

УДК 577.15.1

## ВЛИЯНИЕ ЗАМЕНЫ ОСТАТКОВ Met НА ОСТАТОК Leu НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, ОКИСЛИТЕЛЬНУЮ И ТЕМПЕРАТУРНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ДРОЖЖЕЙ

Д.Л. Агрошенко<sup>1,2</sup>, И.В. Голубев<sup>1,2</sup>, С.С. Савин<sup>1,2</sup>, В.И. Тишков<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова; <sup>2</sup>ООО «Инновации и высокие технологии МГУ»; <sup>3</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; \*e-mail: vitishkov@gmail.com)

Окислительная стабильность ферментов определяется в первую очередь остатками Cys и Met. В случае оксидазы D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) из дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) методом направленного мутагенеза получены три мутанта с точечными заменами остатка Met на остаток Leu. Выбор положений для введения замены сделан на основе множественного выравнивания аминокислотных последовательностей DAAO из разных источников, а также анализа трехмерной структуры TvDAAO. Для полученных мутантов изучены каталитические свойства, а также температурная и окислительная стабильность. Во всех случаях замена привела к изменению у мутантных ферментов профиля субстратной специфичности. Наблюдается заметное увеличение констант Михаэлиса для небольших субстратов и уменьшению  $K_M$  для D-аминокислот с объемным боковым радикалом. Показано, что в результате одной из замен происходит повышение температурной стабильности TvDAAO в 2–3 раза по сравнению с ферментом дикого типа. Разработана методика определения стабильности TvDAAO к действию пероксида водорода. Изучена окислительная стабильность фермента дикого типа и полученных мутантных TvDAAO. Установлено, что во всех случаях замена остатка Met на остаток Leu незначительно повлияла на окислительную стабильность фермента.

**Ключевые слова:** оксидаза D-аминокислот, *Trigonopsis variabilis*, направленный мутагенез, окислительная стабильность, каталитические свойства, температурная стабильность.

Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) относится к классу FAD-содержащих оксидоредуктаз и катализирует окислительное дезаминирование D-аминокислот в соответствующие  $\alpha$ -кетокислоты [1–4]. Этот фермент выполняет важные функции в живых организмах. Например, в микроорганизмах DAAO участвует в катаболизме экзогенных D-аминокислот [5]. В случае высших эукариот роль DAAO заключается в поддержании в клетке определенного уровня D-аминокислот, которые участвуют в регуляции самых разнообразных процессов (старение, функционирование нервной системы, секреция гормонов и т.д.) [6, 7]. Кроме того, фермент используется для решения различных задач биотехнологии. Среди всех известных оксидаз D-аминокислот наиболее широкое применение на практике нашли два фермента из дрожжей – *Rhodotorula gracilis* (RgDAAO) и *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO). Второй фермент

используется чаще, поскольку среди известных оксидаз D-аминокислот он обладает наилучшей температурной стабильностью и наиболее высокой активностью с цефалоспорином C (CPC) [1]. TvDAAO используется в процессе получения 7-аминоцефалоспороановой кислоты (7-АЦК) – исходного соединения для производства полусинтетических цефалоспоринов разных поколений. Кроме того, DAAO активно применяется в аналитической биотехнологии, хиральном синтезе, получении  $\alpha$ -кетокислот [8–9] и имеет большое потенциальное значение для создания систем диагностики и мониторинга ряда психосоматических и онкологических заболеваний [10–12].

Одним из главных ограничений при использовании ферментов в промышленности является их низкая операционная стабильность. Для DAAO одним из процессов, определяющих ее операционную стабильность, является окисление амина-

кислотных остатков ферментов под действием пероксида водорода, который образуется в результате реакции, катализируемой этим ферментом [13–15].

Цель данной работы – изучение стабильности TvDAAO к действию пероксида водорода и исследование влияния замен Met/Leu в положениях 104, 156 и 209 на каталитические свойства, а также температурную и химическую стабильность фермента.

### Экспериментальная часть

**Направленный мутагенез гена *tvdaao*.** Для проведения направленного мутагенеза в гене *tvdaao* применяли ПЦР, как описано ранее [16, 17]. В качестве матрицы использовали плазмиду pTvDAAO2.

Для введения мутации в ген *tvdaao* проводили ПЦР с использованием прямого праймера на начало (T7\_For) и обратного праймера (T7\_Rev) на конец гена, а также прямого (Mut\_for) и обратного (Mut\_rev) праймеров, несущих требуемые мутации в гене *tvdaao* (табл. 1).

Условия проведения ПЦР, обработка и клонирование полученных фрагментов аналогичны таковым, описанным в работах [16, 17]. Для каждого мутанта с чашек Петри были отобраны по три колонии и выделены плазмиды. Секвенирование показало, что все выделенные плазмиды содержат только требуемые нуклеотидные замены.

**Культивирование штаммов-продуцентов *E. coli* и получение препаратов мутантных TvDAAO.** Получение штаммов *E. coli* – продуцентов мутантных TvDAAO и фермента дикого типа, и их культивирование проводили, как описано в [16, 17]. Полученную биомассу собирали центрифугированием 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 (по массе) и хранили при –20°C.

