

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Лю Вэньсюэ

Исследование молекулярных свойств D-аминокислотной оксидазы

Специальность 1.5.2. Биофизика (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова

Научные руководители

Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор,

Рубин Андрей Борисович, доктор биологических наук, профессор, академик РАН

Официальные оппоненты

Лопина Ольга Дмитриевна, доктор биологических наук, профессор, кафедра биохимии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник

Гудилин Евгений Алексеевич, доктор химических наук, профессор, член-корр. РАН, кафедра наноматериалов факультета наук о материалах МГУ имени М.В. Ломоносова, заведующий кафедрой

Агафонов Михаил Олегович, доктор биологических наук, группа геномного редактирования промышленных микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы Биотехнологии РАН», ведущий научный сотрудник, руководитель группы

Защита диссертации состоится «17» апреля 2025 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, ауд. «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3265>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень её разработанности

Известно, что фермент, D-аминокислотная оксидаза (DAAO) представляет собой FAD-содержащий флавопротеин, катализирующий стереоспецифическое окислительное дезаминирование D-аминокислот (D-AA) до альфа-кетокислот и аммиака. Ко-субстратом является кислород, который в ходе реакции превращается в перекись водорода. DAAO выполняют важные функции в клетках и находят широкое практическое применение в биотехнологии. В клетках организма человека DAAO участвуют в синтезе нейромедиаторов, а изменения активности DAAO и концентрации D-AA сопровождает патогенез ряда заболеваний (шизофрения, болезни Альцгеймера и Паркинсона). У низших эукариот ферменту отводится важная функция: клетки грибов и дрожжей используют D-AA в качестве источника углерода и азота. Ферменты DAAO, из разных источников, характеризуются различной чувствительностью к pH, температуре, а также величиной K_M и удельной активностью фермента по отношению к различным субстратам.

Вариабельность типов и свойств DAAO определяет разнообразие их практического применения. Биосенсоры, разработанные на основе их активности и молекулярных свойств, могут быть использованы в новых методах диагностики и контроля бактериального загрязнения продуктов питания; биокатализаторы на основе DAAO широко распространены в промышленности для конверсии модифицированных D-аминокислот при синтезе антибиотиков; их высокая стереоспецифичность может быть использована для получения α -кетокислот, природных и неприродных L-аминокислот, важных для синтеза лекарств. В связи с высоким биотехнологическим и медицинским значением DAAO интерес представляет разработка эффективных и рентабельных систем для их биотехнологического получения. Перспективным организмом-хозяином для получения рекомбинантных DAAO являются метилотрофные дрожжи. Использование сильных регулируемых промоторов генов, отвечающих за утилизацию метанола у таких дрожжей, позволяет достичь высокого выхода целевого продукта при сравнительно низких затратах на ферментацию. Однако, возможность получения таких эндогенных оксидаз штаммов-хозяев исследована явно недостаточно. Гены и ферменты DAAO обнаружены у дрожжей *C. boidinii* (1 ген) и *P. pastoris* (2 гена). Но, гены, кодирующие DAAO другого важного для биотехнологии штамма

метилотрофных дрожжей *H. polymorpha* DL-1, до сих пор не были охарактеризованы, как и свойства продуктов этих генов. Геном штамма DL-1 был расшифрован в Центре биоинженерии РАН в 2013 году и, содержит 4 потенциальных гена DAAO - больше, чем любой из ранее изученных штаммов метилотрофных дрожжей (Ravin et al. 2013). Особый интерес представляет исследования физиологической роли, биохимических особенностей продуктов отдельных генов. Гены HP2082, HP2165, HP2914, HP2400 штамма DL1 кодируют белки размером от 332 до 359 а.к. и по данным аннотации относятся к суперсемейству FAD-зависимых оксидоредуктаз. Для этих соединений характерен значительно больший размер молекулы и более эффективные физико-химические свойства, чем у большинство известных ингибиторов DAAO. Однако, их соотношение элементов "структура-активность" изучена явно недостаточно. Изучение оксидаз D-аминокислот привлекает внимание специалистов в различных областях, однако даже среди близкородственных групп DAAO гомология аминокислотных последовательностей остается низкой, а высокая вариабельность их первичной структуры затрудняет поиск новых ферментов в известных геномах, особенно для бактериальных DAAO, что приводит к большому количеству неаннотированных генов DAAO (Atroshenko et al. 2022).

В настоящей работе мы исследовали молекулярные свойства фермента с помощью нокаута генов, кодирующих оксидазы D-аминокислот в сочетании с биофизическим анализом конформации белка и активного центра фермента.

Цели и задачи исследования

Целью работы было исследовать физиологическую роль ферментов DAAO у дрожжей *H. polymorpha* DL1, кодируемых разными генами и физико-химические свойства белка при активации фермента.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Создать конструкции для нокаута DAAO по генам HP2082, HP2165, HP2914, HP2400 и провести инактивацию этих генов в штамме *H. polymorpha* DL1.
2. Исследовать влияние нокаутов на активность DAAO при различных условиях культивирования и при культивировании штаммов с различными источниками азота и углерода.
3. Исследовать динамику экспрессии гена DAAO и оксидазной активности.
4. Разработать методику регистрации SERS и ИК-спектроскопии для

исследования DAAO;

5. Изучить изменения структуры флавина в процессе активации DAAO с помощью SERS;

6. Исследовать изменения структуры белка в процессе активности DAAO с помощью ИК-спектроскопии;

7. Исследовать структуру белка при активации DAAO с помощью пикосекундной флуоресценции (метод однофотонного счета).

Положения, выносимые на защиту

Получен набор мутантных штаммов *H. polymorpha* DL-1 с нарушением генов, кодирующих DAAO. Разработанный подход инактивации гена оксидазы D-аминокислот в дрожжах *H. Polymorpha* использован для получения нокаутных генов DAAO, их генетической и физиологической характеристики, а также для подтверждения субстратной специфичности оксидазы *H. polymorpha* и изучения конформации белков и флавинов *in vitro*.

Использование подложки из коллоидных наночастиц серебра позволяет увеличить чувствительность КР в 10^5 - 10^6 (регистрация сигнала при 10^{-9} моль/л белка) и исследовать изменения конформации флавина DAAO.

При взаимодействии флавина DAAO с субстратом происходит изменение его конформации, сопровождающееся смещением максимума SERS-спектра 1252 см^{-1} в длинноволновую область, что, вероятно, связано с изменением координации активного центра фермента по отношению к молекуле аминокислоты.

При взаимодействии DAAO с D-аланином изменения конформации флавина происходят в течение более короткого промежутка времени, чем при взаимодействии с D-серинном, что объясняет механизм субстратной специфичности DAAO.

С помощью ИК-спектроскопии и метода однофотонного счета выявлены изменения конформации белка (флуоресценция триптофана, вклад полос амида 1 и амида 2) при активации обоих типов DAAO, что свидетельствует о конформационных переходах не только во флавине, но и в молекуле белка.

Научная новизна работы

Сконструирован вектор для генетической инактивации гена оксидазы D-аминокислот, получена коллекция нокаутов генов DAAO/DDO, проведена их генетическая и физиологическая характеристика. Субстратная специфичность оксидаз *H. polymorpha* была подтверждена с помощью нокаутных штаммов и исследована в системе *in vitro*. Установлено, что D-аланин в сочетании с 1% глицерином и 1% метанолом способен индуцировать активность всех трех основных DAAO *H. Polymorpha*, а глюкоза и L-аланин подавляют активность оксидазы. Доказано, что D-аланин в сочетании с 1% глицерином и 1% метанолом индуцирует экспрессию генов HP2165 и HP2914. Установлено, что использование наноструктур серебра позволяет увеличить КР сигнал в 10^5 - 10^6 раз (разбавление образца до 10^{-9} моль/л). Доказана возможность эффективного использования КР для исследования конформационных изменений флавина DAAO. Установлено, что в ходе окислительно-восстановительной реакции взаимодействия флавина с субстратом происходит изменение его конформации: смещение максимума КР-спектра 1252см^{-1} в длинноволновую область, что, вероятно, связано с процессами координации активного центра DAAO по отношению к молекуле аминокислоты. При взаимодействии DAAO с D-аланином сдвиги в SERS-спектрах наблюдались в течение более короткого промежутка времени, чем при добавлении D-серина, что дополняет представление о механизме различной субстратной специфичности DAAO. С помощью ИК-спектроскопии выявлено изменение вклада полос амида 1 и амида 2 при активации обоих типов DAAO, что свидетельствует о конформационных переходах не только во флавине, но и в молекуле белка. Методом однофотонного счета со временем обнаружено уменьшение амплитуды флуоресценции триптофана при активации DAAO, которое происходит быстрее в рк DAAO, чем в Н.р. DAAO.

