

МОСКОВСКИЙ ОРДЕНА ЛЕНИНА, ОРДЕНА ТРУДОВОГО
КРАСНОГО ЗНАМЕНИ И ОРДЕНА ОКТЯБРЬСКОЙ РЕВОЛЮЦИИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

ГОЛУБЕВ

Игорь Владимирович

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
ИССЛЕДОВАНИЯ ДРОЖЖЕВОЙ
ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ МЕТОДОМ
РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА**

03.01.04 – биохимия

03.01.06 – биотехнология

(в том числе бионанотехнологии)

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук,
профессор В.И. Тишков

Москва – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
I. ВВЕДЕНИЕ.....	6
II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	9
2.1. Оксидаза D-аминокислот.....	9
2.1.1. История открытия, локализация и физиологическая роль	9
2.1.2. Первичная структура DAAO из различных источников.....	12
2.1.3. Трехмерная структура и механизм действия DAAO	18
2.2. Основные свойства DAAO из различных источников	26
2.2.1. Каталитические свойства	27
2.2.2. Температурная стабильность	30
2.2.3. Механизм термоинактивации	31
2.3. Применение DAAO в биотехнологии.....	35
2.3.1. Аналитическая биотехнология	35
2.3.2. Тонкий органический синтез	38
2.3.3. Терапия различных заболеваний	42
2.3.4. Трансгенные растения	45
2.4. Белковая инженерия DAAO	47
2.4.1. Белковая инженерия DAAO из <i>Sus crofa</i> (pKDAAO).....	48
2.4.2. Белковая инженерия DAAO из <i>Homo sapiens</i> (hDAAO)	51
2.4.3. Белковая инженерия DAAO из дрожжей <i>Rhodotorula gracilis</i> (RgDAAO)	51
2.4.4. Белковая инженерия DAAO из дрожжей <i>Trigonopsis variabilis</i> (TvDAAO).....	55
III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	74
3.1. Материалы.....	74
3.2. Методы исследования	75

3.2.1. Рациональный белковый дизайн	75
3.2.2. Направленный мутагенез гена <i>tvdaao</i>	75
3.2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	77
3.2.4. Выделение ДНК из агарозного геля.....	77
3.2.5. Рестрикция ДНК.....	78
3.2.6. Лигирование фрагментов ДНК.....	78
3.2.7. Трансформация клеток <i>E.coli</i>	78
3.2.8. Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>E.coli</i>	79
3.2.9. Секвенирование ДНК	80
3.2.10. Экспрессия TvDAAO в клетках <i>E.coli</i>	80
3.2.11. Выделение и очистка TvDAAO	81
3.2.12. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях	82
3.2.13. Определение концентрации фермента.....	83
3.2.14. Определение активности TvDAAO	83
3.2.15. Определение каталитических параметров TvDAAO.....	84
3.2.16. Изучение температурной стабильности TvDAAO	84
3.2.17. Математический аппарат теории диссоциативной термоинактивации.....	85
IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	86
4.1. Роль остатка Met104 в каталитических свойствах и стабильности TvDAAO.....	86
4.1.1. Анализ трехмерной структуры TvDAAO и компьютерное моделирование.....	86
4.1.2. Получение мутантных TvDAAO с заменами в 104 положении	92
4.1.3. Каталитические свойства мутантных TvDAAO с заменами в 104 положении.....	96
4.1.4. Температурная стабильность мутантных TvDAAO с заменами в 104 положении.....	106
4.1.5. Влияние замен Met104Glu и Met104Lys на свойства TvDAAO	120

4.1.6. Удаление соединительной петли с 99 по 110 остаток в структуре TvDAAO	128
4.2. Изучение взаимодействия между остатками в 54, 104 и 258 положениях ...	137
4.2.1. Компьютерное моделирование замен в 54, 104 и 258 положениях	138
4.2.2. Получение мутантных TvDAAO с двойными заменами в 54/104 и 104/258 положениях.....	140
4.2.3. Каталитические свойства мутантных TvDAAO с двойными заменами	144
4.2.4. Температурная стабильность мутантных TvDAAO с двойными заменами	153
4.3. Оптимизация структуры FAD-связывающего домена TvDAAO	166
4.3.1. Анализ структуры FAD-связывающего домена TvDAAO. Компьютерное моделирование.	167
4.3.2. Получение мутантных TvDAAO с заменами в 9, 12, 32 и 33 положениях.....	176
4.3.3. Температурная стабильность мутантных TvDAAO с заменами в кофермент-связывающем домене.....	183
4.3.4. Изучение влияния замены E32R/F33D на связывание FAD	190
4.3.5. Каталитические свойства мутантных TvDAAO с заменами в кофермент-связывающем домене.....	193
4.4. Объединение точечных аминокислотных замен для получения TvDAAO с улучшенными свойствами	201
4.4.1. Выбор точечных аминокислотных замен для объединения	202
4.4.2. Получение мутантных TvDAAO с многоточечными заменами.....	206
4.4.3. Каталитические свойства многоточечных мутантных TvDAAO.....	210
4.4.4. Температурная стабильность многоточечных мутантных TvDAAO	215
V. ВЫВОДЫ	230
VI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	232

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

FAD	- флавинадениндинуклеотид
DAAO	- оксидаза D-аминокислот
wt-TvDAAO	- дикий тип оксидазы D-аминокислот из дрожжей <i>Trigonopsis variabilis</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>
NMDA	- N-метил-D-аспартат
ИПТГ	- изопропил- β -D-тиогалактопиранозид
АБТС	- 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат)
БСА	- бычий сывороточный альбумин
КФБ	- калий-фосфатный буфер
СРС	- цефаллоспорин C
7-АЦК	- 7-аминоцефалоспоровая кислота
КА-7-АЦК	- α -кетoadипил-7-аминоцефалоспоровая кислота
ГЛ-7-АЦК	- глутарил-7-аминоцефалоспоровая кислота
PDB	- база данных белковых структур (Protein Data Bank)

I. ВВЕДЕНИЕ

Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) относится к классу FAD-содержащих оксидоредуктаз и катализирует окислительное дезаминирование D-аминокислот в соответствующие α -кетокислоты. Этот фермент выполняет важные функции в живых организмах и находит все более широкое практическое применение в биотехнологии. В настоящее время выделяются два основных направления по исследованию DAAO. Первое направление заключается в изучении физиологической роли DAAO в организме человека (hDAAO) и поиске новых ингибиторов этого фермента, которые могут применяться в качестве лекарственных препаратов в терапии целого ряда нейродегенеративных заболеваний. Например, только за последние 3 года в базе данных трехмерных белковых структур (PDB) было депонировано 9 новых структур hDAAO в комплексе с различными ингибиторами, а эксперименты по белковой инженерии не проводятся в настоящее время для этого фермента. С другой стороны, уже более 20 лет назад DAAO стала привлекать внимание исследователей с практической точки зрения для использования в аналитической биотехнологии при создании биосенсоров, систем диагностики и мониторинга ряда психосоматических (шизофрении, болезней Альцгеймера, Паркинсона и др.) и онкологических заболеваний, для применения в процессах органического синтеза неприродных L-аминокислот, α -кетокислот и 7-аминоцефалоспоровой кислоты (7-АЦК). Биокаталитический процесс получения 7-АЦК на данный момент является самым крупнотоннажным и наиболее важным процессом с использованием DAAO, поскольку данное соединение используется в качестве исходного субстрата при производстве полусинтетических цефалоспоринов различных поколений. Стоит отметить, что в настоящее время цефалоспорины являются крайне востребованными препаратами и по мировому объему продаж занимают первое место на рынке антибиотиков (около 10 млрд. долл. в год, 25% от рынка). Среди всех известных оксидаз D-аминокислот наиболее широкое применение на практике нашли два дрожжевых фермента – из дрожжей *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO) и *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO). Второй фермент является более перспективным,

поскольку среди изученных DAAO он изначально обладает наилучшей температурной стабильностью и наиболее высокой активностью с рядом гидрофобных D-аминокислот и цефалоспорином C. В настоящее время, вторым обширным направлением исследования DAAO является оптимизация свойств природных DAAO и получение ферментов с заданными свойствами для целей биотехнологии (повышенной каталитической активностью, увеличенной температурной и операционной стабильностью, и т.д.). Для решения подобных задач применяют различные методы белковой инженерии. Однако, как показывает опыт, наиболее мощным подходом является метод рационального белкового дизайна, который включает в себя анализ трехмерной структуры интересующего фермента, сравнение аминокислотных последовательностей ферментов из различных источников, выбор потенциальных положений для введения аминокислотных замен, компьютерное моделирование, докинг субстратов в активный центр фермента и т.д. Выбранные замены вводятся в ген фермента с помощью направленного мутагенеза. Данный подход позволяет осмысленно и комплексно подходить к решению конкретной биотехнологической задачи. Однако основным требованием является наличие экспериментальной или модельной трехмерной структуры, а также наличие широких знаний о взаимосвязи структуры и функции интересующего фермента. Если в случае RgDAAO трехмерная структура была решена еще в 2000 году и с тех пор был накоплен большой экспериментальный материал по белковой инженерии этого фермента, то для TvDAAO различным группам исследователей долгое время не удавалось получить кристаллы этого фермента и установить его трехмерную структуру. Тем не менее, за прошедшие 10 лет различие в свойствах RgDAAO и TvDAAO так и не было преодолено (в первую очередь в случае температурной стабильности). Таким образом, в настоящее время TvDAAO остается отличной основой для экспериментов по белковой инженерии и направленному изменению свойств природного фермента. Стоит отметить, что за это время различными группами исследователей также проводились эксперименты по компьютерному моделированию структуры TvDAAO, однако полученные модели различались

между собой и не были достаточно точными, что, в первую очередь, связано с низким уровнем гомологии между последовательностями TvDAAO и другими DAAO с известными структурами, которые были взяты за основу при моделировании. Этим объясняется весьма ограниченное количество работ по белковой инженерии TvDAAO по сравнению с RgDAAO. Однако ситуация поменялась в 2008 году, когда в нашей лаборатории впервые в мире удалось получить два кристалла одной из мутантных форм TvDAAO. В результате была определена трехмерная структура этого фермента с разрешением 2,8 и 1,8Å, которая до настоящего времени остается единственной доступной структурой TvDAAO. В ходе экспериментов по белковой инженерии, которые начались в нашей лаборатории с 2008 года, было проведено исследование ряда аминокислотных остатков в структуре TvDAAO, а также получены несколько мутантов с повышенной каталитической активностью и более узким спектром субстратной специфичности. В ходе работ по повышению температурной и операционной стабильности TvDAAO значительных результатов достичь не удалось. Структурно-функциональные исследования, которые были проведены ранее другими исследователями, на данный момент не имеют большого практического значения и не представляют теоретического интереса, поскольку выбор аминокислотных остатков для мутагенеза в большинстве случаев не имел под собой хорошей теоретической базы.

Таким образом, целью данной работы является проведение систематических исследований, направленных на фундаментальное изучение взаимосвязи структуры и функции в оксидазе D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* и получение мутантных форм фермента с улучшенными свойствами с помощью рационального белкового дизайна.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Оксидаза D-аминокислот

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3, DAAO) является FAD-зависимой оксидоредуктазой, которая катализирует стереоспецифичное окислительное дезаминирование D-аминокислот с образованием соответствующих иминокислот, которые затем неферментативно гидролизуются до α -кетокислот и иона аммония (рис. 2.1). Вторым субстратом является кислород, который в процессе реакции превращается в пероксид водорода [1–4].

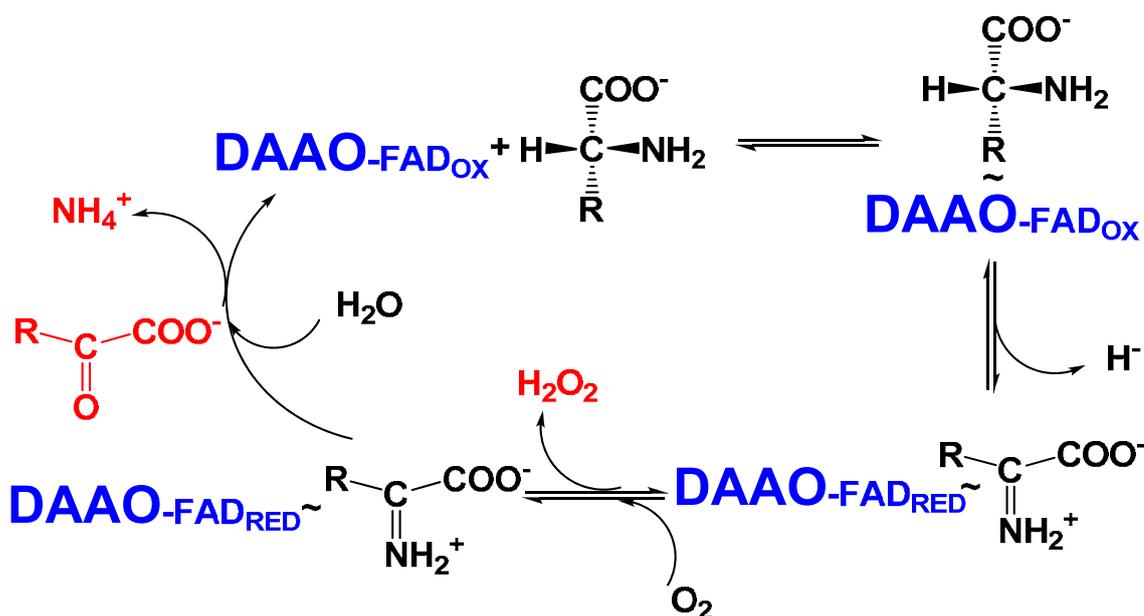


Рис. 2.1. Схема реакции, катализируемой оксидазой D-аминокислот.

2.1.1. История открытия, локализация и физиологическая роль

Оксидаза D-аминокислот впервые была открыта Хансом Адольфом Кребсом в 1935 году во время проведения экспериментов по окислению L- и D-изомеров аминокислот с помощью гомогенатов печени и почек свиньи [5]. Начиная с того времени DAAO являлась объектом большого числа исследований и стала модельным ферментом для целого класса FAD-содержащих белков [6]. Все биохимические свойства DAAO были детально изучены и описаны в период с 1950 по 1990 год на примере фермента из почек свиньи (pkDAAO), который долгое время представлял собой практически единственную доступную DAAO в высокоочищенной форме и в количестве достаточном для анализа [7]. С конца 1980 стали доступны ферменты из дрожжей *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO) [8] и

Trigonopsis variabilis (TvDAAO) [9]. Несмотря на то, что DAAO из почек человека (hDAAO) была клонирована еще в 1988 году [10], данный фермент был получен в высокоочищенной гомогенной форме и подробно изучен сравнительно недавно [11]. В целом за последние 70 лет присутствию DAAO было зафиксировано в большом количестве живых организмов – в моллюсках, рыбах, рептилиях, амфибиях, насекомых, птицах, различных тканях млекопитающих (мозг, легкие, почки), а также в разнообразных микроорганизмах, таких как водоросли *Chlorella vulgaris*, микроскопические грибы, дрожжи и бактерии. У эукариотических организмов, например, у дрожжей, DAAO локализована в пероксисомах, где с помощью каталаз утилизируется цитотоксическая перекись водорода, образующаяся в результате катализируемой DAAO реакции. Стоит отметить, что в зависимости от организма, DAAO выполняет совершенно различные функции [4,7]. Например, основной функцией фермента в микроорганизмах является вовлечение экзогенных D-аминокислот в клеточный метаболизм, которые в результате выступают источниками азота, углерода и энергии, а также защита от токсического действия ароматических D-аминокислот. У беспозвоночных DAAO выполняет в основном детоксификационную роль, у насекомых участвует в синтезе глазного пигмента, в организме светляков также принимает участие в метаболизме D-люцеферина, у рыб участвует в утилизации D-аминокислот в кишечнике и их метаболизме в гепатопанкреасе и почках, у амфибий DAAO является ферментом окислительного стресса и способствует регрессии хвоста головастика во время метаморфоза, у птиц DAAO ускоряет всасывание D-метионина и некоторых других D-аминокислот в кишечнике. Недавно появилось сообщение, что у плоских червей *Dugesia ryukyensis* фермент контролирует развитие яичников и половое созревание [12]. У млекопитающих DAAO была обнаружена в различных органах, где она поддерживает определенный уровень D-аминокислот, которые участвуют в регуляции процессов старения, нервной деятельности, кровяного давления, секреции гормонов и т.д. [4,7,13]. Также DAAO может участвовать в формировании болевого сигнала при онкологических заболеваниях [14]. В настоящее время наибольшее внимание

ученых привлекает физиологическая роль DAAO в организме человека, где она локализована в различных органах и тканях. Этот фермент широко распространен в различных областях мозга и играет исключительно важную роль в поддержании уровня D-аминокислот. Какие-либо отклонения в функции hDAAO, как правило, приводят к серьезным патологиям в работе центральной нервной системы, однако подобные взаимосвязи до сих пор остаются до конца неисследованными [15]. Еще в начале 2000-х было установлено, что гены DAAO и pLG72 (белок, который предположительно активирует DAAO) имеют связь с возникновением шизофрении [16]. Повышение экспрессии гена G72 приводит к росту активности hDAAO в мозге человека, что вызывает снижение уровня D-Ser, который в виде свободной аминокислоты или нейроактивного пептида с высоким сродством может взаимодействовать с глицин-связывающим сайтом NMDA-рецепторов [17]. Это приводит к снижению функциональной активности NMDA-рецепторов, что является одной из причин возникновения шизофрении [18]. С другой стороны, увеличение концентрации синаптического D-Ser может приводить к развитию бокового амиотрофического склероза [19]. Кроме того, недавно было показано, что DAAO может влиять на систему синтеза дофамина, что может являться второй причиной возникновения шизофрении у людей [20]. Стоит отметить, что NMDA-рецепторы играют важную роль в регуляции таких процессов как обучаемость и память [7], а также связаны с развитием эпилепсии [21] и ишемической болезни [22]. Также было показано, что hDAAO участвует в регуляции уровня D-аланина. Например, при болезни Альцгеймера наблюдается повышение общего уровня D-аминокислот в спинномозговой жидкости и увеличение концентрации D-аланина в сером веществе головного мозга более чем в два раза [23]. DAAO также способствует регуляции гормонов, в первую очередь, одним из важнейших регуляторов гормональной секреции является D-Asp [24]. Авторами работы [25] было показано, что в организме различных животных, включая человека, в дополнение к обычной DAAO, присутствует другой схожий по своему каталитическому действию фермент – D-аспартатоксидаза (DASPO). Это связано с тем, что DAAO из млекопитающих с D-Asp практически не активны (для

hDAAO значение k_{cat}/K_M^{D-Asp} 0,003 с⁻¹ММ⁻¹ [26]), в то время как скорость превращения L-аспартата в его D-изомер является одной из самых высоких среди природных L-аминокислот.

Стоит отметить, что в последнее время, подавляющее число статей по исследованию DAAO посвящено изучению физиологической роли hDAAO в организме человека и поиску новых ингибиторов этого фермента, которые могут быть перспективны в лечении, описанных выше, нейродегенеративных заболеваний

2.1.2. Первичная структура DAAO из различных источников

За последние 20 лет наблюдается постепенный рост числа проаннотированных аминокислотных последовательностей DAAO, что главным образом связано с изучением физиологической роли фермента в различных организмах, а также с поисками новых перспективных DAAO для целей биотехнологии. Однако свойства природных ферментов могут быть изменены и оптимизированы с помощью метода рационального дизайна. Данный метод основан анализе как четвертичных, так и первичных белковых структур, что позволяет выявлять структурные отличия и выбирать перспективные аминокислотные замены для придания природному ферменту нужных свойств.

Tva -----MAKIVVIGAGVAGLTTAL----QLLRKG--HEVTIVSEFTPGDLS-IGYTSPWAGANWLT--FYD----GGKLADYDAVSYP 69
Anig -----MANNRIVMLGAGVSLTTAY----LLSQDAS-NSITVLAKHMPGDYD-IEYTSPWAGANYLP--VGKA----GSDHERWERNTWP 73
Asfl -----MSTNNIVILGAGVSLTTAY----LLSKDAS-NSITVLAKHMPGDYD-IEYASPWAGANYLP--VGKA----SSSHGKWERNTWP 73
Cpo -----MASNKIVIIIGGVIILTTAY----LLSKDKS-NVITVAAKHMPGDYD-VEYCSPWAGANFLP--VGAP----GSAHAKWEANTWP 73
Aor -----MEQKNVVVIGAGVAGLTTAL----LLSRLPR-YKVVVAAKHMPGDYD-IEYASPWAGANYMP--MSTR----GTKAADWDKDTWA 73
Ncr -----MSTIVVVVAGVSLTCAL----QLAKQGG-NTITVVAKHMPGDYD-PEYTSPFAGANVLP--MAP-----EYNRWKDEETWP 68
Vpo -----MSKVVVIGGGVSLTTALTLV-NKF-KNEINELTVVSSEFPDGYHAHDYTSWAGANWAS--FAKGN--EPEQIKRDSLTYK 76
Kla -----MAKVVVVAGISGLSVAHSL-ELYGRDKIEELVLIARDIPGTFSTYDYTSWAGANWDS--FAAPD---DHAQIKRDTVTYE 77
Spo -----MTKENKPRDIVIVGAGVILTTAW----ILSDLGLAPRIKVIKAYTPEDRS-VEYTSWAGANFCS--ISAT---DDNALRWKITYH 78
Rto -----MHSQKRVVVIGSGVILSSAL----ILARKGYSVHILARDLPEDEVSSQTFASPWAGANWTP--FMTLTD--GPRQAKWEESTFK 76
Mbo -----MAIGEQQVIVIGAGVSLTSAI----CLAEAG--WPVRVWAAALPQOTT----SAVAGAVWGP--RPKE---PVAKVRGWIEQSLH 71
Maf -----MAIGEQQVIVIGAGVSLTSAI----CLAEAG--WPVRVWAAALPQOTT----SAVAGAVWGP--RPKE---PVAKVRGWIEQSLH 71
Mca -----MAIGEQQVIVIGAGVSLTSAI----CLAEAG--WPVRVWAAALPQOTT----SAVAGAVWGP--RPKE---PVAKVRGWIEQSLH 71
Mtu -----MAIGEQQVIVIGAGVSLTSAI----CLAEAG--WPVRVWAAALPQOTT----SAVAGAVWGP--RPKE---PVAKVRGWIEQSLH 71
Ser -----MLVIGAGVQELTSGI----VLAERG--VPVIRIRTAERPRDPT--SAVAGAMWGP--AMLR---PADRVLRVWTRSYA 64
Msp -----MAARPDVVVIGAGVSLSTGI----RLVESG--ARVLVVRTAAPPHTT----SALAGAMVGP--NLSP---PGDPQRAWTDETLR 70
Scs -----METELDDERDGEVVVIGGGVILTTAV----VLAERG--RRVRLVTRPAERTT--SVVAGGLWWP--YRIE---PVALAQAWALRSLD 76
Ssca -----MTHESNSREIVVIGGGVILTTAV----VLAERG--RRVRLVTRPAERTT--SVVAGGLWWP--YRIE---PVALAQAWALRSLD 72
Sgr -----MTVMAEIVVIGGGVILTTAV----TLAERG--LRVVRVSRDPAGATT--SAVAGALWWP--YRIE---PAERVGDWALATLA 70
Rxy -----MCGMRGRVVARAVVIGGGVAGLSAAI----ALRERG--FGVRVVAAREPPERTT----SAVAAAVWYP--YRAY---PEERVLSWGARTFE 75
Mau -----MGVMTKADVIVVIGGGVIMTTAL----TLQRRG--AHVTVLTAHPDADTV----STVAAAVWYP--SHTA---EDPRVLRWARDTHA 72
Ota MRARSTSRPRAPRRFRGRDLGRNHRWARATRASARPHGVIGAGVGLHICAL----ALIESGKFSSRVVAEKTNEGTT--SAVAAAFWYP--FLTKT--SPEEMDRWAIESLR 108
Sce -----MSTLRRGVLER-----AIVASSRGAQGGQITVVGAGVILTTAV----VLQRDG--HRVQVIAAAREGERTT----SAVAAALWHP--FLAN---PPERVNAWSSRSLD 89
Tpa -----MSD----VTVVGAGVILSCAV----RLLEAG--HTVRVYGRDLAPDLT----SAVAAAVWEP--YLVE---PRDRVAGWSAAALA 67
Nsp -----MTDR---VIVVAGVILTCAV----RLQAG--HRVDVVARDLPLETT----SAVAGAFWYP--YRAL---PQDRVAAWSATSYA 68
Apo -----MPTAPLRITVIGSGVILSAAH----ELAAAG--HQVTVAYDQELAEV--SSVAAAIWFP--YHSE---NSPADKLLADSLA 71
Amed -----MRVTVAGIVGLSSAY----RLAERG--HDVTVVAAREPAST--SAVAGGVVYP--PGRG---SDEIRIVRTAASLA 66
Cfa -----MRVVVIGAGVILSTALCIHERYQSVLPSLDVRYADRFTPLTT----TDVAAGLQQA--YLSDP--SNPQEA--HWNQQTDF 73
Amel -----MRVVVIGAGVILSTALCIHERYHPVLPALDVRVYADRFTPFTI----SDVAAGLSQA--YLSDP--SNPEEV--HWNQQTDF 73
Eca -----MRVVVIGAGVILSTALCIHDYQPVLSLDVRYADRFTPLTN----TDVAAGLWQP--YLSNP--SNPQEA--HWNQQTDF 73
Hsa -----MRVVVIGAGVILSTALCIHERYHSLQPLDKVYADRFTPLTT----TDVAAGLWQP--YLSNP--SNPQEA--HWNQQTDF 73
Bta -----MRVVVIGAGVILSTALCIHERYRSLKSLDMVYADRFTPLTT----TDVAAGLWQP--YLSEP--SNPQEA--HWNQQTDF 73
Ssc_pig -----MRVVVIGAGVILSTALCIHERYHSLQPLDKVYADRFTPFTT----TDVAAGLWQP--YTSEP--SNPQEA--HWNQQTDF 73
Mmu -----MRVAVIGAGVILSTALCIHERYHPTQP-LHMKIYADRFTPFTT----SDVAAGLWQP--YLSDP--SNPQEA--EWSQQTDF 72
Rno -----MRVAVIGAGVILSTALCIHERYHPAQ-LHMKIYADRFTPFTT----SDVAAGLWQP--YLSDP--SNPQEA--EWNQQTDF 72
Mdo -----MDLAVHRSRRMIKGSSTMNVAVIGAGVILSTALCLHEHYHHTLRPLSKVYADRFTPLTT----SDGAAGFWQP--YLSE---DPQER--AWNQKTFD 88
Gga -----MRIAVIGAGVILSTALCIHDRFHALVPQLQLEVYADRFTPHTT----SDGAAGLWQP--YLSDH--GNLQET--LWNKETFE 73
Mga -----MRIAVIGAGVILSTALCIHDRFHALVPQLQLEVYADRFTPHTT----SDGAAGLWQP--YLSDH--GNLQET--LWNKETFE 73
Tgu -----MRVAIIGAGVGLSSALCIHQFHSLEPSLELVYADHFTPHTT----SDGAAGLWQP--YLSDH--GNLQET--LWKKETFD 73
Dre -----MKVCIIGAGVILSTAQSIYQHFHSRVSPLTIEVYADIFTPLTT----SDGAAGLWQP--LYDK--GNVKET--QWNKDTFN 73
Xla -----MHITVVAGVILSTALCIHENYHRIVRPLKIEIYADKFSPLTT----SDGAAGLWQP--YLYDN--GNTQET--KWNKETFD 73
Bfl -----MMKVVVIGGGVILSSALCVKERCQ---RADVTVVAAREFPNTT----GDGAAGLWQP--QLWN--VTQQL--KWLQWTFD 69
Nve -----MAPRVAVVGGVIGATSALEILQSNPS---VRLTVIADTFSPENTT----SDGAAGLLMP--FAVGE--TDPGLVRRWFKETMR 72
Nvi -----MRIAVVAGVILTTAVAMKEAFP---SAELTVFSEAFSPETT----GDGSAGLWTP--YIAN--TDEQKILRWSQATHK 70
Aga -----MKQIVVIGAGVSLSVAVQLAEHYN---VANVTLISENVSPNTT----GDGSAGLWGP--YYCGN--TPDHKIVKWSSEHT 72
Tca -----MLSVAVIGAGVILPTALAIQEELGP---KAEVIFFTDKLSPHTT----GDVSAGLWSP--YLLQN--TPVQQLTKWSKATQD 72
Cel -----MPKIAVIGAGINCIASALAIQERLP---NCEVTIIAEKFSPTNT----SDVAAGLIEP--FLCDD--D--VDRIINWTSATIS 70
Isc -----MVLRVVGGGIIILTTALKVLETID---NVNVTIIAEHFTPHTT----GDVAGGFEP--YLMEG--TDEKLRHSIKKCN 72
Sma -----MKVGIIGSGIILSTAL---AIQENYPNLELIQADKKDVMVT----SYGAAGIFRDPKLLPRSNDDDSFIHWCHLGHE 73
Sst -----MTSKVVVIGAGVILTTAL---QLKRANPDYSISIVAHHLPGDL-IEYTSPFAGANWHS--FASKN---DRELQELDKPGYW 74
Ctr -----MTS--VVVIGAGVILTTAL---ELKRWNPDLDITIAAHHWPGDIH-PSYTSFYAGANWQS--FASPE---DKELQELDKPGYK 73
Dha -----MRPKIVVIGAGVSLTTAL---ELKKSSEYDVTVVAQHLPGDYD-VNYVSPYAGANWYS--FATPE---DKVLQAFDKPSYR 74

Tva ILRELARSSPEAGIRLIN---QRSHVLKRDLP-KLEGAMSA-ICQRNPWFKNVTDSFEIIEDRSRIVHD-----DVAYLVEFASVCIHTGVYLNWLMSSQCLSLGA---TVVKR-RVNHK 175
Anig ALRELTKNHPEAGIHFQE---TIVYNRTKDQGSATGEWFSE-LVQKDPWYMEVVPDFQDIP--ADQLAP-----GIDNASKFTSVCINTAVYLPWLVGQCRKNGV---VFKRAVLKHAVD 179
Asfl ALKEITEKYPEAGIHFQD---AIVYNRTKDQGSATGDWFSE-LVQKEPWyKDVVDFRNF--DNELAP-----GIDNASKFTSVCINTAIYLPWLVGQCRKNGV---VFKRAVVKHVD 179
Cpo VFDLARNHPEAGIHFQD---SI IYNRLKSDASDTAVWFKE-LINPNPWYKDVVDFRPIP--KEKLPH-----GFDNGSVCFTSVCINAPVYLAWLVSQCRKNGV---VFKRAVFKHIVD 179
Aor ALEDLARNHPDAGIHFQE---CEIHSRSKDVGTAKWFG-LLSPSPWFKDVVDFRCTLP---KSRHGP-----GFDVSVTFTSVCINTAVYLPWLVGQCLKNGV---VFKRAVFKHILD 179
Ncr ELKRLAETCEAGIHFQK---AVLYRRAQDEAAGFAGPLSDGLFVRNPWYKDLVDPDYVLP--ASEVPE-----GMSASSFTSVCINTAIYLPWLVGQCRARGV---VFKRAVLKHSID 175
Vpo KFMELADTEPSSGIKFP---LKYFIRKNDMIPWYIEG-----KFVRDIEYLSDDDELITRNLNP-----EYIGIQTFTVTPPIIYNNYLI GLLKSGV---I IKRIPRINDIE 175
Kla WFTELARSKPETGVKEYT---LKLVTRK-ETIPWFVRD-----NFVRDLKQMSSEELKYRNLDP-----QDYHGFEFTFTVTPSTYKFWMVNEIKKMG---KLRQLAKIDAIE 175
Spo RFAYLAKTRPEAGIRFAD---LRELWEYEPKHKIRS-----WNTYVRDFKVIP--EKDLPG-----ECIYGHKATFLINAPHYLNMYKLLIEAGV---EFEKKELSHIKE 173
Rto KWVELVPTGHAMWLKGR---RFAQNEGDGLL-----HWYKDI TPNYRPLP--SSECPP-----G-AIGVTYDTLSVHAPKYCYLARELQKLG---TFERRTVTSLAQ 167
Mbo VFRDLAKDPA-TGVRMT---PALSVGDR IETG-----AMPPGLELIPDVRPADP--ADVPG-----GFRAGFHATLPMIDMPQYLDCLTQRLAATGC---E IETRPLRSLAE 164
Maf VFRDLAKDPA-TGVRMT---PALSVGDR IETG-----AMPPGLELIPDVRPADP--ADVPG-----GFRAGFHATLPMIDMPQYLDCLTQRLAATGC---E IETRPLRSLAE 164
Mca VFRDLAKDPA-TGVRMT---PALSVGDR IETG-----AMPPGLELIPDVRPADP--ADVPG-----GFRAGFHATLPMIDMPQYLDCLTQRLAATGC---E IETRPLRSLAE 164
Mtu VFRDLAKDPA-TGVRMT---PALSVGDR IETG-----AMPPGLELIPDVRPADP--ADVPG-----GFRAGFHATLPMIDMPQYLDCLTQRLAATGC---E IETRPLRSLAE 164
Ser EFTALCRDSA-SGVHLA---PGR-MAARFDLGD-----VVPPEAHLDDLKRCCTP--DELPE-----GFVSGYHATVPLIDMPKYLDHLVDRFRAAG---ELVSPVPTLGE 157
Ssp VLG---AEPL-PGVAWR---DGT-LAARPEGA-----TPPFADQTPGFRSLGD--DERPA-----GFGTAFVTRPLVDMPVYLA YLLERFRDAG---EVRVAPVASLDE 158
SCO VYEELAARPGQTVRML---EGVLGETGLDEV-----GAWAALPGLRAASA--AEYAG-----TGLWARLPLIDMSTARLPLWRERLLAAG---EVRVAPVASLDE 166
Ssca VYEELAARSDETGV RMV---EGVHGTRLDGL-----GAWAS-RVAGLRAATA--GEYPG-----VGLWARLPLVDMPVHLRWRERFVAAG---VVESRTVTDLAA 161
Sgr VYEELSGAPRETGVRRV---AGLHGGERLAAL-----GAWSA---GLR--DA--VEVP-----EGLRVTLP LLDMPVHLAWLERRLAAG---AVERRAVTGFAE 153
Rxy VFRGLAADPR-TGVRLG---EGVELLR SAPG-----EPWWREAVSGFRRCR--EELPP-----GCRGGYRFVAPVAEMPAYLAYLLDRLRGAG---TLELRVSSLEE 167
Mau ELRRQAADGVPGVIDRP---TRMWRHR YAGP-----PWWADACGDLT-AEP--AEP-----YTALLRFTAPSVEMTPYLAWLQRLEAGG---RIVGRALSTLAE 161
Ota WYEEVERDREAKTQSSGVEIRRFK FYLREQE-----KPAAAAALMHHRLEVG--EYDES-----RYAGGFEDTAPVAAMSTFLPWLLERCERAGV---QFDWRKISSVE 206
Sce ELTRIANEHPEAG-----VDLLTAREADDT-----RLPWWAPSVPDLALEPG--PHPLG-----APYSLRFTAPRIEPSLHLPWLEAQLDCPVR---AEHVRSLAEVEG 179
Tpa EFTSLAERG-ADGVVMT---SGTEIFRQPVGE-----PWW--VAVPEVHRV--AEP RP-----GYAEGWSFVAPVIEMPIYLPWLAGRVCELGG---TVEQRTVTS LDD 156
Nsp VFDALADTDPESGVRMV---AGTEVFM APEPD-----PWWG---AAVPLTRT--RDVPP---GWVDGWTF TTPVVDTG VYLAWLAGRVEQLGG---TITRLNLSALPS 158
Apo RFEQLARPEAGETGIDLR---RGLNVDHLPGAD-----PSWTRIVAGTEEASP--ADLDP---GAHAGVWATVPIITMSTYLGWLRGRVEELGA---DFAKGTVTDLAQ 162
Amed VFRGQDAPG---VRFR---RGRVLLPAGTPD-----PQWLP--AVEAAVRD--GD-----RVEFTTAVVDTPVYLEWLRERVAGLGV---RVEYRTLALSS 145
Cfa YLLSHIHSFNAAAMGLALI-SGYNLFHETIP-----DPSWKDAVLGFRRLTRRELDMPF-----NYSYGWFNTSLIVEGRRYLEWLT KRLTERGV---KFFQKVESFEE 169
Amel YLLSHIHSFNAAAMGLALI-SGYNLFREAVP-----DPSWKDITVLGFRKLTPRELDMPF-----DYSYGWFNTSLIVEGRRYLPWLT KRLTERGV---KFFQKVESFEE 169
Eca YLLSHLHSFNAAAMGLALI-SGYNLFHEAVP-----DPSWKDAVLGFRKLTPRELDMPF-----DYSYGWFNTSLILEGKRYLQWLT ERLTERGV---KFIHRKVESLEE 169
Hsa YLLSHVHSFNAAENLGLFLI-SGYNLFHEAIP-----DPSWKDITVLGFRKLTPRELDMPF-----DYGYGWFNTSLILEGKNYLQWLT ERLTERGV---KFFQKVESFEE 169
Bta YLLSLIGSFNAAAMGLAPV-SGYNLFREAVP-----DPYWKDITVLGFRKLTPRELDMPF-----DYSYGWFNTSLILEGKRYLQWLT ERLTERGV---KFFLWKVESFEE 169
Ssc_pig YLLSHIGSFNAAAMGLTPV-SGYNLFREAVP-----DPYWKDMVLGFRKLTPRELDMPF-----DYRYGWFNNTSLILEGKRYLQWLT ERLTERGV---KFFLWKVESFEE 169
Mmu YLLSCLHSFNAAEKMG LALI-SGYNLFRDEVP-----DPFWKNAVLGFRKLTPESEMDLFP-----DYGYGWFNTSLILEGKRYLQWLT ERLTERGV---KFIHRKVESLEE 168
Rno HLQSLHSFNAAEKMG LALI-SGYNLFRDEVP-----DPFWKSTVLGFRKLTPESEMDLFP-----DYSYGWFNTSLILEGKSYLSWLT ERLTERGV---KFIHRKVASFEE 168
Mdo YLLGYLGSPEAKMG LFLI-SGYNLFPKAVP-----DPSWKDITVLGFRKLTPRELELFP-----GYSYGWFNTSMILEAKSYLPWLT QRLTERGV---KFFQKRVHSFEE 184
Gga HLLGYLNSPEAKMG LFLI-SGYNLFPKQVP-----DPSWKNIVLGFRNLTPEKELELFP-----GYSYGWFNTALMLECRSYLPWLT NR LAQRGV---KFFHRKVESFEE 169
Mga HLLGYLNLPEAKMG LFLI-SGYNLFPKQVP-----DPSWKNIVLGFRNLTPEKELELFP-----GYSYGWFNTALMLECRSYLPWLT NR LAQRGV---KFFHRKVESFEE 169
Tgu YLLGHLHSPAATEMGLFLI-SGYNLFTPEVP-----DPSWKNIVLGFRNLTPEKELELFP-----GYSYGWFNTALMLEGRSYLPWLT NR LTRQGV---KFFHKKVESFQE 169
Dre YLLSFINSFDSVKMGIFLQ-SGYNLCAEPM-----EPSFKQAVLGFRQLSKRELEMPF-----GYSYGWFNTALMIEGKYLPWLT MNWLKQRGV---TFFQRTIDSFKE 169
Xla HLLKFVHSSEAPNMG LFLQ-SGYNILKEPAP-----EPSWKDITVLGFRHLTPPELELFP-----GYSYGWFNTAIMIEGKHYLPWLT MMKRLERGV---KFFHKKVESFQE 169
Bfl HLSRLYKTEFSHRIGLFCQ-SGYNVDFKEVP-----DPPWKDITVLGFRHLTEDEVEKFP-----GYSYGWFNTLMLCECRSYLPWLT QRLKEKGV---KFEQRKIASLSE 165
Nve RFEEELRSEIAPELGVFRA-SGCLVADHQE-----IPDWKDLVYGFKQMSRELERFPL---SAKIGVFETIIAQGSYYIPWLMKRIQHYG---KIVKRLIESFQE 169
Nvi WLEIFWKSEMASDVGVSLI-PSYRLTSSSEGLP-----VPVWGDVVYGC SKLNKKQLERLSKTNEKNYTAGYHYITYTCEPTKMLPFLMCKLRSMNV---RIVKTKIKDLK 173
Aga FFHQLWKNLGGKIGVCLQ-PCMLRTDPNGYP-----EPAWKEIVFGCQKIQPELKLRSNEHGRSYTGGYHFAFTTCEPSGLLPYLFNRFIAVGG---KFFVASKVRNFAE 175
Tca YILKLWKNDAKTGIGISLQ-LIMALSNKKD-YK-----APEWLKISLGHSEFTQDRLLKYSQRYGEEFTGGYAFVGF IWEFVRFPLPYLEKFKDRGG---QIRMRGVENFAE 174
Cel RIHEYQADG---NPGAEEQ-SGYLQSVKS-----EPKWLKMLKWNHILDAEMKQVARRPEHKF--GIFYTTWYLEPTPYIKWCTDKFLKNG---KFKKVI IYNI 165
Isc TFEKKKR YASCTNAKQTL-KKNVQTVTR-----KQANIRVKYSRKRES-VQSCSTVKQTLHVSFYVLKRLILTFQPCTLFVSSSLASRGC---HFVRKCLD LDD 169
Sma QYWKLACSWDSSEAGVYFH-----PTYQLSEYEFDIPFIT-----YYTTCIIEPRYMN YLLKLT KLI PNDHSIYSERMTRFTS 150
Sst KFLELS-NEPRSGVWITT---NKSYYTVEFEFN--SKG---RDPAKFVPWFKNFVKNFKTIEN--SSELPD-----GIAFGHSFSDGVVIVSVP IYLN YLLQENL GAGN---SVRRISKISNIH 176
Ctr KFLQLAESDPRAGVWATE---NLSYYTDYEVS---AAK---GNFKEIIPWYRDFVDDFIID--SSKLPA-----GIAFGHSFSGLVVSVRPTFLVQNK EIGN---KFKKVI IYNI 175
Dha AFMELAQNEPRSGIWHKM---SYAYFTEDYMK--EIN---YDTGKGI PWFKDFVEEFKILE--KKELPE-----GILFGFSFGVVISVP IYLN YLLSKALENGI---AIKRVKAIENVE 176

Tva DANLL-HSSGSRPDVIVNCSGLFARFLGGVED---KKMYPICQVVLVRNLSLPF-MASFSSPE-KENEDEALYIMTRFDGT-SITGGCFQPNNWSSEPDPSLTHRILSRALDRFPELT 287

Anig	AAN-G-HHTGQKADVVNCTGLSSKLLGGVLD---DKLYPARCQIVVVRNDPGK-MVSI SGTD--DGE-DEVVYMMTRAAGGGTVI	CGSYQKNQWDLPLDPNLAVRIMKRAIALCPPELV	289	
Asfl	AAS-L-HHSGKKADVVNCTGLSSRKLGGVND---DKLHPIRCQIVVVRNDPGA-MF S I SGTD--DAE-DEVYMMTRAAGGGTVI	CGSYQKDQWDLPLDPNLAVRIMKRAIALVPLQV	289	
Cpo	AAG-A-HHSGQKADVVNCTGLSSKYLGGVED---QKMPYPARCQIVVVRNEVPA-MYSVSGTD--DGP-NEAGYIMMRAAGGGTII	CGCYQRHNYESQDPNLAIRIMKRCVALCPPELV	289	
Aor	ATSPS-VHPDQKVDLVINACGLMASKLGGVED---KTVVYPARCQIVIVRNEAGK-MLDVS GTD--DGD-GEACYVMTRAAGGGTII	CGSYQLGNWDSQADPNLAVRIMKRAVAKMCPALT	290	
Ncr	AAK-L-SHTGRKPDIIINATGLLSRCLGGVMD---KKVMPYPARCQVLLVRNEATPNMVTSGTD--DGNGLDLCYIMRAAGGGTII	CGTYMKNWGDVDPDNIAIRIMKRAVEACPLT	287	
Vpo	DII---DVLGYKPDLLINCSGLNAGRLLNLDPEELSKVYPIKQIILQVYDLPFQVMMIDKLPDLSHALPDQFLNVFPRGEGG-CIMGGIFRGNWDSQDLIEGLSESI	INNVKSHIPEFT	291	
Kla	NIP---EIVGFVVDLVINATGVHAGQFLRHYPSEVEKVYPVKQIVQIYEDLPFQIVVEPLPKDDNPASDQFLNMFPRGDGG-CI	CGIMRKNWDSNTVDELTKKIVEVCKRHTPELK	291	
Spo	TVE-----ETPEASVFNCTGLWASKLGGVEDP---DVYPTRCQHVVLVKAHVHTETIRLNGKN-----SDTYIIPRPLNGGVI	CGFMQPGNWDREIHPEDTLDILKRTSALMPELF	277	
Rto	AFD-----GADLVVNATGLGAKSIAGIDD---QAAPPIRCQTVLVKSPCKRCTMDSSDPAS-----PAYIIPR-PGGEVIC	CGTYGVGDWLSVNPETVQRILKHLCLRLDPTIS	267	
Mbo	AAEA-----APIVINACGL-GARELAGDAT-----VWPRFCQHVVLV-NPGLQLFIER-----TGGSEWICYFAHPQRVVC	CGGISIPGRWDTTPEPEITERILQRCRRIQPRLA	262	
Maf	AAEA-----APIVINACGL-GARELAGDAT-----VWPRFCQHVVLV-NPGLQLFIER-----TGGSEWICYFAHPQRVVC	CGGISIPGRWDTTPEPEITERILQRCRRIQPRLA	262	
Mca	AAEA-----APIVINACGL-GARELAGDAT-----VWPRFCQHVVLV-NPGLQLFIER-----TGGSEWICYFAHPQRVVC	CGGISIPGRWDTTPEPEITERILQRCRRIQPRLA	262	
Mtu	AAEA-----APIVINACGL-GARELAGDAT-----VWPRFCQHVVLV-NPGLQLFIER-----TGGSEWICYFAHPQRVVC	CGGISIPGRWDTTPEPEITERILQRCRRIQPRLA	262	
Ser	AVAE-----ARVVVNCTGV-GARELVGDPA-----VHPVRCQHVVVVA-NPGLVQFYFIEL-----TTDSEFTGYMHPGRDVLV	CGVAVEHDWNLVPSRTVSEHILRRCAIEVEPKLD	255	
Msp	AATS-----APVVVNACGL-AARTLTGDTG-----LHPVRCQRIIVVR-NPGLDRFFMEA-----PMAPTWASIFPHGDHVV	CGGQRRSD-DTTPDPAEEDVLRCAVIEPALA	255	
Scs	AD-----APVVVNCTGL-GARELVDPDA-----VRPVRQCQLVVVE-NPGLHNLVAAD-----ADSGETTYFLPQGRLL	CGTAEEDAWSTEPDPEVAAAIVRRCAALRPEIA	263	
Sca	VD-----APVVVNCTGL-GARELVDPDS-----VRPVRQCQLVVVE-NPGLVTTWLSVE-----HSGSKSTYFIPQDRLI	CGTAEEDAWSLTPDPVAAEIVRRCAAIRPEIA	258	
Sgr	AAER-----SPVVVNCTGL-GARELVDPDAG-----VWPRFCQHVVLV-NPGLQLFIER-----TGGSEWICYFAHPQRVVC	CGTAEADDPRTPEPDPGTAEIQLRCCRIQPRLA	252	
Rxy	AGEG-----ADVVCNCSGV-WARELARDPS-----VFPPIRCQILRVA-NPGLERFVLDEE-----NPAG-LTYIVPRSGDVC	CGTAEEGRWSTEPDPATAEAILRRCSALEPRLR	265	
Mau	AYEV-----APVVVNATGL-AAGRLAADPA-----VYPARGHVLLVA-NPGLTVSVRDE-----DDPAGVTVVHPRRHVV	CGTYEAGVGHTRPDLEEAARIRRCVALVPHLA	259	
Ota	VVRDS-D---DVGVVVNACGL-GARELVNDQE-----VVPPIRCQVLYTTQDCGQGYFDDNPE-----R---LGYIIPRDRVT	CGTATRGRDETEVDEGDTASIFEKQDLFPELD	305	
Sce	-----DCIVNCTGL-GARALTGDGE-----LIGVRCQVAIVEPEGIEPPDVALGDE-----RDESALVYVIPRRRIV	CGCFIPSPDDRPLTPDPELADAMLQRTVRAAGL	274	
Tpa	LDG-----PIVNATGL-GARDLVGDAS-----MEAVRCQVVVLEQIG-LDRWVDDSS-----LDSGVTTVYVPSRDI	CGTEDHGAEDLTVDPVTAEAIVRQTRVPELA	253	
Nsp	GPG-----LVVNACGL-GARLLGADRT-----VVPVRCQVVVVEQTG-IDRWLDRS-----GPTYVVPREHDVV	CGTDVEGEWSRTPSPATAEAILERATRLVPLR	250	
Apo	LKGG-----DLVVLAAAGLRGGELLGDDDT---VYPIRCQVVRLANTKNLTQWLCDDN-----YPDGVSYIIPREDI	CGTDTANDWNREVEPQTSIDILERAACKLVPLE	262	
Amed	LAAD-----VVVNAAGL-GAGALAGDRS-----MVPVRCQVVHVTDPG-LAEFVVDGTG-----PGITYYIIPHGHHV	CGTEEPGRADTPNPVAVTADILRRCRELEPRLA	240	
Cfa	MAR-----GGADVIINCTGVWAGALQPDPLK-----PGRQCQIIKVDAPWMKHFII THDPAK-----GIYQTP-YIIPGQVT	CGIFQLGNWSEANNIQDHNTIWECCSLEPTLK	271	
Amel	VAR-----GGADVIINCTGVWAGALQPDPLK-----PGRQCQIIKVDAPWMKHFII THDPAK-----GIYQSP-YIIPGMQAV	CGIFQLGNWSEVNNNQDHATIWESCCRLEPTLK	271	
Eca	VAR-----GGADVIINCTGVWAGALQPDPLK-----PGRQCQIIKVDAPWMKHFII THDPER-----GIYRSP-YIIPGIRE	CGIFQLGNWSEVNNIQDHKSIWEGCCRLEPTLK	271	
Hsa	VAR-----EGADVIINCTGVWAGALQPDPLQ-----PGRQCQIMKVDAPWMKHFII THDPER-----GIYNSP-YIIPGTQVT	CGIFQLGNWSELNNIQDHNTIWEGCCRLEPTLK	271	
Bta	VVR-----EGADVIINCTGVWAGALQPDPLQ-----PGRQCQIIKVDAPWMKHFII THDPER-----GIYKSP-YIIPGLQAV	CGIFQLGNWSETSHDNTIWDHNTIWEGCCRLEPTLK	271	
Ssc_pig	VAR-----GGADVIINCTGVWAGALQPDPLQ-----PGRQCQIIKVDAPWMKHFII THDLER-----GIYNSP-YIIPGLQAV	CGTFQVGNWNEINNIQDHNTIWEGCCRLEPTLK	271	
Mmu	VAR-----G-VDVIINCTGVWAGALQADASLQ-----PGRQCQIIQVEAPWIKHFII THDPSL-----GIYNSP-YIIPGSKT	CGIFQLGNWSEVNNIQDHNTIWKSCCKLEPTLK	269	
Rno	VVR-----GGVDVIINCTGVWAGALQADASLQ-----PGRQCQIIQVEAPWIKHFII THDPSL-----GIYNSP-YIIPGSKT	CGVFLGNWSELNSVHDHNTIWKSCCKLEPTLK	270	
Mdo	VAR-----EGADVIINCTGVWAGALQADPLQ-----PGRQCQIIKVLAPWVKHFII THSDSA-----GIYKTP-YIIPGSQVT	CGIFQLGNWNEKSDAQDHNTIWEGCCRLEPTLR	286	
Gga	MFS-----QGIDVVIINCTGIRAGELQPDPALQ-----PARQCQIIKVLAPWVKHFII THDMES-----GIYSSP-YV	IPGSEFTVLCGGIYQQGNWNEENSAQDHKSIWERCRLPLMLQ	271	
Mga	MFS-----QGIDVVIINCTGIRAGELQPDPALQ-----PARQCQIIKVLAPWVKHFII THDMES-----GIYSSP-YI	IPGSEFTVLCGGIYQQGNWNEENSAQDHKSIWERCRLPLMLQ	271	
Tgu	VSG-----DGVVDVILNCSGMRSGDLQPDPELQ-----PGRQCQIIKVLAPWVKHFII THNLKS-----GIYNSP-YV	IPGSEFTVLCGGIYQHGNWSEENSAQDHKSIWDGCCQLLPLQ	271	
Dre	LSD-----SGADMIINCSGVRSGDLQPDPELQ-----PARQCQIIKVDAPWMKHFII THDSTS-----GVYDTP-YIIPGSR	LVTVYGGVFGVGNWNRMNSSVDHKGIIWEAACKLEPSLQ	271	
Xla	LAV-----QGADVIINCTGIRSGELQPDPELQ-----PGRQCQIILKVHAPWMKHFII THDLKT-----GVYTP-YIIPGSE	SVTLGGIYQLGNWSEENTSEYKWIWENCCLEVPKSL	271	
Bfl	VCS-----D-YDVVINCCGLSARKMLNDQEVK-----PGRQCQIVRVHAPWVKHFII THNLDT-----ATYNSP-YIIPGINA	VALGGLNQVGDWDEGWREDEKKIWDGAIKMPIAIK	266	
Nve	LAR-----S-FDVVVNCCGLGAKGLAQDRHMF-----PIRCQIILRVKAPWIKQFII LYKEYED-----LKAGRLNDI	IPQMDHVVLCGCAQAGSFNTVPTLQDVTNIIEDTSKVI	271	
Nvi	LKE-----QGFDVVIINCSGIGSRELCFDKSVI-----PIRCQVTRVKAPWMFETFLLEDDEG-----NYVIPNMSV	VVLCGTHQENDFSVSVCPNDLKFILNGCKRLVPSLD	270	
Aga	IILN-----RPVDLIVNCSGLGSELEASDKAVL-----PIRCQVAVRVAPWIIYEVII LDDSDG-----NYIIPNCSF	VIIICGTHQMNDFNRRNVKRDSDRPFIDGCRMLPSLR	273	
Tca	LSH-----FDVVVNCSGLGARSVPDPGVR-----PIRCQIARVRAPWQKHTFMLDTEPG-----NYVISNEDCVI	VGCGTHQEDDFNTGIYDNRDHIILTGCRKYLPKSLA	269	
Cel	VAR-----SYDVTVNCTGLGSRALIGDKVEY-----PTRCQIILKVS CPRVKHFFIDDK-----YYALLNDST	ITLGGTFEAAHQWDLTINSELSQRIILKENIHNI	PSLR	258
Isc	LAG-----KFDVVMNCPGIGAVSLVPPDPVY-----PVRCQTTWVSAPWVKRVVAGE-----YYIIPNVDAI	IVLGGTANKGDFSLDPVQETRQKILDACMALEP	PSLK	262
Sma	SNELYNWAKEQINVIINCTGLGSGYLFNDPELR-----PVRCQVLRVQAPWIKHFFYFVGSKCN-----YIILCSM	FVVVGLCSSTRSDRHDDTIVSSESTKNILQRIDNTW	254	
Sst	EARDL-HSSGAKADIVVNATGGLANRIVGFKDD--KRNFPVRCQVLLVRNNAK-EVSVVEGF--PELDNEMLYLMPRKEGG-CI	ICGCFLENFASTDVDEQLTKRIDRALKYVPEIV	287	
Ctr	SARDF-HSSGKKADYVINATGLDATTIKGVDDD--KLTFPVRCQVLLLLKNARI-QYVHGF--PGFPNELLYIMPRKEGG-TI	VGGCFLPGERNTAEDKELTERIIRRALKYAPELV	286	
Dha	DARNL-HSSGNKANLVINCSGLLAFNLKGYNDP--NRSYGIRQCOTLHVRNNAK-QIEVQSF--PGFEDEMLYIMPRKEGG-SI	ICGCFIENYKNTAEDKELTQRLVNRAKKYAPEMF	288	
Tva	-----KDGQ-LDIVRECVGHRPREGGPRVELEKIPG-----GVVHNYGAGAGYQSSYMADEAVSYVERALT-R--PNL	-----	356	
Anig	EKGQ-----GIEGLDIRHGVLRLPREGGPRIEAEKVDG-----VSVVHNYGHGGFGYQASFGCAEADAVKL	VQETLR-RKDKAKL-----	364	
Asfl	GEGQ-----GIEGLDVIIRHGVLRLPREGGPRIEADKVN-----VSVVHNYGHGGFGYQASFGCAAEAVELV	NGVLK-QKGRAKL-----	364	
Cpo	GKDANGNRGIEALDIVRHGVLRLPREGGPRVERDNIG-----VSVVHNYGHGGFGYQASFGTCADAVAL	VEKVLDEKRRARL-----	370	

Aor	DGKE-----IEHLDIRHSVGLRPVRRANGARIEKERIGD-----TWVVHNYGAGGAGYQSSYGCQAQAVNLAEEALA---TRAKL-----	362
Ncr	GGKG-----IEALDVI RHAVGLRPYREGGVRIDKENING-----TWVVHNYGHGGWGYQGSWCFAFRVQELVDEIKSELKLGSKL-----	362
Vpo	S-----LSVNTYTAALRPGRKGGVRLSDSNYDLLRH-----DGSLRVIHNYGIGGAGYQSSICSAEEVSSLAAILK-----	358
Kla	N-----PTIYNSYVALRPGRKDGVRVEYSEFDLPKN-----QGKLVHNYGIGGAGYQASRGLALEASALAAANVGLPKFISRKACPYKL-----	373
Spo	HGKG-----PEGAEIIQECVGRFPRSRKGGARVELDVVPG-----TSVPLVHDYGASGTGYQAGYGMALDSVMLALPKIKLA-----	348
Rto	SDGT-----IEGIEVLRHNVGLRPARRGGPRVEAERIVLPLDRTKSPLSLGRGSARAAKEKEEVTLVHAYGFFSSAGYQSSYGAEDVAQLVDEAFQRYHGAARESCL-----	368
Mbo	E-----AAVIETITGLRDRPS-VRVEAEP I-GR-----ALCIHNYGHGGDGVTLSWG CAREVNLVGGG-----	320
Maf	E-----AAVIETITGLRDRPS-VRVEAEP I-GR-----ALCIHNYGHGGDGVTLSWG CAREVNLVGGG-----	320
Mca	E-----AAVIETITGLRDRPS-VRVEAEP I-GR-----ALCIHNYGHGGDGVTLSWG CAREVNLVGGG-----	320
Mtu	E-----AAVIETITGLRDRPS-VRVEAEP I-GR-----ALCIHNYGHGGDGVTLSWG CAREVNLVGGG-----	320
Ser	G-----AEVRDEIVGLRPGREQ-VRLEVEHF-EG-----SRIVHDYGHAGCGVALSWG CAFEVADLVGA-----	312
Msp	A-----AEVLEHRVGLRPGRAA-PRVEAER-GR-----ALVVHNYGHAGNVMLSWG CAREAALALGGTPPA-----	317
Sco	G-----ARVLAHLVGLRPARDA-VRLERGLTPDG-----RRLVHNYGHGGAGVTVAWG CAQEARLAS-----	320
Ssca	G-----ARIIEHKVGLRPTPA-VRLEEVLPGG-----RVLVHNYGHGGAGVTVAWG CAREAARLASG-----	316
Sgr	G-----ARVLGHRVGLRPARAEGVRIGTEELPGG-----GLLVHNYGHGGAGVTVAWG CARAAAALVG-----	310
Rxy	G-----ARVLEHRAGLRPGRPE-VRLELEELPGG-----TPCVHNYGHGGSGVTLSWG CAEEAALAGAALS-----	326
Mau	D-----APVLGERIGLRPARHGGPRVEVDAT--D-----GRLVHAYGHGGAGVTLSWG CAEEVADLALGV-----	317
Ota	A-----SKIIIGANVGLRPSRNVVRCLEDEPLSRG-----ARLIHCYGHGGAGMTLAWG CAEDVLRLEAEEA-----	366
Sce	P-----GRLLSRAGLRPYRSTVVREREG-----RVIHNYGHGGSGYTLAWG CAEVSAMLRDNGSTHGHV-----	336
Tpa	G-----ARVIGHNIGLRPARPT-VRLERVG-----EVVHCYGHGGAGVTLSWG CADEVTALIG-----	305
Nsp	G-----ARVLRHRVGLRPPVPA-VRLDRVG-----DVVHCYGHGGAGVTLSWG CAEDVVALAAVSAAPGG-----	310
Apo	G-----LEVLEHKVGLRPARET-IRLEHVAG-HP-----LPVIAAYGHGGAGVTLSWG TAQRVAELAAQLAGEPAS-----	326
Amed	G-----AEVLSLVGLRPPFRE-VRLERDG-----DVVHCYGHGGAGITLAWG CAADVAELVTAG-----	294
Cfa	D-----AKIVAFTGLRPPVQP-IRLEREQLRFGS-----SNTEVIHNYGHGGYGLTIHWG CAMEAAKLFQKLVLEERKLLRMPPHL-----	347
Amel	E-----AKIVAELTGLRPPVQP-IRLEREQLRFGS-----LNTEVIHNYGHGGYGLTIHWG CAMEAAKLFNGILEERKLLRMPPHL-----	347
Eca	K-----AEIVSECTGFRPPVQP-VRLEERLRFGP-----SNTELIHNYGHGGYGLTIHWG CALEAAKLFGEVLEERKLLRMPPHL-----	347
Hsa	N-----ARIIGERTGFRPPVQP-IRLEREQLRTGP-----SNTEVIHNYGHGGYGLTIHWG CALEAAKLFGRILEEKLSRMPPHL-----	347
Bta	D-----AKIIGEWSGFRPPVQP-VRLEREQLRFGS-----SNTEVIHNYGHGGYGLTIHWG CAQEVAKLFGKILEERNLLRIPPSHL-----	347
Ssc_pig	D-----AKIVGEYTGFRPPVQP-VRLEREQLRFGS-----SNTEVIHNYGHGGYGLTIHWG CALEVAKLFGKLVLEERNLLTMPPSHL-----	347
Mmu	N-----ARIVGELTGFRPPVQP-VRLEERLHFGS-----SSAEVIHNYGHGGYGLTIHWG CAMEAANLFGKILEEKLSRMPPHL-----	345
Rno	N-----ARIMGELTGFRPPVQP-VRLEERLRFGS-----SSAEVIHNYGHGGYGLTIHWG CAMEAANLFGKILEEKLSRMPPHL-----	346
Mdo	E-----ADIMYTWGFRPIRSQ-IRLEREKLSHG-----FKAEIIHNYGHGGYGLTIHWG CALEAAKLFQKLVLEERKLPNIPPSHL-----	362
Gga	K-----AEIVQEWGFRPARPT-VRLERESIGHGR-----SRTEVIHNYGHGGYGLTIHWG CAMAARLLGNILQEKQSQRLSAAAI CQTAEFP PWP-----	359
Mga	K-----AEIVQEWGFRPARPS-VRLERESIGHGR-----LRTEVIHNYGHGGYGLTIHWG CAMATARLLGNILQEKQSQR-----	343
Tgu	K-----AKIVGEWGLRPARPS-VRLEERIRLGN-----LQAEVIHNYGHGGYGLTIHWG CAMAARLLGSI LQEKQLATPPGPRL-----	348
Dre	H-----ARIVEDWTGLRPARSK-VRLEERAIRSG-----HSFEVIHNYGHGGYGLTIHRG CAEEAARLFGQFLEQKGLLTAQAKSRL-----	348
Xla	N-----AKIVNAWGLRPTRSK-VRLEERAFVSGS-----MKSQIIHNYGHGGYGLTIHWG CAMEAAKIFGQIKERNLKKTPQSSL-----	347
Bfl	G-----AQVLAKWTGLRPPVER-IRLERDVTK-----DTPVIHNYGHGGYGVTYHWG CALQAASLAAMDDIAAKASSTRVHKSRY-----	342
Nve	N-----AEVISNWSGLRPGKRT-VRLEKEVMLFKDESGCI-----IKLNVHNYGHGGAGPSLSFG CAKDTADLVAQILS-RDAKSM-----	347
Nvi	N-----AEVLKKWVGLRPGRDE-VRLELEIVRTEAG-----QDLTIVHNYGHGGCGITLSWG CAMDVVEMLRQHLKTKNS-SKL-----	342
Aga	N-----ASVTNEWVGLRPGRDS-VRLEMEHYRSDDK-----GSVPIIHNYGHGGCGVTLWCW CAKEVVEISSTLGWKSSTSKL-----	347
Tca	K-----AQVIRDQAGLRPGRDQ-VRLEIEERRIGE-----VMKVIHNYGHGGSGVTLSSI CALDAARLVKEAAGLAGQ-SKL-----	340
Cel	T-----AQILSSHVDMPRSGT-VRLQAEALGR-----SLVHNYGHGGSGITLHWG CALECAEIVENVLMKMS--KL-----	322
Isc	E-----AKFVRDHVGLRPGRTA-VRLEIEDRVLDDSN-----KTLPVIHNYGHGGSGITVSWG SAEDAVNLLKQVIAEKGLPSNAQSKL-----	340
Sma	YGGGLG-----QSSIVEEWTGLRPFPS-IRLEIDWYQPEITCQP-----LPIIHNYGHGSMGVALSWG TAIDAVKLFENVLKSSTGIHS-----	332
Sst	DPSY---KNNPPKVDIVRTQVGLRPFREGGARLEQSDN-----GWLPHNYGAGGGGYQGSYGMSSKLVELIQKHV---GNSKF-----	360
Ctr	DPTF---KNNPSKIEIAQVNVGFRPFRFEDGARVELDKR-----DWLIHNYGAGGGGYQGSFGLANKVIDIMKNELS-K-GKSKL-----	361
Dha	DPGF---KNNPTEIDIRVNVGLRPFDRDGGVRVENDSDN-----KWLIIHNYGAGGGGYQGSFSSSTVVSVLVQALD-KKMASKL-----	364

Рис. 2.2. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей DAAO из различных источников.

С этой целью нами были проанализированы первичные последовательности DAAO из различных организмов. Поиск последовательностей DAAO по базам данных KEGG GENES по ключевому слову D-amino acid oxidase дал более 400 результатов. Поиском по базам данных SwissProt, GeneBank и Brenda Enzymes было найдено более 100 последовательностей, которые обладали наибольшей гомологией с TvDAAO. После исключения повторов и неверно аннотированных последовательностей для анализа было отобрано 50 последовательностей DAAO, включая исходную TvDAAO, и для них выполнено множественное выравнивание с использованием программы CLUSTAL X (версия 1.83). Результаты представлены на рис. 2.2 в порядке убывания гомологии относительно TvDAAO. Наибольшая степень гомологии (около 35-40%) наблюдается с ферментами из *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Coccidioides posadasii* и *Neurospora crassa*. Интересным является тот факт, что уровень гомологии между дрожжевыми TvDAAO и RgDAAO составляет не более 30%. Стоит отметить, что аминокислотные последовательности DAAO из термофильных микроорганизмов до сих пор не определены. Для поиска и клонирования генов *tvdaao* из термофильных организмов нашей группой были организованы научные экспедиции в Кроноцкий государственный заповедник (Камчатка) в 2012-2013 гг.

Важной особенностью всех DAAO является наличие вблизи N-конца консервативной последовательности GXGXXG, которая является характерной для многих нуклеотидсвязывающих белков [27,28]. Эта последовательность указывает на наличие в молекуле белка структурного элемента, известного как “укладка по Россману” (Rossmann fold), представляющего собой определенную комбинацию α -спиралей и β -листов [29]. Этот структурный домен отвечает за связывание адениновой части NAD^+ и FAD в коферментсвязывающих центрах большинства дегидрогеназ. Стоит отметить, что на C-конце многие DAAO содержат специфическую последовательность Ser-(Lys/His/Arg)-Leu, которая представляет собой сигнальный пептид типа 1, обеспечивающий транспорт фермента в пероксисомы [30].

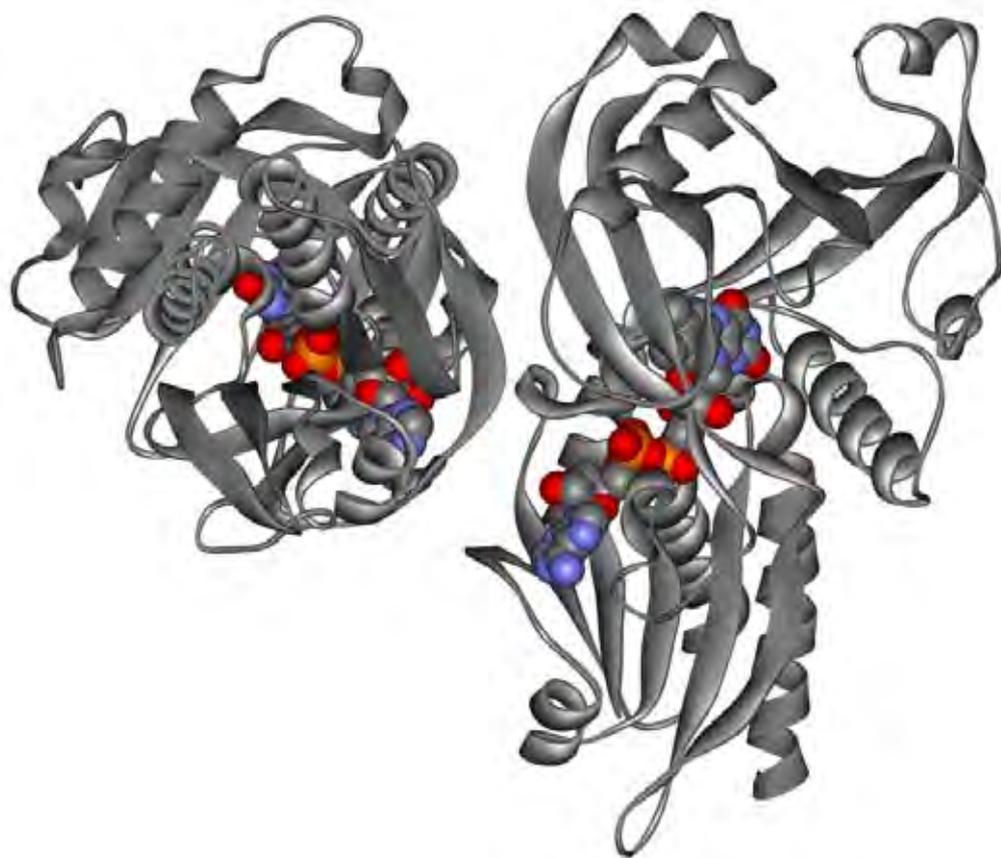
2.1.3. Трехмерная структура и механизм действия DAAO

На сентябрь 2014 года в базе данных трехмерных белковых структур (PDB) находится 27 депонированных пространственных структур DAAO из трех источников – рkDAAO, hDAAO и RgDAAO, среди которых 16 принадлежит hDAAO, 7 структур рkDAAO и 4 структуры дрожжевой RgDAAO (табл. 2.1). Первой среди перечисленных структур была установлена структура для рkDAAO с разрешением 2,6Å и 3,0Å двумя независимыми группами ученых из Японии и Европы в 1996 году [31,32]. В 2000 году была определена структура RgDAAO с разрешением 1,20Å [33], а в 2006 году был получен первый кристалл для hDAAO и определена структура этого фермента с разрешением 2,5Å [34]. Стоит отметить, что с 2011 года к настоящему моменту было решено 10 структур DAAO, из которых 1 для рkDAAO и 9 для hDAAO, что безусловно связано с важной физиологической ролью этого фермента в организме человека и активным поиском новых ингибиторов hDAAO для применения в терапии нейродегенеративных заболеваний. Кристаллическая структура TvDAAO долгое время оставалась недоступной, несмотря на многочисленные попытки кристаллизации этого фермента во многих лабораториях мира. Различными группами исследователей были построены модельные структуры TvDAAO [35,36], однако они различались между собой, что связано с низким уровнем гомологии между последовательностями TvDAAO и других DAAO с известной структурой, которые могут быть взяты за основу при моделировании (см. выше). Однако в 2008 году аспиранту нашей лаборатории Хороненковой С.В. впервые в мире удалось получить два кристалла одной из мутантных форм TvDAAO. В результате была определена трехмерная структура этого фермента с разрешением 2,8 и 1,8Å [4]. В качестве примера на рис. 2.3 приведены четвертичные структуры hDAAO и TvDAAO. Кроме того, на рис. 4.1 раздела “Результаты и их обсуждение” представлены трехмерные структуры мономеров рkDAAO, hDAAO, RgDAAO и TvDAAO. В структурах DAAO можно выделить каталитический (субстрат-связывающий) и FAD-связывающий домены.

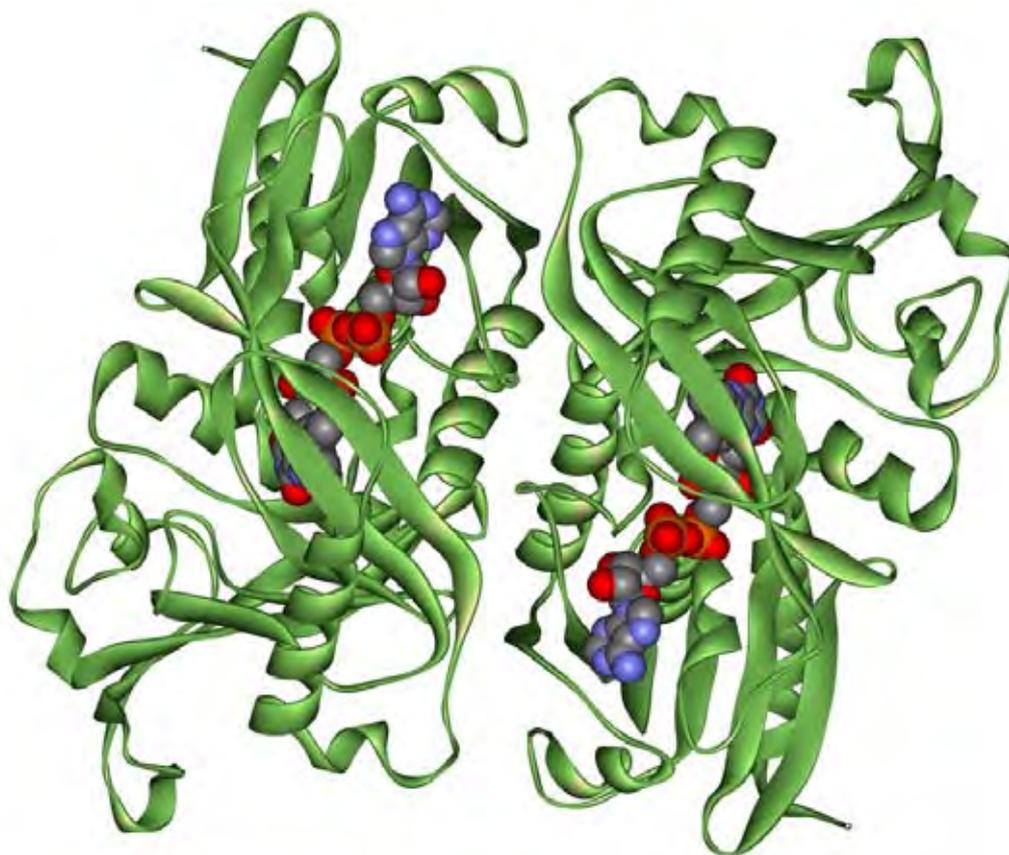
Таблица 2.1.

Структуры оксидазы D-аминокислот из различных источников.

Описание структуры	Разрешение	Код PDB
pkDAAO		
Свободный фермент, уточненная структура [31]	2,5 Å	1VE9
Комплекс с бензоатом [32]	2,6 Å	1KIF
Комплекс с <i>o</i> -аминобензоатом [37]	2,5 Å	1AN9
Восстановленная форма фермента в комплексе с иминотриптофаном [38]	3,1 Å	1DDO
Комплекс с 3-метил-2-оксвалериановой кислотой [38]	3,2 Å	1DAO
Восстановленный пурпурный интермедиат в комплексе с D-пролином [39]	2,5 Å	1EVI
Комплекс с (1R)-1-фенилэтиламин и сульфат-ион [40]	1,88 Å	3WGT
hDAAO		
Комплекс с бензойной кислотой [34]	2,5 Å	2DU8
Свободная холо-форма фермента [41]	2,9 Å	2E48
Комплекс с <i>o</i> -аминобензоатом [41]	2,6 Å	2E4A
Комплекс с иминосерином [41]	3,2 Å	2E49
Комплекс с иминодофамином [41]	2,7 Å	2E82
Комплекс с 4Н-фууро(3,2- <i>b</i>)-пиррол-5-карбоновой кислотой [42]	2,5 Å	3CUK
Комплекс с гидроксихинолином-2(1Н) [43]	2,20 Å	3G3E
Комплекс с 4Н-триен(3,2- <i>b</i>)-пиррол-5-карбоновой кислотой и глицерином [44]	1,90 Å	3ZNN
Комплекс с 4-(4-хлорфенил)-1Н-пиррол-2-карбоновой кислотой и глицерином [44]	2,30 Å	3ZNO
Комплекс с 3-гидрокси-2Н-хромен-2-он и глицерином [44]	2,40 Å	3ZNP
Комплекс с 3-фенилэтил-4Н-фууро(3,2- <i>b</i>)пиролл -5-карбоновой кислотой [44]	2,75 Å	3ZNQ
Комплекс с пиридин-2,3-диолом [45]	2,50 Å	3W4I
Комплекс с 3-гидрокси-5-(2-фенилэтил)-пиридин-2(1Н)-оном [45]	2,74 Å	3W4J
Комплекс с 3-гидрокси-6-(2-фенилэтил)-пиридазин-4(1Н)-оном [45]	2,86 Å	3W4K
Комплекс с 4-гидрокси-6-[2-(7-гидрокси-2-оксо-4-фенил-2Н-хромен-6-ил)этил]пиридазин-3(2Н)-оном [46]	2,4 Å	4QFC
Комплекс с 3-(7-гидрокси-2-оксо-4-фенил-2Н-хромен-6-ил) пропановой кислотой [46]	2,85 Å	4QFD
RgDAAO		
Свободный фермент [33]	1,73 Å	1COL
Комплекс с D-аланином [33]	1,20 Å	1COP
Комплекс с L-лактатом [33]	1,46 Å	1COK
Комплекс с двумя молекулами антранилата [47]	1,9 Å	1COI



А



Б

Рис. 2.3 Четвертичные структуры hDAAO 3G3E (А) и TvDAAO (Б). FAD выделен СРК.

При ориентации, которая показана на рис. 2.3 (правая субъединица) и рис. 4.1, каталитический домен расположен в верхней части субъединицы и представляет собой довольно объемную полость, верхняя часть которой образована β -листами. В нижней части этой полости располагается изоаллоксазиновый цикл FAD. Кофермент-связывающий домен находится в нижней половине субъединицы и представляет собой классическую укладку по Россману, которая приставляет собой определенное пространственное расположение α -спиралей и β -листов, что обеспечивает эффективное связывание аденозиновой части FAD.

Несмотря на структурные сходства между RgDAAO, pkDAAO, hDAAO и TvDAAO, анализ трехмерных структур позволяет выявить несколько отличий, объясняющие различие в некоторых свойствах этих ферментов. Например, в структуре RgDAAO присутствует петля из 14 аминокислотных остатков, соединяющая между собой β -листы β F5- β F6 (явно выделяется в нижней части субъединицы на рис. 4.1B). Группой ученых из Италии было показано, что наличие этой петли играет ключевую роль в образовании димера RgDAAO за счет взаимодействия остатков Arg305 и Arg314 (которые располагаются в указанной петле) одной субъединицы, и остатков Asp269, Glu275 и Glu276 из α -спиралей I3' и I3'' второй субъединицы [48]. Удаление нескольких аминокислотных остатков из этой петли приводило к потере способности RgDAAO образовывать димерное состояние, сильному снижению температурной стабильности и ухудшению связывания FAD [49,50]. В нашей лаборатории были изучены межсубъединичные контакты в структуре TvDAAO и роль отдельных остатков в поддержании стабильного димерного состояния [51]. Была предпринята попытка разрушить межсубъединичный контакт, который образован 12 водородными связями аминокислотных остатков из разных субъединиц. В рамках данной работы был проведен направленный мутагенез остатков Arg169 и Arg220, который привел к тому, что мутантные ферменты экспрессировались в клетках *E.coli* в активной, но нерастворимой форме в виде телец включения. Все полученные мутантные TvDAAO обладали гораздо более низкой температурной стабильностью, чем фермент дикого типа. В качестве особенности структуры pkDAAO можно отметить

наличие петли β I5- β I6 у входа в активный центр. В результате изменения конформации этой петли в рkDAAO, субстрат попадает в активный центр, а продукт выходит из него. Таким образом, диссоциация продукта из активного центра затруднена и эта стадия лимитирует скорость ферментативной реакции [52]. В RgDAAO вход в активный центр немного затрудняет лишь Tyr238, в результате чего этот фермент имеет более высокую каталитическую эффективность, чем рkDAAO. Степень гомологии между hDAAO и рkDAAO составляет более 80%, поэтому между их третичной и четвертичной структурой наблюдается значительное сходство [34]. Единственным существенным отличием между структурами их субъединиц является различная конформация гидрофобного участка ValAlaAlaGlyLys (аминокислотные остатки 47-51 в обеих последовательностях), расположенного со стороны *si*-поверхности изоаллоксазинового кольца FAD, что обуславливает различие в сродстве этих ферментов к FAD.

Отдельно стоит упомянуть о различном строении димеров DAAO из различных источников. В случае RgDAAO и TvDAAO в нативном состоянии ферменты существуют в виде димеров, которые состоят из идентичных субъединиц, соединенных по типу «голова-хвост» [2,4] (рис. 2.3Б). Для рkDAAO известно димерное состояние, в котором субъединицы пространственно-ориентированы «голова-к-голове» друг относительно друга. Необходимо отметить, что для hDAAO различными авторами были получены два типа структуры димера, отличающиеся площадью и способом межсубъединичного контакта – в одном случае такой контакт реализуется способом «голова-голова» [34], а в другом наблюдается необычная крестообразная взаимная ориентация субъединиц (рис. 2.3А) [42]. Важным отличием между структурами hDAAO и рkDAAO является олигомерное состояние этих ферментов в живой клетке – фермент из свиньи существует в виде мономера [6], в то время как активной формой hDAAO является димер [42]. Стоит отметить, что все четыре DAAO способны *in vitro* образовывать олигомерные состояния более высоких порядков (тетрамеры, октамеры и т.д.), что влияет на каталитическую активность и температурную

стабильность этих ферментов. Данный феномен был ранее изучен в нашей лаборатории для рекомбинантной TvDAAO дикого типа.

Отдельно стоит упомянуть о механизме действия DAAO. Аминокислотных остатки, которые формируют активный центр DAAO, играют важную роль в связывании и правильном ориентировании субстрата относительно изоаллоксазинового цикла FAD, но не принимают непосредственного участия в катализе [2]. Процесс катализа ферментом протекает в несколько этапов. На первом этапе происходит связывание D-аминокислоты в активном центре фермента и оптимальное ориентирование аминогруппы относительно N(5)-атома FAD. Непосредственно акт катализа протекает по гидриднему механизму, в результате чего происходит перенос гидрид-иона (H^-) на N(5)-атом изоаллоксазинового цикла FAD и образуется восстановленная форма кофактора $FADH_2$ [32]. О прямом переносе гидрид-иона свидетельствуют также результаты изучения pH-зависимости первичного дейтериевого кинетического эффекта и изотопного эффекта растворителя в реакции окисления D-Ala и D-Asn, катализируемой RgDAAO [53]. Весь процесс катализа с большинством субстратов, как правило, протекает по упорядоченному механизму, в случае которого сначала происходит окисление $FADH_2$ под действием кислорода, с последующей диссоциацией иминокислоты (продукт окисления D-аминокислоты) из активного центра DAAO [2]. Скорость реакции при этом лимитируется отщеплением иминокислоты от фермента. В пользу описанного механизма говорят данные, полученные при анализе трехмерных структур RgDAAO, RgDAAO и TvDAAO в высоком разрешении. На рис. 2.4 представлен активный центр TvDAAO с “Re” стороны изоаллоксазинового цикла FAD. При связывании субстрата в активном центре TvDAAO, карбонильная группа D-аминокислоты образует солевой мостик с Arg302 (у RgDAAO Arg285) и водородную связь с окси-группой остатка Tyr243 (у RgDAAO Tyr223 и Tyr238), α -NH₂ группа образует водородные связи с Gly330 (у RgDAAO Ser335) и через молекулу воды с Asn50 и Gln334 (у RgDAAO Asn54 и Gln339). У RgDAAO боковой радикал субстрата попадает в гидрофобный карман, объем которого ограничен размером Met213, что играет определяющую роль в

субстратной специфичности этого фермента [54,55]. В структуре TvDAAO в соответствующем положении находится остаток Ser228. Однако в связывании бокового радикала субстрата в первую очередь участвуют остатки Phe54 и Phe258, которые играют важную роль в каталитических свойствах TvDAAO [56,57]. Описанное расположение аминокислотных остатков в активном центре DAAO определяет ее абсолютную стереоспецифичность к D-аминокислотам. Стоит отметить, что активный центр оксидазы L-аминокислот (LAAO) является практически зеркальным отображением активного центра DAAO. В результате LAAO обладает абсолютной специфичностью к L-аминокислотам [58,59].

