchaeobius halalkaliphilus* sp.

- nov., alkaliphilic, chitin-utilizing haloarchaea from hypersaline alkaline lakes // *Applied Microbiology*. 2019. T. 42. C. 309-318.
109. Pollegioni L., Molla G., Campaner S., Martegani E., Pilone M.S. Cloning, sequencing and expression in *E. coli* of a d-amino acid oxidase cDNA from *Rhodotorula gracilis* active on cephalosporin C // *Journal of Biotechnology*. 1997. T. 58, №2. C. 115-123.
110. Gonzalez F.J., Montes J., Martin F., Lopez M.C., Ferminan E., Catalan J., Galan M.A., Dominguez A. Molecular cloning of TvDAO1, a gene encoding a D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* // *Yeast*. 1997. T. 13, №15. C. 1399-1408.
111. Lorenzo, M. P., Dudzik, D., Varas, E., Gibellini, M., Skotnicki, M., Zorawski, M., Garcia, A. Optimization and validation of a chiral GC–MS method for the determination of free d-amino acids ratio in human urine: Application to a Gestational Diabetes Mellitus study. // *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015. T. 107, C. 480-487.
112. Tang, H., Jensen, K., Houang, E., McRobb, F. M., Bhat, S., Svensson, M., Ellard, J. M. Discovery of a Novel Class of d-Amino Acid Oxidase Inhibitors Using the Schrödinger Computational Platform // *Journal of Medicinal Chemistry*. 2022. T. 65. №. 9. C. 6775-6802.
113. Атрошенко Д.Л. Биоинженерия кинетических свойств и стабильности дрожжевой оксидазы D-аминокислот // Дис.канд.хим.наук. М. МГУ. 2019. 128 с.
114. Kuo, C. Y., Lin, C. H., & Lane, H. Y. Targeting d-Amino Acid Oxidase (DAAO) for the Treatment of Schizophrenia: Rationale and Current Status of Research. // *CNS drugs*. 2022. T. 36, № 1. C 1143-1153.
115. Rosini, E., & Pollegioni, L. PEG-DAAO conjugate: a promising tool for cancer therapy optimized by protein engineering. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2020. T 24. C. 102122.
116. Fuentes-Baile, M., García-Morales, P., Pérez-Valenciano, E., Ventero, M. P., Sanz, J. M., Romero, C. D. J., Saceda, M. (2020). Cell death

- mechanisms induced by CLytA-DAAO chimeric enzyme in human tumor cell lines. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. T. 21, № 22. C. 8522.
117. Fuentes-Baile, M., Pérez-Valenciano, E., García-Morales, P., de Juan Romero, C., Bello-Gil, D., Barberá, V. M., Saceda, M. CLytA-DAAO chimeric enzyme bound to magnetic nanoparticles. A new therapeutical approach for cancer patients? // *International journal of molecular sciences*. 2022. T. 22, №3. C. 1477.
118. Fuentes-Baile, M., Bello-Gil, D., Pérez-Valenciano, E., Sanz, J. M., García-Morales, P., Maestro, B., Saceda, M. CLytA-DAAO, free and immobilized in magnetic nanoparticles, induces cell death in human cancer cells. // *Biomolecules*. 2020. T. 10, № 2. C. 222.
119. Moussa, S., Murtas, G., Pollegioni, L., & Mauzeroll, J. Enhancing electrochemical biosensor selectivity with engineered D-Amino acid oxidase enzymes for D-Serine and D-Alanine quantification. // *ACS Applied Bio Materials*. 2021. T. 4, № 7. C. 5598-5604.
120. Marcone, G. L., Binda, E., Rosini, E., Abbondi, M., & Pollegioni, L. Antibacterial Properties of D-Amino acid oxidase: Impact on the food industry. // *Frontiers in Microbiology*. 2019. T. 10. C. 2786.
121. Padhi, A. K., & Zhang, K. Y. Mechanistic insights into the loss-of-function mechanisms of rare human D-amino acid oxidase variants implicated in amyotrophic lateral sclerosis. // *Scientific Reports*. 2020. T. 10, № 1. C. 1-14.
122. Moussa, S., Van Horn, M. R., Shah, A., Pollegioni, L., Thibodeaux, C. J., Ruthazer, E. S., & Mauzeroll, J. A Miniaturized Enzymatic Biosensor for Detection of Sensory-Evoked D-serine Release in the Brain. // *Journal of The Electrochemical Society*. 2021. T. 168, № 2. C. 025502.
123. Sasamura T., Matsuda A., Kokuba Y. Effects of D-methionine-containing solution on tumor cell growth in vitro. // *Arzneimittelforschung*. 1999. T. 49. C. 541–543.

124. Sasamura T., Matsuda A., Kokuba Y. Determination of D-amino acid oxidase activity in tumour cells. // *Ann. Clin. Biochem.* 2002. T. 39. C. 595-598.
125. Stegman L.D., Zheng H., Neal E.R. Induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: a cancer gene therapy strategy. // *Hum. Gene Ther.* 1998. T. 9. C. 185–193.
126. Fang J., Sawa T., Akaike T., Maeda H. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. // *Cancer Res.* 2002. T. 62. C. 3138–3143.
127. Bava A., Gornati R., Cappellini F., Caldinelli L., Pollegioni L., Bernardini G. D-amino acid oxidase-nanoparticle system: a potential novel approach for cancer enzymatic therapy. // *Nanomedicine (Lond)*. 2013. T. 8, № 11. C. 1797–1806.
128. Fang J., Sawa T., Akaike T., Greish K., Maeda H. Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a heme oxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin // *Int. J. Cancer.* 2004. T. 109. C. 1–8.
129. Komarova N.V., Golubev I.V., Khoronenkova S.V., Chubar T.A., Tishkov V.I. Engineering of substrate specificity of D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*: Directed mutagenesis of Phe258 residue // *Biochemistry (Moscow)*. 2012. № 77(10). C. 1181-1189.
130. Тишков В.И., Хороненкова С.В., Савина Л.И. Мутантные оксидазы D-аминокислот. Российская Федерация, 2362806, С12N9/06. 2007
131. Хороненкова С.В. Рекombинантная оксидаза D-аминокислот: получение и структурно-функциональные исследования // Дис.канд.хим.наук. М. МГУ. 2008. 162 с.