

УДК 577.322.63

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ СТРУКТУРЫ ДРОЖЖЕВОЙ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ

В.И. Тишков^{1,2,3}, С.В. Хороненкова^{1,2}, Н.В. Черскова^{2,3}, С.С. Савин^{2,3}, И.В. Упоров¹

(¹кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; ²ООО "Инновации и высокие технологии МГУ"; ³Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН; e-mail: vitishkov@gmail.com)

Оксидаза D-аминокислот из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) используется в фармацевтической промышленности и тонком органическом синтезе, однако для широкого применения фермента необходимо повышать его стабильность и получать новые мутантные формы с заданной субстратной специфичностью. Попытки кристаллизации этого фермента в течение последних десятилетий не увенчались успехом. Для проведения экспериментов по белковой инженерии TvDAAO методом гомологичного моделирования была построена модель трехмерной структуры этого фермента. На основе анализа полученной структуры из шести остатков цистеина для направленного мутагенеза выбраны остатки Cys108 и Cys298.

Ключевые слова: оксидаза D-аминокислот, *Trigonopsis variabilis*, структура, компьютерное моделирование, белковая инженерия.

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3, DAAO) широко распространена в природе и играет важную роль в регуляции жизнедеятельности у прокариот и эукариот, особенно у млекопитающих [1–2]. На практике наиболее широкое применение нашел фермент из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO). Он используется в биокаталитическом двухферментном процессе получения из цефалоспорина C 7-аминоцефалоспориновой кислоты – исходного соединения для синтеза цефалоспориновых антибиотиков различных поколений, а также для получения неприродных L-аминокислот, оптически активных соединений и α -кетокислот [3–4].

В нашей лаборатории фермент TvDAAO был клонирован, а затем экспрессирован в клетках *E. coli* в активной и растворимой формах [5]. Мы также разработали высокоэффективную методику очистки, позволяющую получать препараты гомогенного фермента в три стадии с выходом по активности более 65%. В настоящее время проводятся систематические исследования по изучению стабильности и механизма действия TvDAAO.

Несмотря на то, что TvDAAO является наиболее стабильным ферментом среди изученных оксидаз D-аминокислот, он довольно быстро инактивируется в ходе реакции. Наиболее вероятной причиной потери активности может быть окисление остатков цистеина пероксидом водорода, который является одним из

продуктов реакции. Всего в белковой глобуле TvDAAO имеется шесть остатков цистеина. Вполне очевидно, что только некоторые из них имеют существенное влияние на стабильность фермента. Выбор наиболее перспективных остатков цистеина для последующего направленного мутагенеза может быть сделан на основе трехмерной структуры фермента, однако, несмотря на то что впервые TvDAAO был выделен более 30 лет назад, трехмерная структура этого фермента так и не была определена. По всей видимости, это связано с тем, что при высоких концентрациях фермента вместо димера образуются олигомеры более высокого порядка.

Цель данной работы – компьютерное моделирование трехмерной структуры оксидазы D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis* (TvDAAO), анализ этой структуры и выбор наиболее перспективных остатков цистеина для повышения стабильности фермента методом направленного мутагенеза.

Экспериментальная часть

Выравнивание аминокислотных последовательностей TvDAAO и оксидаз D-аминокислот с известной трехмерной структурой проводили с помощью программы "Clustal X 1.83". Компьютерная модель трехмерной структуры TvDAAO была получена методом гомологичного моделирования с использованием пакета программ "Insight II" на станции мо-

лекулярной графики “*Silicon Graphics*”. В качестве базовой использовали структуру RgDAAO в комплексе с D-аланином (PDB1COP.ENT) с разрешением 1,2 Å [6].

Анализ полученной модельной структуры проводили с помощью пакета программ “*Accelrys Discovery Studio 2.1*”. Этот же пакет использовали для получения изображений белковой глобулы.

Результаты и их обсуждение

Компьютерное моделирование структуры оксидазы D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis*

Известно, что точность моделирования зависит от двух основных параметров – степени гомологии меж-

ду исходным и моделируемым ферментом и степени разрешения структуры, которая используется в качестве базовой, исходной.