Выделение и очистку мутантных TvDAAO и фермента дикого типа проводили согласно ранее разработанной методике [16, 17]. Чистоту полученных препаратов анализировали с помощью аналитического электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

**Определение концентрации белков.** Концентрацию активной TvDAAO определяли по концентрации окисленного FAD, измеряя поглощение при длине волны 455 нм на спектрофотометре «UV-1601PC» или «UV-1800PC» («Shimadzu»), используя коэффициент молярного поглощения  $10\,800\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  [18].

**Определение активности DAAO и определение кинетических параметров.** Для определения активности TvDAAO использовали реакцию с участием второго фермента – пероксидазы из корней хрена [19]. В качестве субстрата для TvDAAO использовали D-метионин, для пероксидазы из корней хрена – АБТС. Определение активности проводили по накоплению продукта окисления АБТС при длине волны 414 нм ( $\epsilon_{414} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) на спектрофотометре «UV-1800PC» фирмы «Shimadzu».

Для определения величин максимальной скорости ферментативной реакции ( $V_{\text{макс}}$ ) и константы Михаэлиса ( $K_M$ ) концентрацию соответствующей D-аминокислоты варьировали в диапазоне от 0,3 до 7,0  $K_M$ , ориентируясь на значения  $K_M$  для TvDAAO дикого типа. Активность TvDAAO при каждом значении концентрации D-аминокислоты измеряли не менее трех раз. Кинетические параметры  $V_{\text{макс}}$  и  $K_M$  рассчитывали методом нелинейной регрессии с помощью программы OriginPro 8.5 SR1 («OriginLab Corporation», США). Каталитическую константу  $k_{\text{кат}}$  рассчитывали из значения  $V_{\text{макс}}$ .

**Изучение температурной стабильности DAAO.** Температурную стабильность мутантных TvDAAO и фермента дикого типа изучали

Т а б л и ц а 1

T7_For	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
T7_Rev	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'
M104L_for	5'-TG GAA GGT GCC TTG TCG GCC ATC TGT CAA CGC-3'
M104L_rev	5'-ACA GAT GGC CGA CAA GGC ACC TTC CAG TTT AGG AAG AT-3'
M156L_for	5'-GTC TAC TTG AAC TGG CTG TTG TCC CAA TGC TTA TCG CTC G-3'
M156L_rev	5'-AG CGA TAA GCA TTG GGA CAA CAG CCA GTT CAA GTA GAC TCC-3'
M209L_for	5'-C GTC GAG GAC AAG AAG TTG TAC CCT ATT CGA GGA CAA GTC-3'
M209L_rev	5'-TCG AAT AGG GTA CAA CTT CTT GTC CTC GAC GCC TC-3'

в 0,1 М КФБ (рН 8,0) при разных значениях температуры с шагом 2°C. В тонкостенные пластиковые пробирки объемом 0,5 мл помещали по 100–110 мкл раствора фермента заданной концентрации. Пробирки инкубировали в водном термостате при необходимой температуре (точность термостатирования  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ). 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 SR1 («OriginLab», США) методом нелинейной регрессии.

**Математический аппарат теории диссоциативной термоинактивации.** Термоинактивация мутантных TvDAAO и фермента дикого типа проходила в соответствии с диссоциативным механизмом. Для определения констант скорости термоинактивации использовали математический аппарат, подробно описанный в работах О.М. Полторака [20–21].

**Изучение окислительной стабильности DAAO.** Инактивацию мутантных TvDAAO и фермента дикого типа в присутствии пероксида водорода изучали в 0,05 М КФБ (рН 8,0) при 30°C и разных концентрациях  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,01; 0,05 и 0,1 М). Концентрация фермента составляла 10 мкг/мл. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 100 мкл, добавляли к пробе 5 мкл раствора каталазы 10 000 Ед/мл (всего 50 Ед), перемешивали и измеряли остаточную активность TvDAAO. Отбор проб прекращали после умень-

шения 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 SR1 («OriginLab Corporation», США) методом нелинейной регрессии.

### Результаты и их обсуждение

**Выбор положений для введения аминокислотных замен.** Анализ структуры TvDAAO показал, что на каждую субъединицу фермента приходится по 6 остатков метионина: Met104, Met156, Met209, Met226, Met245 и Met339. (рис. 1). Для каждого остатка метионина была рассчитана площадь поверхности, доступная растворителю (табл. 2). Наиболее доступным растворителю является остаток Met104 (доступная площадь поверхности  $157,5 \text{ \AA}^2$ ), в то время как для остатка Met226 доступность растворителю равна нулю. Остатки Met226 и Met245 находятся в активном центре фермента, поэтому мы исключили их из рассмотрения, так как аминокислотные замены в районе активного центра могут приводить к дестабилизации и потере активности фермента. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей DAAO из разных источников показало, что остатки Met226 и Met245 являются высококонсервативными, а в 339-м положении наиболее часто встречаются остатки метионина и цистеина, что свидетельствует о функциональной значимости указанных остатков в структуре фермента.