Теоретическая и практическая значимость работы

В связи с тем, что изменения активности DAAO и концентрации D-AA сопровождают патогенез ряда заболеваний (шизофрения, болезни Альцгеймера и Паркинсона), полученные данные: коллекция нокаутов генов DAAO/DDO штамма *H. Polymorpha* и их генетическая, ферментативная (субстратная специфичность) и физиологическая характеристика, а также использование наноструктур серебра для исследования

конформационных изменений DAAO позволит сформировать новые технологии диагностики заболеваний с применением методов SERS-, ИК-спектроскопии и флуоресценции однофотонного счета.

Методология и методы исследования

В работе использованы традиционные и современные методы молекулярной и клеточной биофизики. Для исследования генетических и молекулярных механизмов активности фермента DAAO, кодируемых разными генами дрожжей *H. polymorpha* DL1 использовали различные объекты ("DAAO из *Hansenula polymorpha*", "DAAO из почки свиньи") и методы: секвенирование ДНК, регистрация активности фермента, Раман- и ИК-спектроскопия, пикосекундная флуоресценция (метод однофотонного счета) и Surface-enhanced Raman (SERS).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается современными методами исследования, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам. Сформулированные в тексте работы положения, выводы и практические рекомендации продемонстрированы в приведенных таблицах и рисунках. Основные результаты работы были представлены на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" и Международной конференции и школе по нанобиотехнологии. Опубликовано 4 статьи¹ в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки), и представлены на семинаре кафедры биофизики, конференции "Форум молодых ученых "Ломоносов-2021" (Шэньчжэнь, 2021). "Lomonosov-2022"(Shenzhen, 2022).

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Полный объем диссертации составляет 170 страниц, содержит 56 рисунков, 10 таблиц и 201 источник литературы.

¹ Лю Вэньсюэ участвовала в получении результатов, опубликованных в статье Liu W., Shutova V.V., Maksimov G.V., **НАО J.**, He Y. Use of nanostructured silver substrates (coatings) to study the content and conformation of β -carotene // Herald of the Bauman Moscow State Technical University, Series Natural Sciences. – 2022. – Vol. 101, No. 2. – P. 112-124, для использования метода в исследовании фермента.

Основное содержание работы

Введение

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, представлены положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы

В разделе "Обзор литературы" представлено описание структурных и функциональных особенностей DAAO, анализ структур DAAO из различных источников, а также системы Cre-lox и методов оптической спектроскопии. Констатируется, что в пределах близкородственных групп (таких как бактерии, дрожжи, грибы и млекопитающие) гомология между аминокислотными последовательностями DAAO очень низкая. Отсутствие гомологии, особенно у DAAO из бактерий, затрудняет поиск новых ферментов в известных геномах из-за вариабельности первичной структуры DAAO. В связи с этим большое количество генов DAAO остается неаннотированным или неправильно аннотированным. DAAO дрожжей и млекопитающих имеют около 30% идентичности последовательности, в то время как pkDAAO (DAAO из Porcine kidney) имеет 85% идентичности последовательности с hDAAO (DAAO из *Human*). Несмотря на то, что каталитический механизм DAAO является общим, существуют значительные различия в многочисленных биохимических свойствах: каталитическая эффективность, специфичность по отношению к субстратам, олигомерное состояние, стабильность, кинетика ферментативной реакции и механизм взаимодействия «белок - флаavin (FAD)». Часть работы была проведена в лаборатории молекулярной генетики ФИЦ Биотехнологии РАН, где использовали процедуру многократной инактивации инсерционного гена в клетках *H.polyomorpha*, основанную на сайт-специфичной рекомбинации cre-lox. С развитием оптических методов исследований появилась возможность изучать конформацию ферментов, а также изменения конформации FAD-кофакторов при активации DAAO различными субстратами, что и было реализовано в настоящей работе.

Материалы и методы

В главе "Материалы и методы" описаны объекты ("DAAO из *Hansenula polymorpha*", "DAAO из почки свиньи") и методы исследования, порядок приготовления

препаратов и обработки полученных данных. *Секвенирование ДНК и компьютерные программы.* Выделение плазмидной ДНК, конструирование и анализ плазмид проводили с использованием известных методов генной инженерии (Okonechnikov et al. 2012). Нуклеотидные последовательности ПЦР-фрагментов и плазмид определяли методом секвенирования с использованием набора ABIPrizm 3100 DNA Sequencer с программным пакетом Applera "Big dye Cycle fluorescent dye sequencing kit". Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программного пакета Ugene (Okonechnikov et al. 2012). ДНК векторы в клетки дрожжей вводили при помощи литий-ацетат-опосредованной трансформации. Отбор нокаутных клонов по генам HP_2165, HP_2082, HP_2914, HP_2400 проводили с помощью ПЦР-анализа. *Определение активности ДАО* в пермеабелизированных клетках и белковых экстрактах проводили с помощью теста, основанного на определении концентрации кетокислот. *Получение наноструктур для усиления комбинационного рассеяния* (Liu et al. 2022). Использовались подложки с наноструктурированным покрытием на колоидами серебра, на которые наносились образцы каротина (2 - 0,02 мкг/мл или 37 нМоль/л - 3,7 нМ/л). *Анализ DAAO и D-аминокислот методом КР-спектроскопии.* Для исследования конформации кофактора-FAD очищенного препарата оксидазы D-аминокислот, выделенной из почек свиньи (pkDAAO, Shanghai Haruno Biotechnology Co., Ltd.) в окисленном состоянии и при добавлении избытка D-аланина или D-серина, использовали *SERS-спектроскопию.* *Инфракрасные спектры образцов регистрировали* на IR-Фурье спектрометре Spectrum Two (Perkin Elmer, США) с приставкой неполного внутреннего отражения (ATR-FTIR). *Пикосекундная флуоресценция триптофана* (метод однофотонного счета). Для диагностики конформационного состояния ДАО использовали однофотонный подсчет с временной корреляцией флуоресценции триптофана (Тгр) (τ_{fl} Тгр) в области 340 нм (возбуждение флуоресценции при 261 нм импульсным УФ-светодиодом (EPLD 265 нм) регистрировали с помощью 16-канального (корреляционного с однофотонным счетом) спектрографа (PML-SPEC, Becker & Hickl GmbH, Германия) (Tsoraev et al. 2022).

Результаты и их обсуждение

1. Создание и конструирование DAAO для дрожжей *Hansenula polymorpha*

Создание и конструирование вектора для получения нокаута гена HP 2165. С помощью программы NEB cutter были определены подходящие сайты рестрикции XmaI

в позициях 127 и 3371 участка хромосомной ДНК *H. polymorpha* слева и справа от гена HP2165, (Рис.1). Для клонирования гена HP2165 геномную ДНК гидролизировали с помощью рестриктазы XmaI, после чего провели лигирование с образованием кольцевых структур. Полученный препарат использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами 2165КОВ1 и 2165КОН3, специфично отжигающиеся на концах клонируемого фрагмента и несущие фланкирующие сайты рестрикции BamHI и HindIII. Продукт ПЦР размером 2100 п.н. гидролизировали по сайтам HindIII и BamHI и вставили в вектор pAM773 по сайтам HindIII и BglIII. Полученная плазмида была обозначена как LW2165 (Рис.1).