В настоящее время известны структуры для трех оксидаз D-аминокислот, полученных из почек свиньи и человека (pkDAAO и hDAAO соответственно) [7–13] и дрожжей *R. gracilis* (RgDAAO) [6, 14], а также для специализированного фермента – глицинооксидазы [15, 16] (таблица). Как видно из таблицы, все структуры pkDAAO и hDAAO не очень высокого качества – их разрешение не превышает 2,5 Å. Эти структуры очень похожи друг на друга (величина RMSD для C α -атомов составляет около 1,2 Å), т.е. ни одна из них не является уникальной, и для рас-

Структуры оксидазы D-аминокислот из разных источников

Описание структуры	Разрешение, Å	Код PDB
pkDAAO		
Свободный фермент [7]	3,0	1AA8
Свободный фермент, уточненная структура [7]	2,5	1VE9
Комплекс с бензоатом [8]	2,6	1KIF
Комплекс с <i>o</i> -аминобензоатом [9]	2,5	1AN9
Восстановленный пурпурный интермедиат в комплексе с D-пролином [9]	2,5	1EVI
Восстановленная форма фермента в комплексе с иминотриптофаном [10]	3,1	1DDO
Комплекс с 3-метил-2-оксвалериановой кислотой [10]	3,2	1DAO
hDAAO		
Комплекс с бензойной кислотой [11]	2,5	2DU8
Свободная холоформа фермента [12]	2,9	2E48
Комплекс с <i>o</i> -аминобензоатом [12]	2,6	2E4A
Комплекс с иминосерином [12]	3,2	2E49
Комплекс с иминодофамином [12]	2,7	2E82
Комплекс с 4Н-фуоро(3,2-в)-пиррол-5-карбоновой кислотой [13]	2,5	3CUK
RgDAAO		
Свободный фермент [6]	1,73	1COL
Комплекс с D-аланином [6]	1,20	1COP
Комплекс с L-лактатом [6]	1,46	1COK
Комплекс с двумя молекулами антранилата [14]	1,9	1COI
Глицинооксидаза из <i>B. Subtilis</i>		
Свободный фермент [15]	2,3	1NG3
Комплекс с ацетилглицином [15]	2,6	1NG4
Комплекс с гликолевой кислотой [16]	1,8	1RYI

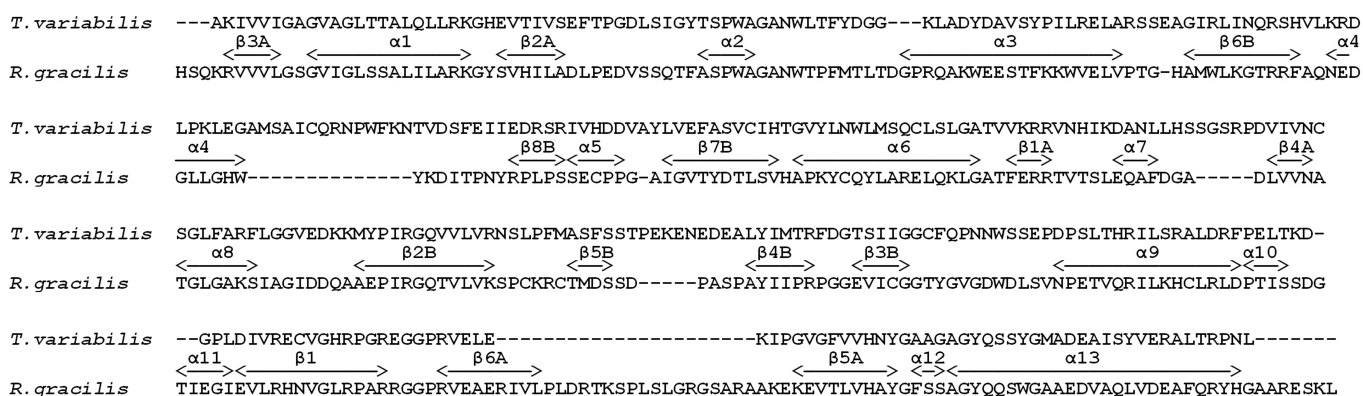


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей оксидаз D-аминокислот из дрожжей *T. variabilis* и *R. gracilis*. Над последовательностью RgDAAO указаны структурные элементы для структуры PDB1COP.ENT. Выравнивание выполнено с помощью программы “Clustal X” (версия 1.83)