Таким образом, в результате анализа для последующего мутагенеза выбраны остатки Met в положениях 104, 156 и 209. Наиболее структур-

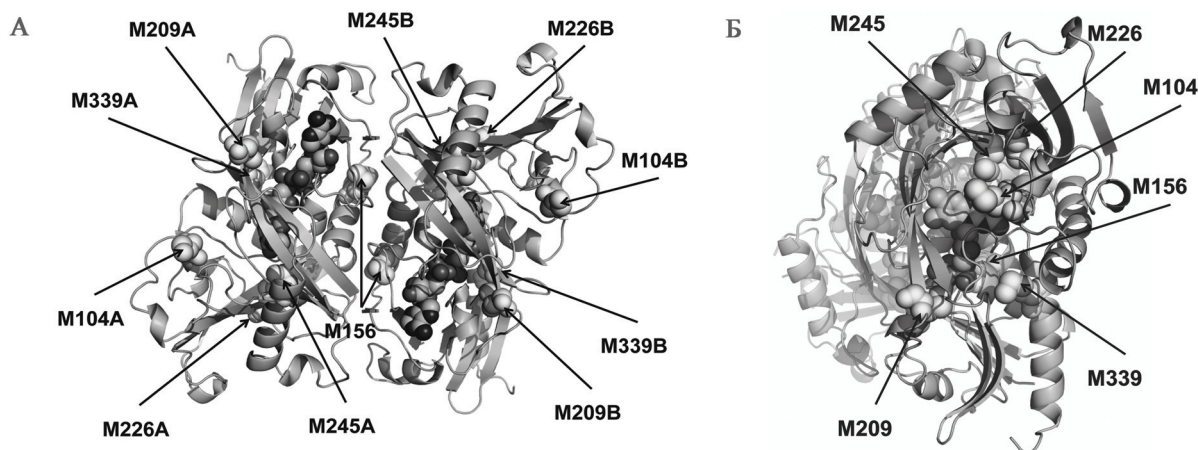


Рис. 1. Трехмерная структура TvDAAO (молекула FAD и остатки метионина показаны в CPK); А и Б – положения остатков Met с поворотом 90°

Т а б л и ц а 2

**Результаты множественного выравнивания и анализа расположения остатков метионина в структуре фермента TvDAAO**

Остаток	Расположение	Другие остатки в этом положении	Площадь поверхности, доступной растворителю, Å <sup>2</sup>
Met104	на поверхности у входа в активный центр	Phe	157,5
Met156	место контакта субъединиц	Val, Leu	2,72
Met209	рядом с поверхностью	Val, Leu	4,43
Met226	<b>в активном центре</b>	<b>Met</b>	<b>0</b>
Met245	<b>в активном центре</b>	<b>Met</b>	5,53
Met339	рядом с поверхностью	<b>Cys, Met</b>	8,35

Примечание. Полужирным шрифтом выделены функционально важные консервативные остатки, которые не были подвергнуты мутагенезу.

но близким к остатку метионина и устойчивым к действию окислителей является остаток лейцина. На основании вышесказанного мы решили выполнить следующие замены: Met104Leu, Met156Leu и Met209Leu.

**Получение мутантных TvDAAO с заменами Met104Leu, Met156Leu и Met209Leu.** После проведения реакции направленного мутагенеза полученный фрагмент клонировали в исходную плазмиду, из которой предварительно удалили аналогичный фрагмент без мутации. Продуктом реакции лигирования трансформировали клетки *E. coli* DH5α и высевали на чашки Петри. С каждой чашки брали по 3 колонии, из которых выделили плазмидную ДНК.

После трансформации клеток *E. coli* BL21 (DE3)CodonPlus/pLysS полученными плазмидами, содержащими в гене *tvdaao* мутации, кодирующие замены Met104Leu, Met156Leu, Met209Leu, было проведено культивирование штаммов-продуцентов. Выходы мутантных ферментов и TvDAAO дикого типа незначительно различались и находились в диапазоне от 9200 до 11800 Ед/л, т.е. экспрессия мутантных ферментов и фермента дикого типа происходит с примерно одинаковыми выходами активного растворимого белка. В случае удельной активности фермента, составляющей 580–860 Ед на 1 г биомассы, отличия также были незначительными. Таким образом, замены Met104Leu, Met156Leu, Met209Leu не влияют на уровень экспрессии TvDAAO.

Очистку мутантных TvDAAO и фермента дикого типа проводили с помощью анионообменной хроматографии на колонке MonoQ с последующим обессоливанием на колонке G25. Для полученных

препаратов ферментов были определены концентрации активного растворимого белка.

Аналитический SDS-электрофорез в полиакриламидном геле показал, что все препараты ферментов были получены в высокоочищенном виде и имели чистоту не менее 95% (на рисунке не показано).

**Определение кинетических параметров мутантных TvDAAO.** Значения  $K_M$  и максимальной скорости реакции, а также каталитической эффективности (отношение величины  $k_{кат}$  к  $K_M$ ) для каждого фермента с рядом D-аминокислот представлены в табл. 3. Полужирным шрифтом выделены случаи улучшения соответствующих кинетических параметров по сравнению с ферментом дикого типа. Как видно из табл. 3, для всех мутантных ферментов наблюдается уменьшение значений констант Михаэлиса в случае объемных D-аминокислот и увеличение  $K_M$  в случае остатков с небольшим боковым радикалом. Из табл. 3 также видно, что все мутантные ферменты имеют схожие профили каталитической эффективности. С небольшими субстратами (D-Ala, D-Val и D-Ser) для всех мутантных TvDAAO наблюдается уменьшение каталитической эффективности, а в случае объемных ароматических субстратов (D-Phe и D-Tyr) величины каталитической эффективности схожи с соответствующими значениями для фермента дикого типа.