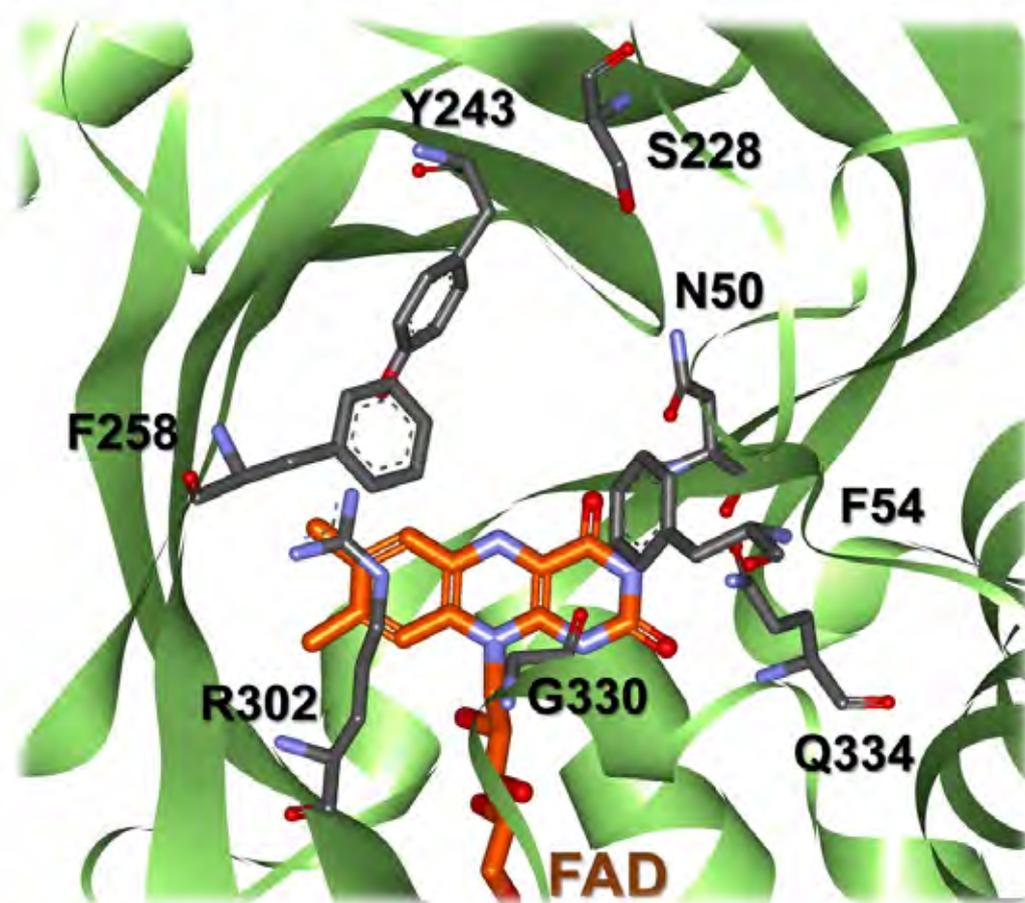


Рис. 2.4. Расположение аминокислотных остатков в активном центре TvDAAO.

В подтверждение того, что ферментативная реакция, катализируемая DAAO протекает по упорядоченному механизму, говорят также исследования, проведенные группой ученых из Италии. На примере RgDAAO ими был изучен кислородный канал, который располагается на “Si” стороне изоаллоксазинового цикла FAD. По данному каналу кислород поступает из растворителя в активный центр фермента (рис. 2.5) [60,61]. С помощью компьютерного моделирования были

обнаружены два сайта - А и В, которые расположены внутри кислородного канала. Сайт А находится в непосредственной близости от FAD (3.5 Å от С4 атома) и участвует в подведении кислорода к изоаллоксазиновому циклу FAD (рис. 2.5). Его функция была исследована методом направленного мутагенеза. В результате введения мутации G52V в структуру RgDAAO часть области сайта А оказалась заполнена боковой группой Val. Активность с кислородом для этого мутанта снизилась в 100 раз. Авторы предполагают, что роль сайта В, который находится в 5 Å от диметилбензольного кольца FAD, заключается в локальном накоплении кислорода. Также была исследована роль остатков Trp50, Thr201 и Ile225 в транспорте кислорода [60]. Мутантная форма RgDAAO T201L обладала увеличенной активностью и более низкими значениями K_M с кислородом. Подобные кислородные каналы также обнаружены при анализе структур rkDAAO, hDAAO и TvDAAO.

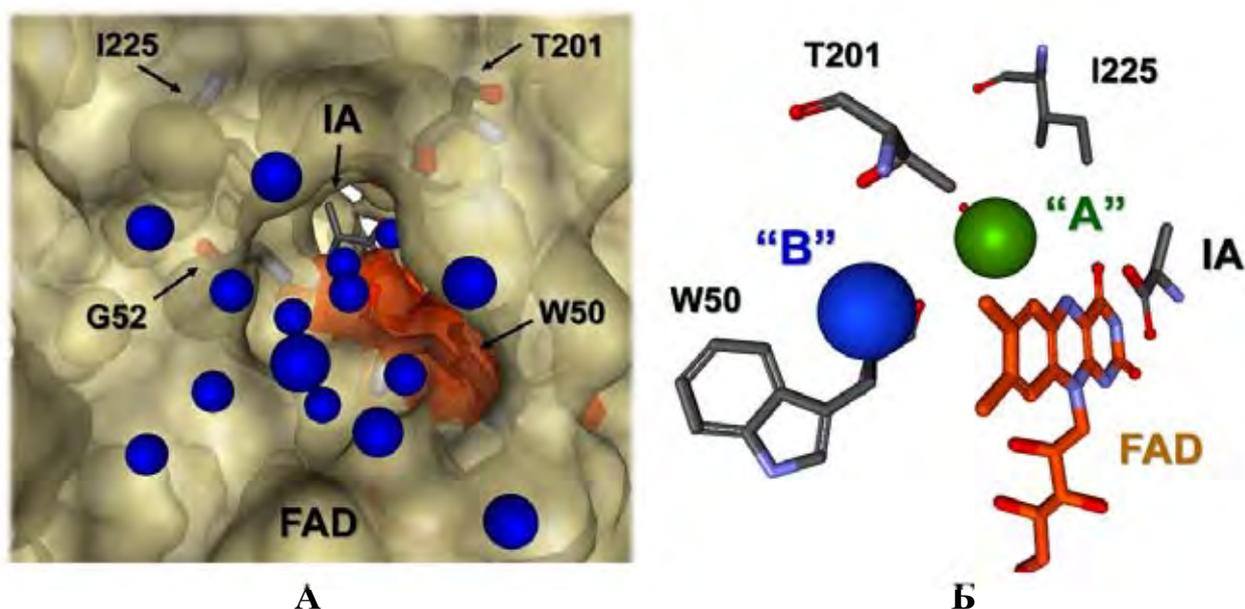


Рис. 2.5. А – канал, расположенный на *Si*-стороне FAD, по которому кислород поступает в активный центр RgDAAO, IA-аминокислота, синими шариками показаны молекулы воды, наполняющие кислородный канал, Б - положение важных аминокислотных остатков относительно высокоаффинных сайтов “А” и “В” [60,61].

2.2. Основные свойства DAAO из различных источников

Постоянный рост числа аннотированных последовательностей DAAO с одной стороны является следствием полногеномного секвенирования различных организмов, а с другой стороны объясняется поиском новых ферментов для целей биотехнологии. Перспективным является поиск и клонирование генов *daao* из термофильных микроорганизмов, однако работы в этом направлении пока не увенчались успехом.

Таблица 2.2.

Сравнение основных свойств DAAO из различных источников.

Параметр	pkDAAO	hDAAO	RgDAAO	TvDAAO
Число аминокислот в субъединице	347	347	368	356
Молекулярная масса субъединицы, кДа	39,6	39,5	40,0	39,3
Изоэлектрическая точка, pI	7,0, 7,2	-	7,2, 7,4, 7,8	5,1
Максимум поглощения, нм				
<i>окисленное состояние</i>	274, 380, 455	278, 372, 454	274, 368, 455	272, 360, 455
<i>переходное состояние</i>	-	378, 400, 485	274, 370, 400, 490	-
<i>восстановленное состояние</i>	355, 415	354	350	-
Максимум флуоресценции (окисленное состояние), нм	350, 530	354, 527	355, 530	355, 530
Отношение поглощения A_{274}/A_{455}	9,5	10,6	8,2	8,4
pK _a FAD (N(3)-H)	9,4	10,3	10,6	10,1
Константа диссоциации FAD (K _d), M	$2,2 \cdot 10^{-7}$	$8 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-8}$	$1,5 \cdot 10^{-7}$
Константа диссоциации бензоата, mM	0,002	0,007	0,25	18,8

В настоящее время наиболее перспективным направлением исследований является изменение свойств известных DAAO с помощью белковой инженерии для целей биотехнологии [58]. На данный момент частично охарактеризованы ферменты из ряда источников, однако наиболее полно изучены свойства рkDAAO, hDAAO, RgDAAO и TvDAAO, которые описаны в работе [2]. В таблице 2.2 представлены общие свойства этих четырех ферментов [2,6,11,36,62–64]. Некоторые общие характеристики свойственны всем DAAO, независимо от источника, из которого выделен фермент. Например, каждая субъединица DAAO содержит одну нековалентно связанную молекулу FAD в активном центре (рис. 2.3), что определяет характерный спектр поглощения, присущий всем флавопротеинам, с двумя максимумами в видимой области при 360-380 и 455 нм (поглощает FAD) и одним большим максимумом в ультрафиолетовой области при 272-274 нм (поглощает белок и FAD) (табл. 2.2). Окисленная форма FAD является флуорофором с максимумом испускания на 530 нм.

2.2.1. Каталитические свойства

В настоящее время спектры субстратной специфичности изучены частично или полностью для DAAO из *C.boidini* (CbDAAO) [65], *Carp hepatopancreas* [66], *V.luteoalbum*[67], *F.oxysporum*, *C.parapsilosis* [67], *A.protophormiae* [68] и др. Для рkDAAO, hDAAO, RgDAAO и TvDAAO каталитические свойства подробно изучены различными авторами [11,66,67,69]. В таблице 2.3 суммированы данные по каталитической активности для рkDAAO, hDAAO, RgDAAO и TvDAAO. Для TvDAAO представлено три столбца данных, в первом указаны значения относительной активности, полученные спектрофотометрически с использованием пероксидазы из корней хрена и ее субстрата – *o*-дианизидина [67], во втором – при электрохимической регистрации потребления кислорода [69]. Свойства рекомбинантной TvDAAO были также детально изучены в нашей лаборатории [51,56,57], и полученные нами данные представлены в последнем столбце в таблице 2.3. Для определения активности нами была использована наиболее распространенная методика, основанная на использовании пероксидазы из корней

хрена и ее субстрата ABTS (см. пункт 3.2.14 раздела “Материалы и методы”). Стоит отметить, что результаты, полученные различными авторами для одного и того же фермента, могут отличаться между собой из-за использования различных условий при определении активности (рН, температура, буфер), а также вследствие различной концентрации растворённого кислорода, максимальная величина которой при нормальном давлении, 25°C и рН 8,0 составляет 0,25 мМ, в то время как значение K_M по кислороду для TvDAAO равно 0,8 мМ [2]. В целом можно отметить, что DAAO из микроорганизмов проявляют высокую активность с незаряженными и гидрофобными субстратами, например, с D-Ala, D-Val, D-Met и D-Trp, что, по-видимому, связано с использованием этих аминокислот в качестве одного из основных источников углерода, азота и энергии различными микроорганизмами [67]. Для DAAO из млекопитающих стоит отметить высокую активность с D-Pro, а также некоторую активность с D-Ala и D-Ser, играющих важную физиологическую роль.

Описанные отличия в субстратной специфичности DAAO из различных организмов могут быть объяснены тем, что в первичной структуре DAAO не наблюдается высокой гомологии в областях, соответствующих субстрат-связывающему домену (см. пункт 2.1.2), что обеспечивает разнообразие каталитических свойств, которые вероятнее всего обусловлены физиологическими функциями DAAO в каждом конкретном организме. Однако стоит отметить, что в самом каталитическом центре большинства DAAO имеются несколько высококонсервативных остатков в районе 189-202, 299-312 и 326-341 (нумерация TvDAAO), например, Arg302 и Tyr326.

Таблица 2.3

Субстратная специфичность оксидаз D-аминокислот из различных источников*.

Субстрат	pkDAAO [67]	hDAAO [11,70]	RgDAAO [67]	TvDAAO [67]	TvDAAO [69]	TvDAAO [51,56,57]
D-Ala	40	35	71	97	32	100
D-Val	28	н.д.**	95	100	39	79
D-Leu	21	н.д.	57	32	30-40	27
D-Ile	35	н.д.	56	76	30-40	н.д.
D-Met	75	н.д.	100	78	100	74
D-Pro	100	69	57	25	2	1
D-Phe	84	45	79	36	80	25
D-Trp	2	22	56	38	100	39
D-Ser	18	20	41	22	2	19
D-Thr	2	н.д.	10	4	30-40	2
D-Tyr	4	100	26	17	н.д.	21
D-Cys	н.д.	н.д.	1	н.д.	0	н.д.
D-Asn	н.д.	н.д.	40	65	70	57
D-Gln	1	н.д.	53	81	н.д.	н.д.
D-Lys	2	н.д.	5	17	н.д.	3
D-Arg	4	н.д.	2	43	30-40	н.д.
D-His	3	н.д.	58	88	88	н.д.
D-Asp	1	45	н.д.	4	0	0
D-Glu	н.д.	н.д.	4	9	<6	0
Gly	н.д.	6	3	н.д.	н.д.	0

* - Приведены относительные значения активности, ** н.д. – нет данных

В заключении хочется отметить, что наибольшую активность с важным биотехнологическим субстратом цефалоспорином *C* проявляют RgDAAO ($K_M=4,0\pm 0,5$ мМ, $k_{cat}=73\pm 7$ с⁻¹) и TvDAAO ($K_M=2,4\pm 0,4$ мМ, $k_{cat}=72\pm 8$ с⁻¹), что объясняет повышенный интерес к этим ферментам с точки зрения создания эффективных биокатализаторов для окисления цефалоспорина *C*. В то же время ферменты из млекопитающих намного менее активны с цефалоспорином *C*, например, значение k_{cat} для pkDAAO с этим субстратом составляет всего 0,65 с⁻¹ [71].

2.2.2. Температурная стабильность

Как было отмечено выше, DAAO из термофильных микроорганизмов до сих пор не выделены и не изучены. Среди всех изученных DAAO на данный момент наиболее стабильным ферментом является TvDAAO – при 45°C сохраняет 100% активность при инкубации в течение 30 минут. Термоинактивация RgDAAO наблюдается уже при температурах выше 30°C – за 30 минут при 45 °C фермент инактивирует полностью. Значения T_m (температура, при которой теряется 50% исходной активности после 30 минутной инкубации) для исследованных препаратов pkDAAO, RgDAAO и TvDAAO составили 39°C, 44°C и 54°C соответственно (pH 8,0) [71]. ApDAAO и CbDAAO по термостабильности очень схожи с RgDAAO. Так при температурах > 30 °C ферменты начинают инактивироваться, а при 50 °C полностью теряют активность за 30 минут [65,68]. Для ApDAAO период полуинактивации при pH 7,6 и 40 °C составляет всего 21 мин [68], а для CbDAAO T_m составляет 37°C [65]. При умеренных температурах DAAO может подвергаться инактивации пероксидом водорода, который образуется в результате катализируемой ферментом реакции. При 2х часовой инкубации фермента в 100 мМ пероксиде водорода наблюдается частичная инактивация [50]. В случае TvDAAO причиной может служить окисление остатков Cys108, Cys298, Met156, Met209, Met226 и др [58–60].

Стоит отметить, что концентрация ферментов влияет на их стабильность. Было показано, что при низких концентрациях RgDAAO (10-20 мкг/мл) такое влияние практически отсутствует, но наблюдается при концентрациях 0,1÷3,5 мг/мл [71]. Это выражается в значительном увеличении температуры T_m с 48 при 0,1 мг/мл до 57°C при 3,5 мг/мл [50]. Другими авторами было показано, что снижение концентрации RgDAAO всего в три раза (с 0,15 до 0,05 мг/мл) приводит к уменьшению периода полуинактивации с 8 часов до 45 мин [75]. Эти данные указывают на то, что первым этапом процесса термоинактивации RgDAAO может являться диссоциация фермента на отдельные субъединицы. В случае pkDAAO зависимости термостабильности от концентрации не наблюдается, поскольку инактивация мономерной pkDAAO и димерных RgDAAO и TvDAAO,

по-видимому, протекает в соответствии с различными механизмами. Интересной является работа по переводу RgDAAO в мономерное состояние [48]. В результате стабильность фермента сильно снизилась - T_m уменьшилась на 6 градусов и перестало зависеть от концентрации фермента в диапазоне 0,1 – 3,5 мг/мл [50].

Стоит отметить, что при добавлении экзогенного FAD происходит стабилизация RgDAAO и TvDAAO при температурах $> 40^\circ\text{C}$ [35,71]. При 50°C период полуинактивации рекомбинантной TvDAAO увеличивается практически в 2 раза при добавлении 100 мкМ экзогенного FAD (10-кратный избыток) к 10 мкМ раствору фермента [35]. Данный феномен указывает на то, что диссоциация FAD из активного центра DAAO является одной из причин потери активности при повышенных температурах. Необходимо подчеркнуть, что приводимые авторами в работе [35] зависимости остаточной активности от времени для рекомбинантной TvDAAO некорректно описываются простой экспоненциальной функцией.

В нашей лаборатории была подробно изучена стабильность рекомбинантной TvDAAO [76]. Стабильность TvDAAO при температурах 4°C , 25°C и $50\text{-}60^\circ\text{C}$ зависит от начальной концентрации фермента, а также фермент теряет около 5-7% активности при каждой заморозке-разморозке. Природа буфера незначительно влияет на стабильность TvDAAO, однако фермент наиболее стабилен в диапазоне $\text{pH} = 7.0\div 8.0$. Период полуинактивации TvDAAO при 54°C составляет 38 минут.

2.2.3. Механизм термоинактивации

Подробное изучение кинетики и механизма термоинактивации TvDAAO является важным условием для выработки стратегии повышения температурной стабильности этого фермента с помощью рационального дизайна. Данные о температурной стабильности TvDAAO, описанные в литературе, являются весьма противоречивыми. Это в первую очередь связано с тем, что скорость термоинактивации зависит от начальной концентрации фермента. Наиболее подробное изучение механизма термоинактивации TvDAAO было проведено в работе [35] при 50°C . Для сравнения использовали модификацию TvDAAO, в которой остаток Cys108 окислен до сульфоновой кислоты. Авторами было

показано, что зависимости остаточной активности хорошо описываются моноэкспоненциальными функциями, однако стабильность ферментов повышается с увеличением их начальной концентрации. Авторы изучили процесс агрегации, влияние экзогенного FAD на стабильность TvDAAO, а также кинетику выделения FAD в процессе инактивации TvDAAO. В результате была предложена кинетическая схема, которая включает три параллельно протекающих процесса – первый из них заключается в обратимой диссоциации кофактора FAD с последующей необратимой агрегацией, второй представляет собой необратимое разворачивание белковой глобулы. Кроме того, возможен третий процесс – окисление остатка Cys108 у нативной TvDAAO, однако он не вносит большого вклада в общую скорость инактивации фермента при 50°C. Авторы отмечают, что главной причиной инактивации TvDAAO является обратимая диссоциация кофактора с последующей необратимой агрегацией. Стоит отметить, что в данной работе были использованы достаточно высокие начальные концентрации ферментов 1, 10 и 20 мкМ, что соответствует 40 мкг/мл, 0,4 мг/мл и 0,8 мг/мл. При самой низкой концентрации нативной и окисленной TvDAAO экспериментальные зависимости плохо описываются простой экспоненциальной функцией. Кроме того, процесс инактивации изучался в 10мМ Трис-НСl рН 7.5 буфере, для которого значение рН сильно зависит от температуры. Также авторы не учитывают возможность изменения активности TvDAAO при различных концентрациях за счет образования олигомерных форм. Кроме того, предложенная модель процесса инактивации плохо описывает данные концентрационной зависимости термоинактивации TvDAAO.

В нашей лаборатории также было проведено подробное изучение механизма термоинактивации рекомбинантной TvDAAO при повышенных температурах в диапазоне 50-60°C и различных начальных концентрациях фермента от 8 до 40 мкг/мл [76]. Кроме того, механизм термоинактивации был изучен для ряда мутантных форм TvDAAO [56,57]. Было показано, что зависимости остаточной активности от времени корректно описываются суммой двух экспоненциальных функций, что было подтверждено с помощью критерия Фишера. Это

свидетельствует о протекании процесса инактивации фермента по крайней мере в две стадии. В результате экспериментов было найдено две особенности процесса термоинактивации TvDAAO:

1. Зависимости остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах при различных температурах и концентрациях фермента имели характерные изломы (т.е. два линейных участка).

2. При фиксированной температуре скорость термоинактивации на ранней стадии процесса (первый линейный участок) не зависит от начальной концентрации, а при более глубокой степени инактивации скорость процесса уменьшается при увеличении начальной концентрации фермента.

Помимо этого, эксперименты показали, что на начальном линейном участке происходит полное восстановление активности фермента после прекращения инкубации, что говорит об обратимости процесса термоинактивации при кратковременной термообработке. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что процесс термоинактивации рекомбинантной TvDAAO, а также ряда ее мутантных форм, протекает по двухстадийному диссоциативному механизму (схема 1.1), который был описан в работах О.М. Полторака для ряда других олигомерных белков [77–79]. Математическое описание данного механизма приведено в пункте 3.2.17 раздела “Материалы и Методы”. Диссоциативный механизм термоинактивации, как правило, наблюдается в узком температурном диапазоне, поскольку константа скорости диссоциации димера k_1 и константа скорости инактивации мономера k_2 по-разному зависят от температуры. В случае TvDAAO при температуре выше 60°C стадия диссоциации димера на мономеры протекает очень быстро, и скорость-лимитирующей оказывается стадия инактивации мономеров, описываемая кинетикой реакции первого порядка. При температурах ниже 50°C скорость-лимитирующей стадией является диссоциация димерной формы TvDAAO. В диапазоне 50-60°C константы обеих стадий сравнимы между собой, что приводит к реализации диссоциативного механизма и появлению биекспоненциальных зависимостей остаточной активности от времени.

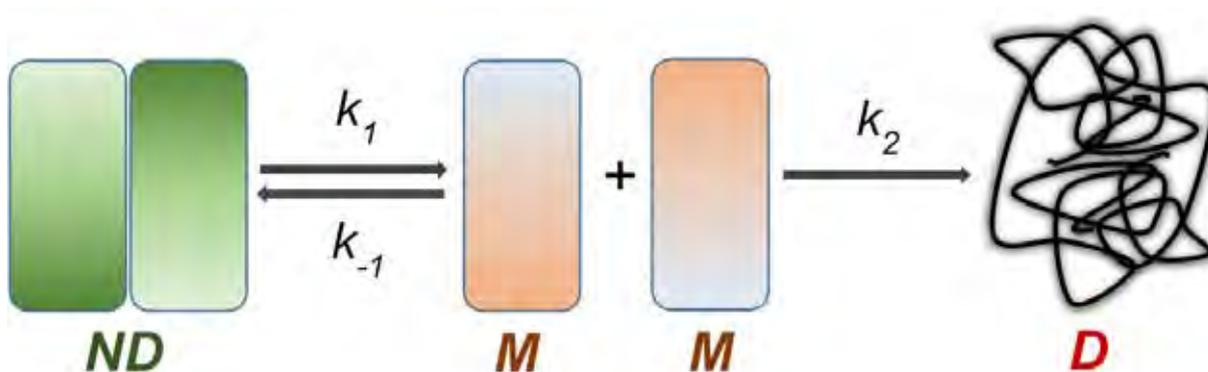


Схема 2.1. Механизм термоинактивации TvDAAO. ND – активный нативный димер, М – неактивный мономер, D – денатурированный мономер, k_1 и k_{-1} – константы скорости диссоциации димера и ассоциации мономеров соответственно ($K_{\text{dis}} = k_1/k_{-1}$ – константа равновесия процесса диссоциации фермента), k_2 – константа скорости инактивации мономеров.

Стоит отметить, что при высоких концентрациях TvDAAO (выше 100 мкг/мл) в начальный момент времени происходит активация фермента, что указывает на более сложный механизм термоинактивации вследствие образования ассоциатов TvDAAO более высоких порядков, чем димер. Наличие форм фермента с более высокой степенью олигомеризации было показано с помощью седиментационного анализа [76]. Например, при концентрации 400 мкг/мл TvDAAO существует в виде тетрамеров, которые обладают более низкой активностью в пересчете на одну субъединицу, чем димеры, на что указывает нелинейный характер зависимости активности от концентрации TvDAAO. Таким образом, в начальный момент времени происходит диссоциация олигомеров и увеличение концентрации димеров, что и приводит к повышению активности TvDAAO.

2.3. Применение DAAO в биотехнологии

Возможность применения DAAO в различных областях биотехнологии и органического синтеза дало мощный толчок к поиску, клонированию и изучению новых ферментов начиная с 1970-80 гг. С точки зрения биотехнологического применения наиболее перспективными оказались RgDAAO и TvDAAO. В первую очередь это было обусловлено изначально высокой активностью природных ферментов с природным антибиотиком цефалоспорином C. Кроме того, как было отмечено выше, TvDAAO на данный момент является наиболее стабильным ферментом среди изученных DAAO.

2.3.1. Аналитическая биотехнология

Качественное и количественное определение D-аминокислот в биологических образцах имеет большое значение для медицины, химической и пищевой промышленности. Например, D-аминокислоты входят в состав пептидогликана клеточной стенки бактерий, их присутствие в пище может говорить о ее бактериальном заражении [80]. Также в ходе производства и хранения пищевых продуктов, природные L-аминокислоты могут превращаться в D-изомеры. В продуктах питания, как правило, содержатся такие D-аминокислоты, как D-Ala, D-Ser, D-Leu, D-Phe, D-Pro, D-Glu, D-Asp, D-Lys и D-Arg. D-аминокислоты содержатся в хлебе, кофе, овощах и фруктах, шоколаде, вине, молочных продуктах. Например, твердые сыры сортов Grana Padano и Parmigiano Reggiano можно отличить друг от друга по содержанию D-Ala, D-Glu и D-Asp [26]. Концентрация D-аминокислот может служить для оценки питательной ценности пищи, поскольку степень рацемизации аминокислот зависит от качества и способа получения продуктов [81]. Таким образом, в пищевой биотехнологии DAAO может быть использована для контроля качества продуктов питания с помощью количественного определения как D-аминокислот, так и отношения изомеров D/(D+L) с использованием LAAO.

Количественное определение D,L-аминокислот в биологических образцах используется в клинической практике с тех пор, как была установлена связь между

некоторыми заболеваниями и нарушением метаболизма аминокислот. Например, содержание D-Ala в сером и белом веществах мозга у пациентов с установленным диагнозом болезни Альцгеймера в 4 раза выше, чем в соответствующих участках мозга здоровых людей [82]. Используя биосенсоры, можно отслеживать уровень D-Ala и других аминокислот в больном и здоровом организме [83,84].

Несмотря на то, что традиционные аналитические способы количественного определения D-аминокислот (газовая или обращено-фазовая жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез и т.д.) являются надежными, воспроизводимыми и чувствительными методами анализа, они также являются время-затратными, трудоемкими и дорогими, в следствии чего не подходят для детекции в режиме реального времени [85]. Для этих целей в начале 1990-х годов было разработано несколько биосенсоров, основанных на DAAO [86]. Как правило, такие сенсоры содержат второй фермент, например, пероксидазу хрена, что позволяет проводить детектирование продукта сопряженной ферментативной реакции. В начале 2000-х появились биосенсоры, содержащие pkDAAO и LAAO, служащие для определения соотношения D-аминокислот/L-аминокислот [87]. Позже стали появляться амперометрические биосенсоры на основе DAAO для определения клинически значимых веществ, таких как D-тироксин и D-пипеколиновая кислота (маркер цирроза печени и хронической печеночной энцефалопатии) [88]. Кроме того, биосенсоры на основе DAAO можно использовать и для анализа оптической чистоты медицинских препаратов, например, D,L-картинина и D,L-метотрексата [89,90]. Еще одним примером может служить определение R-периндоприла, также известного как «Коверзил». Это вещество является ингибитором ангиотензин-превращающего фермента длительного действия и в основном используется при лечении гипертонии и сердечной недостаточности. Для определения этого вещества на основе DAAO был создан амперометрический биосенсор, имеющий предел обнаружения R-периндоприла ~ 10 нМ [91].

Биосенсоры, созданные на основе коммерчески доступной pkDAAO, как правило, имеют низкую стабильность [92], невысокую каталитическую

активность, полное отсутствие реакции с такими D-аминокислотами, как D-Asp и D-Glu. Как следствие, такие биосенсоры показывают плохое воспроизведение и достаточно высокий предел обнаружения (10^{-4} - 10^{-5} М) и, таким образом, не подходят для определения, например, уровня D-Ser у человека, поскольку его концентрация составляет $<10^{-6}$ М. Первые два недостатка были устранены при использовании дрожжевых RgDAAO [93]. Несколько позже остальных DAAO, для определения общих количеств D-аминокислот была использована TvDAAO. На ее основе был сконструирован кислород-независимый электрод с использованием 2,6-дихлороиндофенола в качестве искусственного акцептора электронов [94]. В результате дрожжевые DAAO успешно заменили рkDAAO в биосенсорах. Этому также способствовало создание высокоэффективных систем экспрессии данных ферментов как в клетках *E.coli* [95–97], так и в клетках *Pichia pastoris* [58], *Schizosaccharomyces pombe* [98] и др. В результате первый биосенсор для определения D-Ser в тканях был создан в 2008 году [99]. В настоящее время удалось добиться улучшения многих характеристик биосенсоров на основе DAAO (например, существенное уменьшение времени ответа) для их успешного применения при определении концентрации D-Ser в тканях [26,100,101]. Кроме того, в последнее время создаются все больше биосенсоров на основе DAAO для различных целей. В 2013 году были сконструированы биосенсоры для определения очень низких концентраций D-аминокислот в физиологических жидкостях человека [102], а также амперометрический биосенсор, который успешно использовали для измерения содержания D-аминокислот во фруктовых соках [103]. Стоит отметить, что для создания биосенсоров свойства природных ферментов могут быть оптимизированы с помощью белковой инженерии (см. главу 2.4) [58,104]. Например, была получена мутантная RgDAAO M213R, которая обладала активностью с D-Glu и D-Asp (см. пункт 2.4.3). Однако ее активность с нейтральными аминокислотами сильно уменьшилась, а с положительно заряженными субстратами пропала вовсе [54]. Этот мутантный фермент был использован для количественного определения нейтральных и отрицательно заряженных D-аминокислот в сыре «Пармезан» и розовом вине. Однако ни

RgDAAO, ни RgDAAO M213R не подходят для определения общей концентрации D-аминокислот. Для этих целей методом направленной эволюцией были получены две мутантные RgDAAO K118H и RgDAAO T60A/Q144R/K152E, обладающие высокой активностью со всеми D-аминокислотами [105].

Стоит упомянуть, что для применения в аналитических целях было предложено использование апоформы DAAO [3]. Апоформа DAAO может быть использована для определения количества различных гидролитических ферментов, например, щелочной фосфатазы. Основа метода заключается в том, что некоторые такие ферменты могут гидролизовать искусственные субстраты (простетогены) с образованием простетических групп других ферментов. Таким образом, образующийся кофактор связывается с апоферментом и возникает ферментативная активность, которую можно зафиксировать. Например, щелочная фосфатаза может гидролизовать флавинаденидинуклеотид фосфат (FADP) с образованием FAD, в свою очередь FAD связывается с апоформой DAAO с образованием холофермента, в результате чего с D-аминокислотами появляется активность DAAO, которую можно зафиксировать с помощью сопряженной реакции пероксидазы хрена с ABTS. Также можно использовать апоферменты глюкозооксидазы, оксидазы L-аминокислот, ксантиноксидазы и т.д., но апо-TvDAAO лучше всего подходит для таких целей из-за достаточно высокой стабильности. Стоит отметить, что простетоген FADP практически не проявляет активности как кофактор, что исключает возникновение фонового сигнала при проведении анализа, и не мешает образованию холофермента из FAD и апофермента. Описанный подход может применяться в иммуноферментном анализе, например, при использовании конъюгатов щелочная фосфатаза–стриптовидин. Также было предложено определение одноцепочечных молекул ДНК [3].

2.3.2. Тонкий органический синтез

Дрожжевые DAAO используется в синтезе α -кетокислот из соответствующих D-аминокислот и получении природных и неприродных L-аминокислот из соответствующих рацемических смесей [3,4]. Неприродные

L-аминокислоты и α -кетокислоты широко используются в качестве предшественников при получении разнообразных лекарственных препаратов [106,107]. L-аминокислоты также применяются в качестве пищевых добавок и компонентов инфузионных растворов [55]. DAAO в комбинации с каталазой и ω -трансаминазой применяется для получения оптически чистого L-Ala из рацемической смеси. L-аланин является ключевым хиральным интермедиатом при получении таких лекарств как бриварацетам и леветирацетам (противоэпилептические средства) [108]. Для данных целей широко используются дрожжевые TvDAAO и RgDAAO [3,4,58]. Также описана четырехферментная система из ApDAAO, каталазы, L-фенилаланин дегидрогеназы, формиат дегидрогеназы для полной конверсии рацемической смеси D,L-метионина в L-изомер [109]. Неприродные нафтил-аминокислоты являются исходными веществами для получения различных лекарственных препаратов [55]. Например, L-2-нафтилаланин входит в состав лекарственного пептида Нафарелина (NafarelinTM) [110]. Был разработан метод синтеза L-2-нафтилаланина, в котором используется трехферментная система из RgDAAO, L-аспартатаминотрансферазы и каталазы для полной конверсии рацемической смеси D,L-2-нафтилаланина в L-изомер с выходом до 98% и оптической чистотой порядка 99,5% [111]. Другим важным соединением, получаемым при участии DAAO, является 4-метилтио-2-оксомасляная кислота (МТОМК). Поскольку МТОМК является метаболическим предшественником метионаля – сильного индуктора апоптоза, то данное соединение используется в качестве антиракового средства. Наиболее простым способом получения МТОМК является ферментативное окисление D-метионина с помощью DAAO. В работе [112] был предложен эффективный и экономичный метод получения МТОМК из рацемической смеси D,L-метионина со степенью превращения D-метионина около 98%. Таким образом, в зависимости от поставленной задачи, может быть подобрана соответствующая ферментативная система для получения оптически чистой L-аминокислоты из смеси D,L-изомеров. Стоит отметить, что могут быть получены оптически чистые D-аминокислоты из

рацематов в аналогичных ферментативных системах с использованием оксидазы L-аминокислот (LAAO) [58].

Наиболее крупномасштабным процессом с использованием DAAO является ферментативное превращение цефалоспорина *C* в 7-аминоцефалоспоровую кислоту (7-АЦК). Данный процесс является очень важным, поскольку из 7-АЦК производится более 50% полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков различных поколений. На данный момент рынок цефалоспориновых антибиотиков оценивается более чем в 10 миллиардов долларов США в год [113]. Существует неферментативный метод получения 7-АЦК, который заключается в гидролизе цефалоспорина *C* в органических растворителях с использованием токсичных реагентов [114,115]. Использование химического процесса имеет большое количество недостатков: сложность и дороговизна очистки продуктов, использование токсичных реагентов (N,N-диметиланилин), высокоэнергетические затраты (из-за низкой температуры процесса (-40°C), органические растворители, малые выходы целевого продукта (<63%) и большое количество побочных продуктов. Биокаталитический процесс, напротив, не имеет вышеперечисленных недостатков, однако стоимость разработки биокатализатора высока и трудоемка. В связи с постоянным ростом объема производства все больше применяется ферментативное получение 7-АЦК. Однако на данный момент биферментативный процесс, в котором участвуют DAAO и глутарилгидролаза (рис. 2.6) используется для получения около 10% от общей массы производимой 7-АЦК. В промышленности для этой цели в основном используются RgDAAO и TvDAAO, поскольку они обладают наилучшими каталитическими свойствами с цефалоспорином *C* среди изученных оксидаз D-аминокислот. На первой стадии процесса DAAO катализирует окислительное дезаминирование цефалоспорина *C* с образованием α -кетoadипил-7-аминоцефалоспоровой кислоты (кетoadипил-7-АЦК), которая, под действием образовавшегося пероксида водорода на первой стадии, неферментативно декарбоксилируется в 7- β -(4-карбокси-бутанамидо)цефалоспоровую кислоту (глутарил-7-АЦК). Затем глутарил-7-АЦК ацилаза гидролизует глутарил-7-АЦК, в результате чего образуется целевой продукт –

7-аминоцефалоспоровая кислота (7-АЦК) [116]. Для снижения стоимости данного процесса осуществляются попытки разработки прямой конверсии цефалоспорина *C* в 7-АСА, что может быть реализовано, например, одновременным использованием DAAO и глутарилацилазы [117,118]. Окислительное дезаминирование цефалоспорина *C* под действием DAAO проводят при pH 7,0-8,0 и температуре 20-30°C. Поскольку в реакции потребляется кислород, требуется постоянная его подача в реакционную смесь. Другой проблемой, связанной с использованием DAAO, является загрязнение природного фермента каталазой и эстеразой. Каталаза за счет гидролиза пероксида водорода препятствуют протеканию некаталитического декарбоксилирования КА-7-АЦК, а эстеразы неспецифически разрушают сам цефалоспорин *C*. Проблема легко решается экспрессией DAAO в рекомбинантных штаммах *E.coli*, в которых эстеразы, разрушающие цефалоспорин *C*, отсутствуют, а каталаза очень нестабильна и инактивируется в процессе выделения DAAO. Это было достигнуто путем создания рекомбинантных штаммов *E.coli*, одновременно экспрессирующих гены DAAO и глутарилацилазы [117,119]. Основным ограничением такого подхода является инактивация используемых ферментов образующимся пероксидом водорода. Поэтому была предложена трехферментная система – DAAO, глутарилацилаза и каталаза [120]. Основной недостаток заключается в том, что скорость гидролиза глутарил-7-АЦК ацилазой значительно ниже, чем скорость окисления цефалоспорина *C* оксидазой D-аминокислот. Но при длительном проведении реакции (180 минут), выход 7-АЦК составляет 80%, а не гидролизованной глутарил-7-АЦК остается всего 2,5%. Альтернативный способ получения 7-АЦК в одной системе основан на использовании DAAO в пермеабелизованных клетках *S.pastoris* и иммобилизованной глутарилацилазы. Однако целые клетки *S.pastoris* содержат большие количества каталазы и эстеразы, что может приводить к побочным продуктам. Поэтому перед использованием в процессе получения 7-АЦК эти два фермента инактивируют щелочами или термообработкой [121].

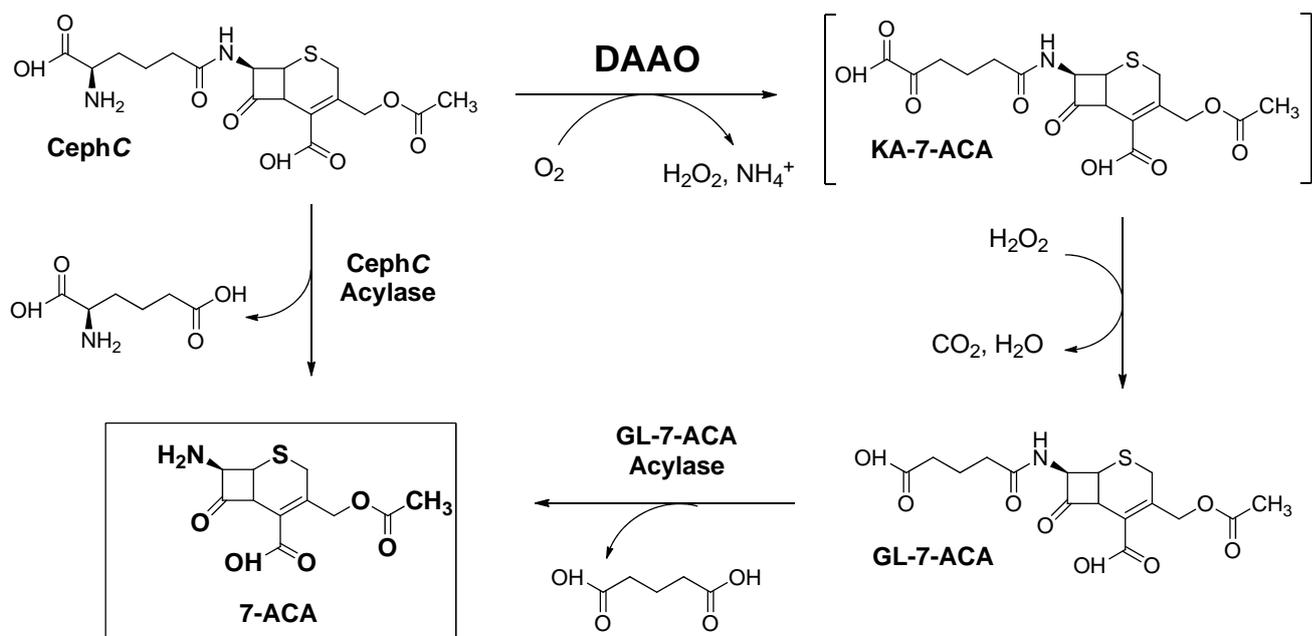


Рис. 2.6. Получение 7-аминоцефалоспориновой кислоты (7-АЦК) в две стадии с помощью биферментной системы оксидаза D-аминокислот (DAAO) – глутарил ацилаза (GL-7-ACA Acylase) (правая часть схемы) и в одну стадию с использованием цефалоспорин C ацилазы (CephC Acylase) (левая часть схемы).

Стоит отметить, что в настоящее время предпринимаются попытки получения цефалоспорин C ацилазы с помощью рационального дизайна и метода направленной эволюции на основе существующей глутарилацилазы [122]. Этот подход может быть использован для одноферментного промышленного получения 7-АЦК (рис. 2.6.) [123], однако все полученные мутантные формы фермента обладают слишком низкой активностью к цефалоспорину C, чтобы вытеснить существующие ферментативные способы получения 7-АЦК

2.3.3. *Терапия различных заболеваний*

В конце 90-годов было установлено, что введение растворов D-аминокислот в организм человека с раковой опухолью замедляет рост раковых клеток. Было высказано предположение, что есть связь между активностью DAAO и развитием рака [124]. Позже исследования на крысах показали, что в раковых клетках активность DAAO является нулевой [125]. Это послужило толчком для изучения возможности применения DAAO в качестве антиракового средства. Было проведено исследование, в котором мутантную RgDAAO с удаленным сигнальным пептидом, отвечающим за транспорт в пероксисомы, экспрессировали в клетках 9L глиомы у мыши [126]. В результате экспрессии DAAO в цитоплазме, происходило

окисление D-Ala с образованием цитотоксичного пероксида водорода. Следует отметить, что пероксид водорода являлся токсичным как для делящихся клеток, так и для находящихся в покое, потому что значительная часть клеток внутри опухоли может находиться именно в состоянии покоя. Антираковое действие DAAO было позже подтверждено при использовании рkDAAO, иммобилизованной на полиэтиленгликоле (ПЭГ-рkDAAO) [127]. Такого рода конъюгат показывал хорошие фармакокинетические параметры и селективно накапливался в раковых клетках крыс. Недавно были созданы наночастицы на основе дрожевой DAAO, состоящие из Fe₃O₄-3-амино-пропилтриэтоксисилан-DAAO для лечения раковых клеток [128]. Важно, что в здоровых органах конъюгаты DAAO не накапливаются, и содержание продуктов окислительного метаболизма не изменяется. Одним из возможных объяснений может быть более высокий уровень метаболизма раковых клеток по сравнению с нормальными, благодаря чему они более активно захватывают различные соединения из своего окружения. При введении через некоторое время в организм крысы D-пролина наблюдалось подавление роста раковых клеток. В первую очередь это связано с увеличением концентрации пероксида водорода в клетках опухоли. Важно, что в здоровых органах DAAO не накапливалась, и содержание продуктов окислительного метаболизма не изменялось. Интересным является тот факт, что раковые клетки человеческой карциомы толстой кишки, сначала обработанные конъюгатом ПЭГ-протопорфирин цинка (это вещество является потенциальным ингибитором гем оксигеназы I, которая защищает раковые клетки от окислительного стресса), были более чувствительны к воздействию цитотоксичных веществ [129]. Таким образом, DAAO в том или ином виде может быть использована в терапии рака, заменив применение химиотерапии, которая является вредной для всего организма, на местную терапию, относительно безвредную для всего организма в целом.

Как отмечалось выше, DAAO играет важную роль в нервной деятельности, регулируя концентрацию D-аминокислот, особенно D-серина. Было показано, что нарушения в функции hDAAO сопряжено с различными заболеваниями. Так при шизофрении наблюдается снижение уровня D-серина в сыворотке крови и в

спинномозговой жидкости по сравнению со здоровыми людьми [130], что связано с повышением активности и уровня экспрессии hDAAO [131]. Использование D-серина и D-аланина в качестве добавок к антипсихотическим препаратам в результате привело к улучшению состояния больных шизофренией [132,133]. Было выдвинуто предположение, что введение D-серина вместе с эффективными ингибиторами hDAAO [134] может увеличить эффективность доставки D-серина в мозг, что может привести к ослаблению симптомов шизофрении. В связи с этим в последнее время идут активные исследования по поиску новых высокоэффективных ингибиторов hDAAO [135]. При другом нейродегенеративном заболевании – ишемии, наоборот, нейронные повреждения в основном вызваны сильной стимуляцией NMDA-рецепторов, поскольку поврежденные клетки выделяют D-серин. На крысах было показано, что экзогенная DAAO может предотвратить подобные повреждения и развитие болезни [22]. Стоит отметить, что DAAO может использоваться для терапии заболеваний, не связанных с поражением нервной системы. Например, недавно было показано, что DAAO может играть важную роль в антибактериальной системе у млекопитающих, например, фермент подавляет рост бактериальных клеток *Staphylococcus aureus* и развитие инфекции [136].

В заключение стоит подчеркнуть, что использование DAAO в терапии рака и нейродегенеративных заболеваний имеет определенные ограничения, поскольку этот фермент участвует в регуляции уровня различных D-аминокислот, которые, в свою очередь, могут участвовать в регуляции совершенно разных процессов в организме. Одним из возможных решений проблемы является использование тканеспецифичной генотерапии. Этот подход заключается в образовании мутантной DAAO с необходимым профилем субстратной специфичности в строго определенных тканях. В этом случае, при неизменном уровне биосинтеза фермента, появляется возможность селективного влияния на уровень только одной определенной D-аминокислоты. Реализация подобного подхода является важной задачей, которую необходимо решить в ближайшее время с помощью методов белковой инженерии.

2.3.4. Трансгенные растения

Наибольший вклад биотехнологии в сельское хозяйство связан с развитием трансгенных зерновых культур. Обычно трансгенные растения получают, комбинируя интересующий ген с геном, который определяет какой-либо полезный признак, например, обеспечивает устойчивость к определенному гербициду. В последние годы, общественный взгляд относительно опасного горизонтального переноса генов устойчивости в окружающую среду стал толчком для изучения альтернативных селекционных систем; одна из наиболее интересных основана на каталитических свойствах DAAO. Растения обладают ограниченной способностью к метаболизму D-аминокислот: они быстро усваивают D-аминокислоты из окружающей среды, но клетки растений не обладают эндогенной активностью DAAO, что замедляет рост [7]. Была создана трансгенная *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующая RgDAAO. В результате такие растения превращают некоторые D-аминокислоты в безвредные α -кетокислоты, что приводит к их росту [90]. Поскольку природное содержание D-аминокислот невелико, гетерологическая экспрессия DAAO не приводит к аномалиям в развитии растений, что было подтверждено при экспрессии TvDAAO в рисе [137]. Так экспрессия DAAO в растениях может быть использована для их селекции. При выращивании такого растения на среде с D-аланином, оно будет расти быстрее, чем остальные. Например, на среде с D-серином были выращены трансгенные листья яблони *Malus domestica*, в которых экспрессируется RgDAAO [58]. С другой стороны, обработка растений, в которых экспрессируется ген *daao*, D-лейцином или D-валином приводит к их гибели, поскольку сами по себе эти D-аминокислоты нетоксичны, а продукты их окислительного дезаминирования ядовиты [138]. RgDAAO вместе с L-глутамат аминотрансферазой использовалась для получения пыльцы одного пола *Nicotiana tabacum* [139]. Глицин оксидаза из *Bacillus subtilis* используется для получения трансгенных растений с устойчивостью к различным гербицидам, таким как N-глицинфосфат (дешевый и низкотоксичный для животных) [137,139,140], поскольку глицин оксидаза окисляет этот субстрат в неядовитый продукт.

В заключении данной главы хочется отметить, что свойства природных ферментов далеко не всегда являются оптимальными для многих биотехнологических процессов и требуют оптимизации. В этом случае DAAO не является исключением и одним из ограничений ее применения в биотехнологии является недостаточно высокая стабильность и каталитическая активность с промышленно-важными субстратами. Вторым основным препятствием использования DAAO является дороговизна биокатализаторов, полученных на ее основе. Таким образом, для замены химических производств на биокаталитические, свойства природных DAAO должны быть оптимизированы под цели и задачи конкретного биотехнологического процесса. Кроме того, в связи с быстрым развитием промышленности и сложностью оптимизации процессов получения ферментов и биокатализаторов, а также непосредственно процессов производства, в последнее время наблюдается тенденция к разработке биокатализаторов, которые могут применяться сразу в нескольких различных биотехнологических процессах [58]. Свойства природных DAAO могут быть изменены и оптимизированы с помощью методов белковой инженерии, результаты применения которых будут обсуждаться в следующей главе.

2.4 Белковая инженерия DAAO

Современные методы генетической инженерии вместе с постоянно расширяющимися знаниями о взаимосвязи структуры и функции DAAO позволяют получать мутантные формы фермента с требуемыми свойствами для каждой конкретной биотехнологической задачи – биосенсоры, катализ, медицина, сельское хозяйство и т.д. Причем это не ограничивает использование DAAO только промышленными процессами, а дает исследователям возможность поиска новых перспективных областей ее применения. Работы по белковой инженерии DAAO направлены как на получение ферментов с заданными свойствами, так и на изучение функции тех или иных аминокислотных остатков. Можно с уверенностью сказать, что наибольшее количество работ по изучению взаимосвязи структуры и функции и направленному изменению свойств природных ферментов сделано для RgDAAO. В первую очередь это объясняется тем, что дрожжевая RgDAAO является промышленно-важным ферментом, и ее структура была установлена сравнительно давно (см. пункт 2.1.3). Значительно меньше изучены рkDAAO и TvDAAO. Если рkDAAO представляла в основном теоретический интерес и не являлась перспективной для применения на практике (последняя работа по белковой инженерии датирована 2006 годом), то TvDAAO является очень перспективным ферментом для целей биотехнологии. Небольшое количество работ по мутагенезу TvDAAO, главным образом, объясняется тем, что для этого фермента долгое время отсутствовала трехмерная структура. В результате, различным авторам для работ по направленному мутагенезу приходилось использовать модельные структуры TvDAAO, полученные с помощью компьютерного моделирования на основе рентгеноструктурных данных для рkDAAO и RgDAAO. Однако данные модели не являлись достаточно точными вследствие низкой гомологии между TvDAAO и RgDAAO (или рkDAAO). Ситуация изменилась, когда в 2008 году в нашей лаборатории была решена трехмерная структура TvDAAO [4]. Это дало начало систематическим структурно-функциональным исследованиям TvDAAO.

В данной главе будут рассмотрены основные достижения в области белковой инженерии *pkDAAO*, *hDAAO*, *RgDAAO* и *TvDAAO*, которые систематизированы в таблице 2.4а-г.

2.4.1. Белковая инженерия DAAO из *Sus crofa* (*pkDAAO*)

Первые работы по белковой инженерии DAAO были начаты с *pkDAAO* в 1991 году группой ученых из Японии [141], еще до того, как была установлена первая трехмерная структура этого фермента в 1996 году [31,32]. Было показано, что ряд остатков в структуре *pkDAAO* может подвергаться химической модификации с помощью различных реагентов. Например, остатки Tyr228 и His307 модифицируются D-пропаргилглицином, что приводит к значительной потере активности фермента. Для изучения роли данных остатков в катализе и свойствах *pkDAAO* были получены мутанты с заменами Y228F и H307L. В результате оба мутантных фермента проявляли более низкую каталитическую активность по сравнению с диким типом, в случае замены Y228F наблюдался значительный рост K_M (в 70 раз), а для H307L – рост константы диссоциации FAD (в 28 раз). По-видимому, обе замены вызывают конформационные изменения в структуре фермента, влияющие на его каталитические свойства, однако роль данных остатков не была до конца выяснена. Несколько позже в работе [142] был исследован кинетический механизм *pkDAAO* с помощью направленного мутагенеза остатков Tyr224 и Tyr228 на остаток фенилаланина. Мутантные ферменты имели спектральные характеристики такие же, как фермент дикого типа. Каталитическая активность мутанта с заменой Y224F с различными субстратами была близка к таковой для дикого типа, тогда как мутант Y228F в среднем имел более высокие значения K_M и более низкую каталитическую активность. Оба остатка находятся вблизи к активному центру *pkDAAO* и играют важную функцию в восстановительной полуреакции. На этом исследование DAAO с помощью направленного мутагенеза было временно прекращено, что, по-видимому, было связано с отсутствием трехмерной структуры DAAO, что существенно осложняло интерпретацию полученных результатов, а также сложность обоснования выбора

положений для введения мутаций и невозможность проведения экспериментов по компьютерному моделированию. В тот период различные группы ученых сконцентрировали свое внимание на экспериментах по кристаллизации DAAO, которые увенчались успехом в 1996 году, когда была закристаллизована ркDAAO и решена ее трехмерная структура двумя независимыми группами исследователей из Японии и Италии (см. пункт 2.1.3) [31,32]. Позже в 2000 году было решено сразу 3 структуры RgDAAO. Эти достижения дали мощный толчок экспериментам по белковой инженерии RgDAAO (см. ниже). После установления структуры ркDAAO вышло всего три работы, поскольку фермент уже не представлял большого практического значения. В 2002 году вышла работа по изучению каталитической роли остатков Gly313 и Thr317. При анализе трехмерной структуры авторы выяснили, что карбонильная группа Gly313 образует водородную связь с аминогруппой субстрата, а гидроксигруппа боковой цепи Thr317 образует водородную связь с карбонильной группой изоаллоксазинового цикла FAD (C(2)=O). Было показано, что Gly313 играет важную роль в молекулярном узнавании – в результате замены G313A сильно увеличилось значение K_M , понизилась каталитическая активность с большинством субстратов (D-Ala, D-Pro, D-Ser, D-Ile, D-Met) и изменился профиль субстратной специфичности. Мутант ркDAAO T317A имел более низкое сродство к FAD, каталитические свойства ухудшились в первую очередь за счет понижения каталитической активности с D-Ala, D-Pro, D-Ser, D-Val, D-Phe. Авторы показали, что Thr317 стабилизирует интермедиат в окислительной полуреакции, способствует диссоциации продукта из активного центра фермента и, таким образом, играет ключевую роль во всем процессе катализа. Стоит отметить, что Gly313 и Thr317 располагаются в активном центре фермента и являются высоконсервативными остатками (рис. 2.2). Все описанные работы, главным образом, относились к изучению роли отдельных остатков в катализе ркDAAO.

В работе [143] было проведено направленное повышение температурной стабильности фермента. Авторы обнаружили, что остатки Phe42 и Asn246 в структуре ркDAAO играют важную роль в стабильности фермента, поскольку

мутанты F42C и N246Y, полученные с помощью неупорядоченного мутагенеза, обладали повышенной температурной стабильностью. В результате в данных положениях был выполнен насыщающий мутагенез и оказалось, что в 42 положении к повышению термостабильности приводит только замена F42C, причем за 60 минут инкубации при 55°C рkDAAO F42C в присутствии 1 мМ FAD сохранял около 80% активности, в то время как дикий тип только 10%. По каталитическим свойствам оба фермента были близки между собой. Замены N246G, N246E, N246F и N246Y обладали практически одинаковой стабильностью и чуть большей, чем для фермента дикого типа, однако все ферменты были в несколько раз менее активные. Механизм стабилизации не был выяснен. Изменение субстратной специфичности рkDAAO было предпринято в работе [144], которой завершаются работы по белковой инженерии этого фермента. Авторами была показана важная роль последовательности Pe215-Asn225 в молекулярном распознавании субстратов. Замена этой последовательности на последовательность Arg216-Gly220 D-аспартат оксидазы человека (hDDO) позволило получить мутант со спектром субстратной специфичности, близким к hDDO, причем мутантный фермент обладал активностью с D-Asp. Кроме того, были получены 5 мутантных форм рkDAAO с заменами E220D/Y224G, R221D/Y224G, G222D/Y224G, I223D/Y224G, Y224D. В результате введения дополнительного отрицательного заряда в короткий участок Glu220-Tyr224 и изменение объема полости удалось значительно повысить каталитическую эффективность рkDAAO с D-Arg в случае первых трех мутантов. Однако все мутанты практически потеряли активность с D-Ala и D-Ser, а также сильно снизилась активность с D-Pro и D-Val. Данная работа представляет собой яркий пример применения метода рационального дизайна для придания природному ферменту новых свойств. Отсутствие дальнейших экспериментов по белковой инженерии рkDAAO, по-видимому, связано с подробным изучением дрожжевой RgDAAO, которая являлась намного более интересным ферментом для целей биотехнологии.

2.4.2. Белковая инженерия DAAO из *Homo sapiens* (hDAAO)

В 2000 году для hDAAO, до установления ее трехмерной структуры, была опубликована статья, в которой авторы описывают получение мутантной формы hDAAO G281C с ковалентно связанным FAD за счет образования связи между Cys281 и 8-метилсульфонил FAD [145]. Положение для мутагенеза было выбрано на основе анализа модельной структуры hDAAO, которая была построена на основе известной структуры pkDAAO. Мутантный фермент с ковалентно связанным FAD имел активность в 4 раза ниже, чем фермент дикого типа, а значение K_M с D-Ala выросло в 13 раз. По-видимому, структура фермента изменяется и становится более жесткой, что вызывает ухудшение каталитических свойств. Несмотря на то, что подвижность FAD сильно ограничена, он остается правильно ориентированным в активном центре hDAAO, что не приводит к значительной потере активности. Данная работа представляет собой единственный пример по белковой инженерии hDAAO и не преследует каких-либо практических целей, а носит сугубо теоретический характер. Подобные результаты могут привести к большему пониманию природы ковалентного связывания FAD различными белками. В настоящее время масса работ, связанных с hDAAO посвящена поиску новых ингибиторов этого фермента с целью создания лекарственных препаратов для лечения различных нейродегенеративных заболеваний (см. пункт 2.1.1 и 2.3.3).

2.4.3. Белковая инженерия DAAO из дрожжей *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO)

К первой работе по белковой инженерии RgDAAO относится удаление трипептида Ser-Lys-Leu на конце аминокислотной последовательности фермента в 1998 году [146]. Авторами было показано, что этот трипептид является сигнальной последовательностью типа I, отвечающей за транспорт фермента в пероксисомы. Существование RgDAAO дикого типа в виде трех изоформ определяется наличием или отсутствием трипептида на С-конце одной или двух субъединиц. Отдельно можно выделить работы по получению химерных ферментов RgDAAO, что было обусловлено практическими нуждами, поскольку в реальных процессах

используют повышенное давление O_2 , в результате чего снижается операционная стабильность иммобилизованной RgDAAO. Так был получен химерный белок VNb-RgDAAO с помощью ковалентной пришивки гемоглобина из *Vitreoscilla* к RgDAAO [147]. Повышение активности в этом случае может быть вызвано двумя причинами: во-первых, гемоглобин повышает локальную концентрацию кислорода, во-вторых, химерный фермент может иметь конформацию, более выгодную для окисления цефалоспоринона C, по сравнению со свободным ферментом. В результате иммобилизованный препарат такого фермента обладал в 3 раза более высокой операционной стабильностью и в 12,5 раз более высокой активностью с цефалоспорином C, чем иммобилизованная RgDAAO дикого типа. Также для RgDAAO был проведен эксперимент по сшиванию двух мономеров дипептидом Tyr-Thr. Связывание двух субъединиц приводит к повышению T_M RgDAAO на $5^\circ C$. Стабильность против инактивации H_2O_2 при этом увеличилась в 2 раза. Каталитическая эффективность с рядом субстратов ухудшилась вследствие повышения значений K_M [148]. В этой же работе было проведено ковалентное сшивание двух субъединиц TvDAAO (см. ниже). Практически все работы по белковой инженерии RgDAAO, после того, как была установлена трехмерная структура этого фермента в 2000 году (см. пункт 2.1.3), разделились на два направления – получение фермента с заданными свойствами для практических целей и исследование роли различных остатков в структуре, катализе и стабильности RgDAAO. Однако оба направления тесно связаны между собой. Одним из наиболее показательных и интересных исследований по инженерии субстратной специфичности RgDAAO является работа [54], в которой была предпринята попытка радикального изменения субстратной специфичности RgDAAO. Уже упоминалось, что DAAO обладают очень низкой активностью или вообще не катализируют окисление D-Asp – для этого существуют D-аспаратоксидазы. Сравнение аминокислотных последовательностей, а также трехмерной структуры RgDAAO и модельной структуры DASPO из почки быка показало, что в последнем ферменте положение остатка Arg237 эквивалентно положению Tyr238 в структуре RgDAAO. Кроме того, в активном центре RgDAAO

на расстоянии $3,8\text{\AA}$ от субстрата находится остаток Met213. Для более эффективного связывания γ -карбоксильной группы D-Asp были получены точечный мутант RgDAAO M213R и двойной мутант M213R/Y238R, обеспечивающие введение в активный центр фермента одного и двух дополнительных положительных зарядов. Замена M213R привела к тому, что величина k_{cat} в реакции окисления D-Asp возросла в 8 раз, а значение K_M снизилось в 10 раз по сравнению с таковыми для RgDAAO дикого типа. По своей каталитической эффективности мутантная RgDAAO не уступала DASPO из почек быка. В случае двойного мутанта RgDAAO M213R/Y238R величина k_{cat} возросла в 53 раза, однако за счет худшей K_M , каталитическая эффективность оказалась в два раза ниже, чем для RgDAAO M213R. Замена M213G приводит к существенному улучшению каталитических свойств фермента с объемными гидрофобными субстратами за счет увеличения объема активного центра [55]. Эти работы являются первыми попытками направленного изменения субстратной специфичности DAAO, и их успешность позволила надеяться на успех в других подобных экспериментах. Кроме перечисленных выше примеров мутагенеза, методами белковой инженерии с помощью различных аминокислотных замен была исследована роль остатков Met213, Tyr223, Tyr238, Arg285, Ser335 и Gln339, располагающихся в активном центре RgDAAO [149]. Замена консервативного остатка Tyr223 на остаток Ser привела к замедлению связывания субстрата и его высвобождения в реакции с D-Ala. При этом замена этого же остатка на Phe не изменяет свойств фермента. Из этого следует, что бензольное кольцо Tyr223 играет важную роль в связывании субстрата. Остаток Tyr223 фиксирует субстрат в оптимальной для эффективного катализа ориентации за счет электростатических и водородных связей [150]. Также было показано, что остаток Arg283 принимает непосредственное участие в катализе – играет важную роль в стабилизации отрицательного заряда в N(1)-C(2)=O локусе изоаллоксазиновой группировки FAD. Конформация остатка Arg283 изменяется при связывании субстрата, что было показано в результате замен R283Q, R283D, R283K, R283A [149,151]. С помощью замен на остатки серина и тирозина была исследована роль остатка Tyr238.

Оказалось, что этот остаток оказывает слабое влияние на связывание субстратов в активном центре, но конформационные изменения боковой цепи при его замене могут играть важную роль в катализе [152,153]. При введении в структуру RgDAAO замены S335G фермент потерял активность с D-лактатом. Этот факт дает основания предполагать, что остаток Ser335 играет важную роль в переносе протона от αNH_3^+ -группы субстрата на растворитель в ходе катализа [154]. Замена W243Y практически не изменяет кинетические свойства, термостабильность и эффективность связывания FAD, тогда как введение мутации W243I вызывает увеличение $K_D(\text{FAD})$ в 19 раз и ослабляет межсубъединичное взаимодействие в димере RgDAAO. Это означает, что Trp243 играет важную роль в образовании конформации белка, требуемой для эффективного связывания FAD. Помимо этого, остаток Trp243 стабилизирует димерную форму RgDAAO за счет Ван-дер-Ваальсовых и гидрофобных взаимодействий [155].

Интересной работой является удаление петли Pro302-Glu322 (и ее части Lys307-Ser311) в структуре RgDAAO [48,49]. Оказалось, что эта петля обеспечивает прочный контакт между субъединицами. Снижение прочности димерного контакта не влияет на кинетические свойства RgDAAO, однако оказывает значительное отрицательное действие на стабильность под действием денатурантов и протеолитических агентов. Невысокая протеолитическая стабильность мутанта с удаленными Lys307-Ser311 обусловлена тем, что часть петли Ser311-Lys321 экспонирована в раствор и подвержена действию протеолитических ферментов. Методом неупорядоченного мутагенеза был получен ряд мутантов RgDAAO, обладающих каталитической активностью с D-Asp и при этом по-прежнему проявляющих высокую активность с такими субстратами, как D-Ala и D-Arg. [105].

Одной из последних и весьма ярких работ, связанных с белковой инженерией RgDAAO, является изучение канала, по которому O_2 поступает в активный центр DAAO к *Si*-стороне FAD [60,61]. Внутри кислородного канала с помощью компьютерного моделирования и методов молекулярной динамики были определены траектории движения кислорода, а также два высокоафинных сайта А

и В. Аминокислотные остатки, формирующие эти сайты, были изучены с помощью направленного мутагенеза. Остаток Gly52 был заменен на остатки Cys, Val и Thr. Часть сайта А была заполнена боковой группой Val за счет введения замены G52V. Активность с кислородом для этого мутанта снизилась в 100 раз [61]. Кроме того, авторы выявили цепочку из трех молекул H_2O , по которой может передаваться H^+ от иминокислоты на молекулу O_2 во время ее восстановления до H_2O_2 . В работе [60] была подробно исследована роль остатков Trp50, Thr201 и Ile225. В данных положениях был выполнен насыщающий мутагенез и отобраны наиболее реакционноспособные мутанты при низкой концентрации кислорода. Среди отобранных мутантов с заменами W50F, W50P, W50R, T201L, T201V, I225F, I225V наиболее интересной была мутантная форма RgDAAO T201L, которая обладала в 5 раз более низким значением K_M и в 3 раза более высокой константой скорости восстановления O_2 , чем фермент дикого типа. Данная особенность делает этот фермент привлекательным для практического применения.

2.4.4. Белковая инженерия DAAO из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO)

Для TvDAAO опубликовано небольшое количество работ по белковой инженерии. Это в первую очередь связано с тем, что трехмерная структура этого фермента долгое время оставалась неизвестна (см. пункт 2.1.3). Таким образом, внимание исследователей сместилось в сторону RgDAAO, с тех пор как в 2000 этот фермент был закристилизован и была решена его структура, поскольку разнообразие подходов белковой инженерии могут позволить значительно улучшить свойства природного фермента. Однако TvDAAO значительно стабильнее других известных DAAO и не уступает им по каталитических свойствах, что делает весьма перспективным данный фермент в качестве отправной точки для направленного мутагенеза. До установления трехмерной структуры TvDAAO, вышло около 8 работ по белковой инженерии этого фермента, начиная с 1998 года, часть из которых опиралась на модельные структуры TvDAAO. Первые четыре работы были опубликованы группой авторов из Тайваня в период с 1998 по 2000 год. Первая статья посвящалась изучению роли

консервативного остатка Asp206 в структуре TvDAAO [156]. По аминокислотному выравниванию, авторы предположили, что роль этого остатка может быть аналогична роли остатка Asp192 в rkDAAO, который взаимодействует с Agr286 и Tyr309, поддерживая правильную конформацию белковой глобулы для связывания FAD. Было выполнено шесть аминокислотных замен остатка Asp206. Мутанты с заменами D206L, D206G, D206N не проявляли каталитической активности, а также утратили спектр поглощения, характерный FAD-содержащим белкам. Мутанты D206E, D206A, D206S сохранили от 6 до 90% исходной активности и имели спектры поглощения, близкие к ферменту дикого типа. Авторы предположили, что данный остаток может играть важную роль в связывании кофактора FAD. Годом позже была опубликована работа, в которой изучалась роль консервативного остатка His324 [157]. Положение для мутагенеза было выбрано аналогично из сравнения нескольких последовательностей DAAO и анализа структуры rkDAAO. В работе было получено 8 мутантных ферментов в 324 положении. Мутантные TvDAAO H324R, H324L, H324K совершенно потеряли активность и характерный спектр поглощения для FAD-содержащих белков. У остальных мутантных TvDAAO с заменами His324N, H324Q, H324A, H324Y, H324E произошло уменьшение каталитической активности в 1,5-4 раза и увеличение значений K_M в 1,4-2,5 раза с D-Ala. В результате было показано, что His324 играет важную структурную роль и принимает участие в связывании FAD апоферментом. В следующей работе была проведена замена остатков Met в TvDAAO с целью повышения стабильности фермента против инактивации пероксидом водорода [72]. Было заменено шесть остатков Met на остатки Leu. Четыре мутантные TvDAAO M104L, M226L, M245L и M339L практически полностью утратили каталитическую активность с D-Ala. Стоит отметить, что эти остатки Met располагаются внутри белковой глобулы. Замены двух других остатков M156L и M209L привели к увеличению каталитической активности в 1,2 и 2 раза соответственно. Мутанты с заменами M104L, M156L и M209L были стабильнее фермента дикого типа при инактивации пероксидом водорода. Остатки Met104 и Met156 располагаются на поверхности белковой глобулы и доступны растворителю. Таким образом, замена

остатков, подверженных окислению, перспективна для повышения операционной стабильности TvDAAO, поскольку пероксид водорода является одним из продуктов реакции, катализируемой этим ферментом. В заключительной своей работе исследователи охарактеризовали мутанты TvDAAO с заменами V167A, P291S, P309S и A343D, которые были получены с помощью ПЦР с ошибками [158]. Все мутанты были практически неактивны и не обладали спектром поглощения FAD-содержащих белков. Авторы предположили, что упомянутые остатки играют важную структурную роль в TvDAAO.

Начиная с 2000 года, настал перерыв в работах по белковой инженерии TvDAAO, что, по-видимому, было вызвано их нецелесообразностью и сложностью интерпретации результатов в отсутствие трехмерной структуры этого фермента. В 2008 году было проведено ковалентное сшивание двух субъединиц TvDAAO с помощью дипептида Lys-Leu, что позволило добиться небольшого повышения температурной стабильности (T_m увеличилась на 2°C) и стабильности против инактивации пероксидом водорода [148]. Ковалентная сшивание практически не повлияло на каталитическую активность с большинством D-аминокислот. В то же время вышла работа, в которой был получен химерный белок VNb-TvDAAO с помощью ковалентной пришивки гемоглобина из *Vitreoscilla* к N-концу TvDAAO [159].

Ранее в 2005 году в работе [73] было показано, что окисление остатка Cys108 в TvDAAO приводит к значительной потере активности фермента. В нашей лаборатории была исследована роль этого остатка Cys108 с помощью замен на остатки Ala, Ser и Phe [76]. Полученные мутанты обладали различным профилем субстратной специфичности, но важной особенностью являлось отсутствие активности с D-Ala, что может быть использовано в определении D-Ser в присутствии D-Ala. Кроме того TvDAAO C108A и C108F обладали более высокой каталитической эффективностью с цефалоспорином C, а TvDAAO C108F обладала более высокой термостабильностью, чем фермент дикого типа. Важным достижением являлась кристаллизация TvDAAO C108F, после чего впервые в мире была решена ее пространственная структура с разрешением 2,8 и 1,8Å. Научной

группой из Австрии (г. Грац) в 2010 году было также проведено изучение роли остатка Cys108 и его замена на остатки Ser и Asp в следствии структурного сходства [160]. Авторы сообщили, что кинетические параметры и термостабильность полученных мутантов в целом ухудшились по сравнению с ферментом дикого типа.

После установления трехмерной структуры TvDAAO нами были начаты систематические исследования взаимосвязи структуры и функции TvDAAO с помощью метода рационального дизайна. В нашей работе [51] на основании анализа структуры TvDAAO было показано, что димерная форма поддерживается за счет образования 12 водородных связей аминокислотными остатками из разных субъединиц, причем Arg169 и Arg220 образуют по две водородные связи каждый, т.е. эти остатки отвечают за образование 8 из 12 водородных связей между двумя субъединицами. Роль остатков Arg169 и Arg220 в образовании межсубъединичных контактов в димере TvDAAO была изучена за счет введения замены R169A, R220A (для удаления водородных связей) и R220E (для создания отталкивания с Glu32 другой субъединицы). Все полученные мутантные TvDAAO экспрессировались в активной и нерастворимой формах, а по термостабильности значительно уступали ферменту дикого типа. Полученные данные подтвердили важную роль остатков Arg169 и Arg220 в поддержании четвертичной структуры TvDAAO. В работе авторов из Китая [161] была построена модельная структура TvDAAO с цефалоспорином *C* в активном центре на основе структур rkDAAO (PDB: 1VE9) и RgDAAO (PDB: 1C0L). Авторы показали, что боковая группа остатка Phe54 находится в 3Å от аминогруппы цефалоспоринона *C*. Для выяснения роли этого остатка в связывании цефалоспоринона *C* и термостабильности фермента были получены мутантные TvDAAO с заменами F54A, F54S и F54Y. Все полученные мутанты обладали увеличенной активностью с цефалоспорином *C*, по сравнению с ферментом дикого типа (каталитическая константа увеличилась в случае замен F54A, F54S и F54Y в 2,7, 3 и 6 раз соответственно). Также оказалось, что все мутанты обладали более высокой температурной стабильностью, чем фермент дикого типа, особенно TvDAAO F54Y и F54A, которые не теряли активность при

инкубации в течение 1 часа при 55°C. В нашей лаборатории также было проведено исследование роли остатка Phe54 в каталитических свойствах и стабильности TvDAAO с помощью аналогичных аминокислотных замен [57]. Проведенное компьютерное моделирование и докинг цефалоспорина C в активный центр фермента показали, что остаток Phe54 взаимодействует с молекулой субстрата. В результате замены F54S была повышена каталитическая активность с объемными D-аминокислотами (D-Trp, D-Tyr, D-Phe, D-Leu) и достигнуто сужение спектра субстратной специфичности за счет отсутствия активности с небольшими субстратами. Мутантные ферменты обладали повышенной активностью с цефалоспорином C. Однако данные по температурной стабильности отличались от данных работы [161]. В нашем случае замена F54A привела к сильной дестабилизации TvDAAO и мутантный фермент выделить не удалось, в то время как мутантная TvDAAO F54Y обладала немного более высокой термостабильностью, чем фермент дикого типа. В другой нашей работе было продолжено изучение роли аминокислотных остатков на входе в активный центр TvDAAO [56]. Был выявлен конформационно подвижный остаток Phe258 и проведена его замена на остатки Ala, Ser и Tyr. Замена F258Y привела к понижению активности с большинством субстратов, а замены F258A и F258S вызвали резкое сужение профиля субстратной специфичности – увеличилась активность с D-Tyr, D-Phe и D-Leu и сильно снизилась с остальными субстратами. Однако обе замены отрицательно сказались на температурной стабильности, в то время как мутант TvDAAO F258S был немного стабильнее фермента дикого типа. Полученные данные свидетельствуют о важной роли остатков на входе в активный центр фермента в стерическом контроле и связывании субстратов. Подобные работы представляют собой большой практический интерес с точки зрения получения мутантных TvDAAO с новыми каталитическими свойствами, поскольку такие ферменты могут быть использованы для различных целей биотехнологии, органического синтеза и аналитическом определении D-аминокислот.

Таблица 2.4а

Белковая инженерия рkDAAO, hDAAO, RgDAAO и TvDAAO.

Цель мутагенеза	Аминокислотная замена	Экспериментальный результат	Вывод о роли исследуемого остатка
ркDAAO			
Исследование роли остатков в катализе Tyr228 и His307 [141]	Y228F H307L	В случае замены Y228F K_M с D-Ala увеличилась в 70 раз, V_m уменьшилась в 1,5 раза, константа ингибирования бензоатом выросла в 1200 раз, $K_d(\text{FAD})$ выросла в 1,4раза. Для H307L K_M с D-Ala увеличилась в 10 раз, V_m уменьшилась в 1,7 раза, константа ингибирования бензоатом выросла в 18 раз, $K_d(\text{FAD})$ выросла в 28 раза.	Остаток Tyr228 участвует в связывании субстратов и играет второстепенную роль в связывании FAD. Остаток His307 участвует в связывании FAD и играет второстепенную роль в катализе.
Исследование механизма действия рkDAAO с помощью мутагенеза остатков Tyr224 и Tyr228 [142]	Y224F Y228F	Для мутанта Y224F спектральные и кинетические свойства соответствуют таковым для фермента дикого типа. Для мутанта Y228F спектральные характеристики аналогичны таковым для фермента дикого типа. Величина k_{cat} с рядом субстратов значительно ухудшилась (в 2,5-8 раз). Для обоих мутантов исследован кинетический изотопный эффект.	Обе мутации приводят к дестабилизации переходного состояния (в случае Y228F эффект более значительный). Гидроксил Tyr228 образует водородную связь с карбоксилем субстрата и стабилизирует отрицательное переходное состояние. Tyr224 стабилизирует комплекс с переносом заряда, взаимодействуя с NH_2^+ -группой. Таким образом, оба остатка играют важную роль в катализе.

<p>Исследование каталитической и структурной роли остатков Gly313 и Thr317[162]</p>	<p>G313A T317A</p>	<p>Для мутанта G313A уменьшилась активность и увеличились значения K_M с D-Ala, D-Pro, D-Ser, D-Ile, D-Met и изменился профиль субстратной специфичности. В случае замены T317A ухудшилось связывание FAD и каталитические свойства с D-Ala, D-Pro, D-Ser, D-Val, D-Phe.</p>	<p>Остаток Gly313 участвует в распознавании субстрата, образуя водородную связь карбонильной группой с аминогруппой субстрата и, таким образом, определяет профиль субстратной специфичности фермента. Остаток Thr317 стабилизирует интермедиат в процессе окислительной полуреакции, способствует высвобождению продукта из активного центра, играет важную роль во всем процессе катализа.</p>
<p>Повышение температурной стабильности с помощью неупорядоченного мутагенеза [143]</p>	<p>F42C N246G N246E N246F N246Y</p>	<p>Для F42C повышена термостабильность на 10 °C. Через 1 ч инкубации при 55 °C в присутствии 1 mM FAD мутант сохраняет около 80% исходной активности, рkDAAO дикого типа – 10%. Спектр субстратной специфичности не изменился. Мутанты в 246 положении обладали немного более высокой термостабильностью, но более низкой активностью, чем дикий тип.</p>	<p>Неупорядоченный мутагенез позволяет найти перспективные положения для исследования и добиться существенного повышения стабильности. Образование внутри- и межмолекулярной дисульфидной связи было исключено из-за удаленности остатка Phe42 от остатков Cys в структуре рkDAAO. Механизм стабилизации не выяснен и требует дополнительных исследований.</p>
<p>Инженерия субстратной специфичности, [144]</p>	<p>участок I215-N225 рkDAAO заменен на R216-G220 hDDO</p>	<p>Каталитическая эффективность по D-Ala ниже в 390 раз, мутант проявляет высокую активность с D-Asp, который не является субстратом рkDAAO.</p>	<p>Последовательность Ile215-Asn225 играет важную роль в распознавании субстратов. Замена этой последовательности на Arg216-Gly220 hDDO позволяет получить мутант со спектром субстратной специфичности,</p>

			близким к hDDO.
	E220D/Y224G R221D/Y224G G222D/Y224G I223D/Y224G Y224D	За счет значительного снижения величины K_M каталитическая эффективность первых трех мутантов с D-Arg повышена в 1,5-8,3 раза. Все мутанты практически потеряли активность с D-Ala и D-Ser, а также сильно снизилась активность с D-Pro и D-Val.	Введение дополнительного “-” заряда в короткий участок Glu220-Tyr224 и изменение объема полости позволяет значительно повысить каталитическую эффективность рkDAAO с D-Arg.

Таблица 2.46

Цель мутагенеза	Аминокислотная замена	Экспериментальный результат	Вывод о роли исследуемого остатка
hDAAO			
Ковалентное связывание FAD [145]	G281C	Получена форма фермента, в который 8-метилсульфонил FAD связан ковалентно. Мутантный фермент с ковалентно связанным FAD имеет активность на 26% выше, чем фермент дикого типа.	Ковалентно связанный FAD имеет правильную пространственную ориентацию и эффективно работает в ходе катализа. При этом, однако, структура фермента изменяется и становится более жесткой, что вызывает ухудшение каталитических свойств.

Таблица 2.4в

Цель мутагенеза	Аминокислотная замена	Экспериментальный результат	Вывод о роли исследуемого остатка
RgDAAO			
Влияние трипептида на С-конце на число изоформ и транспорт в пероксисомы [146]	Удален трипептид SerLysLeu с С-конца	Кинетические параметры и термостабильность не изменились. Количество изоформ уменьшилось с 3 для RgDAAO дикого типа до 1 (pI=7,2) для мутанта. Транспорт фермента в пероксисомы невозможен.	Трипептид –SerLysLeu является сигнальной последовательностью типа I, отвечающей за транспорт фермента в пероксисомы. Существование RgDAAO дикого типа в виде трех изоформ определяется наличием или отсутствием трипептида на С-конце одной или двух субъединиц.
Изучение роли консервативного Tyr223 в связывании субстрата и катализе [150]	Y223F	Кинетические свойства мутанта и фермента дикого типа идентичны.	Бензольное кольцо Tyr223 играет важную роль в связывании субстрата. Остаток фиксирует субстрат в оптимальной для эффективного катализа ориентации (стерический фактор и электростатические и водородные связи).
	Y223S	Связывание субстрата в 60 раз медленнее и в 800 раз снижена скорость высвобождения продукта.	
Исследование роли Arg285 в ориентировании и связывании субстрата [149,151]	R285Q R285D R285K R285A	Замены приводят к резкому ухудшению и K_M (300 раз), и k_{cat} (500 раз). Спектральные свойства мутантов не изменились, но степень стабилизации полухиноновой формы флавинового кольца ниже, чем для фермента дикого типа.	Arg285 принимает непосредственное участие в катализе – играет важную роль в стабилизации отрицательного заряда в N(1)-C(2)=O локусе изоаллоксазинового цикла FAD. Конформация остатка изменяется при связывании субстрата.
Изучение роли Tyr238 в катализе [152,153]	Y238F	Эффективность связывания бензоата натрия зависит от pH. В	Остаток оказывает слабое влияние на связывание лиганда в активном

	Y238S	зависимости от субстрата боковая цепь Tyr238 находится в различных положениях.	центре. Однако конформационные изменения боковой цепи могут играть важную роль в катализе.
Инженерия субстратной специфичности, повышение активности с D-Asp и D-Glu [54]	M213R	В реакции с D-Asp k_{cat} возросла в 8 раз, а значение K_m снизилось в 10 раз. Величина k_{cat}/K_m с D-Glu в 37 раз выше.	Введение дополнительных одного или двух положительных зарядов обеспечивает более эффективное связывание карбоксильных групп. Каталитическая эффективность точечного мутанта с D-Asp и D-Glu не уступает таковой для DASPO из почки быка.
	M213R/Y238R	Величина k_{cat}/K_m в два раза ниже, чем для мутанта Met213Arg. Каталитическая эффективность обоих мутантов с другими субстратами значительно ухудшилась.	
Исследование влияния петли Pro302-Glu322 на димеризацию [48,49]	из петли удалены 14 остатков Ser308-Lys321 из петли удалены 5 аминокислотных остатков Lys307-Ser311	Оба полученных мутанта являются мономерами. Кинетические свойства в обоих случаях изменились незначительно, $K_D(FAD)$ увеличилась в 5 раз. Для обоих мутантов наблюдается пониженная стабильность при высоких температурах. Мутант с удаленными Lys307-Ser311 подвержен протеолизу значительно сильнее, чем другой мутант и фермент дикого типа.	Петля Pro302-Glu322 обеспечивает прочный контакт между субъединицами. Олигомерное состояние не влияет на кинетические свойства, однако оказывает значительное отрицательное действие на стабильность фермента под действием денатурантов и протеолитических агентов. Невысокая протеолитическая стабильность мутанта с удаленными Lys307-Ser311 обусловлена тем, что часть петли Ser311-Lys321 экспонирована в раствор и подвержена действию протеолитических ферментов.