смотрения можно использовать только один из этих ферментов. В случае RgDAAO имеется несколько структур высокого разрешения вплоть до 1,20 Å. Кроме того, сравнение аминокислотных последовательностей TvDAAO с последовательностями pkDAAO, hDAAO и RgDAAO свидетельствует о том, что степень гомологии между TvDAAO и RgDAAO гораздо выше, чем таковая для TvDAAO, с одной стороны, и pkDAAO и hDAAO – с другой. Поэтому для построения компьютерной трехмерной модели TvDAAO в качестве исходной была использована структура RgDAAO, имеющая в базе трехмерных структур ферментов “Protein Data Base” (PDB) код 1COP с самым высоким на настоящий момент разрешением 1,2 Å [6].

Моделирование структуры DAAO из *T. variabilis* проводилось методом гомологичного моделирования на станции молекулярной графики “Silicon Graphics” с помощью пакета программ “Insight II”.

Первый этап моделирования – выравнивание аминокислотных последовательностей TvDAAO и RgDAAO с помощью программы “Clustal X” версии 1.83 (рис. 1). В соответствии с результатами выравнивания проводили наложение консервативных участков TvDAAO на таковые в трехмерной структуре RgDAAO. Конформации участков полипептидной цепи, соединяющих консервативные сегменты, определяли поиском в базе данных “петлевых структур”, входящей в программный пакет. Далее проводили оптимизацию полученной структуры с использованием силовых полей “Amber” и “CVFF” [67]. Для снятия возможных конформационных напряжений струк-

тура была отрелаксирована с помощью метода молекулярной механики (1000 шагов минимизации, 5 нс молекулярной динамики с последующими 1000 шагами минимизации). Модельная структура субъединицы TvDAAO представлена на рис. 2, а. Для сравнения приведены данные рентгеноструктурного анализа для DAAO из почек свиньи и *R. gracilis* (рис. 2, а и б соответственно). Из рис. 2 видно, что общий фолдинг верхней половины субъединицы одинаков для всех трех структур. Модельная структура домена, связывающего адениновую часть FAD, в DAAO из *T. variabilis* имеет большее сходство со структурой таковой в pkDAAO, но не в RgDAAO.

Второй этап моделирования – построение димера TvDAAO на основе соответствующей структуры RgDAAO. Результаты представлены на рис. 3. Оказалось, что в димерах TvDAAO и RgDAAO субъединицы неодинаково ориентированы относительно друг друга. В обеих молекулах связывание субъединиц в димере происходит по классическому типу “голова-хвост”, однако в димере RgDAAO субъединицы расположены в одной плоскости (рис. 3, б), а в димере TvDAAO субъединицы смещены друг относительно друга по оси, перпендикулярной оси симметрии в молекуле RgDAAO (рис. 3, а).

Следует отметить, что экспертная оценка результатов моделирования с помощью специальных программ (“CheckPro” и др.) не выявила элементов структуры с высокими напряжениями, что позволяет сделать вывод о надежности и достоверности построенных моделей. Кроме того, из рис. 3, а видно: полученная в результате моделирования ориентация

