

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)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва - 2014

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор
Тишков Владимир Иванович

Официальные оппоненты:

Туницкая Вера Леонидовна

доктор химических наук
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН,
ведущий научный сотрудник

Яненко Александр Степанович

доктор биологических наук, профессор
Федеральное государственное унитарное предприятие
“Государственный научно-исследовательский институт генетики и
селекции промышленных микроорганизмов”
заместитель директора по научной работе, заведующий
лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится **16 декабря 2014 года в 15 часов** на заседании Совета Д 501.001.59 по защите докторских и кандидатских диссертаций по химическим наукам при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.11, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте Химического факультета МГУ (www.chem.msu.ru).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2014 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 501.001.59,
кандидат химических наук



Сакодынская И.К.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. 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. DAAO является очень важным ферментом с точки зрения фундаментальных исследований структуры, механизма действия, стабильности, выступая в качестве модельного фермента для целого класса FAD-зависимых оксидоредуктаз. 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 из них 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. 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, болезнью Альцгеймера, Паркинсона и др.) и онкологических заболеваний, для применения в процессах органического синтеза неприродных L-аминокислот, α -кетокислот и 7-аминоцефалоспороановой 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 фермента – из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) и *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO). Первый 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 результате, вторым важным направлением исследования DAAO является оптимизация свойств природных ферментов и получение мутантных DAAO с заданными свойствами (повышенной каталитической активностью, увеличенной температурной и операционной стабильностью и т.д.) для целей биотехнологии. 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 задачи по направленному изменению свойств биокатализатора. Основным требованием

при использовании данного подхода является наличие экспериментальной или модельной трехмерной структуры целевого фермента. Кроме того, с помощью рационального дизайна реализуется возможность получения знаний о взаимосвязи структуры и функции интересующего фермента. Трехмерная структура RgDAAO была решена еще в 2000 году и с тех пор был накоплен большой экспериментальный материал по белковой инженерии этого фермента. В случае TvDAAO долгое время не удавалось получить кристаллы фермента и установить его трехмерную структуру. Это, по-видимому, является одной из причин того, почему количество работ по белковой инженерии TvDAAO намного меньше по сравнению с RgDAAO. Ситуация изменилась 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. 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. 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 основы.

Цели исследования.

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.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- исследование роли аминокислотных остатков в области активного центра фермента и изучение взаимодействий между ними;
- оптимизация структуры FAD-связывающего домена;
- повышение температурной стабильности TvDAAO;
- получение мутантных TvDAAO с улучшенными свойствами за счет объединения наиболее успешных точечных аминокислотных замен.

Научная новизна. В ходе выполнения данной работы проведен подробный сравнительный анализ известных четвертичных структур оксидаз D-аминокислот человека (hDAAO), из почек свиньи (pkDAAO), дрожжей *R.gracilis* (RgDAAO) и *T.variabilis* (TvDAAO). В результате были выявлены структурные отличия, которые могут обеспечивают различную субстратную специфичность и стабильность данных ферментов. На основании проведенного анализа выбраны перспективные положения для введения аминокислотных замен. Методом направленного мутагенеза получены 40 мутантных TvDAAO с единичными и многоточечными аминокислотными заменами в области каталитического центра и

FAD-связывающего домена. При введении ряда точечных аминокислотных замен удалось повысить температурную стабильность и каталитическую активность TvDAAO со многими D-аминокислотами. Также были получены точечные мутантные ферменты с измененными профилями субстратной специфичности. Объединение наиболее успешных точечных мутантов в многоточечные позволило еще сильнее повысить стабильность TvDAAO при повышенных температурах.

Практическая значимость работы.

Проведенные систематические исследования взаимосвязи структуры и функции TvDAAO открывают перспективы для поиска новых положений для мутагенеза в структуре TvDAAO с целью значительного улучшения свойств природного фермента. Полученные в данной работе мутантные формы TvDAAO с повышенной температурной стабильностью, увеличенной каталитической эффективностью и измененным спектром субстратной специфичности являются весьма перспективными для применения в аналитической биотехнологии и тонком органическом синтезе.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были представлены на международных конгрессах, конференциях и школах: VI и VII Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2011, 2013), XVIII, XIX, XX и XXI международная молодежная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2011, 2012, 2013, 2014), XI и XII Международная конференция молодых ученых «Леса Евразии» (Брянск, Россия, 2011 и Беларусь-Литва, 2012), 2-я международная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина» (Московская область, Россия, 2011), Международная конференция «Ломоносов и Гумбольдт: научное сотрудничество России и Германии – от истоков до наших дней» (Москва, Россия, 2011), Школа-конференция молодых ученых «Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины» (Москва, 2011), The 20th INPEC Conference "Engineering Protein - Systems, Functions and Applications", (Taipei, Taiwan, 2012), 9th International Conference on Protein Stabilization - ProStab2012 "From Molecular Level to market applications" (Lisbon, Portugal, 2012), V International Meeting "Early events in Human Pathologies" (Listvyanka, Baikal, Russia, 2012), International Conference "Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications" (Moscow, Russia, 2013), CONGRESS of Federation of European Biochemical Societies FEBS-2013 "Mechanisms in Biology" (St.Petersburg, Russia, 2013), Международная научно-практическая конференция «БИОТЕХНОЛОГИЯ И КАЧЕСТВО ЖИЗНИ» (Moscow, Russia, 2014), International BioForum-2014 (Pushchino, Russia, 2014), 10th International Conference on Protein Stabilization (Stresa, Italy, 2014), International Conference OxiZymes (Vienna, Austria, 2014), XVI International Conference INPEC-2014 (International Network of Protein Engineering Centers) (St.Petersburg, Russia, 2014).

По результатам выполненных исследований автор в 2012 г. был дважды удостоен стипендии имени И.В. Березина, в 2012 г. награжден грамотой за лучший доклад среди аспирантов и молодых ученых на конференции Ломоносов-2012 (Москва, Россия, 2012), в 2013 г. награжден дипломом 1 степени среди аспирантов на конференции Ломоносов-2013 (Москва, Россия, 2013), в 2013 г. за особые успехи в учебе и научной деятельности стал лауреатом стипендии Правительства Российской Федерации, в 2014 г награжден медалью и удостоен первой премии в конкурсе молодых ученых на международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, Россия, 2014).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в журналах (все журналы входят в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ), 25 тезисов докладов конференций.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 246 страницах и содержит 72 рисунка, 40 таблиц и 192 ссылки.

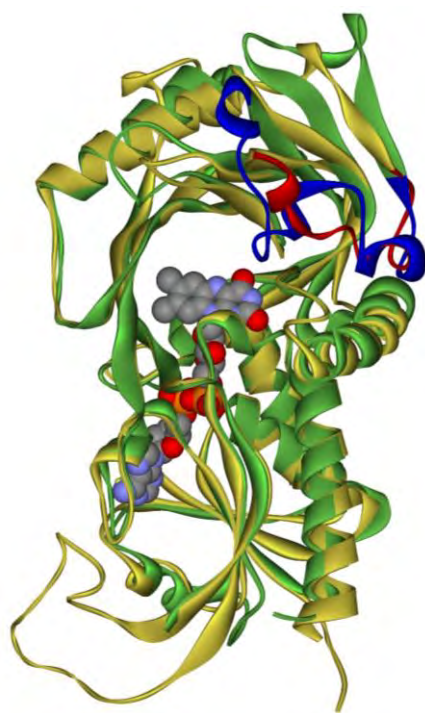
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Роль остатка Met104 в каталитических свойствах и стабильности TvDAAO

Оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* является наиболее стабильным ферментом среди изученных оксидаз D-аминокислот. Для получения систематических данных о взаимосвязи структуры, стабильности и активности TvDAAO нами был проведен подробный анализ известных на данный момент трехмерных структур DAAO. Наложение пространственных структур TvDAAO и RgDAAO и сравнительный анализ некоторых аминокислотных последовательностей DAAO из различных организмов представлены на рис. 1. Результаты экспериментов *in silico* показали, что характерным структурным отличием TvDAAO является наличие более длинной петли в области активного центра, которая располагается с 95 по 120 остаток в последовательности TvDAAO. Эта петля соединяет два β -листа (85-94 и 121-125 остатки) и взаимодействует с пространственно-сближенными элементами вторичной структуры (α -спираль 58-78, β -листы 85-94, 121-125, 135-141, 226-230, 255-260, соединительные петли 51-57, 231-241).

Анализ выравнивания аминокислотных последовательностей DAAO из различных источников в области активного центра показал, что более 90% последовательностей DAAO (в том числе rkDAAO, hDAAO и RgDAAO) в отличие от TvDAAO имеют разрыв в данной области (рис. 1Б). 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. При анализе данного структурного элемента мы обратили внимание на остаток Met104, который располагается на изгибе вышеупомянутой петли на входе в активный центр фермента (рис. 2) Данный остаток является конформационно-подвижным (присутствует в кристаллической структуре в двух конформациях). Было решено изучить роль остатка Met104 в катализе и температурной стабильности TvDAAO.

На основании выравнивания аминокислотных последовательностей DAAO из различных источников и компьютерного моделирования для замены были выбраны остатки, которые имеют различный объем, форму и гидрофобность, а также положительный и отрицательный заряд (всего 10 остатков): Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp, Glu и Lys.