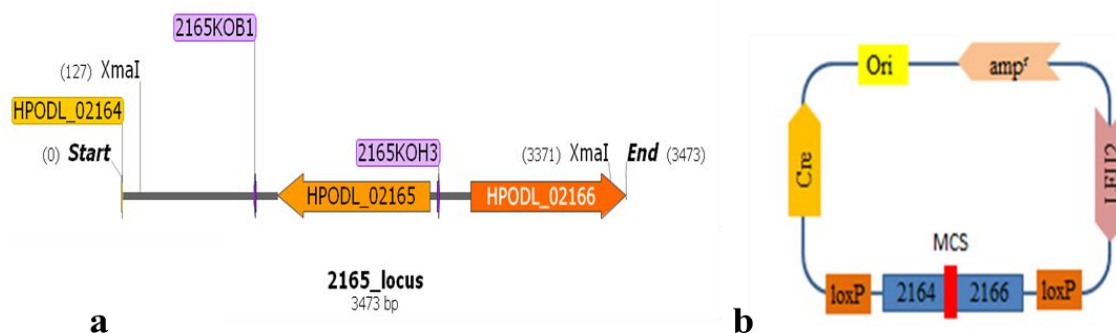


Рис. 1. Схема формирования и конструирования нокаута по HP2165. а - схема локуса HP2165 и фланкирующих областей. б - схема плазмиды LW2165. Где Cre, ген кодирующий Cre-рекомбиназу, с интроном; ori - бактериальный ориджин репликации; amp^r - бактериальный маркер устойчивости к ампициллину; LEU2, *S. cerevisiae* Ген LEU2 модифицированный для лучшей работы в *H. polymorpha*; MCS – полилинкер.

Конструирование кассеты для получения нокаута по гену HP 2082. Для поиска подходящих сайтов рестрикции последовательность локуса HP_2082 с фланкирующими сайтами была проанализирована с помощью программы NEB cutter с целью выявления двойных сайтов, расположенных на расстоянии 0,7-1,5 т.п.н. от начала и конца ФПК HP_2082, которые отсутствуют в векторе pAM773. Подходящие SalI-сайты были выявлены в позициях 77 и 3702 хромосомного участка ДНК *H. polymorpha* слева и справа от гена HP2082 (Рис.2,а). Подобранные с помощью программы Ugene, праймеры 2082L_BglII и 2082R_SpeI, включали фланкирующие сайты рестрикции BglIII и SpeI, которые входят в состав двух MCS вектора pAM773 и отсутствуют в двух фланкирующих последовательностях (между сайтами SalI и праймерами). Полученный препарат использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами 2082L_BglII и

2082R_SpeI, специфично отжигающиеся на концах клонируемого фрагмента и несущие фланкирующие сайты рестрикции BglII и SpeI.

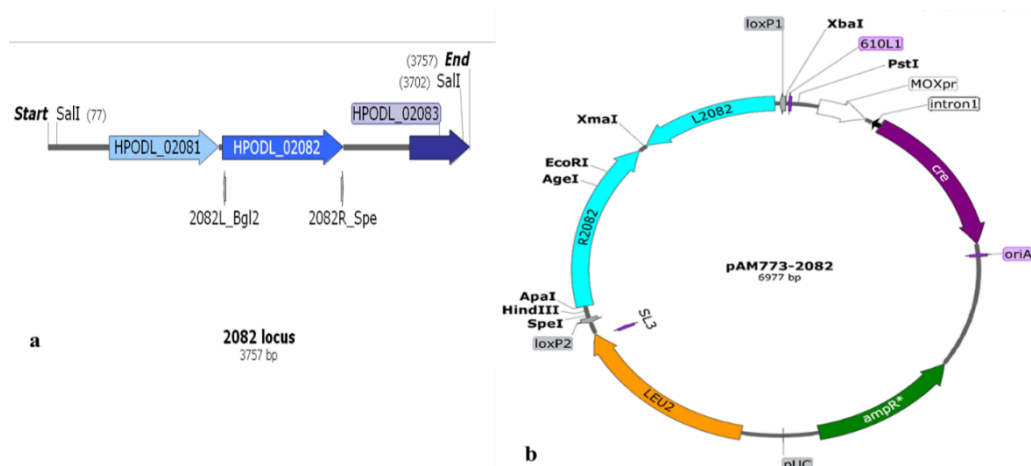


Рис. 2. Схема создания и конструирования нокаута по гену HP_2082. а - схема локуса HP2082 и фланкирующих сайтов. б - химическая диаграмма плазмиды LW2082.

После проведения ПЦР, на полученной матрице, с использованием полимеразы Phuzion, был получен фрагмент длиной 2500 п.н., который после гидролиза SpeI/BglII был клонирован в векторе pAM773, а полученную плазмиду обозначили LW2082 (Рис.2, б).

Разработка и конструирование вектора для нокаута гена HP 2400. С помощью программы NEB cutter подходящие сайты рестрикции BglII были выявлены в позициях 172 и 2145 участка хромосомной ДНК *H. polymorpha* слева и справа от гена HP2400 (Рис.3, а). Полученный препарат использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами 2400КОВ1 и 2400КОЕag, были введены фланкирующие сайты рестрикции BamHI и EagI (отсутствующие в двух фланкирующих последовательностях), специфично отжигающиеся на концах клонируемого фрагмента и несущие фланкирующие сайты рестрикции BamHI и EagI. Продукт ПЦР размером 900 п.н. гидролизовали по сайтам EagI/BamHI и вставили в вектор pAM773 по сайтам EagI и BamHI. Полученная плазмиды была обозначена как LW2400. (Рис.3, б). В ходе исследования были получены следующие нокаутные штаммы: одинарный нокаут: D2400::loxP; двойной нокаут: D2165::Zeo D2082::loxP, D2914::Zeo D2400::loxP, D2400::loxP D2082::loxP, тройной: D2914::Zeo D2400::loxP D2082::loxP. Для исследования биохимических и физиологических характеристик полученных штаммов мы использовали ранее полученный штамм D2165::Zeo D2914::Zeo из лабораторной коллекции.

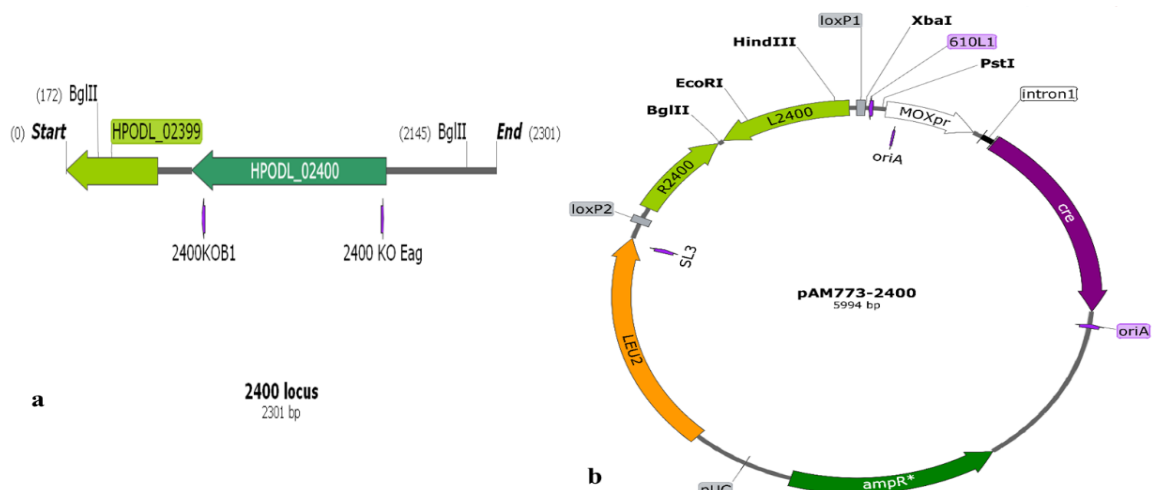


Рис.3. Схема создания и конструирования нокаута HP2400. а - схематическое изображение локуса HP2400 и фланкирующих сайтов. б - принципиальная схема плазмиды LW2400.