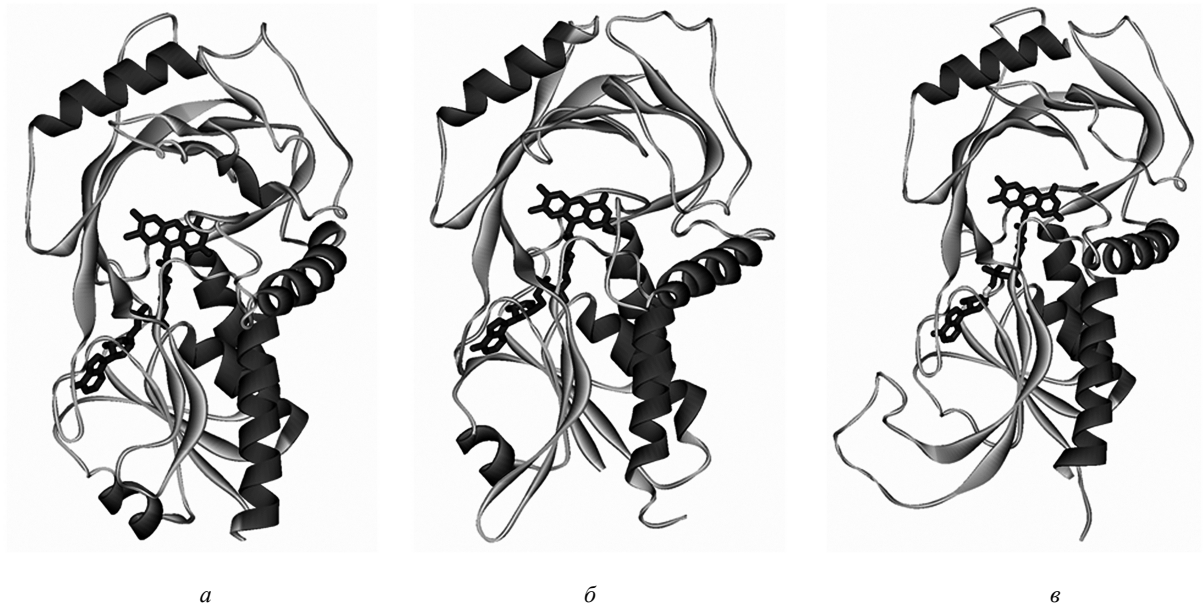


Рис. 2. Модельная структура субъединицы DAAO из *T. variabilis* (а); структуры субъединиц DAAO из почек свиньи (б) и дрожжей RgDAAO (в)

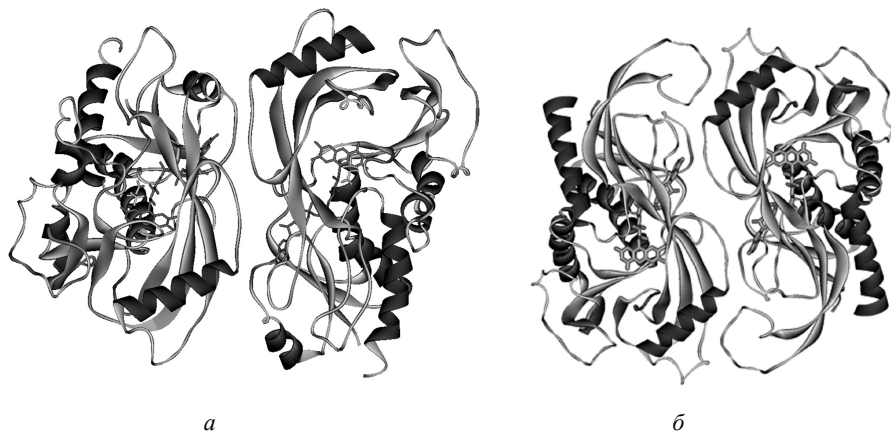


Рис. 3. Модельная структура димера TvDAAO (а); структура димера RgDAAO PDB1COP.ENT (б)

субъединиц в димере TvDAAO такова, что вход в активный центр фермента находится вдали от участка, ответственного за субъединичный контакт, т.е. имеет оптимальное для протекания реакции расположение.

Анализ модельной структуры с целью выбора перспективных положений для мутагенеза

Полученная модельная структура TvDAAO была использована для выбора остатков цистеина, замена которых с помощью направленного мутагенеза позволит повысить стабильность фермента. На рис. 4, а в двух проекциях (фронтальная и обратная) пред-

ставлена глобула TvDAAO, в которой атомы обозначены шариками в соответствии с размерами их вандер-ваальсовых радиусов. На фронтальной проекции (рис. 4, а, левая структура) хорошо видно, что в активном центре фермента имеется два входа (сквозная полость в центре структуры рядом с аллоксазиновым кольцом FAD (указано стрелкой)). Также хорошо видно, что вход с фронтальной части имеет достаточно большой размер. На второй проекции, где изображена обратная сторона белковой глобулы (рис. 4, а, правая структура), также хорошо видно, что и с этой стороны аллоксазиновое кольцо FAD доступно действию растворителя. Такая организация