Для мутанта TvDAAO Met156Leu наблюдается существенное уменьшение константы Михаэлиса с субстратами D-Leu, D-Tyr и D-Thr. Значения каталитических констант в большинстве случаев похожи на соответствующие значения для фермента дикого типа. В случае таких субстратов

Т а б л и ц а 3

Каталитические параметры мутантных TvDAAO с заменами Met104Leu, Met156Leu, Met209Leu и фермента дикого типа

Субстрат	wt-TvDAAO			TvDAAO Met104Leu			TvDAAO Met156Leu			TvDAAO Met209Leu		
	$K_M$ , мМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{кат}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	$K_M$ , мМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{кат}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	$K_M$ , мМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{кат}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>	$K_M$ , мМ	$k_{кат}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{кат}/K_M$ , мМ <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
D-Met	0,46±0,03	80,5±0,8	175±7	1,02±0,03	<b>118,1±1,1</b>	116±3	0,96±0,02	86,4±0,8	90±2	0,95±0,06	60,9±0,9	64±4
D-Ala	16,7±0,7	109±2	6,5±0,3	80±5	<b>169±7</b>	2,10±0,16	27,3±1,5	<b>135±3</b>	5,0±0,3	25,0±1,5	89±2	3,6±0,2
D-Val	14,4±1,2	85±3	5,9±0,5	35,2±1,0	<b>158±3</b>	4,49±0,14	19,3±0,7	<b>93,4±1,4</b>	4,8±0,2	17,9±1,4	59,5±1,8	3,3±0,3
D-Leu	0,78±0,02	29,1±0,3	37±3	<b>0,228±0,09</b>	<b>34,9±0,4</b>	<b>153±6</b>	<b>0,160±0,015</b>	20,3±0,4	<b>127±12</b>	0,193±0,011	14,12±0,17	<b>73±4</b>
D-Ser	37±3	20,5±0,9	0,56±0,06	48±5	6,3±0,4	0,13±0,02	47±4	18,2±0,7	0,39±0,03	39±4	13,0±0,6	0,34±0,04
D-Phe	0,37±0,04	27,2±0,8	74±8	<b>0,33±0,03</b>	<b>36,6±0,7</b>	<b>111±9</b>	0,57±0,04	29,9±0,5	52±3	<b>0,251±0,006</b>	16,4±0,4	65±2
D-Tyr	0,45±0,06	22,5±1,9	50±8	<b>0,27±0,02</b>	19,2±0,8	<b>71±7</b>	<b>0,27±0,02</b>	13,4±0,5	49±4	<b>0,14±0,02</b>	6,3±0,3	45±6
D-Trp	0,49±0,04	42,4±1,4	87±8	<b>0,29±0,03</b>	<b>50±2</b>	<b>170±20</b>	0,67±0,04	37,2±1,2	55±4	0,60±0,05	26,5±1,2	44±4
D-Asn	22,6±1,5	62±2	2,8±0,2	<b>15,5±0,6</b>	45,1±0,8	2,90±0,13	19,6±1,4	50,0±1,7	2,6±0,2	<b>15±2</b>	25,1±1,3	1,6±0,2
D-Thr	11,1±0,8	1,75±0,04	0,158±0,012	нет активности			<b>5,2±0,5</b>	1,49±0,05	<b>0,29±0,03</b>	<b>5,7±1,2</b>	0,89±0,06	0,16±0,03
D-Lys	29±3	3,5±0,2	0,12±0,02	нет активности			28±9	<b>8,0±1,3</b>	<b>0,28±0,11</b>	30±9	<b>6,2±0,9</b>	<b>0,21±0,07</b>

Пр и м е ч а н и е. Полужирным шрифтом выделены случаи улучшения каталитических параметров мутантных TvDAAO по сравнению с таковыми для фермента дикого типа.

как D-Ala, D-Val и D-Lys наблюдается увеличение значений каталитических констант. Значения каталитической эффективности увеличились с субстратами D-Leu, D-Thr и D-Lys.

В случае TvDAAO Met209Leu значения констант Михаэлиса уменьшились с субстратами D-Leu, D-Phe, D-Tyr, D-Asn и D-Thr. Значения каталитических констант уменьшились для большинства субстратов, однако с D-Lys произошло увеличение значения каталитической константы почти в два раза по сравнению с ферментом дикого типа. Увеличение значений каталитической эффективности наблюдается только с D-Leu и D-Lys.

Таким образом, введение замен Met156Leu и Met209Leu привело к изменению профиля субстратной специфичности TvDAAO. Замены привели к заметному увеличению константы Михаэлиса для небольших субстратов и ее уменьшению для объемных D-аминокислот.