Изучение роли Ser335 в катализе [154]	S335G	Кинетические и спектральные характеристики фермента не изменились. Мутант в отличие от фермента дикого типа не проявляет активности с D-лактатом.	Ser335 играет важную роль в переносе протона от αNH_3^+ -группы субстрата на растворитель в ходе катализа.
Инженерия субстратной специфичности (неупорядоченный мутагенез) [104,105]	Q144R L118H D242V/Q253Arg/ D304V T60A/Q144R/K152E	Увеличение каталитической эффективности всех мутантов в реакции с D-Asp в 2-5 раз. Величина k_{cat}/K_M по D-Ala и D-Arg составляет 0,5-1,9 таковой для фермента дикого типа.	В результате всех мутаций удалось достичь положительного эффекта на каталитическую активность фермента с D-Asp и при этом сохранить эффективный катализ с такими субстратами, как D-Ala и D-Arg. Это означает, что аминокислотные остатки, которые были мутированы, расположены в некотором удалении от активного центра, но влияют на структуру и катализ.
	Q144R/G199D /Y223C H329R	Увеличение значения k_{cat}/K_M с D-Ala, D-Asp и D-Arg в 3, 6 и 1,6 раза.	
Исследование роли Trp243 в межсубъединичных контактах, связывании FAD и стабильности [155]	W243Y	Кинетические свойства, термостабильность и эффективность связывания FAD изменились незначительно. Состояние олигомеризации зависит от концентрации мутанта.	Trp243 играет важную роль в образовании конформации белка, требуемой для эффективного связывания FAD. Помимо этого, Trp243 стабилизирует димерную форму фермента за счет Ван-дер-Ваальсовых и гидрофобных взаимодействий.
	W243I	$K_D(\text{FAD})$ увеличилась в 19 раз. Слабый межсубъединичный контакт – мутант является мономером.	

<p>Инженерия субстратной специфичности [55]</p>	<p>M213G</p>	<p>Значительное увеличение каталитической эффективности при окислении нафтил-производных аминокислот. В реакции с D-1-нафтилаланином величина k_{cat} увеличилась в 7 раз, а K_M снизилась в 1,3 раза. Значение k_{cat}/K_M для D-1-нафтилаланина в 180 раз выше, чем для D-Ala.</p>	<p>В активном центре RgDAAO остаток Met213 находится на расстоянии 3,8Å от субстрата и, следовательно, участвует в ориентации и связывании субстрата.</p>
<p>Влияние остатков активного центра на субстратную специфичность [149]</p>	<p>Аминокислотные замены остатков Met213 Tyr223 Tyr238 Arg285 Ser335 Gln339</p>	<p>Каталитическая активность всех мутантов с D-Ala, D-Arg и цефалоспорином <i>S</i> ниже, чем для фермента дикого типа. Введение положительно заряженных остатков в любое из положений обеспечило значительное увеличение значения k_{cat}/K_M с D-Asp. Изменения спектральных характеристик для мутантов не наблюдалось.</p>	<p>Все остатки принадлежат активному центру молекулы RgDAAO и обеспечивают оптимальную конформацию и подходящее микроокружение для связывания субстрата и катализа.</p>
<p>Изучение влияния сшивания димера фермента на его стабильность и активность [148]</p>	<p>Объединение двух полипептидных цепей DAAO сшивкой из дипептида Tyr-Thr</p>	<p>T_m увеличилась на 5°C. Стабильность при инактивации H_2O_2 увеличилась в 2 раза. Каталитическая эффективность с рядом субстратов ухудшилась вследствие повышения K_M.</p>	<p>Сшиванием димера RgDAAO можно добиться его температурной и операционной стабилизации.</p>

<p>Изучение кислородного канала в структуре RgDAAO [60,61].</p>	<p>G52V G52C G52T</p> <p>W50F W50P W50R T201L T201V I225F I225V</p>	<p>Замены G52V привела к уменьшению активности с O₂ в 100 раз[61]. С помощью насыщающего мутагенеза изучены остатки Trp50, Thr201 и Ile225. Наиболее реакционноспособным мутантом с O₂ является RgDAAO T201L (K_M уменьшилась в 5 раз, активность выросла в 3 раза).</p>	<p>Остатки, находящиеся в кислородном канале играют важную роль в транспорте O₂ к Si-стороне FAD в активном центре фермента. Направленный мутагенез остатков в данном канале может приводить к повышению каталитической активности фермента.</p>
---	---	--	---

Таблица 2.4г

Цель мутагенеза	Аминокислотная замена	Экспериментальный результат	Вывод о роли исследуемого остатка
TvDAAO			
Исследование роли консервативного остатка Asp206 в катализе и связывании кофактора [156]	D206L D206G D206N	Мутанты неактивны. Утратили спектры поглощения характерные для FAD-содержащих белков.	Asp206 стабилизирует конформацию, оптимальную для эффективного связывания FAD. Атомы кислорода карбоксильной группы остатка участвуют в образовании водородных связей с другими аминокислотными остатками. Следовательно, при введении замены D206E свойства мутанта незначительно отличаются от дикого типа.
	D206E	Спектр поглощения, идентичный ферменту дикого типа, мутант сохранил 90% исходной активности.	
	D206A D206S	Эффективность связывания FAD значительно ниже, чем для фермента дикого типа. Каталитическая активность с D-Ala ниже в 3-16 раз.	
Изучение роли консервативного His324 в катализе [157]	H324N H324Q H324A H324Y H324E	Ухудшение каталитической эффективности в реакции с D-Ala в 3-11 раз.	Остаток His324 фиксирует оптимальную для связывания FAD конформацию.
	H324R H324L H324K	Мутанты неактивны. Отсутствуют пики спектра поглощения, характерные для FAD-содержащих белков.	
Повышение стабильности против инактивации пероксидом водорода [72]	M104L M226L M245L M339L	Мутанты практически неактивны с D-Ala. Мутант M104L стабильнее дикого типа в отношении инактивации H ₂ O ₂ .	Остатки, расположенные на поверхности значительно сильнее подвержены окислению, чем остатки, находящиеся внутри

	M209L M156L	Повышена стабильность в присутствии H ₂ O ₂ . Каталитическая эффективность с D-Ala для M156L в 2 раза выше, чем для фермента дикого типа.	белковой глобулы. Остатки Met104, Met156 и Met209 расположены близко к поверхности фермента.
Изучение субстратной специфичности (неупорядоченный мутагенез) [158]	V167A P291S P309S A343D	Мутантные ферменты полностью потеряли активность. В спектре их поглощения отсутствует пик, обусловленный поглощением FAD.	Остатки играют важную структурную роль. Они поддерживают конформацию фермента, требуемую для эффективного катализа.
Изучение влияния сшивания димера TvDAAO на его стабильность и активность [148]	Объединение двух полипептидных цепей TvDAAO сшивкой из дипептида Lys-Leu	T _м увеличилась на 2°C. Стабильность при инактивации H ₂ O ₂ увеличилась в 1,5 раза. Каталитическая активность с большинством D-аминокислот близка к дикому типу, но каталитическая эффективность несколько ухудшилась из-за повышения значений K _м .	Сшиванием димера TvDAAO можно добиться повышения его температурной и операционной стабильности.
Сшивка TvDAAO с гемоглобином из <i>Vitreoscilla</i> и экспрессия фьюжн-белка в клетках <i>E.coli</i> [159]	Полипептидная цепь гемоглобина пришта к N-концу TvDAAO	Получена конструкция VHb-TvDAAO, состоящая из гемоглобином из <i>Vitreoscilla</i> (VHb) и TvDAAO. Выход фьюжн-белка в результате экспрессии в клетках <i>E.coli</i> был в 2 раза выше, чем для фермента дикого типа.	VHb-TvDAAO может обладать повышенной стабильностью и каталитической активностью за счет увеличения локальной концентрации O ₂ .
Повышение температурной стабильности и инженерия субстратной специфичности [76]	C108A	Увеличена каталитическая эффективность фермента по отношению к D-аминокислотам с большим гидрофобным радикалом в боковой цепи.	Остаток Cys108 оказывает существенное влияние на температурную стабильность фермента.
	C108S	Ухудшение кинетических свойств и температурной стабильности.	

	C108A	Увеличена каталитическая эффективность фермента по отношению к D-аминокислотам с большим гидрофобным радикалом в боковой цепи. Введение аминокислотной замены C108F приводит к повышению температурной стабильности фермента в 2,2 раза и компактизации белковой глобулы.	
Изучение роли остатков Arg169 и Arg220 в межсубъединичном контакте TvDAAO [51]	R169A R220A R220E	Все полученные мутантные TvDAAO экспрессировались в активной и нерастворимой формах, а по термостабильности значительно уступали ферменту дикого типа.	Остатки Arg169 и Arg220 играют важную роль в поддержании стабильного димерного состояния TvDAAO.
Изучение роли остатка Cys108 в катализе [160]	C108D C108S	Введение обеих замен привело к конформационным изменениям молекулы белка. При термоинактивации мутантных форм наблюдается необратимая диссоциация FAD из активного центра. Кинетические свойства мутантных форм C108S и C108D в реакции с D-Ala ухудшились в 2 и 3 раза соответственно.	Остаток Cys108 участвует в регуляции активного центра фермента и поддержании его стабильности.

<p>A single Phe54Tyr substitution improves the catalytic activity and thermostability of <i>Trigonopsis variabilis</i> D-amino acid oxidase [161]</p>	<p>F54A F54S F54Y</p>	<p>Все полученные мутанты обладали увеличенной активностью с СРС и повышенной температурной стабильностью по сравнению с ферментом дикого типа.</p>	<p>Полученные данные свидетельствует о важной роли остатков на входе в активный центр фермента в стерическом контроле и связывании субстратов.</p>
<p>Инженерия субстратной специфичности, повышение активности с объемными субстратами [57]</p>	<p>F54A F54S F54Y</p>	<p>Мутант с заменой F54A инактивировался в ходе выделения и очистки. В результате замены F54S была повышена каталитическая активность с объемными D-аминокислотами D-Trp, D-Tyr, D-Phe, D-Leu. В результате замен F54S и F54Y повышена каталитическая активность с СРС и наблюдалось небольшое повышение термостабильности.</p>	
<p>Инженерия субстратной специфичности [56]</p>	<p>F258A F258S F258Y</p>	<p>Замена F258Y привела к понижению активности с большинством субстратов, замены F258A и F258S вызвали резкое сужение профиля субстратной специфичности фермента. Замены F258A и F258S привели к понижению, а F258S к небольшому повышению термостабильности.</p>	

Анализ литературных данных свидетельствует, что оксидаза D-аминокислот является очень важным ферментом как с точки зрения физиологической роли в организме человека, так и с точки зрения фундаментальных исследований структуры, механизма действия, стабильности, выступая в качестве модельного фермента для целого класса FAD-зависимых оксидоредуктаз. Кроме того, за последние 30 лет дрожжевые RgDAAO и TvDAAO нашли применение в различных областях биотехнологии. Однако основные ограничения связаны с неоптимальными свойствами природных ферментов. Структура RgDAAO стала доступна в 2000 году, после чего было выполнено большое количество работ по направленному изменению свойств фермента с помощью белковой инженерии, но ни один из полученных мутантов не пригоден для эффективного промышленного применения и по своим свойствам, особенно по температурной стабильности, не превосходят рекомбинантную TvDAAO. Несмотря на то, что TvDAAO изначально является самой перспективной DAAO для практического применения, поскольку обладает самой высокой температурной стабильностью, проявляет наибольшую активность к природному антибиотику цефалоспину C и многим гидрофобным D-аминокислотам, работы по белковой инженерии практически не проводились для этого фермента, что было связано, в первую очередь, с отсутствием его трехмерной структуры. Для успешного применения TvDAAO в создании биосенсоров для селективного определения D-аминокислот и биокатализаторов для биокаталитических процессов, которые способны вытеснить существующие химические способы производства важных субстратов (7-АЦК, α -кетокислоты, неприродные L-аминокислоты и т.д.), необходимо проведение оптимизации свойств природного фермента – увеличение каталитической активности с D-аминокислотами и цефалоспорином C, повышение температурной стабильности и сужение спектра субстратной специфичности. Для этих целей, начиная с 2008 года, мы используем метод рационального белкового дизайна, который основан на подробном сравнении первичных и четвертичных структур гомологичных DAAO, нахождении структурных отличий, компьютерном моделировании, молекулярном докинге и т.д. Данный метод показал свою эффективность в наших предыдущих

работах [51,56,57,163,164]. Тем не менее, для успешного применения метода рационального дизайна, кроме наличия трехмерной структуры, необходимы большое количество экспериментальных данных о взаимосвязи структуры и функции интересующего фермента. Как было показано в обзоре литературы, на данный момент количество подобных исследований по белковой инженерии TvDAAO, в отличие от RgDAAO, весьма ограничено.

В данной работе планируется проведение систематических исследований, направленных на фундаментальное изучение структуры TvDAAO и выявления новых структурно-функциональных взаимосвязей, а также выполнение экспериментов по направленному изменению свойств природного фермента методом рационального белкового дизайна.

III. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы

Для генно-инженерных экспериментов использовали реактивы марки “Molecular Biology Grade”, вода была очищена на установке MilliQ (“Millipore”, США). В микробиологических экспериментах использовали дрожжевой экстракт, бактотриптон и агар (“Difco”, США), глицерин (99,9%, “ultra pure”), хлорид натрия “ultra pure”, гидрофосфат калия, лизоцим (“Fluka/BioChemika”, Швейцария), хлорид магния и хлорид кальция “ultra pure” (“Merck”, Швейцария), изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ), рибофлавин, хлорамфеникол, тетрациклин и канамицин (“Sigma”, США), дигидрофосфат натрия “ч.д.а.”, глюкозу (“РеаХим”, Россия). Pfu-ДНК полимеразу, эндонуклеазы рестрикции и ДНК-лигазу фага T4 фирмы “Thermo Scientific” (Литва) использовали для направленного мутагенеза и клонирования фрагментов ДНК. Олигонуклеотидные праймеры для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) были синтезированы на заказ фирмой “Синтол” (Россия).

Для культивирования клеток *E. coli* использовали модифицированную среду 2YT (16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 1,5 г/л дигидрофосфата натрия, 1 г/л хлорида натрия, 1 г/л гидрофосфата калия, pH 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*(r_B⁻ m_B⁻) *dcm*⁺ Tet^r *gal λ*(DE3) *endA* Hte [pLysS *argU ileY leuW* Cam^r].

Для электрофореза белков использовали реактивы, произведенные фирмой “Bio-Rad” (США). Для очистки и изучения свойств фермента применяли Трис-НСl (трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид) фирмы “Merck” (Германия), рацематы аминокислот фирмы “РеаХим” (Россия) и “Reanal” (Венгрия), 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) АБТС (“ДиаМ”, Россия),

флавинадениндинуклеотид (FAD) фирмы “Sigma” (США) и пероксидазу из корней хрена (“Диам”, Россия).

3.2. Методы исследования

3.2.1. Рациональный белковый дизайн

Поиск последовательностей DAAO из различных источников проводили по базам данных KEGG GENES, SwissProt, GeneBank и IMBL с помощью программы tBLASTn по ключевому слову D-amino acid oxidase. В качестве исходной использовали известную аминокислотную последовательность TvDAAO. Выравнивание аминокислотных последовательностей было выполнено с помощью программы CLUSTAL X 1.83. Моделирование мутантных TvDAAO, наложение трехмерных структур, получение изображений пространственной структуры фермента проводили с помощью пакета программ Accelrys Discovery Studio 2.5 (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA). При расчетах использовали силовое поле CVFF. Использовали не менее 500 циклов оптимизации. Докинг субстратов в активный центр TvDAAO выполняли с помощью молекулярного графического редактора Viewer программного комплекса Insight II (Accelrys Inc., San Diego, CA, USA).

3.2.2. Направленный мутагенез гена *tvdaao*

Направленный мутагенез в гене *tvdaao* проводили с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) на приборе “Терцик” (“ДНК-технология”, Россия). В качестве матрицы использовали плазмиду pTvDAAO, которая была ранее получена из коммерчески доступной плазмиды pET-33b(+) (“Novagen”, США), в которую по сайтам рестрикции NcoI и XhoI был встроен ген *tvdaao* из *Trigonopsis variabilis*. В плазмиде pTvDAAO ген *tvdaao* находится под контролем сильного промотора РНК-полимеразы фага T7.

Для введения мутации в ген *tvdaao* проводили полимеразную цепную реакцию с использованием прямого праймера на начало (T7_For) и обратного

праймера (T7_Rev) на конец гена, а также прямого (Mfor) и обратного (Mrev) праймеров, несущих требуемые мутации в гене *tvdaao*.

T7_For 5' -ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГ-3'

T7_Rev 5' -GСТАГТТАТТГСТСАГСГГ-3'

Реакцию ПЦР проводили в тонкостенной пластиковой пробирке объемом 0,5 мл ("Eppendorf", Германия). Пробирку прогревали в течение 5 мин при 95 °С и затем проводили реакцию ПЦР с использованием следующей программы: 1-я стадия - 95 °С, 30 с; 2-стадия - 56 °С, 60 с и 3-я стадия - 72 °С, 2 мин, всего 25-35 циклов. После этого реакцию смесь выдерживали еще 10 мин при 72 °С. Температуру на второй стадии выбирали на 3-5 градусов ниже температуры плавления дуплексов (T_m), образуемых праймерами. Для определения T_m использовали эмпирическую формулу:

$$T_m = 2 \times (n_A + n_T) + 4 \times (n_G + n_C),$$

где n_x – количество нуклеотидов типа X в праймере.

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 2,5 мкл 10-кратного Pfu-буфера для Pfu ДНК-полимеразы (исходные концентрации: 200 мМ Трис-НСl (рН 8,8 при 25°С), 100 мМ (NH₄)₂SO₄, 100 мМ КCl, 1 мг/мл БСА, 1% (об.) Тритон Х-100, 20 мМ MgSO₄.); 2,5 мкл смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP, концентрация 2,5 мМ каждого); 1 мкл ДНК-матрицы с концентрацией \approx 10 нг/мкл; по 2 мкл праймеров For и Mrev (или Mfor и Rev), концентрация 10 пмоль/мл ("Синтол", Россия); 0,5 мкл Pfu ДНК полимеразы (2,5 Ед/мкл, "Thermo Scientific") и деионизованную воду, общий объема смеси составлял 25 мкл. Для предотвращения испарения реакционной смеси в пробирку добавляли 30 мкл минерального масла.

Для получения фрагментов, содержащих требуемую замену, проводили две ПЦР с использованием пар праймеров T7_For/Mrev (фрагмент 1) и Mfor/T7_Rev (фрагмент 2). Продукты ПЦР, фрагмент 1 и фрагмент 2, очищали из 1% агарозного геля. Затем проводили третью, объединяющую ПЦР с праймерами T7_For и T7_Rev, где в качестве ДНК-матрицы использовали полученные ранее фрагменты 1 и 2. Продукт объединяющей ПЦР очищали в агарозном геле и обрабатывали

уникальными эндонуклеазами рестрикции. Затем полученные фрагменты ДНК очищали и лигировали в ДНК-вектор, полученный из плазмидой pTvDAAO после обработки теми же рестриктазами. Реакционной смесью после лигирования трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5 α . Секвенирования гена *tvdaao* проводили с использованием праймеров T7_For и T7_Rev.

3.2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле в Трис-ацетатном буфере (40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, рН 8,5) при напряженности электрического поля 2-3 В/см. Агарозный гель содержал бромистый этидий в концентрации 1 мкг/мл. Визуализацию ДНК проводили на УФ-трансиллюминаторе при длине волны 254 или 312 нм.

3.2.4. Выделение ДНК 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.

3.2.5. Рестрикция ДНК

Рестрикцию плазмидной ДНК и ПЦР-фрагментов проводили с использованием уникальных эндонуклеаз рестрикции NcoI (10 Ед/мкл), EcoR I (10 Ед/мкл), Bsp119I (10 Ед/мкл), XhoI (10 Ед/мкл) фирмы “Thermo Scientific” в одно- или двукратном Tango™ буфере (2X Tango™: 66 mM Трис-ацетат (pH 7,9 при 25 °С), 20 mM ацетат магния, 132 mM 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.

3.2.6. Лигирование фрагментов ДНК

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 mM Трис-HCl (pH 7,8 при 25°C), 10 mM MgCl₂, 10 mM дитиотреитол, 1 mM 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* DH5α.

3.2.7. 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 охлаждённого 50 мМ раствора CaCl_2 и инкубировали в течение 30-40 мин во льду. Далее клетки осаждали в условиях, описанных выше, ресуспендировали в 100 мкл охлаждённого 50 мМ CaCl_2 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) или 5,0 мкл реакционной смеси после лигирования 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 подращивали 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) pLysS Codon Plus – канамицин (30 мкг/мл), хлорамфеникол (25 мкг/мл) или тетрациклин (8 мкг/мл).

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

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора “GeneJetTM Plasmid Miniprep Kit” фирмы “Thermo Scientific” согласно инструкции производителя. С чашек Петри колонии клеток *E.coli* DH5 α , 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, $+4^\circ\text{C}$), 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” (13000 об/мин, 5 мин), супернатант переносили в специальные колонки для центрифугирования “GeneJET” и центрифугировали (13000 об/мин, 1 мин). Фильтрат удаляли, в колонки добавляли 500 мкл раствора для промывания (“Wash Solution”) и центрифугировали (13000 об/мин, 1 мин), процедуру повторяли еще один раз. Добавляя в колонки 40-50 мкл деионизованной воды или буфера для элюирования (“Elution Buffer”) и затем центрифугируя в течение 2 мин при 13000 об/мин, осуществляли десорбцию ДНК с колонок. Концентрацию плазмидной ДНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полученные образцы плазмидных ДНК хранили при -20°C.

3.2.9. Секвенирование ДНК

Секвенирование плазмидной ДНК проводили в Центре коллективного пользования ЦКП «Геном» (Институт молекулярной биологии им.В.А.Энгельгардта РАН) 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 секвенаторе ДНК “ABI PRISM 3730 Applied Biosystems”. Для обработки результатов секвенирования использовали программу Chromas (версия 1.45), множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы BioEdit (версия 7.1.3.0).

3.2.10. Экспрессия TvDAAO в 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 пересевали 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 пересевали 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, pH 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°C). Полученный осадок клеток ресуспендировали в 20 мМ Трис-HCl pH 8,0 в соотношении 1:4 (масс) и помещали на -20°C.

3.2.11. Выделение и очистка TvDAAO

Клетки *E.coli*, содержащие TvDAAO, разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора “Branson Sonifier 250” (Германия) при постоянном охлаждении в течение 4-5 минут. После чего суспензию разрушенных клеток центрифугировали на центрифуге “Eppendorf 5804R” (13000 об/мин, 30 минут,

+4°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 mM Трис-НСl, рН 8,0. Десорбцию TvDAAO проводили в линейном градиенте 0-300 mM NaCl, 20 mM 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.

3.2.12. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях

Электрофорез белков по методу Лэммли проводили на приборе Miniprotean II фирмы “BioRad” (США) по протоколам фирмы-изготовителя. Используемые растворы:

1. Буфер 1: 1,5 М Трис-НСl, рН 8,8.
2. Буфер 2: 0,5 М Трис-НСl, рН 6,8.
3. Смесь Акриламид/Бис-акриламид в соотношении 36,5:1.
4. 10%-ный раствор SDS Na.
5. Буфер для нанесения образцов: 1 мл буфера 2, 0,8 мл глицерина (100%), 1,6 мл 10%-го SDS, 0,4 мл 2-меркаптоэтанола, 0,4 мл 1%-ный бромфенолового синего, 3,8 мл деионизованной воды.
6. 5-кратный электродный буфер, рН 5,3: 15г/л Трис-НСl, 72 г/л глицин , 5 г/л SDS
7. Раствор для окраски геля: 0,1% Кумасси R-250, 40% этанол и 10% уксусной кислоты.

Состав разделяющего геля (12%): деионизованная вода - 3,35 мл, буфер 1 - 2,5 мл, 10%-ный SDS - 100 мкл, акриламид/бис-акриламид - 4 мл, 10%-ный $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ - 50 мкл, ТЕМЕД - 5 мкл.

Состав концентрирующего геля (4%): деионизованная вода - 6,1 мл, буфер 2 - 2,5 мл, 10%-ный SDS - 100 мкл, акриламид/бис-акриламид - 1,33 мл, 10%-ный $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ - 50 мкл, ТЕМЕД - 10 мкл.

К пробе TvDAAO добавляли 10-50 мкл воды, 50 мкл буфера для нанесения образцов и инкубировали при 95 °С в течение 15 минут. Электрофорез проводили в рекомендованных фирмой-производителем условиях (60 В по верхнему и 120 В по нижнему гелю) до тех пор, пока краска не выйдет из геля. Для визуализации полос белка, гель помещали в раствор для окраски на 30-60 минут. Затем проводили отмывку фона после окрашивания дистиллированной водой в течение 12-14 часов. Чувствительность окраски с помощью Кумасси R-250 составляет 1 мкг белка в полосе.

3.2.13. Определение концентрации фермента

Концентрацию активной TvDAAO определяли по концентрации окисленного FAD, измеряя поглощение на длине волны 455 нм на спектрофотометре UV-1601PC (“Shimadzu”) с использованием коэффициента молярного поглощения $10800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [71]. Верность данного метода была подтверждена дополнительными экспериментами по определению концентрации мутантных TvDAAO и фермента дикого типа с помощью метода Брэдфорда [165] и модифицированного биуретового метода совместно с группой А.В. Левашева. Концентрации различных препаратов TvDAAO, определенные тремя различными способами, различались не более, чем на 10% между собой.

3.2.14. 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°С 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”).

3.2.15. Определение каталитических параметров TvDAAO

Для определения величин максимальной скорости ферментативной реакции и константы Михаэлиса, концентрацию соответствующей D-аминокислоты варьировали в диапазоне от 0,5 до 5 K_M , ориентируясь на значения K_M для TvDAAO дикого типа. В случае большого отклонения значения K_M для мутантной TvDAAO от такового для фермента дикого типа проводили повторное измерение с учетом полученного значения K_M . Активность TvDAAO при каждой концентрации D-аминокислоты измеряли не менее 3 раз. Кинетические параметры V_m и K_M рассчитывали методом нелинейной регрессии с помощью программы OriginPro 8.5 SR1 (OriginLab Corporation, США). Каталитическую константу k_{cat} рассчитывали из значения V_m .

3.2.16. Изучение температурной стабильности TvDAAO

Температурная стабильность мутантных TvDAAO и фермента дикого типа изучалась в 0,1 М КФБ, рН 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 $\pm 0,1$ °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 8.5 (OriginLab Corporation, США) методом нелинейной регрессии.

3.2.17. Математический аппарат теории диссоциативной термоинактивации

Термоинактивация мутантных TvDAAO и фермента дикого типа проходила в соответствии с диссоциативным механизмом (схема 1.1). Для определения констант скоростей термоинактивации использовали математический аппарат, подробно описанный в работах О.М.Полторака [79,166]. Расчет k_1 и k_{-1} проводился на стадии диссоциации димера на мономеры до точки излома в соответствии с выражением:

$$F(v) = 2 \frac{v}{v_0} - \frac{1}{2} \left(\frac{v}{v_0} \right)^2 = \frac{3}{2} - k_1 t$$

где v – активность фермента на участке до точки излома и k_1 определяют из тангенса угла наклона зависимости $F(v)$ от t . Для определения константы диссоциации расчет производился по следующей формуле:

$$K_{dis} = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{4[E]_0 (v_0 - v_x)^2}{v_0 v_x}$$

где v_0 и v_x – начальная активность и активность в точке излома соответственно, $[E]_0$ – начальная концентрация димеров TvDAAO. Из наклона зависимости остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах после точки излома определяли эффективную константу скорости инактивации второй стадии $k_2^{\text{эф}}$. Истинную константу скорости инактивации второй стадии k_2 вычисляли по следующему уравнению:

$$k_2 = \frac{k_2^{\text{эф}} (v_0 + v_x)}{2(v_0 - v_x)}$$

IV. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Роль остатка Met104 в каталитических свойствах и стабильности TvDAAO

4.1.1. Анализ трехмерной структуры TvDAAO и компьютерное моделирование.

Для получения подробных сведений о взаимосвязи структуры, стабильности и активности TvDAAO, а также для объяснения более высокой температурной стабильности TvDAAO по сравнению с изученными DAAO, нами был проведен сравнительный анализ проаннотированных аминокислотных последовательностей DAAO из различных организмов (рис. 2.2), а также подробный анализ известных на данный момент трехмерных структур DAAO (рис 4.1 А-Г). Результаты экспериментов показали, что аминокислотная последовательность TvDAAO имеет низкую гомологию с другими DAAO. Например, дрожжевые TvDAAO и RgDAAO имеют уровень гомологии всего 30%. Тем не менее, известные четвертичные структуры RkDAAO, hDAAO, RgDAAO и TvDAAO довольно схожи между собой (рис 4.1 А-Г). Выравнивание пространственных структур TvDAAO и RgDAAO (рис. 4.2) позволило выявить основные структурные отличия. Так, RgDAAO в области связывания FAD имеет дополнительную петлю (нижняя часть субъединицы, рис. 4.2), роль которой в поддержании димерного состояния и стабильности RgDAAO была подробно изучена в работах [48–50]. С другой стороны, подробное сравнение трехмерных структур различных DAAO показало, что характерным структурным отличием TvDAAO является наличие более длинной петли в области активного центра, которая располагается с 95 по 120 остаток в последовательности TvDAAO и соединяет два β -листа (85-94 и 121-125 остатки) и взаимодействует с пространственно-сближенными элементами вторичной структуры (α -спираль 58-78, β -листы 88-94, 121-125, 135-141, 226-230, 255-260, соединительные петли 51-57, 231-241). На рис. 4.1 данная петля выделена красным цветом, а дополнительный участок в структуре TvDAAO выделен синим цветом. Данное структурное отличие на примере TvDAAO и RgDAAO показано на рис. 4.2.

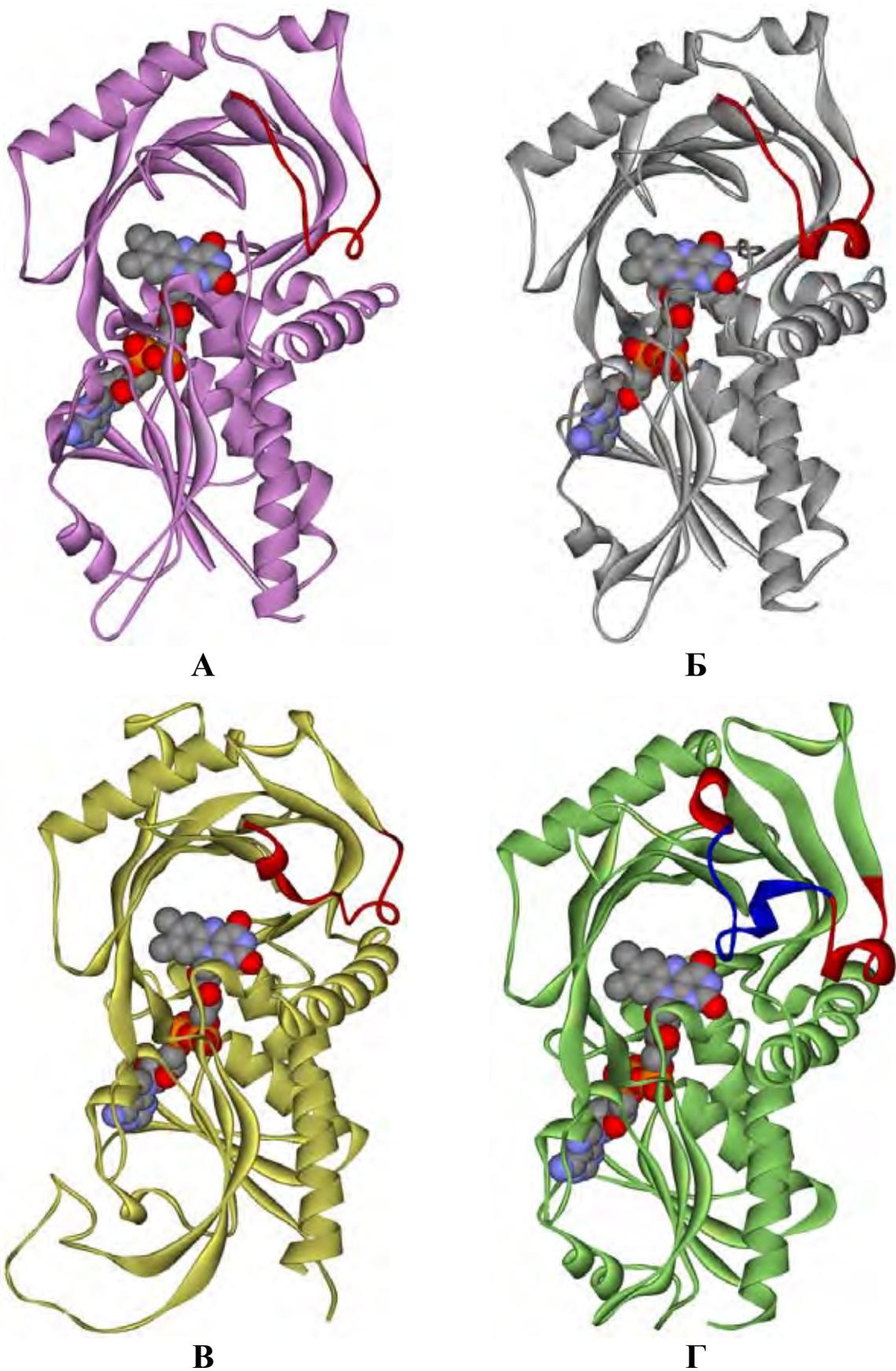


Рис. 4.1. Трехмерные структуры rkDAAO (А), hDAAO (Б), RgDAAO (В) и TvDAAO (Г). Молекула FAD показана в СРК. Красным цветом выделена соединительная петля в области активного центра. Синим цветом показан участок петли в структуре TvDAAO, отсутствующий у других DAAO.

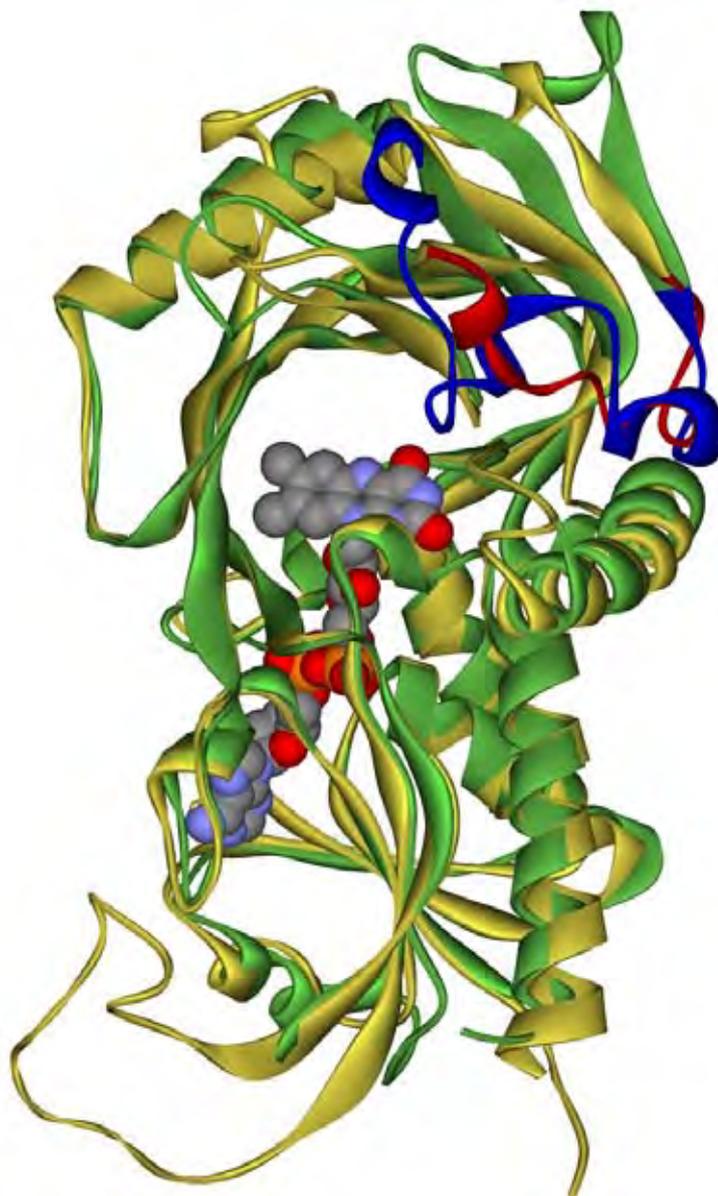


Рис. 4.2. Наложение структуры RgDAAO (1C0P, выделена желтым) на структуру TvDAAO (выделена зеленым), $RMSD = 1,27\text{\AA}$, количество совпадающих аминокислотных остатков – 286 из 356. Петля в области активного центра RgDAAO и TvDAAO выделена красным и синим цветом соответственно.

Анализ множественного выравнивания DAAO из различных источников в области активного центра показал, что более чем 90% последовательностей DAAO (в том числе pKDAAO, hDAAO и RgDAAO) в отличие от TvDAAO имеют разрыв в данной области (рис. 2.2).

Таким образом, петля с 95 по 120 аминокислотный остаток в структуре TvDAAO может играть важную роль в поддержании стабильности TvDAAO, например, за счет экранирования активного центра фермента от растворителя и за счет взаимодействия с соседними элементами вторичной структуры. Поскольку данная петля частично формирует вход в активный центр фермента, то отдельные

аминокислотные остатки, входящие в нее, могут играть важную роль в связывании субстратов, каталитической активности, а также в стабильности TvDAAO.

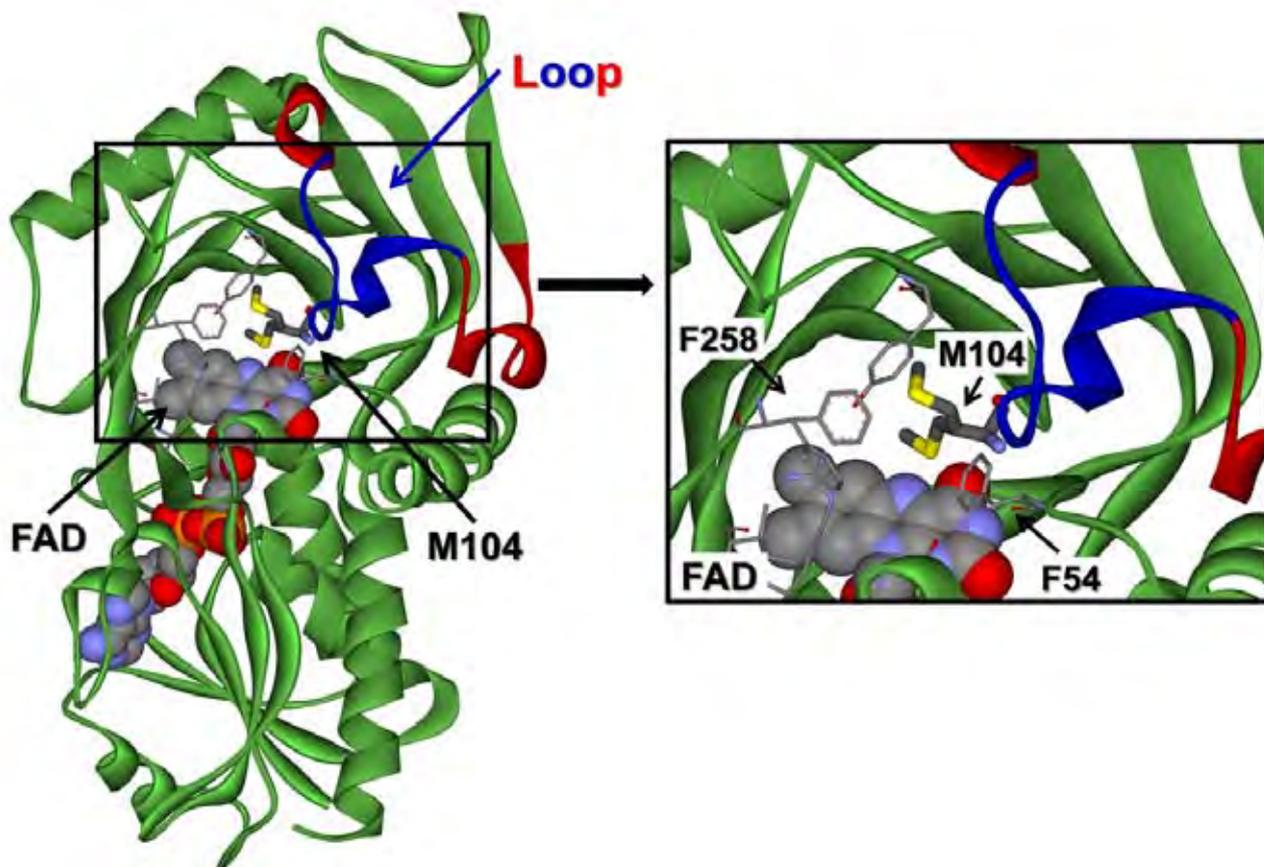


Рис. 4.3. Активный центр TvDAAO и расположение остатка Met104.

Для поиска таких аминокислотных остатков, был проведен анализ строения активного центра TvDAAO и участка соединительной петли с 99 по 110 остаток, который отсутствует у других DAAO. В результате нами был выявлен остаток Met104, который располагается на изгибе вышеупомянутой петли на входе в активный центр фермента и не принимает непосредственного участия в процессе катализа (рис. 4.3) Данный остаток является конформационно подвижным и присутствует в кристаллической структуре в двух конформациях. Стоит отметить, что на входе в активный центр TvDAAO также располагаются два остатка Phe54 и Phe258, последний из которых также имеет две возможные конформации. Оба этих остатка были изучены нами ранее и была показана их важная роль в свойствах TvDAAO: замены в обоих положениях приводили к сужению спектра субстратной специфичности, увеличению активности с объемными гидрофобными D-аминокислотами и цефалоспорином C, однако отрицательно сказывались на стабильности TvDAAO [56,57]. Таким образом, остаток Met104 может играть

важную роль в каталитических свойствах и стабильности фермента, взаимодействуя с субстратами при их связывании в активном центре и экранируя активный центр от растворителя. Исходя из всего вышеописанного, нами было решено изучить влияние замен остатка Met104 на каталитические свойства и температурную стабильность TvDAAO.

Поскольку остаток Met104 расположен на входе в активный центр, нами были выбраны аминокислотные замены, которые имеют различный объем, форму и гидрофобность, а также замены, несущие положительный и отрицательный заряд. Как было отмечено выше, в районе остатка Met104 в TvDAAO в большинстве аминокислотных последовательностей имеется разрыв (рис. N). Исключением являются шесть наиболее эволюционно близких последовательностей DAAO, пять из которых имеют остаток Phe (ферменты из *F. solani*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *C. posadasii*) и одна имеет остаток Leu (фермент из *N. crassa*) в соответствующем положении. Нами было проведено компьютерное моделирование структуры мутантных TvDAAO с различными заменами в 104м положении. В качестве примера на рис. 4.4 представлен активный центр фермента дикого типа и модельные структуры мутантных TvDAAO с заменами M104A и M104F. Остаток Met104 может взаимодействовать с остатками Phe54 и Phe258, поскольку находится на расстоянии 4,5Å от них и является конформационно-подвижным. Из рис. 4.4 хорошо видно, что при введении замены M104A активный центр фермента становится более открытым и доступным растворителю, а также пропадают стерические препятствия, которые возможны при связывании объемных субстратов в активном центре фермента. Обратная картина наблюдается при введении замены M104F. Активный центр сильнее экранирован от доступа растворителя, при этом возможны взаимодействия Phe104 с соседними остатками Phe54 и Phe258. Однако дополнительные стерические препятствия могут отрицательно сказаться на каталитических свойствах фермента с объемными субстратами.

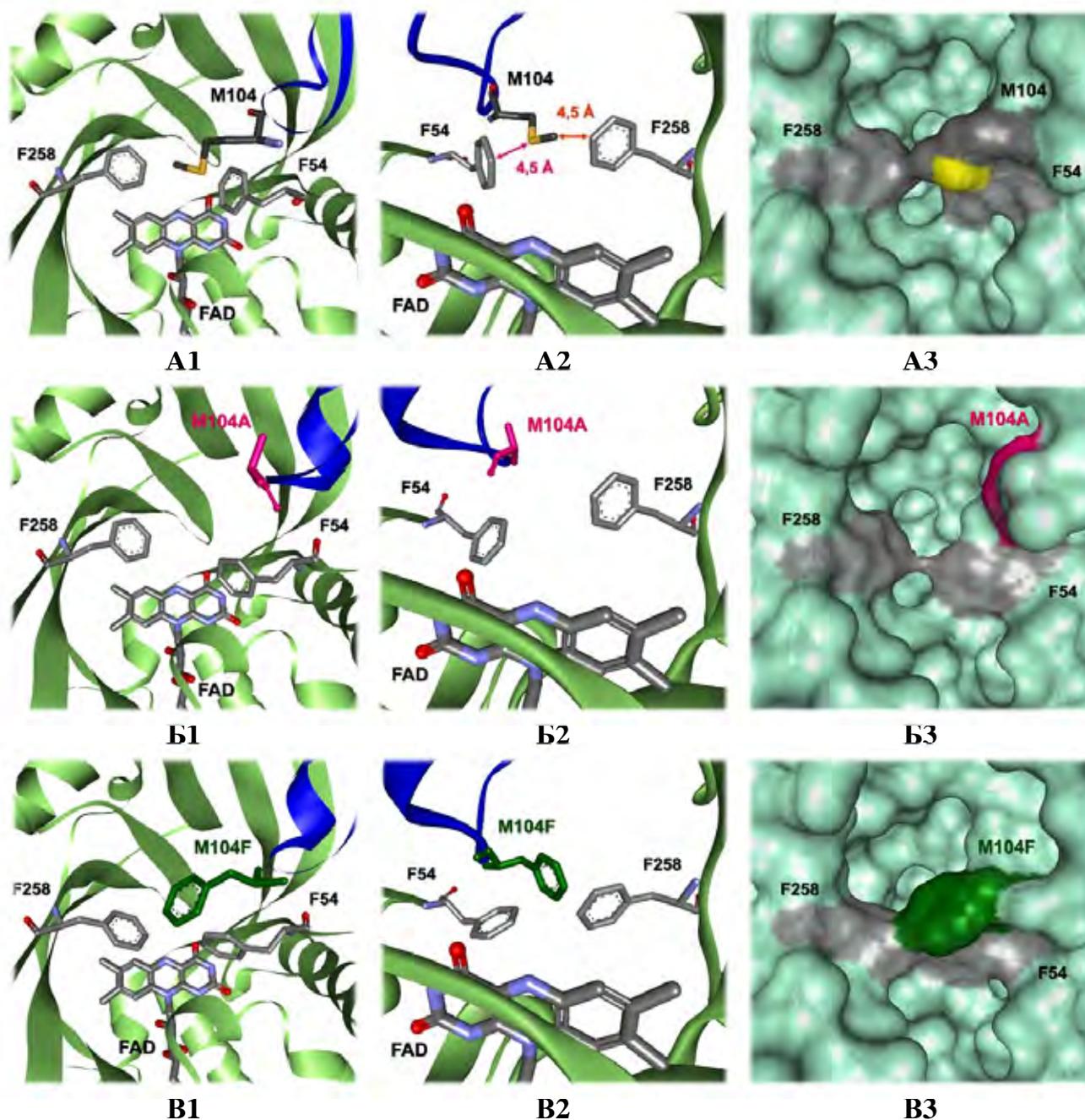


Рис. 4.4. Компьютерное моделирование замен остатка M104 в структуре TvDAAO. Активный центр TvDAAO дикого типа (A), TvDAAO M104A (Б), TvDAAO M104F (В). 1 – вид спереди на активный центр, 2 – вид из активного центр, 3 – вид спереди, голубым цветом показана поверхность доступная растворителю.

Таким образом, в результате подробного анализа структуры TvDAAO, множественного аминокислотного выравнивания последовательностей DAAO из различных источников и компьютерного моделирования было выбрано 10 аминокислотных замен остатка Met104 на остатки Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp, Glu и Lys.

4.1.2. Получение мутантных TvDAAO с заменами в 104 положении

Направленный мутагенез остатка Met104 проводили с помощью полимеразной цепной реакции (см. пункт 3.2.2). Для введения мутаций в ген *daao* использовали универсальные олигонуклеотидные праймеры на начало и конец участка гена соответственно:

T7_For 5' -ТААТАСГАСТСАСТАТАGГГ-3'

T7_Rev 5' -GСТАGТТАТТGСТСАGСGГ-3'

а также соответствующие прямой (Mfor) и обратный (Mrev) праймеры, несущие требуемые замены в гене *tvdaao* (табл. 4.1).

Фрагменты генов, полученные с помощью ПЦР, очищали в 1% агарозном геле (см. пункты 3.2.3, 3.2.4), обрабатывали рестриктазами NcoI и Bsp119I (AsuII) (см. пункт 3.2.5) и лигировали в плазмидный вектор pTvDAAO (см. пункт 3.2.6), из которого с помощью тех же рестриктаз предварительно был удален соответствующий фрагмент без мутации. Реакционной смесью, полученной после проведения реакции лигирования, трансформировали клетки *E.coli* DH5α и клетки высевали на чашки Петри с твердой агаризованной средой 2YT, содержащей 30 мг/мл канамицина (см. пункт 3.2.7). С каждой чашки брали по 3 колонии и выделяли из них плазмиды (см. пункт 3.2.8), которые затем были использованы для секвенирования гена *tvdaao* по обеим цепям. На основе секвенирования были отобраны те плазмиды, которые содержали только необходимые замены в 104м положении и не имели других посторонних мутаций (см. пункт 3.2.9).

Плазмидами, которые содержат мутации в гене *tvdaao*, соответствующее заменам в 104м положении, трансформировали компетентные клетки *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Codon Plus. Затем было проведено культивирование клеток *E.coli* и экспрессия мутантных TvDAAO и фермента дикого типа согласно методике, оптимизированной в нашей лаборатории (см. пункт 3.2.10). Результаты культивирования представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.1.

Олигонуклеотидные праймеры для введения мутаций в ген *tvdaao* в положение, соответствующее 104 остатку в структуре TvDAAO.

Замена		Нуклеотидная последовательность*
Исходная послед-ть	For	5' – AA GGT GCC <u>ATG</u> TCG GCC ATC TGT CAA CGC AAC –3'
	Rev	5' – TTG ACA GAT GGC CGA <u>CAT</u> GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG A –3'
M104A	Mfor	5' – AA GGT GCC GCG TCG GCC ATC TGT CAA CGC AA –3'
	Mrev	5' – AT GGC CGA GGC GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG AT –3'
M104S	Mfor	5' – GAA GGT GCC AGT TCG GCC ATC TGT CAA CGC AAC –3'
	Mrev	5' – CA GAT GGC CGA ACT GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG AT –3'
M104V	Mfor	5' – GAA GGT GCC GTG TCG GCC ATC TGT CAA CGC A –3'
	Mrev	5' – A GAT GGC CGA CAC GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG AT –3'
M104I	Mfor	5' – GAA GGT GCC ATC TCG GCC ATC TGT CAA CGC AAC –3'
	Mrev	5' – CA GAT GGC CGA GAT GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG AT –3'
M104L	Mfor	5' – TG GAA GGT GCC TTG TCG GCC ATC TGT CAA CGC –3'
	Mrev	5' – ACA GAT GGC CGA CAA GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG AT –3'
M104F	Mfor	5' – GAA GGT GCC TTC TCG GCC ATC TGT CAA CGC AAC –3'
	Mrev	5' – ACA GAT GGC CGA GAA GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG AT –3'
M104Y	Mfor	5' – GAA GGT GCC TAC TCG GCC ATC TGT CAA CGC AAC –3'
	Mrev	5' – ACA GAT GGC CGA GTA GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG AT –3'
M104W	Mfor	5' – GAA GGT GCC TGG TCG GCC ATC TGT CAA CGC A –3'
	Mrev	5' – A GAT GGC CGA CCA GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG AT –3'
M104E	Mfor	5' – GAA GGT GCC GAG TCG GCC ATC TGT CAA CGC –3'
	Mrev	5' – GAT GGC CGA CTC GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG –3'
M104K	Mfor	5' – G GAA GGT GCC AAG TCG GCC ATC TGT CAA CGC –3'
	Mrev	5' – CA GAT GGC CGA CTT GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG –3'

* Подчеркиванием показан исходный кодон, соответствующий Met104. Полу жирным шрифтом выделены нуклеотидные замены, обеспечивающие мутации.

Все мутантные TvDAAO с заменами в 104м положении и фермент дикого типа экспрессировались в активной и растворимой форме. При культивировании всех ферментов наблюдался близкий выход биомассы, однако выходы по активности отличались друг от друга. Это связано, главным образом, с более низким выходом активного растворимого фермента, а также с изменением удельной активности с D-метионином, который использовали для измерения активности ферментов. В случае мутантной TvDAAO M104F наблюдался наименьший выход растворимого белка, в то время как самый большой выход имел TvDAAO M104E. Таким образом, вводимые замены в среднем приводят к снижению уровня экспрессии мутантных TvDAAO.

Таблица 4.2.

Результаты экспрессии (в клетках *E.coli*) и очистки мутантных TvDAAO с заменами в 104 положении и фермента дикого типа.

Форма TvDAAO	Культивирование			Очистка			
	Выход биомассы, г/л	Выход активного фермента, Ед/л*	Выход раств. фермента, мг/л	Выход по активности после очистки, %	Концентрация фермента, мкг/мл	Удельная активность, Ед/мг	Отношение поглощения A_{280}/A_{455}
Дикий тип	15,3	11800	84	55	95	140	8,3
M104A	14,6	6500	78	64	133	83	9,2
M104S	15,1	6700	56	63	92	120	9,0
M104V	15,8	7100	46	70	81	155	9,5
M104I	14,6	7200	61	75	95	119	8,4
M104L	14,6	7100	39	98	126	180	8,6
M104F	16,3	5000	38	72	86	130	8,5
M104Y	15,6	4300	49	71	79	87	8,7
M104W	15,6	7700	58	62	64	132	9,7
M104E	13,7	8900	88	83	85	101	10,0
M104K	12,6	5600	72	76	111	78	8,7
Del_99-110	15,6	1200	24	18	10,2	50	29,6

*Активность ферментов определяли по D-метионину

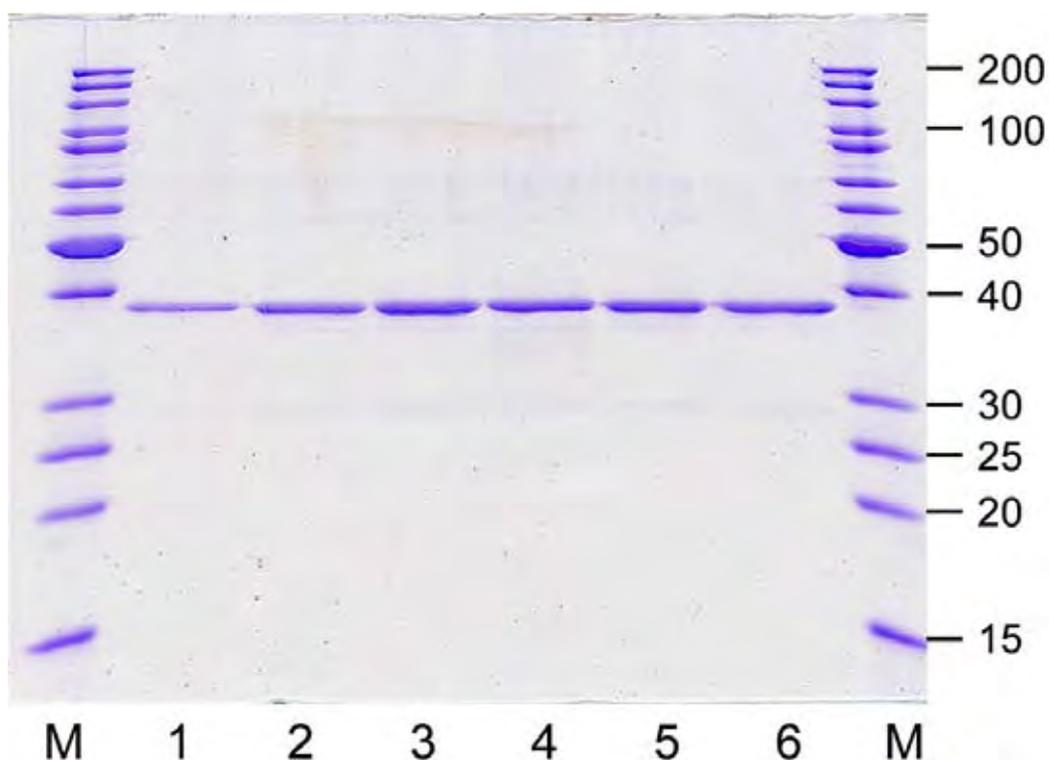


Рис. 4.5. Белковый электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов TvDAAO после очистки. 1 – TvDAAO M104A, 2 – TvDAAO M104I, 3 – TvDAAO M104L, 4 – TvDAAO M104S, 5 – TvDAAO M104V, 6 – TvDAAO дикого типа, М – маркер (мол. массы указаны в кДа).

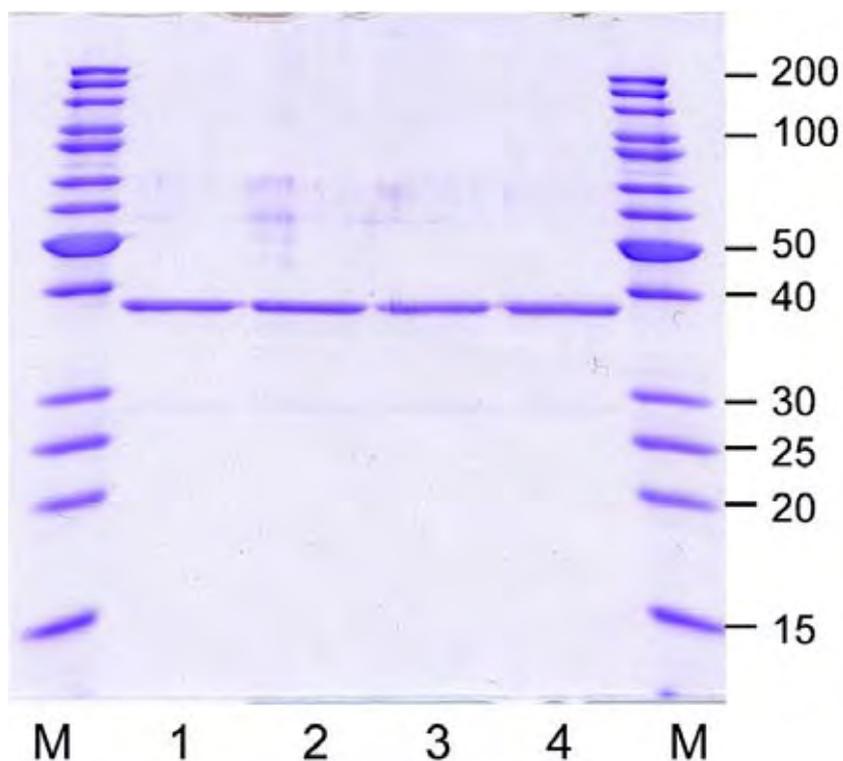


Рис. 4.6. Белковый электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов TvDAAO после очистки. 1 – TvDAAO M104F, 2 – TvDAAO M104Y, 3 – TvDAAO M104W, 4 – TvDAAO дикого типа, М – маркер (мол. массы указаны в кДа).

Очистка всех мутантных TvDAAO и фермента дикого типа была проведена с помощью анионообменной хроматографии на колонке MonoQ и обессоливания на колонке G25 (см. пункт 3.2.11). Аналитический SDS-электрофорез в полиакриламидном геле показал, что все препараты ферментов были получены в высокоочищенном виде и имели чистоту не менее 95% (рис. 4.5 и рис. 4.6). Результаты очистки и параметры образцов TvDAAO, которые были использованы для изучения свойств, представлены в таблице 4.2.

Далее для полученных очищенных мутантных TvDAAO и фермента дикого типа были изучены свойства – субстратная специфичность и температурная стабильность.

4.1.3. Каталитические свойства мутантных TvDAAO с заменами в 104 положении

Для получения профилей субстратной специфичности мутантных TvDAAO с заменами в 104м положении и фермента дикого типа нами были определены константы Михаэлиса (K_M) и каталитические константы (k_{cat}) с различными D-аминокислотами для всех полученных ферментов. Для этого были изучены зависимости активности ферментов от концентрации различных D-аминокислот. Полученные зависимости представляли собой классические кривые Михаэлиса-Ментен. Типичный пример такой зависимости приведен на рис. 4.7 для мутантной TvDAAO M104F с D-метионином. Полученные экспериментальные данные аппроксимировали гиперболической функцией методом нелинейной регрессии с помощью программы Origin Pro 8.5. В результате получали значения K_M и V_m . Используя значения V_m и концентрацию активного фермента (см. пункты 3.2.13, 3.2.14), рассчитывали значение k_{cat} . Затем для каждого субстрата была рассчитана каталитическая эффективность фермента – отношение величины k_{cat} к K_M . Значения k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M для мутантных TvDAAO и фермента дикого типа приведены в таблицах 4.3-4.5. Для наглядности, зеленым цветом и полужирным шрифтом выделено улучшение соответствующих кинетических параметров по сравнению с ферментом дикого типа.

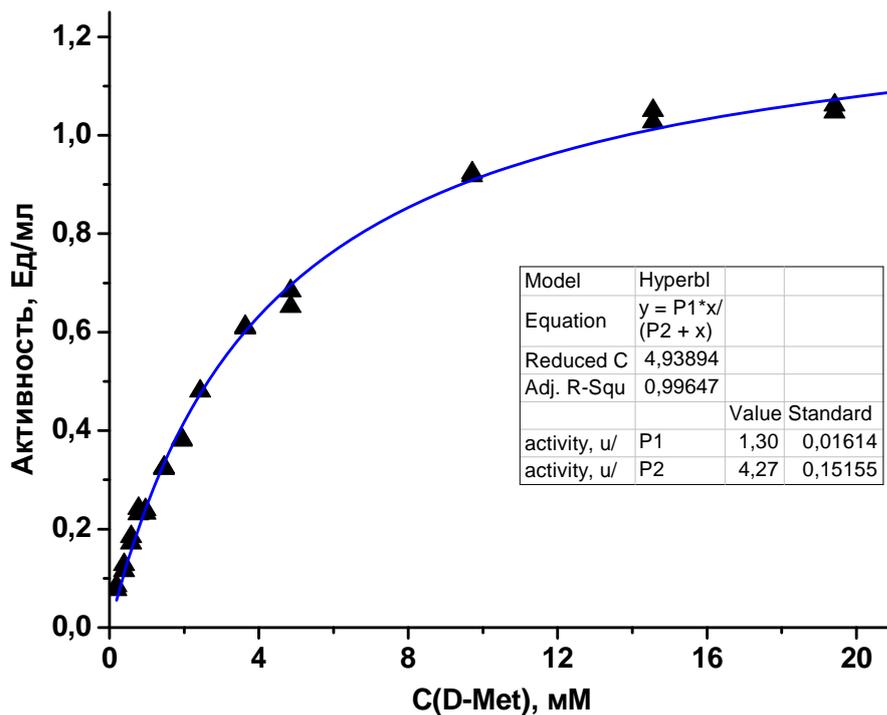


Рис. 4.7. Типичная зависимость активности мутантной TvDAAO M104F от концентрации субстрата (D-метионина). Концентрация фермента 10 мкг/мл. 50 мМ КФБ, pH 8,0, 30 °С. Аппроксимация экспериментальных данных гиперболической функцией.

Для наглядности на рис. 4.8-4.11 представлены относительные значения констант Михаэлиса ($K_M^{mut}/K_M^{wt} \cdot 100\%$), относительные значения каталитических констант ($k_{cat}^{mut}/k_{cat}^{wt} \cdot 100\%$), относительные значения каталитической эффективности ($(k_{cat}/K_M)^{mut}/(k_{cat}/K_M)^{wt} \cdot 100\%$) и абсолютные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M^{mut}) для мутантных TvDAAO и фермента дикого типа. Улучшению K_M соответствует ее уменьшение (меньше 100%), а положительному эффекту в случае k_{cat} и k_{cat}/K_M соответствует их увеличение (больше 100%).

Таблица 4.3.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами M104A, M104S, M104V и фермента дикого типа.

Субстрат	Форма TvDAAO											
	Дикий тип			M104A			M104S			M104V		
	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹
D-Met	0,46±0,03	81±1	175	1,42±0,05	55±1	38	1,47±0,04	78±1	53	1,99±0,10	101±3	51
D-Ala	16,7±0,7	109±2	6,5	48±6	10,6±0,7	0,22	38±4	12,4±0,7	0,32	48±3	20,3±0,8	0,42
D-Val	14,4±1,2	85±3	5,9	29,7±1,4	9,0±0,3	0,30	40±3	14,4±0,5	0,36	99±11	45,8±3,9	0,46
D-Leu	0,78±0,02	29,1±0,3	37	0,14±0,01*	20,1±0,3	142	0,40±0,02	35,2±0,5	89	0,65±0,03	53±2	82,6
D-Ser	37±4	20,5±0,9	0,56	15,8±1,1	1,78±0,04	0,11	26,7±1,9	2,16±0,07	0,08	46±8	2,59±0,22	0,06
D-Phe	0,37±0,04	27,2±0,8	74	0,62±0,06	51±2	82	0,67±0,04	52±1	78	0,73±0,05	53±2	73
D-Tyr	0,45±0,06	22,5±1,9	50	0,62±0,06	24,1±1,6	39	0,49±0,10	27,2±3,6	55	0,58±0,10	22,3±2,7	39
D-Trp	0,49±0,04	42,4±1,4	87	0,41±0,02	32,6±0,6	80	0,30±0,03	32,0±1,4	106	0,78±0,07	45,6±2,5	58
D-Asn	22,6±1,5	62±2	2,8	10,0±0,7	34,8±0,9	3,5	16,7±0,7	39,9±0,7	2,4	18,6±0,8	42,2±0,8	2,3
D-Thr	11,1±0,8	1,75±0,04	0,16	нет активности			нет активности			нет активности		
D-Lys	29,3±3,4	3,54±0,21	0,12	17,5±0,9	5,9±0,2	0,34	нет активности			нет активности		

Таблица 4.4.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами M104I, M104L, M104E, M104K.

Субстрат	Форма TvDAAO											
	M104I			M104L			M104E			M104K		
	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹
D-Met	1,48±0,03	78±1	53	1,02±0,03	118±2	116	0,60±0,02	66±1	111	2,28±0,12	51±1	22,4
D-Ala	36±4	15,0±0,8	0,42	80±5	170±10	2,1	33,4±2,6	15,0±0,6	0,45	86±12	8,3±0,8	0,10
D-Val	80±6	45,0±2,0	0,57	35±1	160±10	4,5	27,0±1,9	14,6±0,5	0,54	91±9	10,1±0,6	0,11
D-Leu	0,48±0,02	38,0±0,7	79	0,23±0,01	34,9±0,4	153	0,15±0,01	34,0±0,4	230	0,67±0,05	21,0±0,6	31
D-Ser	37±3	1,87±0,05	0,05	48±5	6,3±0,4	0,13	н.д.**	2,00±0,20	н.д.	нет активности		
D-Phe	0,49±0,03	34,9±0,6	72	0,33±0,03	36,6±0,7	112	0,37±0,02	65±1	179	1,41±0,10	55±2	39
D-Tyr	0,60±0,05	20,8±1,3	35	0,27±0,02	19,2±0,9	71	0,47±0,06	31,7±2,4	67	1,50±0,46	40,7±10,5	27,2
D-Trp	0,48±0,03	29,8±0,8	62	0,29±0,03	50±3	170	0,34±0,02	51±2	149	0,67±0,05	31,5±1,3	47
D-Asn	14,6±0,9	36,0±0,9	2,5	15,5±0,7	45,1±0,9	2,9	18,0±0,8	55,1±1,0	3,06	31±4	29,5±1,7	0,95
D-Thr	нет активности			нет активности			нет активности			нет активности		
D-Lys	25,2±2,6	2,27±0,41	0,09	нет активности			88,3±22,1	63±12	0,71	н.д.	1,30±0,20	н.д.

Таблица 4.5.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами M104F, M104Y, M104W и TvDAAO Del_99-110.

Субстрат	Форма TvDAAO											
	M104F			M104Y			M104W			Del_99-110		
	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹
D-Met	4,30±0,15	80±1	18,6	2,09±0,07	57±1	27,2	3,18±0,08	86±1	27,1	0,80±0,06	32,7±0,8	41
D-Ala	27,7±1,2	159±4	5,7	40±4	19,5±1,0	0,48	14,5±1,2	93±3	6,4	45±7	5,1±0,5	0,11
D-Val	21,5±0,6	105±2	4,9	60±6	25,2±1,4	0,42	31±2	62±2	2,0	18,8±2,4	3,06±0,16	0,16
D-Leu	1,37±0,06	22,1±0,3	16,2	1,02±0,05	22,7±0,5	22,3	0,82±0,03	22,9±0,4	28,1	0,14±0,01	10,8±0,2	80
D-Ser	38,2±1,3	64±1	1,7	24,3±1,1	29,4±0,5	1,21	25,4±1,6	17,3±0,4	0,68			
D-Phe	1,05±0,05	14,2±0,3	13,5	0,86±0,04	24,2±0,4	28,3	0,99±0,05	23,6±0,3	23,9	1,35±0,11	46±2	34
D-Tyr	2,26±0,8	18,5±5,8	8,2	1,69±0,41	8,6±2,6	5,11	1,03±0,23	9,2±2,9	8,9	0,44±0,06	17,2±1,6	39
D-Trp	0,78±0,06	15,5±0,5	19,9	0,44±0,03	17,1±0,4	39	0,58±0,03	15,1±0,3	25,8	2,1±0,3	15,1±1,0	7,2
D-Asn	68,4±5,8	73±5	1,1	5,7±0,3	19,7±0,3	3,4	21,9±2,0	17,9±0,8	0,82	37±8	23,4±2,6	0,63
D-Thr	нет активности			нет активности			нет активности					
D-Lys	нет активности			нет активности			нет активности			н.д.	6,5±1,0	н.д.

* - Зеленым фоном и полужирным шрифтом выделено случаи улучшения каталитических параметров мутантных TvDAAO по сравнению с таковыми для фермента дикого типа

** - нет данных

Из таблиц 4.3-4.5 и рис. 4.8-4.11 следует, что введение различных замен в 104е положение в области активного центра привело к получению мутантных форм фермента с различным профилем субстратной специфичности. Все мутантные ферменты неактивны с D-Thr, активность с D-Lys сохранили только TvDAAO M104A и M104I. В целом, мутантные TvDAAO с алифатических заменами M104A, M104S, M104V, M104I имеют весьма схожие профили каталитической эффективности – для всех четырех ферментов наблюдается снижение каталитической эффективности с небольшими субстратами (D-Ala, D-Val, D-Ser), что связано как с увеличением K_m , так и со снижением каталитической активности с этими субстратами, в то время, как с объемными алифатическими и ароматическими субстратами каталитическая эффективность этих мутантов практически не изменилась или увеличилась (с D-Leu) по сравнению с ферментом дикого типа. По отдельным мутантам можно выделить следующие моменты.

TvDAAO M104A имеет существенно более низкую каталитическую активность с D-Ala, D-Val, D-Ser. Значения k_{cat} для этих субстратов уменьшились в среднем в 10 раз. Наблюдается улучшение K_m с D-Leu (в 5,5 раз), D-Ser (в 2,3 раза), D-Asn (в 2,3 раза) и D-Lys (в 1,7 раза). Каталитическая активность возросла с D-Phe и D-Lys почти в 2 раза в обоих случаях. Фермент неактивен с D-Thr, но активен с D-Lys.

TvDAAO M104S обладает более высокой каталитической активностью с D-Phe (почти в 2 раза). Также наблюдается небольшое улучшение в активности с D-Leu и D-Trp. Так же, как и TvDAAO M104A, данный фермент имеет более низкую каталитическую активность с D-Ala, D-Val, D-Ser. Значения K_m улучшились с D-Leu (в 2 раза), D-Ser (в 1,4 раза), D-Trp (в 1,7 раза) и D-Asn (в 1,3 раза). Фермент неактивен с D-Thr и D-Lys.

TvDAAO M104V обладает наибольшей активностью с D-Leu (увеличение в 1,8 раза) среди всех полученных мутантов. Фермент имеет повышенную активность с D-Met (в 1,2 раза) и D-Phe (в 2 раза). Кроме того, немного улучшились значения K_m с D-Leu и D-Asn. С D-Thr и D-Lys фермент неактивен.

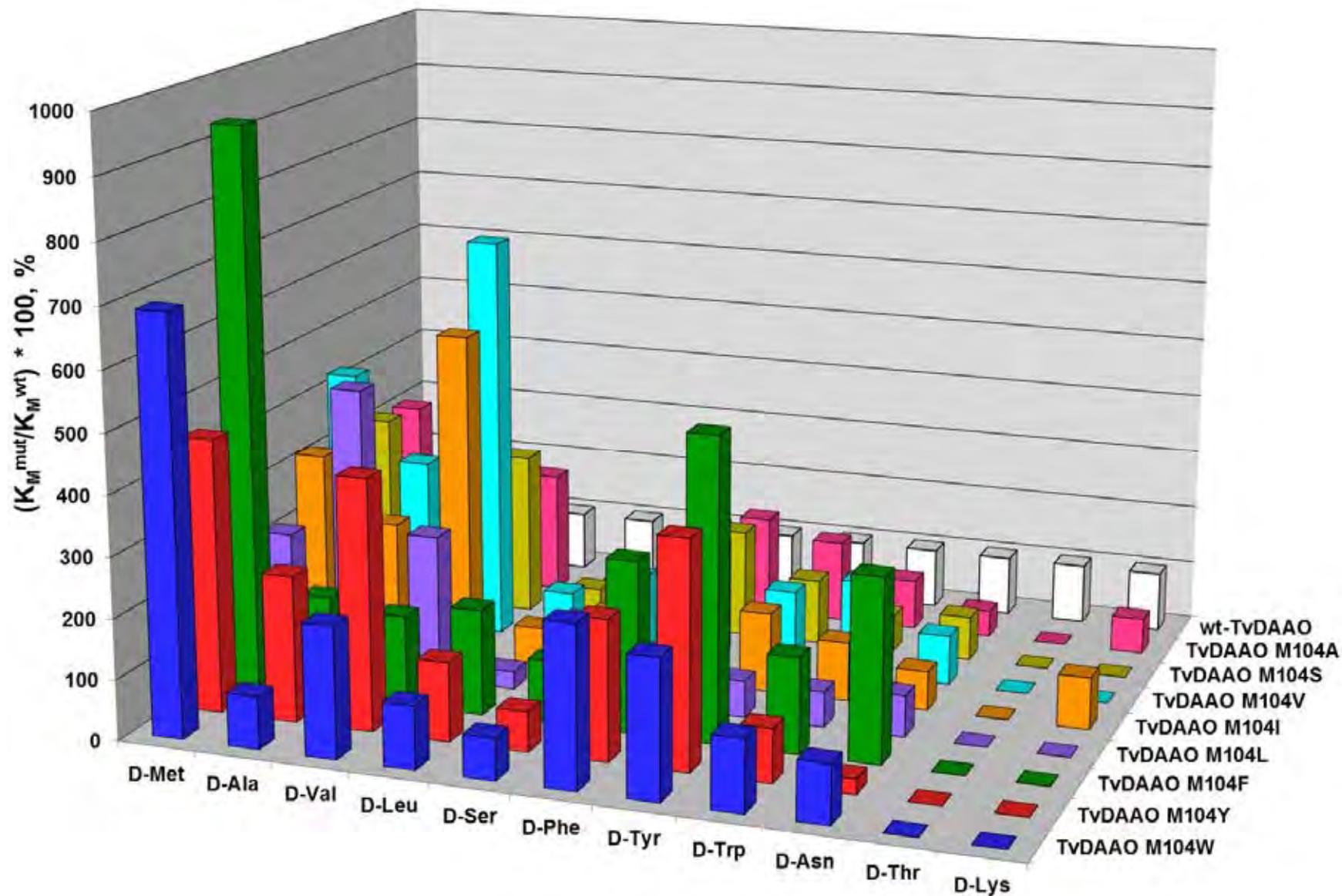


Рис. 4.8. Относительные значения констант Михаэлиса (K_M) для мутантных TvDAAO с заменами Met104 на Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp. За 100% приняты значения K_M фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

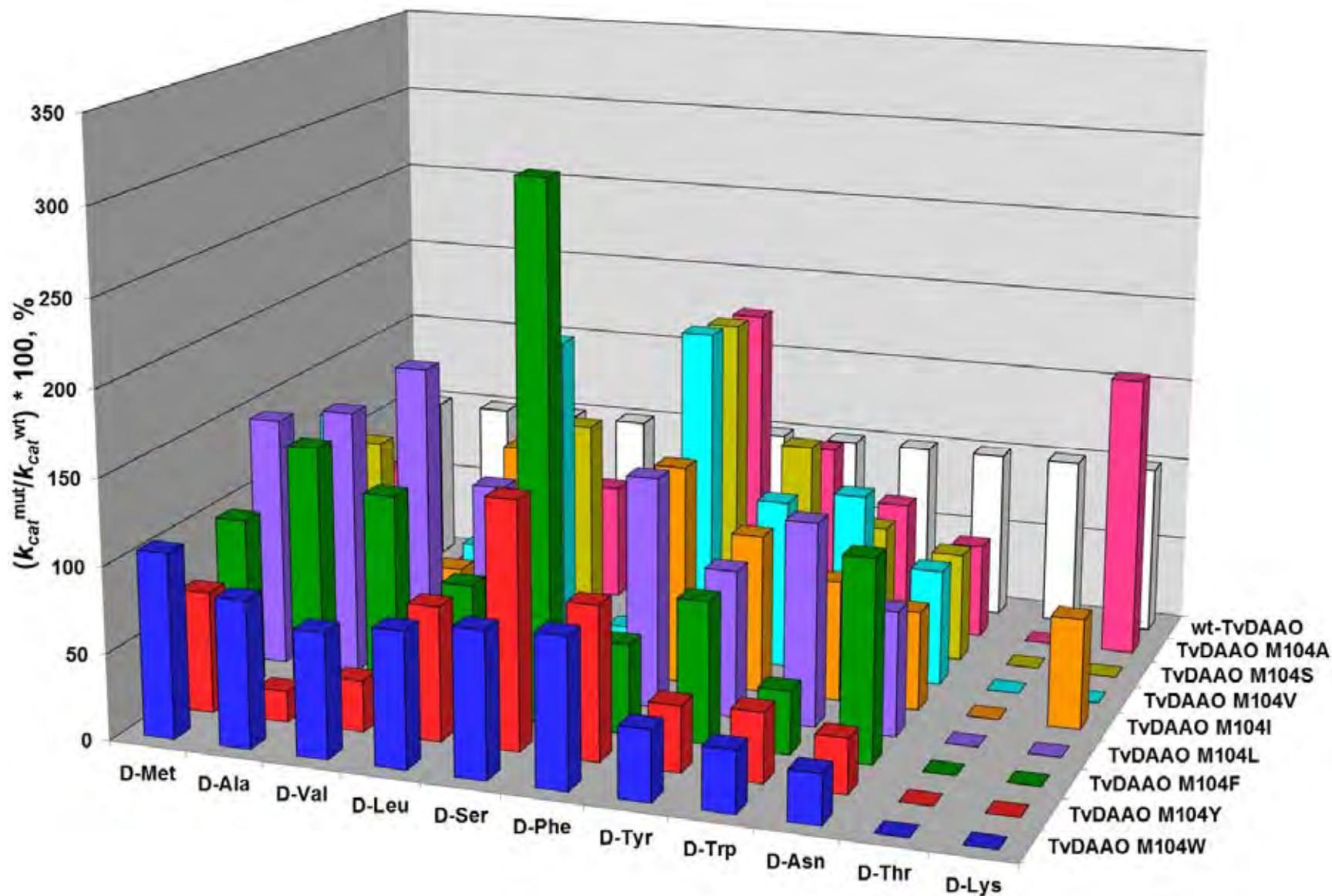


Рис. 4.9. Относительные значения каталитических констант (k_{cat}) для мутантных TvDAAO с заменами Met104 на Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp. За 100% приняты значения k_{cat} фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

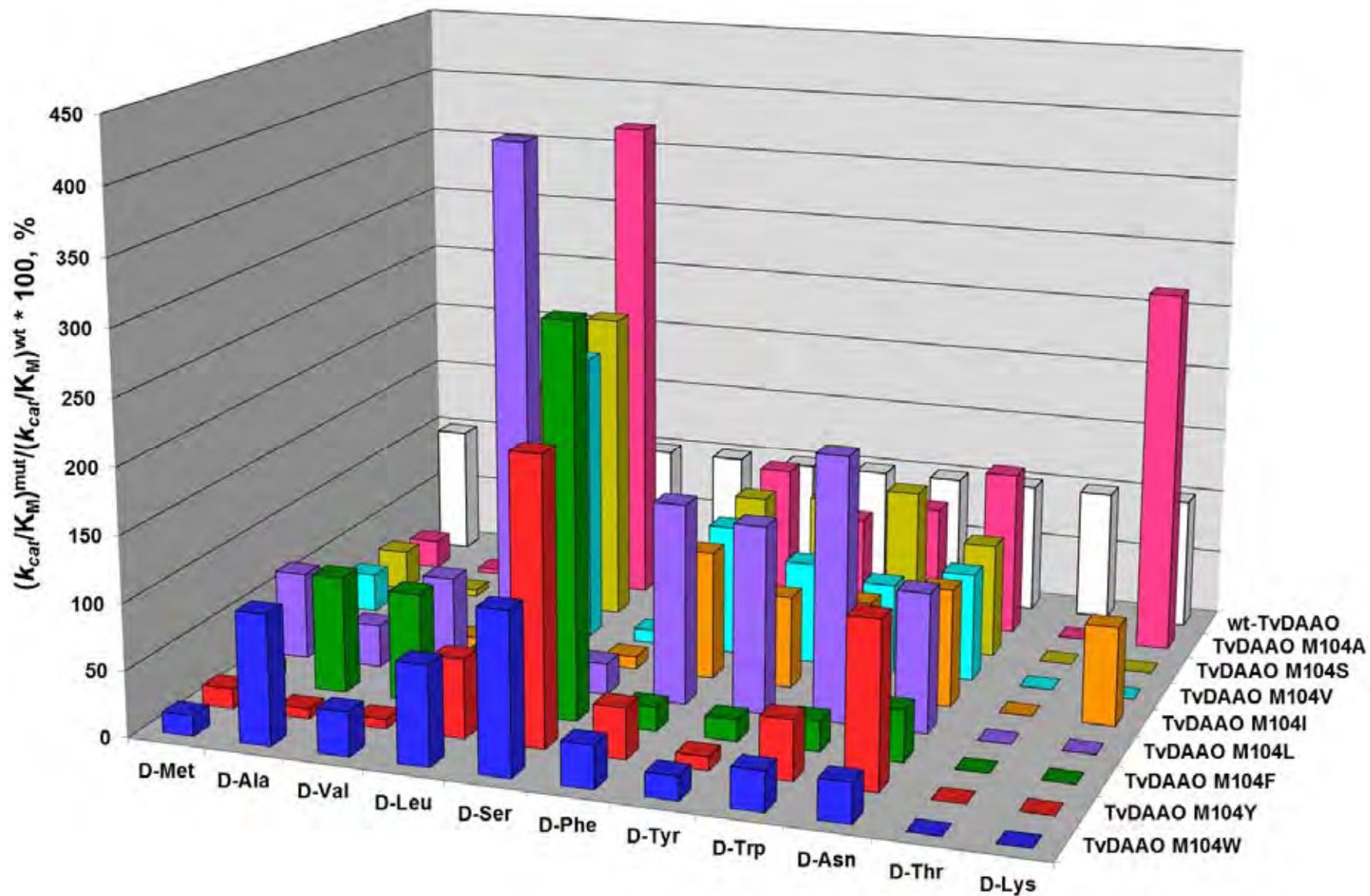


Рис. 4.10. Относительные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с заменами Met104 на Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp. За 100% принята каталитическая эффективность фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

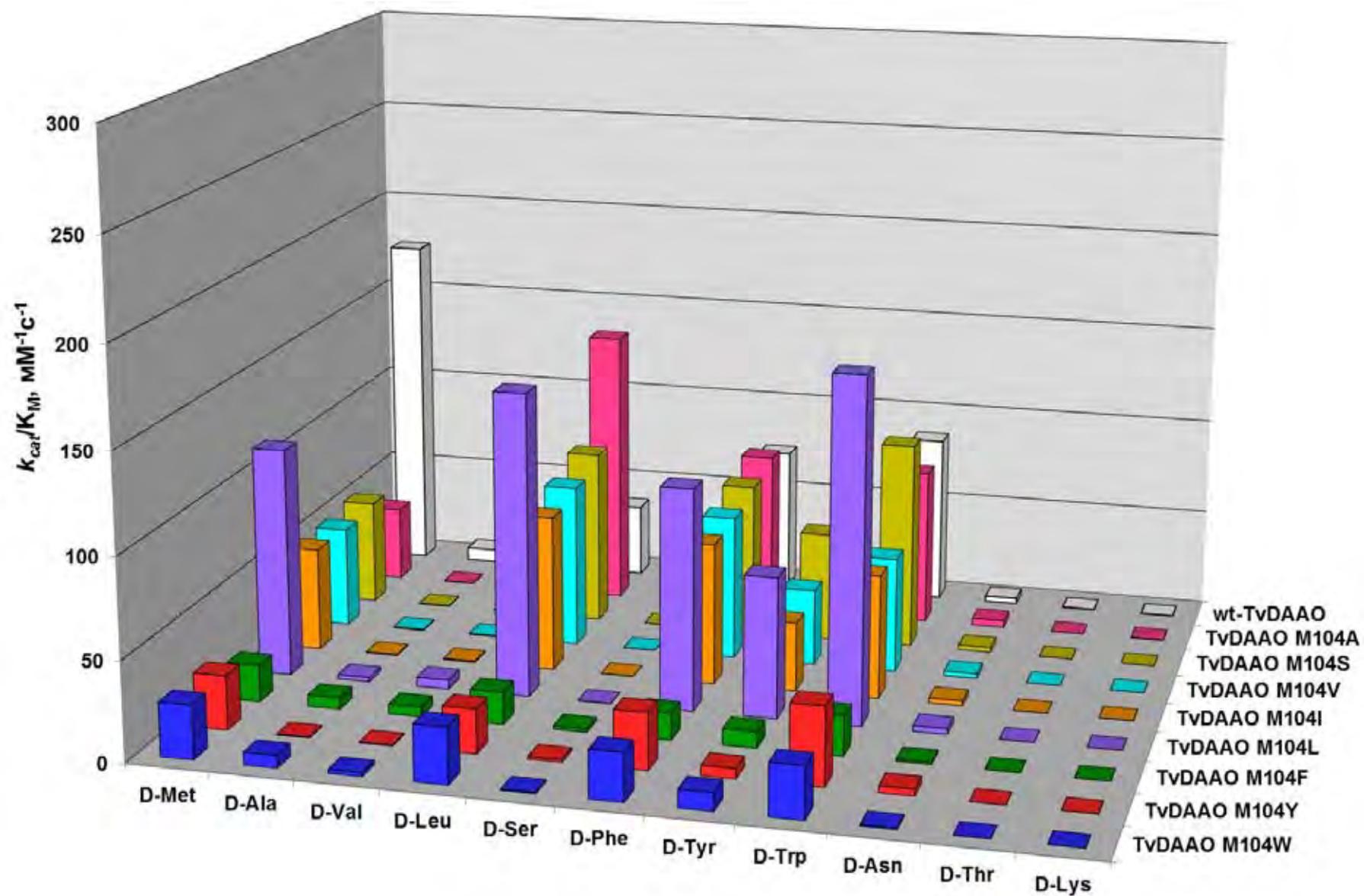


Рис. 4.11. Абсолютные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с заменами Met104 на Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp.