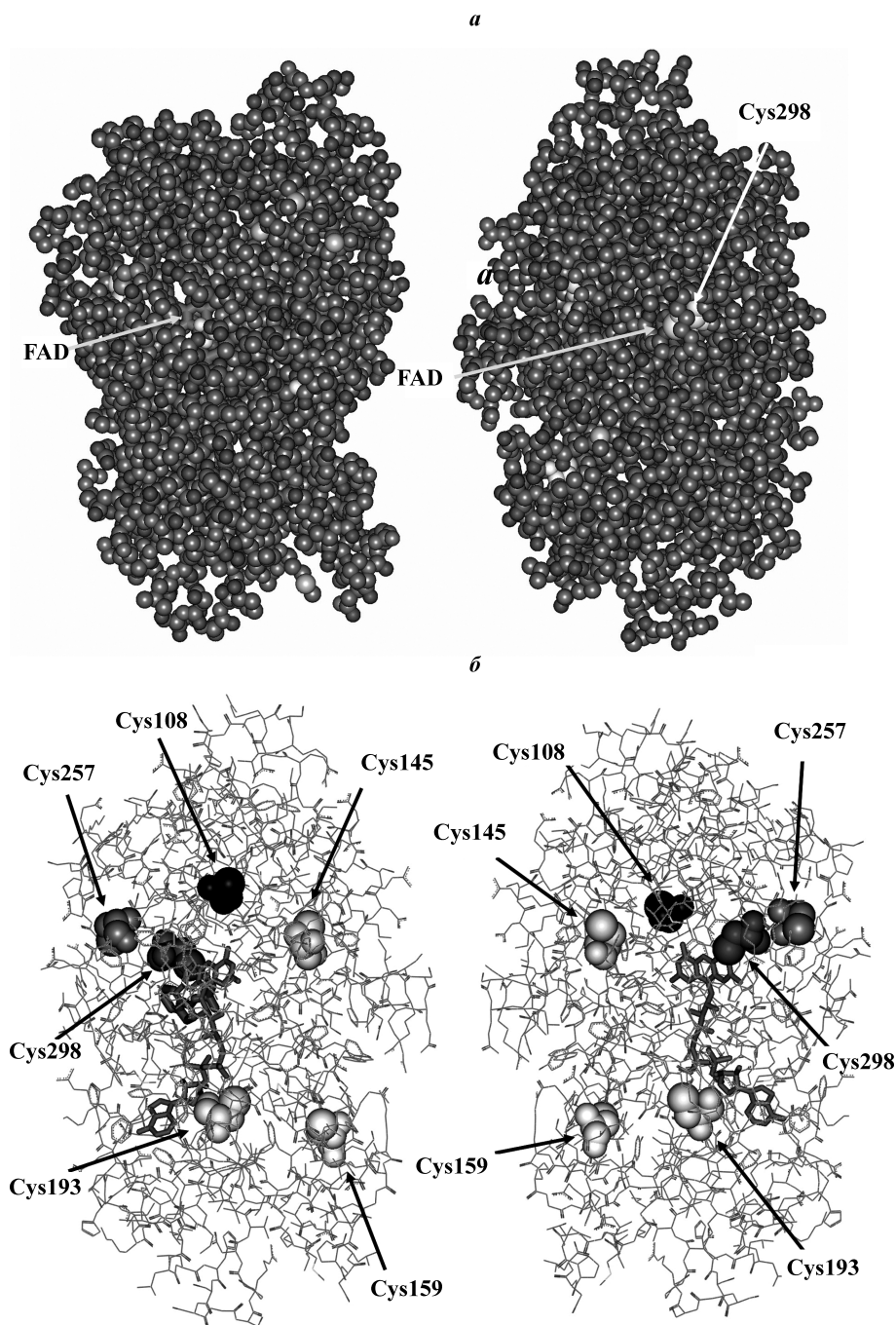


Рис. 4. Субъединица DAAO из *T. variabilis*, представленная в двух проекциях (вид спереди и сзади, левая и правая структуры соответственно): *a* – размеры атомов соответствуют их ван-дер-ваальсовым радиусам; *б* – та же структура, представленная тонкими линиями, в которой шариками указаны остатки цистеина