**Изучение температурной стабильности мутантных TvDAAO (Met156Leu и Met209Leu).** Температурную стабильность мутантных TvDAAO изучали по кинетике термоинактивации при разных температуре и концентрации ферментов. На рис. 2 представлены зависимости остаточной активности полученных мутантов и фермента дикого типа от времени при одинаковой концентрации ферментов (10 мкг/мл) и температуре 56°C. Как видно из рис. 2, замены Met104Leu и Met209Leu привели к незначительному изменению стабильности TvDAAO, а замена Met156Leu привела к увеличению стабильности по сравнению с TvDAAO дикого типа.

В наших предыдущих работах неоднократно показано, что TvDAAO дикого типа и ее различ-

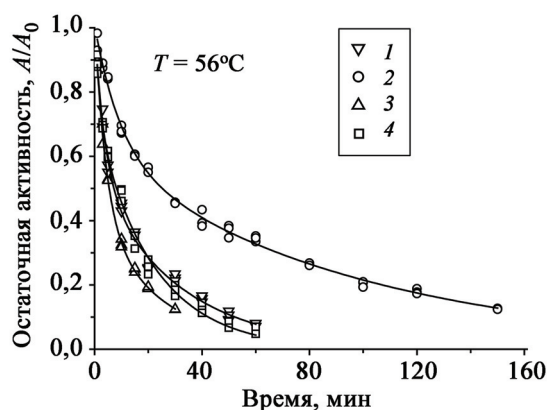


Рис. 2. Зависимость остаточной активности от времени мутантных TvDAAO с заменами Met104Leu (1), Met156Leu (2), Met209Leu (3), и TvDAAO дикого типа (4). Концентрация ферментов 10 мкг/мл; 0,1 М К-фосфатный буфер; pH 8,0; температура инкубации 56°C

ные мутантные формы при повышенной температуре инактивируются в соответствии с диссоциативным механизмом термоинактивации, который был подробно описан в работах О.М. Полторака для некоторых других олигомерных белков [20, 21]. Согласно этому механизму, на первой стадии происходит обратимая диссоциация активного димера на неактивные мономеры, а на второй стадии субъединицы необратимо денатурируют. Экспериментальные зависимости остаточной активности фермента от времени корректно описываются суммой двух экспоненциальных функций, а скорость инактивации фермента зависит от его концентрации [17, 22–23].

Для диссоциативной термоинактивации олигомерных ферментов характерны следующие признаки [20,21]:

- 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. 3 (А, Б) представлены типичные зависимости остаточной активности от времени для мутантной TvDAAO Met156Leu в полулогарифмических координатах при разных значениях температуры (52–60°C) и начальной концентрации фермента (10, 20 и 40 мкг/мл). Действительно, данные зависимости представляют собой прямые с изломом. Кроме того, из рис. 3, А 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. Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что термоинактивация мутантных TvDAAO при повышенных значениях температуры, как и для фермента дикого типа, протекает по диссоциативному механизму. Для всех мутантных форм двустадийный характер термоинактивации наблюдается во всех исследованных интервалах температуры (которые зависят от стабильности мутантов) и при разной концентрации ферментов.

С использованием математического аппарата теории диссоциативной термоинактивации [20, 21] рассчитаны константы скорости инактивации обеих стадий процесса для мутантных TvDAAO.

Результаты расчетов приведены в табл. 4 в сравнении с аналогичными параметрами для TvDAAO Met104Leu и TvDAAO дикого типа. Для TvDAAO Met156Leu наблюдается уменьшение значений констант скорости инактивации первой и второй стадий в среднем в 2–3 раза по сравнению с TvDAAO дикого типа, т.е. замена Met156Leu привела к увеличению температурной стабильности TvDAAO во всем исследуемом диапазоне. В случае TvDAAO Met209Leu значения констант скорости первой стадии инактивации схожи с таковыми для TvDAAO дикого типа, но константы диссоциации существенно увеличились. Значения констант скорости второй стадии уменьшились. Это может свидетельствовать о том, что введение данной замены привело к ухудшению межсубъединич-