Tva	QRSHVLKRDLP-KLEG MSA -ICQRNPWFKN T VDS 120
Anig	TIVYNRTKDQGSATGEWFSE-LVQKDPWYMEVVPD
Asfl	AIVYNRTKDQGSATGDFWSE-LVQKEPWYKD V VPD
Cpo	SIIYNRLKDASSDTAVWFKE-LINPNPWYKD I VPD
Aor	CEIHSRSKDVGT T TAKWFGE-LLSPSPWFKD V VPN
Ncr	AVLYRRAQDEAAGFAGPLSDGLFVRNPWYKD I VPD
Vpo	LKYFIRKNDMIPWYIEG-----KFVRDIEY
Kla	LKLVTRK-ETIPWFVRD-----NFVRDLKQ
Spo	LRELWEYEPKHDKIRS-----WNTYVRD
Rto	RFAQNEDGLLG-----HWYKDITPN
Mbo	ALSVGDRIETG-----AMPPGLELIPD
Mca	ALSVGDRIETG-----AMPPGLELIPD
Mtu	ALSVGDRIETG-----AMPPGLELIPD
Msp	GT-LAARPEGA-----TPPFADQTPG
SCO	GVLGETGLDEV-----DGWAAARLPG
Ssca	GVHGGTRLDGL-----GAWAS-RVAG
Rxy	GVELLRRSAPG-----EPWWR E AVSG
Mau	RMWLRHRYAGP-----PWWADACGD
Ota	RRFKFYLR E QKE-----KPAWAAALMHH
Sce	DLTAREAADD T -----RLPWWAP S VPD
Nsp	GTEVFMAPEPD-----PWWG--AAV
Apo	GLNVDHLPGAD-----RSWTRIVAG
Amed	GRVLLPAGT P D-----PQWLP--AV
Cfa	GYNLFHETIP-----DPSWKDAV L G
Amel	GYNLFREAF P -----DPSWKDT V LG
Eca	GYNLFHEAV P -----DPSWKD I VLG
Hsa	GYNLFHEAI P -----DPSWKDT V LG
Bta	GYNLFREAV P -----DPYWKD I VLG
Ssc_pig	GYNLFREAV P -----DPYWKD M VLG

А

Б

Рис. 1. **А** - Наложение структуры RgDAAO (1C0P, выделена желтым) на структуру TvDAAO (выделена зеленым), RMSD = 1,27Å, количество совпадающих аминокислотных остатков – 286 из 356. Петли в области активного центра RgDAAO и TvDAAO выделены красным и синим цветом соответственно. **Б** – Фрагмент выравнивания аминокислотных последовательностей DAAO из различных источников.

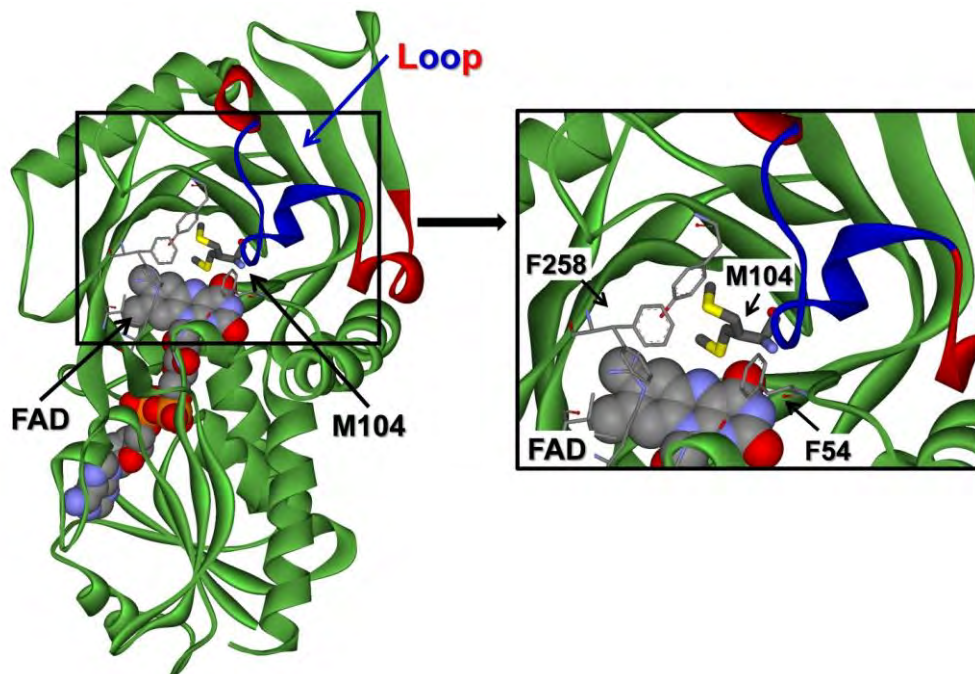


Рис. 2. Активный центр TvDAAO и расположение остатка Met104.

Все мутантные TvDAAO с заменами в 104-м положении и фермент дикого типа были экспрессированы в клетках *E. coli* и получены в активной и растворимой форме. При культивировании всех ферментов наблюдался близкий выход биомассы, однако в среднем уровень экспрессии мутантных белков был несколько ниже, чем TvDAAO дикого типа.

Введение различных замен в 104-е положение привело к получению мутантных ферментов с различным профилем субстратной специфичности (рис. 3). Все мутанты были неактивны с D-Thr, активность с D-Lys сохранили TvDAAO M104A, M104I и M104E. В целом, мутантные TvDAAO с 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), в то время, как с объемными алифатическими и ароматическими субстратами каталитическая эффективность этих мутантов по сравнению с ферментом дикого типа практически не изменилась или увеличилась (например, с D-Leu). Введение замен M104F, M104Y и M104W 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.

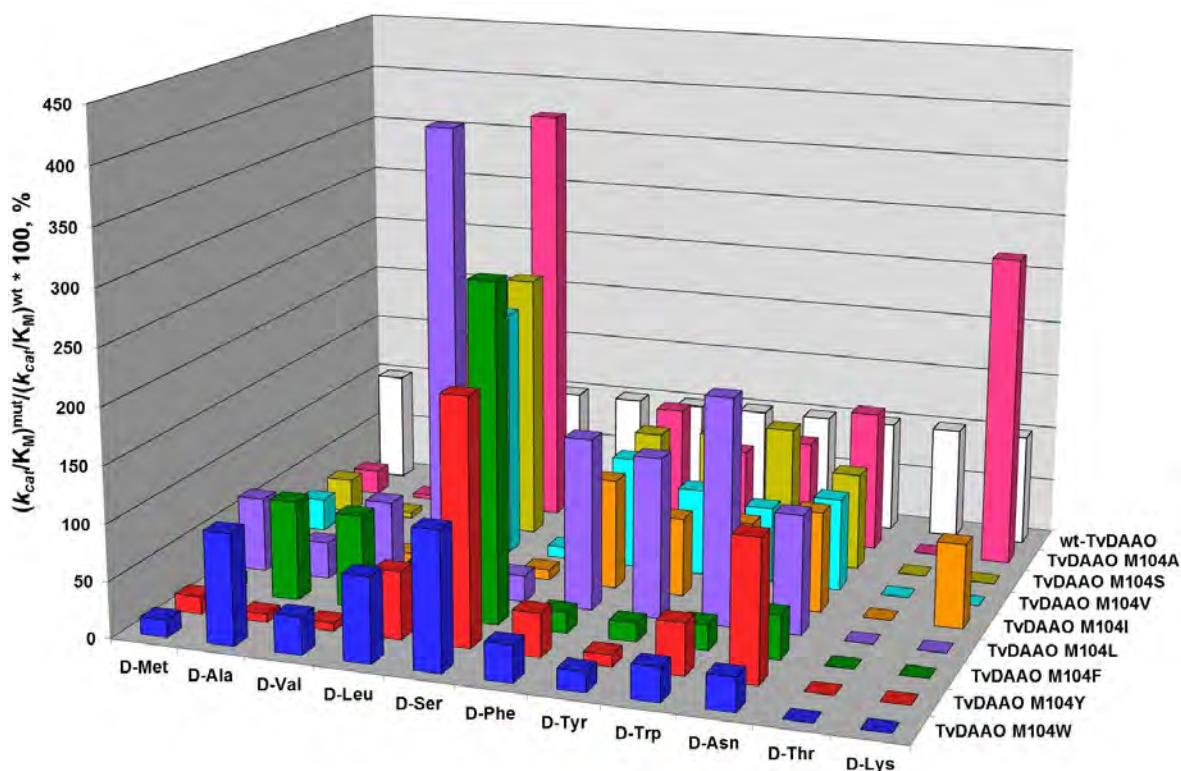


Рис. 3. Относительные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с заменами Met104 на Ala, Ser, Val, Ile, Leu, Phe, Tyr, Trp. За 100% принята каталитическая эффективность фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

Замена M104L привела к увеличению каталитической активности с большинством субстратов, однако с небольшими субстратами несколько возросли значения K_m , что приводит к небольшому снижению каталитической эффективности. Стоит отметить, что мутантная TvDAAO M104E проявляет в 48 раз более высокую каталитическую активность с D-Lys, чем TvDAAO M104K, однако оба фермента не проявляют активности с D-Glu и D-Asp.

Изучение температурной стабильности по кинетике инактивации показало, что замены M104A, M104S, M104V и M104I привели к понижению стабильности TvDAAO в той или иной степени. Мутантная TvDAAO M104L по стабильности близка к ферменту дикого типа. В то же время, объемные ароматические замены M104F, M104Y и M104W привели к заметной стабилизации фермента (рис. 4).