активного центра позволяет хорошо объяснить тот факт, что в ходе реакции после окисления D-аминокислоты восстановление кислорода до пероксида водорода может проходить до диссоциации иминокислоты из активного центра – молекула кислорода вза-

имодействует с восстановленным аллоксазиновым кольцом за счет попадания в активный центр через второй вход. Сразу отметим, что непосредственно на втором входе в активный центр с обратной стороны расположен остаток Cys298 (рис. 4, *a*, правая струк-

тура). На рис. 4, б модельная структура TvDAAO для удобства анализа и большей наглядности представлена в виде линий также в двух проекциях – вид спереди и сзади. Все шесть остатков цистеина обозначены шариками. На рисунке хорошо видно, что два остатка цистеина (Cys159 и Cys193) расположены в кофермент-связывающем домене, причем остаток Cys193 расположен вблизи пирофосфатной части кофермента FAD и, по-видимому, может влиять на его связывание, а остаток Cys193 находится на периферии и не должен оказывать влияния на связывание кофактора. В субстрат-связывающем домене расположены четыре остатка цистеина. Как уже отмечалось выше, наиболее близко к обратной стороне аллоксазинового кольца FAD расположен остаток Cys298. Совершенно очевидно, что его окисление должно происходить в первую очередь, и такая модификация может очень сильно повлиять на каталитическую активность фермента. Вторым по значимости является остаток Cys108. Он расположен в верхней части субстрат-связывающего домена и должен непосредственно контактировать с субстратом, в частности с объемной молекулой цефалоспорина C. Остатки Cys145 и Cys257 расположены в субстрат-связывающем домене слева и справа от аллоксазинового кольца. Остаток Cys257 доступен действию растворителя, и вероятность его окисления в ходе реакции довольно высока. Остаток Cys145 хорошо экранирован от растворителя, и его окисление наименее вероятно.

Таким образом, на основании анализа модельной структуры TvDAAO можно расставить следующие приоритеты при направленном мутагенезе остатков цистеина.

1. **Cys298.** Этот остаток расположен на задней части субстрат-связывающего домена, контролирует второй вход в активный центр и непосредственно контактирует с аллоксазиновой частью FAD.

2. **Cys108.** Остаток расположен в верхней части субстрат-связывающего домена активного центра. Его модификация может существенно влиять на эффективность связывания субстратов.

3. **Cys257.** Вероятность окисления остатка достаточно высока, однако в силу его расположения окисление не должно существенно влиять на каталитические свойства.

4. **Cys193.** Остаток расположен в кофермент-связывающем домене и непосредственно контактирует с пирофосфатной частью. Его окисление маловероятно в силу достаточно прочного связывания FAD, однако если такое произойдет, то прочность связывания кофермента резко упадет.

5. **Cys145.** Остаток расположен на боковой части субстрат-связывающего домена и экранирован от растворителя. Вероятность его окисления невелика.

6. **Cys159.** Остаток расположен на периферии кофермент-связывающего домена, непосредственно с FAD не контактирует. Его окисление не должно сильно повлиять на каталитические свойства.

На основании данного анализа в качестве наиболее перспективных для направленного мутагенеза мы выбрали остатки Cys298 и Cys108. Результаты по направленному мутагенезу этих остатков будут представлены в других публикациях. Однако следует отметить, что полученные данные свидетельствуют о влиянии этих остатков не только на химическую (операционную), но и на температурную стабильность, а также и на субстратную специфичность. Например, у двух полученных мутантов – Cys108Phe и Cys108Ala – в реакции окисления цефалоспорина C каталитическая эффективность ($k_{\text{кат}}/K_M$) была выше в 3 и 4 раза соответственно по сравнению с таковой для TvDAAO дикого типа [19]. Таким образом, результаты направленного мутагенеза подтвердили правильность моделирования структуры фермента.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 08-04-01703-а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pollegioni L., Piubelli L., Sacchi S., Pilone M. S., Molla G. // Cell. Mol. Life Sci. 2007. **64**. P. 1373.
2. Khoronenkova S. V., Tishkov V. I. // Biochemistry (Mosc.). 2008. **73**. P. 1511.
3. Хороненкова С.В., Тишков В.И. // Биохимия. 2005. **70**. С. 51.
4. Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., E. Rosini, R. Verga, Pilone M. S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. **78**. P. 1.
5. Давыдова Е.Е., Тишков В.И. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. **43**. С. 353.
6. Umhau S., Pollegioni L., Molla G., Diederichs K., Welte W., Pilone M.S., Ghisla S. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000. **97**. P. 12463.
7. Mizutani H., Miyahara I., Hirotsu K., Nishina Y., Shiga K., Setoyama C., Miura R. // J. Biochem. (Tokyo). 1996. **120**. P. 14.