2. Получение и характеристика трансформантов с нокаутом гена HP2400.

Плазмидную ДНК LW2400 гидролизовали рестриктазой BglIII и использовали для трансформации штамма *H. polymorpha* DL1. В результате трансформации получили 45 клонов, 12 из которых использовали для анализа. Для подтверждения сайта интеграции слева провели ПЦР-анализ выделенной ДНК с использованием пары праймеров 2400LF1/610. Фрагменты ожидаемого размера, примерно 800 п.н., обнаружили в 12-ти образцах (Рис.4, а). Для проверки сайта интеграции справа провели ПЦР-анализ выделенной ДНК с парой праймеров 2400RF1/SL3. Фрагменты ожидаемого размера, примерно 900 п.н., обнаружили в 11 из 12 образцов. (Рис.4, а). Для индукции эксцизии трансформированные вставки переносили на среду с метанолом (Рис.4, б).

3. Культивирование нокаутных штаммов в жидких и плотных средах YNB с различными источниками азота.

В результате проведенной серии экспериментов было установлено, что внесенные генетические модификации не приводят к замедлению роста по сравнению с исходными - реципиентами DL1 и ранее полученными одиночными нокаутами D2165::Zeo, D2914::Zeo. Результат был получен при анализе характера роста культур на жидких средах 1xYNB (без аминокислот и сульфата аммония, 0,17% вес/объем) с использованием 2% глюкозы либо 1% метанола в качестве источника углерода. Для экспресс-оценки параметров роста и степени стрессоустойчивости штаммов

использовали метод серийных разведений. В результате по 3 мкл разведений ($10^{-4}, 10^{-3}, 10^{-2}, 10^{-1}$) наносили на чашки с плотной средой YNB с различными источниками азота (сульфат аммония, D-аланин, D, L-аланин), углерода, с добавлением 0,5 М хлорида натрия (устойчивость к осмотическому стрессу), 2 мМ перекиси водорода (устойчивость к оксидативному стрессу) (Рис. 5). Нами были выявлены различия в характере роста штаммов на твердой среде, а также в степени чувствительности штаммов как к осмотическому стрессу (рост на чашках с 0,8 М NaCl), так и окислительному стрессу (рост на чашках с 2,5 мМ перекисью водорода).

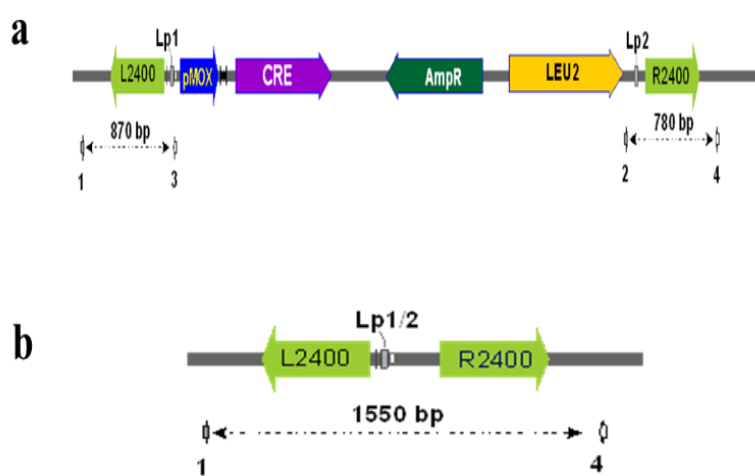


Рис. 4. Молекулярный анализ рекомбинантных клонов *H. Polymorpha*.

а - Схемы касетт локуса

HP2400 и длина фрагменты на правой и левой сторон.

б - Схема «нокаутного» локуса HP2400 и его длина фрагмента

В ходе исследования были выявлены различия в скорости роста штаммов на плотных средах с D, L-аланином. Эксперименты с двойными нокаутами D2165::Zeo D2082::loxP ($\Delta 2082/2165$) и D2400::Zeo D2082::loxP ($\Delta 2082/2400$) показали увеличение роста по сравнению с другими штаммами. В штамме $\Delta 2082/2165$ отсутствуют гены 2082 и 2165, при этом сохраняются гены 2914 и 2400; в штамме $\Delta 2082/2400$ нокаутирован ген 2082/2400, тогда как ген 2165/2914 сохраняется. В связи с этим, активность всех трех основных DAAO *H. polymorpha* (как 2165, 2400 и 2914) способен индуцировать D-аланин в сочетании с 1% глицерина и 1% метанола. По сравнению с другими штаммами

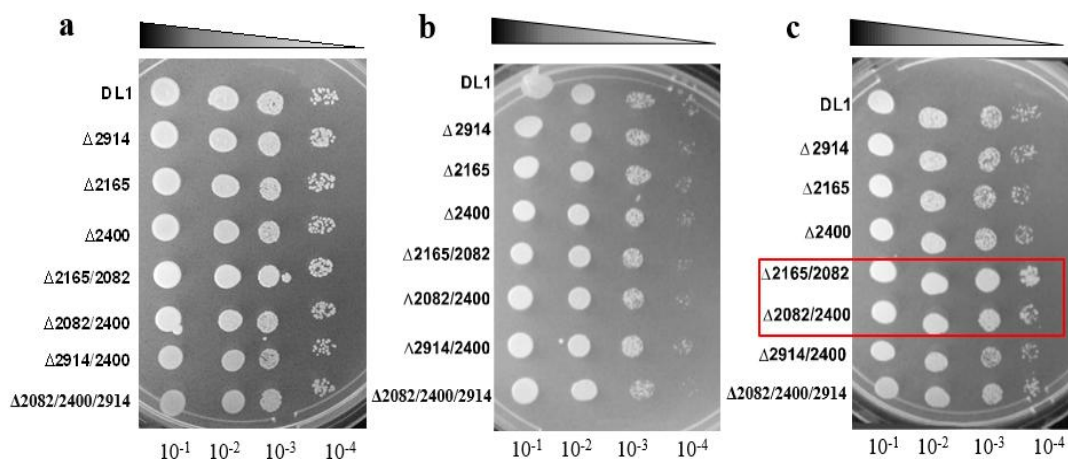


Рис. 5. Анализ роста штаммов в стандартных условиях YNB с разными источниками азота.
a - YNB + AS/2% Glu; **b** – YNB + AS/1% Gly/1% Met; **c** - YNB + DL-Ala/ 1% Gly/1% Met. Где AS - 0,5% сульфат аммония; DL-Ala - 30 мМ DL-аланина; 2% Glu - 2% глюкозы; 1% Gly 1% Met - 1% глицерина 1% метанола

в той же группе штаммы с геном 2914/2400 ($\Delta 2082/2165$) и геном 2165/2914 ($\Delta 2082/2400$) росли лучше, из них $\Delta 2082/2165$, который с геном 2914/2400, росли еще лучше. Поэтому можно предположить, что D-аланин в сочетании с 1% глицерина и 1% метанола индуцирует экспрессию генов HP2165 и HP2914. Поскольку у этих штаммов не затронут ген HP2914, можно предположить, что этот ген важен для окисления D-аланина (Рис. 5).

4. Исследование потребности в азоте и углеводе для индукции оксидазной активности фермента.