TvDAAO M104I имеет повышенную активность с D-Leu (в 1,3 раза) и D-Phe (в 1,3 раза). Фермент неактивен с D-Thr, но активен с D-Lys.

TvDAAO M104L обладает наилучшей каталитической активностью среди полученных мутантов со многими субстратами, за исключением отсутствия активности D-Thr и D-Lys. Значения k_{cat} увеличились с D-Met (в 1,5 раза), D-Ala (в 1,5 раза), D-Val (в 1,9 раза), D-Leu (в 1,2 раза), D-Phe (в 1,3 раза) и D-Trp (в 1,2 раза). Однако стоит отметить, что произошло возрастание значений K_m с D-Met (в 2,2 раза), D-Ala (в 4,8 раза), D-Val (в 2,4 раза).

TvDAAO M104F обладает повышенной каталитической активностью с D-Ala (в 1,5 раза), D-Val (в 1,2 раза) и D-Asn (в 1,2 раза). С D-Thr и D-Lys фермент неактивен. Стоит отметить, что среди полученных мутантов этот фермент является наиболее активным с D-Ser – значение K_m не изменилось, а k_{cat} увеличилась в 3 раза по сравнению с диким типом. В целом каталитическая эффективность снизилась со многими субстратами за счет увеличения значений K_m .

TvDAAO M104Y имеет наименьшую каталитическую эффективность со многими субстратами среди всех полученных мутантов в 104м положении. С D-Thr и D-Lys фермент неактивен. Улучшение наблюдается только в случае D-Ser (K_m снизилась в 1,5 раза, k_{cat} выросла в 1,4 раза). Таким образом, введение гидроксильной группы, в сравнении с заменой M104F, приводит к еще большему ухудшению каталитической активности фермента.

TvDAAO M104W имеет более низкую активность и более высокие значения K_m с ароматическими D-аминокислотами, с остальными субстратами активность сравнима с таковой для дикого типа, однако в некоторых случаях наблюдается некоторое падение каталитической эффективности за счет небольшого роста значений K_m . С D-Thr и D-Lys фермент неактивен.

Таким образом, введение объемных ароматических замен M104F, M104Y и M104W в среднем выразилось в увеличении значений K_m с объемными субстратами и увеличении каталитической активности с небольшими субстратами, что в конечном счете привело к соответствующему изменению каталитической эффективности. Замена M104L, с точки зрения влияния на каталитические

свойства, является чем-то средним между небольшими алифатическими заменами (хорошая активность с объемными субстратами) и ароматическими заменами (хорошая активность с небольшими субстратами).

4.1.4. Температурная стабильность мутантных TvDAAO с заменами в 104 положении

Температурную стабильность мутантных TvDAAO изучали по кинетике термоинактивации при различных температурах и начальных концентрациях ферментов. На рис. 4.12 представлены зависимости остаточной активности полученных мутантов TvDAAO от времени при одинаковой концентрации ферментов (10 мкг/мл) и температуре 56°C. Как видно из рис. 4.12 замены M104A, M104S, M104V и M104I привели к снижению стабильности TvDAAO в различной степени. TvDAAO M104L по стабильности близка к ферменту дикого типа. В то же время, объемные ароматические замены M104F, M104Y и M104W приводят к заметной стабилизации фермента.

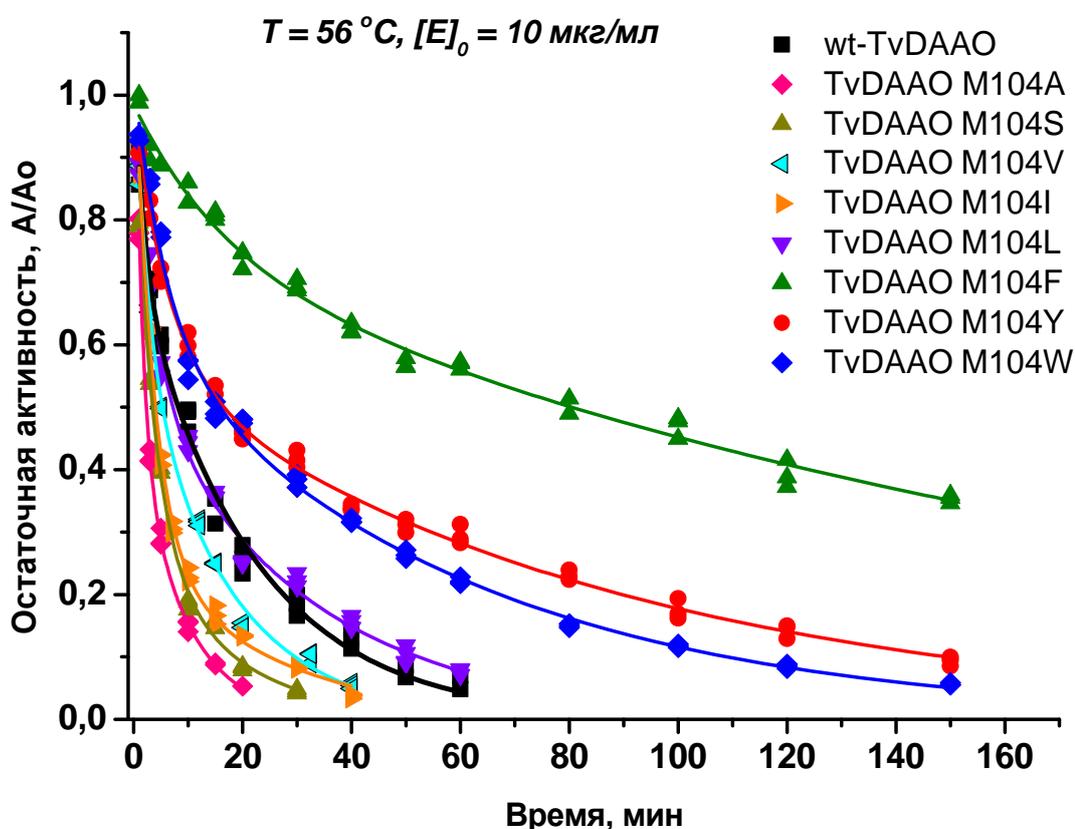


Рис. 4.12. Зависимости остаточной активности от времени мутантных TvDAAO с заменами M104A (♦, —), M104S (▲, —), M104V (◄, —), M104I (►, —), M104L (▼, —), M104F (▲, —), M104Y (●, —), M104W (◆, —) и TvDAAO дикого типа (■, —). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0, температура инкубации 56°C.

В предыдущих работах нашей лаборатории было неоднократно показано, что TvDAAO дикого типа и ее различные мутантные формы при повышенных температурах инактивируются в соответствии с диссоциативным механизмом термоинактивации, который был подробно описан в работах О.М. Полторака для некоторых других олигомерных белков [77,79,166,167]. Согласно этому механизму на первой стадии происходит обратимая диссоциация активного димера на неактивные мономеры, а на второй стадии субъединицы необратимо денатурируют (схема 1.1). Экспериментальные зависимости остаточной активности фермента от времени корректно описываются суммой двух экспоненциальных функций и скорость инактивации фермента зависит от его концентрации [56,57,76,168].

В качестве примера на рис. 4.13 представлена типичная зависимость остаточной активности от времени для мутантной TvDAAO M104F при 60°C. Данная зависимость аппроксимирована моноэкспоненциальной $a \times \exp(b \times x)$ и биэкспоненциальной $A \times \exp(-k_1 \times x) + B \times \exp(-k_2 \times x)$ функциями. Хорошо видно, что экспериментальные данные не могут быть корректно описаны простой экспоненциальной функцией и значительно лучше аппроксимируются суммой двух экспонент. Для подтверждения правомерности описания экспериментальных данных суммой двух экспоненциальных функций для термоинактивации мутантных форм TvDAAO была проверена достоверность аппроксимации моно- и биэкспоненциальными моделями в соответствии с критерием Фишера [169].

Для однопараметрических функций вида $y=f(x)$, критерий Фишера рассчитывается по формуле:

$$F_{\text{экс}} = \frac{S_{\text{ад}}^2}{S_{\text{ср}}^2},$$

где $S_{\text{ад}}^2$ – дисперсия адекватности, $S_{\text{ср}}^2$ – дисперсия среднего.

Дисперсия адекватности вычисляется по формуле:

$$S_{\text{ад}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i^{\text{экс}} - Y_i^{\text{расч}})^2}{N - m},$$

где $Y_i^{\text{экс}}$ – экспериментальные значения в i -ой точке, $Y_i^{\text{расч}}$ – расчетные значения в i -ой точке, N – количество экспериментальных точек, m – число коэффициентов в

уравнении. В случае аппроксимации моноэкспонентой $m = 2$, а в случае аппроксимации биэкспонентой $m=4$.

Для расчета дисперсии среднего использовали следующее выражение:

$$S_{cp}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i^{эксп} - Y_i^{cp})^2}{N - m},$$

где Y_i^{cp} – среднее значение в i -ой точке.

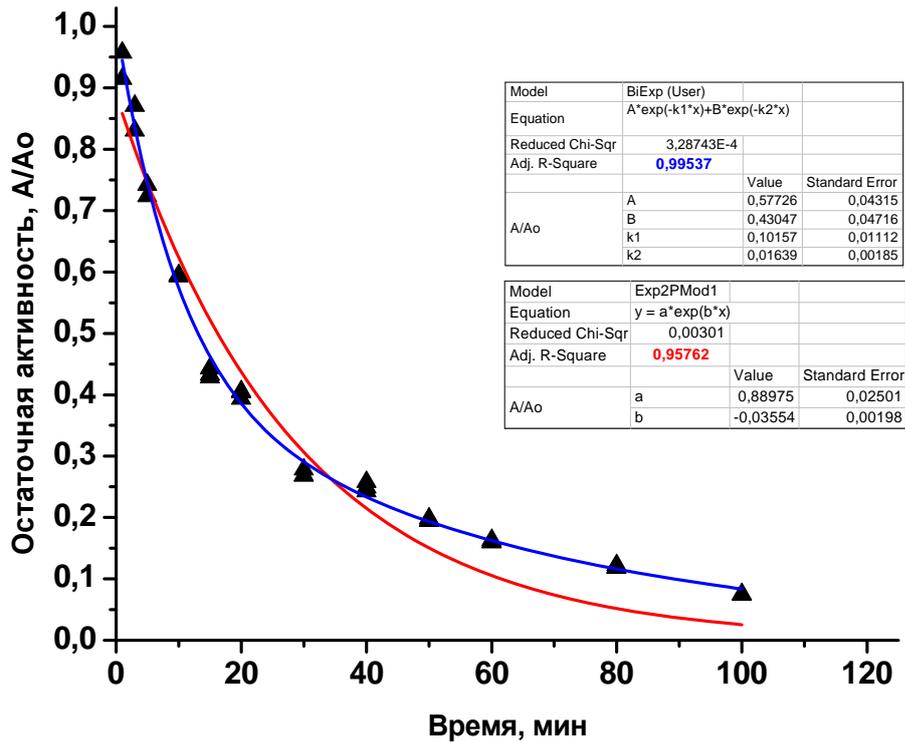


Рис. 4.13. Зависимость остаточной активности от времени мутантной TvDAAO M104F. Концентрация фермента 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0, температура инкубации 60°C. Аппроксимация экспериментальных данных моноэкспоненциальной (—) и биэкспоненциальной (—) функциями.

Аппроксимация является адекватной, если вычисленное значение коэффициента Фишера $F_{эксн}$ меньше теоретического значения $F_{теор}$. В таблице 4.6, в качестве примера, представлены результаты расчета статистических параметров для оценки адекватности аппроксимации зависимости остаточной активности от времени для мутантной TvDAAO M104F при 60 °C. Теоретический коэффициент $F_{теор}$ взят из таблицы распределения Фишера для доверительной вероятности, равной 0,95.

Таблица 4.6.

Значения статистических параметров оценки адекватности моделей для мутантной формы TvDAAO M104F при 60 °С.

Параметр	Модель	
	$y=A \cdot \exp^{-k \cdot x}$	$y=A \cdot \exp^{-k_1 \cdot x} + B \cdot \exp^{-k_2 \cdot x}$
$S_{ад}^2$	$1,96 \cdot 10^{-3}$	$2,69 \cdot 10^{-4}$
$S_{ср}^2$	$1,49 \cdot 10^{-4}$	
$F_{эксп}$	13,14	1,80
$F_{теор}$	2,02	2,05

Из таблицы 4.6 видно, что в случае моноэкспоненциальной модели значение экспериментального коэффициента Фишера превышает соответствующее теоретическое значение. Для биэкспоненциальной модели значение экспериментального коэффициента Фишера удовлетворяет требованию адекватности модели, то есть предложенная аппроксимация экспериментальных данных суммой двух экспоненциальных функций является корректной и статистически обоснованной. Вышесказанное означает, что процесс температурной инактивации мутантной TvDAAO M104F является сложным и протекает, по крайней мере, в две стадии.

Для диссоциативной термоинактивации олигомерных ферментов характерны следующие признаки [79]:

1. Наличие изломов (т.е. двух линейных участков) на зависимостях остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах.

2. При фиксированной температуре тангенс угла наклона первого линейного участка не зависит от концентрации фермента, а для второго линейного участка происходит увеличение тангенса угла наклона при уменьшении начальной концентрации фермента.

В качестве примера на рис. 4.14 и рис. 4.15 представлены типичные зависимость остаточной активности от времени для мутантной TvDAAO M104F в полулогарифмических координатах при различных температурах (54-64°C) и начальных концентрациях фермента (3, 5, 10 и 20 мкг/мл). Действительно, данные

зависимости представляют собой прямые с изломом. Кроме того, из рис. 4.15 видно, что наклоны начальных линейных участков до точки излома совпадают, а после точки излома наклон увеличивается с уменьшением начальной концентрации фермента. Такого рода зависимости были получены для всех мутантных форм TvDAAO с заменами в 104м положении. Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что термоинактивация мутантных TvDAAO при повышенных температурах, как и для фермента дикого типа, протекает по диссоциативному механизму. Для всех мутантных форм двухстадийный характер термоинактивации наблюдается во всех исследованных интервалах температур (которые зависят от стабильности мутантов) и при различных концентрациях ферментов.

Исходя из вышесказанного, для наиболее корректной интерпретации экспериментальных данных, сравнения констант скорости термоинактивации, периодов полуинактивации, эффектов стабилизации и дестабилизации отдельных точечных замен и т.д., зависимости остаточной активности от времени при различных температурах для всех мутантов и фермента дикого типа были получены при одинаковой начальной концентрации ферментов, равной 10 мкг/мл.

Используя математический аппарат теории диссоциативной термоинактивации, который подробно изложен в [79,167], были рассчитаны константы скорости инактивации для обеих стадий процесса для всех мутантных TvDAAO. Результаты расчетов приведены в таблице 4.7 в сравнении с аналогичными параметрами для TvDAAO дикого типа.

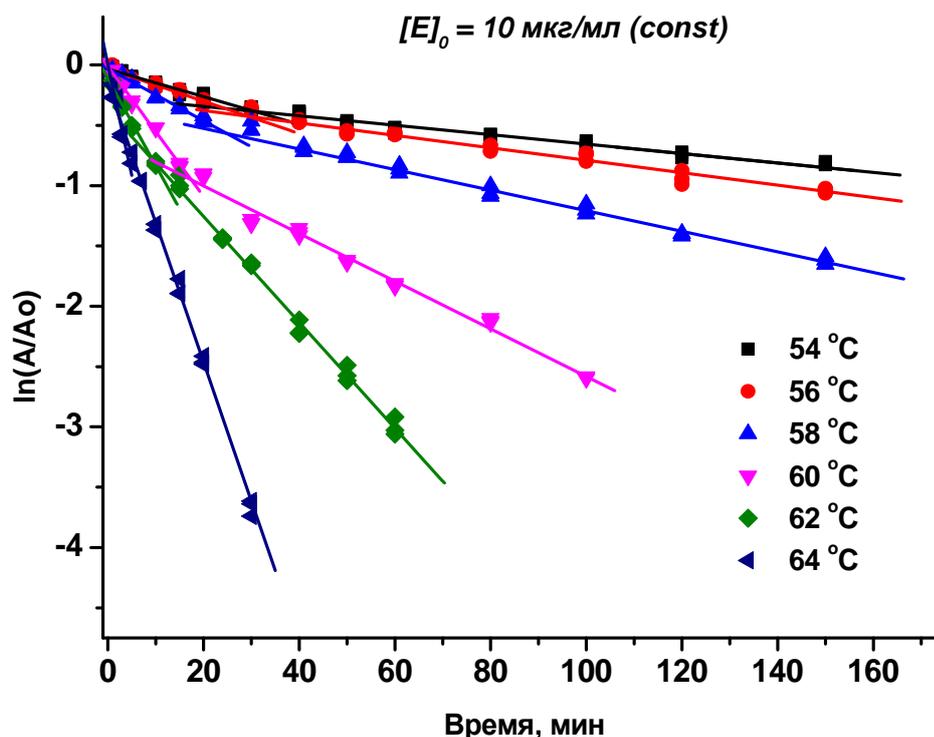


Рис. 4.14. Зависимости остаточной активности от времени мутантной TvDAAO M104F в полулогарифмических координатах при различных температурах. Концентрация фермента 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0, температура 54°C (■,—), 56°C (●,—), 58°C (▲,—), 60°C (▼,—), 62°C (◆,—) и 64°C (◄,—).

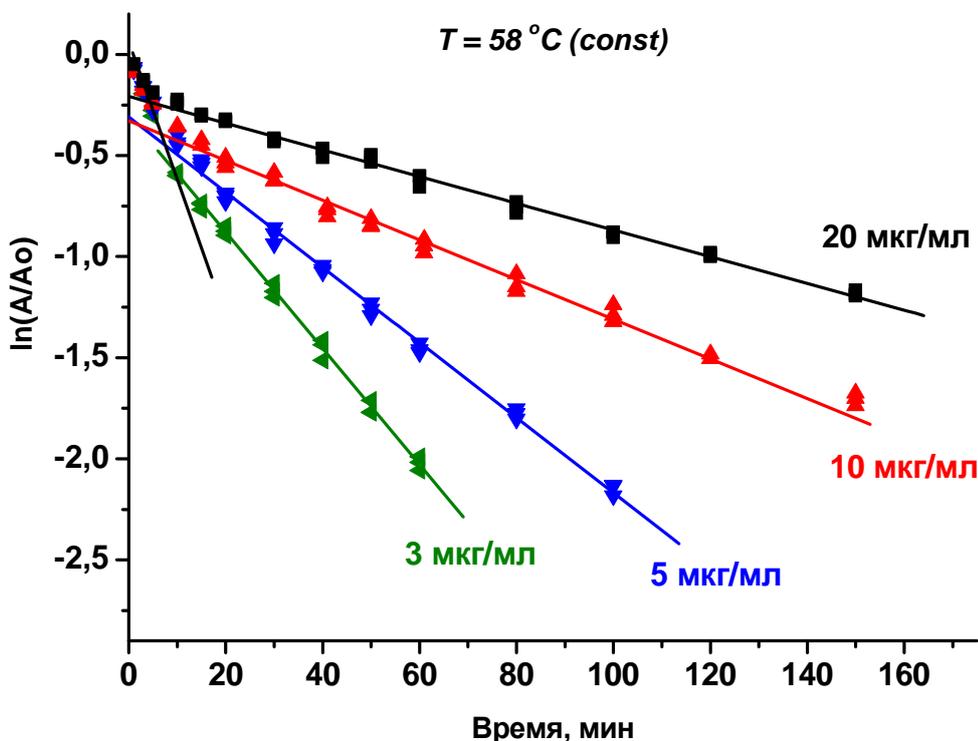


Рис. 4.15. Зависимости остаточной активности от времени мутантной TvDAAO M104F в полулогарифмических координатах при различных начальных концентрациях фермента. Температура 58°C, 0,1 М КФБ, рН 8,0, концентрации фермента – 3 мкг/мл (◄,—), 5 мкг/мл (▼,—), 10 мкг/мл (▲,—) и 20 мкг/мл (■,—).

В случае мутаций M104A и M104S произошло смещение температурного диапазона, в котором реализуется диссоциативный механизм, в сторону более низких температур на 2 °С по сравнению с ферментом дикого типа, причем мутант TvDAAO M104A является наименее стабильным среди мутантов, полученных в очищенном виде (рис. 4.12, табл. 4.7). При температуре 56°С, для которой приведены кинетические кривые на рис. 4.12, в результате замен M104A и M104S константы скорости инактивации первой стадии увеличились в 3,6 и 2 раза, а для второй стадии в 2,3 и 1,5 раза, соответственно (табл. 4.7). Для четырех замен M104V, M104I, M104L и M104W температурный диапазон остался прежним, однако значения констант скоростей термоинактивации изменились по сравнению с ферментом дикого типа. Для мутантных TvDAAO M104Y и TvDAAO M104F данный диапазон сдвинулся в область более высоких температур на 2°С и 4°С, соответственно. Исходя из зависимостей остаточной активности от времени, представленных на рис. 4.12, были также рассчитаны периоды полуинактивации для всех мутантных TvDAAO при всех изученных температурах (табл. 4.8). Анализ данных таблиц 4.7 и 4.8 и рис. 4.12 свидетельствует о том, что температурная стабильность мутантных TvDAAO с заменами в 104м положении коррелирует с объемом, формой, гидрофобностью, то есть с природой вводимого остатка. По увеличению температурной стабильности мутантные TvDAAO и фермент дикого типа располагаются в следующем ряду: TvDAAO M104A, TvDAAO M104S, TvDAAO M104V, TvDAAO M104I, TvDAAO M104L, TvDAAO дикий тип, TvDAAO M104W, TvDAAO M104Y, TvDAAO M104F. Наибольший эффект стабилизации наблюдается в случае замены M104F. Например, при температуре 56°С, для которой приведены кинетические кривые на рис. 4.12, константы скорости первой и второй стадии термоинактивации уменьшились в 3,4 и 4 раза соответственно. Период полуинактивации при этой температуре вырос более чем в 11 раз, что является значительным результатом для повышения температурной стабильности TvDAAO.

Таблица 4.7.

Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации мутантных TvDAAO и фермента дикого типа (концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0)*.

Форма TvDAAO	Параметр	Температура, °С								
		48	50	52	54	56	58	60	62	64
Дикий тип	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-**	0,19	1,27	1,34	6,0	9,3	14,6	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	2,86	3,67	9,2	11,6	21,5	41	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	2,28	3,13	5,6	7,1	10,8	19,4	-	-
M104A	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	2,61	4,18***	4,26	7,2	10,4	14,8	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	3,65	5,8	7,8	16,4	42	55	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,23	1,72	4,40	6,9	16,2	48	-	-	-
M104S	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	1,15	1,54	5,1	6,1	12,4	13,6	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,88	4,00	8,5	13,8	23,1	30	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,53	3,28	4,24	5,4	10,5	29	-	-	-
M104V	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	1,61	1,68	2,81	5,4	5,9	22,1	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	4,47	5,5	8,4	20,4	47	59	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,44	3,75	6,3	10,4	30	45	-	-
M104I	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	1,77	2,51	8,7	9,2	13,7	21,0	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	2,40	4,05	10,7	22,2	33	54	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,76	2,36	4,7	8,8	18,8	39	-	-
M104L	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	1,35	1,60	1,61	2,57	3,16	5,7	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	3,00	3,80	5,9	11,7	19,2	38	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,22	1,49	4,01	6,2	14,4	29	-	-
M104F	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	1,10	1,36	1,97	3,16	3,86	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,53	2,17	3,40	6,4	10,0	20,0
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,07	1,76	2,31	4,57	9,2	19,3
M104Y	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	1,52	1,62	3,35	4,59	5,1	6,4	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	2,02	2,52	5,7	10,1	18,4	30	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	0,95	1,64	2,56	3,77	9,6	23,2	-
M104W	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	0,30	0,69	1,30	2,09	3,13	8,4	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,33	2,37	3,67	7,0	12,1	23,4	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,70	2,34	3,51	4,8	9,9	15,7	-	-
M104E	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	1,30	1,52	3,17	7,9	16,6	-	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	2,60	4,12	8,9	14,3	27,0	-	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,38	2,54	4,7	9,9	15,4	-	-	-	-
M104K	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	0,61	0,90	1,77	4,31	11,1	-	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	4,07	6,9	7,8	15,5	24,1	-	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	2,29	3,39	5,3	8,4	14,0	-	-	-	-

* – ошибка эксперимента составляла не более 15%

** – параметр не определяли из-за очень малого или очень большого значения констант

*** – уменьшение параметров термоинактивации мутантных TvDAAO по сравнению с ферментом дикого типа выделено полужирным шрифтом и зеленым фоном, небольшое изменение – серым, увеличение – красным. Более темный фон соответствует большему эффекту.

Таблица 4.8.

Периоды полуинактивации мутантных TvDAAO и фермента дикого типа (концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0)*.

Форма TvDAAO	$\tau_{1/2}$, мин.; температура, °C								
	48	50	52	54	56	58	60	62	64
Дикий тип	-	73	47	23	7,2	4,7	2,7	-	-
M104A	24	14,5**	10,3	5,5	2,5	1,5	-	-	-
M104S	76	33	9,1	8,2	3,6	1,9	-	-	-
M104V	-	48	29	8,9	5,0	2,9	1,3	-	-
M104I	-	51	23	7,3	4,1	2,2	1,5	-	-
M104L	-	47	26	15,4	6,1	4,2	2,3	-	-
M104F	-	-	-	107	82	37	14,0	8,1	4,7
M104Y	-	-	96	57	16,5	6,3	4,6	3,2	-
M104W	-	158	83	32	12,3	6,2	3,2	-	-
M104E	80	38	14,0	6,3	2,5	-	-	-	-
M104K	87	51	17,5	6,3	4,1	-	-	-	-

* – ошибка эксперимента составляла не более 15%

** – увеличение периодов полуинактивации ($\tau_{1/2}$) мутантных TvDAAO по сравнению с ферментом дикого типа выделено полужирным шрифтом и зеленым фоном, небольшое изменение – серым, увеличение – красным. Более темный фон соответствует большему эффекту.

Для более полной оценки влияния точечных замен на температурную стабильность TvDAAO, для каждого мутанта были проанализированы температурные зависимости констант скорости первой и второй стадий инактивации. Для этого было использовано уравнение теории активированного комплекса (ТАК). Согласно теории активированного комплекса константа скорости мономолекулярной реакции зависит от температуры следующим образом:

$$k_{mono} = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^\ddagger}{RT}} = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{\Delta S^\ddagger}{R}} e^{-\frac{\Delta H^\ddagger}{RT}}$$

Это уравнение приводится к следующему линейному виду:

$$\ln\left(\frac{k_{mono}}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} = const - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T}$$

На рис. 4.16. приведены зависимости констант скоростей первой и второй стадий инактивации от температуры в координатах ТАК.

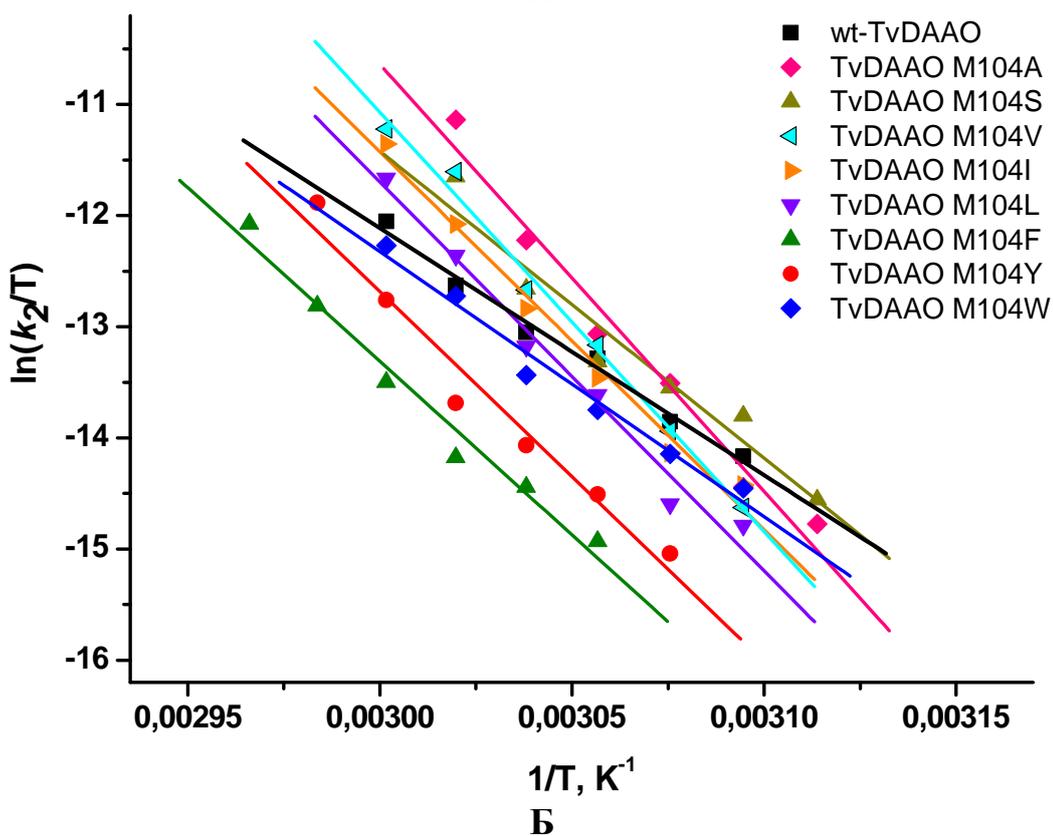
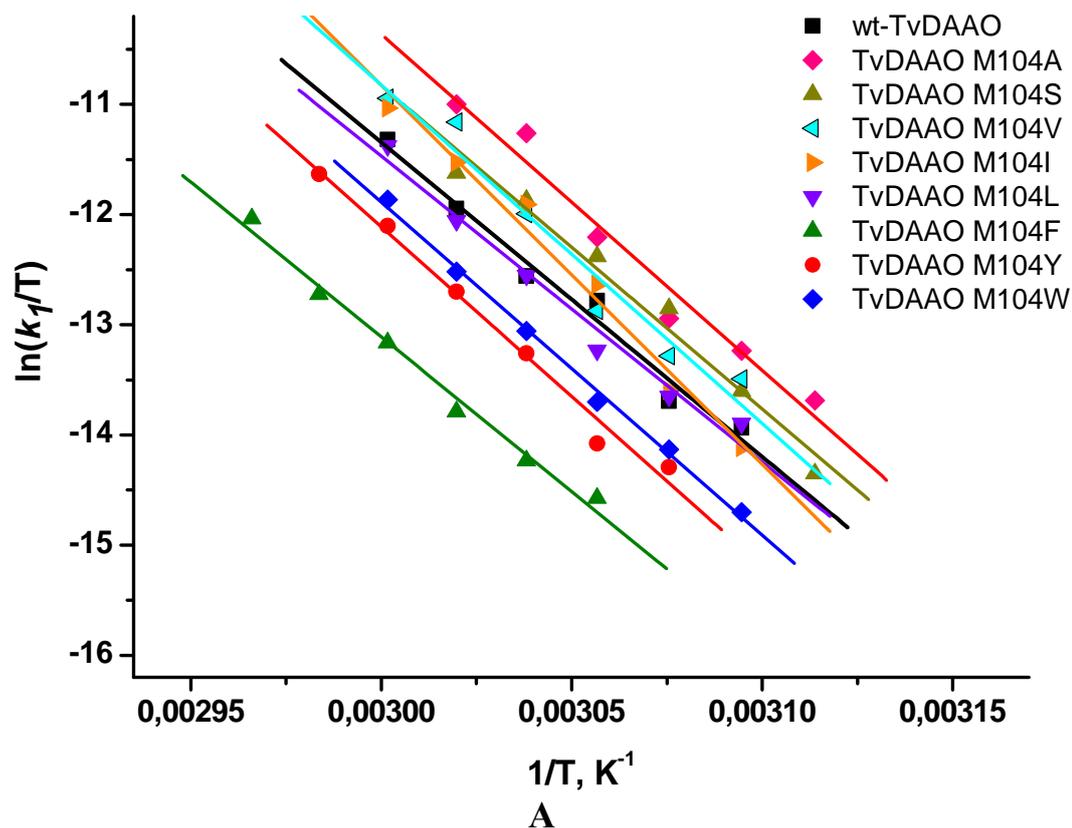


Рис. 4.16. Температурные зависимости констант скорости первой (k_1/T от $1/T$, **А**) и второй (k_2/T от $1/T$, **Б**) стадий термоинактивации в полулогарифмических координатах для мутантных TvDAAO с заменами M104A (◆, —), M104S (▲, —), M104V (◄, —), M104I (►, —), M104L (▼, —), M104F (▲, —), M104Y (●, —), M104W (◆, —) и TvDAAO дикого типа (■, —). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0.

На первой стадии процесса термоинактивации все мутантные TvDAAO, кроме TvDAAO M104I, и фермент дикого типа имеют одинаковый характер изменения констант скорости инактивации от температуры. Для замен M104A, M104S, M104V константы первой стадии k_1 лежат выше таковых для дикого типа во всем температурном диапазоне, т.е. эти ферменты менее стабильны. Для замены M104I константа k_1 растет с температурой быстрее, чем для фермента дикого типа, что выражается в более низкой стабильности TvDAAO M104I на первой стадии при температурах выше 56°C, тогда как при более низких температурах данный мутант сравним с ферментом дикого типа. Для TvDAAO M104L значения констант k_1 в пределах ошибки совпадают с таковыми для фермента дикого типа. Для мутантных TvDAAO M104F, M104Y, M104W значения k_1 лежат ниже, чем для TvDAAO дикого типа во всем температурном диапазоне (рис. 4.16А).

Несколько другая картина наблюдается для температурных зависимостей констант скорости второй стадии термоинактивации. В случае мутантных TvDAAO с заменами M104A, M104S, M104V, M104I и M104L константы скорости второй стадии с температурой растут быстрее, чем для фермента дикого типа. Так на второй стадии термоинактивации по своей стабильности с ферментом дикого типа сравнимы мутантные TvDAAO M104A при температуре ниже 50°C, TvDAAO M104V – при 50°C и ниже, TvDAAO M104I – 54°C и ниже, TvDAAO M104L – при 56°C и ниже. TvDAAO M104S по второй стадии менее стабильный, чем фермент дикого типа во всем изученном диапазоне. Мутантные TvDAAO с ароматическими заменами M104F, M104Y и M104W по второй стадии стабильнее дикого типа во всем температурном диапазоне. Для TvDAAO M104W вид зависимости k_2 от температуры близок к таковому для фермента дикого типа, а для TvDAAO M104F и M104Y константа второй стадии быстрее растет с температурой, что говорит о большем эффекте стабилизации при более низких температурах (рис. 4.16Б). Несмотря на то, что остаток Met104 располагает близко к поверхности фермента на входе в активный центр, он находится в гидрофобном окружении. Подобные температурные зависимости констант скорости второй стадии инактивации и небольшие эффекты стабилизации при более низких

температурах для замен M104A, M104V, M104I и M104L можно объяснить возможным усилением гидрофобных взаимодействий, поскольку в случае замены M104S подобного эффекта не наблюдается. Кроме того, замена остатка Met104 может предотвращать его окисление при повышенных температурах. С таким предположением согласуется суммарная стабильность TvDAAO M104L, которая близка к стабильности фермента дикого типа (рис. 4.12, 4.16 и табл. 4.7, 4.8). С другой стороны, введение небольших аминокислотных замен может открывать больший доступ растворителю в активный центр фермента. В результате, введение таких замен суммарно не приводит к стабилизации TvDAAO, а наоборот дестабилизируют фермент во всем изученном температурном диапазоне. Наибольший стабилизационный эффект наблюдается в результате введения ароматических аминокислотных остатков, особенно в случае замены M104F, что, вероятно, объясняется усилением взаимодействий с соседними остатками Phe54 и Phe258. По-видимому, введение аминокислотных замен различной природы в 104e положение по-разному влияет на температурную стабильность TvDAAO в силу комплекса описанных выше причин.

Для первой и второй стадий термоинактивации были найдены активационные параметры – энтальпия и энтропия активации, а также Аррениусовская энергия активации. Из тангенса угла наклона прямых, представленных на рис. 4.16, было рассчитано значение энтальпии активации ΔH^\ddagger . Величины E_a были получены из аналогичных зависимостей в координатах $\ln(k)$ от $1/T$. Для минимизации ошибки определения, величина энтропии активации ΔS^\ddagger была найдена из значения тангенса угла наклона зависимости свободной энергии активации ΔG^\ddagger от температуры:

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger$$

Для расчета ΔG^\ddagger было использовано выражение, следующее из основного уравнения теории активированного комплекса:

$$\Delta G^\ddagger = RT \left[\ln \left(\frac{k_B}{h} \right) - \ln \left(\frac{k_2}{T} \right) \right] = RT \ln \left(\frac{k_B T}{k_2 h} \right)$$

Графики зависимости ΔG^\ddagger от T для TvDAAO M104F для первой и второй стадии термоинактивации представлены на рис. 4.17.

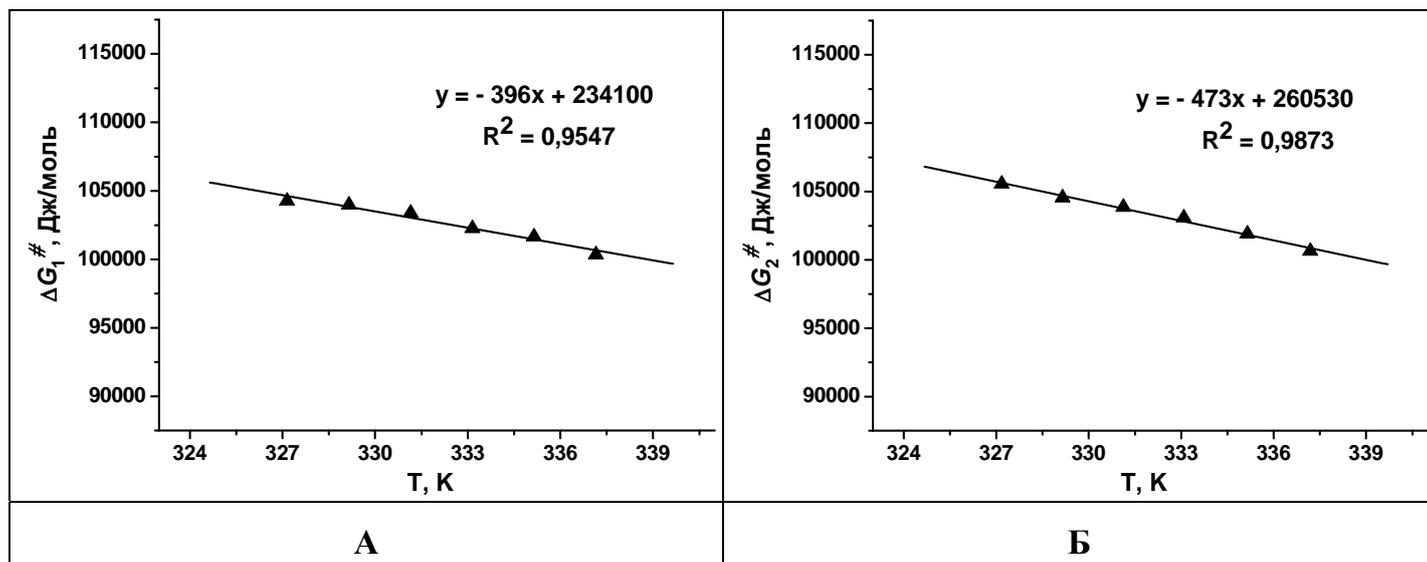


Рис 4.17. Зависимости свободной энергии активации ΔG^\ddagger от температуры для первой (А) и второй (Б) стадии термоинактивации для мутантной TvDAAO M104F.

Результаты приведены в таблице 4.9. Активационные параметры ΔH^\ddagger и E_a на первой стадии термоинактивации для всех мутантных TvDAAO близки между собой в пределах ошибки эксперимента. Энтропии активации ΔS^\ddagger для всех мутантных ферментов, кроме TvDAAO M104L и M104F несколько выше, чем для фермента дикого типа. Самое высокое значение ΔS^\ddagger наблюдается для замены M104I. На второй стадии термоинактивации активационные параметры ΔH^\ddagger и E_a для мутантных TvDAAO M104S, M104W и фермента дикого типа близки между собой. Выделяются высокие значения всех активационных параметров для TvDAAO M104A, M104V, M104I, M104L, M104F, M104Y и , в меньшей степени, для M104S. Действительно, из рис. 4.16 следует, что именно для этих мутантов угол наклона зависимостей больше, чем для фермента дикого типа, что соответствует росту стабильности этих ферментов на второй стадии термоинактивации с понижением температуры. Полученные значения активационных параметров являются достаточно высокими по сравнению с обычными химическими реакциями и характерны для процессов, связанных с разворачиванием белковой глобулы. Изменение параметров активации может быть объяснено изменением структуры TvDAAO в результате введения различных

замен в 104 положение. Так, введение ароматических замен M104F, M104Y и M104W может приводить к усилению, например, гидрофобных взаимодействий и компактизации белковой глобулы, что в результате приводит к повышению температурной стабильности.

Таблица 4.9.

Активационные параметры первой и второй стадий инактивации мутантных TvDAAO с заменами в 104 положении и фермента дикого типа (0,1 М КФБ, pH 8,0).

Форма TvDAAO	1я стадия инактивации			2я стадия инактивации		
	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль* К)	E_a , кДж/моль	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль* К)	E_a , кДж/моль
Дикий тип	237±18	420±40	240±17	185±11	260±30	187±10
M104A	254±20	480±70	256±20	320±30	680±94	322±30
M104S	244±20	440±60	247±20	230±30	400±90	232±30
M104V	255±30	480±80	258±30	305±20	630±60	316±15
M104I	286±20	570±60	289±20	282±18	560±50	285±18
M104L	230±17	400±50	239±17	290±30	580±80	294±20
M104F	233±12	400±40	236±13	260±20	470±60	263±20
M104Y	256±15	470±40	259±15	277±30	530±80	280±30
M104W	251±8	460±20	254±10	198±15	300±40	201±15
M104E	258±11	490±30	260±11	262±10	500±20	265±10
M104K	190±20	280±60	192±20	196±6	300±20	199±6

4.1.5. Влияние замен *Met104Glu* и *Met104Lys* на свойства *TvDAAO*

С точки зрения влияния на каталитические свойства и стабильность *TvDAAO* также представляют интерес замены остатка *Met104* на заряженные аминокислотные остатки. В качестве таких замен нами были выбраны остатки *Glu* и *Lys*, которые при pH рабочего буфера (pH 8.0) несут отрицательный ($pK_a \approx 4.1$) и положительный ($pK_a \approx 10.8$) заряды на своих боковых радикалах, соответственно. Кроме того, эти аминокислоты являются структурно-близкими к метионину, следовательно, такие замены не должны приводить к увеличению доступа активного центра фермента растворителю. На рис. 4.17 представлены результаты компьютерного моделирования структуры *TvDAAO* в области активного центра с заменами *M104E* и *M104K*.

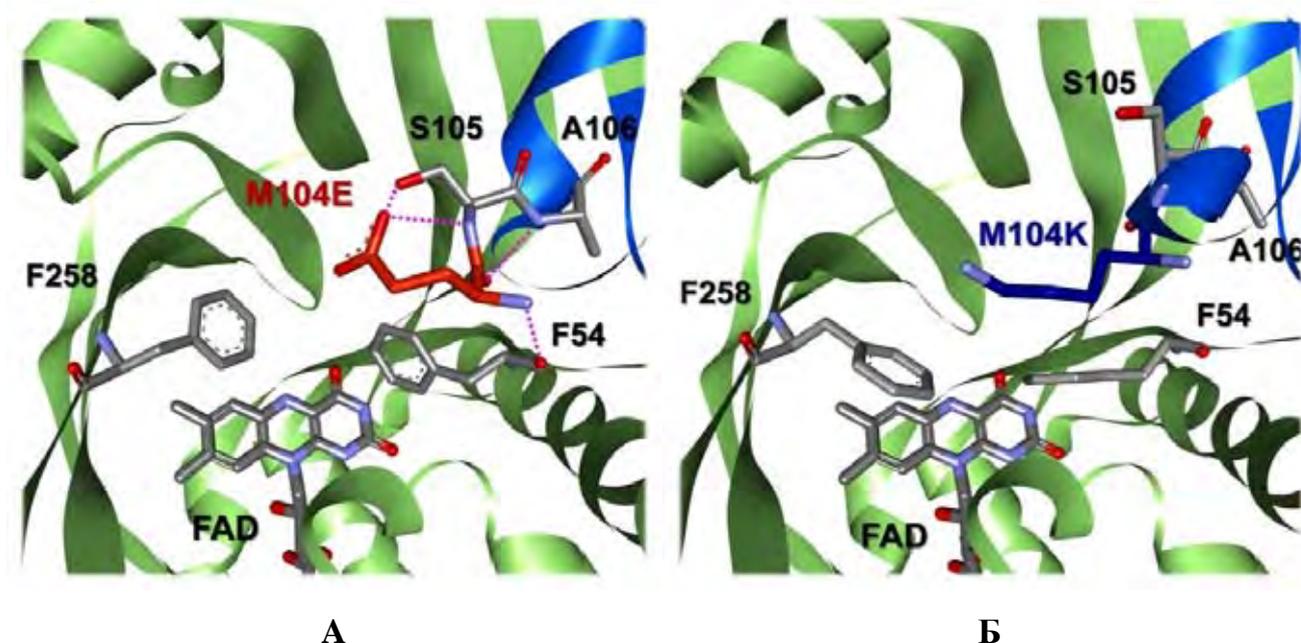


Рис. 4.18. Компьютерное моделирование замен *M104E* (А) и *M104K* (Б) в структуре *TvDAAO*. Пунктиром показаны водородные связи.

В случае введения замены *M104E* возможно образование новой водородной связи между карбоксильной группой и боковым радикалом соседнего остатка *Ser105*. В случае обеих замен, боковые радикалы вводимых остатков смотрят в сторону активного центра и, таким образом, могут взаимодействовать с боковыми радикалами *D*-аминокислот в процессе катализа.

Получение мутантных *TvDAAO* с заменами *M104E* и *M104K* было описано в пункте 4.1.2. Результаты экспрессии и очистки представлены в таблице 4.2.

Аналитический SDS-электрофорез очищенных образцов TvDAAO M104E и M104K в полиакриламидном геле показал, что все препараты имели чистоту не менее 95% (рис. 4.19).

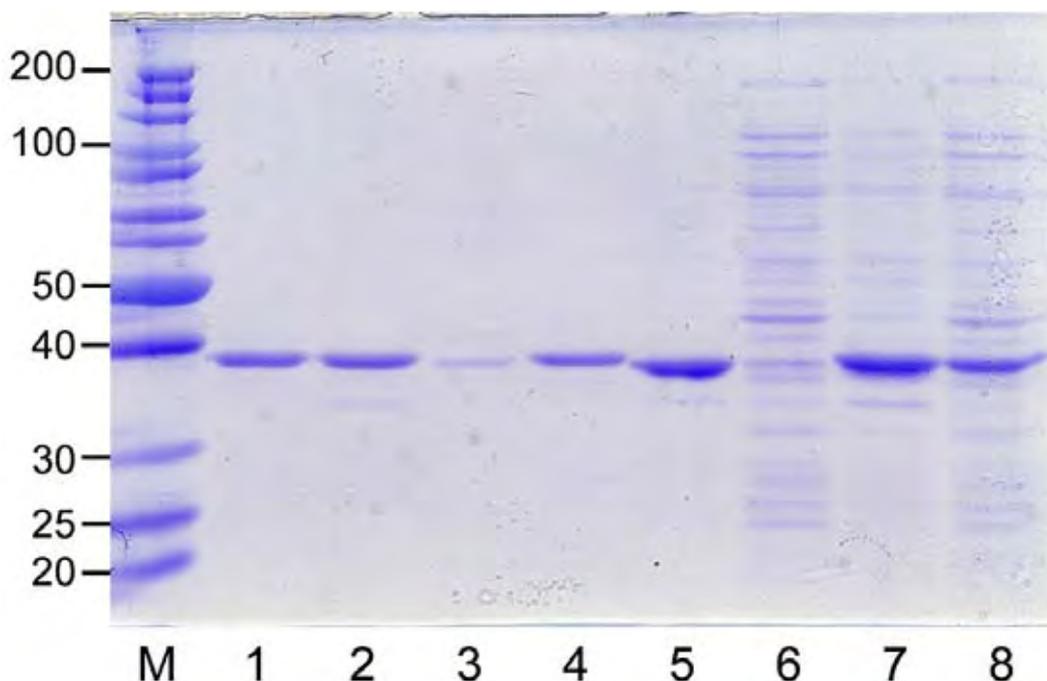


Рис. 4.19. Белковый электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (препараты TvDAAO 1-4 после очистки и 5-8 после разрушения клеток). 1 – TvDAAO M104E, 2 – TvDAAO M104K, 3 – TvDAAO Del_99-110, 4 – TvDAAO дикого типа, 5 – TvDAAO Del_99-110 (клеточные стенки после разрушения клеток УЗ), 6 – TvDAAO Del_99-110 (бесклеточный экстракт после разрушения клеток УЗ), 7 – TvDAAO дикого типа (клеточные стенки), 8 – TvDAAO дикого типа (бесклеточный экстракт), М – маркер (мол. массы указаны в кДа).

На следующем этапе были изучены кинетические свойства и температурная стабильность TvDAAO M104E и M104K. Полученные значения k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M с набором D-аминокислот приведены в таблице 4.2. Зеленым цветом и полужирным шрифтом выделены те случаи, когда наблюдается улучшение каталитических параметров с данным субстратом.

Введение замены M104E практически не повлияло на значения K_M со многими D-аминокислотами, в то время как замена M104K привела к увеличению K_M со всеми субстратами, кроме D-Leu (рис. 4.20, табл. 4.2).

С точки зрения каталитической активности, обе мутантные TvDAAO похожи между собой с большинством субстратов. С D-Ala, D-Val и D-Ser значения k_{cat}

уменьшились в среднем в 5-10 раз. TvDAAO M104E неактивен с D-Thr, TvDAAO M104K неактивен с D-Thr и D-Ser (рис. 4.21, табл. 4.2).

Мутант TvDAAO M104E обладает повышенной каталитической эффективностью с D-Leu (в 6 раз), с D-Phe (в 2,4 раза), с D-Tyr (в 1,4 раза) и D-Trp (в 1,7 раза). Для мутантной TvDAAO M104K каталитическая эффективность со всеми субстратами ниже, чем для фермента дикого типа из-за роста значений K_M (рис. 4.22, табл. 4.2).

Интересным моментом является то, что каталитическая активность с D-Lys в случае замены M104E возросла почти в 18 раз, а для замены M104K упала почти в 3 раза по сравнению с ферментом дикого типа (рис. 4.21, табл. 4.2). Другими словами, с D-Lys мутантная TvDAAO M104E проявляет в 48 раз более высокую каталитическую активность, чем TvDAAO M104K. В то же время, оба фермента TvDAAO M104E и TvDAAO M104K не проявляют активности с D-Glu и D-Asp. По-видимому, в процессе катализа боковые радикалы отрицательно заряженного Glu104 и положительно заряженного Lys104 (в результате замен M104E и M104K) взаимодействует с положительно заряженным боковым радикалом D-Lys, при его связывании в активном центре фермента, что и определяет активность мутантных ферментов с этим субстратом. При связывании D-Glu и D-Asp, вероятно, их взаимодействия с аминокислотными остатками на входе в активный центр носят более сложный характер, поэтому замена M104K не приводит к возникновению активности с данными субстратами. Таким образом, мутантная TvDAAO M104E может быть использована для селективного определения D-Lys в различных образцах, а также для его эффективного окисления в процессах тонкого органического синтеза.

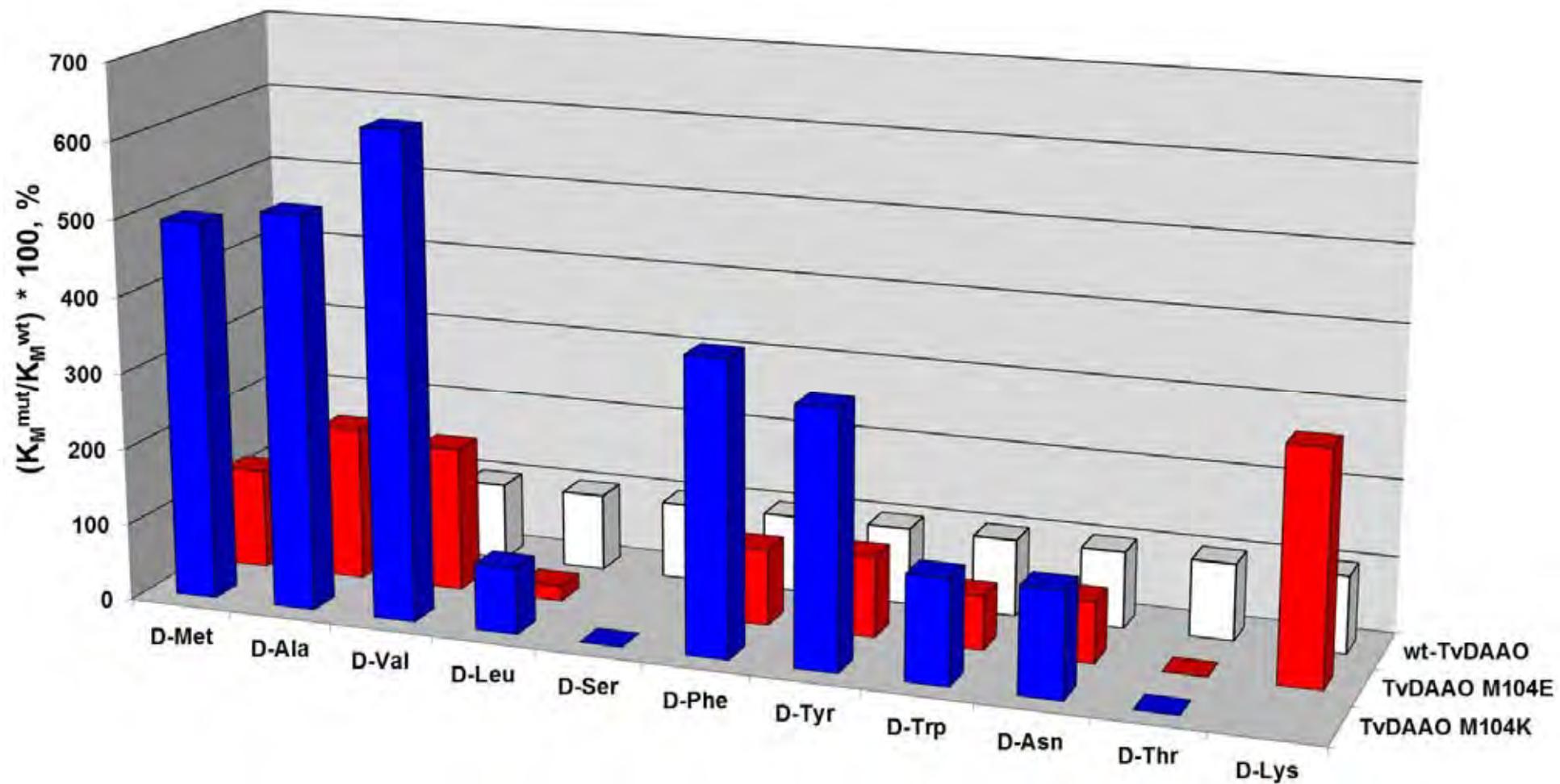


Рис. 4.20. Относительные значения констант Михаэлиса (K_M) для мутантных TvDAAO с заменами Met104Glu и Met104Lys. За 100% приняты значения K_M фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

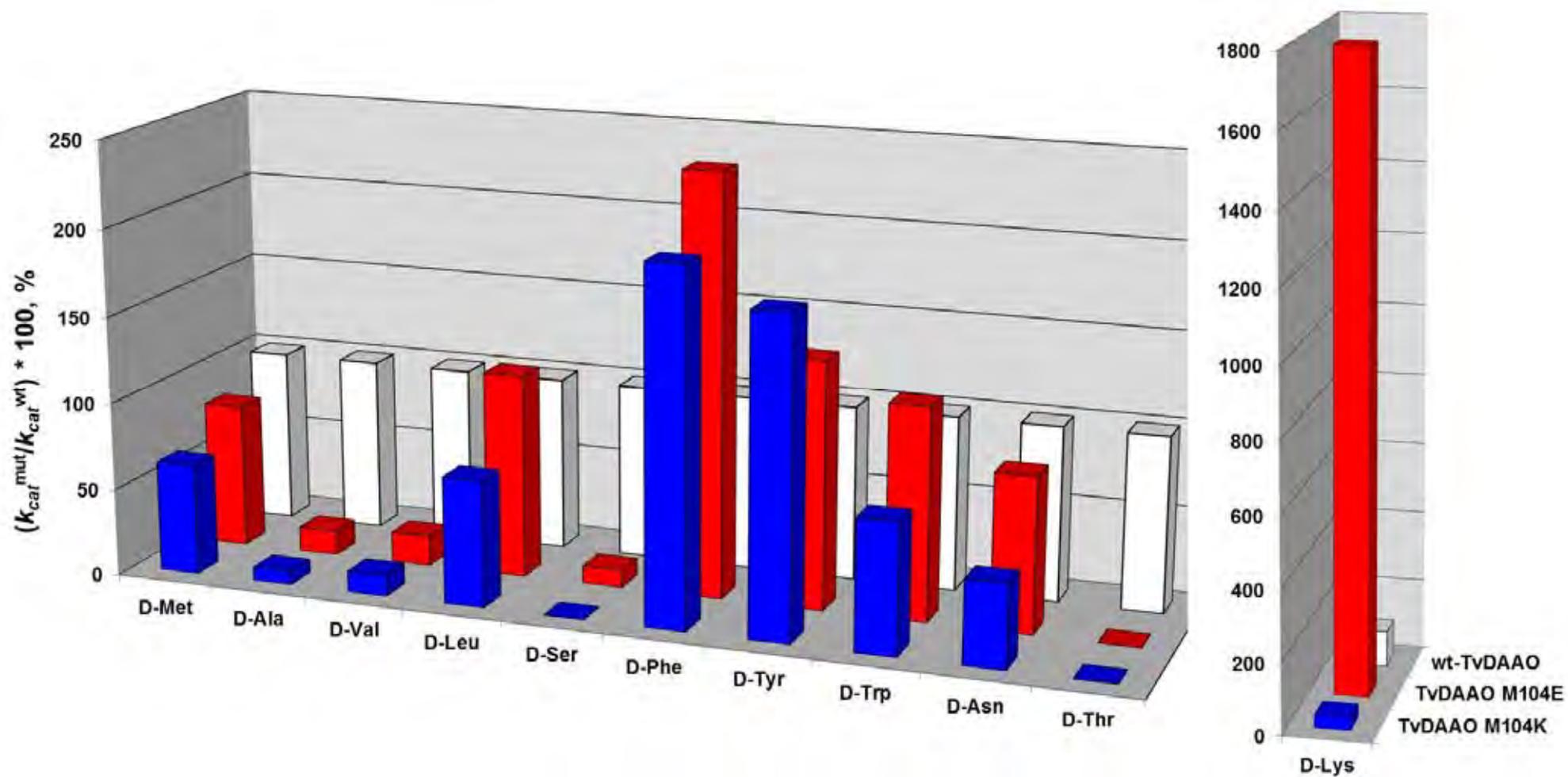


Рис. 4.21. Относительные значения каталитических констант (k_{cat}) для мутантных TvDAAO с заменами Met104Glu и Met104Lys. За 100% приняты значения k_{cat} фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

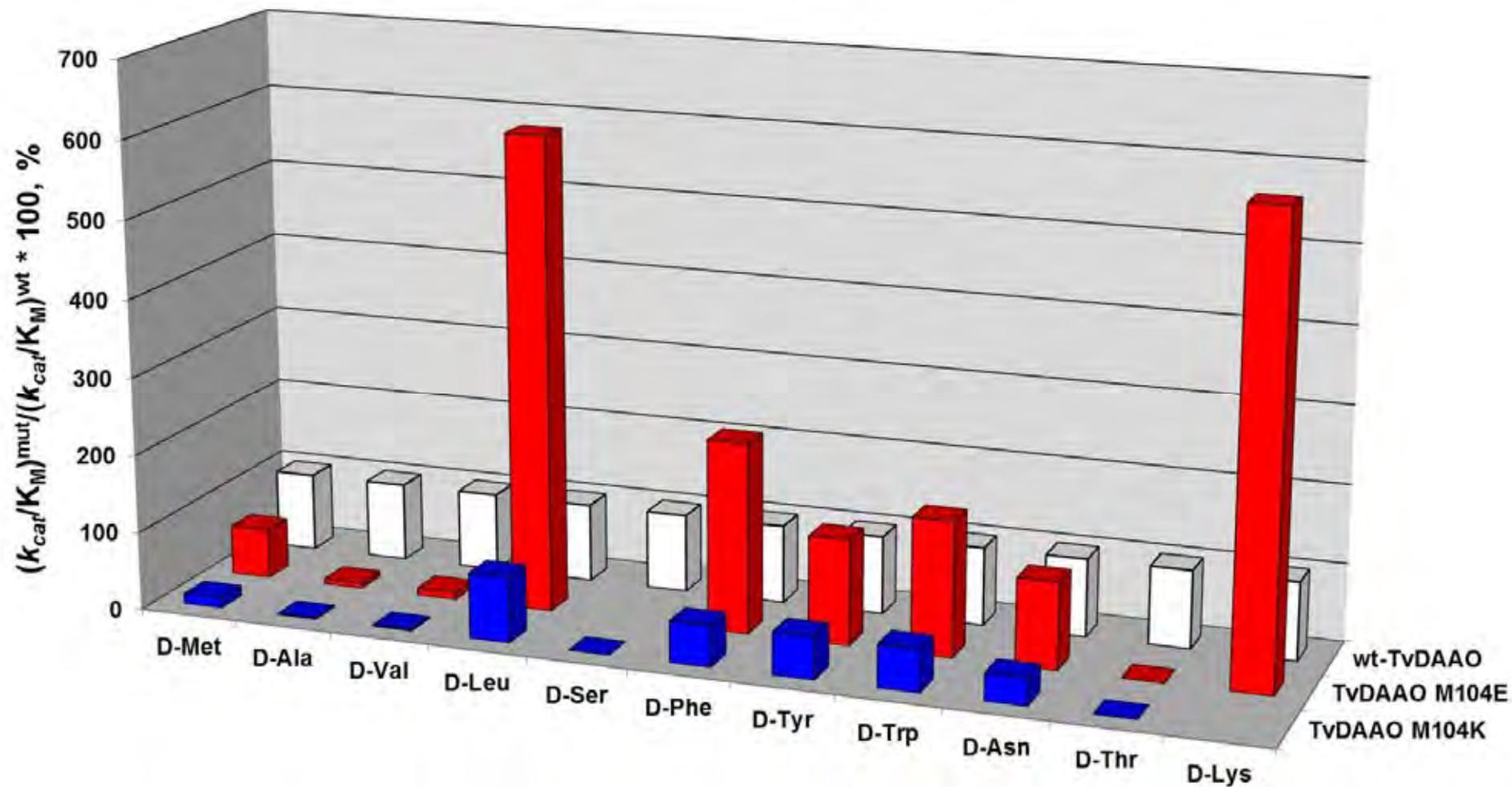


Рис. 4.22. Относительная каталитическая эффективность (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с заменами Met104Glu и Met104Lys. За 100% принята каталитическая эффективность фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

Температурная стабильность мутантных TvDAAO M104E и TvDAAO M104K была изучена при температурах от 48 до 56°C. Как и в случае других мутантных TvDAAO с заменами остатка Met104 и фермента дикого типа, термоинактивация TvDAAO с заменами M104E и M104K протекала по диссоциативному механизму в исследованном температурном диапазоне 48-56°C. На рис. 4.23 приведены зависимости остаточной активности от времени при 54°C, аппроксимированные биекспоненциальными функциями.

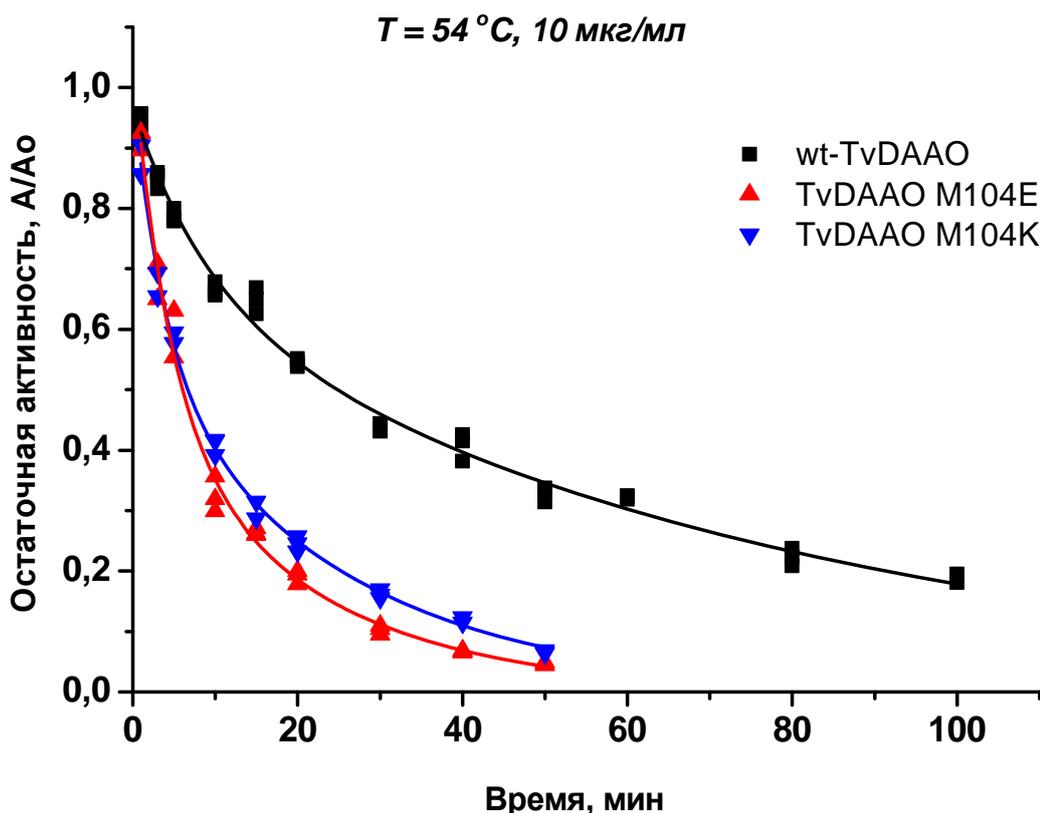


Рис. 4.23. Зависимости остаточной активности от времени для TvDAAO M104E (\blacktriangle ,—), TvDAAO M104K (\blacktriangledown ,—) и TvDAAO дикого типа (\blacksquare ,—). Экспериментальных данные аппроксимированы биекспоненциальными функциями. Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0, температура инкубации 54°C.

Результаты расчета констант скорости для обеих стадий процесса термоинактивации и периодов полуинактивации приведены в таблицах 4.7 и 4.8 соответственно. При сравнении данных таблицы 4.7 и рис. 4.23, видно, что мутантные формы TvDAAO M104E и TvDAAO M104K близки между собой по температурной стабильности, но менее стабильны, чем фермент дикого типа, что связано с увеличением констант скорости обеих стадий процесса термоинактивации.

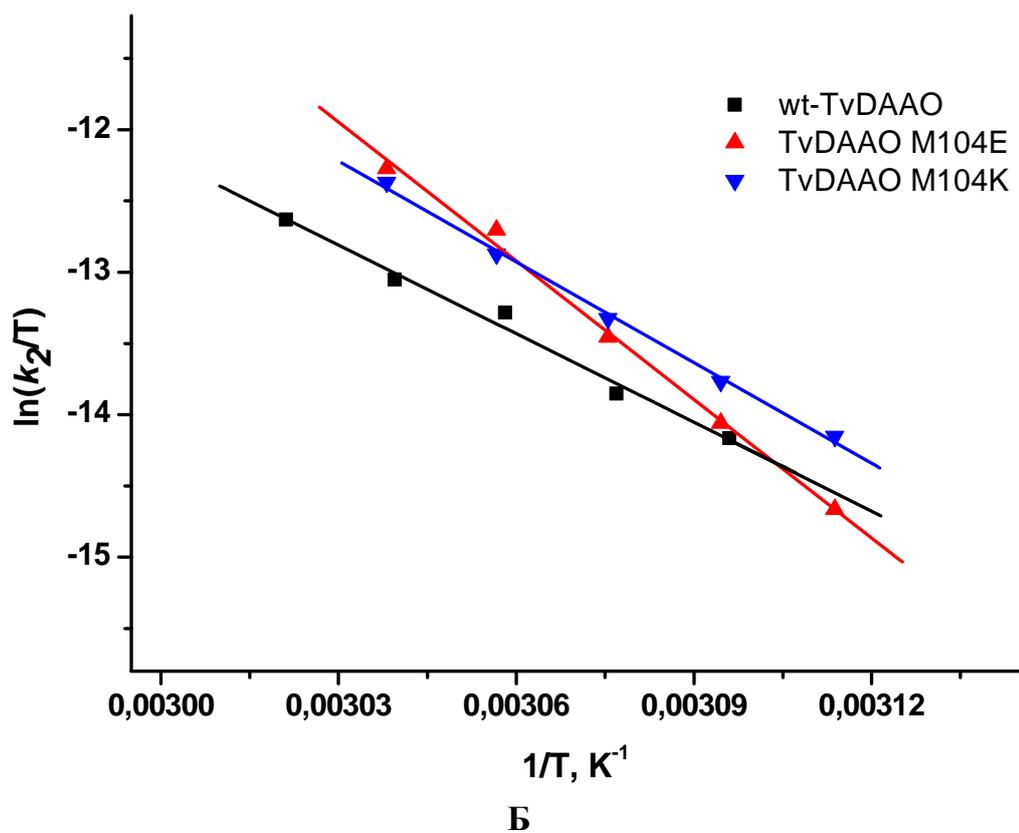
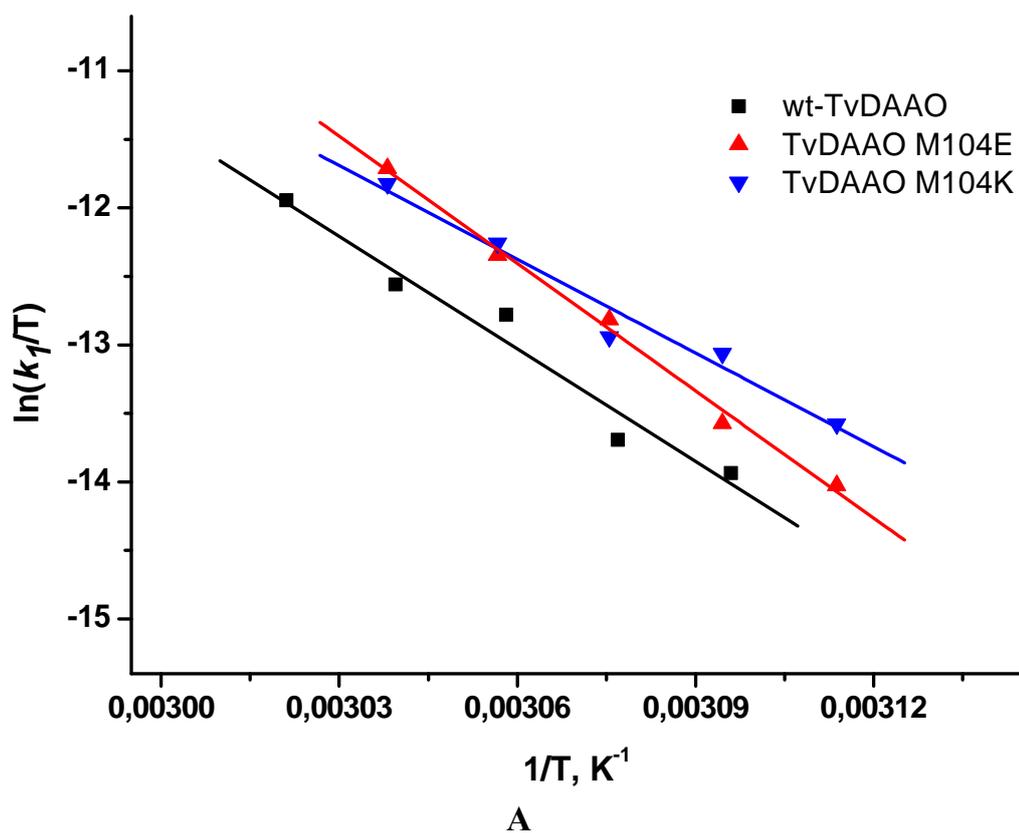


Рис. 4.24. Температурные зависимости констант скорости первой (k_1/T от $1/T$, **А**) и второй (k_2/T от $1/T$, **Б**) стадий термоинактивации для TvDAAO M104E ($\blacktriangle, -$), TvDAAO M104K ($\blacktriangledown, -$) и TvDAAO дикого типа ($\blacksquare, -$). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0.

На рис. 4.24 приведены зависимости констант скоростей первой и второй стадий инактивации в обратных полулогарифмических координатах ТАК для обеих мутантных форм и TvDAAO дикого типа. Видно, что для TvDAAO M104E константы скорости обеих стадий процесса термоинактивации сильнее зависят от температуры по сравнению с TvDAAO M104K и ферментом дикого типа. В результате TvDAAO M104E менее стабилен, чем фермент дикого типа во всем изученном температурном диапазоне и эффект дестабилизации для обеих стадий увеличивается с температурой. Однако при температуре ниже 48°C по стабильности данный мутант сравним с ферментом дикого типа на каждой стадии термоинактивации. Для мутантной формы TvDAAO M104K температурные зависимости констант обеих стадий практически не изменились по сравнению с таковыми для фермента дикого типа, однако по абсолютному значению находятся выше, что говорит о меньшей температурной стабильности мутантного фермента во всем изученном температурном диапазоне. Для обеих стадий процесса термоинактивации также были рассчитаны активационные параметры (табл. 4.9).

4.1.6. Удаление соединительной петли с 99 по 110 остаток

в структуре TvDAAO

Полученные результаты в ходе направленного мутагенеза остатка Met104, который входит в описанную выше соединительную петлю с 95 по 120 остатки, говорят о том, что данный структурный элемент может играть весьма важную роль в поддержании стабильной структуры TvDAAO. Чтобы проверить данное предположение, нами было решено удалить дополнительный участок соединительной петли с 99 по 110 остатки, который отсутствует у более чем 90% последовательностей DAAO (рис. 2.2). Как было описано выше, данное структурное отличие хорошо видно при наложении трехмерных структур TvDAAO и RgDAAO (рис. 4.2) Нами было проведено компьютерное моделирование структуры TvDAAO Del_99-110 на основе структуры TvDAAO дикого типа и выполнено наложение этих двух структур (рис. 4.25), на котором структура TvDAAO дикого типа показана зеленым цветом, синим цветом выделен удаляемый

участок соединительной петли в районе активного центра, бордовым цветом показана модельная структура TvDAAO Del_99-11.

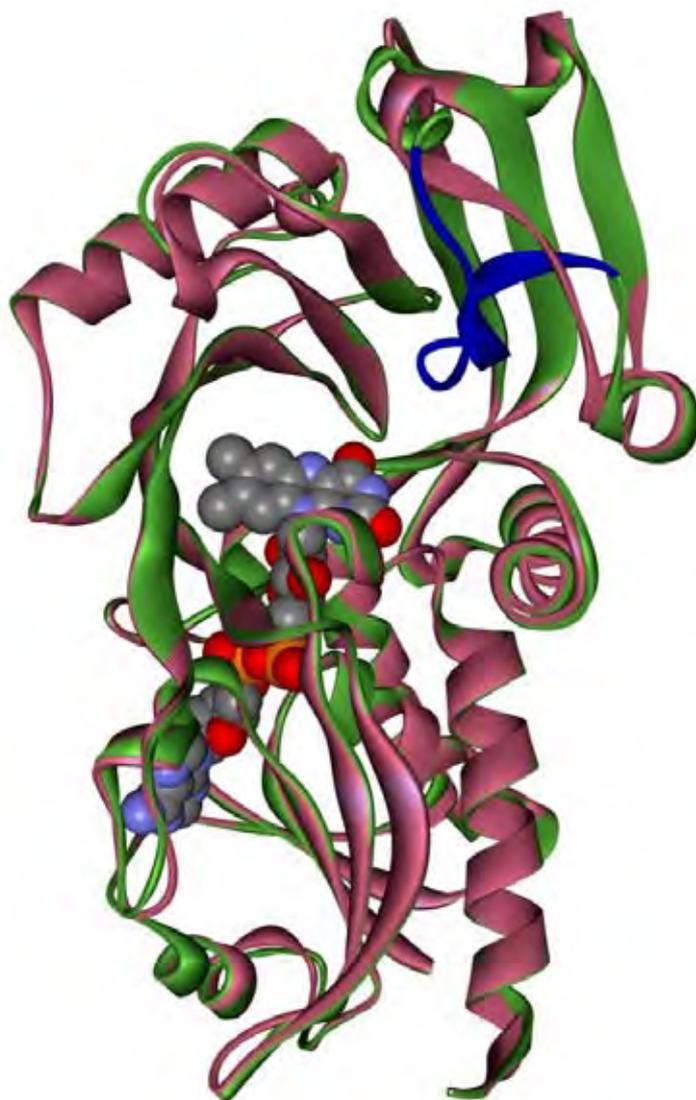


Рис. 4.25. Наложение модельной структуры TvDAAO Del_99-110 (выделена бордовым цветом) на структуру TvDAAO дикого типа (выделена зеленым цветом). Удаленный участок петли в области активного центра TvDAAO дикого типа выделен синим цветом.

В области активного центра структура TvDAAO Del_99-110 очень похожа на структуру RgDAAO (рис. 4.2). На рис. 4.26 представлены активные центры TvDAAO дикого типа и модельной TvDAAO Del_99-110, цветом показана поверхность доступная растворителю. При сравнении хорошо видно, что удаление части соединительной петли, с одной стороны, приводит к значительному увеличению доступа растворителя в активный центр фермента, а с другой стороны приводит к исчезновению взаимодействий с близкорасположенными аминокислотными остатками. В результате такой делеции можно ожидать

значительного изменения каталитических свойств и температурной стабильности TvDAAO.

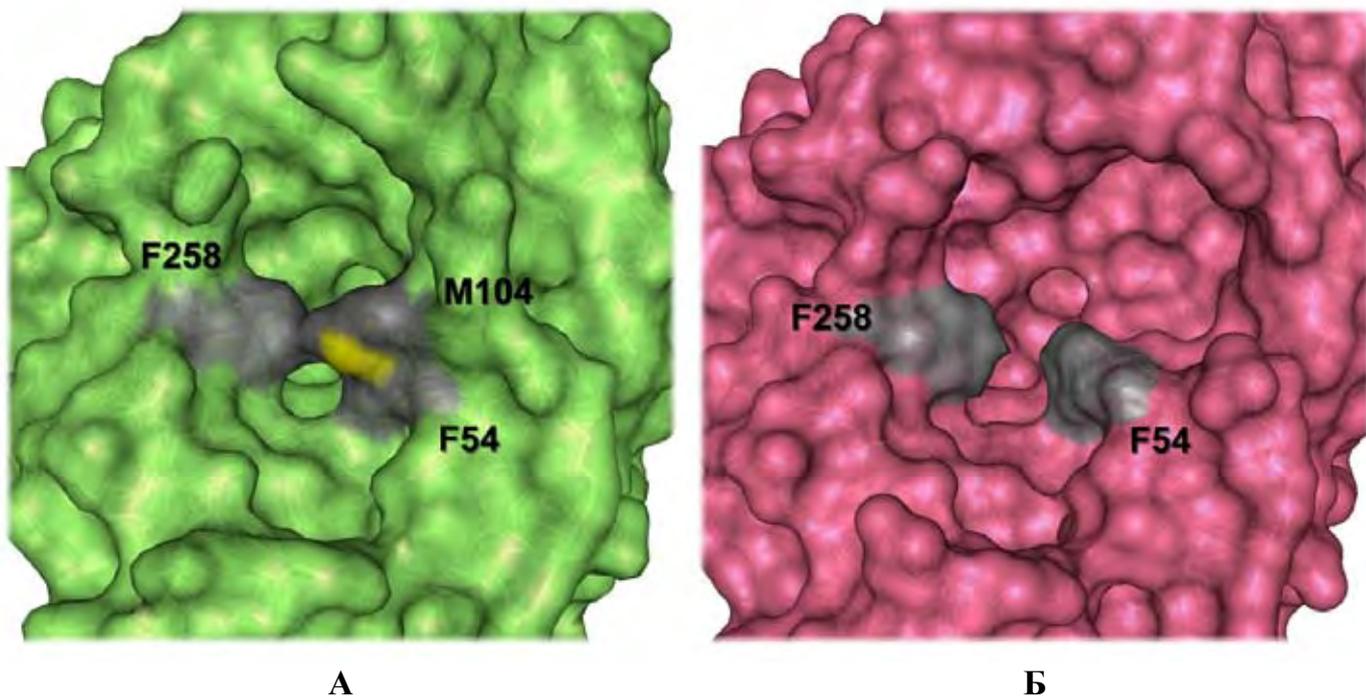


Рис. 4.26. Активный центр TvDAAO дикого типа (А) и модельной TvDAAO Del_99-110 (Б). Цветом показана поверхность доступная растворителю.