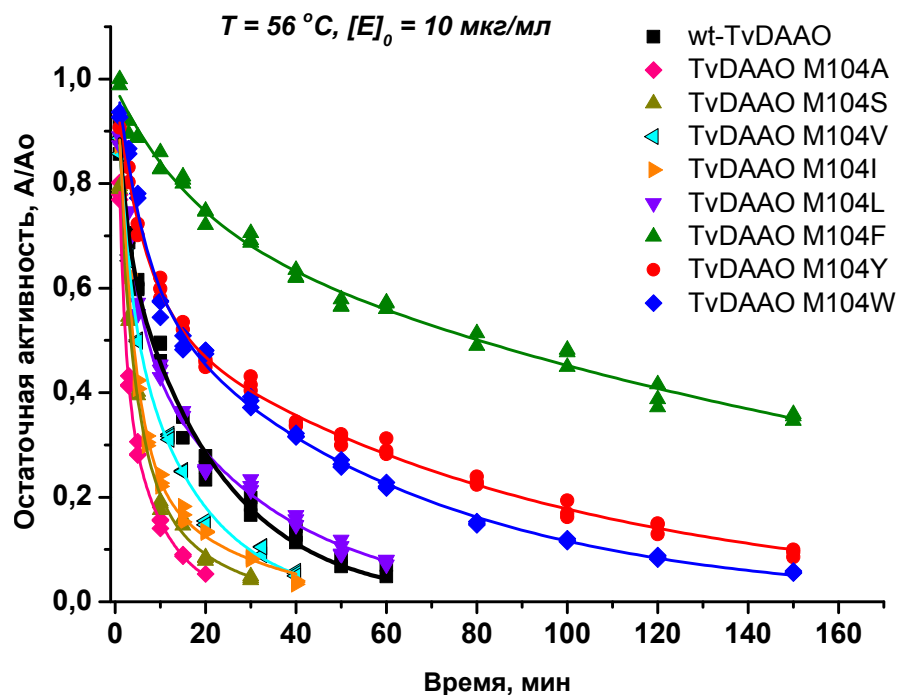


Рис. 4. Зависимости остаточной активности от времени мутантных TvDAAO с заменами M104A (♦,—), M104S (▲,—), M104V (◄,—), M104I (►,—), M104L (▼,—), M104F (▲,—), M104Y (●,—), M104W (◆,—) и TvDAAO дикого типа (■,—). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0, температура инкубации 56°C.

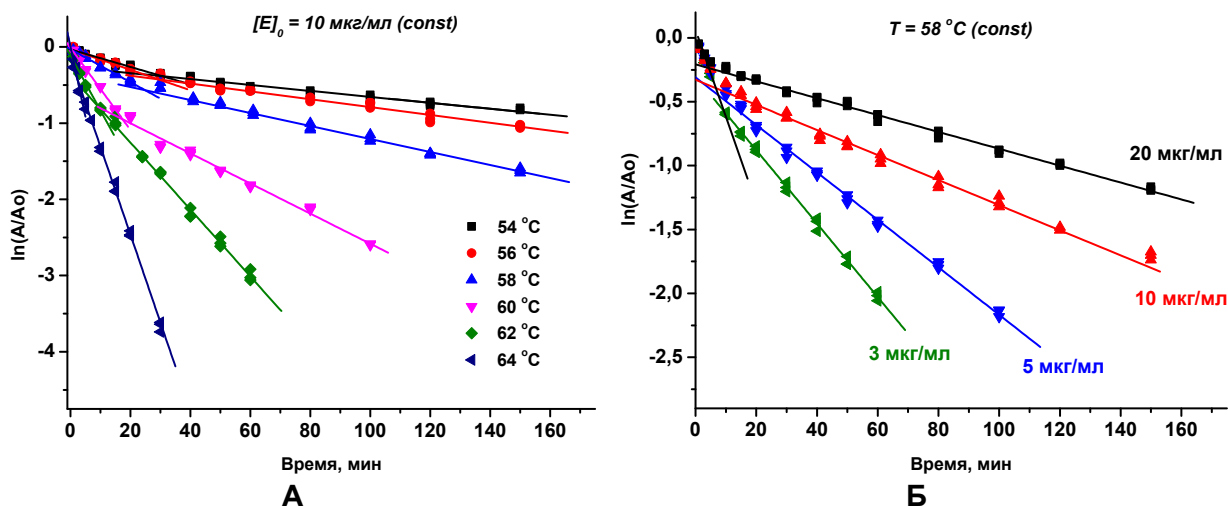


Рис. 5. Зависимости остаточной активности от времени мутантной TvDAAO M104F в полулогарифмических координатах: А – при одной концентрации фермента (10 мкг/мл) и различных температурах; Б – при одной температуре (58°C) и различных концентрациях фермента.

Процесс температурной инактивации мутантных TvDAAO, как и фермента дикого типа, протекал по диссоциативному механизму, поскольку:

1. Экспериментальные зависимости остаточной активности фермента от времени корректно описываются суммой двух экспоненциальных функций. В результате в полулогарифмических координатах наблюдается наличие изломов (т.е. двух линейных участков) на зависимостях остаточной активности от времени (рис. 5).
2. При фиксированной температуре скорость инактивации до точки излома не зависит от концентрации фермента, а на втором линейном участке скорость инактивации возрастает при уменьшении начальной концентрации фермента (рис. 5).

Таблица 1.

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

Форма TvDAAO	T _{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	-	-	-	-
Del_99-110	-	1,2	-	-	-	-	-	-	-
F54S			40	14	5,0	1,1			
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	25	16	10,6	5,0	-	-	-	-	-
M104F/F258S	66	29	10,6	4,7	2,5	-	-	-	-
M104Y/F258S	13,4	9,2	5,0	3,7	2,6	-	-	-	-
M104W/F258S	46	13,7	7,6	3,4	2,3	-	-	-	-

* – ошибка эксперимента составляла не более 15%

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

Нами также была изучена роль соединительной петли, в которой располагается остаток Met104. Удаление участка 99-110, который отсутствует у большинства последовательностей DAAO, показало, что данный структурный элемент играет важную роль как в каталитических свойствах, так и в поддержании стабильной структуры фермента. Мутантная TvDAAO Del_99-110 при концентрации фермента 10 мкг/мл и температуре 50°C полностью теряла активность менее, чем за 5 минут, в то время, как фермент дикого типа в этих условиях сохраняет около 35% активности при инкубации в течение 150 минут. Мутантный фермент имеет более высокие значения K_M и более низкую активность со всеми изученными субстратами по сравнению с ферментом дикого типа.

Исходя из зависимостей остаточной активности от времени, представленных на рис. 4, были рассчитаны периоды полуинактивации для всех мутантных TvDAAO при всех

изученных температурах (табл. 1). Температурная стабильность мутантных TvDAAO коррелирует с объемом, формой и гидрофобностью остатка, вводимого в 104е положение. По увеличению температурной стабильности мутантные TvDAAO и фермент дикого типа располагаются в следующем ряду: M104A < M104S < M104V < M104 < M104L < wt-TvDAAO < M104W < TvDAAO < M104Y < M104F. Наибольший эффект стабилизации наблюдается в случае замены M104F. Например, при температуре 56°C, для которой приведены кинетические кривые на рис. 4, 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.

При введении ароматических аминокислотных остатков основополагающей причиной стабилизации TvDAAO может являться взаимодействие с близкорасположенными аминокислотными остатками, в первую очередь с остатками Phe54 и Phe258 (рис. 2), 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 нами было решено изучить взаимодействия между остатками в 54, 104 и 258 положениях с помощью направленного мутагенеза.

Изучение взаимодействия между остатками в 54, 104 и 258 положениях

Остаток Met104 находится на расстоянии около 4,5Å от остатков Phe54 и Phe258. Компьютерное моделирование показало, что введение замены M104F приводит к уменьшению указанных расстояний от остатков Phe54 и Phe258 до 3,5 и 3,7Å, соответственно (рис. 6). 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 экспериментов *in silico* 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.

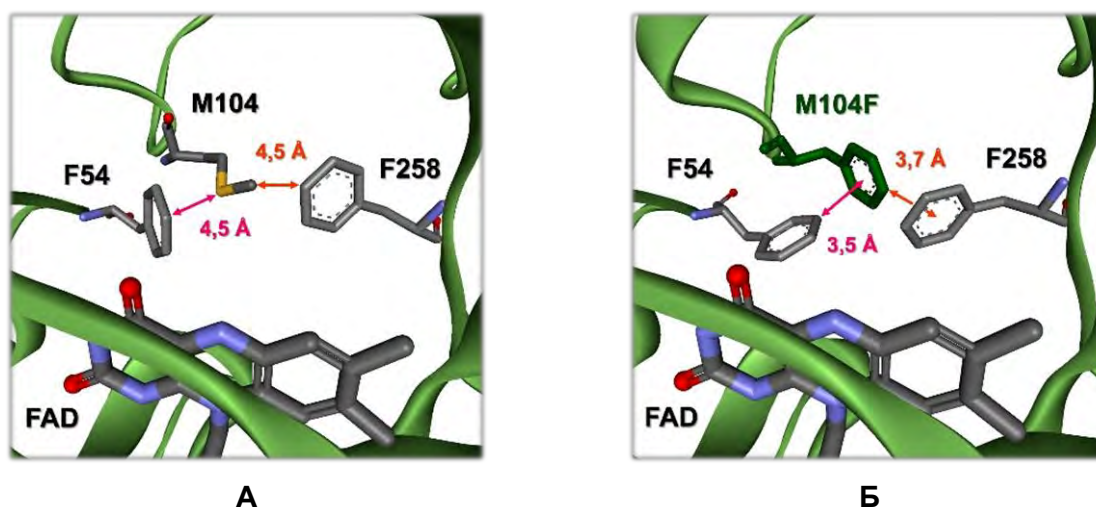


Рис. 6. Активный центр TvDAAO дикого типа (А) и компьютерной модели TvDAAO M104F (Б).