Экспрессия гена Dao1 у дрожжей *Rhodotorula gracilis* индуцируется при добавлении D-Ala, тогда как добавление L-Ala и, вероятно, глюкозы, приводит к пониженной регуляции (Müller 2019). Мы сравнили характер оптической плотности по отношению к D-Ala при выращивании штамма DL1 на средах с различными источниками азота (D-Ala, DL-Ala, сульфат аммония) и углевода. (Рис.).

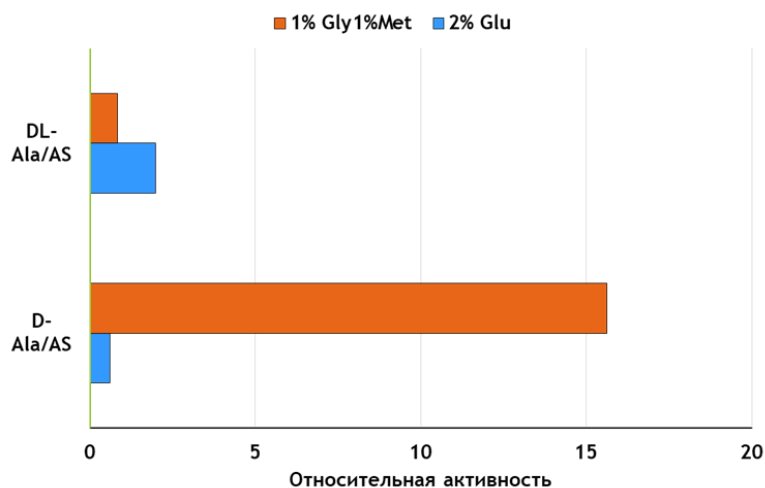


Рис. 6. Активность DAAO штамма *H. polymorpha* DL1, выращенного в течение 72 часов на среде с различными источниками азота и углеводов. DL-Ala/AS – субстрат DL-аланин и сульфат аммония; D-Ala/AS – субстрат D-аланин и сульфат аммония.

Итак, в ходе проведенного исследования нами была подтверждена роль D-Ala как эффективного индуктора активности DAAO при росте *H. polymorpha* на глицерин- и метанолсодержащей среде. Доказано, что наличие глюкозы и сульфата аммония ингибировало активность DAAO, а рост *H. polymorpha* на среде с глюкозой DL-Ala является слабым индуктором DAAO. Проявления индукции активностей DAAO у *H. polymorpha* и *R. gracilis* оказался сходным.

5. Исследование конформации кофактора-FAD при инкубации DAAO с D-аланином и D-серином.

В этой серии экспериментов мы исследовали изменения конформации DAAO при активации окисленной формы DAAO (Рис.7). В ходе исследования было установлено, что регистрация КР- спектров фермента без усиления сигнала с помощью серебряных наноструктур, не возможна (при используемых концентрациях фермента). В ходе анализа полученных SERS-спектров DAAO было установлено, что наиболее характерными максимумами были: 1630, 1584, 1546, 1355, 1252, и 1160 см^{-1} , что соответствует колебаниям связей в одном из трех ароматических колец кофермента FAD (Рис. 7, б). Нами установлено, что SERS-спектр восстановленной формы флавина (FAD) характеризуется меньшим числом максимумов по сравнению с окисленной формой, что связано, вероятно, с изменением делокализации π -электронных орбиталей на атомах N(5) и N(10) (Nishina et al., 1986). При добавлении к DAAO субстрата D-аланина в течение 10с нами были обнаружены изменения в спектре SERS, которые завершались через 60 с.

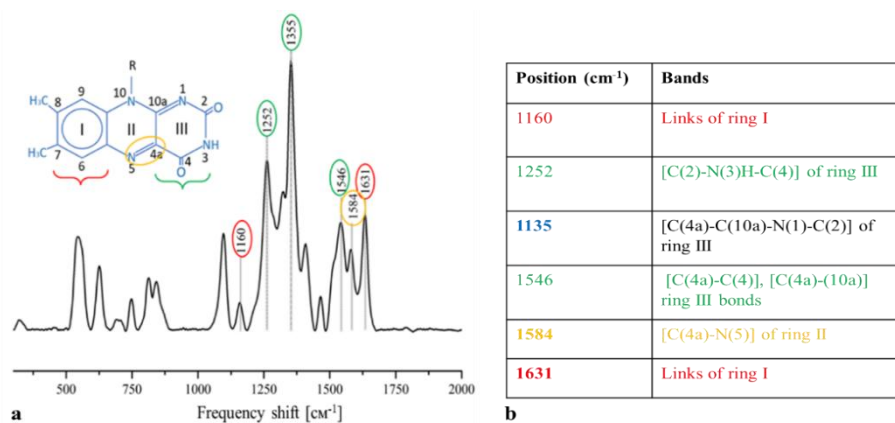


Рис. 7. SERS-спектр фермента DAAO (раствор фермента в концентрации 1 мг/мл) в окисленном состоянии. а - спектр соответствует спектру окисленного кофактора-флавина (FAD). Длина волны возбуждения 532 нм, мощность лазера не более 1 мВт, длина волны 800 нм, время накопления спектра 60 с. Положения максимумов характерных пиков в спектре и соответствующие им группы атомов в структурной формуле FAD обведены разными цветами. b - корреляция пиков SERS-спектра фермента DAAO с колебаниями связей FAD-групп (Kitagawa et al. 1979; Nishina et al. 1978, 1986; Nishina, Tojo, and Shiga 1988)

На Рис. 8. представлена серия SERS-спектров, полученных после добавления D-аланина в раствор с DAAO. Установлено, что через 1 секунду в SERS-спектре обнаружен максимум при 1612 см^{-1} (отмечен красной звездочкой на синем спектре Рис. 8, а), который исчезает на 3-й и последующих секундах и обусловлен либо семихиноной формой FAD (Nishina et al. 1980), либо полностью восстановленной формой флавина (Nishina et al. 1983). Также на SERS-спектре, полученном через секунду после добавления D-аланина, не выявлен пик 1252 см^{-1} , но появляется пик около 1300 см^{-1} , который также исчезает на второй и третьей секундах. Отметим, что аналогичные изменения полос SERS-спектра флавина наблюдаются при замещении водорода в положении N(3)-H дейтерием, а также при образовании водородной связи N(3)-H R (Kitagawa et al. 1979). Вероятно, положение максимума 1252 см^{-1} SERS-спектра может быть использована в качестве индикатора для оценки взаимодействия белков. Известно, что при ферментативной реакции DAAO происходит дегидрирование аминокислоты и перенос водорода на N(5)-флавин. Отметим, что стабилизация субстрата относительно фермента осуществляется за счёт водородных связей, а дегидрирование - за счет электростатических взаимодействий. Вероятно, N(3)-H-группа флавина не участвует в протекании ферментативной реакции, но стабилизация молекулы кофактора