Получение TvDAAO Del_99-110 проводили полностью аналогично пункту 4.1.2. Олигонуклеотидные праймеры для направленного удаления последовательности из гена *tvdaao* представлены в таблице 4.10. Секвенирование плазмид подтвердило удаление соответствующей последовательности нуклеотидов из гена *tvdaao*. В процессе культивирования мутантная TvDAAO Del_99-110 экспрессировалась в активной и растворимой форме. Результаты культивирования представлены в таблице 4.2. Количество биомассы, полученное в результате культивирования TvDAAO Del_99-110 и TvDAAO дикого типа практически одинаково, но выход активного и растворимого фермента в случае TvDAAO Del_99-110 значительно ниже, чем для фермента дикого типа. Это может быть связано как с более низкой удельной активностью фермента с D-метионином, так и с более низкой стабильностью и уровнем экспрессии фермента в клетках *E.coli*. Результаты очистки и параметры образцов для изучения свойств представлены в таблице 4.2.

Таблица 4.10.

Олигонуклеотидные праймеры для введения делеции в ген *tvdaao*.

Мутация		Нуклеотидная последовательность*
Исходная послед-ть	For	5' – С ААГ СГТ ГАТ СТТ ССТ ААА СТГ ГАА ГГТ GCC АТГ TCG GCC АТС ТГТ САА СGC ААС ССС ТGG ТТС ААА ААС АСА GTC –3'
	Rev	5' – GTT TTT GAA CCA GGG GTT GCG TTG ACA GAT GGC CGA CAT GGC ACC TTC CAG TTT АGG ААГ АТС АСГ СТТ GAG ААС АТГ –3'
Del_99-110	Mfor	5' – С ААГ СГТ ГАТ СТТ ССТ ААС ССС ТGG ТТС ААА ААС АСА GTC –3'
	Mrev	5' – GTT TTT GAA CCA GGG GTT АGG ААГ АТС АСГ СТТ GAG ААС АТГ –3'

* Подчеркиванием показана удаляемая последовательность в гене *tvdaao*, соответствующая аминокислотной последовательности TvDAAO с 99 по 110 остаток. Полужирным шрифтом выделены нуклеотидные замены между которыми вводится делеция.

Аналитический SDS-электрофорез в полиакриламидном геле показал, что все препараты ферментов были получены в высокоочищенном виде и имели чистоту не менее 95% (рис. 4.19). Кроме того, электрофорез нерастворимых и растворимых фракций (клеточные стенки после разрушения клеток и бесклеточные экстракты соответственно) показал, что TvDAAO Del_99-110 и фермент дикого типа присутствуют как в растворимой, так и нерастворимой формах (рис. 4.19, дорожки 5-8). Однако в отличие от фермента дикого типа, содержание для TvDAAO Del_99-110 в растворимой фракции значительно ниже, чем в осадке клеточных стенок. Поскольку ферментативная активность TvDAAO Del_99-110 отсутствовала в клеточном дебрисе после разрушения клеток, то весь активный фермент TvDAAO Del_99-110 находился только в растворе.

Спектр поглощения TvDAAO Del_99-110 соответствует спектру поглощения FAD-содержащих белков с максимумами поглощения на 280, 370 и 450 нм и соотносится со спектром TvDAAO дикого типа (рис. 4.27). Стоит отметить, что соотношение поглощения A_{280}/A_{455} для TvDAAO Del_99-110 аномально высокое. Это говорит о том, что содержание FAD в активном центре этого фермента существенно ниже по сравнению с ферментом дикого типа. Однако добавление разных количеств экзогенного FAD к образцам TvDAAO Del_99-110 не привело к повышению ферментативной активности (табл. 4.11).

Таблица 4.11.

Активность TvDAAO Del_99-110 при добавлении экзогенного FAD.

C(FAD)/ C(TvDAAO Del_99-100)	Активность, Ед/мл
1	0,38 ± 0,02
2	0,33 ± 0,02
4	0,35 ± 0,02
60	0,34 ± 0,02
200	0,34 ± 0,02

Исходя из этого, можно сделать вывод, что большая часть растворимой фракции TvDAAO Del_99-110 находится в некотором денатурированном состоянии и неспособна связать дополнительные количества FAD.

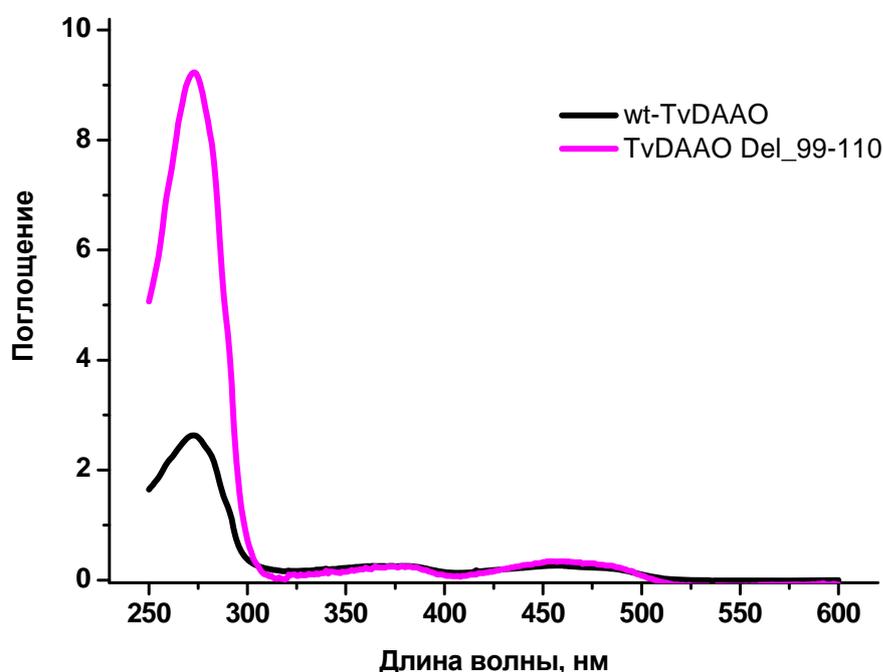


Рис. 4.27. Спектры поглощения TvDAAO Del_99-110 (—) и фермента дикого типа (—) при концентрации 1 мг/мл в диапазоне 250-600 нм.

Эксперименты по изучению процесса термоинактивации показали, что температурная стабильность TvDAAO Del_99-110 сильно понизилась по сравнению с ферментом дикого типа. На рис. 4.28 приведены зависимости остаточной активности в полулогарифмических координатах при 4 и 50°C. Так при 4°C TvDAAO Del_99-110 теряла около половины своей активности в течение недели. Константа скорости инактивации TvDAAO Del_99-110 почти в 3 раза выше, чем для фермента дикого типа, что может указывать на более слабое связывание FAD белковой глобулой TvDAAO Del_99-110 (табл. 4.12), поскольку

при низких температурах потеря активности TvDAAO, главным образом, связана с диссоциацией кофактора FAD из активного центра фермента.

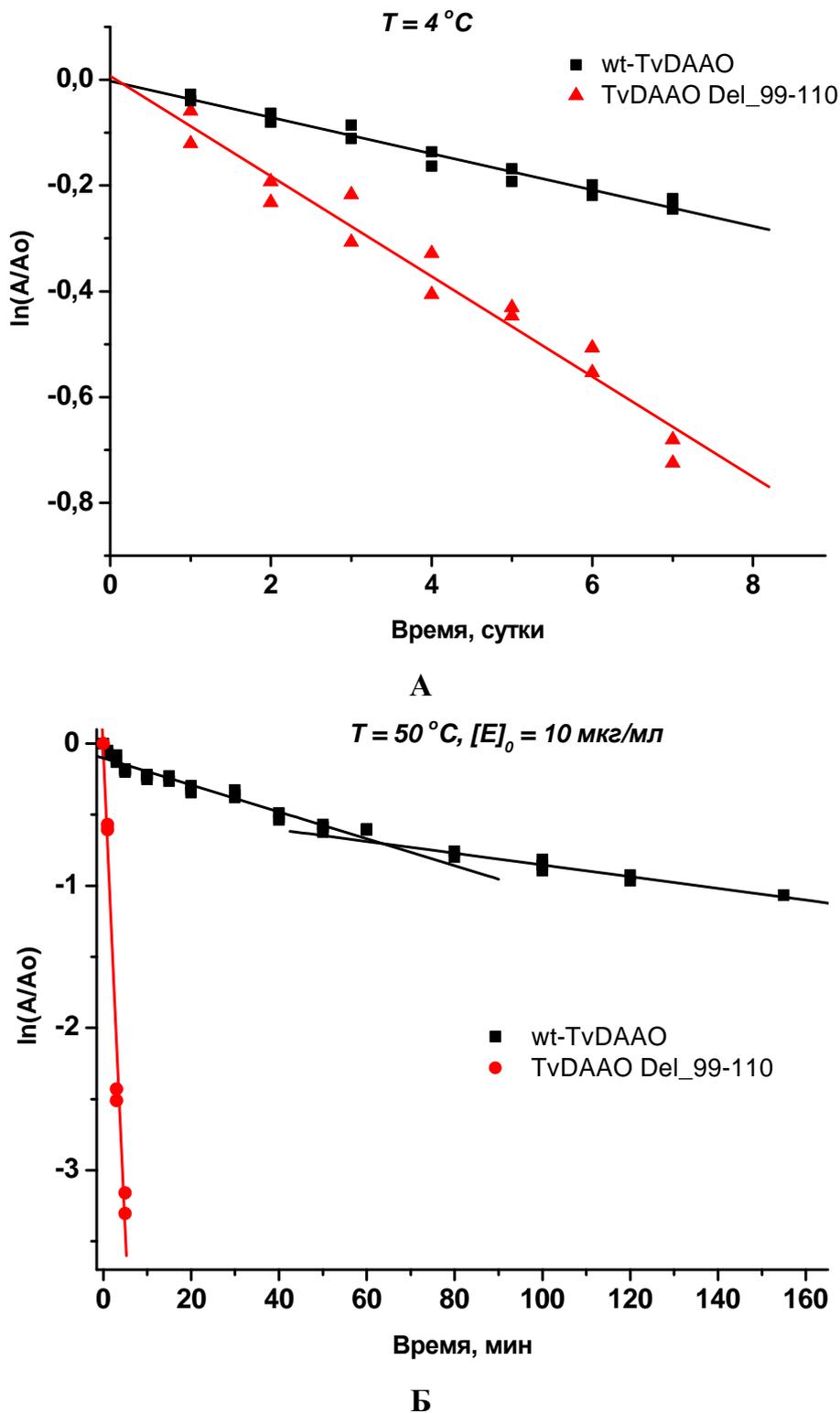


Рис. 4.28. Зависимости остаточной активности от времени для TvDAAO Del_99-110 (▲, —) и TvDAAO дикого типа (■, —) при температуре 4 °С (А) и 50 °С (Б) в полулогарифмических координатах. Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0.

При повышенных температурах различие в стабильности TvDAAO Del_99-110 и фермента дикого типа более значительное. Так, мутантная TvDAAO Del_99-110 при концентрации фермента 10 мкг/мл и температуре 50°C полностью теряет активность менее, чем за 5 минут, в то время, как фермент дикого типа с такой же концентрацией сохраняет около 35% активности при инкубации в течение 150 минут при 50°C (рис. 4.28).

Таблица 4.12.

Константы скорости инактивации TvDAAO Del_99-110 и фермента дикого типа при 4 и 50°C. Значения констант умножены на 10^6 .

Форма TvDAAO	$k_{in}^{эф} \times 10^6, c^{-1}$	
	4°C	50°C
Дикий тип	$0,40 \pm 0,03$	$110 \pm 10^*$
Del_99-110	$1,10 \pm 0,07$	11000 ± 1400

*Для дикого типа при 50C приведена эффективная k_2 ($k_1=315 \times 10^{-6}, c^{-1}$)

Эффективное значение константы скорости термоинактивации для TvDAAO Del_99-110 в 100 раз выше, чем соответствующее значение для второй стадии термоинактивации TvDAAO дикого типа (табл. 4.12).

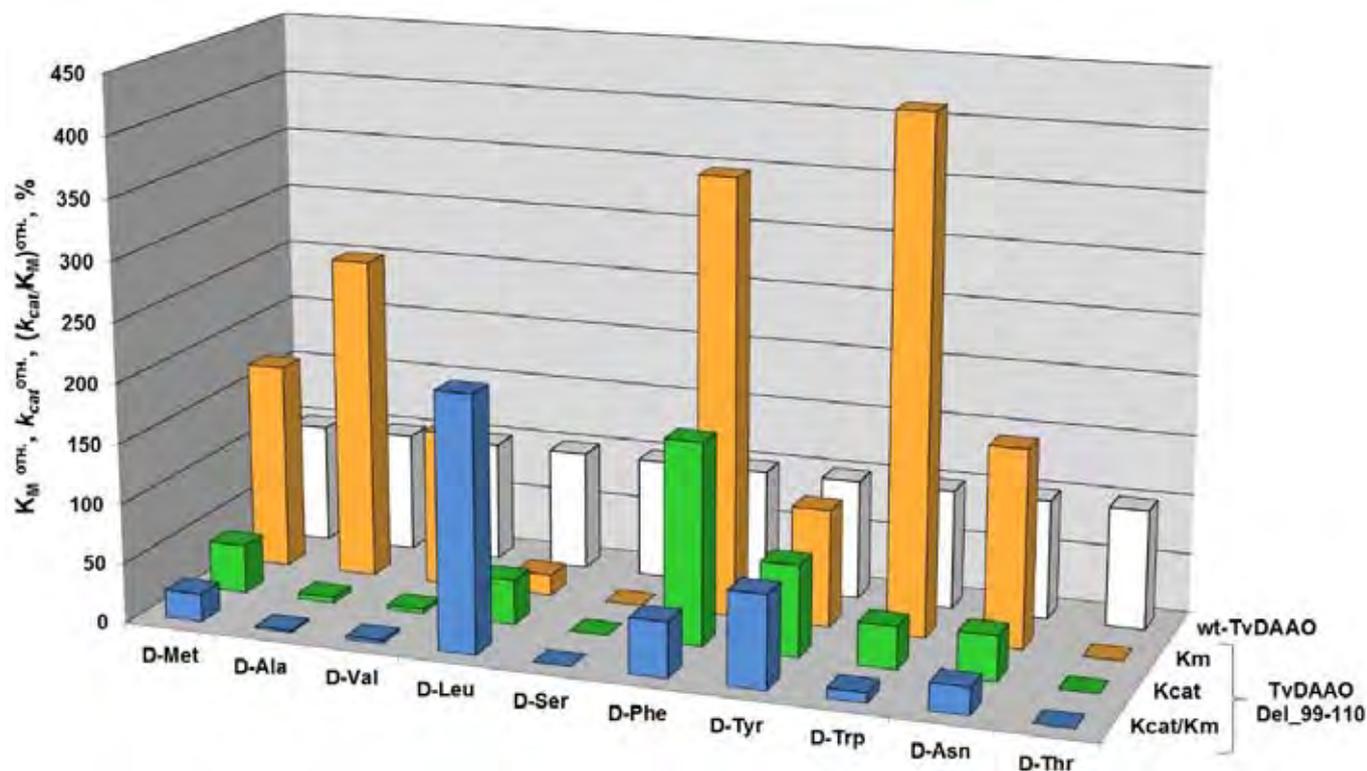


Рис. 4.29. Относительные значения констант Михаэлиса (K_M), каталитических констант (k_{cat}) и каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для TvDAAO Del_99-100. За 100% приняты значения соответствующих параметров для фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

Несмотря на низкую температурную стабильность TvDAAO Del_99-110, нам удалось изучить каталитические свойства для этого фермента с рядом D-аминокислотами. Полученные каталитические параметры k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M с набором D-аминокислот приведены в таблице 4.5. Для наглядности на рис.4.29 приведена диаграмма с относительными значениями k_{cat} , K_M и k_{cat}/K_M . Для TvDAAO Del_99-110 наблюдается увеличение значений K_M со многими субстратами, кроме D-Leu (K_M уменьшилось в 5,5 раз) и D-Tyr (K_M не изменилось), уменьшение каталитической активности со многими субстратами, кроме D-Phe (k_{cat} увеличилась в 1,7 раза), что в конечном счете выражается в соответствующем падении каталитической эффективности (табл. 4.5 и рис.4.29).

Таким образом, в данной части работы нами была изучена роль остатка Met104, который располагается на входе в активный центр. Также, была изучена роль соединительной петли в районе активного центра TvDAAO, которая соединяет два β -листа, образованные 85-94 и 121-125 остатками в структуре фермента и включает в себя Met104. Удаление дополнительного участка соединительной петли, который отсутствует у большинства последовательностей DAAO, показало, что данный структурный элемент играет важную роль как в каталитических свойствах, так и в поддержании стабильной четвертичной структуры TvDAAO. Полученные данные по направленному мутагенезу остатка Met104 говорят о том, что данный остаток играет исключительно важную роль в каталитической активности и температурной стабильности TvDAAO. Введение 10 различных замен в данное положение привело к получению мутантных TvDAAO с различными профилями субстратной специфичности. Кроме того, было однозначно показано, что температурная стабильность мутантных ферментов коррелирует с природой (размером, формой, гидрофобностью) вводимого аминокислотного остатка в 104 положение. Замены на незаряженные M104A, M104S, M104V, M104I и заряженные остатки M104E, M104K дестабилизировали фермент, замена M104L практически не оказала влияния на стабильность, в то время как введение ароматических аминокислот привело к значительной стабилизации фермента, особенно в случае замены M104F. Данная особенность

указывает на то, что при введение ароматических аминокислотных замен основополагающей причиной стабилизации TvDAAO может являться не экранирование активного центра фермента от растворителя объемным остатком, а взаимодействие с близкорасположенными аминокислотными остатками, в первую очередь с Phe54 и Phe258, что в конечном счете может приводить к усилению взаимодействий между пространственно-сближенными элементами вторичной структуры (с β -листом 255-260 и соединительной петлей 51-57) и стабилизации всей белковой глобулы TvDAAO. Для проверки данной гипотезы требуются дополнительные эксперименты по направленному мутагенезу близкорасположенных остатков в области входа в активный центр TvDAAO, что будет являться предметом обсуждения следующей главы 4.2.

4.2. Изучение взаимодействия между остатками

в 54, 104 и 258 положениях

В результате направленного мутагенеза остатка Met104 были получены мутантные формы TvDAAO M104F, TvDAAO M104Y и TvDAAO M104W, которые обладают повышенной температурной стабильностью по сравнению с ферментом дикого типа. Причинами стабилизации могут быть усиление взаимодействий с соседними аминокислотными остатками, экранирование активного центра от растворителя, а также предотвращение окисления остатка Met104. Вероятно, каждый из перечисленных факторов в той или иной степени вносит свой вклад в стабилизацию фермента. Интересным является тот факт, что наибольшей температурной стабильностью обладает мутантная TvDAAO с заменой M104F. Остаток Phe не является самым объемным, однако является наиболее гидрофобным среди всех введенных замен. Тем не менее, стабилизационный эффект не может быть объяснен только гидрофобными взаимодействиями, поскольку, например, замена M104L практически не повлияла на температурную стабильность TvDAAO, хотя остаток Leu близок по размеру к остатку Met, но при этом является более гидрофобным [170]. Другими словами, при усилении только гидрофобных взаимодействий стоило ожидать более высокую термостабильность TvDAAO M104L.

Таким образом, эффект стабилизации, по-видимому, обусловлен природой вводимых ароматических аминокислотных замен Phe, Tyr и Trp играет ключевую роль. Как было отмечено в главе 4.1, на входе в активный центр TvDAAO располагаются два остатка Phe54 и Phe258, роль которых была изучена нами ранее [56,57]. Поскольку эти остатки находятся в непосредственной близости от остатка Met104, то усиление взаимодействия между элементами вторичной структуры в результате введения замен M104F, M104Y и M104W может быть причиной увеличения температурной стабильности TvDAAO. Для проверки данной гипотезы нами было решено изучить взаимодействия между остатками в 54, 104 и 258 положениях с помощью направленного мутагенеза.

4.2.1. Компьютерное моделирование замен в 54, 104 и 258 положениях

Остаток Met104 находится на расстоянии около 4,5Å от остатков Phe54 и Phe258 (рис. 4.30А). В результате экспериментов *in silico* было показано, что введение замены M104F приводит к уменьшению указанных расстояний от остатков Phe54 и Phe258 до 3,5 и 3,7 Å, соответственно (рис. 4.30Б). Кроме того, в компьютерной модели активного центра TvDAAO M104F остаток Phe54 располагается по отношению к остатку Phe104 в энергетически выгодной конформации “Edge-to-Face”, а в свою очередь остатки Phe104 и Phe258 располагаются относительно друг друга также в выгодной “T-shaped” конформации. Таким образом, результаты компьютерного моделирования свидетельствуют о возможном образовании стабильного тримера из трех бензольных колец за счет π - π взаимодействий электронных оболочек боковых радикалов остатков Phe54, Phe104 и Phe258 в структуре TvDAAO M104F [171]. Стоит отметить, что π - π взаимодействия широко распространены в структурной биологии. Наиболее известной разновидностью является стэкинг-взаимодействия между азотистыми основаниями в структуре ДНК [172–175]. В большинстве трехмерных структур белков и ферментов также встречаются различные виды ароматических π - π и катионных π^+ - π взаимодействий между аминокислотными остатками Phe, Tyr, Trp, His, Lys и Arg, которые, наряду с гидрофобными взаимодействиями, водородными связями и ионными парами, играют важную роль как для поддержания стабильной четвертичной структуры белка, так и для молекулярного узнавания [171,176–186]. В структуре TvDAAO также можно выделить несколько участков, где наблюдаются такого рода взаимодействия между следующими остатками: 1 – Arg89, His91, His132, Phe225, Phe229, Arg282 и Phe283, 2 – изоаллоксазиновый цикл FAD, Tyr243, Phe258, Arg302, 3 – Phe197, Phe200, Trp263, His301, 4 – His147, Arg247 Phe248, 5 – Trp51, Tyr68, Trp113, Phe114, Phe121, Phe141, 6 – Arg110 и Tyr137, 7 – Arg305, Arg310, His324, Tyr326, 8 – Tyr151, Trp154, Tyr333, Tyr337.

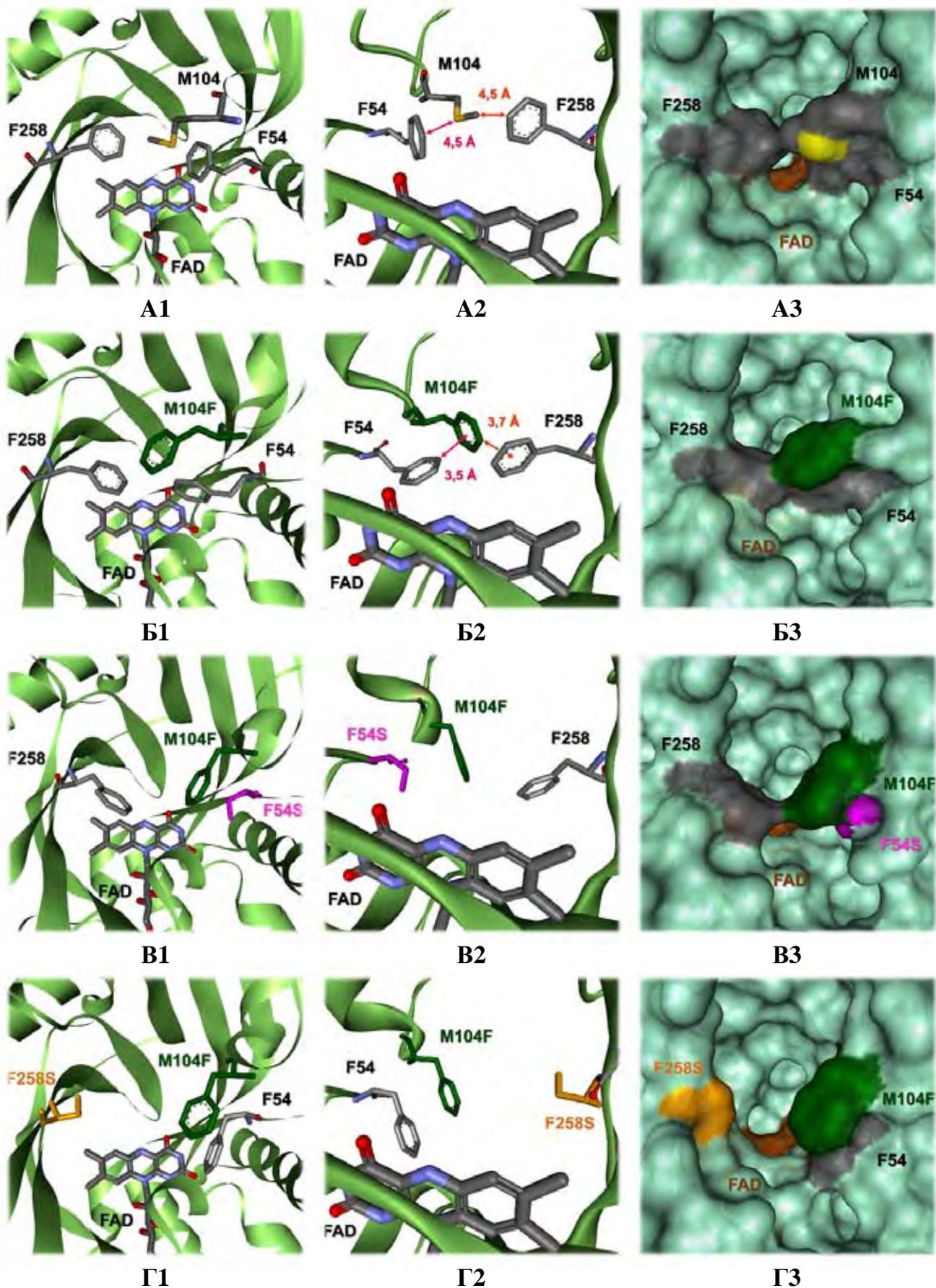


Рис. 4.30. Компьютерное моделирование замен M104F, F54S/M104F и M104F/F258S в структуре TvDAAO. Активный центр TvDAAO дикого типа (А), TvDAAO M104F (Б), TvDAAO F54S/M104F (В), TvDAAO M104F/F258S (Г). 1 – вид спереди на активный центр, 2 – вид из активного центра, 3 – вид спереди, голубым цветом показана поверхность доступная растворителю.

Ранее в нашей лаборатории, в ходе работ по направленному повышению каталитической активности с цефалоспорином С, были получены и охарактеризованы мутантные TvDAAO заменами F54A, F54S, F54Y, F258A, F258S, F258Y [56,57]. Для изучения взаимодействия между остатками в 54, 104 и 258 положениях было решено объединить замены F54S и F258S с заменами M104F, M104Y и M104W, что должно исключить любые взаимодействия, в том числе гидрофобные, между парами остатков 54/104 и 104/258. В качестве примера на рис. 4.30 В-Г приведены результаты компьютерного моделирования структур мутантных TvDAAO с двойными аминокислотными заменами F54S/M104F и M104F/F258S. В первом случае пропадает взаимодействие между остатками Phe104 и Phe54, однако может сохраняться взаимодействие Phe104 с остатком Phe258. Активный центр становится немного более доступным растворителю. Во втором случае наоборот пропадает взаимодействие между остатками Phe104 и Phe258, но может сохраняться с остатком Phe54. Кроме того, заметно, что увеличивается вход в активный центр.

Таким образом, для изучения стабилизационного эффекта в случае замен M104F, M104Y и M104W и изучения взаимодействия вводимых остатков с близкорасположенными остатками Phe54 и Phe258 было решено получить мутантные TvDAAO с двойными аминокислотными заменами F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S.

4.2.2. Получение мутантных TvDAAO с двойными заменами в 54/104 и 104/258 положениях

Мутантные TvDAAO F54S и F258S были получены и охарактеризованы в работах [56,57] полностью согласно главе 4.1. Олигонуклеотидные праймеры, для введения соответствующих мутаций в ген *tvdaao*, представлены в таблице 4.13. Расположение мутаций, которые соответствуют заменам в 54, 104 и 258 положениях, и сайтов рестрикции уникальных рестриктаз NcoI, EcoRI, Bsp119I и XhoI позволило получить мутантные гены *tvdaao* с двойными заменами с помощью

переклонирования участков генов, которые содержат триплеты, обеспечивающие замены F54S, M104F, M104Y, M104W и F258S.

Таблица 4.13.

Олигонуклеотидные праймеры для введения мутаций в ген *tvdaao* в положения, соответствующие 54 и 258 остаткам в структуре TvDAAO.

Замена		Нуклеотидная последовательность*
F54S	Mfor	5' – CC AAC TGG CTC ACA T CT TAC GAT GGA GGC AAG TTA GCC –3'
	Mrev	5' – CTT GCC TCC ATC GTA AGA TGT GAG CCA GTT GGC ACC T –3'
F258S	Mfor	5' – GGC GGT TGT T CT CAA CCC AAC AAC TGG TCA TC –3'
	Mrev	5' – GTT GTT GGG TTG AGA ACA ACC GCC AAT GAT AGA AGT AC –3'

* Полужирным шрифтом выделены нуклеотидные замены, обеспечивающие мутации.

Объединение замен F54S, M104F, M104Y, M104W было проведено с помощью рестрикции участка гена, который несет мутации, соответствующие замене F54S, рестриктазами NcoI и EcoRI и последующим лигированием в вектора, которые имеют соответствующие замены M104F, M104Y, M104W. Объединение замен M104F, M104Y, M104W и F258S было проведено с помощью рестрикции участка гена, который несет мутации, соответствующие замене F258S, рестриктазами Bsp119I и XhoI и последующим лигированием в вектора, которые имеют соответствующие замены M104F, M104Y, M104W. Наличие только необходимых мутаций было подтверждено с помощью секвенирования.

Получение штаммов-продуцентов мутантных TvDAAO, культивирование, экспрессию, выделение и очистку проводили аналогично методикам, описанным в главе 4.1 и разделе “Материалы и Методы”. В процессе культивирования все мутантные TvDAAO F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S синтезировались в активной и растворимой форме. Результаты экспрессии представлены в таблице 4.14 в сравнении с ферментом дикого типа и мутантными TvDAAO F54S и TvDAAO F258S. Видно, что выходы растворимых ферментов как по активности, так и по массе в мг с литра среды, сильно отличаются друг от друга, что наиболее

вероятно объясняется различным уровнем экспрессии и различной удельной активностью с D-метионином.

Таблица 4.14.

Результаты экспрессии (в клетках *E.coli*) и очистки фермента дикого типа и мутантных TvDAAO с двойными заменами в 54-104 и 104-258 положениях.

Форма TvDAAO	Культивирование			Очистка			
	Выход био-массы, г/л	Выход активного фермента, Ед/л*	Выход раств. фермента, мг/л	Выход по активности после очистки, %	Концентрация фермента, мкг/мл	Удельная активность, Ед/мг	Отношение поглощения A_{280}/A_{455}
Дикий тип	15,3	11800	84	55	95	140	8,3
F54S	14,7	6800	64	50	89	107	9,4
F258S	13,1	3940	61	73	154	65	7,1
F54S/M104S	15,3	2500	78	51	118	32	8,7
F54S/M104F	15,3	8700	86	95	110	101	9,3
F54S/M104Y	14,0	2300	64	80	109	36	11,1
F54S/M104W	15,3	8900	133	51	102	67	9,9
M104F/F258S	15,9	9400	145	84	182	65	8,1
M104Y/F258S	14,6	5500	183	80	139	30	8,5
M104W/F258S	13,5	4700	84	91	149	56	8,2

* - Активность ферментов определяли по D-метионину

Аналитический SDS-электрофорез очищенных мутантных TvDAAO и фермента дикого типа в полиакриламидном геле показал, что все препараты имели чистоту не менее 95% (рис. 4.31, 4.32). Результаты очистки и параметры образцов мутантных TvDAAO, которые были использованы для изучения свойств, представлены в таблице 4.14. Стоит отметить, что удельная активность по D-метионину для всех мутантных TvDAAO с двойными заменами, как и для их предшественников, ниже, чем для фермента дикого типа. Наибольший выход по активности наблюдался для TvDAAO F54S/M104F, что может быть связано с более высокой стабильностью данного фермента. После получения очищенных препаратов нами были изучены их каталитические свойства и температурная стабильность.

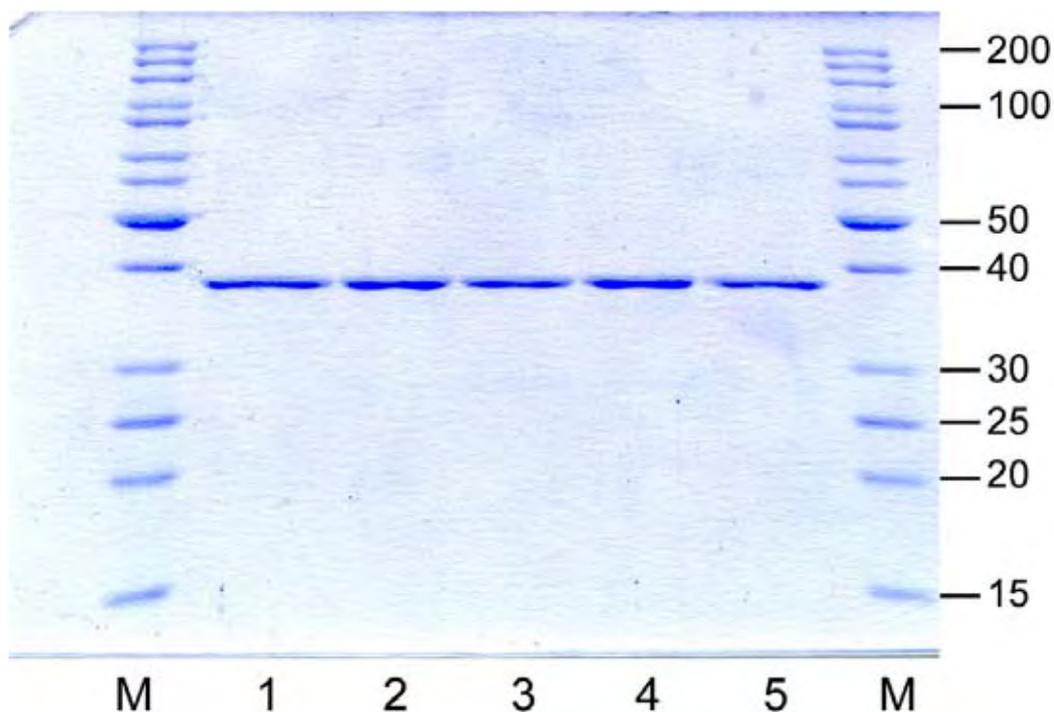


Рис. 4.31. Белковый электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов TvDAAO после очистки. 1 – TvDAAO F54S/M104F, 2 – TvDAAO F54S/M104Y, 3 – TvDAAO F54S/M104W, 4 – TvDAAO F54S/M104S, 5 – TvDAAO дикого типа, М – маркер (мол. массы указаны в кДа).

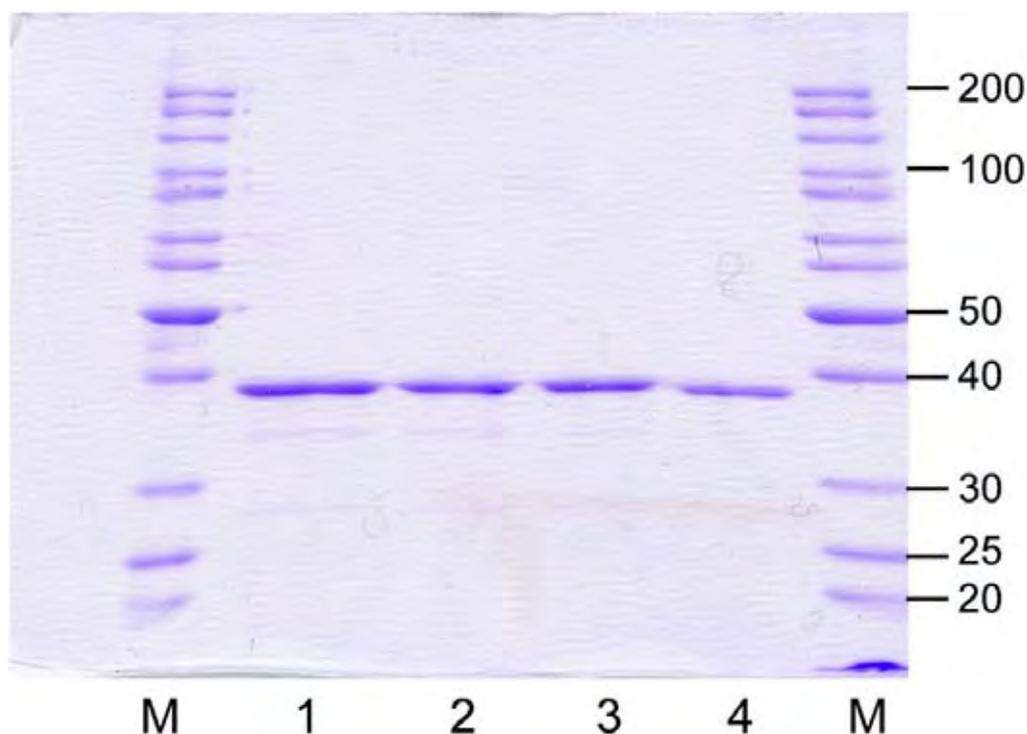


Рис. 4.32. Белковый электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов TvDAAO после очистки. 1 – TvDAAO M104F/F258S, 2 – TvDAAO M104Y/F258S, 3 – TvDAAO M104W/F258S, 4 – TvDAAO дикого типа, М – маркер (мол. массы указаны в кДа).

4.2.3. Каталитические свойства мутантных TvDAAO с двойными заменами

Ранее нами было показано, что введение замен F54S и F258S в активный центр фермента приводит к сильному сужению спектра субстратной специфичности TvDAAO (табл. 4.15, рис. 4.33-36). Замена F54S приводила к полной потери активности с D-Ala, D-Val, D-Ser и D-Thr. Стоит отметить, что сужение спектра субстратной специфичности сопровождалось значительным увеличением каталитической эффективности с объемными субстратами: D-Leu (в 7 раз), D-Phe (в 4,4 раза), D-Tyr (в 3,1 раза), D-Trp (в 2,4 раза), D-Asn (в 3,4 раза) и D-Lys (в 7,3 раза). С D-Met каталитические свойства практически не изменились. В случае замены F258S наблюдалась несколько похожая картина – фермент полностью потерял активность с D-Ala, D-Ser, D-Thr, D-Lys и каталитическая эффективность сильно упала с D-Val (в 24 раза) и D-Met (в 13,7 раз), но при этом возросла с D-Leu (в 6,6 раз), D-Phe (в 4,7 раза) и D-Tyr (в 1,7 раза).

Как было описано выше (см. главу 4.1), введение замен M104F, M104Y и M104W выражается в среднем в увеличении (ухудшении) значений K_m с объемными субстратами и увеличении каталитической активности с небольшими субстратами, что в конечном счете приводит соответствующему изменению каталитической эффективности. Причем, объем вводимого остатка не играет основную роль в формировании спектра субстратной специфичности – наихудшими каталитическими свойствами среди трех мутантов обладает TvDAAO M104Y.

При объединении замен F54S и M104S, M104F, M104Y, M104W в двойные замены F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W в случае большинства субстратов наблюдается усреднение каталитических свойств, причем сам профиль субстратной специфичности, в первую очередь, определяется точечной заменой F54S (табл. 4.16, рис. 4.33-36). В сравнении с TvDAAO дикого типа по каждому мутанту можно отметить следующие моменты:

TvDAAO F54S/M104F имеет более высокие значения K_M со многими субстратами, что в первую очередь обусловлено заменой M104F. Однако значения k_{cat} выросли в случае D-Leu (в 1,5 раза), D-Phe (в 3,1 раза), D-Lys (в 5,4 раза),

возросла каталитическая эффективность с D-Leu (в 1,5 раза) и D-Lys (в 1,3 раза), при это практически полностью пропала активность с D-Ala, D-Val, D-Ser и полностью пропала с D-Thr, что, безусловно, определяется заменой F54S.

TvDAAO F54S/M104Y практически неактивен с D-Ala, D-Val, D-Leu и D-Ser. Не проявляет активность с D-Thr. Имеет более высокую активность с D-Phe (в 2,1 раза), D-Tyr (в 1,6 раза) и D-Lys (в 2,6 раза). Каталитическая эффективность выросла только с D-Asn (в 1,5 раза) за счет уменьшения K_m и с D-Lys (в 1,6 раза) за счет увеличения k_{cat} . Имеет несколько повышенную активность с D-Phe и D-Tyr.

TvDAAO F54S/M104W неактивен с D-Ser и D-Thr, сильно упала активность с D-Ala и D-Val. Характерной особенностью данного фермента является то, что влияние замены F54S главным образом выразилось в уменьшении значений K_m , по сравнению с TvDAAO M104W, но значения k_{cat} при этом не увеличились. Как результат, наблюдается некоторый рост каталитической эффективности относительно таковой для TvDAAO M104W с объемными субстратами.

TvDAAO F54S/M104S является наименее активным двойным мутантом со многими субстратами. Замена F54S не приводит к улучшению каталитической активности, а лишь сужает спектр субстратной специфичности.

При объединении замен M104F, M104Y, M104W с заменой F258S в двойные замены M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S в случае большинства субстратов наблюдается уменьшение значений K_m по сравнению с предшественниками, что связано не с отдельным, а совместным влиянием точечных замен в 104м положении и замены F258S (табл. 4.17, рис. 4.33-36). Однако стоит отметить, что двойные мутанты 104/258 имеют более узкий спектр субстратный специфичности и немного увеличенные значения k_{cat} с некоторыми субстратами, например с D-Leu и D-Phe, что главным образом, является результатом влияния замены F258S. Отдельно по каждому мутанту можно выделить следующие моменты в сравнении с TvDAAO дикого типа:

TvDAAO M104F/F258S имеет повышенную активность с D-Leu (в 1,5 раза) и D-Phe (в 1,5 раза). На фоне снижения значений K_m с некоторыми субстратами,

возросла каталитическая эффективность с D-Leu (в 2,2 раза). Фермент неактивен с D-Thr, сильно снизилась активность с D-Ala, D-Val, D-Ser, D-Asn и D-Lys.

TvDAAO M104Y/F258S имеет пониженную каталитическую активность со всеми изученными субстратами. Фермент неактивен с D-Thr. За счет снижения значений K_m , немного увеличилась каталитическая эффективность с D-Leu (в 2,1 раза) и D-Phe (в 2,2 раза).

TvDAAO M104W/F258S имеет пониженную активность с D-Ala, D-Val, D-Ser, D-Asn и D-Lys. Фермент неактивен с D-Thr. Выросла каталитической эффективностью с D-Leu (в 1,2 раза) и D-Phe (в 1,4 раза).

Исходя из диаграммы с абсолютными значениями каталитической эффективности (рис. 4.36), в целом можно констатировать, что введение замен F54S и F258S в дополнение к заменам M104F, M104Y, M104W приводит к увеличению каталитической эффективности с объемными субстратами (D-Met, D-Leu, D-Phe, D-Тур, D-Трп) и уменьшению активности с небольшими субстратами (D-Ala, D-Val, D-Ser) по сравнению с соответствующими точечными предшественниками. Замены F54S и F258S определяют вид спектра субстратной специфичности двойных мутантов F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S. Кроме того, замена F54S определяет активность двойных мутантов с D-Lys (рис. 4.34, 4.35). Стоит отметить, что для всех двойных мутантов, как и для TvDAAO F54S и TvDAAO F258S, лучшим субстратом является D-Phe. Таким образом, остатки в 54 и 258 положениях оказывают большее влияние на каталитические свойства и спектр субстратной специфичности фермента, чем остаток Met104.

Таблица 4.15.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами F54S, F258S и фермента дикого типа.

Субстрат	Форма TvDAAO								
	Дикий тип			F54S			F258S		
	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹
D-Met	0,46±0,03	81±1	175	0,39±0,03	70±2	180	3,3±0,3	42,0±2,0	12,7
D-Ala	16,7±0,7	109±2	6,5	нет активности			нет активности		
D-Val	14,4±1,2	85±3	5,9	нет активности			46±4	11,5±0,5	0,25
D-Leu	0,78±0,02	29,1±0,3	37	0,13±0,02*	34,0±2,0	260	0,23±0,01	56±1	250
D-Ser	37±4	20,5±0,9	0,56	нет активности			нет активности		
D-Phe	0,37±0,04	27,2±0,8	74	0,36±0,06	116±11	320	0,13±0,01	47,1±0,9	350
D-Tyr	0,45±0,06	22,5±1,9	50	0,50±0,08	78±8	160	0,84±0,16	72±12	86
D-Trp	0,49±0,04	42,4±1,4	87	0,38±0,02	79±2	210	0,46±0,02	31,0±0,7	67
D-Asn	22,6±1,5	62±2	2,8	8,3±0,7	78±3	9,4	50±3	14,8±1,3	0,30
D-Thr	11,1±0,8	1,75±0,04	0,16	нет активности			нет активности		
D-Lys	29,3±3,4	3,54±0,21	0,12	43±12	38,0±5,0	0,9	нет активности		

Таблица 4.16.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, F54S/M104S.

Субстрат	Форма TvDAAO											
	F54S/M104F			F54S/M104Y			F54S/M104W			F54S/M104S		
	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹
D-Met	2,00±0,10	66±2	33	0,61±0,03	23,7±0,4	39	0,57±0,03	43,8±0,9	77	0,36±0,04	21,1±0,6	58
D-Ala	1,50±0,10	4,5±0,1	3,0	н.д.	2,00±0,10	н.д.	3,70±0,30	3,70±0,10	1,02	10,0±1,0	1,97±0,08	0,19
D-Val	2,60±0,30	9,9±0,3	3,8	н.д.	1,60±0,10	н.д.	10,7±1,1	4,00±0,20	0,38	н.д.	0,80±0,05	н.д.
D-Leu	0,75±0,05	42,3±1,0	57	н.д.	2,00±0,10	н.д.	0,17±0,01	12,0±0,1	71	0,08±0,01	7,1±0,2	86
D-Ser	н.д.**	2,0±0,2	н.д.	19,9±1,8	2,24±0,06	0,11	нет активности			нет активности		
D-Phe	2,05±0,10	84±1	41	1,00±0,05	57±0,9	58	0,23±0,01	17,5±0,3	76	0,42±0,02	38,5±0,7	92
D-Tyr	0,73±0,20	15,2±2,9	20,8	1,50±0,25	35,0±4,7	23,3	0,39±0,05	13,7±1,0	35	0,27±0,03	13,3±0,7	49
D-Trp	1,06±0,10	29,9±1,5	28	0,64±0,08	23,8±1,4	37	0,31±0,04	19,5±0,8	64	0,55±0,06	18,4±1,0	33
D-Asn	29,9±2,1	44,2±1,5	1,5	10,2±0,5	41,9±0,8	4,10	8,8±0,9	12,1±0,5	1,38	8,0±0,5	28,1±0,8	3,5
D-Thr	нет активности			нет активности			нет активности			нет активности		
D-Lys	125±47	19,1±5,8	0,2	48±10	9,3±1,3	0,19	13,5±1,9	7,7±0,4	0,57	14,6±1,2	9,8±0,4	0,67

Таблица 4.17.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S и фермента дикого типа.

Субстрат	Форма TvDAAO											
	M104F/F258S			M104Y/F258S			M104W/F258S			Дикий тип		
	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹
D-Met	1,46±0,11	42,7±1,1	29,2	0,50±0,06	19,7±0,6	39,1	1,02±0,04	36,6±0,6	36,0	0,46±0,03	81±1	175
D-Ala	39,5±2,4	22,3±0,7	0,56	28,6±2,3	7,5±0,3	0,26	13,3±0,7	30,3±0,7	2,27	16,7±0,7	109±2	6,5
D-Val	10,2±0,6	22,6±0,5	2,21	26,8±1,3	5,8±0,1	0,22	21,4±0,9	10,4±0,2	0,48	14,4±1,2	85±3	5,9
D-Leu	0,28±0,02	43,9±0,5	156	0,45±0,02	23,1±0,4	51	0,45±0,01	34,8±0,4	77	0,78±0,02	29,1±0,3	37
D-Ser	46,1±5,7	4,5±0,4	0,10	50,1±9,3	2,70±0,27	0,05	35,2±3,4	2,73±0,12	0,08	37±4	20,5±0,9	0,56
D-Phe	0,27±0,02	43,3±0,7	158	0,18±0,01	19,1±0,2	106	0,23±0,02	37,8±0,7	164	0,37±0,04	27,2±0,8	74
D-Tyr	0,34±0,03	15,7±0,7	46,7	0,25±0,0	8,0±0,4	32,1	0,24±0,02	11,6±0,6	48,9	0,45±0,06	22,5±1,9	50
D-Trp	0,71±0,08	30,6±1,8	43,3	0,36±0,03	10,5±0,4	29,4	0,34±0,03	19,0±0,6	56	0,49±0,04	42,4±1,4	87
D-Asn	38,1±4,0	16,1±1,1	0,42	29,7±2,1	14,7±0,6	0,50	55,5±4,5	12,2±0,7	0,22	22,6±1,5	62±2	2,8
D-Thr	нет активности			нет активности			нет активности			11,1±0,8	1,75±0,04	0,16
D-Lys	н.д.	0,46±0,04	н.д.	н.д.	0,29±0,03	н.д.	н.д.	0,50±0,05	н.д.	29,3±3,4	3,54±0,21	0,12

* – Зеленым фоном и полужирным шрифтом выделены случаи улучшения каталитических параметров мутантных TvDAAO по сравнению с таковыми для фермента дикого типа

** – нет данных

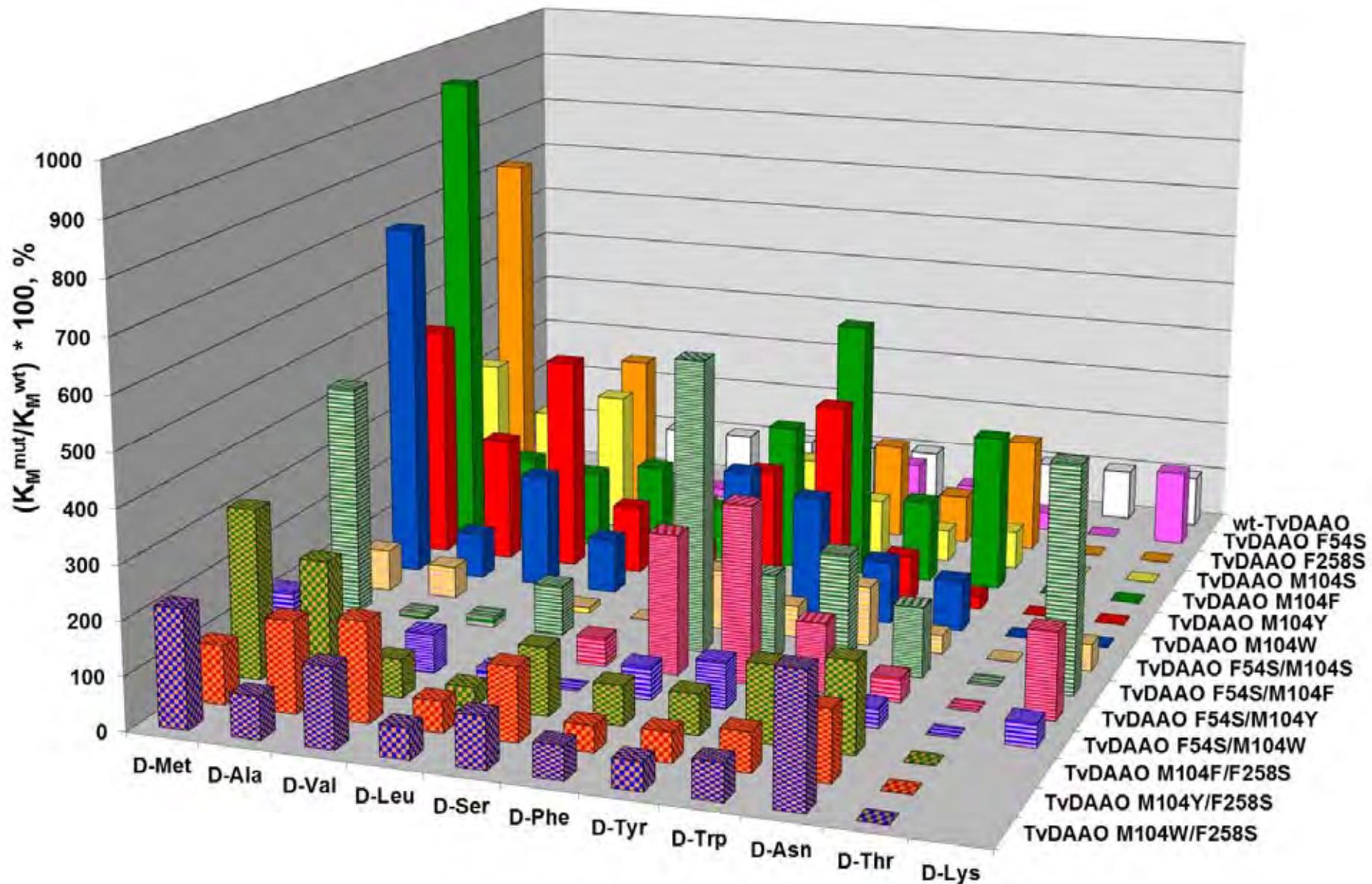


Рис. 4.33. Относительные значения констант Михаэлиса (K_M) для мутантных TvDAAO с точечными заменами F54S, F258S, M104S, M104F, M104Y, M104W и двойными заменами F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S. За 100% приняты значения K_M фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

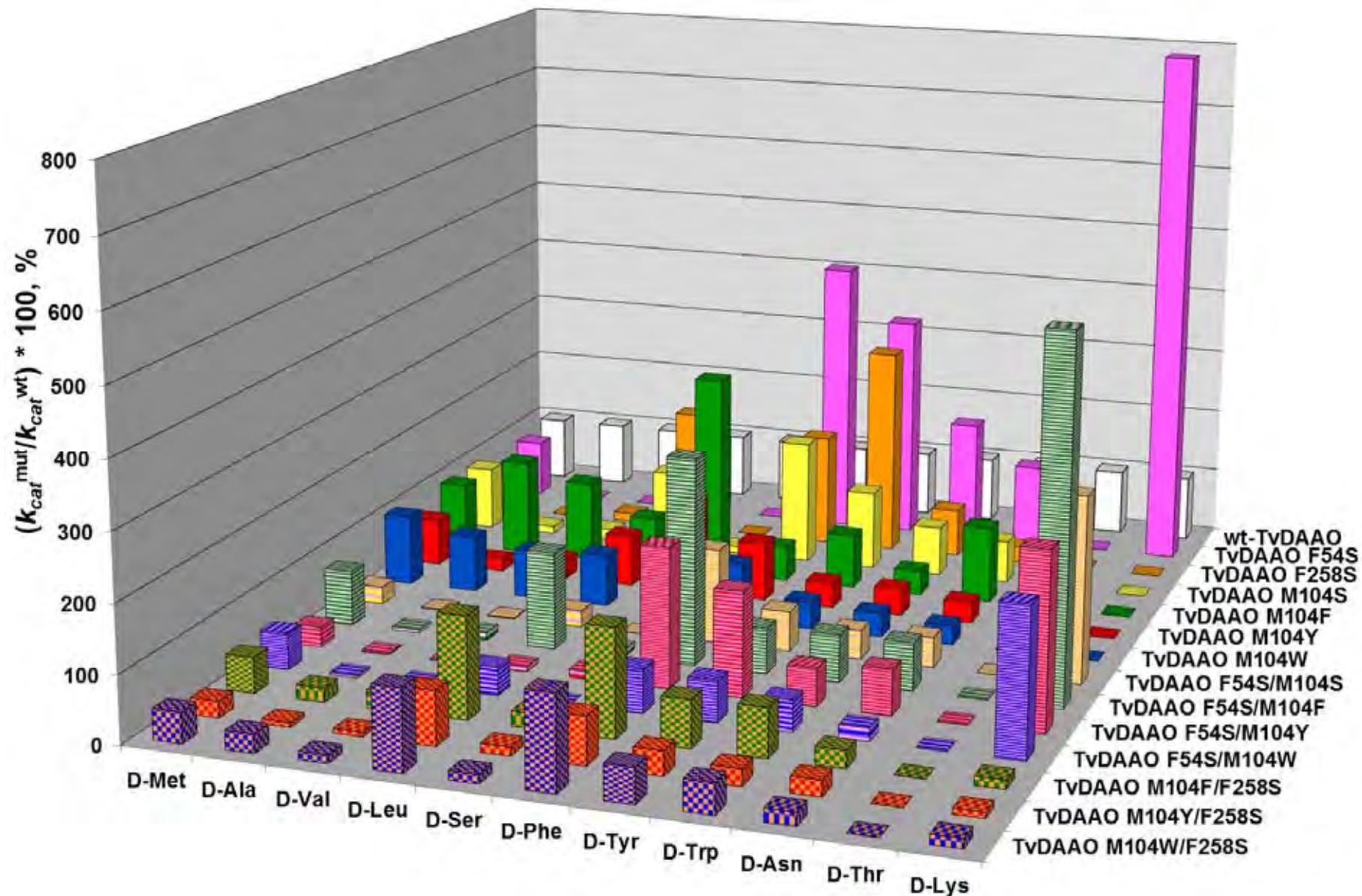


Рис. 4.34. Относительные значения каталитических констант (k_{cat}) для мутантных TvDAAO с точечными заменами F54S, F258S, M104S, M104F, M104Y, M104W и двойными заменами F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S. За 100% приняты значения k_{cat} фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

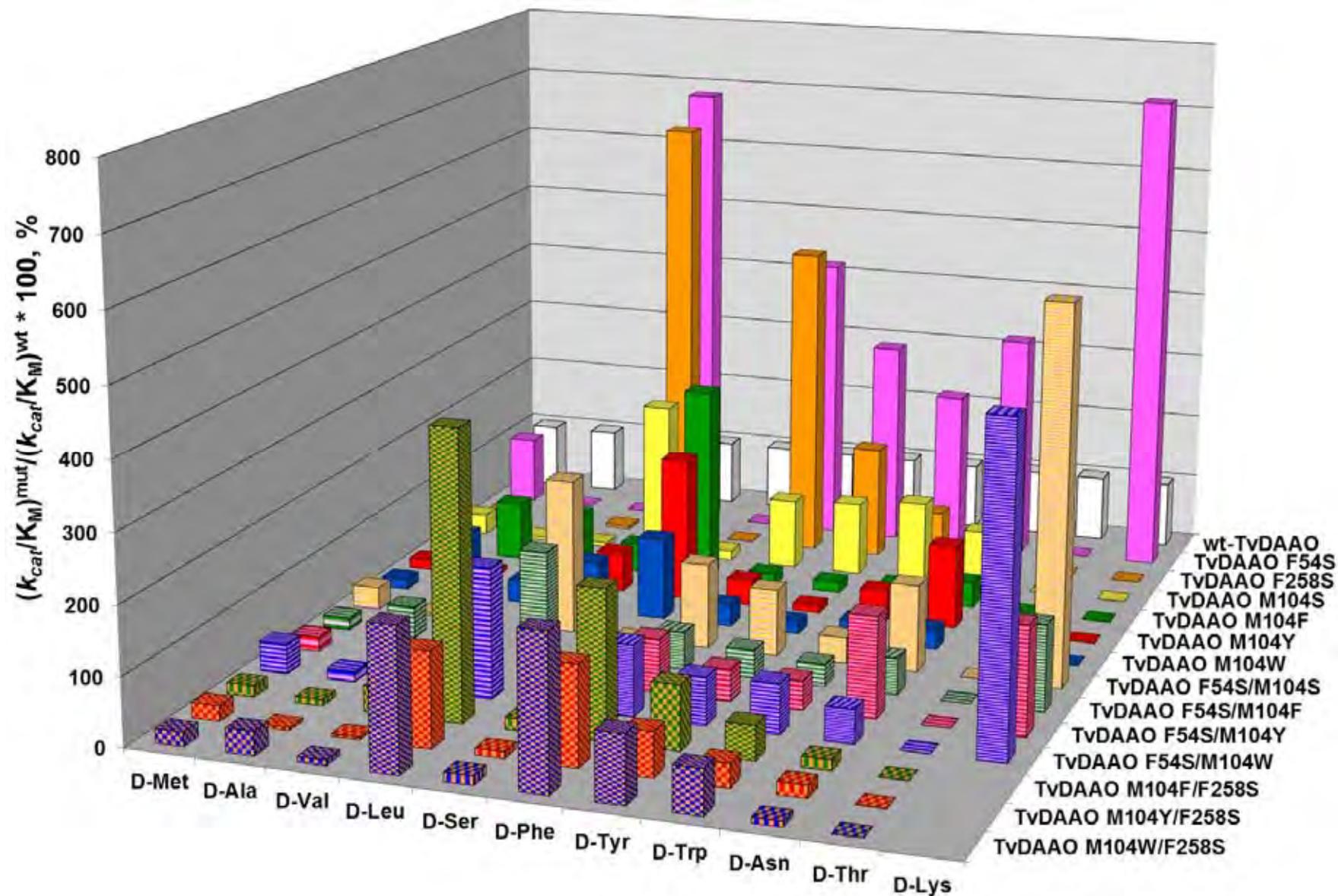


Рис. 4.35. Относительные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с точечными заменами F54S, F258S, M104S, M104F, M104Y, M104W и двойными заменами F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S. За 100% принята каталитическая эффективность фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

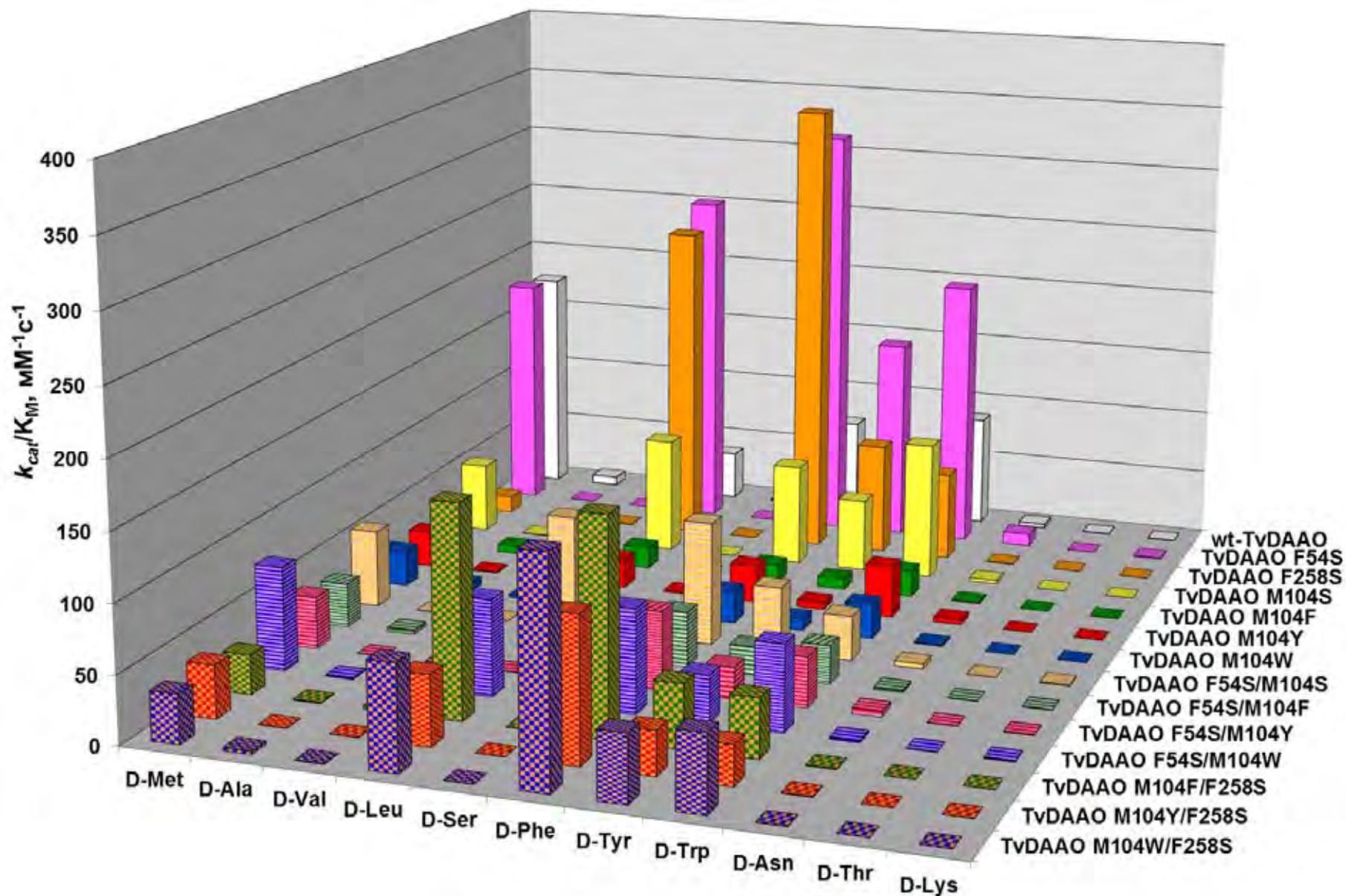


Рис. 4.36. Абсолютные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с точечными заменами F54S, F258S, M104S, M104F, M104Y, M104W и двойными заменами F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S.

4.2.4. Температурная стабильность мутантных TvDAAO с двойными заменами

Изучение температурной стабильности мутантных TvDAAO с двойными заменами F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S проводили по кинетике инактивации. Эксперименты при различных температурах и начальных концентрациях ферментов показали, что термоинактивация всех двойных мутантов протекает по диссоциативному механизму, что подтверждалось наличием точек излома на зависимостях остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах и увеличением тангенса угла наклона второго линейного при уменьшении начальной концентрации фермента. (см. главу 4.1). Исходя из этого, для корректной интерпретации экспериментальных данных, зависимости остаточной активности от времени при различных температурах для всех двойных и точечных мутантов были получены при одинаковой начальной концентрации ферментов равной 10 мкг/мл. Подобные зависимости при 56°C приведены на рис. 4.37 для TvDAAO F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W и на рис. 4.38 для TvDAAO M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S в сравнении с точечными предшественниками TvDAAO F54S, M104F, M104Y, M104W, F258S и ферментом дикого типа. При введении точечной замены F54S в дополнение к заменам в 104м положении эффект дестабилизации увеличивается в ряду F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, причем двойной мутант TvDAAO F54S/M104W по скорости инактивации сравним с TvDAAO F54S (рис. 4.37). Другими словами, в случае мутанта TvDAAO F54S (рис. 4.30B) дополнительные замены остатка Met104 на ароматические аминокислоты стабилизируют такой фермент в разной степени, причем этот эффект растет в зависимости от вводимого остатка в ряду Trp – Tyr – Phe. Аналогичная ситуация наблюдалась в случае фермента дикого типа, т.е. когда в 54 положении находится остаток Phe (рис. 4.12 и 4.30). Совершенно другая ситуация наблюдается в случае TvDAAO M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S. Введение замены F258S в дополнение к M104F, M104Y и M104W приводит к снижению температурной стабильности ферментов практически в равной степени (рис. 4.38).

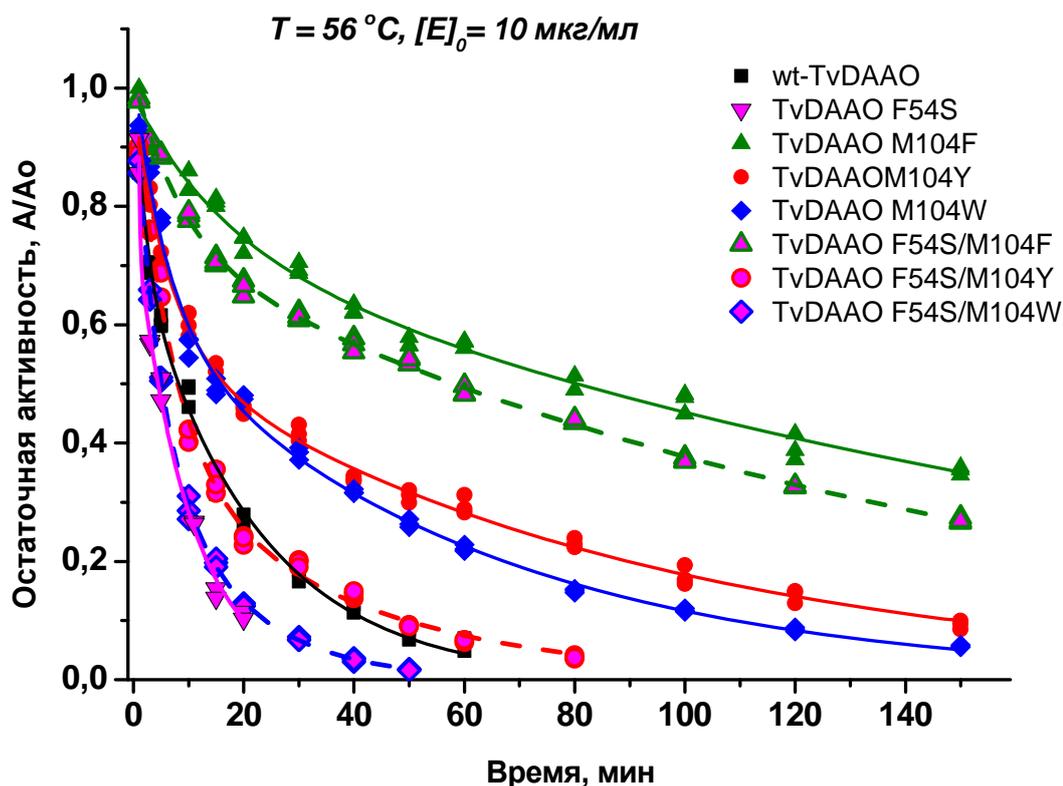


Рис. 4.37. Зависимости остаточной активности от времени для мутантных TvDAAO с заменами F54S (▼, -), M104F (▲, -), M104Y (●, -), M104W (◆, -), F54S/M104F (▲, -), F54S/M104Y (●, -), F54S/M104W (◆, -) и TvDAAO дикого типа (■, -). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0, 56 °С.

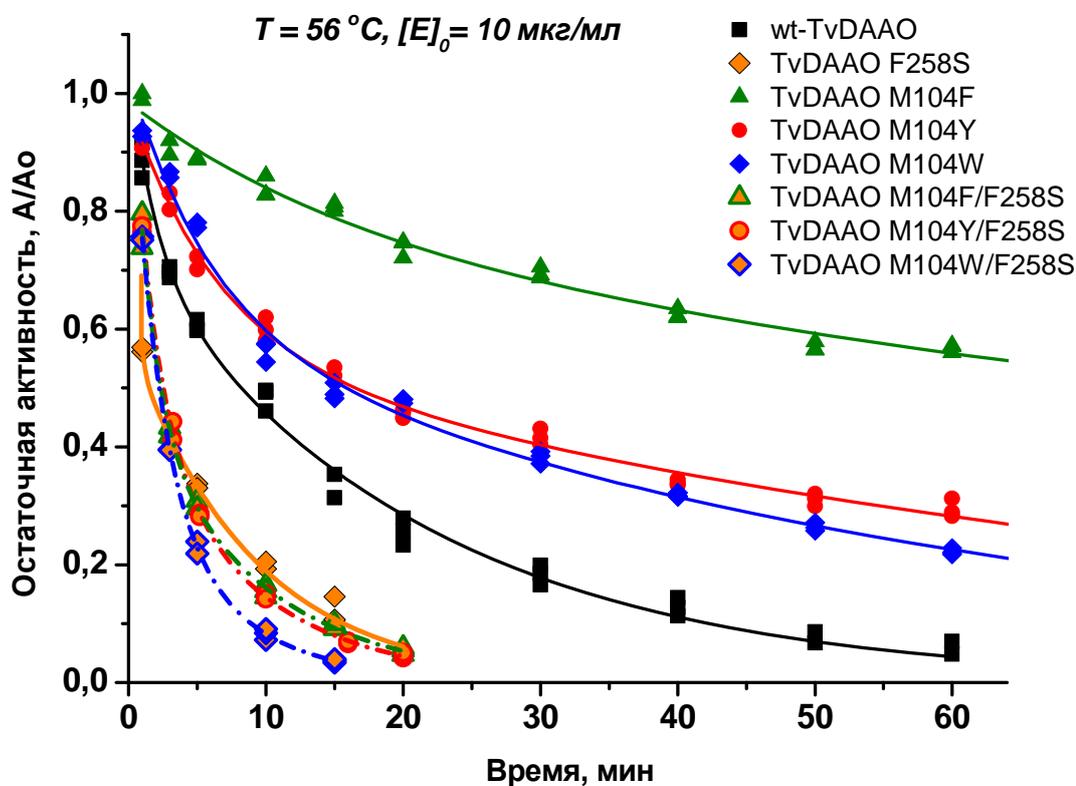


Рис. 4.38. Зависимости остаточной активности от времени для мутантных TvDAAO с заменами F258S (◆, -), M104F (▲, -), M104Y (●, -), M104W (◆, -), M104F/F258S (▲, -), M104Y/F258S (●, -), M104W/F258S (◆, -) и TvDAAO дикого типа (■, -). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0, 56 °С.

Таким образом, в случае TvDAAO F258S введение ароматических замен в 104е положение практически не стабилизирует такой фермент, в отличие от TvDAAO дикого типа и TvDAAO F54S. По-видимому, остаток Phe258 играет более важную роль в температурной стабильности TvDAAO и является более значимым для взаимодействия с ароматическими заменами в 104м положении.

Для более подробного анализа температурной стабильности мутантных TvDAAO и фермента дикого типа, нами были рассчитаны истинные константы скорости для первой и второй стадии процесса термоинактивации в соответствии с теорией диссоциативной инактивации (табл. 4.18), а также периоды полуинактивации для всех ферментов при всех изученных температурах (табл. 4.19). Из данных таблиц 4.18 и 4.19 видно, что для двойных мутантов TvDAAO F54S/M104Y и TvDAAO F54S/M104W температурные диапазоны, в которых реализуется диссоциативный механизм термоинактивации, сместились на 2°C в область низких температур по сравнению с точечными мутантами TvDAAO M104Y и TvDAAO M104W, соответственно. Мутантные TvDAAO M104F и TvDAAO M104F/F258S имеют одинаковый температурный диапазон термоинактивации от 54 до 64°C. Все мутантные TvDAAO с двойными заменами в 104/258 положениях, как и TvDAAO F258S, были изучены в диапазоне от 46 до 56°C.

Для оценки аддитивности мутаций мы использовали подход, аналогичный предложенному в работе [187]. Поскольку повышение температурной стабильности связано с понижением констант скорости инактивации, то для простоты и большей наглядности в качестве параметров $\alpha_{\text{эксп}}$ и $\alpha_{\text{теор}}$ для точечных и многоточечных мутантов мы использовали значения эффектов стабилизации, которые рассчитываются как:

$$\alpha^{\text{эксп}} = k_{\text{in}}^{\text{wt}}/k_{\text{in}}^{\text{mut}*}, \text{ где } k_{\text{in}}^{\text{wt}} - \text{ константа скорости инактивации фермента дикого типа, } k_{\text{in}}^{\text{mut}} - \text{ константа скорости инактивации точечных и многоточечных мутантов.}$$

$$\alpha^{\text{теор}} = \prod_{i=1}^n k_{\text{in}}^{\text{wt}}/k_{\text{in}}^{\text{mut}}, \text{ где } n - \text{ число объединенных замен.}$$

Таблица 4.18.

Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации мутантных TvDAAO с заменами в 54, 104, 258, 54/104 и 104/258 положениях (концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0)*.

Форма TvDAAO	Параметр	Температура, °C									
		46	48	50	52	54	56	58	60	62	64
Дикий тип	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-**	-	0,19	1,27	1,34	6,0	9,3	14,6	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	2,86	3,67	9,2	11,6	21,5	41	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	2,28	3,13	5,6	7,1	10,8	19,4	-	-
F54S	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	0,60	1,80	3,83	19,5	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,85	6,7	12,2	27,8	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	3,81	4,54	7,7	11,4	-	-	-
M104F	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	-	1,10***	1,36	1,97	3,16	3,86	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	1,53	2,17	3,40	6,4	10,0	20,0
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	1,07	1,76	2,31	4,57	9,2	19,3
M104Y	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	1,52	1,62	3,35	4,59	5,1	6,4	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	2,02	2,52	5,7	10,1	18,4	30	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	0,95	1,64	2,56	3,77	9,6	23,2	-
M104W	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	0,30	0,69	1,30	2,09	3,13	8,4	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	1,33	2,37	3,67	7,0	12,1	23,4	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	1,70	2,34	3,51	4,8	9,9	15,7	-	-
M104S	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	1,15	1,54	5,1	6,1	12,4	13,6	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,88	4,00	8,5	13,8	23,1	30	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,53	3,28	4,24	5,4	10,5	29	-	-	-
F258S	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	0,50	0,70	3,40	5,9	6,1	-	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	3,77	7,3	8,4	11,4	18,7	-	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	3,23	4,75	8,0	12,0	14,3	-	-	-	-
F54S/M104F	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	-	0,56	0,87	3,04	3,71	4,41	6,7
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	1,63	3,65	6,3	10,1	22,1	39
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	1,98	2,80	3,63	6,7	16,6	35
F54S/M104Y	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	1,13	2,75	4,0	7,0	16,9	30	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	1,92	2,78	5,5	11,9	16,5	34	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	1,52	1,74	2,47	5,4	9,9	15,7	-	-
F54S/M104W	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	0,49	1,44	3,96	9,8	13,8	37	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,93	4,18	4,55	8,7	14,5	30	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,59	2,07	2,74	3,60	8,8	16,9	-	-	-
F54S/M104S	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	1,38	2,46	4,29	10,5	22,1	-	-	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	2,58	3,83	5,7	7,7	15,1	-	-	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,69	2,18	3,41	5,9	10,7	-	-	-	-	-
M104F/F258S	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	0,42	0,80	1,79	2,70	5,5	8,4				
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	2,07	3,60	5,1	9,8	21,9	40				
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,67	2,54	2,93	5,2	8,7	16,7				
M104Y/F258S	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	1,17	2,33	3,05	4,40	6,7	9,5				
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	5,0	5,8	9,1	19,4	25	36				
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,62	1,94	2,50	5,1	11,5	17,9				
M104W/F258S	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	0,50	0,83	2,13	3,44	7,6	16,1				
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	3,02	4,30	7,1	14,1	27,1	43				
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	2,33	3,30	3,72	6,8	12,2	21,7				

*Ошибка эксперимента составляла не более 15%, **параметр не определяли из-за очень малого или очень большого значения констант, ***уменьшение параметров термоинактивации мутантных TvDAAO по сравнению с ферментом дикого типа выделено полужирным шрифтом и зеленым фоном, небольшое изменение – серым, увеличение – красным. Более темный фон соответствует большему эффекту.

Соответственно параметры $\alpha^{\text{эксп}}$ есть экспериментальные эффекты стабилизации для каждого мутантного фермента относительно фермента дикого типа. Значения $\alpha^{\text{теор}}$ могут быть рассчитаны только для многоточечных мутантов как произведение эффектов стабилизации отдельных точечных замен. Если значение $\alpha^{\text{эксп}} > 1$, то наблюдается повышение температурной стабильности, если $\alpha^{\text{эксп}} < 1$ – стабильность снижается. Поскольку TvDAAO инактивируется в соответствии с двухстадийным диссоциативным механизмом, то указанные параметры рассчитываются для каждой стадии процесса термоинактивации. Эффект аддитивности может быть рассчитан как отношение этих двух параметров ($\alpha^{\text{эксп}}/\alpha^{\text{теор}}$) выраженное в %.

Таблица 4.19.

Периоды полуинактивации мутантных TvDAAO и фермента дикого типа (концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0)*.

Форма TvDAAO	$\tau_{1/2}$, мин.; температура, °C									
	46	48	50	52	54	56	58	60	62	64
Дикий тип	-	-	73	47	23	7,2	4,7	2,7	-	-
F54S	-	-	-	40**	14	5,0	1,1	-	-	-
M104F	-	-	-	-	107***	82	37	14,0	8,1	4,7
M104Y	-	-	-	96	57	16,5	6,3	4,6	3,2	-
M104W	-	-	158	83	32	12,3	6,2	3,2	-	-
M104S	-	76	33	9,1	8,2	3,6	1,9	-	-	-
F258S	-	64	35	9,8	4,1	3,0	-	-	-	-
F54S/M104F	-	-	-	-	123	58	17	9,0	4,3	2,2
F54S/M104Y	-		132	47	28	11,1	5,2	2,9	-	-
F54S/M104W		157	44	17	10,6	5,3	2,2	-	-	-
F54S/M104S	65	25	16	10,6	5,0	-	-	-	-	-
M104F/F258S	160	66	29	10,6	4,7	2,5	-	-	-	-
M104Y/F258S	62	13,4	9,2	5,0	3,7	2,6	-	-	-	-
M104W/F258S	104	46	13,7	7,6	3,4	2,3	-	-	-	-

* – ошибка эксперимента составляла не более 15%

** – италикотом отмечены периоды полуинактивации ($\tau_{1/2}$) оцененные из данных по термоинактивации при концентрации фермента не равной 10 мкг/мл

*** – увеличение периодов полуинактивации мутантных TvDAAO по сравнению с ферментом дикого типа выделено полужирным шрифтом и зеленым фоном, небольшое изменение – серым, увеличение – красным. Более темный фон соответствует большему эффекту.

Таблица 4.20.

Аддитивность свойств мутантных TvDAAO при различных температурах.

Форма TvDAAO	Стадия	Температура, отношение ($\alpha^{\text{эксп}}/\alpha^{\text{теор}}$)*100%				
		50	52	54	56	58
F54S/M104F	1	-	-	68	63	70
	2	-	-	44	68	67
F54S/M104Y	1	-	37	33	50	79
	2	-	66	54	51	40
F54S/M104W	1	-	26	31	51	52
	2	-	104	79	59	62
F54S/M104S	1	-	56	67	-	-
	2	-	87	41	-	-
M104F/F258S	1	-	-	9	9	-
	2	-	-	26	21	-
M104Y/F258S	1	-	24	12	26	-
	2	-	48	31	29	-
M104W/F258S	1	48	38	17	26	-
	2	95	88	62	45	-

Сравнение значений констант скоростей инактивации для мутантных TvDAAO с двойными заменами F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W и их точечных предшественников F54S, M104F, M104Y и M104W показывает, что как по первой, так и по второй стадии наблюдается аддитивность ниже 100%, что говорит о взаимном влиянии замен, вводимых в 54 и 104 положения (табл. 4.20). Стоит отметить, что в случае объединения замен F54S и M104F аддитивность по обеим стадиям термоинактивации в целом выше, чем в случае объединения замен F54S, M104Y, M104W и M104S. Это говорит о том, что введение замены F54S в дополнение к заменам в 104м положении дестабилизирует точечный мутант TvDAAO M104F в меньшей степени, чем мутанты TvDAAO M104Y и M104W, причем эффекты дестабилизации при объединении M104Y и M104W с F54S близки между собой. Данный вывод также следует из данных таблиц 4.18 и 4.19 и температурных зависимостей констант скоростей k_1 и k_2 для первой и второй стадий термоинактивации, соответственно (рис. 4.39). Для констант скоростей на первой стадии термоинактивации температурные зависимости для двойных мутантов с заменами F54S/M104F, F54S/M104Y и F54S/M104W по углу наклона близки к таковым для точечных мутантов с заменами M104F, M104Y, M104W и ферменту дикого типа (рис. 4.39А). Однако стоит отметить, что для TvDAAO

F54S/M104F и TvDAAO F54S/M104W наблюдается некоторое увеличение угла наклона данных зависимостей, что, по-видимому, является результатом влияния замены F54S, поскольку для этого фермента константа скорости k_1 сильнее всего зависит от температуры. Как видно из рис.4.39А, все мутантные ферменты, кроме TvDAAO F54S/M104W, стабильнее фермента дикого типа на первой стадии инактивации при всех изученных температурах. Для TvDAAO F54S/M104W наблюдается небольшая дестабилизация относительно фермента дикого типа. Более сложная картина наблюдается для температурных зависимостей константы скорости инактивации на второй стадии (рис.4.39Б). Мутантные TvDAAO F54S/M104F и TvDAAO F54S/M104W имеют похожие зависимости со своими точечными предшественниками в 104м положении. В случае TvDAAO F54S/M104Y угол наклона зависимости k_2 несколько меньше, чем для TvDAAO M10Y, что является результатом введения замены F54S, поскольку для TvDAAO F54S константа k_2 слабее зависит от температуры. Несмотря на различные температурные зависимости, мутантные TvDAAO F54S/M104F и TvDAAO F54S/M104Y на второй стадии термоинактивации оказываются стабильнее, чем мутантная TvDAAO F54S и фермент дикого типа, в то время как, мутантная TvDAAO F54S/M104W в пределах ошибки эксперимента близка к своим точечным предшественникам.