Для изучения эффекта стабилизации в случае замен M104F, M104Y и M104W и взаимодействий между остатками в 54, 104 и 258 положениях было решено ввести замены F54S и F258S в дополнение к заменам M104F, M104Y и M104W, что должно исключить любые взаимодействия, в том числе гидрофобные, между парами остатков 54/104 и 104/258. Для этого были получены мутантные TvDAAO с двойными аминокислотными заменами F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S.

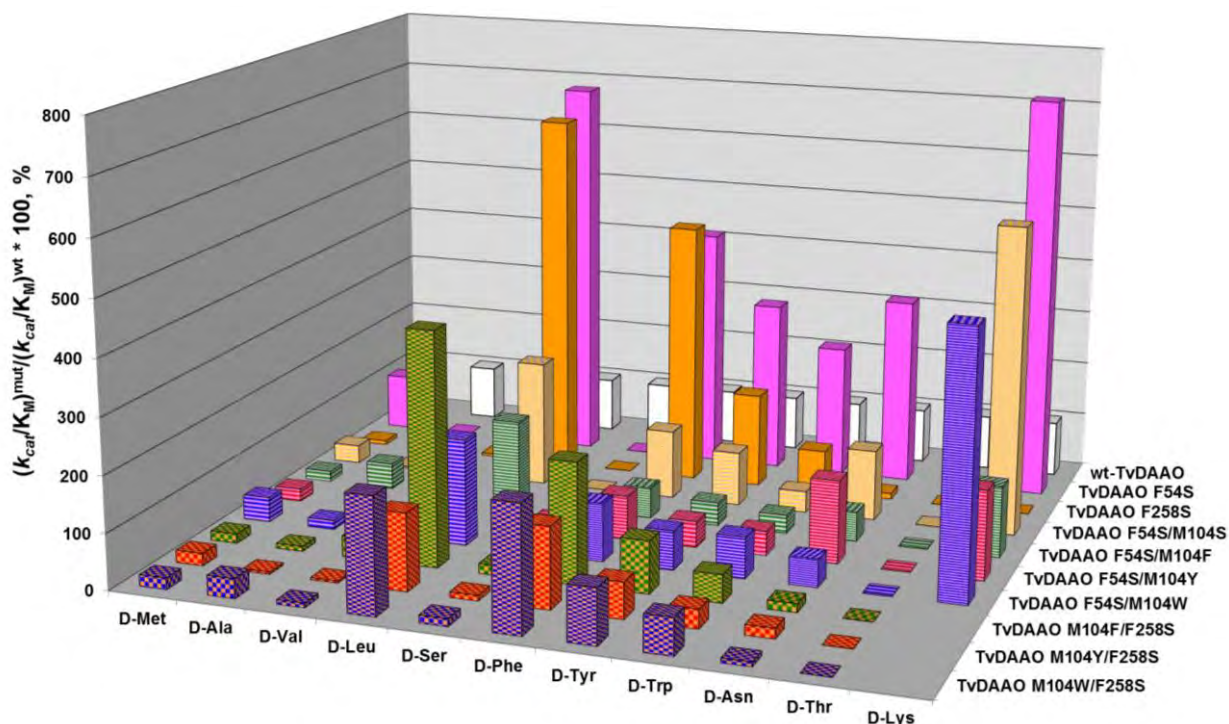


Рис. 7. Относительные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с точечными заменами F54S, F258S и двойными заменами F54S/M104S, F54S/M104F, F54S/M104Y, F54S/M104W, M104F/F258S, M104Y/F258S, M104W/F258S. За 100% принята каталитическая эффективность фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

Изучение каталитических свойств показало, что замены F54S и F258S приводят к сильному сужению спектра субстратной специфичности TvDAAO за счет полной потери активности с некоторыми субстратами и увеличением активности с остальными D-аминокислотами (рис. 7). В целом, 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-Tyr, D-Trp) 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. 7). 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.

Эксперименты по изучению термостабильности показали, что при объединении точечной замены F54S с ароматическими заменами в 104м положении эффект

стабилизации (относительно мутанта TvDAAO F54S) увеличивается в ряду F54S/M104W, F54S/M104Y, F54S/M104F, причем двойной мутант TvDAAO F54S/M104W по скорости инактивации сравним с TvDAAO F54S (рис. 8А). Аналогичная ситуация наблюдалась в случае фермента дикого типа, т.е. когда в 54 положении находится остаток Met (рис. 8А). Совершенно иная 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, причем двойные мутанты сравнимы по стабильности с точечным предшественником TvDAAO F258S (рис. 8Б).

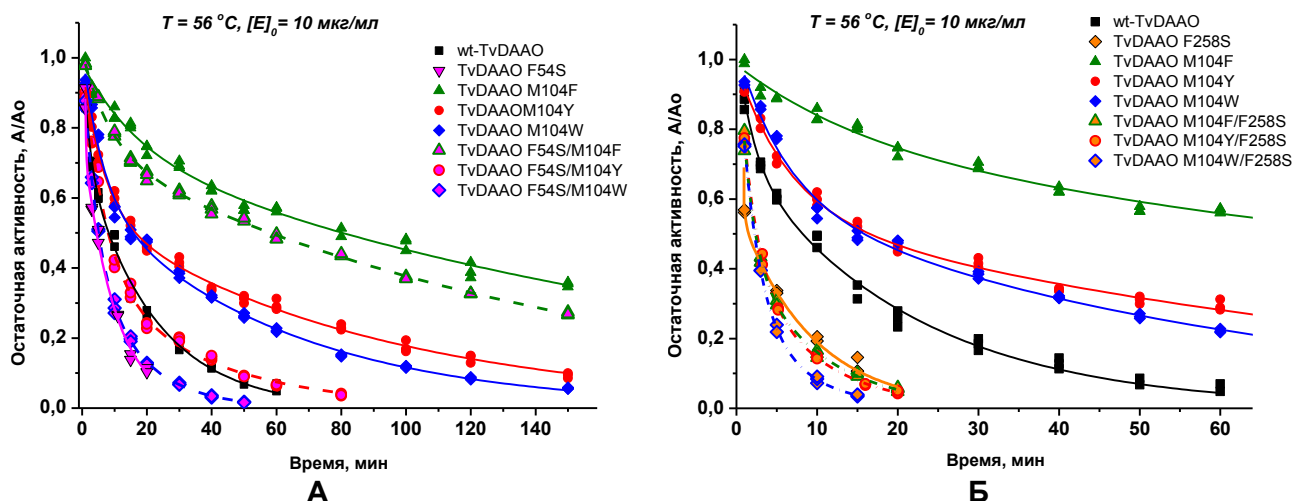


Рис. 8. Зависимости остаточной активности от времени для мутантных TvDAAO с заменами в 54 и 104 положениях (А) и с заменами в 104 и 258 положениях (Б). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, рН 8,0, температура инкубации 56 °С.

Данные по изучению температурной стабильности точечных и двойных мутантов TvDAAO показали, что взаимодействие между остатками в 104-м 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 остатков 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. Экранирование активного центра от растворителя также 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 остатками Phe54 и Phe258. Все вышеизложенное позволяет, с определенной долей уверенности, сделать вывод о том, что повышение температурной стабильности TvDAAO обусловлено взаимодействиями между остатками Phe54, Phe(Tyr, Trp)104 и Phe258, которые являются ароматическими π-π взаимодействиями. На такую возможность также указывают результаты компьютерного моделирования (рис. 6).

Оптимизация структуры FAD-связывающего домена TvDAAO

В случае TvDAAO, каждая субъединица активного фермента содержит одну молекулу нековалентно связанного FAD. 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. Исходя из этого, нами было выдвинуто предположение, что введение аминокислотных замен, которые способны усилить связывание FAD, может привести к повышению температурной стабильности TvDAAO. Для поиска таких положений нами был проведен подробный компьютерный анализ трехмерной структуры TvDAAO в области FAD-связывающего домена (рис. 9), который показал, что с молекулой кофактора 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.

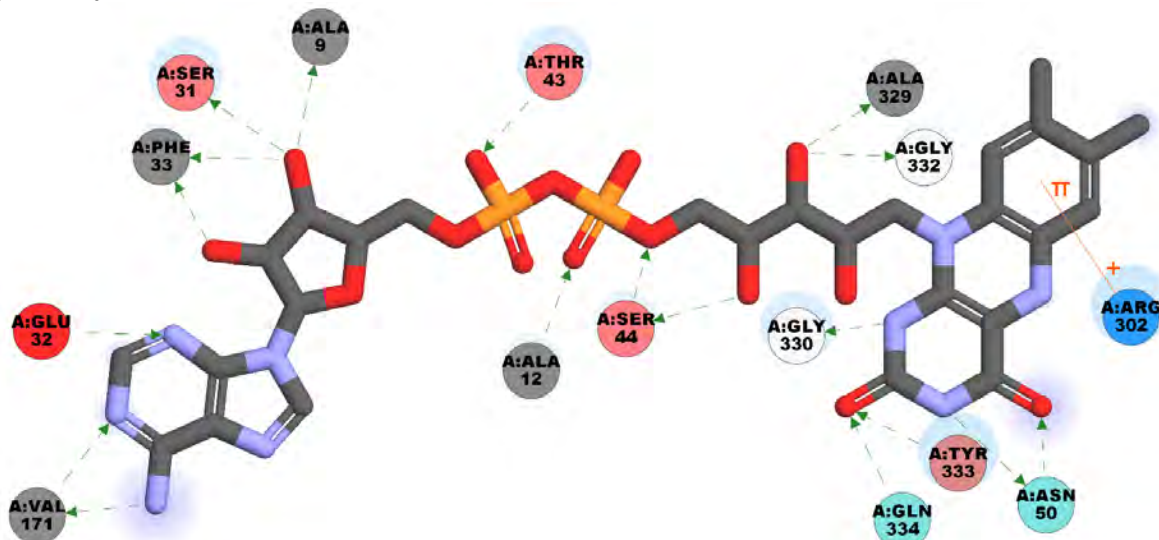


Рис. 9. Схематичное строение FAD-связывающего домена TvDAAO. Зеленым пунктиром показаны водородные связи между молекулой FAD и окружающими аминокислотными остатками, оранжевой линией показано катионное π -взаимодействие между остатком R302 и изоаллоксазиновым циклом FAD, голубым очертанием выделены аминокислотные остатки и атомы доступные растворителю.