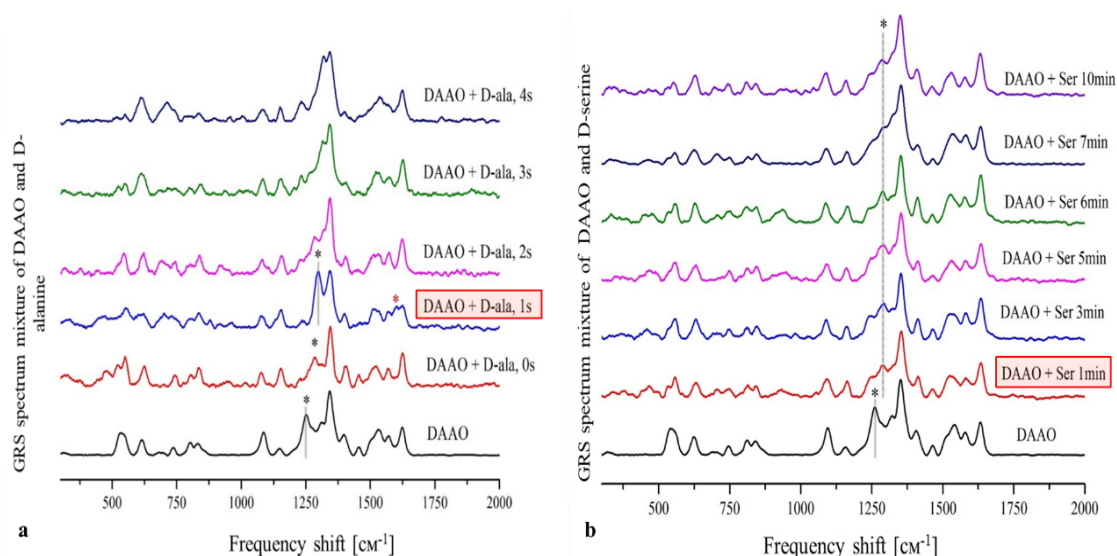


Рис. 8 SERS-спектры DAAO при избытке различных субстратов. Спектр после добавления D-аланина (а) и D-серина (б). Концентрация DAAO - 1 мг/мл, конечная концентрация D-аланина/D-серина в растворе с ферментом - 50 мМ. а - продолжительность записи спектров 1 с. На спектре, записанном через 1 с после добавления D-аланина (синий спектр с надписью "1s"), красной звездочкой отмечен пик при 1612 см^{-1} , соответствующий восстановленной молекуле FAD. Черной звездочкой на спектрах 0s и 1s отмечен сдвиг пика 1252 см^{-1} в положение около 1300 см^{-1} , что, вероятно, связано с изменением вклада колебаний водородной связи в III положении кольца группы FAD при стабилизации комплекса D-аланином; Б-звездочками обозначено изменение положения пика 1252 см^{-1} .

относительно лиганда может влиять на изменение вклада водородной связи $\text{N}(3)\text{-H}\cdots\text{R}$, что мы и наблюдаем при инкубации D-аланина с DAAO. Далее, восстановленный комплекс «фермент-аминокислота» подвергается повторному окислению, при этом выявлено исчезновение полосы КР спектра при 1612 см^{-1} , а максимум в области 1600 см^{-1} вновь смещается в низкочастотную область спектра SERS. На Рис.8, б представлены данные исследования динамики конформационного изменения FAD DAAO (1 мг/мл) в присутствии D-серина (100 мМ). Известно, что константа Михаэлиса (K_M) для ферментативной реакции между DAAO человека и D-серином в четыре раза выше по сравнению со значением K_M для реакции между DAAO и D-аланином. Более того, установлено, что относительная активность DAAO, выделенной из почки свиньи, в отношении D-аланина превосходит по сравнению с D-серином более чем в два раза (Gabler, Hensel, and Fischer 2000). Эти данные подтверждаются и результатами наших

экспериментов: при инкубации D-серина и DAAO, изменения в спектре FAD-групп происходят в течение более длительного периода по сравнению с инкубацией фермента с D-аланином (изменения обнаружены в течение первых секунд ферментативной реакции). При активации DAAO D-серином положение максимума при 1252 см^{-1} SERS-спектра смещается в течение 60 секунд, что сопровождается появлением нового пика, в области 1300 см^{-1} . Однако, в течение последующих 7-10 минут изменений в SERS-спектр в области $1200\text{-}1355 \text{ см}^{-1}$ не обнаружены. Предложенный нами подход, основанный на SERS-спектроскопии с использованием серебряных плазмонных наноструктур, может быть использован в исследованиях механизмов реакции DAAO с D-аминокислотами и определении эффективности генерации H_2O_2 различными формами DAAO.

6. Исследование конформационных изменений белка при активации DAAO

В данной серии экспериментов, с помощью ИК-спектроскопии, исследовали изменения структуры белка при активации DAAO. Известно, что полоса ИК- спектра в области 1650 см^{-1} соответствует групповым колебаниям пептидной связи в молекуле белка (амид I), наибольший вклад в этот тип колебаний вносят колебания карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$ пептидной связи, а полоса ИК - спектра, около 1550 см^{-1} соответствует групповым колебаниям пептидной связи амида II, включающим деформационные колебания N-H и валентные колебания C-N.

Изменения ИК-спектра белка при активации rkDAAO и DAAO из Hansenula polymorpha. Нами были выявлены изменения ИК-спектра белка, rkDAAO и DAAO из Hansenula polymorpha в присутствии аланина и серина (Рис.9 и 10). В ИК -спектре белка rkDAAO выявлен максимум, 1644 см^{-1} , который соответствует групповым колебаниям пептидной связи в молекуле белка (амид I, колебания карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$), и максимум, 1544 см^{-1} , который соответствует групповым колебаниям пептидных связей амида II (деформационные колебания N-H и валентные колебания C-N).

В ходе исследования изменений ИК-спектра HpDAAO также был выявлен максимум, при 1644 см^{-1} , который соответствует колебаниям карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$ амида I, и максимум, 1541 см^{-1} - деформационные колебания N-H и валентные колебания C-N амида II (Рис.10). Установлено, что в присутствии аминокислот наблюдается увеличение амплитуды и смещение максимумов ИК -спектров белков обоих ферментов (Рис. 9-10).

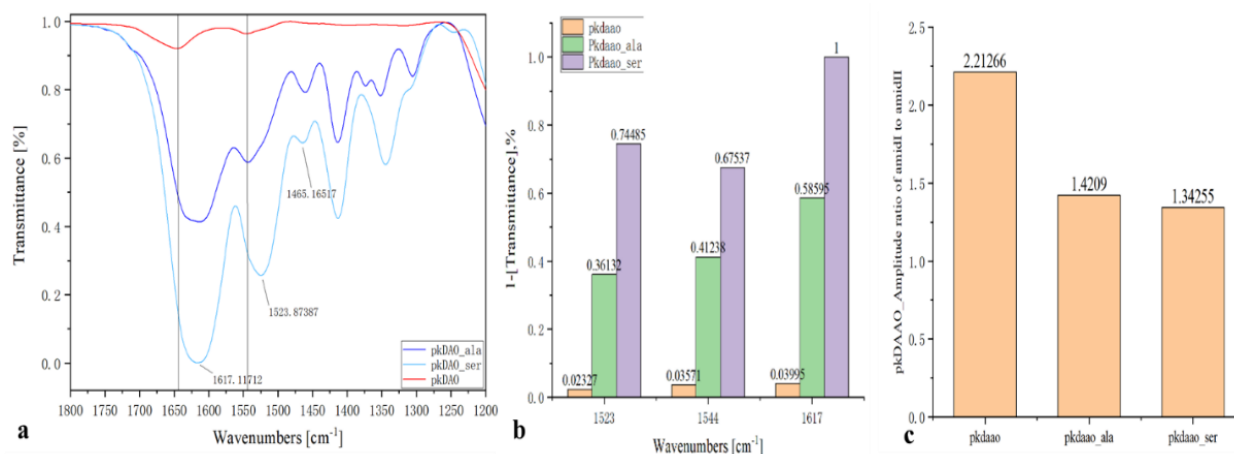


Рис. 9. Изменения ИК-спектра pkDAAO в присутствии D-аминокислот. а- IR-спектр pkDAAO; изменение амплитуды пика амида I (b) и отношение амплитуд амида I и амида II (c) для pkDAAO.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при активации pkDAAO и HpDAAO меняется конформация белка за счет вклада в структуре Amid I, (рис. 9, c). Для характеристики вторичной структуры белка была проведен анализ (деконволюция) второй производной полосы амида I (область 1600-1700 cm^{-1}) с помощью программы OriginPro 2022, модуль Peak Analyzer (Рис.11).