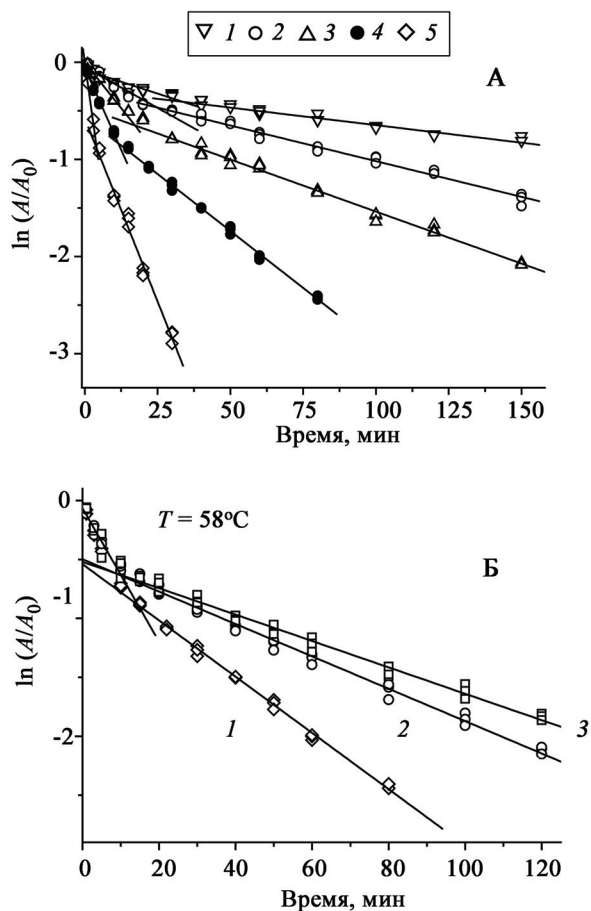


Рис. 3. А. Зависимости остаточной активности от времени для мутантной TvDAAO Met156Leu в полулогарифмических координатах при разной температуре. Концентрация фермента 10 мкг/мл; 0,1 М КФБ; pH 8,0; температура, °С: 52 (1), 54 (2), 56 (3), 58 (4) и 60 (5). Б. Зависимости остаточной активности от времени мутантной TvDAAO Met156Leu в полулогарифмических координатах при разных значениях начальной концентрации фермента, мкг/мл: 10 (1), 20 (2) и 40 (3). Температура 58°С; 0,1 М К-фосфатный буфер; pH 8,0

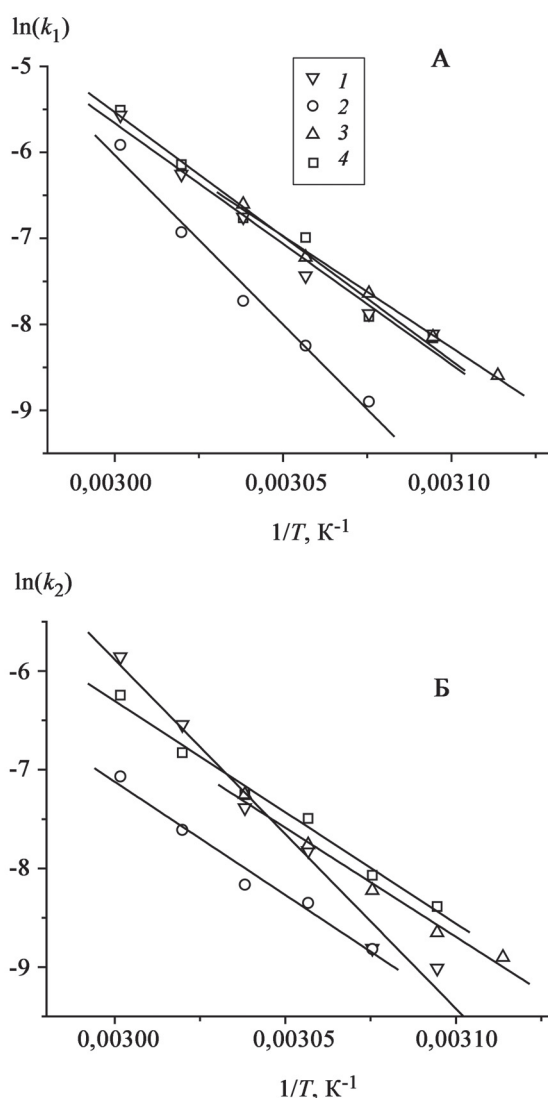


Рис. 4. Температурные зависимости констант скорости первой ( $k_1$ ) (А) и второй ( $k_2$ ) (Б) стадий термоинактивации в координатах  $\ln(k) - 1/T$  для мутантных TvDAAO с заменами Met104Leu (1), Met156Leu (2), Met209Leu (3) и TvDAAO дикого типа (4). Концентрация ферментов 10 мкг/мл; 0,1 М К-фосфатный буфер; pH 8,0

ного связывания и к увеличению стабильности каждой отдельной субъединицы.

На основании зависимостей остаточной активности от времени были рассчитаны периоды полуинактивации для всех мутантных TvDAAO при всех изученных значениях температуры. Полученные результаты согласуются со значениями констант скорости термоинактивации. Для TvDAAO Met156Leu наблюдается увеличение времени полуинактивации в 2–3 раза по сравнению с ферментом дикого типа во всем исследуемом диапазоне (рис. 2). Для TvDAAO M209Leu наблюдается незначительное уменьшение периодов полуинактивации, несмотря на улучшение значений констант скорости второй стадии инактивации. Это связано с тем, что на начальных

Т а б л и ц а 4

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

Форма TvDAAO	Параметр	Температура, °С						
		48	50	52	54	56	58	60
Дикий тип	$K_{\text{дис}} \cdot 10^7, \text{M}$	–	0,19	1,27	1,34	6,0	9,3	14,6
	$k_1 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	–	2,86	3,67	9,2	11,6	21,5	41
	$k_2 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	–	2,28	3,13	5,6	7,1	10,8	19,4
Met104Leu	$K_{\text{дис}} \cdot 10^7, \text{M}$	–	1,35	1,60	1,61	2,57	3,16	5,7
	$k_1 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	–	3,00	3,80	5,9	11,7	19,2	38
	$k_2 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	–	<b>1,22</b>	<b>1,49</b>	<b>4,01</b>	<b>6,2</b>	14,4	29
Met156Leu	$K_{\text{дис}} \cdot 10^7, \text{M}$	–	–	<b>0,88</b>	1,39	<b>2,23</b>	<b>3,75</b>	15,0
	$k_1 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	–	–	<b>1,37</b>	<b>2,62</b>	<b>4,40</b>	<b>9,78</b>	<b>27,0</b>
	$k_2 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	–	–	<b>1,48</b>	<b>2,36</b>	<b>2,84</b>	<b>4,96</b>	<b>8,52</b>
Met209Leu	$K_{\text{дис}} \cdot 10^7, \text{M}$	1,47	1,82	3,16	5,52	8,56	–	–
	$k_1 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	1,85	2,90	4,82	7,32	13,6	–	–
	$k_2 \cdot 10^4, \text{c}^{-1}$	1,36	<b>1,75</b>	<b>2,68</b>	<b>4,26</b>	7,10	–	–