Таким образом, по своей температурной стабильности мутантные TvDAAO F54S/M104F и TvDAAO F54S/M104Y в изученных температурных диапазонах превосходят точечный мутант с заменой F54S и фермент дикого типа, однако уступают своим предшественникам с заменами M104F и M104Y. Температурная стабильность TvDAAO F54S/M104W в целом оказывается ниже, чем у фермента дикого типа и точечного предшественника TvDAAO M104W во всем температурном диапазоне от 48 до 58°C, но при температурах выше 56°C фермент немного стабильнее, чем TvDAAO F54S. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что взаимодействие вводимых ароматических замен в 104е положении с остатком Phe54 не является единственной причиной стабилизации TvDAAO. Также интересным является тот факт, что объединение замен F54S и M104S в двойной мутант F54S/M104S приводит к сильному снижению темпера-

турной стабильности TvDAAO, несмотря на то, что каждая из указанных точечных замен не дает такого эффекта дестабилизации. По-видимому, при введении точечных замен F54S или M104S в каждом случае сохраняются взаимодействия между остатками Met104-Phe258 или Phe54-Phe258, соответственно. Однако возможно, что активный центр не так сильно экспонируется растворителю, как в случае объединения точечных замен в двойной мутант.

Анализ параметров термоинактивации для мутантных TvDAAO с двойными заменами M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S и их точечных предшественников M104F, M104Y, M104W, F258S показывает, что по обеим стадиям термоинактивации в среднем наблюдается очень низкая аддитивность, особенно в случае объединения замен M104F и F258S, что также указывает на взаимодействие между остатками в 104 и 258 положениях (табл. 4.20). Стоит отметить, что аддитивность при объединении замен в 104 и 258 положениях в целом ниже, чем при объединении замен в 54 и 104 положениях. Интересно, что введение замены F258S в дополнение к заменам в 104м положении дестабилизирует точечные мутантные TvDAAO M104F, TvDAAO M104Y, M104W в одинаково большой степени так, что двойные мутанты TvDAAO M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S по стабильности становятся сравнимы с исходной TvDAAO F258S (таблицы 4.18, 4.19 и рис. 4.38). Об этом также говорят температурные зависимости для констант первой и второй стадий термоинактивации (рис. 4.40). На первой стадии инактивации наклоны этих зависимостей для TvDAAO M104F/F258S и M104W/F258S близки к таковым для соответствующих точечных мутантов с заменами M104F и M104W и фермента дикого типа. В случае TvDAAO M104Y/F258S значения k_1 в меньшей степени зависят от температуры, в отличие от остальных двойных мутантов в этих положениях и температурная зависимость оказывается похожей как на TvDAAO F258S, так и на TvDAAO M104Y. Интересным является тот факт, что двойные мутанты TvDAAO M104F/F258S, M104Y/F258S и M104W/F258S оказываются менее стабильными на первой стадии инактивации, чем TvDAAO F258S при температурах выше 52°C (рис. 4.40А). На второй стадии наблюдается несколько другая ситуация. По своим температурным зависимостям k_2 двойные мутанты

TvDAAO M104F/F258S, TvDAAO M104Y/F258S, TvDAAO M104W/F258S являются чем-то средним между точечными предшественниками M104F, M104Y, M104W и F258S соответственно. Другими словами, замены в 104и и 258м положениях приблизительно в равной степени влияют на вид температурной зависимости k_2 для двойных мутантов. Однако значения констант скоростей первой и второй стадий термоинактивации лежат выше соответствующих значений для фермента дикого типа. В результате в сумме по обеим стадиям термоинактивации двойные мутанты TvDAAO M104F/F258S, M104Y/F258S и M104W/F258S оказываются менее стабильны, чем TvDAAO дикого типа во всем изученном температурном диапазоне от 46 до 56°C. Анализ данных таблиц 4.18, 4.19 и рис. 4.40 позволяет сделать вывод, что несмотря на сильную дестабилизацию в случае двойных замен 104/258, в совокупности по обеим стадиям термоинактивации наиболее стабильным является мутант TvDAAO M104F/F258S. В силу сложного механизма термоинактивации и различных температурных зависимостей k_1 и k_2 , стабильности TvDAAO M104Y/F258S и TvDAAO M104W/F258S при каждой температуре определяются соотношением констант каждой стадии инактивации, но в целом TvDAAO M104Y/F258S оказываются немного менее стабильнее, чем TvDAAO M104W/F258S.

Таким образом, наблюдается сильная дестабилизация TvDAAO M104F/F258S, TvDAAO M104Y/F258S, TvDAAO M104W/F258S относительно точечных мутантов с заменами M104F, M104Y, M104W и фермента дикого типа за счет введения замены F258S. Исходя из этого, можно сделать вывод о наличии взаимодействия между ароматическими заменами в 104м положении и остатком Phe258. Причем, как следует из полученных данных, данное взаимодействие вносит основной вклад в стабилизацию TvDAAO, особенно в случае замены M104F. Для всех двойных мутантов, исходя из температурных зависимостей констант скорости (рис.4.39, 4.40), были найдены активационные параметры – энтальпия и энтропия активации, а также Аррениусовская энергия активации для первой и второй стадий термоинактивации (табл. 4.21). Значения ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger и E_a соотносятся с положением температурных зависимостей и по сути являются их численным представлением.

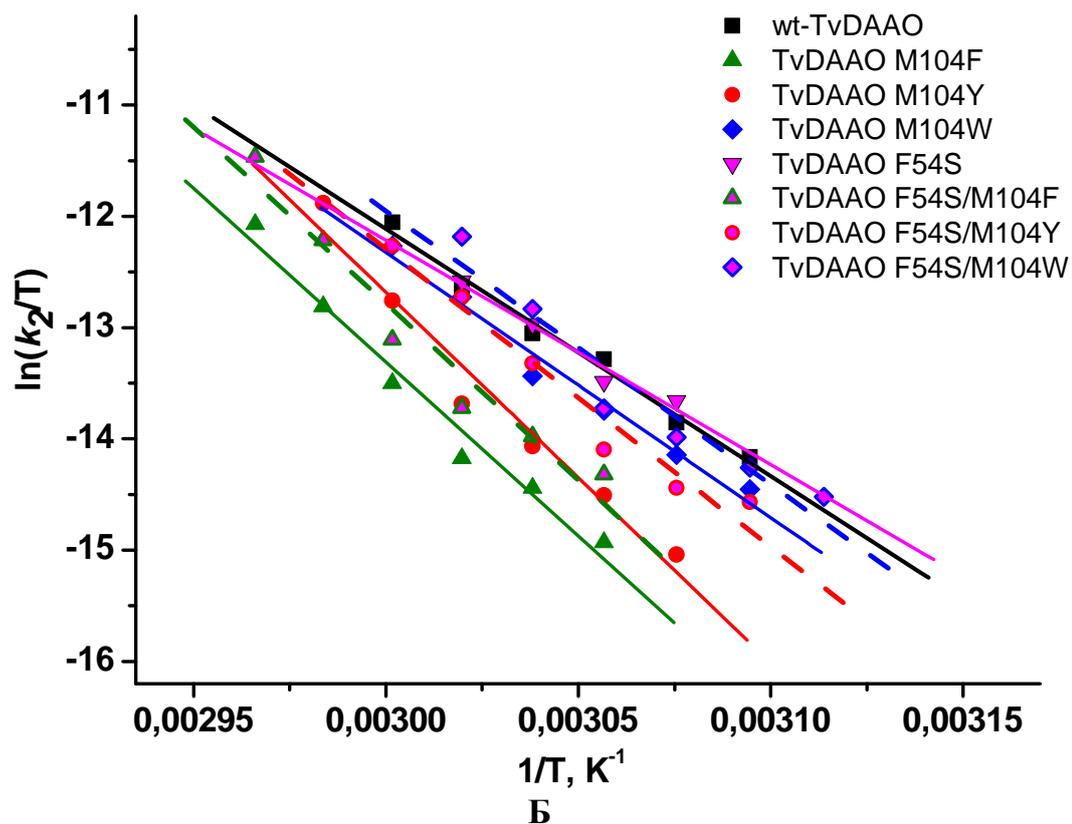
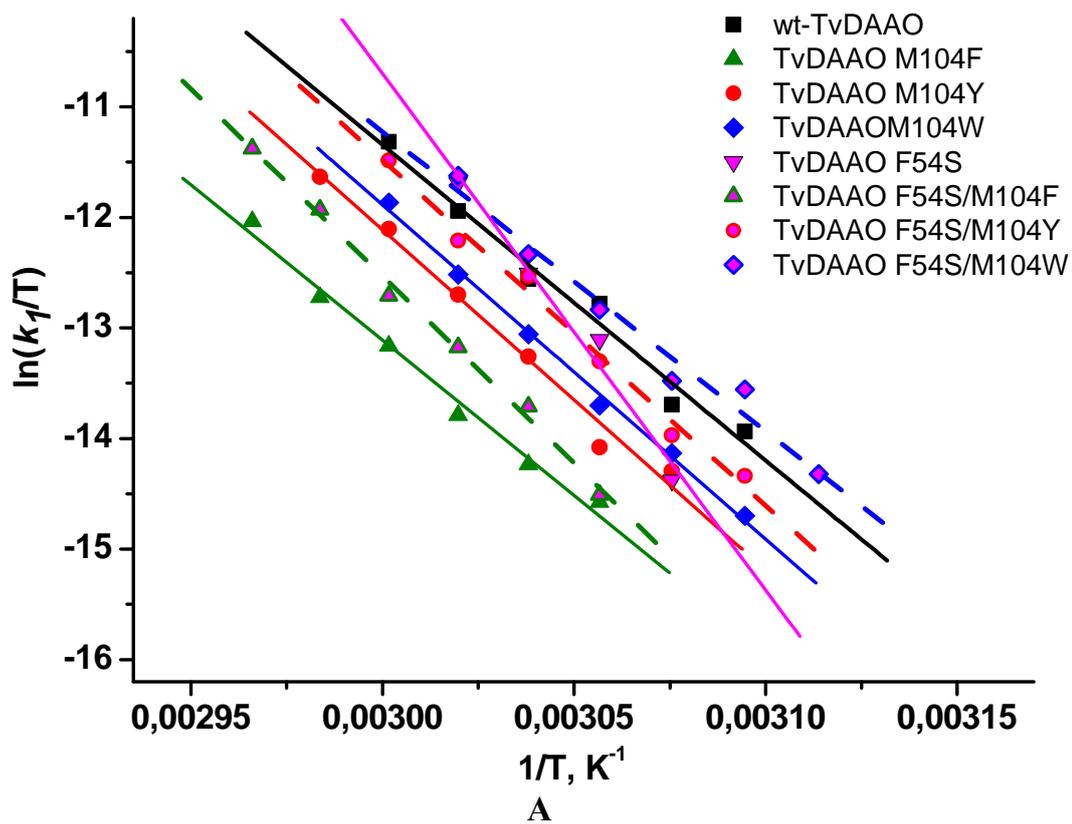


Рис. 4.39. Температурные зависимости констант скорости первой (k_1/T от $1/T$, **А**) и второй (k_2/T от $1/T$, **Б**) стадий термоинактивации для мутантных TvDAAO с заменами F54S (∇ , —), M104F (\blacktriangle , —), M104Y (\bullet , —), M104W (\blacklozenge , —), F54S/M104F (\blacktriangle , - -), F54S/M104Y (\bullet , - -), F54S/M104W (\blacklozenge , - -) и TvDAAO дикого типа (\blacksquare , —). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0.

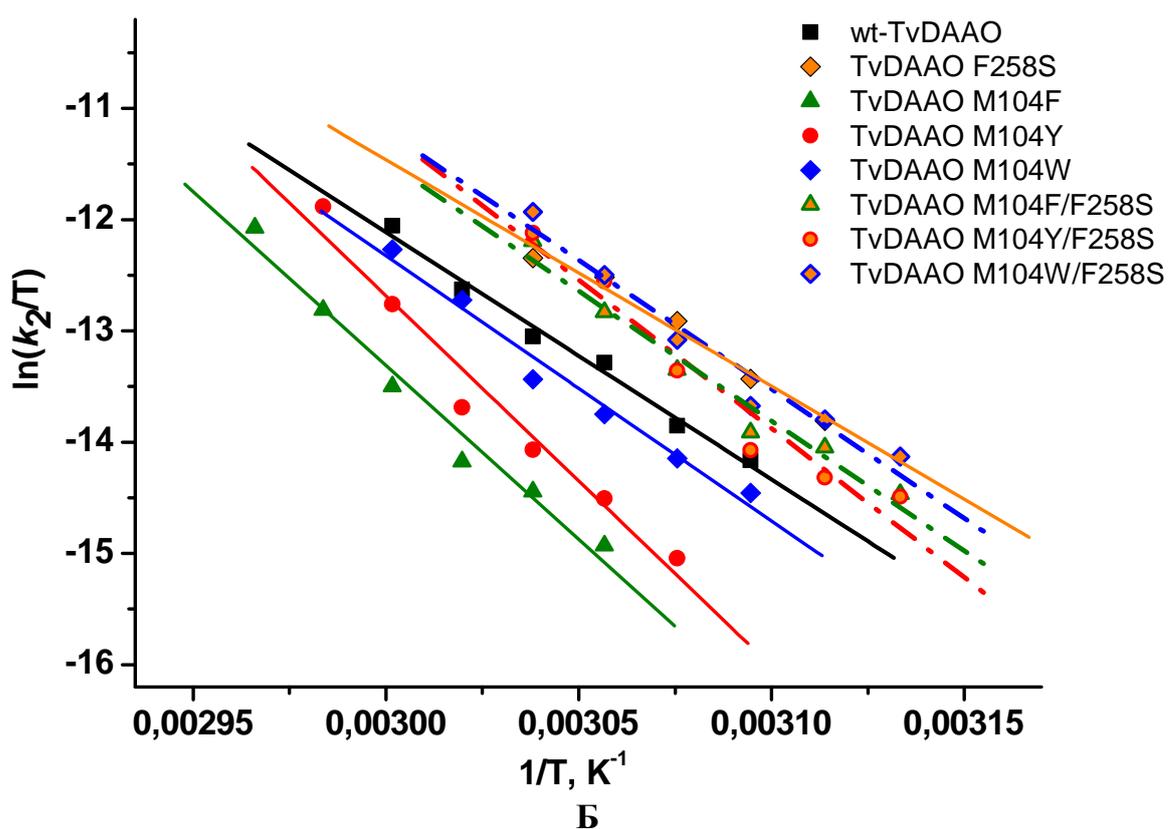
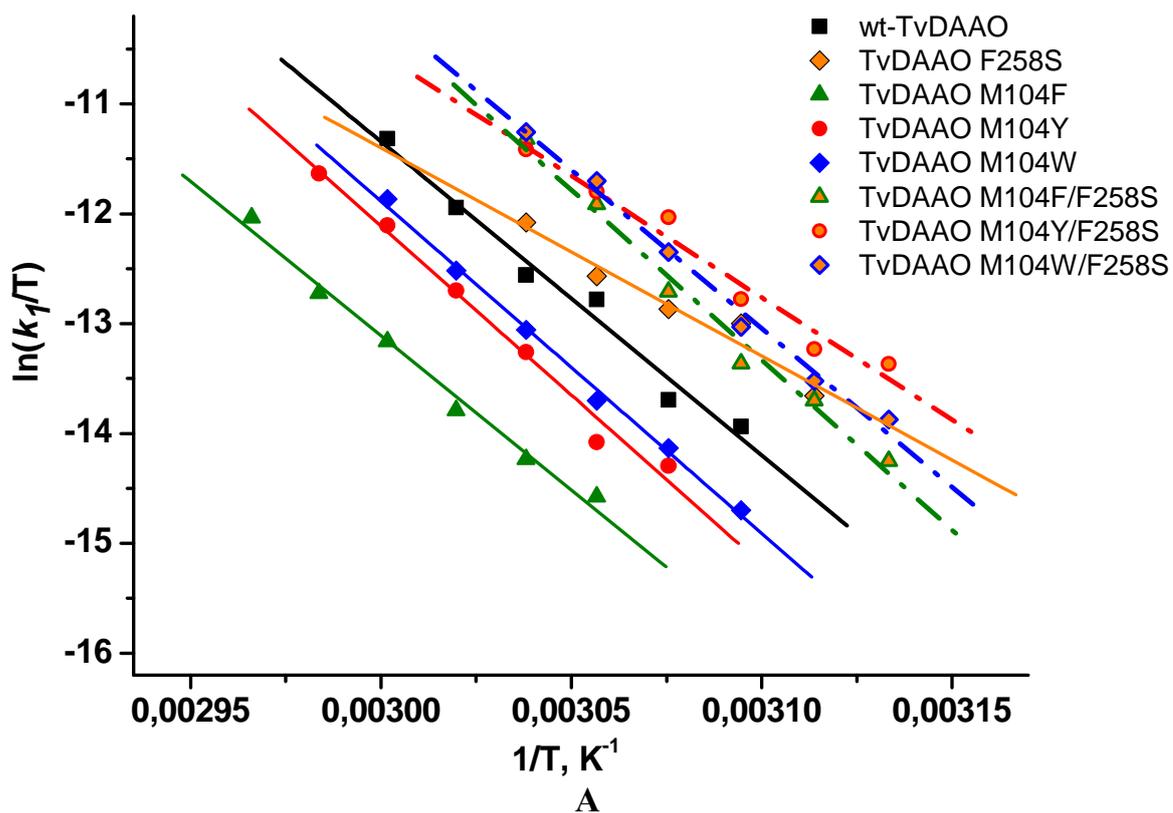


Рис. 4.40. Температурные зависимости констант скорости первой (k_1/T от $1/T$, **А**) и второй (k_2/T от $1/T$, **Б**) стадии термоинактивации для мутантных TvDAAO с заменами F258S ($\blacklozenge, -$), M104F ($\blacktriangle, -$), M104Y ($\bullet, -$), M104W ($\blacklozenge, -$), M104F/F258S ($\blacktriangle, - - -$), M104Y/F258S ($\bullet, - - -$), M104W/F258S ($\blacklozenge, - - -$) и TvDAAO дикого типа ($\blacksquare, -$). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0.

Таблица 4.21.

Активационные параметры первой и второй стадий инактивации мутантных TvDAAO и фермента дикого типа (0,1 М КФБ, рН 8,0).

Форма TvDAAO	1я стадия инактивации			2я стадия инактивации		
	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль* К)	E_a , кДж/моль	ΔH^\ddagger , кДж/моль	ΔS^\ddagger , Дж/(моль* К)	E_a , кДж/моль
Дикий тип	237±18	420±40	240±17	185±11	260±30	187±10
F54S	388±40	880±130	391±40	168±20	200±60	170±20
M104F	233±12	400±40	236±13	260±20	470±60	263±20
M104Y	256±15	470±40	259±15	277±30	530±80	280±30
M104W	251±8	460±20	254±10	198±15	300±40	201±15
M104S	244±20	440±60	247±20	230±30	400±90	232±30
F258S	157±20	180±60	160±20	169±14	214±45	172±14
F54S/M104F	281±10	540±30	284±10	264±30	490±90	267±30
F54S/M104Y	260±13	490±50	262±13	223±20	370±70	225±20
F54S/M104W	225±19	390±60	228±19	204±30	320±60	207±30
F54S/M104S	181±15	250±50	183±15	201±18	310±60	203±18
M104F/F258S	258±16	490±50	260±16	194±18	290±60	197±18
M104Y/F258S	185±16	270±50	187±16	223±30	380±80	225±30
M104W/F258S	224±9	390±30	227±9	189±17	280±60	192±17

Таким образом, с помощью направленного мутагенеза, нами были изучены взаимодействия между остатками Phe54, Phe258 и ароматическими аминокислотными заменами в 104м положении, за счет парного объединения замен M104F, M104Y, M104W, M104S с заменами F54S и F258S. Все изученные остатки располагаются на входе в активный центр фермента. Результаты экспериментов показали, что введенные замены приводят к заметному изменению профиля субстратной специфичности TvDAAO. При объединении точечных аминокислотных замен в двойные, профили субстратной специфичности двойных мутантов с большинством D-аминокислот, главным образом, определяются заменами F54S и F258S. Однако каталитическая активность с большинством D-аминокислот обусловлена влиянием каждой пары точечных мутаций. Данные по изучению температурной стабильности точечных и двойных мутантов TvDAAO

показали, что взаимодействие между остатками в 104м положении и остатком Phe258 вносят наибольший вклад в стабилизацию TvDAAO в случае замены M104Y и, особенно, в случае M104F. Стабилизационный эффект при введении замены M104W, по-видимому, в равной степени обусловлен взаимодействиями 54-104 и 104-258. В пользу взаимодействий не гидрофобной природы между ароматическими остатками, говорит тот факт, что замена M104L практически не изменила, а замена M104I ухудшила температурную стабильность TvDAAO, причем остатки Leu и Ile по объему близки к остатку Met, но при этом обладают большей гидрофобностью [170]. По этой же причине повышение стабильности за счет введения ароматических замен нельзя объяснить предотвращением окисления остатка Met104. То есть, если бы стабилизационный эффект объяснялся только гидрофобными взаимодействиями и отсутствием химической модификации Met104, то в этом случае стоило ожидать повышенную термостабильность мутантных TvDAAO M104I и TvDAAO M104L. Кроме того, экранирование активного центра от растворителя также целиком не объясняет данный феномен, поскольку тогда стоило ожидать наибольшую стабильность мутанта TvDAAO M104W или, по крайней мере, близкие стабильности мутантов при введении трех ароматических замен M104F, M104Y и M104W. По-видимому, причина такого значительного эффекта стабилизации TvDAAO заключается в ароматической природе вводимых остатков. Наибольшее увеличение стабильности наблюдается в случае введения остатка Phe. Вероятно, данный остаток наилучшим образом подходит по объему и конфигурации для оптимального взаимодействия с близкорасположенными остатками Phe54 и Phe258. Кроме того, экспериментальные данные также указывают на наличие взаимодействия между Phe54 и Phe258. Все вышеизложенное позволяет, с определенной долей уверенности, сделать вывод о том, что повышение температурной стабильности обусловлено взаимодействиями между остатками Phe54, Phe(Tyr, Trp)104 и Phe258, которые являются ароматическими π - π взаимодействиями, имеющими электростатическую природу. На такую возможность также указывают результаты компьютерного моделирования (рис. 4.30).

4.3. Оптимизация структуры FAD-связывающего домена TvDAAO

Рациональный белковый дизайн является мощным методом изучения структурно-функциональных взаимосвязей и направленного изменения свойств биотехнологически важных ферментов. Одним из важных направлений такой работы является повышение температурной стабильности, в ходе которой решаются не только важные прикладные задачи, но и накапливаются ценные экспериментальные данные о взаимосвязи структуры и стабильности фермента, что представляет большой фундаментальный интерес. Для ферментов с повышенной стабильностью упрощается процесс выделения и очистки, а также увеличиваются выходы целевого высокоочищенного препарата фермента, что, в свою очередь, приводит к снижению стоимости конечного биокатализатора.

В рамках рационального белкового дизайна для направленного увеличения температурной стабильности ферментов, как правило, используют сравнение аминокислотных последовательностей исследуемого фермента и ферментов из термофильных организмов, а также анализ трехмерной структуры (если она доступна хотя бы для одного фермента из семейства) с целью выявления аминокислотных остатков, играющих важную роль в стабильности [188–190]. В случае TvDAAO такой подход не может быть использован, поскольку данный фермент является наиболее стабильным среди изученных на данный момент оксидаз D-аминокислот, а аминокислотные последовательности DAAO из термофильных микроорганизмов до сих пор не известны. Кроме того, как было отмечено в обзоре литературы, к настоящему времени опубликовано всего несколько статей по увеличению температурной стабильности TvDAAO с помощью белковой инженерии, однако во всех случаях эффекты стабилизации были незначительными [57,148,161]. В данной части работы нами был использован комплексный подход для повышения температурной стабильности TvDAAO.

Важной особенностью всех DAAO является наличие вблизи N-конца консервативной последовательности GXGXXG (рис. 2.2), которая указывает на наличие в молекуле белка структурного элемента, известного как “укладка по Россману” (Rossmann fold), представляющего собой определенную

пространственную комбинацию α -спиралей и β -листов [27,29]. Этот структурный домен отвечает за связывание адениновой части NAD и FAD в кофермент-связывающих доменах многих оксидоредуктаз. В случае TvDAAO, каждая субъединица активного фермента содержит одну молекулу нековалентно связанного FAD в активном центре. Из литературы известно, что при повышенных температурах (выше 40-50°C) потеря активности TvDAAO в основном обусловлена денатурацией белковой глобулы и диссоциацией кофактора FAD из активного центра фермента [35]. Исходя из этого, нами было выдвинуто предположение, что введение аминокислотных замен, которые способны усилить связывание FAD в кофермент-связывающем домене, может привести к повышению температурной стабильности TvDAAO. Для поиска таких положений нами был проведен подробный компьютерный анализ трехмерной структуры TvDAAO, анализ множественного аминокислотного выравнивания последовательностей DAAO из различных источников (рис. 2.2) и эксперименты по компьютерному моделированию аминокислотных замен в кофермент-связывающем домене TvDAAO.

4.3.1. Анализ структуры FAD-связывающего домена TvDAAO. Компьютерное моделирование.

Проведенный анализ структуры TvDAAO показал, что с молекулой FAD в активном центре TvDAAO взаимодействуют по крайней мере 15 аминокислотных остатков: Ala9, Ala12, Ser31, Glu32, Phe33, Thr43, Ser44, Asn50, Val171, Arg302, Ala329, Gly330, Gly332, Tyr333 и Gln334. Схематично указанные остатки и их взаимодействия с FAD показаны на рис. 4.41. Первая группа остатков вблизи N-конца (Ala9, Ala12, Ser31, Glu32, Phe33, Thr43, Ser44, и Val171) формирует кофермент-связывающий домен в нижней части субъединицы TvDAAO и образует водородные связи с рибозой, фосфатными группами и адениновой частью молекулы FAD. Остальные остатки (Asn50, Arg302, Ala329, Gly330, Gly332, Tyr333 и Gln334) располагаются в области каталитического центра TvDAAO и взаимодействуют с изоаллоксазиновым циклом молекулы FAD посредством

гидрофобных взаимодействий и водородных связей. Кроме того, компьютерный анализ показал, что между остатком Arg302 и ароматическим ядром изоаллоксазина наблюдается катионное π^+ - π взаимодействие, о котором упоминалось в главе 4.2. Мутагенез аминокислотных остатков в самом каталитическом центре TvDAAO, которые также участвуют в связывании субстратов (Arg302, Ala329, Gly330, Gln334), является нецелесообразным, поскольку их замена на другие аминокислотные остатки может привести к нарушению правильной ориентации изоаллоксазинового цикла FAD, который непосредственно является акцептором электронов и играет ключевую роль в катализе. В результате может произойти частичная или полная потеря каталитической активности TvDAAO. Кроме того, большая часть данных остатков находится в высоконсервативной области и является консервативными или полуконсервативными (рис. 2.2), что также указывает на их важную структурно-функциональную роль.

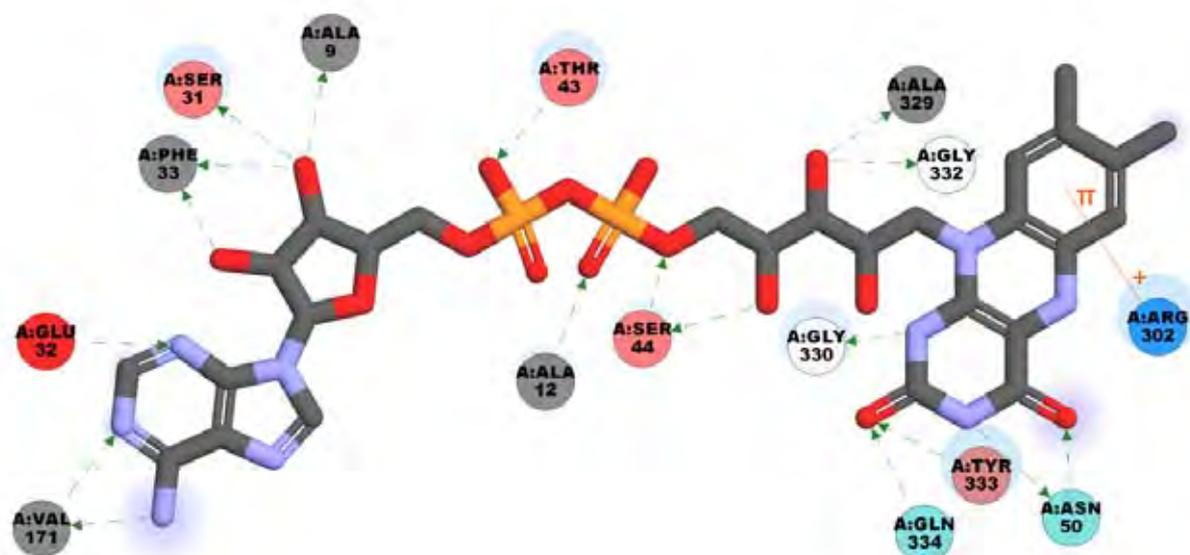


Рис. 4.41. Схематичное строение FAD-связывающего домена TvDAAO. Зеленым пунктиром показаны водородные связи между молекулой FAD и окружающими аминокислотными остатками, оранжевой линией показано катионное π -взаимодействие между остатком R302 и изоаллоксазиновым циклом FAD, голубым очертанием выделены аминокислотные остатки и атомы доступные растворителю.

Таким образом, поиск перспективных положений для мутагенеза сузился до восьми аминокислотных остатков Ala9, Ala12, Ser31, Glu32, Phe33, Thr43, Ser44, и Val171, которые располагаются в кофермент-связывающем домене TvDAAO и

взаимодействуют с фосфатными группами, рибозой и адениновой частью молекулы FAD (рис. 4.41). При дальнейшем анализе первичной и четвертичной структуры нами было уделено особое внимание DAAO из дрожжей *Rhodotorula gracilis* (*Rhodospiridium toruloides*), поскольку из литературы известно, что данный фермент обладает самым высоким связыванием FAD из всех изученных на данный момент DAAO ($K_{dis}=2*10^{-8}$ M) [2,6,36]. Для определения положений для направленного мутагенеза нами был проведен подробный анализ расположения и взаимодействия с молекулой FAD всех вышеперечисленные остатков.

Остатки Ala9 и Ala12 являются частью консервативной последовательности GXGXXG, которая располагается около рибозы и фосфатных групп FAD на изгибе между β -листом 1-8 и α -спиралью 12-23, однако сами по себе эти остатки не являются консервативными. У других DAAO в положении, соответствующем Ala9 в последовательности TvDAAO, встречаются остатки Gly, Ser и Cys. На месте остатка Ala12 часто встречаются остатки Ser, Ile, Val, а также остатки Met, Asn, Gln и Ala. У RgDAAO в этих двух положениях находятся остатки Ser и Ile соответственно. Остаток Ala9 расположен около 3'-окси-группы рибозы и образует водородную связь атомами основной цепи с боковой группой остатка Ser31. Остаток Ala12 образует водородные связи атомами основной цепи с остатком фосфорной кислоты FAD, карбонильной группой остатка Gly10, боковым радикалом и амидной группой остатка Thr16, что поддерживает структуру α -спирали 12-23. Однако боковой радикал данного остатка располагается в полости, которая сформирована боковыми группами остатков Val11, Thr16, Cys193, Asn325, Ala328, Gly332, Met339 и фосфатной группой FAD. Кроме того, исходя из рентгеноструктурных данных, в данной полости находятся по крайней мере 3 молекулы кристаллизационной воды, которые с одной стороны сольватируют отрицательно заряженные остатки фосфорной кислоты, а с другой стороны могут отрицательно влиять на температурную стабильность TvDAAO, поскольку находятся внутри белковой глобулы.

Остаток Ser31 не является консервативным, однако у многих DAAO, в том числе у RgDAAO, в этом положении встречаются остатки Ala. В структуре

TvDAAO боковой радикал данного остатка образует водородные связи с 3'-окси-группой рибозы FAD, а также с атомами полипептидной цепи остатков Ala9 и Phe33. На наш взгляд направленный мутагенез этого остатка не является целесообразным.

Остатки Glu32 и Phe33 не являются консервативными, располагаются вблизи межсубъединичного контакта в димере TvDAAO на поверхности белковой глобулы, однако их боковые радикалы не принимают участия в каких-либо межсубъединичных взаимодействиях. Атомы полипептидной цепи остатков Glu32 и Phe33 образуют водородные связи с аденином и окси-группами рибозы FAD соответственно. Поскольку гидрофобный боковой радикал Phe33 находится в непосредственной близости от гидрофильных окси-групп рибозы, то такое взаимодействие может быть неоптимальным. У других DAAO в положениях, которые соответствуют остатку Glu32 в последовательности TvDAAO, наиболее часто встречаются остатки Asp, Lys, Ala, Glu, Arg, His и др. В случае остатка Phe33 наиболее часто встречаются Arg, His, Ala, Asp, Glu и др. (рис. 2.2). У RgDAAO в положениях, которые эквивалентны по выравниванию 32 и 33 позициям в TvDAAO, находятся остатки Arg и Asp соответственно.

Остатки Thr43 и Ser44 располагаются рядом с фосфатными группами FAD. На месте остатка Thr43 в большинстве последовательностей DAAO находится разрыв, а в наиболее близких по гомологии структурах встречается также остаток Thr. У RgDAAO в соответствующем положении находится Ala, введение которого в структуру TvDAAO не приведет к возникновению дополнительных взаимодействий с молекулой FAD. Кроме того, данный остаток своим боковым радикалом образует водородную связь с карбонильной группой остатка Arg302. Остаток Ser44 своим боковым радикалом образует водородные связи с фосфатными группами FAD и является полуконсервативным – помимо Ser в данном положении встречаются только 5 остатков Thr и 5 остатков Gly. У RgDAAO этому остатку также соответствует остаток Ser. Кроме того, Thr43 и Ser44 находятся внутри белковой глобулы в близком контакте со своим окружением. Исходя из этого, замена этих двух остатков представляется нецелесообразной.

Остаток Val171 образует водородные связи атомами полипептидной цепи с адениновой частью FAD. Боковой радикал Val171 находится внутри белковой глобулы в гидрофобном ядре, которое образовано остатками Ile7, Val30, Ile174, Ala177, Leu180 и Ile190. У RgDAAO в соответствующем положении также находится остаток Val. Таким образом, замена данного остатка может привести к потере гидрофобных взаимодействий и нарушению структуры фермента в области связывания адениновой части FAD, что в конечном счете может отрицательно сказаться температурной стабильности TvDAAO. Поэтому Val171 был исключен из возможных кандидатов для направленного мутагенеза.

Таким образом, на основе анализа структуры FAD связывающего домена TvDAAO, а также исходя из выравнивания аминокислотных последовательностей DAAO из различных источников, нами были отобраны остатки Ala9, Ala12, Glu32 и Phe33 для проведения направленного мутагенеза. Выбор аминокислотных замен в первую очередь был основан на сравнении первичных и четвертичных структур TvDAAO и RgDAAO. На рис. 4.42 представлен результат наложения структур RgDAAO и TvDAAO друг на друга в области кофермент-связывающего домена. Нумерация остатков приведена для последовательности TvDAAO. На основе сравнения структур TvDAAO и RgDAAO были выбраны замены A9S и A12I. Результаты компьютерного моделирования для этих замен представлены на рис. 4.43. Видно, что в модельной структуре мутантной TvDAAO A9S сохраняются водородные связи, изначально существующие в ферменте дикого типа, но при этом боковой радикал вводимого остатка Ser может образовать новые водородные связи с остатками Ser31, Tyr42, Phe33 и 3'-оксигруппой рибозы (рис. 4.43А). Исходя из этого, также была выбрана замена A9T. При введении замены A12I происходит заполнение полости, которая была описана выше (рис. 4.43Б). С целью заполнения полости также была выбрана замена A12M. Кроме того, была выбрана замена A12S, поскольку в соответствующем положении встречаются остатки Ser у наиболее гомологичных DAAO и введение такой замены может приводить к образованию водородных связей с остатком фосфатной группой FAD.

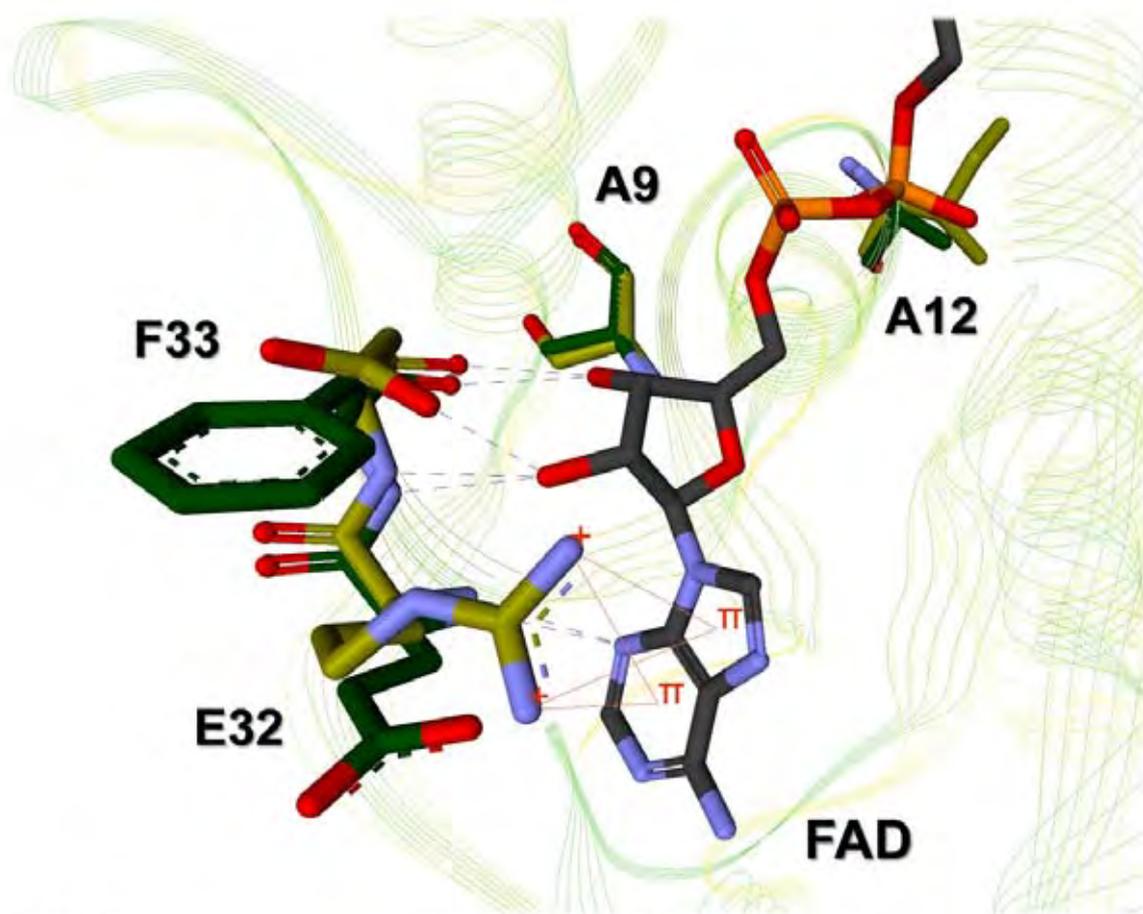


Рис. 4.42. Наложение структуры RgDAAO (1C0P, остатки показаны темно-желтым цветом) на структуру TvDAAO (остатки показаны темно-зеленым цветом) в области FAD-связывающего домена, RMSD = 1,27Å. Нумерация остатков приведена для TvDAAO.

Эксперименты по компьютерному моделированию показали, что в структуре RgDAAO остаток Arg35 (соответствует Glu32 у TvDAAO) образует катионное π^+ - π взаимодействие с ароматическим ядром аденина (рис. 4.42). Как упоминалось в главе 4.2 такого рода взаимодействия, наряду с другими слабыми взаимодействиями в белках, играют важную роль в поддержании стабильной четвертичной структуры [171,176–186,191]. В структуре TvDAAO есть несколько участков, где наблюдаются различные π - π взаимодействия, в том числе катионные π^+ - π взаимодействия, например, между остатками Arg89 и Phe225, а также между изоаллоксазиновым циклом FAD, Arg302 и Phe258 (рис. 4.41). Стоит отметить, что при катионном π^+ - π взаимодействии между Arg и ароматическими системами, гуанидиновая группа остатка Arg сохраняет способность образовывать водородные связи. Остаток Arg35 в структуре RgDAAO находится близко к поверхности фермента и, являясь конформационно подвижным, с большой вероятностью также

может образовывать водородные связи как с аденином FAD, так и с соседними аминокислотными остатками. Из рис. 4.42 хорошо видно, что остаток Asp36 (соответствует Phe33 у TvDAAO) образует водородную связь с 2'-окси-группой рибозы. Таким образом, на основании вышесказанного нами были выбраны замены E32R и F33D. Стоит отметить, что замена F33D приводит к появлению дополнительного отрицательного заряда в области связывания FAD. Поскольку в TvDAAO дикого типа в 32м положении находится остаток Glu, то введение замены F33D приведет к возникновению двух отрицательно заряженных остатков в соседних положениях, что в результате может привести к дестабилизации белковой глобулы. В связи с этим, для предотвращения отталкивания указанных отрицательно заряженных остатков нами было решено ввести двойную замену E32R/F33D. Кроме того, поскольку в TvDAAO дикого типа в этой области имеется один отрицательный заряд, то для его сохранения в дополнение к замене F33D была предложена замена E32Q, исходя из структурного сходства остатков Glu и Gln. В качестве примера на рис. 4.44 представлена компьютерная модель TvDAAO E32R/F33D в сравнении с ферментом дикого типа. Видно, что замена E32R/F33D в FAD-связывающем домене TvDAAO хорошо имитирует соответствующий участок последовательности RgDAAO. В результате замены E32R/F33D не только сохраняются все водородные связи, изначально существующие в ферменте дикого типа, но и образуются новые, причем может возникать катионное π^+ - π взаимодействие между вводимым остатком Arg в 32 положение и адениновой частью FAD. Кроме того, в результате такой замены FAD становится менее экспонирован растворителю, чем в случае TvDAAO дикого типа, что может также оказать положительное влияние на температурную стабильность фермента (рис. 4.44). Забегая вперед, отметим, что по результатам предварительных экспериментов двойная замена E32R/F33D оказалась наиболее удачной с точки зрения температурной стабильности, поэтому нами было решено провести подробное изучение отдельных остатков 32 и 33 положения.

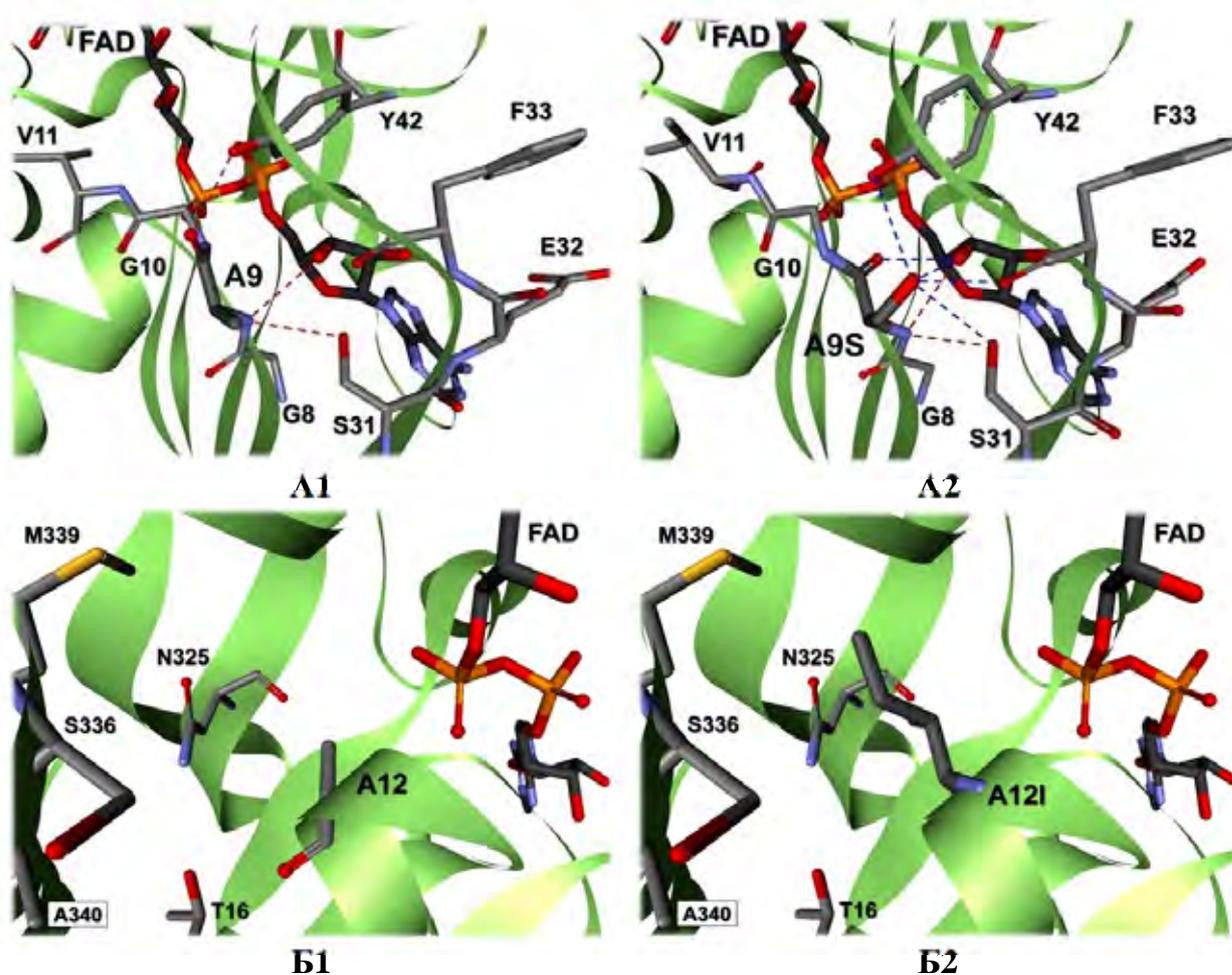


Рис. 4.43. Компьютерное моделирование замены A9S и A12I в структуре TvDAAO. Область FAD-связывающего домена TvDAAO дикого типа (A1, B1), TvDAAO A9S (A2) и TvDAAO A12I (B2). Новые водородные связи показаны синим пунктиром, а совпадающие – красным.

Для изучения влияния введения отдельных замен в эти положения на свойства TvDAAO, на основе множественного выравнивания и компьютерного моделирования были предложены замены E32Q, E32R, F33D, F33H, F33S и F33T, каждая из которых также способна образовывать водородные связи как с аденином, так и с 2'-окси-группой рибозы FAD.

Итак, в результате комплексного анализа FAD-связывающего домена TvDAAO для введения в структуру фермента с помощью направленного мутагенеза были выбраны следующие 11 точечных и 2 двойные замены:

A9S, A9T, A12S, A12I, A12M, E32Q, E32R, F33D, F33H, F33S, F33T, E32Q/F33D, E32R/F33D.

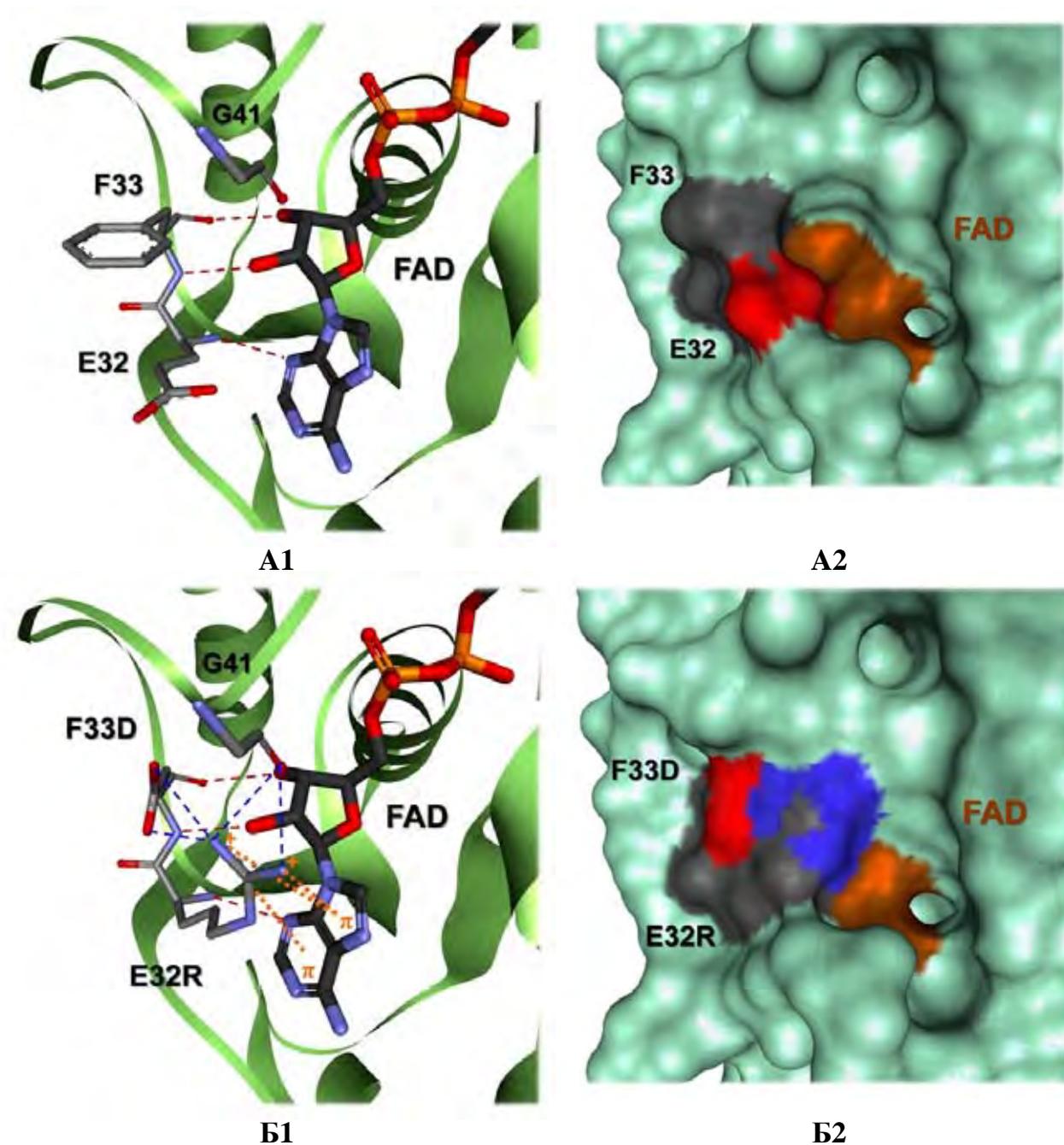


Рис. 4.44. Компьютерное моделирование двойной замены E32R/F33D в структуре TvDAAO. Область FAD-связывающего домена TvDAAO дикого типа (А) и TvDAAO E32R/F33D (Б). 1 – новые водородные связи показаны синим пунктиром, совпадающие – красным. Оранжевым пунктиром показано катионное π -взаимодействие между заменой E32R и адениновой частью FAD, 2 – голубым цветом показана поверхность доступная растворителю.

4.3.2. Получение мутантных TvDAAO с заменами в 9, 12, 32 и 33 положениях

Получение мутантных TvDAAO с заменами A9S, A9T, A12S, A12I, A12M, E32Q, E32R, F33D, F33H, F33S, F33T, E32Q/F33D, E32R/F33D проводили согласно экспериментам, описанным в главе 4.1. Олигонуклеотидные праймеры для направленного мутагенеза гена *tvdaao* в положениях, которые соответствуют остаткам Ala9, Ala12, Glu32 и Phe33, представлены в таблице 4.22. Для проведения реакции рестрикции были использованы рестриктазы NcoI и EcoRI. Результаты секвенирования полученных плазмид показали наличие только необходимых мутаций в гене *tvdaao*. Получение штаммов-продуцентов мутантных TvDAAO, культивирование, экспрессию, выделение и очистку проводили аналогично предыдущим главам. Результаты культивирования и экспрессии мутантных TvDAAO представлены в таблице 4.23. При культивировании всех мутантов выходы биомассы сравнимы или выше, чем в случае фермента дикого типа. Исключением является только TvDAAO E32R. Для этого фермента количество биомассы ниже, чем для остальных, что связано с ранним лизисом клеток при культивировании. Все мутантные ферменты синтезировались в активной и растворимой форме, за исключением мутанта TvDAAO с заменой F33D, который был активен только в осадке клеточных стенок. В случае этого фермента выход по активности в таблице 4.23 приведен для нерастворимого белка. Для всех мутантов наблюдаются различные выходы растворимых ферментов по активности, что наиболее вероятно объясняется различным уровнем экспрессии и различной удельной активностью с D-метионином.

Для выбора наиболее перспективных мутантных TvDAAO для дальнейшей очистки и изучения свойств, нами были проведены эксперименты по изучению температурной стабильности на бесклеточных экстрактах для фермента дикого типа и мутантных TvDAAO с заменами 9S, A9T, A12S, A12I, A12M, E32Q/F33D и E32R/F33D. В качестве сравнения также была использована мутантная TvDAAO M104F, поскольку данный фермент обладает очень высокой температурной стабильностью (см. главу 4.1). Экспрессия и выделение этого

фермента были проведены параллельно с получением других мутантных TvDAAO и фермента дикого типа.

Таблица 4.22.

Олигонуклеотидные праймеры для введения мутаций в ген *tvdaao* в положения, соответствующие 9, 12, 32 и 33 остаткам в структуре TvDAAO.

Замена		Нуклеотидная последовательность*
A9S	Mfor	5'- G GCT AAA ATC GTT GTT ATT GGT TCC GGT GTT GCC GGT TTA ACT A-3'
	Mrev	5'- C GGC AAC ACC GGA ACC AAT AAC AAC GAT TTT AGC CAT GG -3'
A9T	Mfor	5'- G GCT AAA ATC GTT GTT ATT GGT ACC GGT GTT GCC GGT TTA ACT A-3'
	Mrev	5'- C GGC AAC ACC GGT ACC AAT AAC AAC GAT TTT AGC CAT GG -3'
A12S	Mfor	5'- GGT GCC GGT GTT TCC GGT TTA ACT ACA GCT CTT CAA C -3'
	Mrev	5'- GC TGT AGT TAA ACC GGA AAC ACC GGC ACC AAT AAC AAC G -3'
A12I	Mfor	5'- GGT GCC GGT GTT ATC GGT TTA ACT ACA GCT CTT CAA CTT C -3'
	Mrev	5'- G AGC TGT AGT TAA ACC GAT AAC ACC GGC ACC AAT AAC AAC G -3'
A12M	Mfor	5'- GGT GCC GGT GTT ATG GGT TTA ACT ACA GCT CTT CAA CTT C -3'
	Mrev	5'- G AGC TGT AGT TAA ACC CAT AAC ACC GGC ACC AAT AAC AAC G -3'
E32Q	Mfor	5'- CA ATT GTG TCC CAG TTT ACG CCC GGT GAT CTT AG -3'
	Mrev	5'- GG CGT AAA CTG GGA CAC AAT TGT AAC CTC ATG TCC -3'
E32R	Mfor	5'- CA ATT GTG TCC AGG TTT ACG CCC GGT GAT CTT AG -3'
	Mrev	5'- GG CGT AAA CCT GGA CAC AAT TGT AAC CTC ATG TCC -3'
F33D	Mfor	5'- GTG TCC GAG GAT ACG CCC GGT GAT CTT AGT ATC -3'
	Mrev	5'- C GGG CGT ATC CTC GGA CAC AAT TGT AAC CTC ATG -3'
F33H	Mfor	5'- GTG TCC GAG CAT ACG CCC GGT GAT CTT AGT ATC -3'
	Mrev	5'- C GGG CGT ATG CTC GGA CAC AAT TGT AAC CTC ATG -3'
F33S	Mfor	5'- GTG TCC GAG TCT ACG CCC GGT GAT CTT AGT ATC -3'
	Mrev	5'- C GGG CGT AGA CTC GGA CAC AAT TGT AAC CTC ATG -3'
F33T	Mfor	5'- GTG TCC GAG ACT ACG CCC GGT GAT CTT AGT ATC -3'
	Mrev	5'- C GGG CGT AGT CTC GGA CAC AAT TGT AAC CTC ATG -3'
E32Q/F33D	Mfor	5'-CA ATT GTG TCC CAG GAT ACG CCC GGT GAT CTT AGT ATC GGA-3'
	Mrev	5'- GGC GTA TCC TGG GAC ACA ATT GTA ACC TCA TGT CC - 3'
E32R/F33D	Mfor	5'- A ATT GTG TCC AGG GAT ACG CCC GGT GAT CTT AGT ATC -3'
	Mrev	5'- GGC GTA TCC CTG GAC ACA ATT GTA ACC TCA TGT CC - 3'

* Полу жирным шрифтом выделены нуклеотидные замены, обеспечивающие мутации.

Таблица 4.23.

Результаты экспрессии (в клетках *E.coli*) мутантных TvDAAO с аминокислотными заменами в FAD-связывающем домене и фермента дикого типа.

Форма TvDAAO	Выход биомассы, г/л	Выход активного фермента после культивирования, Ед/л среды	Удельная активность, Ед/г биомассы
Дикий тип	13,1	12500	950
A9S	12,9	9900	770
A9T	16,0	13700	860
A12S	14,7	7800	530
A12I	15,7	16800	1070
A12M	15,3	13600	890
E32Q	15,6	9700	620
E32R	10	6200	620
F33D	16,2	4000	250
F33H	15,2	9900	655
F33S	15,1	4300	285
F33T	14,6	3600	250
E32Q/F33D	16,1	9000	560
E32R/F33D	14,3	9800	680

*Активность ферментов определяли по D-метионину

Для проведения эксперимента, бесклеточные экстракты соответствующих мутантных TvDAAO и фермента дикого типа разбавляли 0,1М калий-фосфатным буфером pH 8,0 до активности ~1 ед/мл по D-метионину и инкубировали при 56°C в течение 30 минут, после чего измеряли остаточную активность в образцах. Результаты эксперимента представлены в таблице 4.24. В этих условия фермент дикого типа и TvDAAO M104F сохраняли около 35 и 80% активности соответственно. Мутантные TvDAAO с заменами A9T, A12S, A12M и E32Q/F33D полностью потеряли активность, TvDAAO A9S практически полностью инактивировалась, TvDAAO A12I сохранила около 7% активности, в то время как, TvDAAO E32R/F33D в этих условиях сохраняла около 55-60% активности. Стоит отметить, что подобного рода эксперимент является достаточно грубым, поскольку

удельная активность по D-метионину у всех мутантных ферментов и фермента дикого типа может отличаться друг от друга и, как следствие, концентрации активных ферментов также могут быть различными при начальных условиях эксперимента, т.е. при 1 ед/мл по D-метионину, а температурная стабильность TvDAAO, как известно, зависит от начальной концентрации фермента. Тем не менее, такая большая разница в остаточных активностях мутантных TvDAAO и фермента дикого типа позволяет сделать вывод, что замена E32R/F33D с большой вероятностью приводит к повышению температурной стабильности TvDAAO. Также интересным является тот факт, что несмотря на сильную дестабилизацию TvDAAO в результате замен в 9 и 12 положениях, мутанты с заменами A9S и A12I, которые были выбраны исходя из сравнения последовательностей TvDAAO и RgDAAO, все же сохраняют некоторую активность после 30 минутной обработки при 56°C.

Таблица 4.24.

Изучение температурной стабильности мутантных TvDAAO и фермента дикого типа на бесклеточных экстрактах при 56 °C.

Форма TvDAAO	Активность, Ед/мл t = 0 мин	Активность, Ед/мл t = 30 мин	Остаточная активность, %
Дикий тип	0,98±0,03	0,36±0,02	36,7
M104F	0,98±0,03	0,81±0,02	82,7
A9S	1,02±0,03	~ 0,01	<1,0
A9T	0,95±0,02	0	0
A12S	1,02±0,03	0	0
A12I	0,97±0,02	0,07±0,01	7,2
A12M	0,96±0,02	0	0
E32Q/F33D	0,98±0,02	0	0
E32R/F33D	0,99±0,03	0,58±0,02	58,5

Таким образом, описанный выше эксперимент показал, что двойная замена E32R/F33D, по-видимому, приводит к положительному стабилизирующему эффекту и остатки в 32 и 33 положениях являются перспективными для подробного изучения с помощью направленного мутагенеза. Выбор точечных замен в этих положениях был описан выше в пункте 4.3.1. Итак, мутантные

TvDAAO с заменами E32Q, E32R, F33D, F33H, F33S, F33T, E32Q/F33D и E32R/F33D были выбраны для проведения дальнейших экспериментов – выделения, очистки и изучения свойств.

В процессе выделения из клеток мутантная TvDAAO F33T полностью инактивировалась в течение 10-15 минут. По-видимому, введение замены F33T приводит к существенной дестабилизации TvDAAO. В случае мутанта TvDAAO F33D активность отсутствовала в бесклеточных экстрактах после разрушения клеток, но присутствовала в осадке клеточных стенок. Это свидетельствует о том, что мутантный фермент синтезируется в активной форме в виде телец включения. Попытки перевести TvDAAO F33D в раствор не увенчались успехом. Стоит отметить, что похожая ситуация наблюдалась нами ранее при получении мутантных TvDAAO с заменами в области межсубъединичного контакта [51]. Для мутантных TvDAAO с заменами E32Q, E32R, F33H, F33S, E32Q/F33D и E32R/F33D была проведена очистка с помощью анионообменной хроматографии на колонке MonoQ с последующим обессоливанием. Результаты очистки и параметры образцов TvDAAO, которые были использованы для изучения свойств, представлены в таблице 4.25. Стоит отметить, что мутантные TvDAAO E32R/F33D и TvDAAO E32Q/F33D имеют более высокую удельную активность с D-метионином, чем фермент дикого типа.

Таблица 4.25.

Результаты очистки мутантных TvDAAO с аминокислотными заменами в 32 и 33 положениях и фермента дикого типа.

Форма TvDAAO	Очистка			
	Выход по активности после очистки, %	Концентрация фермента, мкг/мл	Удельная активность, Ед/мг	Отношение поглощения A_{280}/A_{455}
Дикий тип	65	132	136	8,9
E32Q	45	98	124	8,8
E32R	51	75	125	9,1
F33H	75	94	140	9,5
F33S	36	87	80	9,9
E32Q/F33D	57	62,0	178	10,2
E32R/F33D	62	80,0	153	8,1

*Активность ферментов определяли по D-метионину

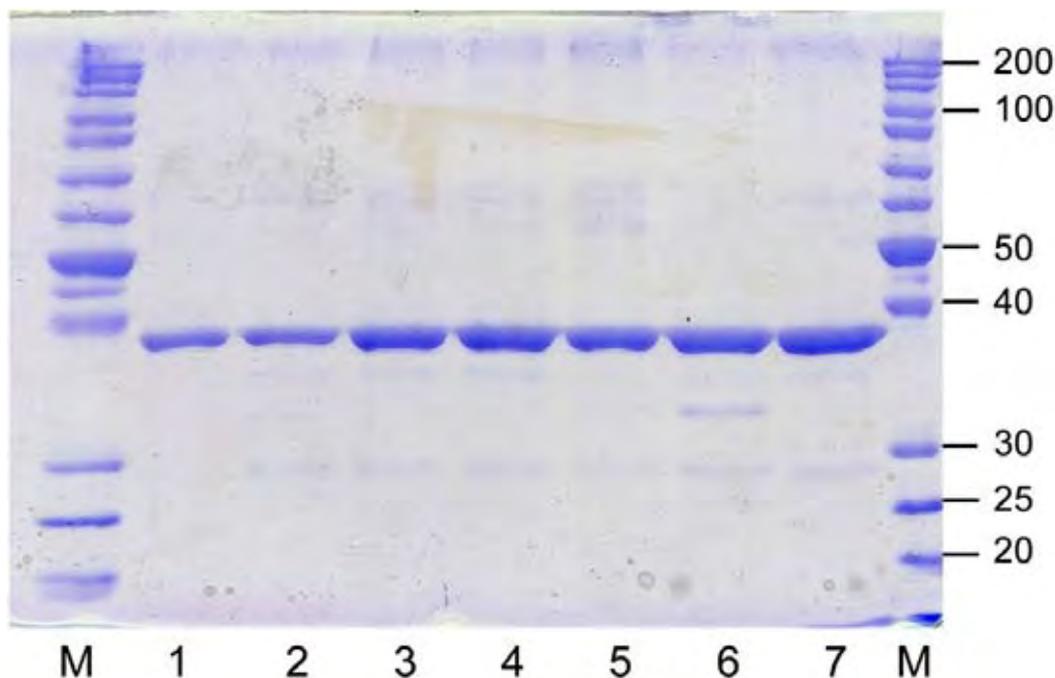


Рис. 4.45. Белковый электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов TvDAAO после очистки. 1 – TvDAAO F33H, 2 – TvDAAO F33S, 3 – TvDAAO E32R/F33D, 4 – TvDAAO E32Q/F33D, 5 – TvDAAO E32R, 6 – TvDAAO E32Q, 7 – TvDAAO дикого типа, М – маркер (мол. массы указаны в кДа).

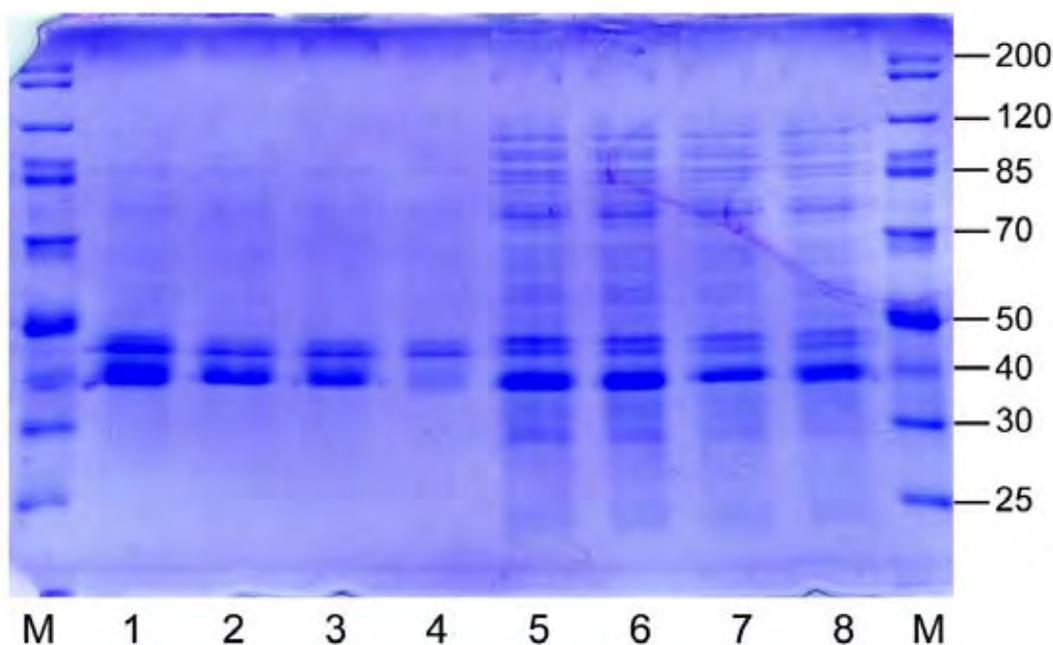


Рис. 4.46. Белковый электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов TvDAAO после культивирования и разрушения клеток (1-4 нерастворимые фракции (осадок клеточных стенок), 5-8 растворимые фракции (бесклеточные экстракты). 1,5 – TvDAAO дикого типа, 2,6 – TvDAAO F33D, 3,7 – TvDAAO E32Q/F33D, 4,8 – TvDAAO E32R/F33D, М – маркер (мол. массы указаны в кДа).

Аналитический SDS-электрофорез в полиакриламидном геле показал, что все препараты мутантных TvDAAO имели чистоту не менее 95% (рис. 4.45). Белковый электрофорез растворимых и нерастворимых фракций (бесклеточные экстракты и клеточный дебрис после разрушения клеток соответственно) для мутантных TvDAAO с заменами F33D, E32Q/F33D и E32R/F33D показал, что все ферменты присутствуют как в растворимой, так и нерастворимой формах (рис. 4.46) В случае замены F33D отсутствие активности фермента в растворе, по-видимому, связано с дестабилизацией белковой глобулы. Стоит отметить, что количество TvDAAO E32R/F33D в осадке гораздо меньше по сравнению с другими образцами TvDAAO. Спектр поглощения TvDAAO E32R/F33D соответствует спектру поглощения FAD-содержащих белков с максимумами на 280, 370 и 450 нм и соотносится со спектром TvDAAO дикого типа (рис. 4.47). Соотношение поглощения A_{280}/A_{455} для TvDAAO E32R/F33D ниже, чем для остальных мутантов и фермента дикого типа, что может говорить о более высоком содержании FAD в активном центре этого фермента (табл. 4.25).

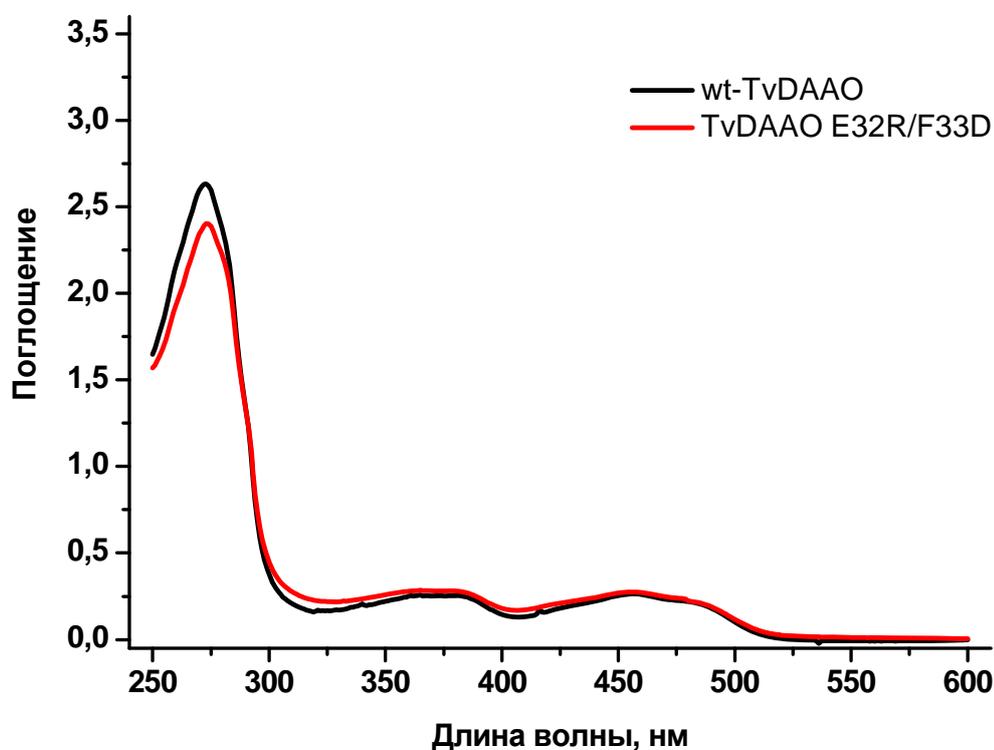


Рис. 4.47. Спектры поглощения TvDAAO E32R/F33D (—) и фермента дикого типа (—) при концентрации 1 мг/мл в диапазоне 250-600 нм.

Далее для полученных в очищенном виде мутантных TvDAAO и фермента дикого типа были изучены свойства – субстратная специфичность и температурная стабильность.

4.3.3. Температурная стабильность мутантных TvDAAO с заменами в кофермент-связывающем домене

Введение аминокислотных замен F33T и F33D в структуру TvDAAO привело к сильной дестабилизации фермента. Как было отмечено выше, мутантную форму TvDAAO F33T не удалось выделить и получить в чистом виде – фермент инактивировался при разрушении клеток. TvDAAO F33D был получен в активном виде только в нерастворимой форме. Оказалось, что замена F33D привела к сильной дестабилизации молекулы белка – при 50°C фермент терял более 90% активности за 3 минуты. Причиной этого, как обсуждалось ранее, может является появление двух отрицательно заряженных остатков в непосредственной близости друг от друга в результате замены F33D, поскольку в соседнем 32 положении находится остаток Glu. Для остальных шести мутантных TvDAAO с заменами E32Q, E32R, F33H, F33S, E32Q/F33D и E32R/F33D была изучена температурная стабильность в различных температурных диапазонах по кинетике инактивации.

Поскольку все замены выполнены вне области межсубъединичного контакта в димере TvDAAO, то они не должны повлиять на механизм температурной инактивации фермента. Для подтверждения этого, нами была изучена кинетика термоинактивации всех мутантных TvDAAO при различных температурах и начальных концентрациях ферментов. В качестве примера на рис. 4.48 и 4.49 приведены экспериментальные зависимости остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах для TvDAAO E32R/F33D при температурах 50-60°C и начальных концентрациях фермента 7-40 мкг/мл. Наличие точек излома на данных зависимостях, а также увеличение тангенса угла наклона второго линейного участка при уменьшении начальной концентрации фермента подтверждает, что термоинактивация протекает по диссоциативному механизму. Подробное изучение данного механизма было изложено в главе 4.1.

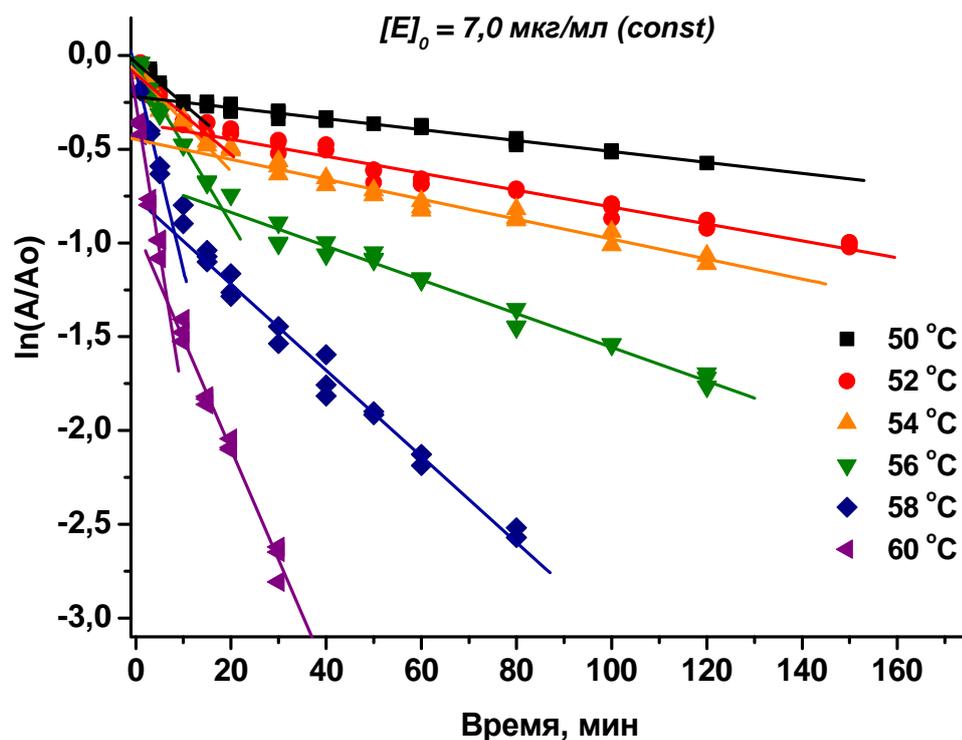


Рис. 4.48. Зависимости остаточной активности от времени для мутантной TvDAAO E32R/F33D в полулогарифмических координатах при различных температурах. Концентрация фермента 7,0 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0, температура 50 °С (■,—), 52 °С (●,—), 54 °С (▲,—), 56 °С (▼,—), 58 °С (◆,—), 60 °С (◄,—).

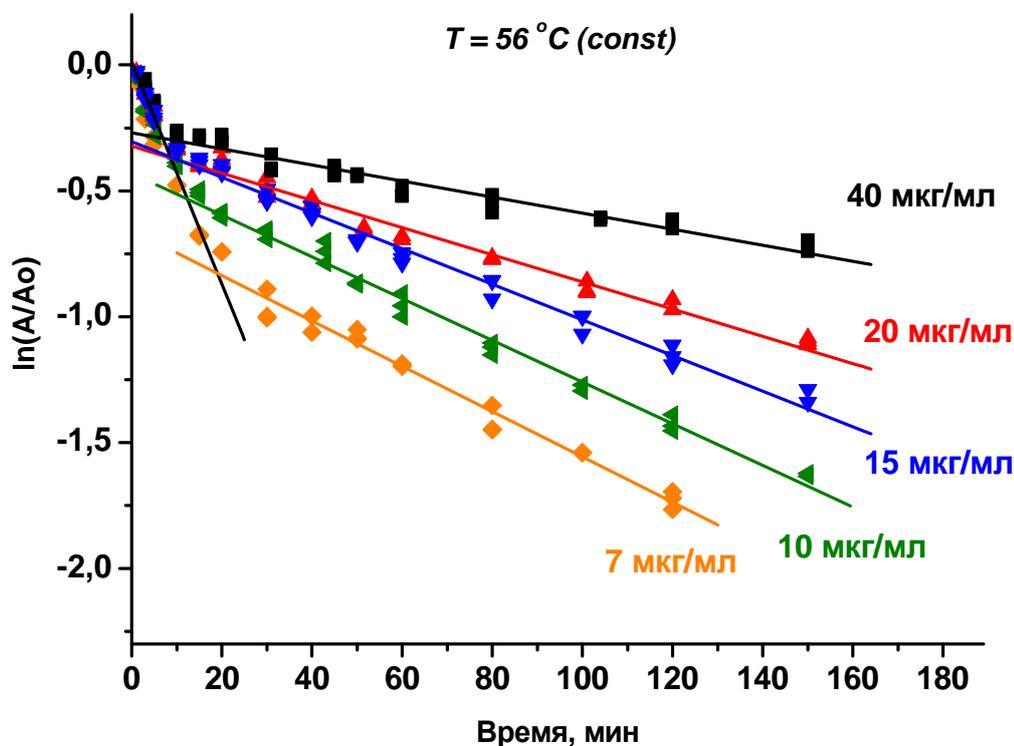


Рис. 4.49. Зависимости остаточной активности от времени для мутантной TvDAAO E32R/F33D в полулогарифмических координатах при различных начальных концентрациях фермента. Температура 56 °С, 0,1 М КФБ, рН 8,0, концентрации фермента – 7,0 мкг/мл (◆,—), 10,0 мкг/мл (◄,—), 15 мкг/мл (▼,—), 20 мкг/мл (▲,—), 40 мкг/мл (■,—).

Таким образом, термоинактивация мутантных TvDAAO протекает в две стадии и зависимости остаточной активности от времени описываются суммой двух экспоненциальных функций (рис. 4.50 и 4.51). С использованием математического аппарата теории диссоциативной инактивации [167] нами были рассчитаны значения констант скорости первой и второй стадии инактивации для всех мутантных TvDAAO (табл. 4.26). Анализ данных показывает, что в случае введения замен E32Q, E32R, F33H, F33S, E32Q/F33D произошло увеличение констант скоростей первой и второй стадии термоинактивации и снижение температурной стабильности TvDAAO. Также произошло смещение температурных диапазонов, в которых реализуется диссоциативный механизм термоинактивации, от 2 до 10°C в область более низких температур. Однако в случае двойной замены E32R/F33D удалось достичь существенного повышения температурной стабильности (рис. 4.51, табл. 4.26). Таким образом, мутантные TvDAAO с заменами в FAD-связывающем домене можно расположить по возрастанию стабильности в следующем порядке: F33S, E32R, F33H, E32Q/F33D, E32Q, фермент дикого типа, E32R/F33D. Период полуинактивации при 54°C и начальной концентрации фермента 10 мкг/мл для фермента дикого типа составляет 23 минуты, в то время как для TvDAAO E32R/F33D это значение составляет уже 102 минуты, т.е. более чем в 4 раза выше (рис. 4.51). Также стоит отметить, что для TvDAAO E32R/F33D в среднем происходит уменьшение констант скорости обеих стадий от 1,5 до 4 раз по сравнению с таковыми значениями для фермента дикого типа, причем данный эффект увеличивается с температурой. Исходя из значений констант скоростей обеих стадий инактивации, можно сделать вывод, что введение замены E32R/F33D стабилизирует как каждую отдельную субъединицу, так и димерное состояние TvDAAO, что происходит вероятнее всего за счет вызываемых конформационных изменений, которые могут способствовать усилению межсубъединичного контакта.

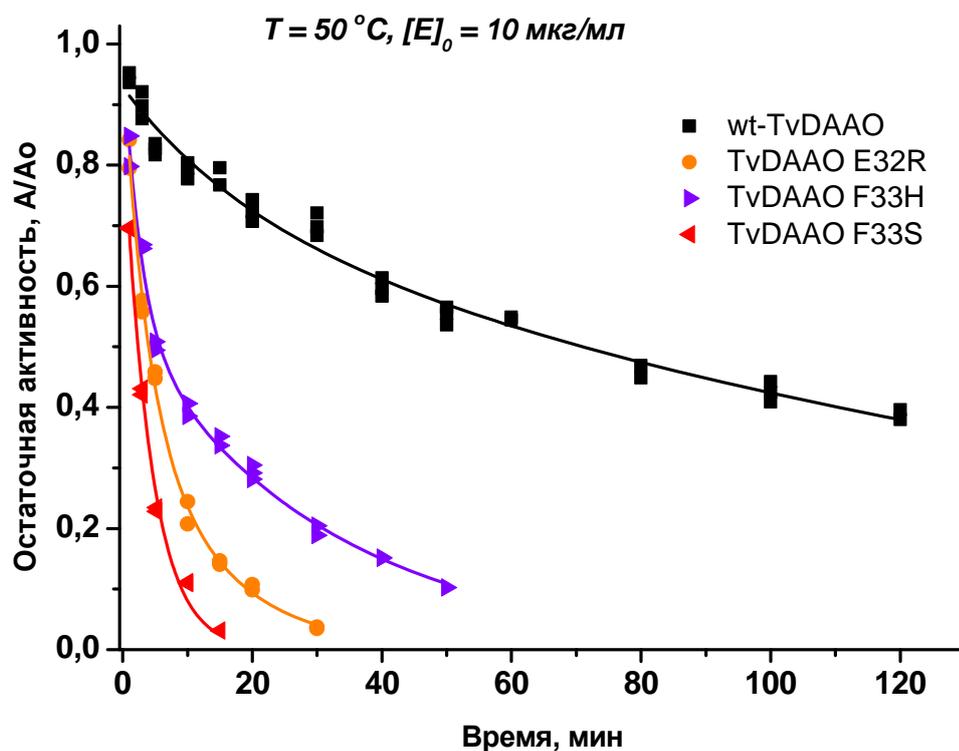


Рис. 4.50. Зависимости остаточной активности от времени для мутантных TvDAAO с заменами E32R (●, —), F33H (▲, —), F33S (◄, —) и TvDAAO дикого типа (■, —). Экспериментальные данные аппроксимированы биэкспоненциальными функциями. Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0, температура инкубации 50°C.