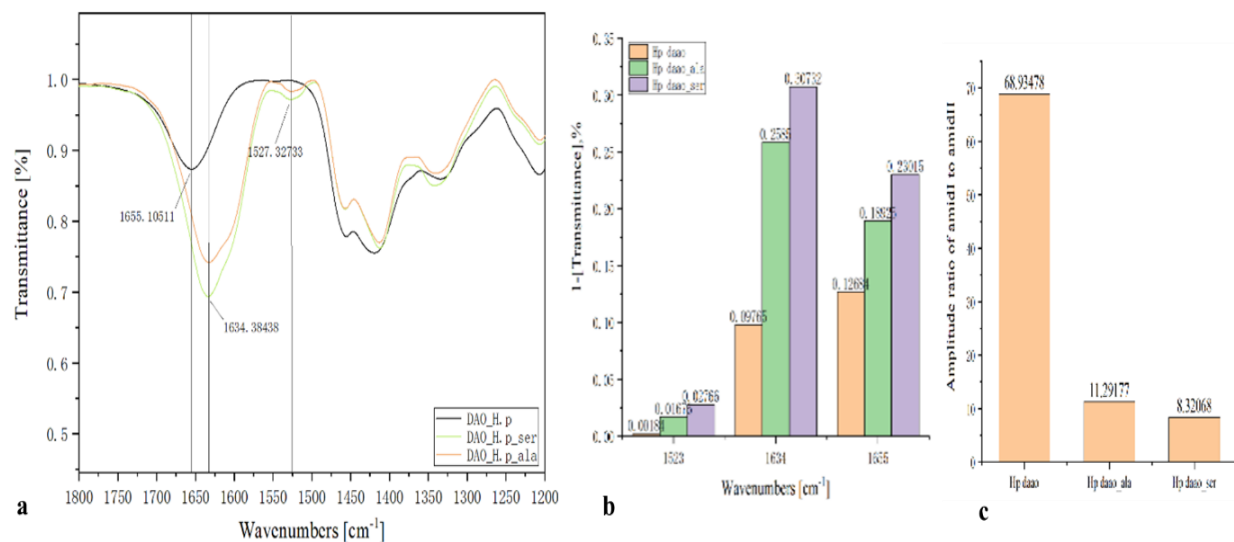


Рис.10. Изменения ИК- спектра HpDAAO в присутствии D-аминокислот. а - ИК -спектр HpDAAO; изменение амплитуды пика амида I (b) и соотношении амплитуд амида I и амида II (c) для DAAO_H.p.

Установлено, что вторичная структура HpDAAO, охарактеризованная с помощью метода ATR-FTIR, очень близка к структуре pkDAAO (Caldinelli et al. 2004). Отметим, что доля альфа-спиральных и бета-структур была относительно велика независимо от

источника используемого фермента. Установлено, что при активации фермента содержание альфа-спиралей во вторичной структуре DAAO увеличивается до 49%, а содержание бета-листов и бета-поворотов снижается (с 22 до 28%) (10, с).

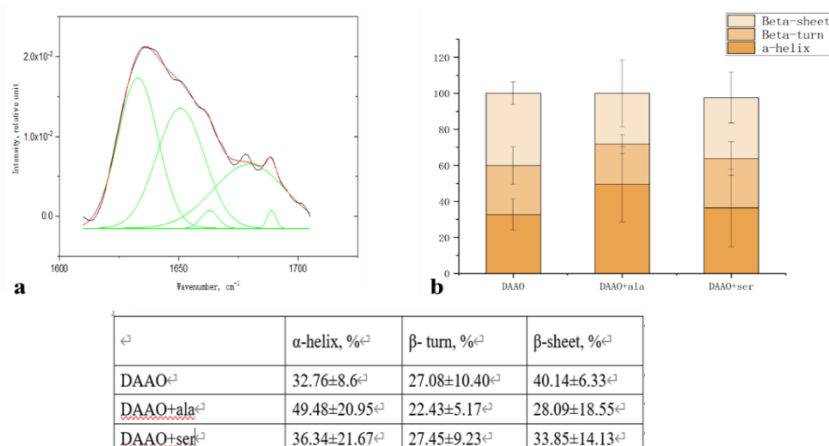


Рис. 11 . **a** - анализ (деконволюция) второй производной полосы амида I HrDAAO (область 1600-1700 cm^{-1}) с помощью программы OriginPro 2022, модуль Peak Analyzer; **b**- Соотношения различных типов вторичных белков до и после взаимодействия HrDAAO с аминокислотами; **с**- Доля вторичной структуры белков после добавления различных типов аминокислот в DAAO.

7. Изменения параметров пикосекундной флуоресценции триптофана белка при активации DAAO.

Для исследования быстрых изменений структуры белка при активации рkDAAO и HrDAAO мы использовали метод регистрации кинетики флуоресценции триптофана. Триптофан в данном случае служил зондом для оценки конформационных изменений белка в области данной аминокислоты. На Рис.12,а представлена кинетика триптофановой флуоресценции рkDAAO при активации DAAO аланином. Установлено, что амплитуда флуоресценции уменьшалась, причем тенденция к снижению квантового выхода до и после добавления D-аланина не изменилась (в отличие от кинетики HrDAAO, Рис. 12, b).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация обоих типов DAAO приводит к снижению амплитуды флуоресценции триптофана, которое, вероятно, обусловлено повышением эффективности миграции энергии от триптофана, возможно, за счет уменьшения расстояния между донором и акцептором, вызванного сжатием молекулы фермента. Важно отметить, что в рkDAAO этот процесс протекает быстрее: после 5 минут инкубации не наблюдается существенных различий по сравнению с Hr.

DAAO. Итак, быстрые изменения конформации белка (до 10нс) в области аминокислотных остатков триптофана при активации фермента аланином и серином различны по времени и аналогичны изменениям конформации флавина.

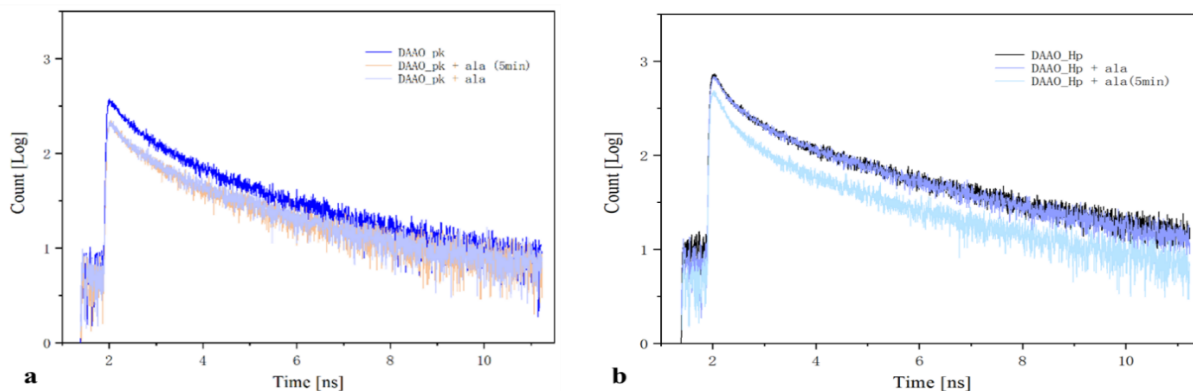


Рис.12. Кинетика триптофановой флуоресценции rKDAAO при активации DAAO аланином (D-AA) по триптофановой пикосекундной флуоресценции. $C_{\text{rKDAAO}}=0.03\text{mg/ml}$, $C_{\text{HpDAAO}}=0.02\text{mg/ml}$; (при возбуждении 262 нм и излучении 340 нм, длительность 120 с). а – кинетика rKDAAO с D-аланином; б - Спектр взаимодействия rKDAAO с D-серином.