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 данных положениях в первую очередь был основан на сравнении первичных и четвертичных структур TvDAAO и RgDAAO поскольку известно, что в RgDAAO FAD связывается наиболее прочно из всех изученных на данный момент DAAO ($K_{dis}=2 \cdot 10^{-8}$ M). На рис. 10 представлен результат наложения структур RgDAAO и TvDAAO в области кофермент-связывающего домена.

В результате комплексного анализа FAD-связывающего домена TvDAAO было решено получить 13 мутантных форм TvDAAO:

– с точечными заменами A9S, A9T, A12S, A12I, A12M, E32Q, E32R, F33D, F33H, F33S и F33T

– с двойными заменами E32Q/F33D и E32R/F33D.

В результате замены E32R/F33D не только сохраняются все водородные связи, изначально существующие в ферменте дикого типа, но и образуются новые.

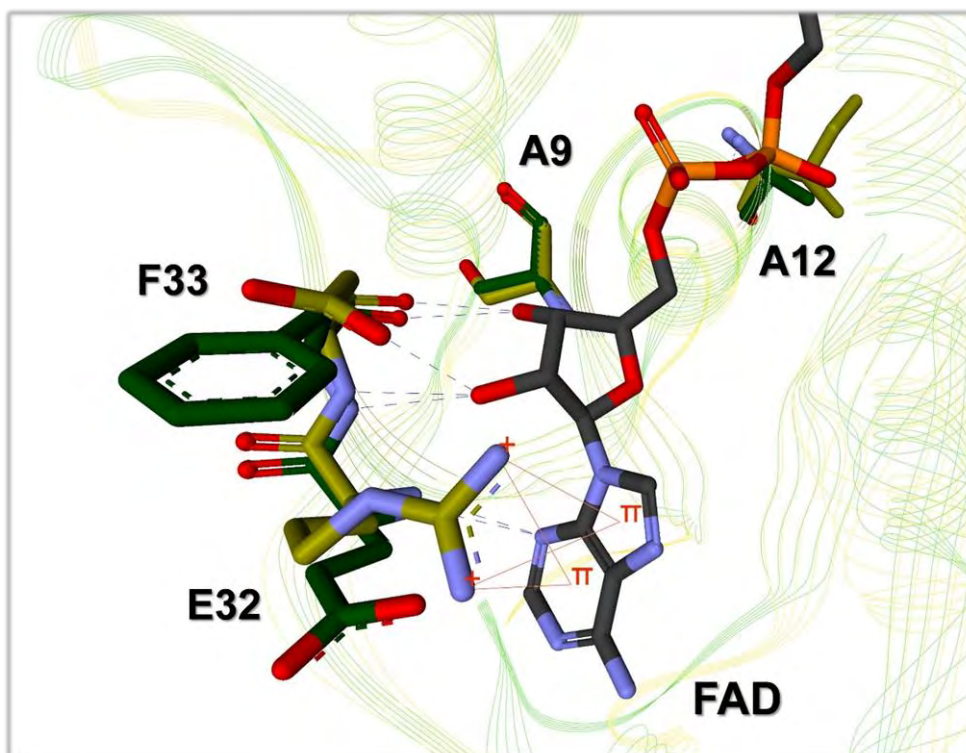


Рис. 10. Наложение структуры RgDAAO (1C0P, остатки показаны темно-желтым цветом) на структуру TvDAAO (остатки показаны темно-зеленым цветом) в области FAD-связывающего домена, RMSD = 1,27Å. Нумерация остатков по TvDAAO.

Все мутантные TvDAAO за исключением TvDAAO F33D экспрессировались в активной и растворимой формах. В случае мутанта TvDAAO F33D активность отсутствовала в бесклеточных экстрактах и в культуральной жидкости, но присутствовала в осадке клеточных стенок.

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. Эксперименты показали, что все замены в 9 и 12 положениях приводят к существенной потере стабильности TvDAAO, в то время как мутант с двойной заменой E32R/F33D оказался стабильнее фермента дикого типа. Данные положения были изучены более подробно. Оказалось, что введение аминокислотных замен F33T и F33D в структуру TvDAAO приводит к сильной дестабилизации фермента. Мутант 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 и при 50°C терял более 90% активности за 3 минуты. В случае введения замен E32Q, E32R, F33H, F33S, E32Q/F33D произошло увеличение констант скоростей первой и второй стадии термоинактивации и снижение температурной стабильности TvDAAO. Однако в случае двойной замены E32R/F33D удалось достичь существенного повышения температурной стабильности (рис. 11А). Например, 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 (рост в 4,4 раза).

Эксперименты по изучению кинетики термоинактивации в присутствии 100-кратного молярного избытка FAD показали, что TvDAAO E32R/F33D и фермент дикого типа в

одинаковой степени стабилизируются за счет добавления экзогенного FAD 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 (рис. 11Б), т.е. эффект стабилизации вероятнее всего объясняется усилением связывания молекулы FAD белковой глобулой TvDAAO.

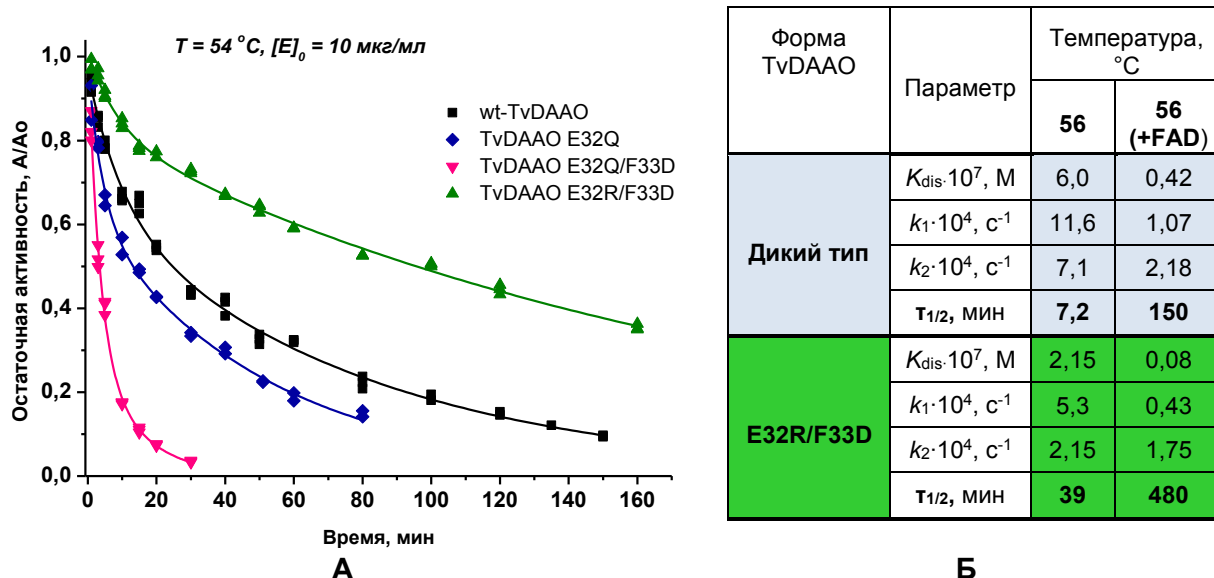


Рис. 11. А - Зависимости остаточной активности от времени для мутантных TvDAAO с заменами E32Q (◆, —), E32Q/F33D (▼, —), E32R/F33D (▲, —) и TvDAAO дикого типа (■, —). Концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0, 54°C; **Б** - кинетические параметры диссоциативной термоинактивации TvDAAO E32R/F33D и TvDAAO дикого типа при добавлении экзогенного 100-кратного молярном избытка FAD (56°C, концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0).