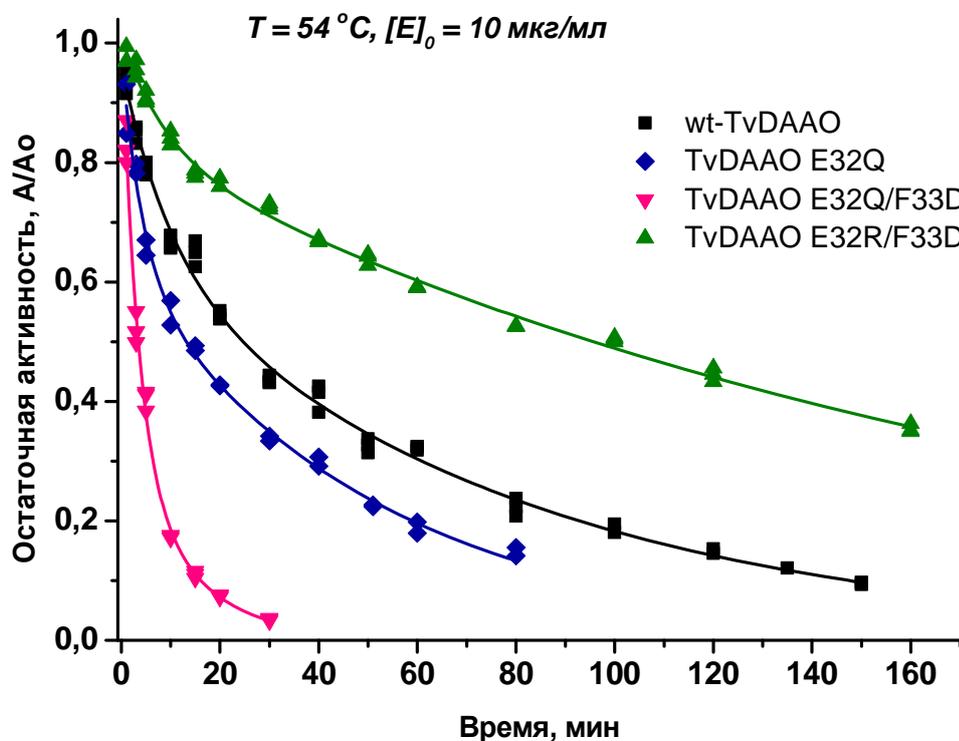


Рис. 4.51. Зависимости остаточной активности от времени для мутантных TvDAAO с заменами E32Q (◆, —), E32Q/F33D (▼, —), E32R/F33D (▲, —) и TvDAAO дикого типа (■, —). Экспериментальные данные аппроксимированы биэкспоненциальными функциями. Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0, температура инкубации 54°C.

Таблица 4.26.

Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации мутантных TvDAAO с заменами в FAD-связывающем домене и фермента дикого типа (0,1 М КФБ, рН 8,0)*.

Форма TvDAAO	Параметр	Температура, °С								
		44	46	48	50	52	54	56	58	60
Дикий тип	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-**	-	-	0,19	1,27	1,34	6,0	9,3	14,6
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	2,86	3,67	9,2	11,6	21,5	41
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	2,28	3,13	5,6	7,1	10,8	19,4
E32Q	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	-	2,02***	3,42	6,1	8,1	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	4,48	12,4	18,9	38	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	1,95	3,63	6,6	17,8	-
E32R	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	2,26	5,9	5,5	16,9	-	-	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	3,98	6,9	18,5	20,8	-	-	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	3,29	4,8	8,7	12,5	-	-	-	-	-
F33H	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	1,00	1,89	3,62	4,1	6,7	-	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,60	2,07	5,2	13,3	19	-	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	1,27	1,69	2,97	5,8	13,2	-	-	-	-
F33S	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	2,29	6,8	13,3	21	-	-	-	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	7,8	15,0	23	32	-	-	-	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	5,4	7,1	9,7	20	-	-	-	-	-
E32Q/F33D	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	1,26	2,10	2,54	3,18	5,2	11,2	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	2,28	4,60	6,6	20,5	41	62	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	2,29	3,45	4,81	10,2	21,6	40	-	-
E32R/F33D	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	0,41	0,94	1,10	2,15	5,47	15,2
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	2,03	3,03	4,17	5,3	7,8	13,1
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,14	1,50	1,83	2,15	3,22	5,8

* – ошибка эксперимента составляла не более 15%

** – параметр не определяли из-за очень малого или очень большого значения констант

*** – уменьшение параметров термоинактивации мутантных TvDAAO по сравнению с ферментом дикого типа выделено полужирным шрифтом и зеленым фоном, небольшое изменение – серым, увеличение – красным. Более темный фон соответствует большему эффекту.

Для трех наиболее стабильных мутантов TvDAAO E32R/F33D, TvDAAO E32Q/F33D и TvDAAO E32Q были проанализированы температурные зависимости констант скоростей первой и второй стадий термоинактивации в обратных полулогарифмических координатах ТАК (рис. 4.52). Видно, что в случае TvDAAO E32R/F33D константы скорости обеих стадий термоинактивации находятся ниже, чем соответствующие значения для фермента дикого типа во всем температурном диапазоне от 50 до 60°C. Стоит отметить, что значения k_1 и k_2 для TvDAAO E32R/F33D не так сильно зависят от температуры, чем таковые для фермента дикого типа, что выражается в увеличении эффекта стабилизации с

ростом температуры на обеих стадиях инактивации. Для двойного мутанта TvDAAO E32Q/F33D зависимости k_1 и k_2 лежат выше таковых для фермента дикого типа, т.е. данный фермент обладает меньшей стабильностью во всем изученном температурном диапазоне. На общем фоне выделяется мутантная форма TvDAAO E32Q, поскольку у этого фермента константы скорости обеих стадий термоинактивации растут быстрее, чем для остальных ферментов. Это отличие особенно заметно в случае k_2 (рис. 4.52Б). Из анализа температурных зависимостей можно сделать вывод, что при температурах ниже 52°C данный фермент становится более стабильным, чем TvDAAO дикого типа. Используя теорию активированного комплекса (ТАК) и зависимости представленные на рис. 4.52, были найдены активационные параметры – энтальпия и энтропия активации, а также Аррениусовская энергия активации для первой и второй стадий термоинактивации для мутантных TvDAAO с заменами E32Q, E32Q/F33D и E32R/F33D (табл. 4.27). Значения ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger и E_a соотносятся с положением температурных зависимостей соответствующих констант скоростей и, по сути, являются их численным представлением. Полученные значения активационных параметров являются достаточно высокими по сравнению с обычными химическими реакциями и характерны для процессов, связанных с разворачиванием белковой глобулы. Из данных таблицы 4.27. следует, что для TvDAAO E32Q и TvDAAO E32Q/F33D произошло увеличение активационных параметров для обеих стадий термоинактивации, причем для второй стадии более существенно. Для мутантной TvDAAO E32R/F33D, напротив, наблюдается существенное уменьшение активационных параметров на обеих стадиях. Изменение параметров инактивации может быть объяснено конформационными изменениями структуры TvDAAO, которые происходят в результате мутагенеза.

Таким образом, в результате направленного мутагенеза аминокислотных остатков Ala9, Ala12, Glu32 и Phe33 в FAD-связывающем домене TvDAAO, была получена мутантная форма TvDAAO E32R/F33D с повышенной температурной стабильностью в среднем в 3-4 раза по сравнению с TvDAAO дикого типа.

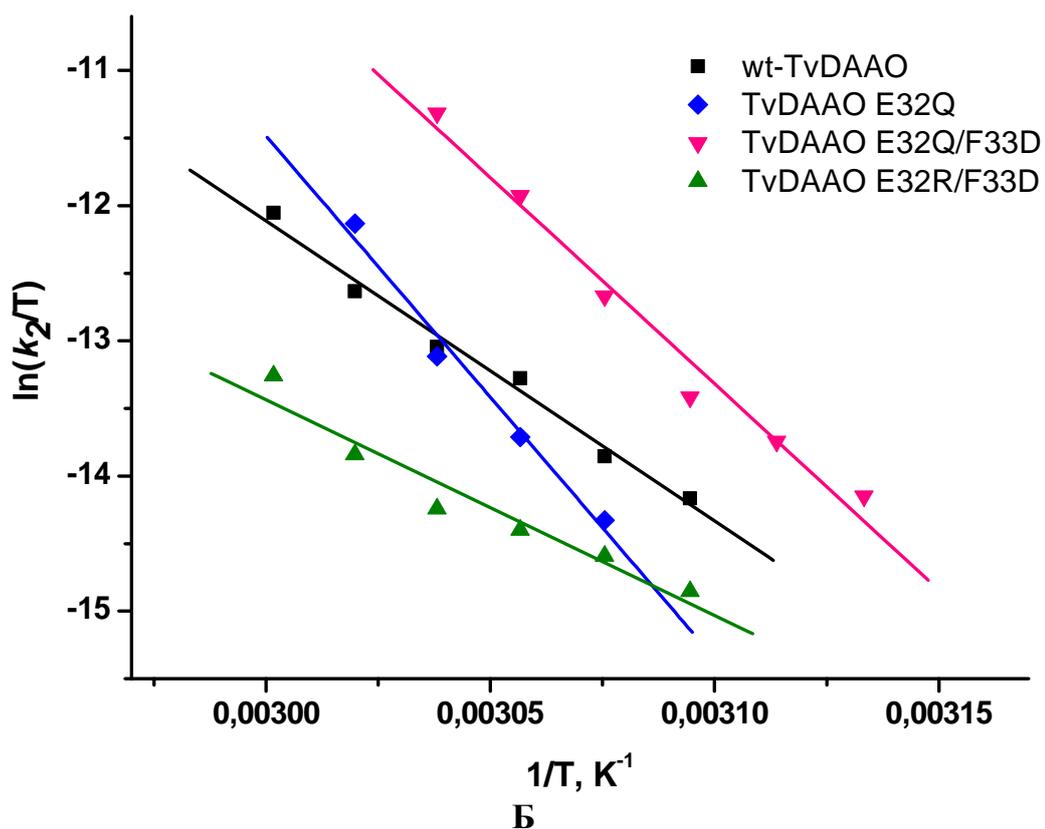
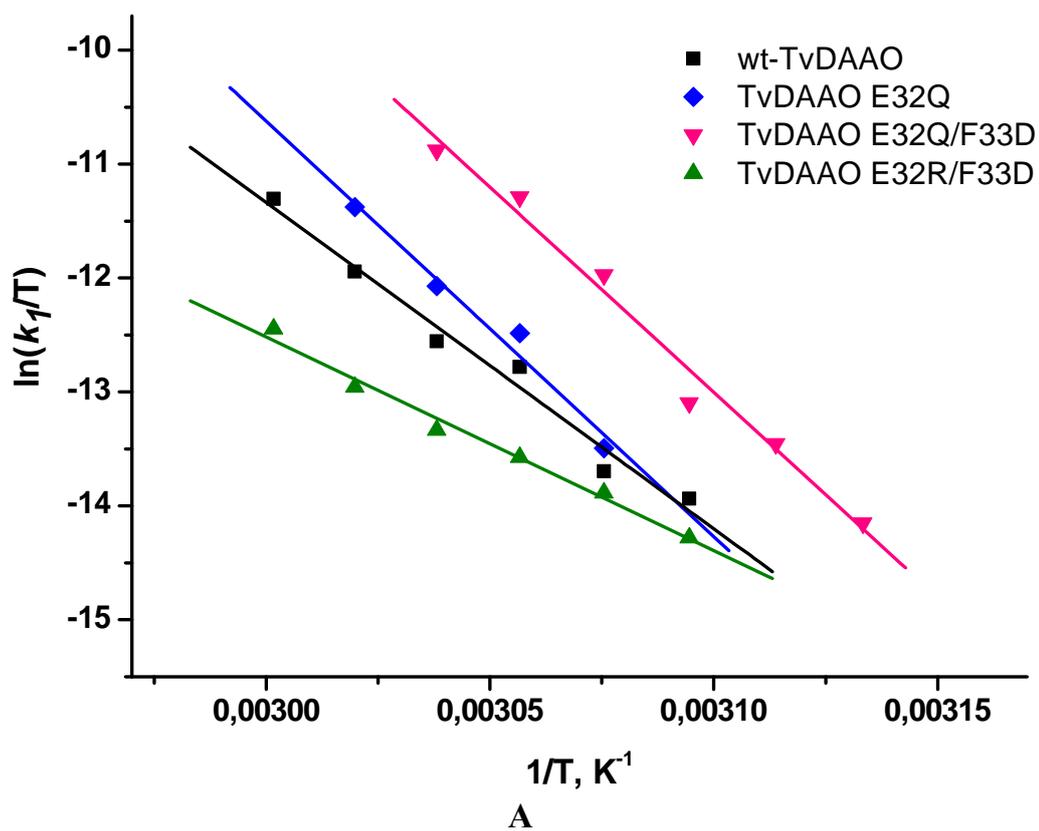


Рис. 4.52. Температурные зависимости констант скорости первой (k_1/T от $1/T$, **А**) и второй (k_2/T от $1/T$, **Б**) стадий термоинактивации для мутантных TvDAAO с заменами E32Q ($\blacklozenge, -$), E32Q/F33D ($\blacktriangledown, -$), E32R/F33D ($\blacktriangle, -$) и TvDAAO дикого типа ($\blacksquare, -$). 0,1 М КФБ, pH 8,0.

Таблица 4.27.

Активационные параметры первой и второй стадий инактивации мутантных TvDAAO с заменами в FAD-связывающем домене и фермента дикого типа (0,1 М КФБ, pH 8,0).

Форма TvDAAO	1я стадия инактивации			2я стадия инактивации		
	$\Delta H^\#, \text{ кДж/моль}$	$\Delta S^\#, \text{ Дж/(моль*К)}$	$E_a, \text{ кДж/моль}$	$\Delta H^\#, \text{ кДж/моль}$	$\Delta S^\#, \text{ Дж/(моль*К)}$	$E_a, \text{ кДж/моль}$
Дикий тип	237±18	420±40	240±17	185±11	260±30	187±10
E32Q	303±35	620±100	306±35	321±30	670±90	324±30
E32Q/F33D	299±20	620±60	302±20	254±20	480±60	256±20
E32R/F33D	156±10	170±30	159±10	133±17	130±30	135±17

4.3.4. Изучение влияния замены E32R/F33D на связывание FAD

Как было отмечено выше, диссоциация FAD из активного центра TvDAAO является одной из причин инактивации фермента при повышенных температурах. Следовательно, полученный стабилизационный эффект в случае введения замены E32R/F33D может быть объяснен усилением связывания FAD в активном центре фермента. В частности, исходя из спектра поглощения TvDAAO E32R/F33D, фермента дикого типа, а также других мутантных TvDAAO, можно сделать вывод, что содержание FAD в активном центре TvDAAO E32R/F33D выше, чем у других ферментов (рис. 4.47, табл. 4.25). Для более выяснения причины эффекта стабилизации в случае замены E32R/F33D, нами была изучена кинетика термоинактивации в отсутствие и в присутствии экзогенного FAD для TvDAAO E32R/F33D и TvDAAO дикого типа. Для этого к образцу фермента с начальной концентрацией 10 мкг/мл добавляли 100-кратный молярный избыток FAD и инкубировали при температуре 56°C. Как следует из полученных зависимостей остаточной активности от времени инкубации на рис 4.53, добавление экзогенного FAD повышает температурную стабильность как фермента дикого типа, так и мутантной TvDAAO E32R/F33D.

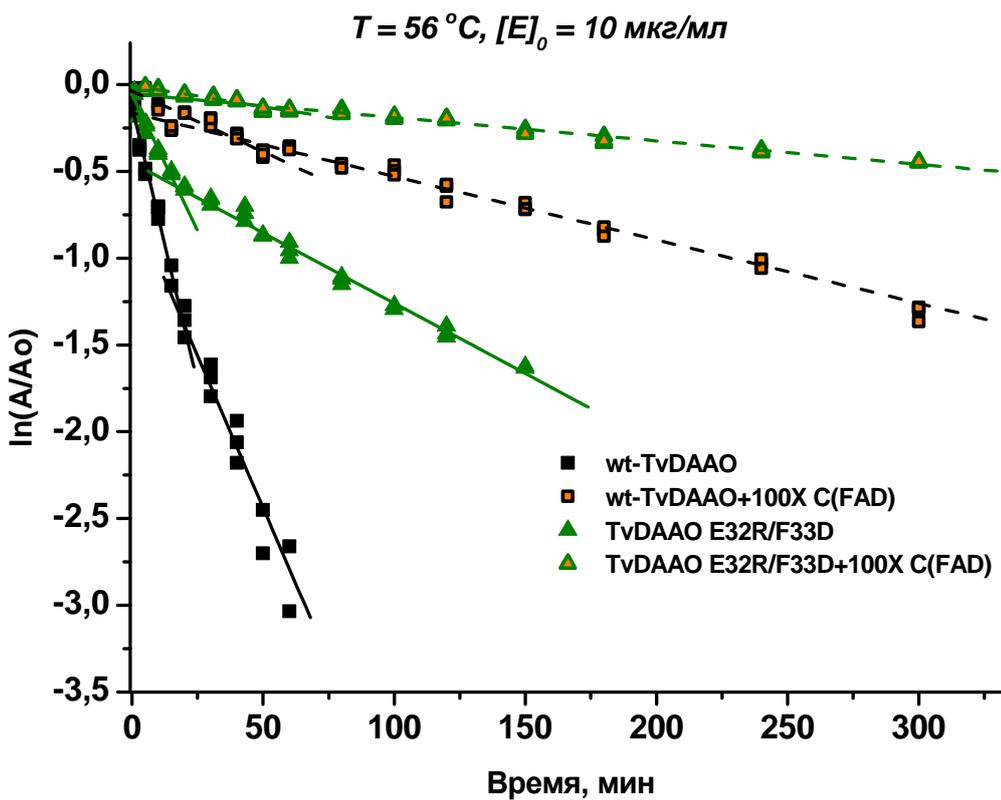
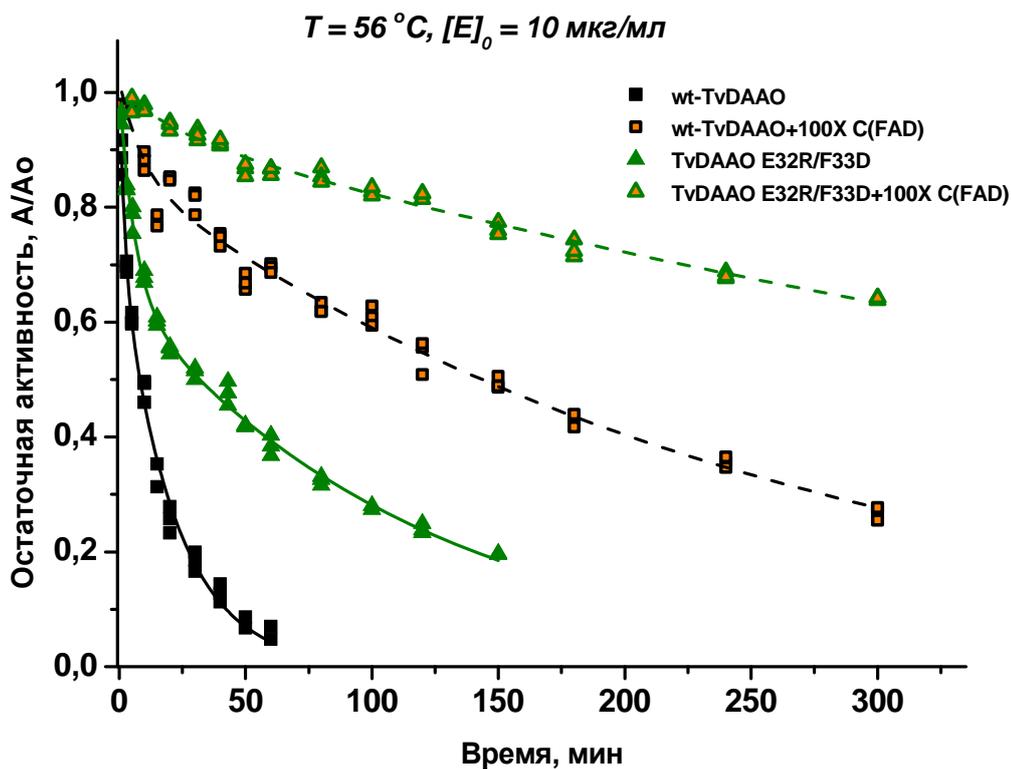


Рис. 4.53. Кинетика термоинактивации TvDAAO в присутствии экзогенного FAD. А – зависимости остаточной активности от времени, аппроксимация биэкспоненциальными функциями, Б - зависимости остаточной активности от времени в полупологарифмических координатах, аппроксимация линейными функциями. TvDAAO E32R/F33D (\blacktriangle , —), TvDAAO E32R/F33D+100x FAD (\blacktriangle , - -), wt-TvDAAO (\blacksquare , —), wt-TvDAAO+100x FAD (\blacksquare , - -). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0, температура инкубации 56°C.

Поскольку оба фермента при повышенных температурах инактивируются в соответствии с диссоциативным механизмом, а при добавлении FAD также наблюдаются изломы на зависимостях остаточной активности от времени в полулогарифмических координатах (рис 4.53Б), то нами было сделано предположение, что механизм термоинактивации TvDAAO не изменяется в присутствии экзогенного FAD. Для оценки количественного эффекта повышения температурной стабильности, нами были рассчитаны константы скорости для обеих стадий процесса термоинактивации, а также периоды полуинактивации в присутствии и в отсутствии экзогенного FAD для TvDAAO E32R/F33D и фермента дикого типа (табл. 4.28). Анализ данных показывает, что добавление FAD влияет на обе стадии процесса термоинактивации. Для фермента дикого типа k_1 снижается почти в 11 раз, а k_2 снижается в 3,3 раза, период полуинактивации возрастает почти в 21 раз. Для TvDAAO E32R/F33D k_1 снижается почти в 12 раз, а k_2 уменьшается всего в 1,2 раза, при этом период полуинактивации возрастает в 12 раз. Следовательно, добавление экзогенного FAD в одинаковой степени стабилизирует оба фермента на первой стадии термоинактивации (диссоциация димера на неактивные мономеры), в то время как на второй стадии процесса (диссоциация FAD из активного центра и разворачивание белковой глобулы) эффект стабилизации для TvDAAO дикого типа в 2,7 раза выше, чем для TvDAAO E32R/F33D. Разница в увеличении периодов полуинактивации составляет почти 2 раза.

Таблица 4.28.

Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации и периоды полуинактивации TvDAAO E32R/F33D и TvDAAO дикого типа при добавлении экзогенного 100-кратного молярном избытка FAD (концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0).

Форма TvDAAO	Параметр	Температура, °С	
		56	56 (+FAD)
Дикий тип	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	6,0	0,42
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	11,6	1,07
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	7,1	2,18
	$\tau_{1/2}$	7,2	150
E32R/F33D	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	2,15	0,08
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	5,3	0,43
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	2,15	1,75
	$\tau_{1/2}$	39	480

Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод, что увеличение температурной стабильности TvDAAO при введении замены E32R/F33D в структуру фермента в FAD-связывающем домене, по-видимому, происходит за счет усиления связывания кофактора FAD белковой глобулой TvDAAO.

4.3.5. Каталитические свойства мутантных TvDAAO с заменами в кофермент-связывающем домене

Для всех активных и стабильных мутантных TvDAAO и фермента дикого типа были получены профили субстратной специфичности. Для этого были определены константы Михаэлиса (K_M) и каталитические константы (k_{cat}) с различными D-аминокислотами. Кроме того, для каждого субстрата была рассчитана каталитическая эффективность фермента – отношение величины k_{cat} к K_M . Полученные экспериментальные данные приведены в таблицах 4.29 и 4.30. Для наглядности зеленым цветом и полужирным шрифтом выделено улучшение соответствующего кинетического параметра по сравнению с ферментом дикого типа. Поскольку мутантная TvDAAO F33D была активна только в нерастворимой форме, то для изучения ферментативной кинетики этого мутанта использовали суспензию разрушенных клеток. Определение k_{cat} для этого мутанта не представлялось возможным, поскольку не существует метода определения концентрации активных центров TvDAAO, связанной с клеточной мембраной. Поэтому в случае TvDAAO F33D были определены только значения K_M с различными D-аминокислотами.

Для наглядности сравнения на рис. 4.54-4.57 представлены относительные значения констант Михаэлиса ($K_M^{mut}/K_M^{wt} \cdot 100\%$), каталитических констант ($k_{cat}^{mut}/k_{cat}^{wt} \cdot 100\%$), каталитической эффективности ($(k_{cat}/K_M)^{mut}/(k_{cat}/K_M)^{wt} \cdot 100\%$), а также абсолютные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO и фермента дикого типа.

Из таблиц 4.29, 4.30 и рис. 4.54-4.57 следует, что введение различных замен в 32 и 33 положение в FAD связывающем домене TvDAAO привело к получению мутантных форм фермента с различным профилем субстратной специфичности.

Все мутантные ферменты имеют повышенную каталитическую эффективность с D-Leu, неактивны с D-Lys, а с D-Thr активны только TvDAAO E32R/F33D и TvDAAO E32Q/F33D.

Для мутантов с точечными аминокислотными заменами в целом наблюдается небольшой рост значений K_M и некоторое уменьшение каталитической активности с большинством D-аминокислот, что в конечном итоге приводит к более низкой каталитической эффективности. Исключением является только TvDAAO F33H, для которой значения K_M уменьшились с D-Leu (в 2,6 раза) и D-Phe (в 2,1 раза), а значения k_{cat} выросли с D-Met (1,15 раза), D-Val (1,5 раза), D-Leu (1,3 раза) и D-Tyr (1,9 раза). Также следует отметить, что у нерастворимого мутанта с TvDAAO F33D наблюдается улучшение величины K_M практически со всеми изученными субстратами.

Для двойных мутантов E32R/F33D и E32Q/F33D следует отметить следующие моменты:

TvDAAO E32Q/F33D обладает более низкими значениями K_M только с D-Leu (в 2,4 раза), D-Ser (в 1,3 раза) и D-Phe (в 1,5 раза), однако каталитическая активность выросла со многими субстратами от 1,1 до 1,6 раза (табл. 4.30, рис. 4.54, 4.55).

TvDAAO E32R/F33D по сравнению с ферментом дикого типа имеет более высокую каталитическую активность со всеми субстратами (рост в среднем от 1,2 до 1,6 раза), за исключением D-Ser. Значения K_M немного увеличились с D-Met, D-Ala и D-Val, однако с остальными субстратами значения K_M уменьшились или практически не изменились. В результате данный фермент имеет увеличенную каталитическую эффективность с D-Ala (в 1,2 раза), D-Leu (в 3,8 раза), D-Ser (в 1,3 раза), D-Phe (в 2,0 раза), D-Tyr (в 1,2 раза), D-Trp (в 1,4 раза), D-Asn (в 1,5 раза), D-Thr (в 1,3 раза), и только с D-Met данный параметр уменьшился в 1,3 раза за счет небольшого увеличения значения K_M . Таким образом, мутантная TvDAAO E32R/F33D в целом обладает улучшенными каталитическими свойствами по сравнению с ферментом дикого типа и, кроме того, является наиболее эффективным ферментом среди всех изученных мутантов с заменами в области FAD-связывающего домена TvDAAO.

Таблица 4.29.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами E32Q, E32R, F33D и фермента дикого типа.

Субстрат	Форма TvDAAO									
	Дикий тип			E32Q			E32R			F33D
	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM
D-Met	0,46±0,03	81±1	175	1,65±0,06	82±2	49,4	2,23±0,13	82±3	36,7	0,95±0,04
D-Ala	16,7±0,7	109±2	6,5	23,8±1,6	37,1±1,1	1,56	26,2±1,4	85±3	3,2	6,5±0,6
D-Val	14,4±1,2	85±3	5,9	18,7±1,1	32,6±0,9	1,74	17,6±1,4	58,3±1,8	3,3	4,7±0,5
D-Leu	0,78±0,02	29,1±0,3	37	0,27±0,02	15,9±0,5	58,9	0,26±0,02	12,4±0,3	47,1	0,16±0,03
D-Ser	37±4	20,5±0,9	0,56	41,0±6,0	13,2±1,0	0,32	32,3±2,2	11,9±0,4	0,37	24,2±3,5
D-Phe	0,37±0,04	27,2±0,8	74	0,52±0,03	21,0±0,5	40,4	0,39±0,02	16,9±0,3	43,5	0,50±0,05
D-Tyr	0,45±0,06	22,5±1,9	50	н.д.**			0,48±0,04	12,6±0,6	26,1	0,19±0,02
D-Trp	0,49±0,04	42,4±1,4	87	0,49±0,06	22,1±1,2	45,1	0,59±0,05	26,8±0,9	45,7	0,31±0,05
D-Asn	22,6±1,5	62±2	2,8	18,0±2,0	25,9±1,6	1,44	16,9±1,6	21,2±1,2	1,26	17,9±1,3
D-Thr	11,1±0,8	1,75±0,04	0,16	н.д.			н.д.			нет активности
D-Lys	29,3±3,4	3,54±0,21	0,12	н.д.			н.д.			18,9±2,1

Таблица 4.30.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами F33H, F33S, E32Q/F33D и E32R/F33D.

Субстрат	Форма TvDAAO											
	F33H			F33S			E32Q/F33D			E32R/F33D		
	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹	K_M , mM	k_{cat} , c ⁻¹	k_{cat}/K_M , mM ⁻¹ c ⁻¹
D-Met	0,93±0,07	92±2	99	0,78±0,06	52,7±1,8	67,6	0,80±0,03	117±2	145,9	0,75±0,02	100±2	134
D-Ala	17,0±2,0	56,1±4,1	3,3	26,0±2,0	63,1±2,1	2,4	25,8±1,0	168±4	6,5	19,7±0,7	154±3	7,8
D-Val	25,0±3,0	125±10	5,0	20,0±2,0	60,3±2,4	3,0	19,1±1,9	104±4	5,4	17,8±0,8	115±2	6,5
D-Leu	0,30±0,02	38,7±0,9	129	0,22±0,01	13,8±0,3	62,7	0,32±0,02	38,0±0,6	119	0,27±0,02	38,7±0,3	143
D-Ser	51,0±5,0	18,4±1,0	0,36	нет активности			27,8±1,5	13,7±0,3	0,49	24,0±1,7	17,8±0,5	0,74
D-Phe	0,18±0,01	26,4±0,8	150	0,23±0,02	12,2±0,2	53,1	0,25±0,02	30,2±0,5	121	0,26±0,02	38,2±0,3	147
D-Tyr	1,10±0,3	41,8±8,2	38,0	0,71±0,13	22,2±2,7	31,3	0,44±0,02	20,8±0,6	47,3	0,46±0,03	26,6±0,9	57,8
D-Trp	0,48±0,05	25,5±1,0	53,1	0,59±0,06	27,1±0,9	46,0	0,77±0,05	53,3±1,5	69,2	0,54±0,02	66,1±2,0	122
D-Asn	28,0±4,0	58,2±0,4	2,1	9,4±0,9	15,5±0,9	1,7	22,4±1,5	50,7±1,6	2,26	19,0±1,6	79±4	4,16
D-Thr	нет активности			нет активности			13,4±1,4	1,82±0,06	0,14	10,5±1,2	2,12±0,07	0,20
D-Lys	нет активности											

* - Зеленым фоном и полужирным шрифтом выделено случаи улучшения каталитических параметров мутантных TvDAAO по сравнению с таковыми для фермента дикого типа

** - нет данных

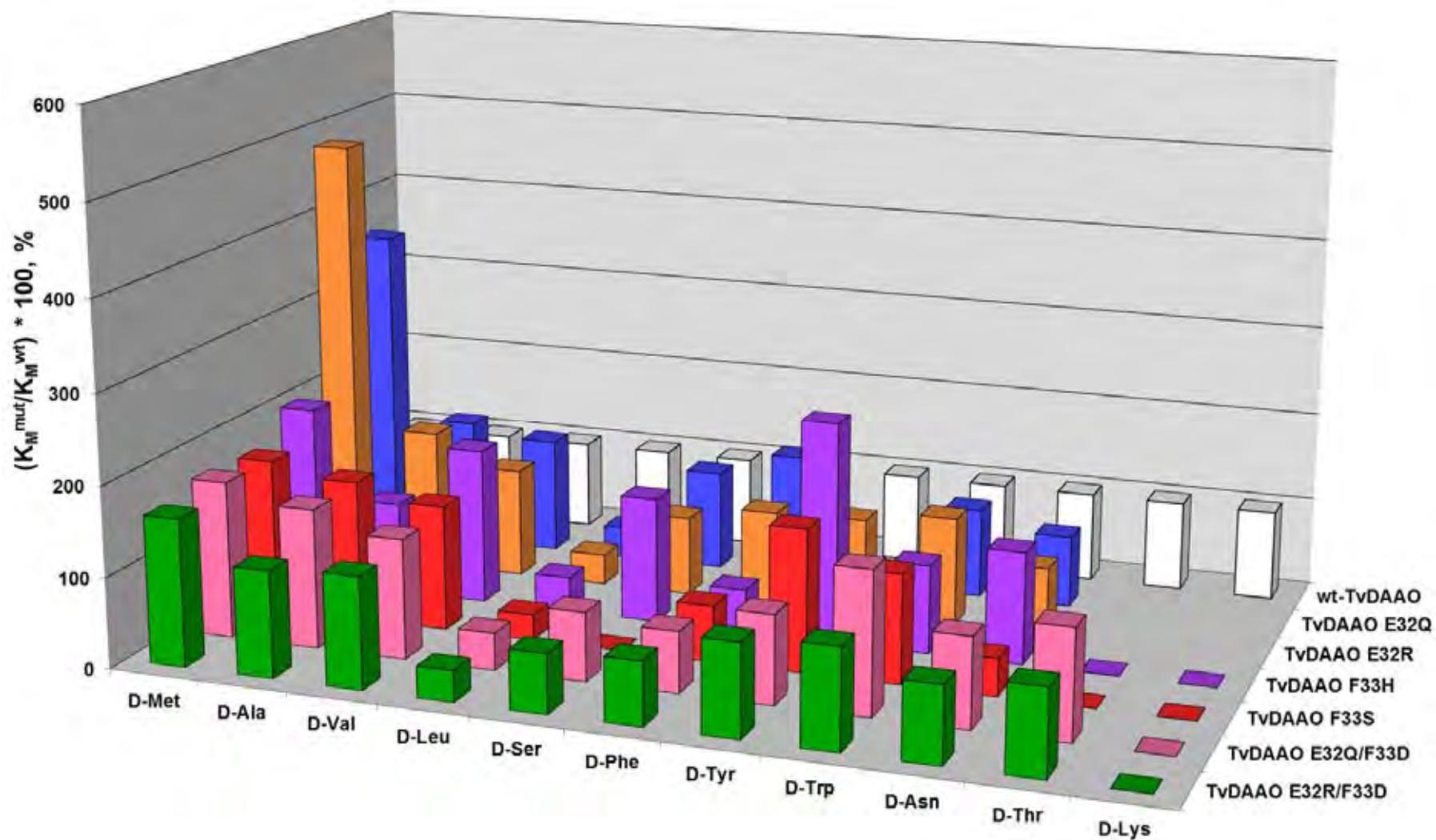


Рис. 4.54. Относительные значения констант Михаэлиса (K_M) для мутантных TvDAAO с заменами в FAD-связывающем домене. За 100% приняты значения K_M фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

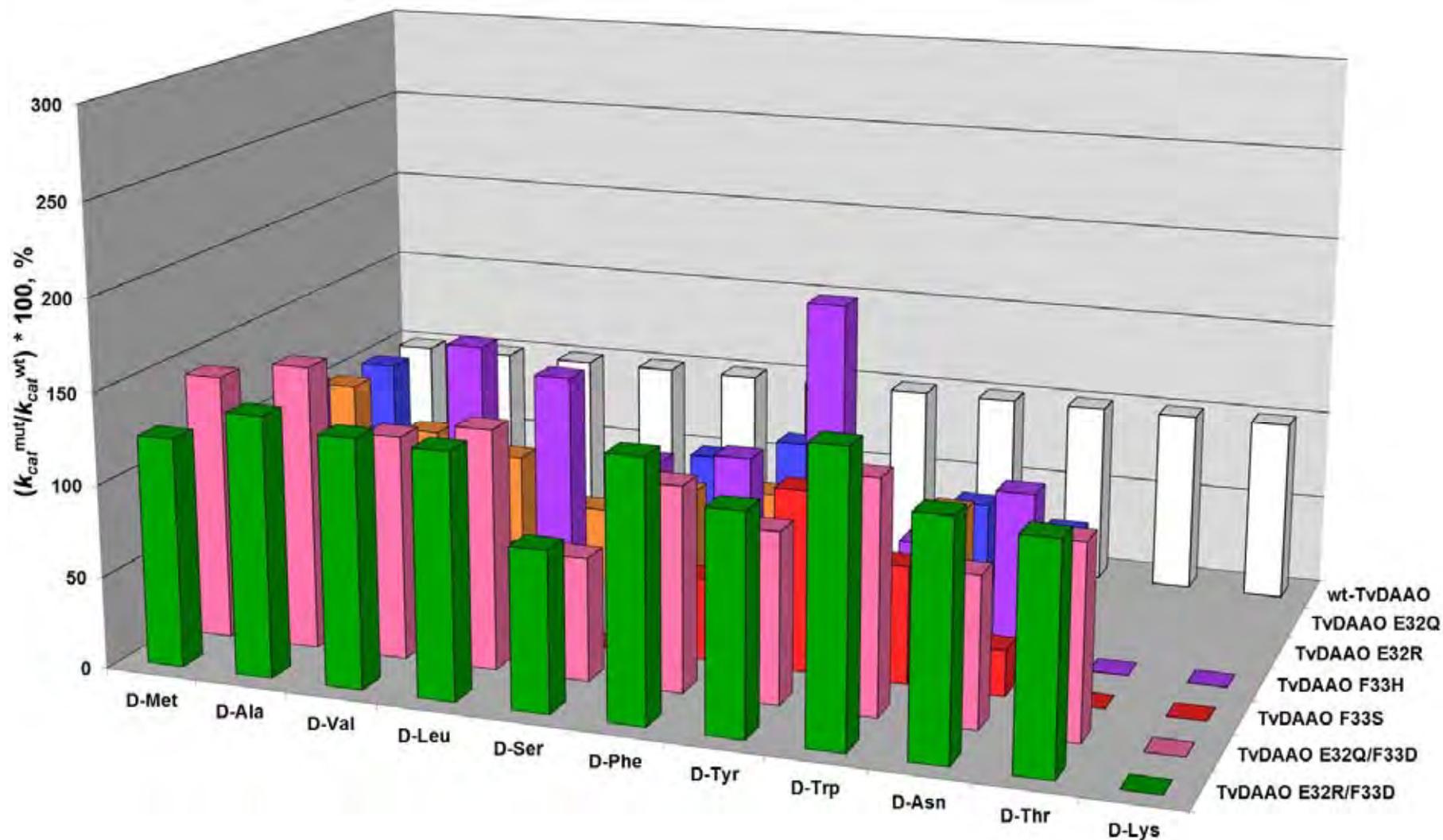


Рис. 4.55. Относительные значения каталитических констант (k_{cat}) для мутантных TvDAAO с заменами в FAD-связывающем домене. За 100% приняты значения k_{cat} фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

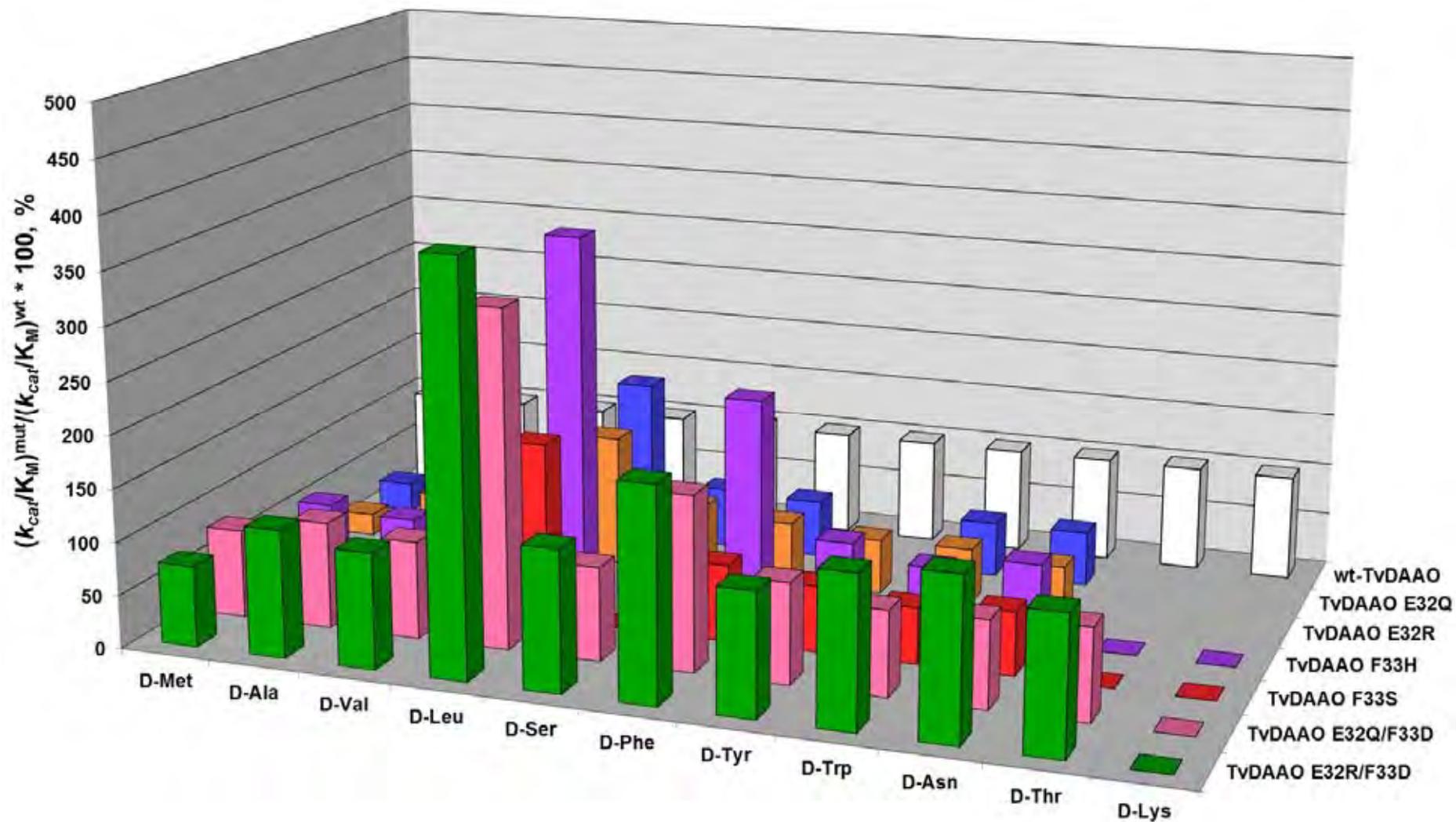


Рис. 4.56. Относительные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с заменами в FAD-связывающем домене. За 100% принята каталитическая эффективность фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

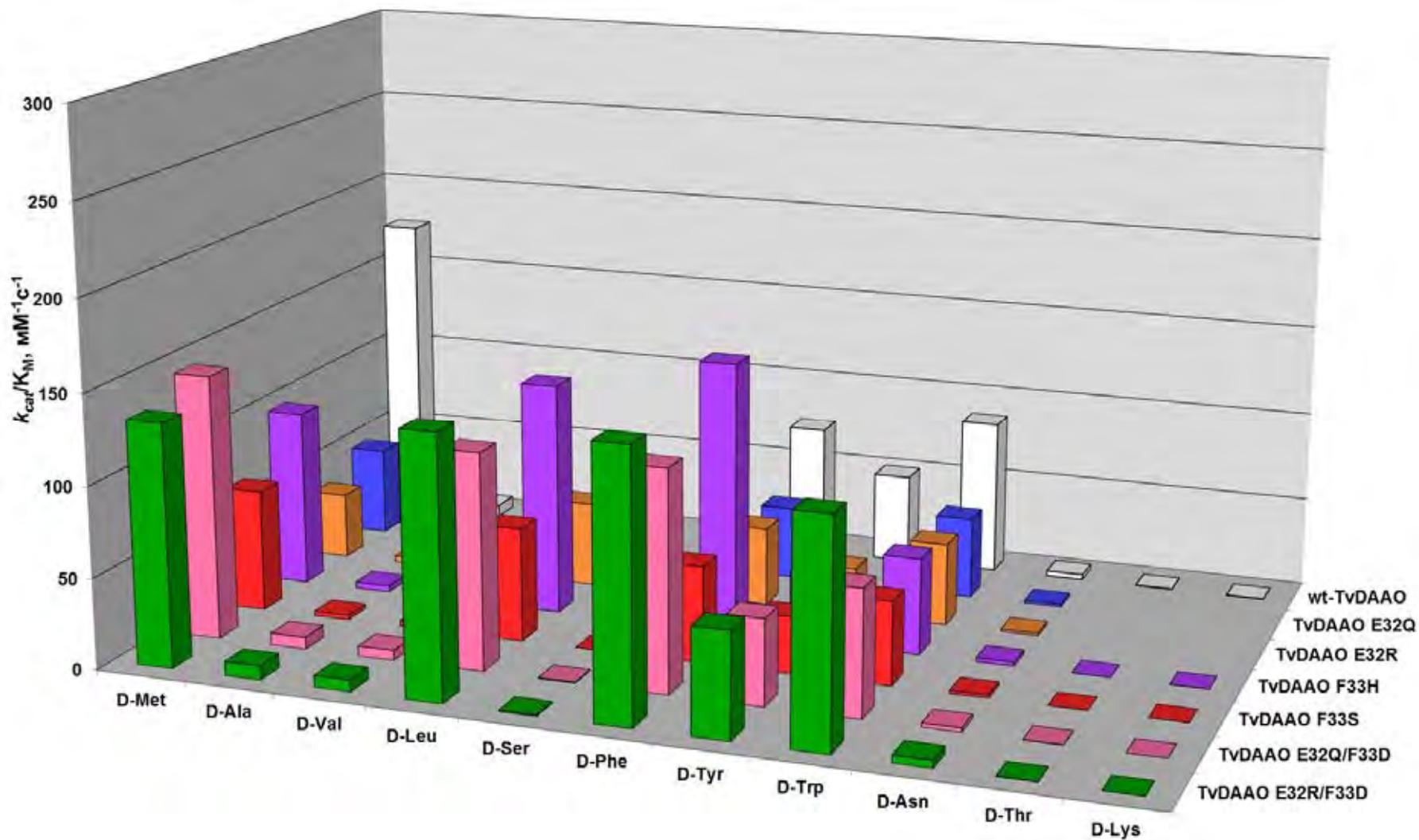


Рис. 4.57. Абсолютные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с заменами в FAD-связывающем домене.

Таким образом, нами был проведен подробный анализ структуры FAD-связывающего домена TvDAAO и выявлены аминокислотные остатки, обеспечивающие нековалентное связывание кофактора. На основании компьютерного скрининга выбраны и изучены роли остатков Ala9, Ala12, Glu32 и Phe33 в температурной стабильности и каталитических свойствах TvDAAO с помощью направленного мутагенеза. Оказалось, что эти остатки играют исключительно важную роль в структуре и функции TvDAAO. Замены остатков Ala9 и Ala12, которые сами по себе не являются консервативными, но находятся в высококонсервативной последовательности GXGXXG, привели к существенной потере температурной стабильности фермента. В результате изучения остатков Glu32 и Phe33, которые располагаются рядом с окси-группами рибозы и адениновой частью FAD, было показано, что введение нескомпенсированных зарядов, а также введение гидрофильных замен, структурно отличающихся от исходных остатков в этой области, приводят к сильной дестабилизации молекулы фермента. При компенсации отрицательного заряда за счет введения двойной замены E32R/F33D была получена мутантная TvDAAO E32R/F33D, которая обладает повышенной температурной стабильностью и улучшенными каталитическими свойствами с большинством субстратов по сравнению с TvDAAO дикого типа. Было показано, что эффект стабилизации вероятнее всего объясняется усилением связывания молекулы FAD белковой глобулой TvDAAO. Стоит упомянуть, что двойная замена E32R/F33D была выбрана на основе сравнения структуры FAD-связывающих доменов TvDAAO и RgDAAO. Кроме того, полученные результаты свидетельствуют о том, что аминокислотные замены вдали от каталитического центра TvDAAO могут приводить к улучшению каталитических свойств фермента. Данный эффект, возможно, объясняется изменением конформации белка таким образом, что возрастает эффективность катализа. В пользу этого говорит небольшой рост каталитической активности со многими D-аминокислотами.

Исходя из вышесказанного, нами было решено использовать TvDAAO E32R/F33D в качестве основы для дальнейшего получения мутантных TvDAAO с улучшенными свойствами вместо фермента дикого типа.

4.4. Объединение точечных аминокислотных замен для получения TvDAAO с улучшенными свойствами

В настоящее время для снижения стоимости биокатализаторов, повышения их операционной стабильности, уменьшения времени реакции, увеличения выхода целевого продукта и т.д., свойства ферментов оптимизируют с помощью различных методов белковой инженерии. Оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* не является исключением. В нашей лаборатории проводятся работы по изучению структурно-функциональных взаимосвязей TvDAAO и получение мутантных форм TvDAAO с улучшенными свойствами с помощью рационального дизайна. Однако, получение фермента со значительно улучшенными свойствами является весьма сложной практической задачей.

В течение последних лет в нашей лаборатории, помимо описанных в данной работе, было получено около 30 мутантных форм TvDAAO с точечными и двойными аминокислотными заменами, некоторые из которых обладали повышенной температурной стабильностью, увеличенной каталитической активностью с рядом D-аминокислот, в том числе с цефалоспорином C. В практике белковой инженерии, как правило, задача получения мутантных ферментов с оптимизированными свойствами под цели определенных биотехнологических процессов решается путем объединения нескольких успешных точечных аминокислотных замен в многоточечные замены. Каждая из этих замен в отдельности может иметь умеренное или очень специфическое влияние на свойства фермента, в то время как многоточечный мутантный фермент приобретает совокупность желаемых свойств, например, значительно повышенную стабильность, каталитическую активность и т.д. [192].

В связи с большим количеством полученных экспериментальных данных и определенными успехами в улучшении свойств TvDAAO, в рамках заключительной главы структурно-функциональных исследований TvDAAO стояла задача объединения наиболее успешных, с точки зрения влияния на свойства фермента, точечных аминокислотных замен в многоточечные мутантные TvDAAO в различных комбинациях с целью усиления положительных эффектов.

4.4.1. Выбор точечных аминокислотных замен для объединения

Ранее в нашей лаборатории был получен ряд мутантных TvDAAO, которые обладали улучшенными свойствами по сравнению с ферментом дикого типа. Среди них следует отметить мутантные ферменты с точечными аминокислотными заменами F54A, F54S, F54Y, S105A, C108F и мутанты с двойными заменами F54A/C108F, F54S/C108F и F54Y/C108F. Среди полученных мутантных TvDAAO в рамках данной работы наиболее интересными с точки зрения улучшения свойств были мутанты с заменами E32R/F33D, M104F и F54S/M104F. Можно констатировать, что 32/33, 54, 104, 105 и 108 положения оказались наиболее интересными и перспективными в структуре TvDAAO. Замены в этих положениях привели к следующим положительным изменениям в свойствах TvDAAO (подчеркиванием показаны замены полученные в данной работе):

1. **E32R/F33D** привела к существенному повышению температурной стабильности TvDAAO (в среднем в 3-4 раза), усилению связывания кофактора FAD белковой глобулой, а также к улучшению каталитических свойств со многими D-аминокислотами (см. главу 4.3).
2. **F54S, F54A, F54Y** привели к сужению спектра субстратной специфичность, увеличению каталитической активности с цефалоспорином C, однако в целом отрицательно повлияли на температурную стабильность фермента. Замена F54A привела к полной дестабилизации TvDAAO. Комбинация этих трех замен с заменой C108F позволила получить мутантные TvDAAO с повышенной активностью с цефалоспорином C, которые не уступали по своей температурной стабильности ферменту дикого типа [57].
3. **M104F** привела к значительному повышению температурной стабильности TvDAAO (более чем в 5 раз). Каталитическая активность TvDAAO M104F со многими D-аминокислотами была близка или превышала таковую для фермента дикого типа, однако для большинства субстратов наблюдался рост значений K_M (см. главу 4.1 и 4.2). Объединение с заменой F54S позволило получить более узкоспецифичный фермент и повысить активность с частью D-аминокислот при небольшой потере в температурной стабильности.

4. **S105A** привела к повышению температурной стабильности (в 1,5-2 раза) и улучшению каталитических свойств с некоторыми D-аминокислотами.
5. **C108F** привела к повышению температурной стабильности (в среднем в 2 раза), а также к небольшому улучшению каталитических свойств фермента с некоторыми D-аминокислотами и цефалоспорином C. Мутантная TvDAAO C108F была успешно закристаллизована в нашей лаборатории, после чего впервые в мире была решена ее трехмерная структура разрешением 2,8 и 1,8Å [76].

Положение описанных аминокислотных остатков в структуре TvDAAO показано на рис. 4.58. Все положения можно разделить на две пространственно-разделенные группы. К первой группе относится замена E32R/F33D, которая находится в FAD-связывающем домене TvDAAO. Ко второй группе относятся замены в 54, 104, 105 и 108 положениях, которые располагаются на входе в активный центр (субстрат-связывающий домен) фермента. Необходимо подчеркнуть, что остаток Phe54 и остатки Met104, Ser105, Cys108 расположены в разных элементах вторичной структуры TvDAAO и, как было показано в главе 4.2, остатки Phe54 и Met104 могут взаимодействовать между собой. Кроме того, стоит отметить, что 3 из 4 остатков (Met104, Ser105, Cys108), замены которых привели к повышению температурной стабильности TvDAAO, расположены в неупорядоченной петле с 95 по 120 остаток. Гидрофобизация данного структурного элемента, по-видимому, приводит к повышению стабильности белковой глобулы TvDAAO. Роль данной соединительной петли в температурной стабильности и каталитической активности TvDAAO была подробно изучена в главе 4.1.

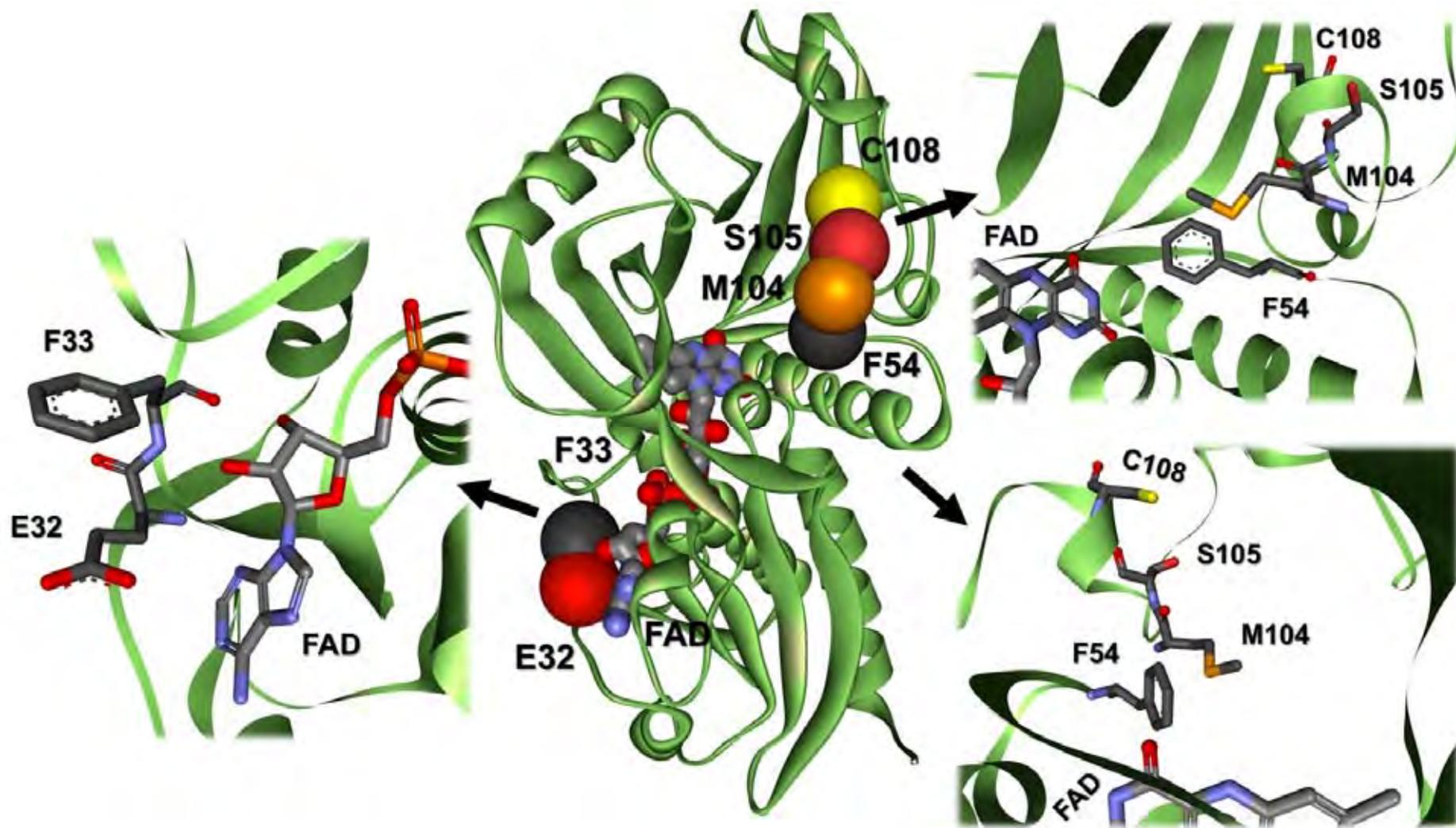


Рис. 4.58. Пространственное расположение остатков E32, F33, F54, M104, S105 и C108 в трехмерной структуре TvDAAO (слева показано расположение остатков в FAD-связывающем домене, справа наверху – вид спереди на активный центр, справа внизу – вид из активного центра).

Итак, поскольку замена E32R/F33D положительно повлияла как на температурную стабильность, так и на каталитическую активность TvDAAO, то нами было решено использовать эту замену как основу для всех многоточечных мутантов. Так как данная замена располагается вдали от активного центра фермента, мы можем ожидать аддитивность свойств при ее объединении с другими аминокислотными заменами. Также было решено изучить влияние введения сразу нескольких замен в соединительную петлю с 95 по 120 остаток на температурную стабильность TvDAAO.

Таким образом, нами были выбраны следующие комбинации для объединения:

1. E32R/F33D + C108F (мутант **M1**)
2. E32R/F33D + F54A + C108F (мутант **M2**)
3. E32R/F33D + F54S + C108F (мутант **M3**)
4. E32R/F33D + F54Y + C108F (мутант **M4**)
5. E32R/F33D + M104F + C108F (мутант **M5**)
6. E32R/F33D + S105A + C108F (мутант **M6**)
7. E32R/F33D + M104F + S105A + C108F (мутант **M7**)
8. E32R/F33D + M104F (мутант **M8**)
9. E32R/F33D + F54S + M104F (мутант **M9**)

Многоточечные замены M1-M4 выбраны с целью получения фермента с увеличенной каталитической активностью и повышенной температурной стабильностью. Замены M5-M7 образуются за счет объединения замены M1 с заменами M104F, S105A и M104F/S105A, соответственно, с целью изучения влияния введения нескольких замен в соединительную петлю 95-120 на стабильность TvDAAO. Замена M8 является объединением замен E32R/F33D и M104F, которые привели к самому большому эффекту стабилизации. Замена M9 образуется из M8 добавлением точечной замены F54S. Таким образом, нами было решено получить 9 многоточечных мутантных TvDAAO, которые далее для краткости будут обозначаться M1-M9.

4.4.2. Получение мутантных TvDAAO с многоточечными заменами

Объединение замен в 32/33, 54 и 108 положениях (мутанты М1-М4) было проведено с помощью ПЦР с использованием праймеров, которые несут мутацию E32R/F33D в гене *tvdaao* (см. главу 4.3), поскольку расположение уникальных сайтов рестрикции не позволяет выполнить переклонирование участков генов с мутациями. В качестве ДНК матриц для проведения ПЦР, рестрикции (по сайтам NcoI и Bsp119I) и лигирования использовали ранее полученные плазмиды с мутантными генами *tvdaao*, которые обеспечивают замены C108F, F54A/C108F, F54S/C108F, F54Y/C108F в структуре TvDAAO (табл. 4.31).

Таблица 4.31.

Олигонуклеотидные праймеры для введения мутаций в ген *tvdaao*.

Матрица	Замена		Нуклеотидная последовательность*
C108F, F54A/C108F, F54S/C108F, F54Y/C108F	E32R/ F33D	Mfor	5' - A ATT GTG TCC AGG GAT ACG CCC GGT GAT CTT AGT ATC -3'
		Mrev	5' - GGC GTA TCC CTG GAC ACA ATT GTA ACC TCA TGT CC - 3'
E32R/F33D/ C108F	M104F	Mfor	5' - GAA GGT GCC TTC TCG GCC ATC TTC CAA CGC AAC -3'
		Mrev	5' - GAA GAT GGC CGA GAA GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG -3'
	S105A	Mfor	5' - GGT GCC ATG GCG GCC ATC TTC CAA CGC AAC -3'
		Mrev	5' - GAA GAT GGC CGC CAT GGC ACC TTC CAG TTT AGG -3'
	M104F/ S105A	Mfor	5' - GGT GCC TTC GCG GCC ATC TTC CAA CGC AAC -3'
		Mrev	5' - GAT GGC CGC GAA GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG -3'

* Полужирным шрифтом выделены нуклеотидные замены, обеспечивающие мутации.

Объединение замен в 32/33, 104, 105 и 108 положениях в описанных выше комбинациях (мутанты М5-М7) было проведено с помощью ПЦР, поскольку в этом случае переклонирование участков генов с мутациями из исходных плазмид было также невозможно из-за близкого расположения вводимых замен в ген *tvdaao*. Для ПЦР использовали праймеры, несущие замены M104F, S105A и M104F/S105A в гене *tvdaao*. В качестве ДНК-матрицы для генно-инженерных

манипуляций использовали полученную на первом этапе объединения плазмиду, которая содержит тройную замену E32R/F33D/C108F (табл. 4.31).

Объединение замен в 32/33, 54 и 104 положениях (мутантны M8-M9) было проведено с помощью переклонирования участков генов, которые содержат триплеты, обеспечивающие замены E32R/F33D, F54S и M104F. Для этого использовали ранее полученные плазмиды с мутантными генами *tvdaao* pTvDAAO E32R/F33D (см. главу 4.3), pTvDAAO M104F (см. главу 4.1) и pTvDAAO E32R/F33D/F54S/C108F. Из соответствующих плазмид вырезали участки гена с мутациями E32R/F33D и E32R/F33D/F54S с помощью рестриктаз NcoI и EcoRI и проводили лигирование в вектор pTvDAAO M104F, из которого с помощью тех же рестриктаз предварительно был удален соответствующий фрагмент без мутации.

Во всех случаях наличие необходимых многоточечных мутаций, а также отсутствие посторонних мутаций, было подтверждено с помощью секвенирования.

Получение штаммов-продуцентов мутантных TvDAAO, культивирование, экспрессию, выделение и очистку проводили аналогично методикам, описанным в главе 4.1. В процессе культивирования и экспрессии все многоточечные мутантные TvDAAO M1-M9 синтезировались в активной и растворимой форме. Выходы мутантных ферментов и фермента дикого типа по активности сильно отличаются друг от друга, однако коррелируют с удельной активностью по D-метионину в каждом случае (табл. 4.32). Стоит отметить, что объединение точечных аминокислотных замен в многоточечные замены не приводит к уменьшению уровня экспрессии растворимых белков по сравнению с ферментом дикого типа. Все ферменты являлись достаточно стабильными, были выделены и очищены с помощью анионообменной хроматографии на колонке MonoQ с последующим обессоливанием на колонке G25. Результаты очистки и параметры образцов мутантных ферментов, которые были использованы для изучения свойств, представлены в таблице 4.32. В целом за две стадии очистки наблюдаются более высокие выходы для мутантных ферментов, чем для фермента дикого типа, что может быть связано с более высокой стабильностью многоточечных мутантов.

Аналитический SDS-электрофорез очищенных образцов мутантных TvDAAO и фермента дикого типа в полиакриламидном геле представлен на рис. 4.59 и 4.60. Все препараты TvDAAO M1-M9 имели чистоту не менее 95%.

После получения высокоочищенных препаратов мутантных TvDAAO с многоточечными аминокислотными заменами M1-M9 нами были изучены их свойства – субстратная специфичность и температурная стабильность.

Таблица 4.32.

Результаты экспрессии (в клетках *E.coli*) и очистки многоточечных мутантных TvDAAO M1-M9 и фермента дикого типа.

Форма TvDAAO	Культивирование			Очистка			
	Выход биомассы, г/л	Выход активного фермента, Ед/л*	Выход раств. фермента, мг/л	Выход по активност и после очистки, %	Концентрация фермента, мкг/мл	Удельная активност, Ед/мг	Отношение поглощения A_{280}/A_{455}
Дикий тип	15,3	11800	84	55	95	140	8,3
M1	15,3	19800	133	82	156	149	8,8
M2	12,9	9200	115	83	145	80	8,5
M3	13,2	4800	89	78	155	54	8,9
M4	15,5	4600	81	95	119	57	9,4
M5	13,2	9200	97	86	182	95	7,7
M6	13,9	12800	95	71	136	135	8,2
M7	15,3	11900	96	88	163	124	8,9
M8	13,5	10100	81	80	109	125	9,0
M9	13,9	6800	76	85	155	89	9,4

*Активност ферментов определяли по D-метионину

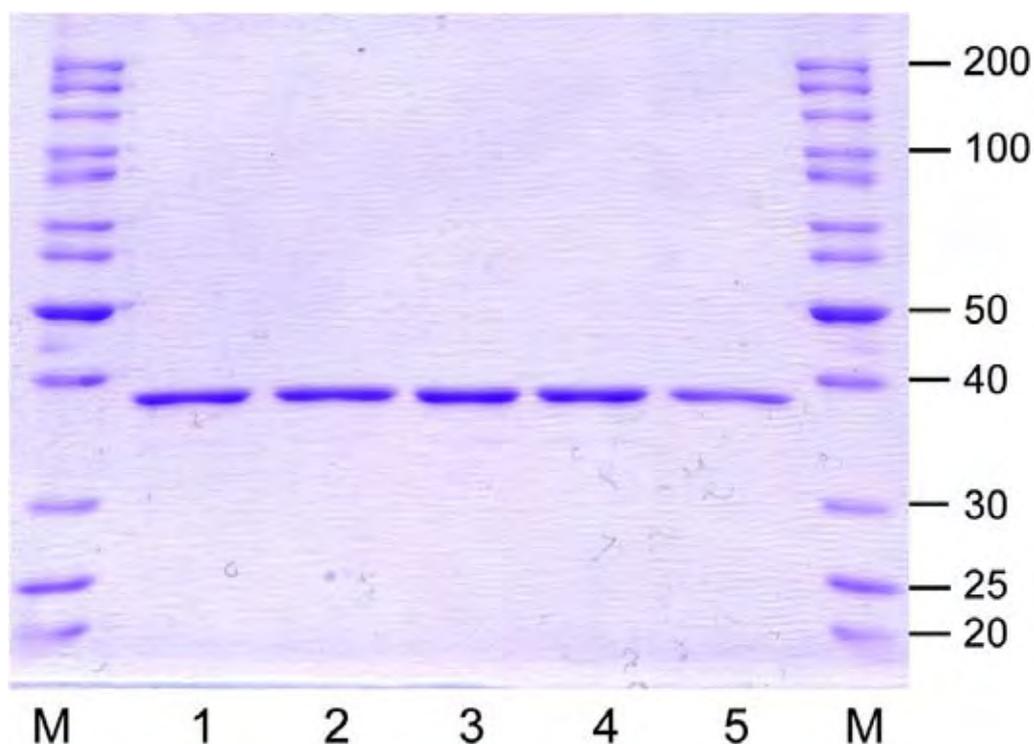


Рис. 4.59. Белковый электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов TvDAAO после очистки. 1 – TvDAAO M1, 2 – TvDAAO M2, 3 – TvDAAO M3, 4 – TvDAAO M4, 5 – TvDAAO дикого типа, M – маркер (мол. массы указаны в кДа).

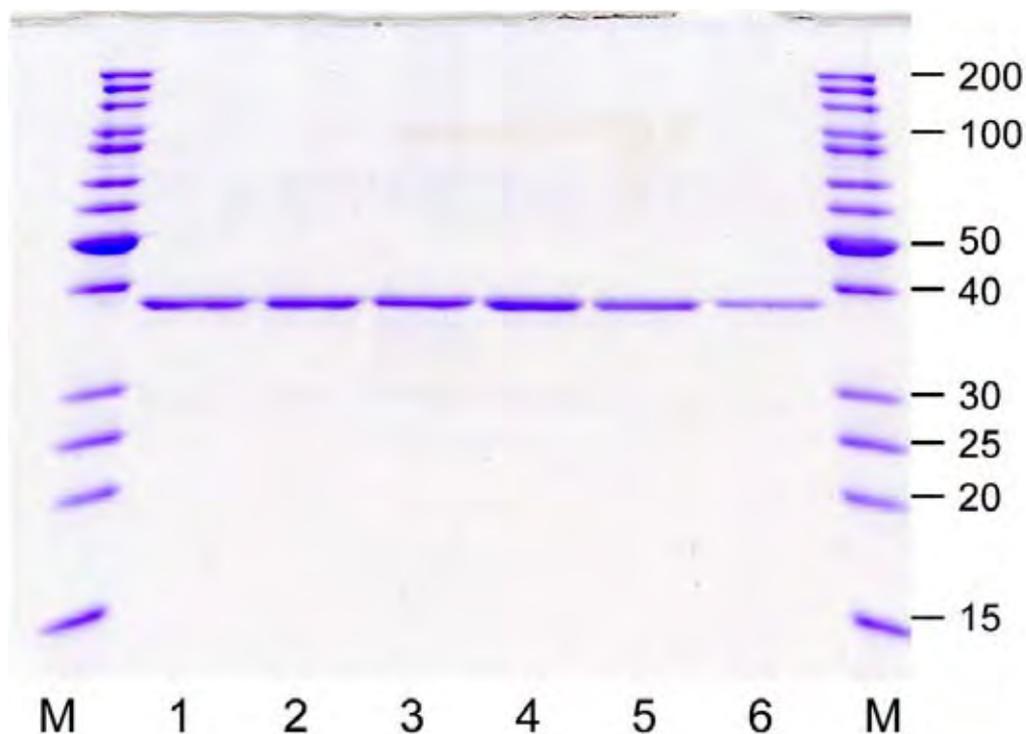


Рис. 4.60. Белковый электрофорез в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях препаратов TvDAAO после очистки. 1 – TvDAAO M5, 2 – TvDAAO M6, 3 – TvDAAO M7, 4 – TvDAAO M8, 5 – TvDAAO M9, 6 – TvDAAO дикого типа, M – маркер (мол. массы указаны в кДа).

4.4.3. Каталитические свойства многоточечных мутантных TvDAAO

Каталитические свойства были подробно изучены для многоточечных мутантных TvDAAO M1-M4, которые содержат замены в активном центре фермента. Подробное изучение профилей субстратной специфичности для мутантных TvDAAO M5-M9 не входило в задачи данной работы, поэтому для этих ферментов были изучены каталитические свойства с основным субстратом D-метионином. Экспериментальные данные были обчислены согласно методикам, которые описаны в главе 4.1. Результаты определения констант Михаэлиса (K_M), каталитические констант (k_{cat}) и значения каталитической эффективности с различными D-аминокислотами приведены в таблице 4.33. Для наглядности зеленым цветом и полужирным шрифтом выделено улучшение соответствующего кинетического параметра по сравнению с ферментом дикого типа. На рис. 4.61 представлена диаграмма, на которой приведены значения каталитической эффективности ($(k_{cat}/K_M)^{mut}/(k_{cat}/K_M)^{wt} \cdot 100\%$) для мутантных TvDAAO относительно таковых для фермента дикого типа (приняты за 100%).

Из таблицы 4.33 и рис. 4.61 следует, что многоточечные мутантные TvDAAO M1-M4 и фермент дикого типа имеют различные профили субстратной специфичности. Для всех мутантов наблюдается уменьшение каталитической активности с небольшими субстратами D-Ala, D-Val и D-Ser, а с D-Thr активность полностью отсутствует. В случае объемных алифатических и ароматических субстратов, как правило, наблюдается улучшение, по крайней мере, одного из каталитических параметров (K_M или k_{cat}) этих мутантов по сравнению с таковыми для фермента дикого типа. По каждому отдельному многоточечному мутантному ферменту в сравнении с ферментом дикого типа можно выделить следующие моменты:

TvDAAO M1 обладает повышенной каталитической активностью с D-Met (в 1,2 раза), D-Phe (в 2,3 раза), D-Asn (в 1,7 раза) и D-Lys (в 2,1 раза). Значения K_M немного уменьшились с D-Leu, D-Ser, D-Tyr и D-Asn, но с остальными субстратами возросли в 1,5-5,8 раза. Профиль субстратной специфичности TvDAAO M1

определяется заменой С108F, но в целом фермент активнее, чем TvDAAO С108F, за счет положительного влияния замены E32R/F33D.

TvDAAO M2 имеет более высокую каталитическую активность с D-Phe (в 3,6 раза), D-Tyr (в 2,2 раза), D-Trp (в 1,2 раза) и D-Lys (в 2,8 раза). Значения K_M улучшились с D-Leu (в 8 раз), D-Tyr (в 1,5 раза), D-Asn (в 5,9 раза) и D-Lys (в 1,8 раза). Также произошло уменьшение значений K_M с D-Ala, D-Val, D-Ser от 2 до 10 раз, однако значения k_{cat} уменьшились от 10 до 20 раз, что соответствующим образом повлияло на значения каталитической эффективности с этими субстратами. Этот фермент обладает самой высокой k_{cat} с D-Phe, самой высокой k_{cat}/K_M с D-Leu и D-Asn среди полученных мутантов. Тем не менее, значения K_M ухудшились с D-Met (в 3,1 раза), D-Phe (в 2,6 раза) и D-Trp (в 2,0 раза).

TvDAAO M3 обладает более высокой каталитической активностью с D-Phe (в 2,9 раза), D-Tyr (в 1,9 раза), D-Asn (в 1,2 раза) и D-Lys (в 2,4 раза). Наблюдается улучшение K_M с D-Leu (в 10 раз), D-Tyr (в 2,2 раза), D-Asn (в 4,2 раза) и D-Lys (в 1,7 раза). С D-Ala, D-Val, D-Ser в 2-3 раза уменьшились значения K_M и сильно упала каталитическая активность. Кроме того, значения K_M увеличились с D-Met (в 2,6 раза), D-Phe (в 3,9 раза) и D-Trp (в 2,5 раза).

TvDAAO M4 имеет повышенную каталитическую активность с D-Phe (в 3,4 раза), D-Tyr (в 2,3 раза) и D-Lys (в 2,3 раза). Фермент практически не проявляет активность с D-Ala, D-Val, D-Ser, как и TvDAAO M2-M3. Кроме того, произошло увеличение значений K_M с D-Met (в 2,8 раза), D-Phe (в 4,7 раза) и D-Trp (в 2,1 раза).

Таким образом, многоточечные мутантные TvDAAO M1-M4 имеют похожие профили субстратной специфичности, но при этом мутанты TvDAAO M2-M4 имеют более высокую каталитическую эффективность, чем TvDAAO M1. Спектр субстратной специфичности каждого мутанта в первую очередь определяются заменами F54A, F54S и F54Y и С108F в активном центре фермента, при этом замена E32R/F33D вносит положительный вклад в каталитическую активность практически со всеми субстратами. Например, с D-аминокислотами, которые являются “хорошими субстратами”, все мутантные ферменты TvDAAO M1-M4 имеют более высокую активность, чем их общий предшественник TvDAAO С108F,

а также чем TvDAAO F54Y (TvDAAO F54A не был изучен в силу очень низкой стабильности). Исключением является TvDAAO M3, которая с некоторыми субстратами хоть и активнее, чем TvDAAO C108F, но в то же время обладает меньшей активностью, чем TvDAAO F54S, что по-видимому является следствием введения замены C108F. Стоит отметить, что при объединении нескольких пространственно-удаленных друг от друга точечных замен в многоточечные мутантные TvDAAO, аддитивное влияние каждой отдельной замены на значения K_M и k_{cat} наблюдается не с каждым субстратом.

Исходя из абсолютных значений каталитических констант k_{cat} , представленных в таблицы 4.33, наиболее перспективными для окислительного дезаминирования отдельных D-аминокислот, можно выделить мутанты TvDAAO M1 для окисления D-Phe и D-Asn, TvDAAO M2-M4 для окисления D-Phe и D-Tyr. Несмотря на то, что TvDAAO M1-M4 имеют повышенную каталитическую эффективность с D-Leu и D-Lys, эти ферменты не являются перспективными для окисления этих субстратов в силу невысоких абсолютных значений каталитических констант k_{cat} .

Поскольку D-Met является основным субстратом для измерения активности TvDAAO, то для выбора насыщающей концентрации при изучении температурной стабильности, были изучены каталитические свойства для многоточечных мутантных TvDAAO M5-M9 с этой D-аминокислотой (в сравнении с ферментом дикого типа):

TvDAAO M5 $K_M=4,2$ мМ (возросла в 9 раз), $k_{cat}=62$ с⁻¹ (уменьшилась в 1,3 раза)

TvDAAO M6 $K_M=3,1$ мМ (возросла в 6,7 раза), $k_{cat}=88$ с⁻¹ (возросла в 1,1 раза)

TvDAAO M7 $K_M=3,5$ мМ (возросла в 7,7 раза), $k_{cat}=81$ с⁻¹ (не изменилась)

TvDAAO M8 $K_M=3,95$ мМ (возросла в 8,5 раз), $k_{cat}=82$ с⁻¹ (не изменилась),

TvDAAO M9 $K_M=2,03$ мМ (возросла в 4,4 раз), $k_{cat}=58$ с⁻¹ (уменьшилась в 1,3 раза),

Таким образом, для мутантов TvDAAO M5-M9 с D-Met наблюдается увеличение значений K_M , однако каталитическая активность практически не изменяется. Стоит отметить, что для многоточечных мутантных TvDAAO M5-M9 наблюдается корреляция с каталитическими параметрами исходных мутантных TvDAAO с точечными аминокислотными заменами M104F, S105A и C108F.

Таблица 4.33.

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами M104A, M104S, M104V и фермента дикого типа.

Субстрат	Форма TvDAAO														
	Дикий тип			M1			M2			M3			M4		
	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat} , с ⁻¹	k_{cat}/K_M , мМ ⁻¹ с ⁻¹
D-Met	0,46±0,03	81±1	175	2,68±0,08	98±2*	36	1,44±0,04	52±1	36	1,23±0,06	35,3±0,6	28,8	1,29±0,09	37±1	29
D-Ala	16,7±0,7	109±2	6,5	51±3	31±1	0,61	7,8±0,61*	5,8±0,2	0,74	7,8±0,9	3,45±0,13	0,44	6,4±1,0	3,09±0,13	0,48
D-Val	14,4±1,2	85±3	5,9	39±2	37±1	0,95	4,6±0,5	5,0±0,2	1,10	4,5±0,6	2,86±0,10	0,64	5,0±0,9	2,47±0,13	0,49
D-Leu	0,78±0,02	29,1±0,3	37	0,58±0,01	20,7±0,9	36	0,09±0,01	26,3±0,6	280	0,07±0,01	11,9±0,26	170	0,09±0,01	11,5±0,2	130
D-Ser	37±4	20,5±0,9	0,56	32±3	5,5±0,2	0,17	3,7±0,6	2,07±0,06	0,6	н.д.**	1,07±0,04	н.д.	7,4±2,6	1,60±0,14	0,22
D-Phe	0,37±0,04	27,2±0,8	74	1,08±0,07	63±2	58	0,96±0,06	98±3	100	1,44±0,08	79±2	55	1,73±0,11	92±2	53
D-Tyr	0,45±0,06	22,5±1,9	50	0,18±0,02	11,2±0,5	64	0,30±0,03	49±3	160	0,21±0,01	43±2	205	0,36±0,03	52±3	150
D-Trp	0,49±0,04	42,4±1,4	87	0,79±0,09	27,6±1,3	35	0,98±0,07	49±2	50	1,22±0,07	23,8±0,9	19,5	1,04±0,11	23,1±1,5	22,2
D-Asn	22,6±1,5	62±2	2,8	16,0±0,3	107±1	6,7	3,8±0,2	65±2	17	5,5±0,2	72±1	13,0	4,7±0,3	68±2	14,6
D-Thr	11,1±0,8	1,75±0,04	0,16	нет активности											
D-Lys	29,3±3,4	3,54±0,21	0,12	48±9	7,3±0,9	0,15	16±2	9,9±0,3	0,61	17,3±1,8	8,4±0,4	0,48	12,4±1,4	8,0±0,3	0,64

* - Зеленым фоном и полужирным шрифтом выделено случаи улучшения каталитических параметров мутантных TvDAAO по сравнению с таковыми для фермента дикого типа

** - нет данных

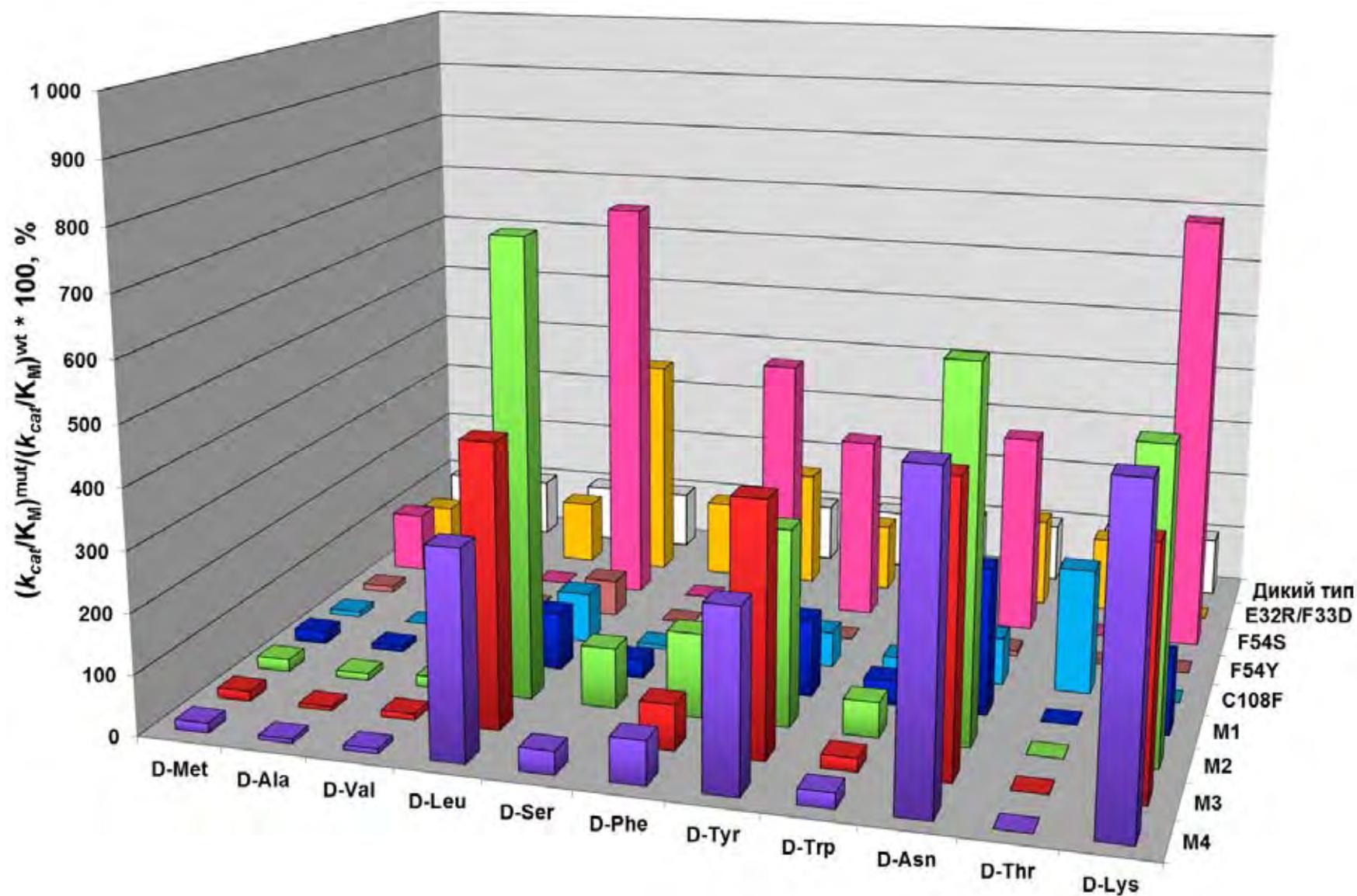


Рис. 4.61. Относительные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для многоточечных мутантных TvDAAO M1-M4 и их предшественников с заменами E32R/F33D, F54S, F54Y, C108F. За 100% принята каталитическая эффективность фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

4.4.4. Температурная стабильность многоточечных мутантных TvDAAO

Температурную стабильность всех многоточечных мутантных TvDAAO M1-M9 изучали по кинетике термоинактивации, как было описано в предыдущих главах. Сравнение температурной стабильности мутантов и фермента дикого типа проводили при одинаковой начальной концентрации ферментов и различной температуре. На рис. 4.62 и рис. 4.63 представлены зависимости остаточной активности от времени для TvDAAO M1-M4 при температуре 56°C и для TvDAAO M5-M9 при температуре 60°C. Концентрация ферментов во всех случаях 10 мкг/мл, экспериментальные данные аппроксимированы биэкспоненциальными функциями. Для подтверждения диссоциативного механизма термоинактивации также были получены зависимости остаточной активности от времени при различных начальных концентрациях ферментов. В качестве примера на рис. 4.64 и рис. 4.65 представлены типичные зависимости остаточной активности от времени для TvDAAO M1 в полулогарифмических координатах при различных температурах (52-62°C) и начальных концентрациях фермента (5, 10, 15 и 20 мкг/мл). Наличие точек излома и зависимость скорости инактивации от начальной концентрации фермента указывают на двухстадийный диссоциативный механизм (см. главу 4.1). Такого рода зависимости были получены для всех мутантных форм TvDAAO с многоточечными аминокислотными заменами. В результате, для каждого мутанта было показано, что механизм термоинактивации при повышенных температурах не изменился, несмотря на то, что стабильность в некоторых случаях сильно возросла относительно фермента дикого типа. Это может быть связано с тем, что все исходные точечные замены располагаются вне области межсубъединичного контакта в димере TvDAAO. Следовательно, данные замены не могут приводить к существенной стабилизации димерного состояния фермента и, в конечном счете, к одностадийному механизму термоинактивации по реакции первого порядка.