Пр и м е ч а н и е. Ошибка эксперимента составляла не более 15%; прочерк (–) в ячейках таблицы означает, что 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.

этапах термоинактивации скорость инактивации в большей степени зависит от значения константы скорости первой стадии инактивации и константы диссоциации.

На рис. 4 (А, Б) приведены зависимости натурального логарифма констант скорости первой и второй стадий инактивации от обратной температуры ( $1/T$ ). Видно, что в случае TvDAAO Met156Leu значения констант скорости первой стадии инактивации уменьшились и при увеличении температуры приближаются к соответствующим значениям для TvDAAO дикого типа. Для второй стадии инактивации зависимость аналогична таковой для фермента дикого типа и во всем исследуемом диапазоне значения констант скорости ниже соответствующих значений TvDAAO дикого типа. Как было сказано выше, значения констант скорости инактивации в случае TvDAAO Met209Leu схожи с таковыми для первой стадии TvDAAO дикого типа и меньше соответствующих значений для второй стадии.

Таким образом, введение Met156Leu приводит к увеличению температурной стабильности и смещению температурного диапазона, в котором реализуется диссоциативный механизм термоинактивации, примерно на 2°С в область более высоких температур. Введение замены

Met209Leu привело к увеличению значений констант диссоциации и в целом к незначительному уменьшению температурной стабильности фермента. Температурная стабильность мутанта TvDAAO Met104Leu близка к таковой для фермента дикого типа.

*Изучение окислительной стабильности мутантных TvDAAO с заменами Met104Leu, Met156Leu, Met209Leu и фермента дикого типа.* На заключительном этапе работы мы изучили окислительную стабильность мутантных TvDAAO и фермента дикого типа по кинетике инактивации при инкубации в растворе пероксида водорода. Пероксид водорода был выбран в качестве окислителя, потому что происходит его выделение в процессе реакции, катализируемой DAAO. Кроме того, при получении 7-АЦК (наиболее крупномасштабном производстве с использованием TvDAAO), в реакционную систему вносят дополнительные количества пероксида водорода для количественного протекания реакции [13].

В случае применения реакции с использованием ПХ для измерения активности TvDAAO пероксид водорода, добавляемый при инкубации фермента, необходимо удалить. В этих целях использовали каталазу из печени быка. Каталаза может мешать определению активности TvDAAO с помощью



ПХ, так как она катализирует разложение пероксида водорода. Поэтому было решено инактивировать каталазу кратковременным нагреванием таким образом, чтобы не изменялась активность TvDAAO. Оказалось, что каталаза из печени быка обладает высокой температурной стабильностью и в концентрации, необходимой для проведения эксперимента, не теряет каталитическую активность в течение 10 мин при 45°C.

В связи с вышесказанным мы исследовали влияние добавления каталазы на активность TvDAAO. Для этого была изучена зависимость наблюдаемой остаточной активности TvDAAO дикого типа и ее мутантных форм при добавлении разного количества каталазы в кювету при измерении активности TvDAAO (рис. 5). Оказалось, что присутствие каталазы в концентрации до 100 ед. активности в реакционной смеси не влияет на активность TvDAAO. Таким образом, нами предложена методика для изучения окислительной стабильности TvDAAO. Для устранения экзогенного пероксида водорода из реакционной смеси добавляли каталазу из печени быка в концентрации, при которой конечная концентрация каталазы в кювете для измерения активности TvDAAO составляет порядка 15 ед. активности. В данном случае влиянием каталазы на наблюдаемую активность TvDAAO при изучении окислительной стабильности можно пренебречь.

На рис. 6, А представлена зависимость остаточной активности TvDAAO Met156Leu от времени при инкубации с пероксидом водорода в разной концентрации (подобные зависимости получены для всех мутантных ферментов и фермента ди-

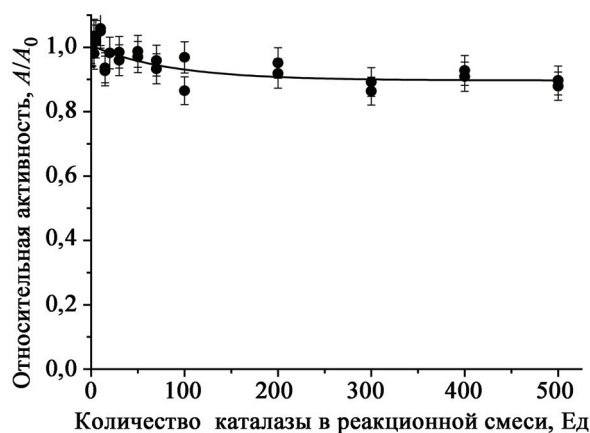


Рис. 5. Влияние количества каталазы в реакционной смеси на скорость реакции при измерении активности TvDAAO дикого типа