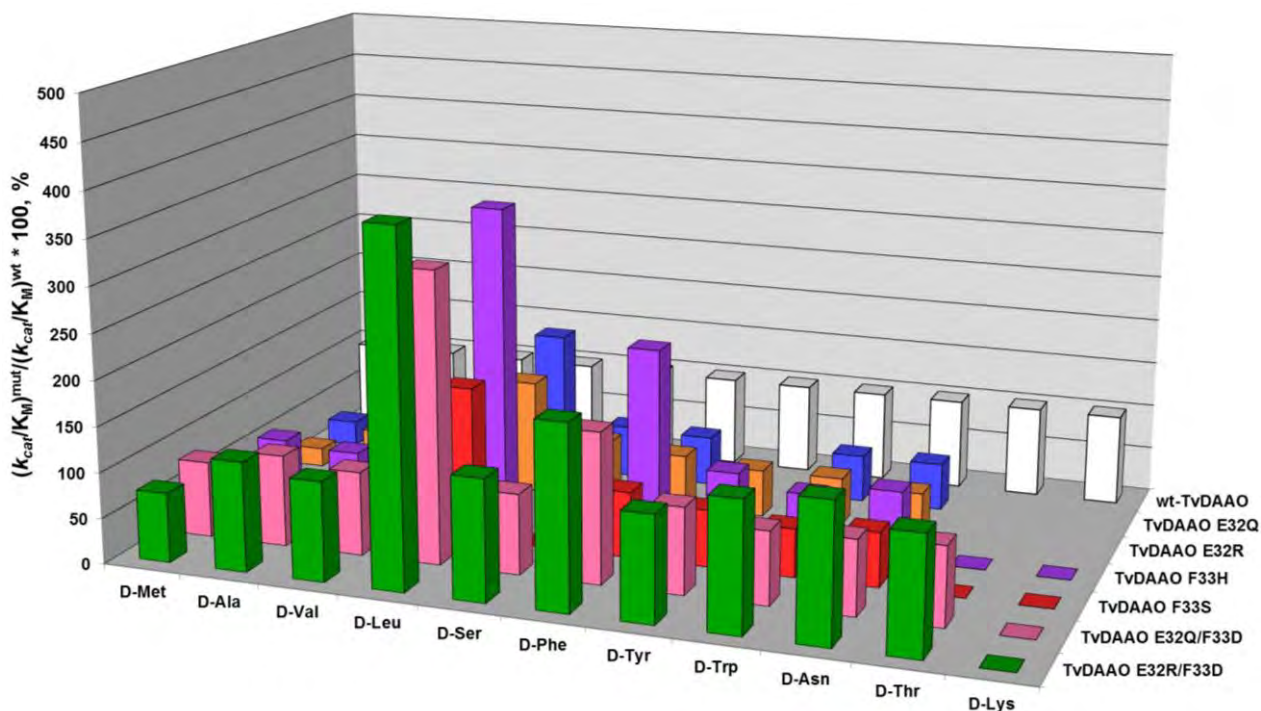


Рис. 12. Относительные значения каталитической эффективности (K_{cat}/K_M) для мутантных TvDAAO с заменами в FAD-связывающем домене. За 100% принята каталитическая эффективность фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

Введение замен в FAD-связывающий домен оказало влияние на каталитические свойства TvDAAO. 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. Примечательно, что 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 (рис. 12).

Таким образом, нами была получена мутантная TvDAAO E32R/F33D, которая обладает повышенной температурной стабильностью и улучшенными каталитическими свойствами с большинством субстратов по сравнению с TvDAAO дикого типа. Стоит упомянуть, что данная замена была выбрана на основе сравнения структуры FAD-связывающих доменов TvDAAO и RgDAAO. 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.

Объединение точечных аминокислотных замен для получения TvDAAO с улучшенными свойствами

В практике белковой инженерии задача получения мутантных ферментов с улучшенными свойствами, как правило, решается путем объединения нескольких положительных точечных аминокислотных замен в многоточечные мутанты. 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.

В рамках заключительной главы структурно-функциональных исследований TvDAAO стояла задача объединения наиболее успешных точечных аминокислотных замен в многоточечные мутантные TvDAAO в различных комбинациях с целью усиления положительных эффектов.

В нашей лаборатории в течение последних лет был получен ряд мутантных форм TvDAAO с повышенной температурной стабильностью, увеличенной каталитической активностью с рядом D-аминокислот, в том числе с цефалоспорином C. Среди них следует следующие аминокислотные замены (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.

2. **F54S, F54Y** привели к сужению спектра субстратной специфичности, увеличению каталитической активности с цефалоспорином C, однако в целом отрицательно повлияли на температурную стабильность фермента. Комбинация этих замен с заменой C108F позволила получить мутантные TvDAAO с повышенной активностью с цефалоспорином C, которые не уступали по своей температурной стабильности ферменту дикого типа.

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 . Объединение с заменой F54S позволило получить более узкоспецифичный фермент и повысить активность с частью D-аминокислот при небольшом снижении 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 закристиализована в нашей лаборатории, после чего впервые в мире была решена ее трехмерная структура с разрешением 2,8 и 1,8Å.

Положение описанных аминокислотных остатков в структуре TvDAAO показано на рис. 13. 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.

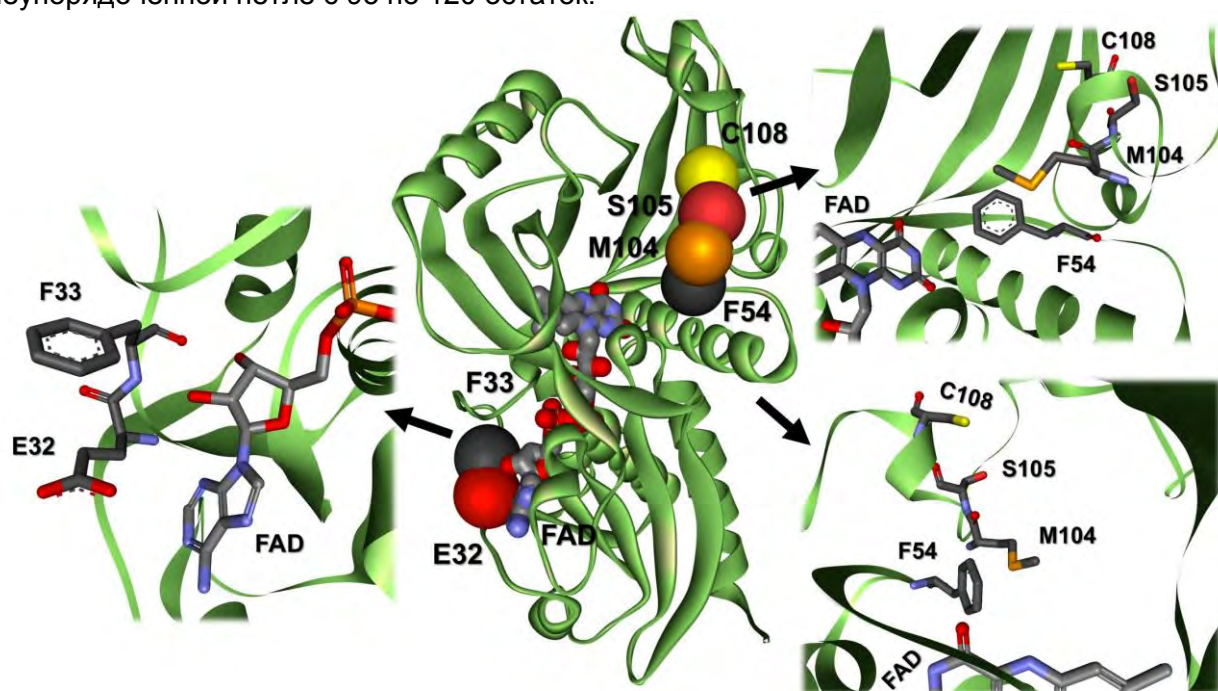


Рис. 13. Пространственное расположение остатков E32, F33, F54, M104, S105 и C108 в трехмерной структуре TvDAAO (слева показано расположение остатков в FAD-связывающем домене, справа сверху – вид спереди на активный центр, справа внизу – вид из активного центра).

Замена E32R/F33D была использована нами в качестве основы для всех многоточечных мутантов. Таким образом, нами были выбраны следующие комбинации для объединения: E32R/F33D + C108F (мутант **M1**), E32R/F33D + F54A + C108F (мутант **M2**), E32R/F33D + F54S + C108F (мутант **M3**), E32R/F33D + F54Y + C108F (мутант **M4**), E32R/F33D + M104F + C108F (мутант **M5**), E32R/F33D + S105A + C108F (мутант **M6**), E32R/F33D + M104F + S105A + C108F (мутант **M7**), E32R/F33D + M104F (мутант **M8**), 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.

Изучение каталитических свойств показало, что мутантные TvDAAO M1-M4 имеют похожие профили субстратной специфичности, но мутанты TvDAAO M2-M4 имеют более высокую каталитическую эффективность, чем TvDAAO M1. Спектр субстратной специфичности каждого мутанта определяется заменами F54A, F54S и F54Y и C108F в активном центре фермента, при этом замена E32R/F33D вносит положительный вклад в каталитическую активность практически со всеми субстратами (рис. 14). Например, с D-аминокислотами, которые являются “хорошими субстратами”, все мутантные ферменты TvDAAO M1-M4 имеют более высокую активность, чем их общий предшественник TvDAAO C108F, а также чем TvDAAO F54Y (TvDAAO F54A не был изучен в силу очень низкой стабильности). Исключением является TvDAAO M3, которая с некоторыми субстратами немного 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, аддитивное влияние на значения K_M и k_{cat} наблюдается не с каждым субстратом. 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} .