8. Mattevi A., Vanoni M.A., Todone F., Rizzi M., Teplyakov A., Coda A., Bolognesi M., Curti B. // Proc. Natl. Acad. Sci. 1996. **93**. P. 7496.
9. Miura R., Setoyama C., Nishina Y., Shiga K., Mizutani H., Miyahara I., Hirotsu K. // J. Biochem (Tokyo). 1997. **122**. P. 825.
10. Todone F., Vanoni M.A., Mozzarelli A., Bolognesi M., Coda A., Curti B., Mattevi A. // Biochemistry. 1997. **36**. P. 5853.
11. Kawazoe T., Tsuge H., Pilone M.S., Fukui K. // Protein Sci. 2006. **15**. P. 2708.
12. Kawazoe T., Tsuge H., Imagawa T., Aki K., Kuramitsu S., Fukui K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2007. **355**. P. 385.
13. Sparey T., Abeywickrema P., Almond S., Brandon N., Byrne N., Campbell A., Hutson P.H., Jacobson M., Jones B., Munshi S., Pascarella D., Pike A., Prasad G.S., Sachs N., Sakatis M., Sardana V., Venkatraman S., Young M.B. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. **18**. P. 3386.
14. Pollegioni L., Diederichs K., Molla G., Umhau S., Welte W., Ghisla S., Pilone M.S. // J. Mol. Biol. 2002. **324**. P. 535.
15. Settembre E.C., Dorrestein P.C., Park J.H., Augustine A.M., Begley T.P., Ealick S.E. // Biochemistry. 2003. **42**. P. 2971.
16. Murtl M., Diederichs K., Welte W., Molla G., Motteran L., Andriolo G., Pilone M.S., Pollegioni L. // J. Biol. Chem. 2004. **279**. P. 29718.
17. Dauber-Osguthorpe P., Roberts V.A., Osguthorpe D.J., Wolff J., Genest M., Hagler A.T. // Proteins. 1988. **4**. P. 31.
18. Pilone M.S. // Cell. Mol. Life Sci. 2000. **57**. P. 1732.
19. Тишков В.И., Хороненкова С.В., Савина Л.И. // Патент РФ № 2 362 806. Бюллетень "Изобретения. Полезные модели", 2009. № 21.

Поступила в редакцию 20.01.10

3D-STRUCTURE MODELING OF YEAST D-AMINO ACID OXIDASE

V.I. Tishkov, S.V. Khoronenkova, N.V. Cherskova, S.S. Savin, I.V. Uporov

(Division of Chemical Enzymology, Chemistry Faculty, M.V. Lomonosov Moscow State University; Innovations and High Technologies MSU Ltd.; A.N. Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences)

D-amino acid oxidase from yeast *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) is used in pharmaceutical industry and fine organic synthesis but for future practical application new mutant forms of the enzyme with improved stability and catalytic properties have to be prepared. Experiments for crystallization of TvDAAO were carried out last three decades without any success. For protein engineering of the enzyme by rational design approach the model 3D-structure of TvDAAO was built using homology modeling method. Cys108 and Cys298 residues were proposed for site-directed mutagenesis after analysis of the enzyme model structure.

Key words: *D-amino acid oxidase, Trigonopsis variabilis, structure, computer modeling, protein engineering.*

Сведения об авторах: Тишков Владимир Иванович – профессор кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com); Хороненкова Светлана Владимировна – мл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, вед. специалист-биотехнолог ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук; Черскова Наталья Владимировна – аспирант Института биохимии им. А.Н. Баха РАН; Савин Святослав Сергеевич – мл. науч. сотр. Института биохимии им. А.Н.Баха РАН; Упоров Игорь Владимирович – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ, канд. физ.-матем. наук.