Заключение

В ходе проведенного исследования были созданы конструкции для генетического нокаута гена оксидазы D-аминокислот в полиморфных дрожжах *Hansenula polymorpha*, а также коллекция многочисленных нокаутов DAO/DOA. Используя полученные штаммы, мы выявили субстратную специфичность оксидазы *H. Polymorpha* in vitro. Установлено, что сочетание D-аланина с 1% глицерина и 1% метанола является эффективным индуктором активности DAO *H. polymorpha*, напротив, глюкоза и L-аланин ингибируют активность фермента. Доказано, что сочетание D-аланина с 1% глицерина и 1% метанола индуцирует экспрессию генов HP2165 и HP2914. Для исследования физико-химические изменения в структуре белка при активации фермента DAAO, проведено комплексное исследование конформации активного сайта (конформации флавина, SERS) и структуры белка (ИК- и флуоресцентная спектроскопия). Впервые, с помощью наночастиц серебра, были зарегистрированы SERS-спектры и изучены изменения конформации флавина (FAD-кофактора) при активации DAAO. Установлено, что в ходе окислительно-восстановительной реакции формирования комплекса флавина с субстратом происходит изменение конформации флавина: смещение максимума SERS

-спектра 1252 см^{-1} в длинноволновую область, что, вероятно, связано с процессами координации активного центра DAAO по отношению к аминокислоте. При взаимодействии фермента с D-аланином был выявлен максимум при 1612 см^{-1} , вероятно, связанного со структурой, восстановленной молекула флавина. Предположено, что в ходе ферментативной реакции DAAO с аминокислотой происходит ее дегидрогенизация и перенос водорода на флавин N (5). Стабилизация субстрата по отношению к ферменту в этом случае обеспечивается несколькими водородными связями, а после дегидрогенизации - за счет электростатических взаимодействий атомов в молекуле флавина. Вероятно, N (3)-H-группа флавина не участвует непосредственно в процессе ферментативного акта, но стабилизация молекулы кофактора по отношению к лиганду влияет на изменение вклада водородной связи N (3)-H \cdots R в изменение конформации фермент-субстратного комплекса, которое мы наблюдаем при добавлении D-аланина в среду с DAAO. Восстановленный комплекс фермент-аминокислота подвергается повторному окислению, причем во втором случае мы наблюдали исчезновение пика КР-спектра при 1612 см^{-1} , а максимум SERS - спектра в области 1600 см^{-1} вновь смещается в низкочастотную область. Известно, что кинетика реакции между ферментом DAAO человека и D-серинном характеризуется в четыре раза более высоким значением K_M по сравнению с реакцией между DAAO и D-аланином. Кроме того, известно, что активность фермента DAAO, полученного из почек свиньи, более чем в два раза выше по отношению к D-аланину по сравнению с D-серинном. Эти результаты согласуются с нашими данными, свидетельствующими о том, что изменения в спектре FAD-групп DAAO в присутствии D-серина происходят в течение более длительного времени, по сравнению с D- аланина: при активации фермента D-серинном положение пика при 1252 см^{-1} меняется в течение 60 секунд, сопровождаясь появлением нового пика в области 1300 см^{-1} . Отметим, что через 7-10 мин после добавления субстрата изменений в диапазоне $1200\text{-}1355\text{ см}^{-1}$ SERS-спектра флавина DAAO не выявлено. Таким образом, при взаимодействии DAAO с D-аланином сдвиги в SERS-спектрах наблюдались в течение короткого промежутка времени. И наоборот, при добавлении D-серина для получения аналогичных результатов требовались считанные минуты, что подтверждает литературные данные о различной активности фермента DAAO при взаимодействии с этими аминокислотами. С помощью ИК -спектроскопии исследовали изменения структуры белка при активации DAAO: при активации

НpDAAO в присутствии субстрата, аланина вклад как колебаний карбонильной группы C=O, так и деформационных колебаний N-H и валентные колебаний C-N возрастал. Для изучения быстрых (нс) изменений структуры белка мы регистрировали изменением триптофановой флуоресценции белка DAAO. Вероятно, при активации обоих типов DAAO происходит повышение эффективности миграции энергии в белке фермента от этой аминокислоты за счет уменьшения расстояния между донором и акцептором в результате "сжатия" молекулы фермента, но в рkDAAO этот процесс протекает быстрее, чем в НpDAAO.

ВЫВОДЫ

1. Получена коллекция нокаутов генов оксидазы D-аминокислот в полиморфных дрожжах *Hansenula polymorpha*, включающие один одинарный нокаут, три двойные и один тройной нокаут.
2. В системе *in vitro* подтверждена субстратная специфичность оксидаз *H. polymorpha* DL-1 с использованием нокаутных штаммов.
3. Установлено, что D-аланин в сочетании с 1% глицерина и 1% метанола способен индуцировать активность всех трех основных оксидаз D-аминокислот *H. polymorpha*. Напротив, глюкоза, и L-аланин подавляют активность оксидазы.
4. Показано, что D-аланин в сочетании с 1% глицерина и 1% метанола индуцирует экспрессию генов HP2165 и HP2914.
5. Доказано, что использование наноструктурированной подложки из серебра позволяет увеличить чувствительность КР в 10^5 - 10^6 (регистрация сигнала при концентрации белка 10^{-9} моль/л), что использовалось для исследования конформации флавина оксидазы D-аминокислот.
6. Установлено, что в ходе окислительно-восстановительной реакции флавина и субстрата происходит изменение конформации флавина (смещение максимума КР-спектра 1252 см^{-1} в длинноволновую область), что, вероятно, связано с ориентацией молекулы аминокислоты в активном центре оксидазы D-аминокислот.
7. Изменения в активном центре оксидазы D-аминокислот при взаимодействии с D-аланином происходят быстрее, чем при действии D-серина, что, вероятно, является причиной различной субстратной специфичности фермента.
8. С помощью ИК -спектроскопии выявлено изменение вклада полос амида 1 и

амида 2 при активации обоих типов оксидаз D-аминокислот, что свидетельствует о конформационных переходах как во флавине, так и в молекуле белка.

9. Методом однофотонного счета обнаружены изменения амплитуды флуоресценции триптофана при активации оксидазы D-аминокислот, которые протекают быстрее в рkDAAO, чем в HpDAAO и, вероятно, связаны с локальными изменениями конформации молекулы белка.

Основные публикации Лю В. по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2. Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объём публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах)

1. **Liu W.**, Eldarov M.A., Shutova V.V., Maximov G.V. Genetic inactivation of D-amino acid oxidase genes in methylotrophic yeast *Hansenula Polymorpha* // Herald of the Bauman Moscow State Technical University, Series Natural Sciences. — 2021. — Vol. 99, No. 6. — P. 110–120. DOI: 10.18698/1812-3368-2021-6-110-120 (**SJR 0.258, 0.732/ 0.345 п.л.**)
2. **Liu W.**, Shutova V.V., Maksimov G.V., Hao J., He Y. Use of nanostructured silver substrates (coatings) to study the content and conformation of β -carotene // Herald of the Bauman Moscow State Technical University, Series Natural Sciences. – 2022. – Vol. 101, No. 2. – P. 112-124. DOI: <https://doi.org/10.18698/1812-3368-2022-2-112-124> (**SJR 0.258, 0.879/ 0.163 п.л.**)
3. Bochkova J.V., **Liu W.**, Brazhe N.A., Zhgun A.A., Maksimov G.V. A Raman Spectroscopic Study of the Conformation of Flavin Adenine Dinucleotide, a CoEnzyme of D-Amino Acid Oxidase // Biophysics. – 2023. – Vol. 68. – P. 719-724. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006350923050068> (**SJR 0.251, 0.769/ 0.321 п.л.**)
4. Parshina E.Yu, **Liu W.**, Yusipovich A.I., Gvozdev D.A., He Y., Pirutin S.K., Klimanova E.A., Maksimov E.G., Maksimov G.V. Spectral and conformational characteristics of phycocyanin associated with changes of medium pH // Photosynthesis Research. – 2024. – Vol. 161, No. 1-2. – P. 93-103. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11120-023-01068-0> (**SJR 0.856, 0.563 / 0.247 п.л.**)