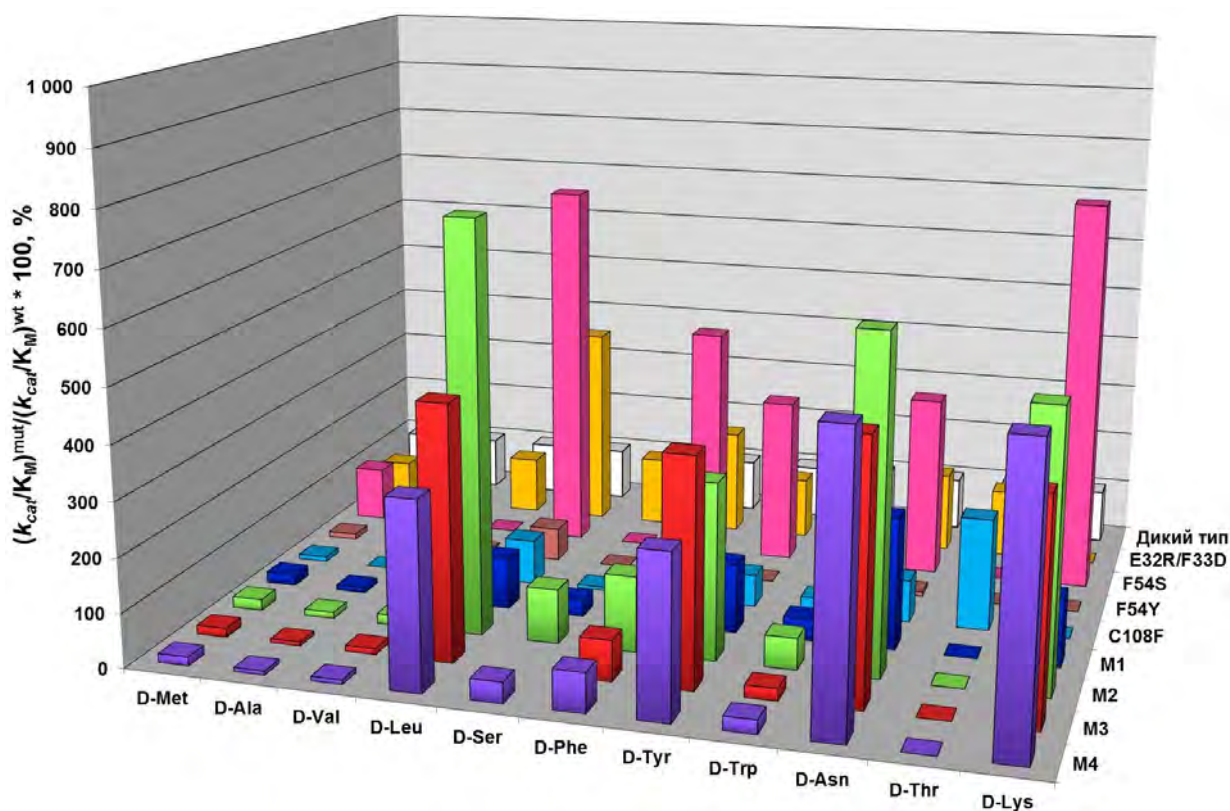


Рис. 14. Относительные значения каталитической эффективности (k_{cat}/K_M) для многоточечных мутантных TvDAAO M1-M4 и их предшественников с заменами E32R/F33D, F54S, F54Y, C108F. За 100% принята каталитическая эффективность фермента дикого типа с каждой D-аминокислотой.

Для TvDAAO M5-M9 каталитические свойства были изучены только с основным субстратом D-Met: 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 мутантов TvDAAO M5-M9 наблюдается корреляция с каталитическими параметрами исходных мутантных TvDAAO с единичными аминокислотными заменами M104F, S105A и C108F.

Для каждого многоточечного мутанта было показано, что механизм термоинактивации при повышенных температурах не изменился. Анализ полученных данных показал, что многоточечные мутанты, как и их точечные предшественники стабильнее фермента дикого типа (рис. 15, табл. 2).

TvDAAO M1-M4: между собой ферменты имеют близкую стабильность, однако наибольший стабилизационный эффект наблюдается в случае мутанта TvDAAO M1. 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). Экспериментальные данные подтверждают изначальное предположение о том, что эффекты от пространственно-удаленных замен в структуре фермента суммируются между собой.

TvDAAO M5-M7: среди трех мутантов TvDAAO M5 является наименее стабильным, а TvDAAO M6 и TvDAAO M7 по стабильности близки между собой (рис. 15, табл. 2). Все три мутанта по своей температурной стабильности превосходят предшественников TvDAAO S105A и TvDAAO C108F, близки к TvDAAO E32R/F33D, и менее стабильны, чем TvDAAO M104F. Полученные данные говорят о том, что при объединении трех замен M104F, S105A и C108F, которые располагаются в соединительной петле 95-120 с заменой E32R/F33D в кофермент-связывающем домене наблюдается очень низкая (и даже отрицательная) 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. Полученные данные позволяют 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 более высокой 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 введение замены F54S в дополнение к замене M104F не приводит к сильному снижению температурной стабильности TvDAAO, но положительно влияет на каталитические свойства.

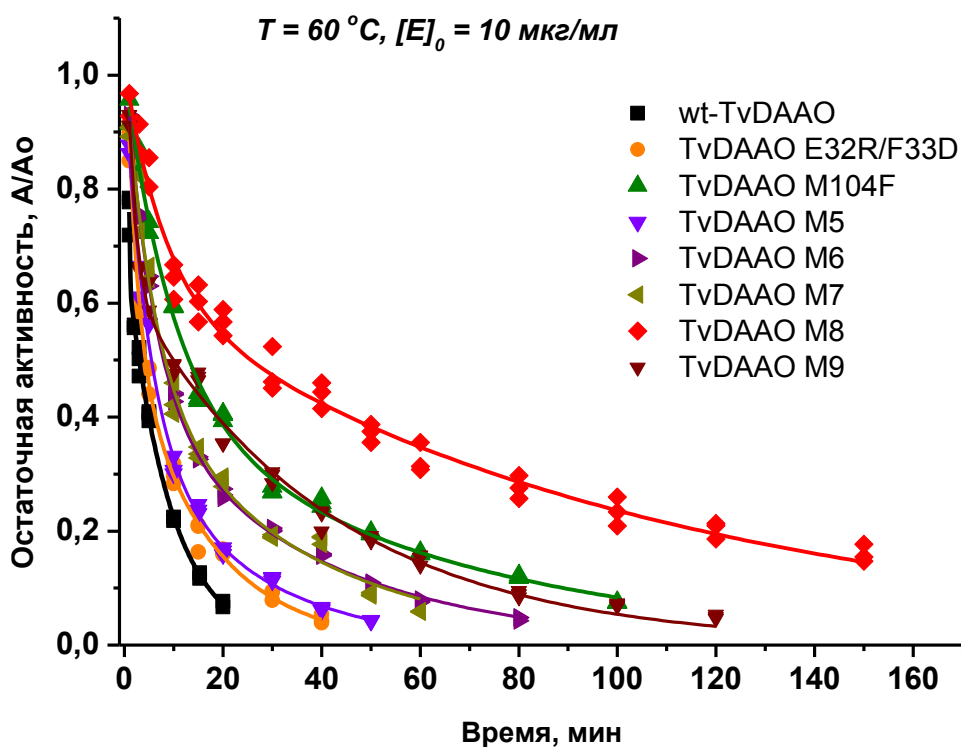


Рис. 15. Зависимости остаточной активности от времени для мутантных TvDAAO E32R/F33D (●,—), TvDAAO M104F (▲,—), TvDAAO M5 (▼,—), TvDAAO M6 (►,—), TvDAAO M7 (◄,—), TvDAAO M8 (◆,—), TvDAAO M9 (▼,—) и TvDAAO дикого типа (■,—), концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,1 М КФБ, pH 8,0. температура инкубации 60 °C

Таблица 2.

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

Форма TvDAAO	T _{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	-	-
E32R/F33D	-	300**	135	102	39	17	7,5	-	-
M104F	-	-	-	107	82	37	14,0	8,1	4,7
S105A	-	-	74	35	20	4,2	3,1	-	-
C108F	-	138	95	77	27	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%

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

TvDAAO M8-M9 по температурной стабильности значительно превосходят фермент дикого типа, а также все свои одноточечные предшественники (рис. 15, табл. 2). 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. Например, при 60°C период полуинактивации TvDAAO M8 составляет 28 минут, для TvDAAO M104F – 14 минут, а для фермента дикого типа 2,7 минуты. Если фермент дикого типа при этих условиях полностью инактивируется за 20 минут, то TvDAAO M8 через 150 минут инкубации сохраняет около 20% активности (рис. 15) Таким образом, мутантная TvDAAO M8 на данный момент является самой термостабильной из мутантных и природных оксидаз D-аминокислот, описанных в литературе.

Оценка эффекта аддитивности для всех многоточечных мутантов была проведена при 56°C. Результаты представлены в таблице 3.

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

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

Параметры $\alpha^{эксп}$ есть экспериментальные эффекты стабилизации для каждого мутанта относительно фермента дикого типа. Значения $\alpha^{теор}$ могут быть рассчитаны только для многоточечных мутантов как произведение эффектов стабилизации точечных замен. Значение $\alpha^{эксп}>1$ соответствует повышению температурной стабильности, а $\alpha^{эксп}<1$ понижению стабильности. 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 ($\alpha^{эксп}/\alpha^{теор}$) выраженное в %.

Таблица 3.

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

Таким образом, в результате изучения оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis 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. Целью таких исследований является не 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, механизма действия фермента и роли различных остатков в его структуре. Однако подобные исследования часто приводят к самым неожиданным результатам. Другое направление, которому была посвящена вторая половина работы, имеет более прикладной характер и заключается в получении мутантных форм TvDAAO с улучшенными свойствами. Оба направления тесно связаны между собой, поскольку изменения в структуре белка ведут к изменениям в его свойствах, а стремление получить желаемое свойство неизбежно ведет к изменениям в структуре. В ходе подобных исследований нами были получены мутантные TvDAAO с повышенной термостабильностью и увеличенной каталитической активностью со многими субстратами. TvDAAO E32R/F33D была положена в основу для дальнейшего получения мутантных форм TvDAAO с улучшенными свойствами, вместо фермента дикого типа. На ее основе 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. Объединение замен E32R/F33D и M104F 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. Многоточечные мутантные TvDAAO могут быть весьма перспективными для применения в качестве биокатализаторов в процессах органического синтеза с использованием оксидаз D-аминокислот. В ближайшее время 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.