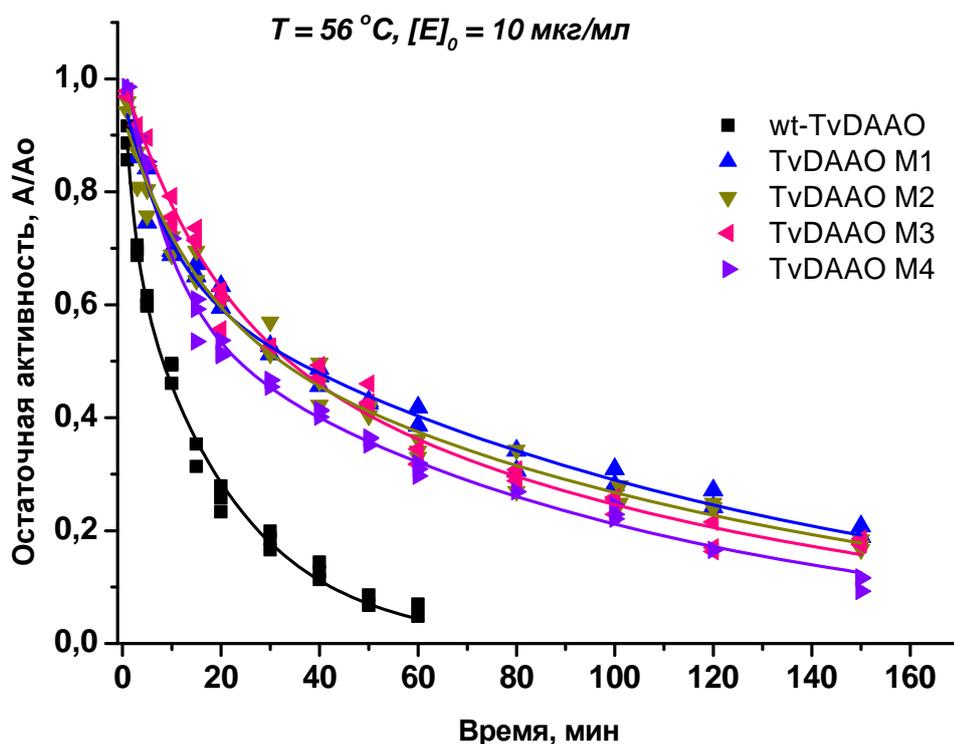


Рис. 4.62. Зависимости остаточной активности от времени мутантных TvDAAO M1 (\blacktriangle ,—), TvDAAO M2 (\blacktriangledown ,—), TvDAAO M3 (\blacktriangleleft ,—), TvDAAO M4 (\blacktriangleright ,—) и TvDAAO дикого типа (\blacksquare ,—). Экспериментальные данные аппроксимированы биэкспоненциальными функциями. Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0, температура инкубации 56 °С.

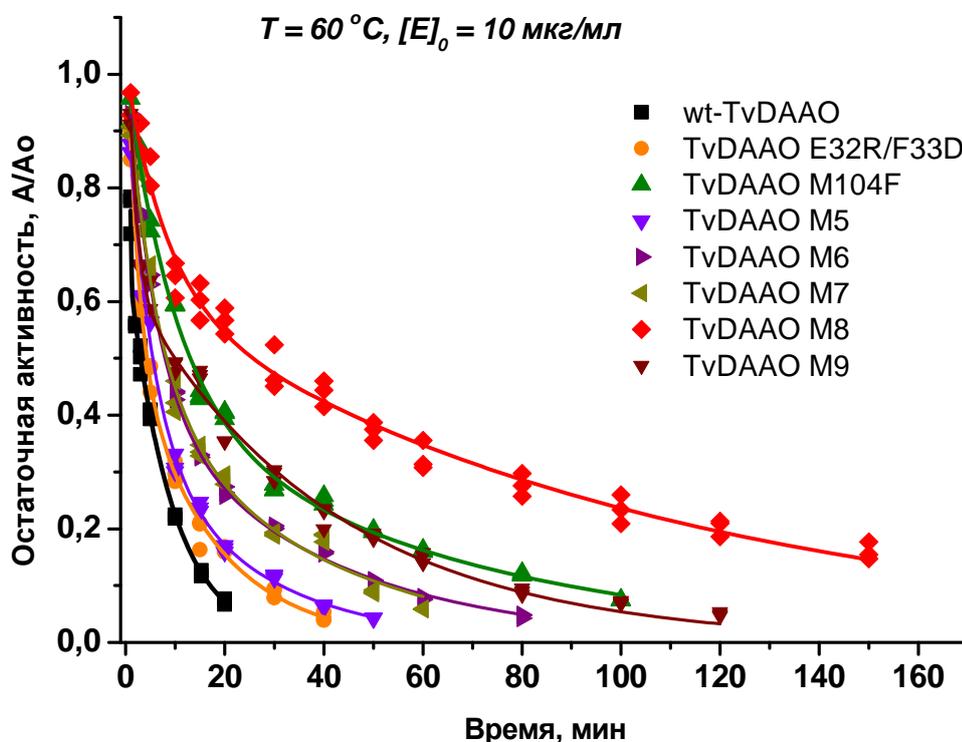


Рис. 4.63. Зависимости остаточной активности от времени мутантных TvDAAO E32R/F33D (\bullet ,—), TvDAAO M104F (\blacktriangle ,—), TvDAAO M5 (\blacktriangledown ,—), TvDAAO M6 (\blacktriangleright ,—), TvDAAO M7 (\blacktriangleleft ,—), TvDAAO M8 (\blacklozenge ,—), TvDAAO M9 (\blacktriangledown ,—) и TvDAAO дикого типа (\blacksquare ,—). Экспериментальные данные аппроксимированы биэкспоненциальными функциями. Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0, температура инкубации 60 °С.

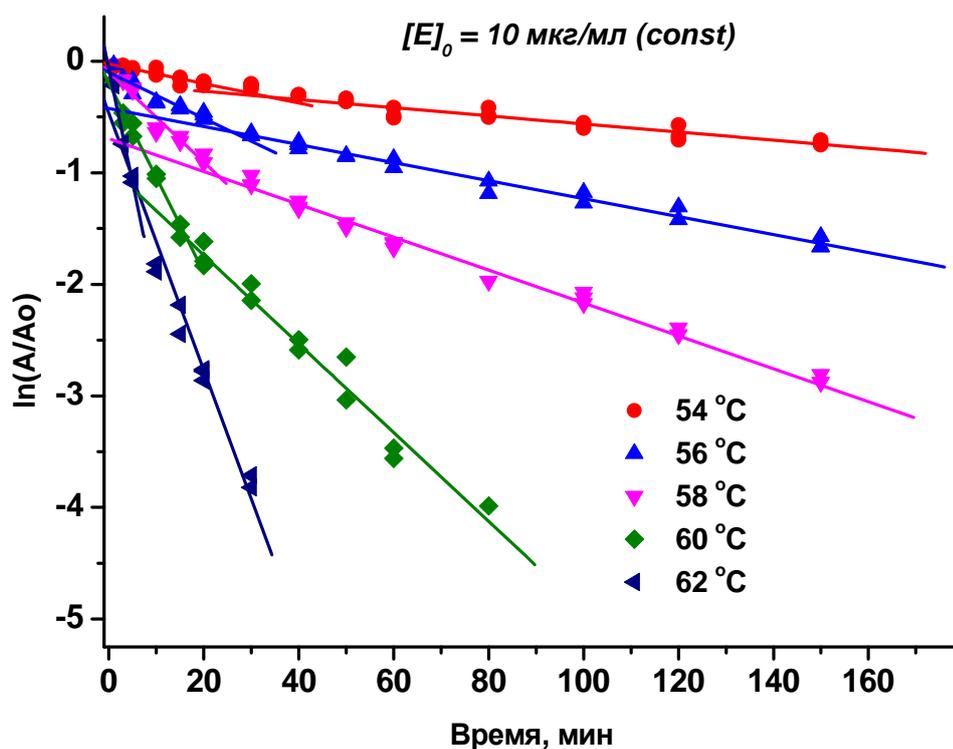


Рис. 4.64. Зависимости остаточной активности от времени мутантной TvDAAO M1 в полулогарифмических координатах при различных температурах. Концентрация фермента 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0, температура 54 °C (●,—), 56 °C (▲,—), 58 °C (▼,—), 60 °C (◆,—) и 62 °C (◄,—).

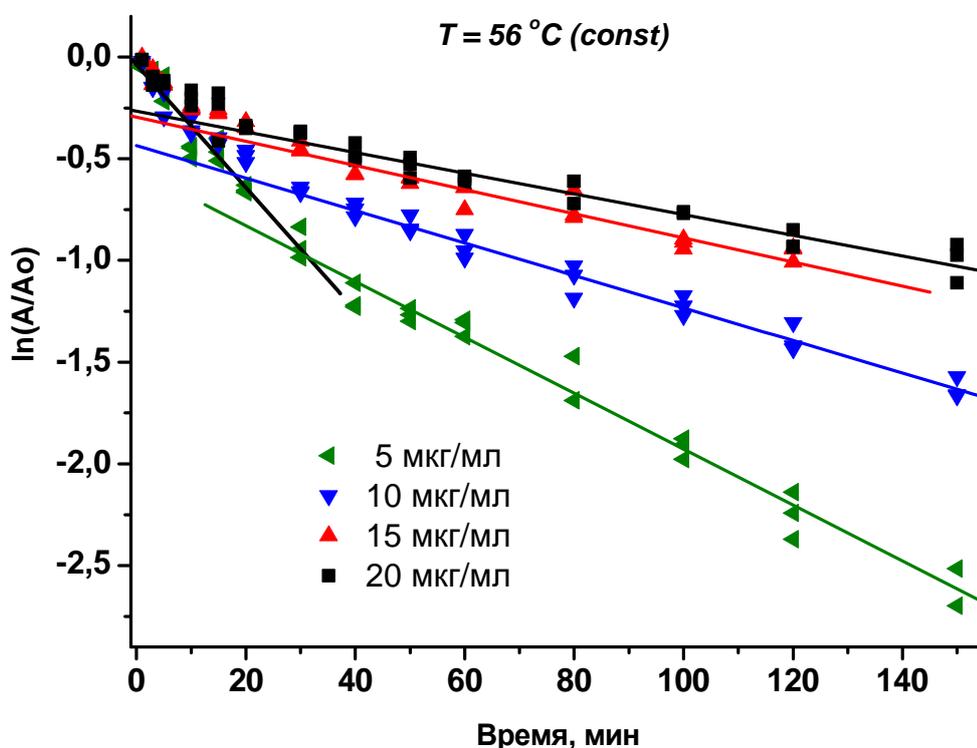


Рис. 4.65. Зависимости остаточной активности от времени мутантной TvDAAO M1 в полулогарифмических координатах при различных начальных концентрациях фермента. Температура 56 °C, 0,1 М КФБ, рН 8,0, концентрации фермента – 5 мкг/мл (◄,—), 10 мкг/мл (▼,—), 15 мкг/мл (▲,—) и 20 мкг/мл (■,—).

Для подробного сравнения стабильности мутантных TvDAAO и количественной оценки аддитивности влияния точечных замен на стабильность фермента, исходя из экспериментальных данных (рис. 4.62-64), были рассчитаны значения констант скорости первой и второй стадии инактивации, а также периоды полуинактивации для всех мутантных TvDAAO (табл. 4.34, 4.35).

Анализ полученных данных показал, что многоточечные мутанты, как и их точечные предшественники стабильнее фермента дикого типа. По каждой отдельной группе многоточечных мутантных TvDAAO можно отметить следующие моменты:

TvDAAO M1-M4: Из таблицы 4.34 видно, что для мутантных TvDAAO M1-M4 значения констант скорости термоинактивации как на первой, так и на второй стадиях понизились по сравнению со своими точечными предшественниками (табл.4.34, для F54S см. табл.4.18, для F54Y см. [57]). Для всех мутантов температурный диапазон по сравнению с таковым для TvDAAO дикого типа сдвинулся на два градуса в сторону более высоких температур (с 50-60°C на 52-62°C). Между собой ферменты имеют близкую стабильность, однако наибольший стабилизационный эффект наблюдается в случае тройного мутанта TvDAAO M1 (табл.4.34, 4.35). Стоит отметить, что для точечного мутанта TvDAAO C108F эффект стабилизации связан в первую очередь с уменьшением констант скорости первой стадии инактивации, в то время как для TvDAAO E32R/F33D наблюдается снижение констант скоростей обеих стадий инактивации. При объединении этих двух замен в TvDAAO M1 наблюдается аддитивность этих эффектов.

Оценку эффекта аддитивности проводили аналогично тому, как описано в главе 4.2 (пункт 4.2.4). При 56°C для обоих мутантов TvDAAO E32R/F33D и мутанта TvDAAO C108F константа скорости инактивации на первой стадии упала в 2,2 раза (на 54%) в сравнении с таковой для фермента дикого типа, а при объединении этих замен в мутант TvDAAO M1 константа скорости падает в 4 раза (на 75%). На второй стадии для TvDAAO E32R/F33D значение k_2 понизилось в 3,3 раза (на 70%), для TvDAAO C108F снизилось в 1,4 раза (почти на 28%), а для

TvDAAO M1 упало в 3,6 раза (на 73%). Данные расчетов, представленные в таблице 4.36, говорят о том, что при объединении замен E32R/F33D и C108F в многоточечный мутант, на первой и второй стадиях термоинактивации аддитивность влияния двух мутаций составляет около 80-82% (k_1 упала в 4 раза, а теоретически должна была снизиться в $2,2 \times 2,2 = 4,8$ раза; k_2 упала в 3,6 раза, а теоретически должна была снизиться в $3,3 \times 1,4 = 4,6$ раза). Поскольку температурные зависимости констант скоростей обеих стадий инактивации для всех мутантных TvDAAO и фермента дикого типа отличаются друг от друга, то эффект аддитивности может отличаться при различных температурах. Однако в целом экспериментальные данные подтверждают изначальное предположение о том, что эффекты от пространственно-удаленных замен в структуре фермента суммируются между собой. При переходе от мутанта TvDAAO M1 к мутантам TvDAAO M2-M4 за счет введения дополнительных замен F54A, F54S, F54Y в активный центр фермента наблюдается снижение температурной стабильности относительно TvDAAO M1. Данный факт также указывает на сложение эффектов от точечных замен, поскольку TvDAAO F54S и TvDAAO F54Y обладали более низкой температурной стабильностью, чем фермент дикого типа. Интересным является то, что замена F54A приводила к сильной дестабилизации белковой глобулы и мутантная TvDAAO F54A полностью инактивировалась в процессе выделения из клеток [57]. Однако при комбинации этой замены с заменами E32R/F33D и C108F, многоточечный TvDAAO M2 оказывается стабильнее фермента дикого типа. Также стоит отметить, что в целом многоточечные TvDAAO M2-M4 с заменами в активном центре обладают очень близкой температурной стабильностью между собой, а также со своими точечными предшественниками (табл. 4.34 и 4.35).

Таблица 4.34.

Кинетические параметры диссоциативной термоинактивации мутантных TvDAAO и фермента дикого типа (концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0)*.

Форма TvDAAO	Параметр	Температура, °C								
		48	50	52	54	56	58	60	62	64
Дикий тип	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-**	0,19	1,27	1,34	6,0	9,3	14,6	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	2,86	3,67	9,2	11,6	21,5	41	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	2,28	3,13	5,6	7,1	10,8	19,4	-	-
E32R/F33D	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	0,41	0,94	1,10	2,15	5,47	15,2	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	2,03	3,03	4,17	5,3	7,8	13,1	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,14	1,50	1,83	2,15	3,22	5,8	-	-
M104F	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	1,10	1,36	1,97	3,16	3,86	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,53	2,17	3,40	6,4	10,0	20,0
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,07	1,76	2,31	4,57	9,2	19,3
S105A	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	0,74	1,29	1,43	6,2	11,5	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	2,43	3,37	5,4	12,6	21,9	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	2,48	3,44	5,8	7,2	9,7	-	-
C108F	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	0,38	0,34	0,48	0,53	0,64	0,80	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	1,33	1,55	4,23	5,3	9,8	18,0	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	2,10	2,66	3,50	5,1	12,2	20,0	-	-
M1	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	0,90	1,16	2,54	8,3	15,1	20,6	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	0,88	1,09	2,92	5,9	10,2	27,3	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	0,97	1,04	1,95	2,68	5,2	10,8	-
M2	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	0,33	0,85	0,94	3,5	4,6	-	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	1,52	2,58	3,4	5,9	8,3	-	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	1,33	2,48	4,8	5,1	10,0	-	-
M3	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	0,39	0,89	1,90	4,13	5,0	12,0	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	0,88	1,88	3,85	9,8	14,6	34	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	1,28	2,33	3,14	7,0	12,6	20,6	-
M4	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	0,33	0,76	2,55	7,1	12,5	37	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	2,00	3,12	5,1	7,1	14,6	22,2	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	1,37	2,08	2,64	3,76	7,9	18,0	-
M5	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	0,73	1,70	4,80	10,4	15,1	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	2,47	4,83	10,2	13,7	29,3	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,96	2,91	5,5	6,9	18,1	-
M6	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	0,69	1,13	3,21	6,7	33	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	2,37	3,87	6,0	11,7	16,3	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,67	2,50	3,28	5,0	8,7	-
M7	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	0,83	1,28	4,20	4,37	12,9	-
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,30	2,65	5,8	11,6	27,1	-
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	1,48	2,76	3,18	7,7	16,0	-
M8	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	-	0,52	0,63	2,02	3,04	10,8
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	1,80	3,07	5,5	8,1	13,0
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	1,23	2,17	2,91	5,1	7,5
M9	$K_{dis} \cdot 10^7, M$	-	-	-	-	0,83	1,56	3,16	5,6	9,5
	$k_1 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	2,20	5,4	9,0	21,6	46
	$k_2 \cdot 10^4, c^{-1}$	-	-	-	-	1,42	2,44	5,07	11,5	36

*Ошибка эксперимента составляла не более 15%, **параметр не определяли из-за очень малого или очень большого значения констант, ***уменьшение параметров термоинактивации мутантных TvDAAO по сравнению с ферментом дикого типа выделено полужирным шрифтом и зеленым фоном.

Таблица 4.35.

Периоды полуинактивации мутантных TvDAAO и фермента дикого типа (концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0)*.

Форма TvDAAO	$\tau_{1/2}$, мин.; температура, °С								
	48	50	52	54	56	58	60	62	64
Дикий тип	-	73	47	23	7,2	4,7	2,7	-	-
E32R/F33D	-	<i>300**</i>	<i>135</i>	102***	39	<i>17</i>	<i>7,5</i>	-	-
M104F	-	-	-	107	82	37	14,0	8,1	4,7
S105A	-	-	74	35	20	4,2	3,1	-	-
C108F	-	138	<i>95</i>	77	<i>27</i>	14,8	6,1	-	-
M1	-	-	-	150	42	19,2	8,9	3,1	-
M2	-	-	-	84	31	13,2	9,0	-	-
M3	-	-	-	79	33	9,5	5,6	2,8	-
M4	-	-	-	89	20,5	13,3	6,5	3,5	-
M5	-	-	-	90	25	7,7	5,8	2,2	-
M6	-	-	-	115	53	16,6	8,1	4,0	-
M7	-	-	-	124	49	17,1	8,2	2,9	-
M8	-	-	-	-	187	101	28	11,7	5,1
M9	-	-	-	-	111	36	10	4,5	2,1

* – ошибка эксперимента составляла не более 15%

** – италикотом отмечены периоды полуинактивации ($\tau_{1/2}$) оцененные из данных по термоинактивации при концентрации фермента не равной 10 мкг/мл

***– увеличение периодов полуинактивации мутантных TvDAAO по сравнению с ферментом дикого типа выделено полужирным шрифтом и зеленым фоном. Более темный фон соответствует большему эффекту.

TvDAAO M5-M7 были получены для изучения влияния одновременного введения нескольких замен в соединительную петлю 95-120. В основу всех мутантов была положена замена E32R/F33D, поскольку ее эффект стабилизации аддитивен с эффектом от замены C108F в активном центре. Все три мутанта TvDAAO M5-M7 стабильнее, чем фермент дикого типа, при этом среди трех мутантов TvDAAO M5 является наименее стабильным ферментом, а TvDAAO M6 и TvDAAO M7 по стабильности близки между собой (табл. 4.34 и 4.35). Стоит отметить, что все три мутанта TvDAAO M5-M7 по своей температурной

стабильности превосходят предшественников TvDAAO S105A и TvDAAO C108F, однако близки к TvDAAO E32R/F33D, и менее стабильны, чем TvDAAO M104F. Эффект аддитивности объединения точечных замен был проверен при 56°C на основе данных таблицы 4.34. Результаты представлены в таблице 4.36. В случае точечных замен и их объединения в многоточечные мутанты наблюдаются следующие эффекты стабилизации ($\alpha^{\text{прак}}$) на каждой стадии процесса термоинактивации относительно фермента дикого типа:

E32R/F33D – k_1 упала в 2,2 раза (на 54%), k_2 упала в 3,3 раза (на 70%)

F54S – k_1 и k_2 немного возросли ($\alpha^{\text{прак}}=0,95$ и $0,92$ соответственно)

F54Y – k_1 и k_2 упали примерно в 1,2 раза (на 16,5%)

M104F – k_1 упала в 5,3 раза (на 81%), k_2 упала в 4 раза (на 75%)

S105A – k_1 упала в 2,1 раза (на 53%), k_2 упала в 1,2 раза (на 18%)

C108F – k_1 упала в 2,2 раза (на 54%), k_2 упала в 1,4 раза (на 28%)

M5 (E32R/F33D/M104F/C108F) – k_1 упала в 2,4 раза (на 58%), k_2 упала в 2,4 раза (на 58%)

M6 (E32R/F33D/S105A/C108F) – k_1 упала в 3 раза (на 67%), k_2 упала в 2,8 раза (на 65%)

M7 (E32R/F33D/M104F/S105A/C108F) – k_1 упала в 4,4 раза (на 77%), k_2 упала в 2,6 раза (на 61%)

Теоретические значения эффекта стабилизации ($\alpha^{\text{теор}}$) для многоточечных мутантов исходя из уменьшения констант скоростей для точечных следующие:

M5 (E32R/F33D/M104F/C108F) – k_1 : $2,2 \times 5,3 \times 2,2 = 26$ раз (на 96%), k_2 : $3,3 \times 4 \times 1,4 = 18,5$ раза (на 94,5%)

M6 (E32R/F33D/S105A/C108F) – k_1 : $2,2 \times 2,1 \times 2,2 = 10,2$ раза (на 90%), k_2 : $3,3 \times 1,2 \times 1,4 = 5,5$ раза (на 82%)

M7 (E32R/F33D/M104F/S105A/C108F) – k_1 : $2,2 \times 5,3 \times 2,1 \times 2,2 = 55$ раза (на 98%), k_2 : $3,3 \times 4 \times 1,2 \times 1,4 = 23$ раза (на 95,5%)

Таким образом, как следует из рассчитанных эффектов стабилизации $\alpha^{\text{прак}}$ и $\alpha^{\text{теор}}$, аддитивность $((\alpha^{\text{прак}}/\alpha^{\text{теор}}) \times 100, \%)$ при объединении точечных замен в многоточечные в каждом случае следующая (табл. 4.36):

E32R/F33D+M104F+C108F 1 стадия – 9,5%, 2 стадия – 13%

E32R/F33D+S105A+C108F 1 стадия – 29%, 2 стадия – 51%

E32R/F33D+M104F+S105A+C108F 1 стадия – 8,0%, 2 стадия – 11%

Полученные данные говорят о том, что при объединении трех замен M104F, S105A, C108F, которые располагаются в соединительной петле 95-120 с заменой E32R/F33D в кофермент-связывающем домене наблюдается очень низкая аддитивность. Например, при объединении E32R/F33D+M104F+S105A+C108F в TvDAAO M7 константа скорости второй стадии инактивации k_2 теоретически должна была уменьшиться в 23 раза, но снизилась всего лишь в 2,6 раза. Данный эффект, по-видимому, связан с взаимным влиянием замен M104F, S105A и C108F друг на друга, поскольку при объединении E32R/F33D и C108F наблюдается практически полная аддитивность эффектов стабилизации. Каждая из замен M104F, S105A, C108F в отдельности может приводить к гидрофобизации неупорядоченного участка с 95 по 120 остаток, заполнению полостей в области активного центра, усилению взаимодействия с соседними аминокислотными остатками и элементами вторичной структуры, экранированию активного центра от растворителя и т.д., однако одновременно все три замены не дают аддитивного положительного эффекта. Сильнее всего это проявляется при одновременном введении замен M104F и C108F (самая низкая аддитивность в случае мутантов M5 и M7) в структуру TvDAAO, т.е. двух остатков Phe в область активного центра фермента, что возможно нарушает правильное расположения этих остатков. Возможно в результате нарушается ориентация вводимого остатка Phe в 104 положение, который, как было показано в главе 4.2 взаимодействует с остатками Phe54 и Phe258, что в конечном счете не дает такого большого эффекта стабилизации, как в случае точечной замены M104F.

Все вышесказанное позволяет сделать вывод о том, что для достижения высокой аддитивности эффектов стабилизации необходимо проводить объединение

замены в FAD-связывающем домене E32R/F33D с одной из трех замен M104F, S105A, C108F в соединительной петле в районе активного центра. Для проверки данного предположения и получения мутантной TvDAAO с еще большей температурной стабильностью было выполнено объединение замен E32R/F33D и M104F (TvDAAO M8). Кроме того, было проведено объединение замен E32R/F33D, F54S, M104F (TvDAAO M8), поскольку, как было показано ранее в главе 4.2, введение замены F54S в дополнение к замене M104F не приводит к сильному снижению температурной стабильности TvDAAO.

TvDAAO M8-M9 по своей температурной стабильности значительно превосходят фермент дикого типа, а также все свои однотоочечные предшественники (рис. 4.63, табл. 4.34 и 4.35). На основе рассчитанных констант скоростей инактивации был рассчитан эффект аддитивности объединения точечных замен при 56°C. Наблюдаемые эффекты стабилизации ($\alpha^{\text{прак}}$) следующие:

M8 (E32R/F33D/M104F) – k_1 упала в 6,4 раза (на 84%), k_2 упала в 5,8 раза (на 83%)

M9 (E32R/F33D/F54S/M104F) – k_1 упала в 5,3 раза (на 81%), k_2 упала в 5 раз (на 80%)

Теоретические значения эффекта стабилизации ($\alpha^{\text{теор}}$) для многотоочечных мутантов исходя из уменьшения констант скоростей для точечных замен следующие:

M8 (E32R/F33D/M104F) – k_1 : $2,2 \times 5,3 = 11,7$ раза (на 91,5%), k_2 : $3,3 \times 4,0 = 13,2$ раза (на 92,4%)

M9 (E32R/F33D/F54S/M104F) – k_1 : $2,2 \times 0,95 \times 5,3 = 11,1$ раза (на 90%), k_2 : $3,3 \times 0,92 \times 4,0 = 12,3$ раза (на 82%)

Таким образом аддитивность при объединении точечных замен в многотоочечные в каждом случае следующая (табл. 4.36):

E32R/F33D+M104F 1 стадия – 55%, 2 стадия – 43%

E32R/F33D+F54SF+M104F 1 стадия – 47%, 2 стадия – 41%

Стоит отметить, что полученные значения аддитивности для мутантов M8-M9 несколько ниже, чем для TvDAAO M1. Однако при объединении замен E32R/F33D

и M104F в многоточечный мутант наблюдается дополнительная стабилизация относительно соответствующих одноточечных мутантов. Таким образом, полученные мутанты M8 и M9 оказываются намного стабильнее, чем фермент дикого типа. Например, при 60°C период полуинактивации TvDAAO M8 составляет 28 минут, для TvDAAO M104F – 14 минут, а для фермента дикого типа 2,7 минуты (табл. 4.35). Если фермент дикого типа при этих условиях полностью инактивируется за 20 минут, то TvDAAO M8 через 150 минут инкубации сохраняет около 20% активности (рис. 4.63) Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что мутантная TvDAAO M8 на данный момент является самой термостабильной из мутантных и природных оксидаз D-аминокислот, описанных в литературе.

Таблица 4.36.

Расчет параметров $\alpha^{эксп}$, $\alpha^{теор}$ и аддитивности для мутантных TvDAAO при 56°C.

Форма TvDAAO	1 стадия				2 стадия			
	k_1	$\alpha^{эксп}$	$\alpha^{теор}$	%	k_2	$\alpha^{эксп}$	$\alpha^{теор}$	%
Дикий тип	11,6	1	-	-	7,1	1	-	-
TvDAAO E32R/F33D	5,3	2,2	-	-	2,15	3,3	-	-
TvDAAO F54S	12,2	0,95	-	-	7,7	0,92	-	-
TvDAAO F54Y	10,0	1,2	-	-	6,0	1,2	-	-
TvDAAO M104F	2,17	5,3	-	-	1,76	4,0	-	-
TvDAAO S105A	5,4	2,1	-	-	5,8	1,2	-	-
TvDAAO C108F	5,3	2,2	-	-	5,1	1,4	-	-
TvDAAO M1	2,92	4,0	4,8	83	1,95	3,6	4,6	79
TvDAAO M2	3,38	3,4	-	-	4,77	1,5	-	-
TvDAAO M3	3,85	3,0	4,6	66	3,14	2,3	4,2	53
TvDAAO M4	5,1	2,3	5,6	41	2,64	2,7	5,4	50
TvDAAO M5	4,83	2,4	26	9,4	2,91	2,4	19	13
TvDAAO M6	3,87	3,0	10	29	2,50	2,8	6	51
TvDAAO M7	2,65	4,4	55	8,0	2,76	2,6	23	11,3
TvDAAO M8	1,80	6,4	11,7	55	1,23	5,8	13,3	43
TvDAAO M9	2,20	5,3	11,1	47	1,42	5,0	12,3	41

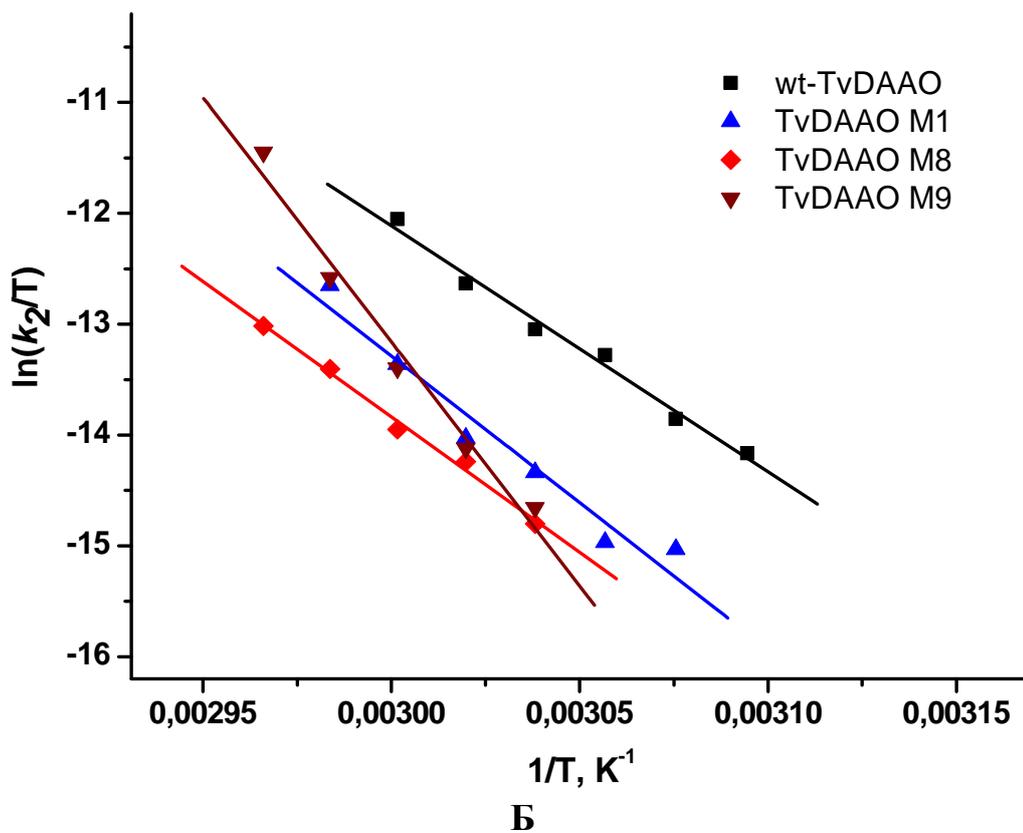
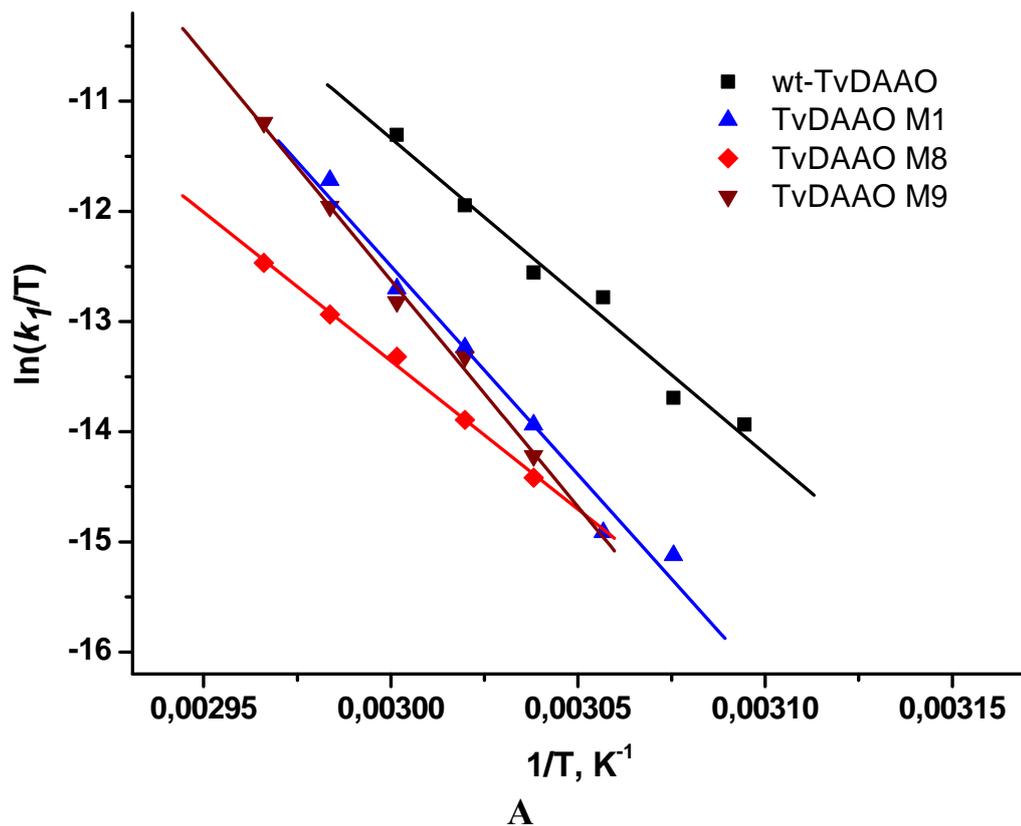


Рис. 4.66. Температурные зависимости констант скорости первой (k_1/T от $1/T$, А) и второй (k_2/T от $1/T$, Б) стадий термоинактивации для мутантных TvDAAO M1 ($\blacktriangle, -$), TvDAAO M8 ($\blacklozenge, -$), TvDAAO M9 ($\blacktriangledown, -$) и TvDAAO дикого типа ($\blacksquare, -$). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0.

Для наиболее стабильных мутантов TvDAAO M1, TvDAAO M8 и TvDAAO M9 были проанализированы температурные зависимости констант скоростей первой и второй стадий термоинактивации в обратных полулогарифмических координатах ТАК (рис. 4.66). Из данных зависимостей хорошо видно, что все три мутанта намного стабильнее TvDAAO дикого типа и наибольшей температурной стабильностью обладает TvDAAO M8 во всем изученном температурном диапазоне. На первой и второй стадии процесса термоинактивации наклоны температурных зависимостей констант скорости для TvDAAO M1 и TvDAAO M8 близки к соответствующим зависимостям для фермента дикого типа. Это говорит о том, что эффект стабилизации практически не меняется с температурой для TvDAAO M1 и TvDAAO M8. Однако стоит отметить, что k_1 в случае TvDAAO M1 несколько быстрее падает с температурой, чем для TvDAAO дикого типа, то есть эффект стабилизации на первой стадии немного растет с понижением температуры. На общем фоне выделяется мутантная TvDAAO M9, поскольку константы скорости на обеих стадиях процесса термоинактивации быстрее растут с температурой, чем для остальных ферментов, причем для второй стадии данный эффект наиболее значительный. Таким образом, эффект стабилизации увеличивается с понижением температуры и TvDAAO M9 по своей стабильности становится сравним с TvDAAO M8 при температурах ниже 54°C на обеих стадиях термоинактивации.

Таким образом, в результате изучения оксидазы D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis* с помощью метода рационального белкового дизайна было получено 40 мутантных форм этого фермента. Данное исследование представляет собой совокупность двух направлений, одно из которых заключается в изучении структурно-функциональных взаимосвязей TvDAAO, чему были посвящены первые две главы данной работы. Целью таких исследований, как правило, является не направленное изменение или оптимизация свойств природного фермента, а поиск и изучение структурных особенностей, изучение влияния вводимых изменений в структуру фермента на его свойства, что представляет собой фундаментальный интерес и ведет к более глубокому пониманию строения и механизма действия

различных ферментов. Однако подобные исследования часто приводят к самым неожиданным результатам. Другое направление, которому была посвящена вторая половина данной работы, имеет сугубо прикладной характер и заключается в получении мутантных форм TvDAAO с заданными свойствами. Стоит отметить, что изучая какую-либо структурную особенность или отдельный аминокислотный остаток, его роль в структуре и свойствах TvDAAO, мы неизбежно получаем мутантные формы фермента с измененными свойствами. С другой стороны, задача получения фермента с заданными свойствами, например, повышенной температурной стабильностью или увеличенной каталитической активностью с определенным субстратом, так или иначе сводится к подробному анализу структуры TvDAAO с целью поиска перспективных положений, замены в которых могут привести к желаемому результату. Другими словами, изменения в структуре белка ведут к изменениям в его свойствах, а стремление получить желаемое свойство ведет к изменениям в структуре. Таким образом, фундаментальное и прикладное направления исследования оказываются тесно связанными между собой, что было наглядно продемонстрировано в данной работе. Так в результате изучения взаимосвязи структуры и функции TvDAAO была получена мутантная форма фермента с заменой M104F, которая обладала значительно повышенной термостабильностью. В рамках работы по оптимизации кофермент-связывающего домена с целью усиления связывания FAD была получена мутантная TvDAAO E32R/F33D с увеличенной термостабильностью и каталитической активностью со многими субстратами. В результате TvDAAO E32R/F33D была положена в основу для дальнейшего получения мутантных форм TvDAAO с улучшенными свойствами, вместо фермента дикого типа, поскольку в практике белковой инженерии такая задача, как правило, решается путем объединения нескольких успешных точечных замен, каждая из которых в отдельности может иметь умеренное влияние на активность и стабильность фермента, в то время как многоточечные мутанты могут обладать значительно улучшенными свойствами по сравнению с ферментом дикого типа. Заключительная глава посвящалась объединению наиболее успешных точечных аминокислотных замен, которые были

получены в рамках данной работы, а также другими исследователями в нашей лаборатории. В результате были получены термостабильные мутантные TvDAAO M1-M4, обладающие узким спектром субстратной специфичности и повышенной каталитической активностью с ароматическими D-аминокислотами, что может быть использовано для селективного определения D-Phe и D-Tyr, а также для их окисления в тонком органическом синтезе. Наиболее выдающиеся результаты были достигнуты в повышении температурной стабильности TvDAAO. Объединение замен E32R/F33D и M104F, которые были изучены в данной работе, привело к увеличению температурной стабильности TvDAAO более, чем в 10 раз. Мутантная форма TvDAAO E32R/F33D/M104F на данный момент является самой термостабильной оксидазой D-аминокислот, как среди природных ферментов, так и среди ранее полученных мутантов. Комбинация замен E32R/F33D и M104F с дополнительной заменой F54S в активном центре фермента, которая определяет спектр субстратной специфичности всех многоточечных мутантов, привела также к получению термостабильной TvDAAO. Многоточечные мутантные TvDAAO, полученные в данной работе, могут быть весьма перспективными для применения в качестве биокатализаторов в процессах органического синтеза с использованием оксидаз D-аминокислот. Однако в ближайшей перспективе необходимо провести изучение каталитических свойств многоточечных мутантов с наиболее важным биотехнологическим субстратом цефалоспорином C. Кроме того, необходимо изучить влияние термообработки бесклеточных экстрактов после разрушения клеток на стабильность и каталитическую активность многоточечных TvDAAO при различных температурах. Данные эксперименты позволят подобрать оптимальную температуру и ввести дополнительную стадию термообработки при выделении, что может привести к существенному упрощению очистки TvDAAO и повышению выхода активного фермента. В заключении хочется отметить, что данная работа продемонстрировала, что рациональный дизайн является мощным методом как для изучения структурно-функциональных взаимосвязей в белках, так и для получения мутантных форм ферментов с улучшенными и оптимизированными свойствами для целей биотехнологии.

V. ВЫВОДЫ

1. Проведено систематическое исследование взаимосвязи структуры и функции оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* с помощью метода рационального белкового дизайна. В ходе работы было получено 40 мутантных фермента с аминокислотными заменами в области активного центра и FAD-связывающего домена TvDAAO.
2. Изучена роль соединительной петли 95-120 и остатка Met104, который расположен на входе в активный центр TvDAAO. Показано, что данный структурный элемент и остаток Met104 играют исключительно важную роль в каталитических свойствах и температурной стабильности TvDAAO. Введение 10 различных замен в данное положение привело к изменению спектра субстратной специфичности фермента. Введение ароматических аминокислот в данное положение привело к значительной стабилизации TvDAAO.
3. Изучены взаимодействия между остатками Phe54, Met (Phe, Tyr, Trp)104 и Phe258 за счет получения 7 двойных мутантов в 54/104 и 104/258 положениях. Показано, что профили субстратной специфичности двойных мутантов, главным образом, определяются заменами F54S и F258S. Значительный эффект стабилизации в случае замен M104F, M104Y и M104W, по-видимому, обусловлен ароматическими π - π взаимодействиями с остатками Phe54 и Phe258.
4. Проведена оптимизация структуры FAD-связывающего домена за счет получения 13 аминокислотных замен в 9, 12, 32 и 33 положениях. Получена мутантная TvDAAO E32R/F33D с улучшенными каталитическими свойствами, повышенной температурной стабильностью и усиленным связыванием FAD. Мутантная TvDAAO E32R/F33D была взята за основу для дальнейшего получения мутантных форм TvDAAO с улучшенными свойствами вместо фермента дикого типа.
5. Проведено объединение наиболее успешных точечных замен в 32/33, 54, 104, 105 и 108 положениях в 9 многоточечных мутантных TvDAAO. Получены TvDAAO M1-M4 с повышенной каталитической активностью с

ароматическими D-аминокислотами и более узким спектром субстратной специфичности, которые повторяют соответствующие профили своих предшественников с заменами в 54 и 108 положениях. Все мутантные TvDAAO обладают повышенной температурной стабильностью.

6. Показано, что одновременное объединение замен M104F, S105A и C108F в многоточечные мутанты не приводит к аддитивному эффекту стабилизации.
7. Объединение замены E32R/F33D в FAD-связывающем домене с заменами M104F или C108F в области активного центра сопровождается высокой аддитивностью и приводит к значительному повышению температурной стабильности TvDAAO.
8. Получена супер-термостабильная TvDAAO M8 с повышенной температурной стабильностью относительно фермента дикого типа в более, чем 10 раз.

VI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tishkov V.I., Khoronenkova S.V. D-Amino acid oxidase: structure, catalytic mechanism, and practical application. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70, № 1. P. 40–54.
2. Pollegioni L., Sacchi S., Caldinelli L., Boselli A., Pilone S., Piubelli L., Molla G. Engineering the properties of D-amino acid oxidases by a rational and a directed evolution approach. // *Current protein & peptide science*, 2007. Vol. 8, № 6. P. 600–618.
3. Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone S. Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases: current state and perspectives. // *Applied microbiology and biotechnology*, 2008. Vol. 78, № 1. P. 1–16.
4. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. D-amino acid oxidase: physiological role and applications. // *Biochemistry (Moscow)*, 2008. Vol. 73, № 13. P. 1511–1518.
5. Krebs H.A. Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids. // *The Biochemical Journal*. 1935. Vol. 29, № 7. P. 1620–1644.
6. Pilone M.S. D-Amino acid oxidase: new findings. // *Cellular and molecular life sciences*. 2000. Vol. 57, № 12. P. 1732–1747.
7. Pollegioni L., Piubelli L., Sacchi S., Pilone S., Molla G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. // *Cellular and molecular life sciences*. 2007. Vol. 64, № 11. P. 1373–1394.
8. 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*. 1987. Vol. 914. P. 136–142.
9. Kubicek-Pranz E.M., Röhr M. D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*. // *Journal of applied biochemistry*. 1985. Vol. 7, № 2. P. 104–113.
10. Momoi K., Fukui K., Watanabe F., Miyake Y. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human kidney D-amino acid oxidase. // *FEBS Letters*. 1988. Vol. 238, № 1. P. 180–184.
11. Molla G., Sacchi S., Bernasconi M., Pilone S., Fukui K., Pollegioni L. Characterization of human D-amino acid oxidase. // *FEBS Letters*. 2006. Vol. 580, № 9. P. 2358–2364.
12. Maezawa T., Tanaka H., Nakagawa H., Ono M., Aoki M., Matsumoto M., Ishida T., Horiike K., Kobayashi K. Planarian D-amino acid oxidase is involved in ovarian development during sexual induction. // *Mechanisms of development*. 2014. Vol. 132. P. 69–78.
13. Xin Y.-F., Zhou X.-J., Cheng X., Wang Y. -X. Renal D-amino acid oxidase mediates chiral inversion of N(G)-nitro-D-arginine. // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2005. Vol. 312. P. 1090–1096.

14. Huang J.-L., Huang J.-L., Chen X.-L., Guo C., Wang Y.-X. Contributions of spinal D-amino acid oxidase to bone cancer pain. // *Amino Acids*. 2012. Vol. 43, № 5. P. 1905–1918.
15. Sasabe J., Suzuki M., Imanishi N., Aiso S. Activity of D-amino acid oxidase is widespread in the human central nervous system. // *Front. Synaptic Neurosci.* 2014. Vol. 6. P. 14.
16. Chumakov I., Blumenfeld M., Guerassimenko O. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99, № 21. P. 13675–13680.
17. Nishikawa T. Metabolism and functional roles of endogenous D-serine in mammalian brains. // *Biol. Pharm. Bull.* 2005. Vol. 28. P. 1561–1565.
18. Corvin A., Donohoe G., McGhee K.. d-Amino acid oxidase (DAO) genotype and mood symptomatology in schizophrenia // *Neurosci. Lett.* 2007. Vol. 426. P. 97–100.
19. Paul P., de Belleruche J. The role of D-amino acids in amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a review. // *Amino Acids*. 2012. Vol. 43, № 5. P. 1823–1831.
20. Betts J.F., Schweimer J.V., Burnham K.E., Burnet P.W.J., Sharp T., Harrison P.J. D-amino acid oxidase is expressed in the ventral tegmental area and modulates cortical dopamine. // *Front. Synaptic Neurosci.* 2014. Vol. 6. P. 11.
21. Meldrum B.S., Akbar M.T., Chapman A.G. Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy // *Epilepsy Res.* 1999. Vol. 36. P. 189–204.
22. Katsuki H., Nonaka M., Shirakawa H., Kume T., Akaike A. Endogenous D-serine is involved in induction of neuronal death by N-methyl-D-aspartate and simulated ischemia in rat cerebrocortical slices. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2004. Vol. 311. P. 836–844.
23. Fisher G., Lorenzo N., Abe H. Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects. // *Amino Acids*. 1998. Vol. 15. P. 263–269.
24. Furuchi T., Homma H. Free D-aspartate in mammals. // *Biol. Pharm. Bull.* 2005. Vol. 28, № 9. P. 1566–1570.
25. D’Aniello A., D’Onofrio G., Pischetola M. Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase. Effects of D-amino acids. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268. P. 26941–26949.
26. Sacchi S., Rosini E., Caldinelli L., Pollegioni L.. Biosensors for D-amino acid detection. // *Methods Mol. Biol.* 2012. Vol. 794. P. 313–324.
27. Wierenga R.K., Drenth J., Schulz G.E. Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of p-hydroxybenzoate

- hydroxylase with the FAD- as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase. // *J. Mol. Biol.* 1983. Vol. 167, № 3. P. 725–739.
28. Kleiger G., Eisenberg D. GXXXG and GXXXA Motifs Stabilize FAD and NAD(P)-binding Rossmann Folds Through C α -H O Hydrogen Bonds and van der Waals Interactions // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 323, № 1. P. 69–76.
 29. Rossman M.G., Liljas A., Brändén C.-I., Banaszak L.J. Evolutionary and Structural Relationships among Dehydrogenases. 11th ed. Academic Press, New York, 1975. P. 61–102.
 30. Subramani S. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. // *Annu. Rev. Cell Biol.* 1993. Vol. 9. P. 445–478.
 31. Mizutani H., Miyahara I., Hirotsu K., . Three-dimensional structure of porcine kidney D-amino acid oxidase at 3.0 Å resolution. // *J. Biochem.* 1996. Vol. 120. P. 14–17.
 32. Mattevi A., Vanoni M.A., Todone F. Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996. Vol. 93. P. 7496–7501.
 33. Umhau S., Pollegioni L., Molla G. The x-ray structure of D-amino acid oxidase at very high resolution identifies the chemical mechanism of flavin-dependent substrate dehydrogenation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 97, № 23. P. 12463–12468.
 34. Kawazoe T., Tsuge H., Piloni 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 Sci.* 2006. Vol. 15. P. 2708–2717.
 35. Dib I., Slavica A., Riethorst W., Nidetzky B. Thermal inactivation of D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* occurs via three parallel paths of irreversible denaturation. // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. Vol. 94, № 4. P. 645–654.
 36. Arroyo M., Menéndez M., García J.L. The role of cofactor binding in tryptophan accessibility and conformational stability of His-tagged D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. Vol. 1774, № 5. P. 556–565.
 37. Miura R., Setoyama C., Nishina Y. Structural and mechanistic studies on D-amino acid oxidase x substrate complex: implications of the crystal structure of enzyme x substrate analog complex. // *J. Biochem.* 1997. Vol. 122. P. 825–833.
 38. Todone F., Vanoni M.A., Mozzarelli A. Active site plasticity in D-amino acid oxidase: a crystallographic analysis. // *Biochemistry.* 1997. Vol. 36. P. 5853–5860.
 39. Mizutani H., Miyahara I., Hirotsu K. Three-Dimensional Kidney - Reaction through Structure of the Purple Intermediate of Porcine Acid Oxidase . Optimization Alignment of the Product of the Oxidative Half with Reduced // *J. Biochem.* 2000. Vol. 128. P. 73–81.

40. 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. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2014. Vol. 53, № 17. P. 4428–4431.
41. 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 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 355. P. 385–391.
42. Sparey T., Abeywickrema P., Almond S. The discovery of fused pyrrole carboxylic acids as novel, potent d-amino acid oxidase (DAO) inhibitors // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2008. Vol. 18. P. 3386–3391.
43. Duplantier A.J., Becker S.L., Bohanon M.J.. Discovery, SAR, and pharmacokinetics of a novel 3-hydroxyquinolin-2(1H)-one series of potent D-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors. // *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52, № 11. P. 3576–3585.
44. Hopkins S.C., Heffernan M.L.R., Saraswat L.D.. Structural, kinetic, and pharmacodynamic mechanisms of D-amino acid oxidase inhibition by small molecules. // *J. Med. Chem.* 2013. Vol. 56, № 9. P. 3710–3724.
45. Hondo T., Warizaya M., Niimi T. 4-Hydroxypyridazin-3(2H)-one derivatives as novel D-amino acid oxidase inhibitors. // *J. Med. Chem.* 2013. Vol. 56, № 9. P. 3582–3592.
46. Terry-lorenzo R.T., Chun L.E., Scott P. Novel human D -amino acid oxidase inhibitors stabilize an active-site lid-open conformation *Bioscience Reports.* 2014.
47. Pollegioni L., Diederichs K., Molla G. Yeast d-Amino Acid Oxidase: Structural Basis of its Catalytic Properties // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 324, № 3. P. 535–546.
48. Piubelli L., Molla G., Caldinelli L., Pilone M.S., Pollegioni L. Dissection of the structural determinants involved in formation of the dimeric form of D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*: role of the size of the betaF5-betaF6 loop. // *Protein Eng.* 2003. Vol. 16, № 12. P. 1063–1069.
49. 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. Vol. 526, № 1-3. P. 43–48.
50. Pollegioni L., Iametti S., Fessas D. Contribution of the dimeric state to the thermal stability of the flavoprotein D-amino acid oxidase // *Protein Sci.* 2003. Vol. 12, № 5. P. 1018–1029.
51. Cherskova N., Khoronenkova S., Tishkov V. The role of residues Arg169 and Arg220 in intersubunit interactions of yeast D-amino acid oxidase // *Russ. Chem. Bull.* 2010. Vol. 59, № 1. P. 1–7.

52. Porter D.J., Voet J.G., Bright H.J. Mechanistic features of the D-amino acid oxidase reaction studied by double stopped flow spectrophotometry. // *J. Biol. Chem.* 1977. Vol. 252, № 13. P. 4464–4473.
53. Harris C.M., Pollegioni L., Ghisla S. pH and kinetic isotope effects in D -amino acid oxidase catalysis Evidence for a concerted mechanism in substrate dehydrogenation via hydride transfer. 2001. Vol. 5520. P. 5504–5520.
54. Sacchi S., Lorenzi S., Molla G., Pilone M.S., Rossetti C., Pollegioni L. Engineering the substrate specificity of D-amino-acid oxidase. // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 30. P. 27510–27516.
55. Caligiuri A., D'Arrigo P., Rosini E. Enzymatic Conversion of Unnatural Amino Acids by Yeast D-Amino Acid Oxidase // *Adv. Synth. Catal.* 2006. Vol. 348, № 15. P. 2183–2190.
56. 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. Vol. 77, № 10. P. 1181–1189.
57. Komarova N.V., Golubev I.V., Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. Mutant d-amino acid oxidase with higher catalytic efficiency toward d-amino acids with bulky side chains // *Russ. Chem. Bull.* 2013. Vol. 61, № 7. P. 1489–1496.
58. Pollegioni L., Molla G. New biotech applications from evolved D-amino acid oxidases. // *Trends Biotechnol. Elsevier Ltd*, 2011. Vol. 29, № 6. P. 276–283.
59. Pollegioni L., Motta P., Molla G. L-amino acid oxidase as biocatalyst: a dream too far? // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97, № 21. P. 9323–9341.
60. 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. // *FEBS J.* 2011. Vol. 278, № 3. P. 482–492.
61. Saam J., Rosini E., Molla G., Schulten K., Pollegioni L., Ghisla S. O₂ reactivity of flavoproteins: dynamic access of dioxygen to the active site and role of a H⁺ relay system in D-amino acid oxidase. // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 32. P. 24439–24446.
62. Pollegioni L., Butò S., Tischer W., Ghisla S., Pilone M.S.. Characterization of D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1993. Vol. 31. P. 709–717.
63. Pollegioni L., Ghisla S., Pilone M.S. Studies on the active centre of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase and comparison with pig kidney enzyme. // *Biochem. J.* 1992. Vol. 286 (Pt 2. P. 389–394.
64. Pilone Simonetta M., Pollegioni L., Casalin P., Curti B., Ronchi S. Properties of D-amino-acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. // *Eur. J. Biochem.* 1989. Vol. 180, № 1. P. 199–204.

65. Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. Characterization and high-level production of D-amino acid oxidase in *Candida boidinii*. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001. Vol. 65. P. 627–633.
66. Sarower M.G., Okada S., Abe H. Catalytic and structural characteristics of carp hepatopancreas D-amino acid oxidase expressed in *Escherichia coli* // *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 2005. Vol. 140. P. 417–425.
67. Gabler M., Hensel M., Fischer L. Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases. // *Enzyme Microb. Technol.* 2000. Vol. 27, № 8. P. 605–611.
68. Geueke B., Weckbecker A., Hummel W. Overproduction and characterization of a recombinant D-amino acid oxidase from *Arthrobacter protophormiae*. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2007. Vol. 74, № 6. P. 1240–1247.
69. Schröder T., Andreesen J.R. Studies on the inactivation of the flavoprotein D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1996. Vol. 45, № 4. P. 458–464.
70. Sacchi S., Caldinelli L., Cappelletti P., Pollegioni L., Molla G. Structure-function relationships in human D-amino acid oxidase. // *Amino Acids.* 2012. Vol. 43, № 5. P. 1833–1850.
71. 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. // *Biotechnol. Prog.* 2004. Vol. 20, № 2. P. 467–473.
72. Ju S.S., Lin L.L., Chien H.R., Hsu W.H. Substitution of the critical methionine residues in *trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase with leucine enhances its resistance to hydrogen peroxide. // *FEMS Microbiol. Lett.* 2000. Vol. 186, № 2. P. 215–219.
73. Slavica A., Dib I., Nidetzky B. Single-Site Oxidation Cysteine 108 to Cysteine Sulfinic Acid in D-Amino Acid Oxidase from *Trigonopsis variabilis* and Its Structural and Functional Consequences. 2005. Vol. 71, № 12. P. 8061–8068.
74. Nidetzky B. Stability and stabilization of D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis*. // *Biochem. Soc. Trans.* 2007. Vol. 35, № Pt 6. P. 1588–1592.
75. Betancor L., Hidalgo A., Fernández-Lorente G. Use of physicochemical tools to determine the choice of optimal enzyme: stabilization of D-amino acid oxidase. // *Biotechnol. Prog.* 2003. Vol. 19, № 3. P. 784–788.
76. Хороненкова, С. В. Рекомбинантная оксидаза D-аминокислот: получение и структурно-функциональные исследования. Дис. канд. хим. наук. М. - МГУ, 2008, 162 с.

77. Poltorak, O. M. ; Chukhrai, E. S. ; Atyaksheva, L. F. ; Torshin I.Y. Dissociative Thermal Inactivation of beta-Galactosidase and the Structure of the Conformational Lock // *Russ. J. Phys. Chem.* 2000. Vol. 74, № 3. P. 559–563.
78. Atiaksheva L.F., Pilipenko O.S., Poltorak O.M. Mechanism of the thermoinactivation of the β -galactosidase from *Escherichia coli*. 2000. P. 95–97.
79. Poltorak O.M., Chukhray E.S., Torshin I.Y. Dissociative thermal inactivation, stability, and activity of oligomeric enzymes. // *Biochemistry (Moscow)*. 1998. Vol. 63, № 3. P. 303–311.
80. Friedman M. Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids // *J. Agric. Food Chem.* 1999. Vol. 47. P. 3457–3479.
81. Marchelli R. The potential of enantioselective analysis as a quality control tool // *Trends Food Sci. Technol.* 1996. Vol. 7. P. 113–119.
82. D’Aniello A., Vetere A., Fisher G.H., Cusano G., Chavez M., Petrucelli L. Presence of D-alanine in proteins of normal and Alzheimer human brain. // *Brain Res.* 1992. Vol. 592, № 1-2. P. 44–48.
83. Duplantier A.J., Becker S.L., Bohanon M.J. Discovery, SAR, and pharmacokinetics of a novel 3-hydroxyquinolin-2(1H)-one series of potent D-amino acid oxidase (DAAO) inhibitors. // *J. Med. Chem.* 2009. Vol. 52, № 11. P. 3576–3585.
84. Adage T., Trillat A.-C., Quattropani A. In vitro and in vivo pharmacological profile of AS057278, a selective d-amino acid oxidase inhibitor with potential anti-psychotic properties. // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2008. Vol. 18, № 3. P. 200–214.
85. Brückner H., Westhauser T. Chromatographic determination of L- and D-amino acids in plants. // *Amino Acids.* 2003. Vol. 24. P. 43–55.
86. Pilone, M.S. and Pollegioni L. Enzymes, D-amino acid oxidases // *Encycl. Ind. Biotechnol. Bioprocess, Biosep. CellTechnology. Volume 7 / ed. Flickinger M.C. JohnWiley& Sons, 2011. P. 1–11.*
87. Domínguez R., Serra B., Reviejo A.J., Pingarrón J.M. Chiral analysis of amino acids using electrochemical composite bienzyme biosensors. // *Anal. Biochem.* 2001. Vol. 298. P. 275–282.
88. Stefan R.I., Nejem R.M., Van Staden J.F., Aboul-Enein H.Y. Biosensors for the enantioselective analysis of pipercolic acid // *Sensors Actuators, B Chem.* 2003. Vol. 94. P. 271–275.
89. 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 // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003. Vol. 33. P. 323–328.

90. Stefan R.I., Bokretzion R.G., Van Staden J.F., Aboul-Enein H.Y. Simultaneous determination of L- and D-methotrexate using a sequential injection analysis/amperometric biosensors system // *Biosens. Bioelectron.* 2003. Vol. 19. P. 261–267.
91. Van Staden J.F., Stefan R.I., Aboul-Enein H.Y. Amperometric biosensor based on D-aminoacid oxidase for the R-perindopril assay. // *Fresenius. J. Anal. Chem.* 2000. Vol. 367. P. 178–180.
92. Wu X., Van Wie B.J., Kidwell D. An enzyme electrode for amperometric measurement of D-amino acid. // *Biosens. Bioelectron.* 2004. Vol. 20, № 4. P. 879–886.
93. Sacchi S., Pollegioni L., Pilone M.S., Rossetti C. Determination of D-amino acids using a D-amino acid oxidase biosensor with spectrophotometric and potentiometric detection // *Biotechnol. Tech.* 1998. Vol. 12. P. 149–153.
94. Trampitsch C., Slavica A., Riethorst W., Nidetzky B. Reaction of *Trigonopsis variabilis* d-amino acid oxidase with 2,6-dichloroindophenol: kinetic characterisation and development of an oxygen-independent assay of the enzyme activity // *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2005. Vol. 32, № 5-6. P. 271–278.
95. Liu Y, Li Q, Zhu H, Yang J. High soluble expression of D-amino acid oxidase in *Escherichia coli* regulated by a native promoter. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009. Vol. 158, № 2. P. 313–322.
96. Hou J., Liu Y., Li Q., Yang J. High activity expression of d-amino acid oxidase in *Escherichia coli* by the protein expression rate optimization // *Protein Expr. Purif.* 2013. Vol. 88. P. 120–126.
97. Deng S., Su E., Ma X., Yang S., Wei D. High-level soluble and functional expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in *Escherichia coli*. // *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2014.
98. Takahashi S., Okada H., Abe K., Kera Y. D-amino acid-induced expression of D-amino acid oxidase in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. // *Curr. Microbiol.* 2012. Vol. 65, № 6. P. 764–769.
99. Pernot P., Mothet J.-P., Schuvailo O. Characterization of a yeast D-amino acid oxidase microbiosensor for D-serine detection in the central nervous system. // *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80, № 5. P. 1589–1597.
100. Mohd Zain Z., Ab Ghani S., O'Neill R.D. Amperometric microbiosensor as an alternative tool for investigation of D-serine in brain. // *Amino Acids.* 2012. Vol. 43, № 5. P. 1887–1894.
101. Polcari D., Kwan A., Van Horn M.R.. Disk-shaped amperometric enzymatic biosensor for in vivo detection of d -serine // *Anal. Chem.* 2014. Vol. 86. P. 3501–3507.

102. Nieh C.H., Kitazumi Y., Shirai O., Kano K. Sensitive d-amino acid biosensor based on oxidase/peroxidase system mediated by pentacyanoferrate-bound polymer // *Biosens. Bioelectron.* 2013. Vol. 47. P. 350–355.
103. Lata S., Batra B., Kumar P., Pundir C.S.. Construction of an amperometric d-amino acid biosensor based on d-amino acid oxidase/carboxylated multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaniline modified gold electrode // *Anal. Biochem.* 2013. Vol. 437. P. 1–9.
104. Frattini L., Rosini E., Pollegioni L., Pilone M.S. Analyzing the D-amino acid content in biological samples by engineered enzymes. // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. Elsevier B.V.*, 2011. Vol. 879, № 29. P. 3235–3239.
105. Sacchi S., Rosini E., Molla G., Pilone M.S., Pollegioni L. Modulating D-amino acid oxidase substrate specificity: production of an enzyme for analytical determination of all D-amino acids by directed evolution. // *Protein Eng. Des. Sel.* 2004. Vol. 17, № 6. P. 517–525.
106. Molla G., Piubelli L., Volontè F., Pilone M.S.. Enzymatic detection of D-amino acids. // *Methods Mol. Biol.* 2012. Vol. 794. P. 273–289.
107. Tedeschi G., Pollegioni L., Negri A. Assays of d-amino acid oxidases // *Methods Mol. Biol.* 2012. Vol. 794. P. 381–395.
108. Seo Y.-M., Mathew S., Bea H.-S.. Deracemization of unnatural amino acid: homoalanine using D-amino acid oxidase and ω -transaminase. // *Org. Biomol. Chem.* 2012. Vol. 10, № 12. P. 2482–2485.
109. Z. Findrik; Đ.Vasić-Rački. Biotransformation of D -Methionine into L -Methionine in the Cascade of Four Enzymes // *Biotechnol. Bioeng.* 2007. Vol. 98. P. 956–967.
110. Taylor P.P., Pantaleone D.P., Senkpeil R.F., Fotheringham I.G.. Novel biosynthetic approaches to the production of unnatural amino acids using transaminases // *Trends Biotechnol.* 1998. Vol. 16. P. 412–418.
111. Caligiuri A., D'Arrigo P., Gefflaut T. Multistep enzyme catalysed deracemisation of 2-naphthyl alanine // *Biocatal. Biotransformation.* 2006. Vol. 24. P. 409–413.
112. García-García M., Martínez-Martínez I., Sánchez-Ferrer Á., García-Carmona F. Production of the apoptotic cellular mediator 4-methylthio-2-oxobutyric acid by using an enzymatic stirred tank reactor with in situ product removal // *Biotechnol. Prog.* 2008. Vol. 24. P. 187–191.
113. Barber M.S., Giesecke U., Reichert A., Minas W. Industrial enzymatic production of cephalosporin-based beta-lactams. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2004. Vol. 88. P. 179–215.
114. Таранцева К.Р., Яхкинд М.И. Анализ технологий синтеза 7-аминоцефалоспоровой кислоты и выбор оптимальной безопасной промышленной технологии // *М - Научный мир.* 2009. P. 216.

115. Яхкин М. Разработка биокаталитической технологии производства 7-аминоцефалоспоровой кислоты. Автореферат дис. канд. хим. наук. М., 2010, 17 с.
116. Pilone M.S., Pollegioni L. D-amino acid oxidase as an industrial biocatalyst // *Biocatal. Biotransformation*. 2002. Vol. 20. P. 145–159.
117. Luo H., Yu H., Li Q., Shen Z. Cloning and co-expression of d-amino acid oxidase and glutaryl-7-аминоцефалоспоровой кислоты acylase genes in *Escherichia coli* // *Enzyme Microb. Technol.* 2004. Vol. 35, № 6-7. P. 514–518.
118. Luo H., Li Q., Yu H., Shen Z. Construction and application of fusion proteins of D-amino acid oxidase and glutaryl-7-аминоцефалоспоровой кислоты acylase for direct bioconversion of cephalosporin C to 7-аминоцефалоспоровой кислоты. // *Biotechnol. Lett.* 2004. Vol. 26, № 11. P. 939–945.
119. Zheng H., Zhu T., Chen J. Construction of recombinant *Escherichia coli* D11/pMSTO and its use in enzymatic preparation of 7-аминоцефалоспоровой кислоты in one pot. // *J. Biotechnol.* 2007. Vol. 129, № 3. P. 400–405.
120. Lopez-Gallego F, Batencor L, Hidalgo A, Mateo C, Fernandez-Lafuente R. One-Pot Conversion of Cephalosporin C to 7-Aminocephalosporanic Acid in the Absence of Hydrogen Peroxide // *Adv. Synth. Catal.* 2005. Vol. 347, № 14. P. 1804–1810.
121. Tan Q., Zhang Y., Song Q., Wei D. Single-pot conversion of cephalosporin C to 7-аминоцефалоспоровой кислоты in the absence of hydrogen peroxide // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009. Vol. 26, № 1. P. 145–152.
122. Pollegioni L., Rosini E., Molla G. Cephalosporin C acylase: Dream and(/or) reality // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013. Vol. 97. P. 2341–2355.
123. Pollegioni L., Lorenzi S., Rosini E. Evolution of an acylase active on cephalosporin C // *Protein. Sci.* 2005. Vol. 14, № 12. P. 3064–3076.
124. Sasamura T., Matsuda A., Kokuba Y. Effects of D-methionine-containing solution on tumor cell growth in vitro. // *Arzneimittelforschung*. 1999. Vol. 49. P. 541–543.
125. Sasamura T., Matsuda A., Kokuba Y. Determination of D-amino acid oxidase activity in tumour cells. // *Ann. Clin. Biochem.* 2002. Vol. 39. P. 595–598.
126. 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. Vol. 9. P. 185–193.
127. 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. Vol. 62. P. 3138–3143.
128. 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. Vol. 8, № 11. P. 1797–1806.

129. 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. Vol. 109. P. 1–8.
130. Hashimoto K., Fukushima T., Shimizu E. Decreased serum levels of D-serine in patients with schizophrenia: evidence in support of the N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia. // *Arch. Gen. Psychiatry*. 2003. Vol. 60. P. 572–576.
131. Bendikov I., Nadri C., Amar S. A CSF and postmortem brain study of d-serine metabolic parameters in schizophrenia // *Schizophr. Res*. 2007. Vol. 90. P. 41–51.
132. Tsai G.E., Yang P., Chang Y.C., Chong M.Y. D-alanine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia // *Biol. Psychiatry*. 2006. Vol. 59. P. 230–234.
133. Tsai G., Yang P., Chung L.C., Lange N., Coyle J.T. D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia // *Biol. Psychiatry*. 1998. Vol. 44. P. 1081–1089.
134. Smith S.M., Uslaner J.M., Hutson P.H. The Therapeutic Potential of D-Amino Acid Oxidase (DAAO) Inhibitors. // *Open Med. Chem. J*. 2010. Vol. 4. P. 3–9.
135. Sacchi S., Rosini E., Pollegioni L., Molla G. D-amino acid oxidase inhibitors as a novel class of drugs for schizophrenia therapy. // *Curr. Pharm. Des*. 2013. Vol. 19, № 14. P. 2499–2511.
136. Nakamura H., Fang J., Maeda H. Protective role of D-amino acid oxidase against *Staphylococcus aureus* infection. // *Infect. Immun*. 2012. Vol. 80. P. 1546–1553.
137. Lin S.Y., Wang J.D., Lin J.H., ShihYun L., JiunDa W., JenqHorng L. Expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in transgenic rice for cephalosporin production // *Bot. Stud*. 2009. Vol. 50. P. 181–192.
138. Erikson O., Hertzberg M., Näsholm T. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. // *Nat. Biotechnol*. 2004. Vol. 22. P. 455–458.
139. Hawkes T., Pline-Srnic W., Dale R. D-glufosinate as a male sterility agent for hybrid seed production // *Plant Biotechnol. J*. 2011. Vol. 9. P. 301–314.
140. Pedotti M., Rosini E, Molla G. Glyphosate resistance by engineering the flavoenzyme glycine oxidase. // *J. Biol. Chem*. 2009. Vol. 284. P. 36415–36423.
141. Miyano M., Fukui K., Watanabe F. Studies on Phe-228 and Leu-307 recombinant mutants of porcine kidney D-amino acid oxidase: expression, purification, and characterization. // *J. Biochem*. 1991. Vol. 109, № 1. P. 171–177.
142. Pollegioni L., Fukui K., Massey V. Studies on the kinetic mechanism of pig kidney D-amino acid oxidase by site-directed mutagenesis of tyrosine 224 and tyrosine 228. // *J. Biol. Chem*. 1994. Vol. 269, № 50. P. 31666–31673.

143. Bakke M., Setoyama C., Miura R., Kajiyama N. Thermostabilization of porcine kidney D-amino acid oxidase by a single amino acid substitution. // *Biotechnol. Bioeng.* 2006. Vol. 93, № 5. P. 1023–1027.
144. Setoyama C., Nishina Y., Mizutani H. Engineering the substrate specificity of porcine kidney D-amino acid oxidase by mutagenesis of the “active-site lid”. // *J. Biochem.* 2006. Vol. 139, № 5. P. 873–879.
145. Raibekas A., Fukui K., Massey V. Design and properties of human D-amino acid oxidase with covalently attached flavin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 97, № 7. P. 3089–3093.
146. Campaner S., Pollegioni L., Ross B.D., Pilone M.S. Limited proteolysis and site-directed mutagenesis reveal the origin of microheterogeneity in *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. // *Biochem. J.* 1998. Vol. 330 (Pt 2. P. 615–621.
147. 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. // *Biotechnol. Bioeng.* 2003. Vol. 82, № 4. P. 480–488.
148. Wang S.-J., Yu C.-Y., Lee C.-K., Chern M.-K., Kuan I.-C. Subunit fusion of two yeast D-amino acid oxidases enhances their thermostability and resistance to H₂O₂. // *Biotechnol. Lett.* 2008. Vol. 30, № 8. P. 1415–1422.
149. Boselli A., Piubelli L., Molla G., Pilone M.S., Pollegioni L., Sacchi S. Investigating the role of active site residues of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase on its substrate specificity. // *Biochimie.* 2007. Vol. 89, № 3. P. 360–368.
150. Harris C.M., Molla G., Pilone M.S., Pollegioni L. Studies on the reaction mechanism of *Rhodotorula gracilis* D-amino-acid oxidase. Role of the highly conserved Tyr-223 on substrate binding and catalysis. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 51. P. 36233–36240.
151. Molla G., Porrini D., Job V., Pollegioni L. Role of arginine 285 in the active site of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. A site-directed mutagenesis study. // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 24715–24721.
152. Pollegioni L., Harris C.M., Molla G., Pilone M.S., Ghisla S. Identification and role of ionizing functional groups at the active center of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase // *FEBS Lett.* 2001. Vol. 507. P. 323–326.
153. Boselli A., Sacchi S., Job V., Pilone M.S., Pollegioni L. Role of tyrosine 238 in the active site of *Rhodotorula gracilis* D -amino acid oxidase A site-directed mutagenesis study. 2002. Vol. 4771. P. 4762–4771.
154. Boselli A., Piubelli L., Molla G. On the mechanism of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: role of the active site serine 335. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2004. Vol. 1702, № 1. P. 19–32.

155. Caldinelli L., Molla G., Pilone M.S., Pollegioni L. Tryptophan 243 affects interprotein contacts, cofactor binding and stability in D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. // FEBS J. 2006. Vol. 273, № 3. P. 504–512.
156. Ju S.S., Lin L.L., Wang W.C., Hsu W.H. A conserved aspartate is essential for FAD binding and catalysis in the D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*. // FEBS Lett. 1998. Vol. 436, № 1. P. 119–122.
157. Lin L.L., Wang W.C., Ju S.S., Chien H.R., Hsu W.H. The role of a conserved histidine residue, His324, in *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase. // FEMS Microbiol. Lett. 1999. Vol. 176, № 2. P. 443–448.
158. Lin L., Chien H., Wang W., Hwang T., Fu H., Hsu W.. Expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase gene in *Escherichia coli* and characterization of its inactive mutants. // Enzyme Microb. Technol. 2000. Vol. 27, № 7. P. 482–491.
159. Yu H., Ma X., Luo H., Wen C., Shen Z. Fusion expression of D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* with maltose binding protein and *Vitreoscilla* hemoglobin. // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2008. Vol. 24, № 6. P. 1004–1009.
160. Mueller M., Kratzer R., Schiller M. The role of Cys108 in *Trigonopsis variabilis* d-amino acid oxidase examined through chemical oxidation studies and point mutations C108S and C108D. // Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V., 2010. Vol. 1804, № 7. P. 1483–1491.
161. 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. // N. Biotechnol. Elsevier B.V., 2010. Vol. 27, № 1. P. 78–84.
162. Setoyama C., Nishina Y., Tamaoki H. Effects of hydrogen bonds in association with flavin and substrate in flavoenzyme d-amino acid oxidase. The catalytic and structural roles of Gly313 and Thr317. // J. Biochem. 2002. Vol. 131, № 1. P. 59–69.
163. Alekseeva A.A., Serenko A.A., Kargov I.S., Savin S.S., Kleymenov S.Y., Tishkov V.I. Engineering catalytic properties and thermal stability of plant formate dehydrogenase by single-point mutations. // Protein Eng. Des. Sel. PEDS. 2012. Vol. 25. P. 781–788.
164. Alekseeva A.A., Savin S.S., Kleimenov S.Y., Uporov I. V., Pometun E. V., Tishkov V.I. Stabilization of plant formate dehydrogenase by rational design. // Biochem. 2012. Vol. 77, № 10. P. 1199–1209.
165. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
166. Poltorak O.M., Chukhrai, E.S., Torshin I.Y. On the influence of interprotein contacts on the active centers and catalytic properties of oligomeric enzymes // Russ. J. Phys. Chem. 2000. Vol. 74, № 3. P. 400–410.

167. Полтора́к, О.М., Чухра́й Е.С. Диссоциативная термоинактивация катализаторов. Итоги науки и техники // Итоги науки и техники. Биотехнология. 1986. Vol. 5. P. 50–86.
168. Черско́ва Н., Хороненко́ва С., Тишко́в В. Роль остатков Arg169 и Arg220 в межсубъединичном контакте дрожжевой оксидазы D аминокислот // Известия Академии Наук. Серия химическая. 2010. P. 262–268.
169. Гартман, Т.Н., Клушин Д.В. Основы компьютерного моделирования химико технологических процессов. М.: Академкнига, 2006. P. 416.
170. Rose G.D., Geselowitz A.R., Lesser G.J., Lee R.H., Zehfus M.H. Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins // Science (80-.). 1985. Vol. 229, № 7. P. 834–838.
171. McGaughey G.B., Gagné M., Rappé A.K. pi-Stacking interactions. Alive and well in proteins. // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273, № 25. P. 15458–15463.
172. Zacharias M., Sklenar H. Analysis of the stability of looped-out and stacked-in conformations of an adenine bulge in DNA using a continuum model for solvent and ions. // Biophys. J. 1997. Vol. 73, № 6. P. 2990–3003.
173. Hunter C., Lu X. DNA base-stacking interactions: a comparison of theoretical calculations with oligonucleotide X-ray crystal structures // J. Mol. Biol. 1997. Vol. 265, № 5. P. 603–619.
174. Luo R., Gilson H.S., Potter M.J., Gilson M.K. The physical basis of nucleic acid base stacking in water. // Biophys. J. 2001. Vol. 80, № 1. P. 140–148.
175. Hobza P. Stacking interactions. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2008. Vol. 10, № 19. P. 2581–2583.
176. Hunter C.A., Singh J., Thornton J.M. Pi-pi interactions: the geometry and energetics of phenylalanine-phenylalanine interactions in proteins. // J. Mol. Biol. 1991. Vol. 218, № 4. P. 837–846.
177. Chakrabarti P., Bhattacharyya R. Geometry of nonbonded interactions involving planar groups in proteins. // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2007. Vol. 95, № 1-3. P. 83–137.
178. Dougherty D.A. Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. // Science. 1996. Vol. 271, № 5246. P. 163–168.
179. Gallivan J.P., Dougherty D. a. Cation-pi interactions in structural biology. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999. Vol. 96, № 17. P. 9459–9464.
180. Zacharias N., Dougherty D. a. Cation-pi interactions in ligand recognition and catalysis. // Trends Pharmacol. Sci. 2002. Vol. 23, № 6. P. 281–287.
181. Anbarasu A, Anand S, Mathew L, Sethumadhavan R. Influence of cation-pi interactions on RNA-binding proteins. // Int. J. Biol. Macromol. 2007. Vol. 40, № 5. P. 479–483.

182. Tayubi I., Sethumadhavan R. Nature of cation- π interactions and their role in structural stability of immunoglobulin proteins. // *Biochem. Biokhimiia*. 2010. Vol. 75, № 7. P. 912–918.
183. Liao S.-M., Du Q.-S., Meng J.-Z., Pang Z.-W., Huang R.-B. The multiple roles of histidine in protein interactions. // *Chem. Cent. J. Chemistry Central Journal*, 2013. Vol. 7, № 1. P. 44.
184. Dougherty D. The cation π -interaction. // *Acc. Chem. Res.* 2013. Vol. 46, № 4. P. 885–893.
185. Sivasakthi V., Anitha P., Kumar K.M. Aromatic-aromatic interactions: analysis of π - π interactions in interleukins and TNF proteins. // *Bioinformatics*. 2013. Vol. 9, № 8. P. 432–439.
186. Sivasakthi V., Anbarasu A., Ramaiah S. π - π Interactions in Structural Stability: Role in RNA Binding Proteins. // *Cell Biochem. Biophys.* 2013. Vol. 67, № 3. P. 853–863.
187. Rojkova A., Galkin A, Kulakova L., Serov A.E., Savitsky P.A., Fedorchuk V.V., Tishkov V.I. Bacterial formate dehydrogenase. Increasing the enzyme thermal stability by hydrophobization of alpha-helices // *FEBS Lett.* 1999. Vol. 445, № 445. P. 183–188.
188. Munoz V., Serrano L. Helix design, prediction and stability // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995. Vol. 6. P. 382–386.
189. Vogt G., Argos P. Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing? // *Fold. Des.* 1997. Vol. 2. P. S40–S46.
190. Bogin O., Levin I., Hacham Y. Structural basis for the enhanced thermal stability of alcohol dehydrogenase mutants from the mesophilic bacterium *Clostridium beijerinckii*: contribution of salt bridging. // *Protein Sci.* 2002. Vol. 11. P. 2561–2574.
191. Crowley P.B., Golovin A. Cation- π interactions in protein-protein interfaces. // *Proteins*. 2005. Vol. 59, № 2. P. 231–239.
192. Tishkov V.I., Popov V.O. Protein engineering of formate dehydrogenase // *Biomol. Eng.* 2006. Vol. 23, № 2-3. P. 89–110.