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 ферментов 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. 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.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Голубев И.В.**, Комарова Н.В., Рыженкова К.В., Чубарь Т.А., Савин С.С., Тишков В.И. Исследование взаимосвязи структура–функция–стабильность в дрожжевой оксидазе D-аминокислот: гидрофобизация альфа-спиралей. *Acta Naturae*, 2014, т.6, №.3 (22), с.82-94
2. **Голубев И.В.**, Комарова Н.В., Скиргелло О.Е., Осипова Т.А., Тишков В.И. Оптимизация методики определения каталитических параметров оксидазы D-аминокислот в реакции окисления цефалоспоринона С с помощью ВЭЖХ. *Вестник Московского Университета, Серия 2: Химия*, 2014, т.55, №.2, с.95-100.

3. **Golubev I.V.**, Komarova N.V., Chubar T.A., Tishkov V.I. Investigation the role of Met104 in catalytic activity and thermal stability of D-amino acid oxidase. *FEBS Journal*, 2013, v.280, N. S1, p.173.
4. Комарова Н.В., **Голубев И.В.**, Чубарь Т.А., Хороненкова С.В., Тишков В.И. Инженерия субстратной специфичности оксидазы D-аминокислот *Trigonopsis variabilis*: направленный мутагенез остатка Phe258. *Биохимия*, 2012, т.77, №10, с.1424-1433..
5. Комарова Н.В., **Голубев И.В.**, Хороненкова С.В., Тишков В.И. Мутантная оксидаза D-аминокислот с улучшенной каталитической эффективностью к D-аминокислотам с объемными боковыми заместителями. *Известия Академии наук. Серия Химическая*, 2012, т.61, №7, с.1472-1479.
6. **Golubev I.V.**, Atroshenko D.L., Zarubina S.A., Chubar T.A., Tishkov V.I. Engineering the properties of D-amino acid oxidase from yeast *Trigonopsis variabilis* with rational design. *Abstracts of the 21th International Conference INPEC-2014*, September 10-14, 2014, Zelenogorsk, St.Petersburg region, Russian Federation, p.24.
7. **Golubev I.V.**, Tishkov V.I. Study of D-amino acid oxidase with rational design approach. *Program and Book of Abstracts of International Conference OxiZymes-2014*, July 1-4, 2014, Vienna, Austria, O36, p.53.
8. **Golubev I.V.**, Atroshenko D.L., Zarubina S.A., Tishkov V.I. D-amino acid oxidase: structure-function relationship. *Books of Abstracts of the 10th International Conference on Protein Stabilization*, May 7-9, 2014 Stresa (Lake Maggiore), Italy. p.66.
9. **Golubev I.V.**, Komarova N.V., Zarubina S.A., Tishkov V.I. Rational protein design of D-amino acid oxidase: novel biocatalysts for biotechnology. *Book of Abstracts of the International BioForum 2014*, Russian-German Session, April 22-24, 2014, Pushchino, Russia, p.22-23.
10. **Golubev I.V.**, Tishkov V.I. Novel mutants of D-amino acid oxidase for medicine and biotechnology. *Proceedings of the International Conference "Biotechnology and quality of life"*, March 18-20, 2014, Moscow, Russia, p.44-45.
11. **Golubev I.V.**, Komarova N.V., Tishkov V.I.. Study of the Structure Functional Relationships of D-amino acids Oxidase with Rational Design. *Abstracts of International Conference "Biocatalysis 2013: Fundamentals and Applications"*, July 2-5, 2013, Moscow, Russia, p.31.
12. **Голубев И.В.**, Комарова Н.В., Тишков В.И. Рациональный дизайн оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis*: взаимосвязь структуры и функции. *Материалы XX международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013»* (Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2013»), апрель 8-13, 2013, Москва, М.: МАКС Пресс, 2013.
13. **Golubev I.V.**, Komarova N.V., Savin S.S., Tishkov V.I. Biocatalysts for organic synthesis and medical diagnostic based on D-amino acids oxidase. *Proceedings of the VII Moscow International Congress "Biotechnology: State of the Art and Prospects Development"*, March 19-22, 2013, Moscow, Russia, part 2, p.136-137.
14. Atroshenko D.L., **Golubev I.V.** and Tishkov V.I. Enhancement of the activity of D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis variabilis* on D-lysine with site-directed mutagenesis. *Abstracts of the 21th International Conference INPEC-2014*, September 10-14, 2014, Zelenogorsk, St.Petersburg region, Russian Federation, p.42.
15. Zarubina S.A., **Golubev I.V.**, Komarova N.V., Chubar T.A., Tishkov V.I. New multi-point mutants of D-amino acid oxidase with enhanced properties. *Abstracts of the 21th International Conference INPEC-2014*, September 10-14, 2014, Zelenogorsk, St.Petersburg region, Russian Federation, p.49.
16. Atroshenko D.L., **Golubev I.V.**, Tishkov V.I. Influence of Met104Glu and Met104Lys substitutions on catalytic properties and thermal stability of D-amino acid oxidase from yeast *Trigonopsis variabilis*. *Program and Book of Abstracts of International Conference OxiZymes-2014*, July 1-4, 2014, Vienna, Austria, P2, p.60.
17. Zarubina S.A., **Golubev I.V.**, Komarova N.V., Chubar T.A., Tishkov V.I. Preparation and characterization of multi-point mutants of D-amino acid oxidase from the yeast *Trigonopsis*

- variabilis* with improved properties. *Program and Book of Abstracts of International Conference OxiZymes-2014*, July 1-4, 2014, Vienna, Austria, P114, p.172.
18. Tishkov V.I, Komarova N.V., **Golubev I.V.**, Zarubina S.A., Atroshenko D.L., Chubar T.A., Savin S.S. Engineering stability and catalytic properties of D-amino acid oxidase. *Books of Abstracts of the 10th International Conference on Protein Stabilization*, May 7-9, 2014 Stresa (Lake Maggiore), Italy. p.25.
 19. **Golubev I.V.**, Komarova N.V., Tishkov V.I. Protein engineering of D-amino acid oxidase from yeast *Trigonopsis variabilis*. *Materials of the XII International Conference of Young Scientists Forests of Eurasia*, Sept. 30 – Oct. 6, 2012, Belorussia - Lithuania, M.: MSFU, 2012., p.335-336.
 20. Komarova N.V., **Golubev I.V.**, Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. Engineering of substrate specificity of TvDAAO: Phe54 and Cys108 mutagenesis. *Materials of the XII International Conference of Young Scientists Forests of Eurasia*, Sept. 30 – Oct. 6, 2012, Belorussia - Lithuania, M.: MSFU, 2012., p.340-341.
 21. Tishkov V.I., Komarova N.V., **Golubev I.V.**, Baldin S.M., Savin S.S. Engineered D-amino acid oxidase for medicine diagnostics. *Programme & Abstracts of V International Meeting "Early events in Human Pathologies"*, July 9-12, 2012, Listvyanka, Baikal, Russia, p.37.
 22. Komarova N.V., **Golubev I.V.**, Ryzhenkova K.V., and Tishkov V.I. Improvement of stability of D-amino acid oxidase using rational mutagenesis approach. *Books of Abstracts of the 9th International Conference on Protein Stabilisation*, May 2-4, 2012, Lisbon, Portugal, p.24.
 23. Savin S.S., Komarova N.V., **Golubev I.V.**, Ryzhenkova K.V., Savina L.I., Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. Engineering of substrate specificity of yeast D-amino acid oxidase. *Abstracts of the 20th INPEC Conference "Engineering Protein-Systems, Functions and Applications"*, April 18-20, 2012, Taipei, Taiwan, P6, p.39.
 24. **Голубев И.В.**, Комарова Н.В., Тишков В.И. Белковая инженерия оксидазы D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis*. *Материалы XIX международной молодежной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013»* (Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2012»), апрель 9-13, 2012, Москва - М.: МАКС Пресс, с.516.
 25. Komarova N.V., **Golubev I.V.**, Tishkov V.I. Protein design of D-amino acid oxidase for improvement of its catalytic efficiency in Cephalosporin C oxidation. *Book of abstracts of International Conference "Lomonosov and Humboldt: Scientific Co-operation between Russia and Germany"*, November 14-17, 2011, Moscow, Russia, p.217-218.
 26. **Голубев И.В.** Рекомбинантные биокатализаторы для получения биологически активных соединений. *Материалы школы-конференции молодых ученых "Фундаментальная наука для биотехнологии и медицины"*, сентябрь 29-30, 2011, Москва, Россия, с.15-16.
 27. Komarova N.V., **Golubev I.V.**, Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. New mutant D-amino acid oxidases with improved properties. *Book of abstracts of the 2nd International School: «Nanomaterials and Nanotechnologies in Living Systems. Safety and Nanomedicine»*, September 19-24, 2011, Moscow region, Russia, p.175-176.
 28. Komarova N.V., **Golubev I.V.**, Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. Genetically engineered forms of D-Amino acid oxidase with improved properties. *Book of abstracts of the International School-Conference of Young Scientists for Molecular Biology and Biotechnology of Forest*, September 12-18, 2011, Bryansk, Russia, MSU of Forest Press, Moscow, 2011, p.262-263.
 29. Berezin A.I., Komarova N.V., **Golubev I.V.**, Khoronenkova S.V., Savin S.S., Tishkov V.I. Temperature stability of D-amino acid oxidase. *Book of abstracts of the International School-Conference of Young Scientists for Molecular Biology and Biotechnology of Forest*, September 12-18, 2011, Bryansk, Russia, MSU of Forest Press, Moscow, 2011, p.257-258.
 30. Комарова Н.В., **Голубев И.В.**, Хороненкова С.В., Тишков В.И. Направленный мутагенез остатка Phe54 в оксидазе D-аминокислот из *Trigonopsis variabilis*: влияние на каталитические свойства и стабильность. *Материалы XVIII Молодежной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011»*, секция «Химия», апрель 11-15, 2011, Москва, с.409.