кого типа). Видно, что фермент в значительной степени подвержен действию пероксида водорода и при увеличении концентрации быстрее теряет свою активность. Поскольку концентрация пероксида водорода намного больше, чем концентрация фермента, то концентрация окислителя во время измерения практически не изменяется, и зависимость потери активности от времени должна соответствовать кинетике реакции первого порядка. Из рис. 6, А хорошо видно, что наблюдаемые зависимости действительно хорошо описываются моноэкспоненциальной функцией  $A \times \exp(-k \times x)$ , что свидетельствует о первом порядке процесса инактивации.

На рис. 6, Б представлены зависимости остаточной активности от времени инкубации для всех мутантных ферментов и фермента дикого типа при концентрации пероксида водорода, равной 0,01 моль/л. Видно, что стабильность

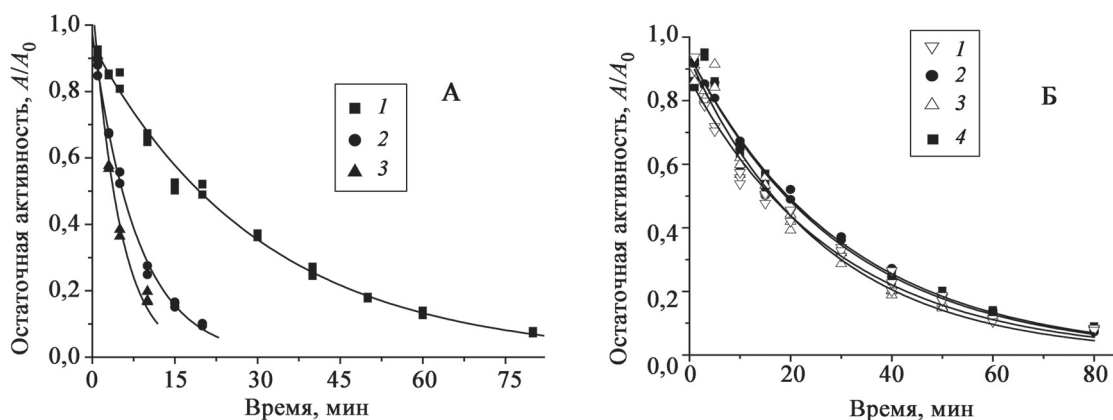


Рис. 6. А. Зависимости остаточной активности от времени мутантной TvDAAO Met156Leu при разных значениях концентрации пероксида водорода: 10 (1), 50 (2) и 100 (3). Концентрация фермента 10 мкг/мл, 0,05 М К-фосфатный буфер, pH 8,0. Б. Зависимости остаточной активности от времени мутантных TvDAAO с заменами Met104Leu (1), Met156Leu (2), Met209Leu (3), и TvDAAO дикого типа (4). Концентрация ферментов 10 мкг/мл; концентрация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 мМ; 0,05 М К-фосфатный буфер (pH 8,0)

Т а б л и ц а 5

**Константы скорости инактивации мутантных TvDAAO и фермента дикого типа под действием пероксида водорода (концентрация ферментов 10 мкг/мл, 0,05 М КФБ, pH 8,0)**

Форма TvDAAO	$k_{ин} \cdot 10^4, c^{-1}$		
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,01 М)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,05 М)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0,1 М)
Дикий тип	4,9	17,9	27,7
Met104Leu	4,4	14,0	25,3
Met156Leu	5,2	19,3	29,3
Met209Leu	5,9	24,3	38,6

П р и м е ч а н и е. Ошибка эксперимента составляла не более 15%.

ферментов к действию пероксида водорода практически не изменилась при введении аминокислотных замен. В табл. 5 представлены рассчитанные значения констант скорости инактивации пероксидом водорода.

Значения константы скорости инактивации для TvDAAO Met104Leu и TvDAAO Met156Leu практически не изменились, а в случае TvDAAO Met209Leu увеличались по сравнению с таковыми для фермента дикого типа. Причиной этого, вероятно, является менее стабильная структура димерного мутантного фермента, что обсуждалось в главе, посвященной изучению температурной стабильности мутантных ферментов.

Оксидаза D-аминокислот является важным ферментом для биотехнологии. Практическое применение DAAO обусловлено стабильностью

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00043).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тишков В.И., Хороненкова С.В. // Биохимия. 2005. Т. 70. № 1. С. 51.
2. Pollegioni L., Sacchi S., Caldinelli L., Boselli A., Pilone M.S., Piubelli L., Molla G. // Curr. Protein Pept. Sci. 2007. Vol. 8. N 6. P. 600.
3. Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M.S. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2008. Vol. 78. N 1. P. 1.
4. Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // Biochemistry (Moscow). 2008. Vol. 73. № 13. P. 1511.
5. Pollegioni L., Piubelli L., Sacchi S., Pilone M.S., Molla G. // Cell. Mol. Life Sci. 2007. Vol. 64. N 11. P. 1373.
6. Fisher G., Lopez S., Peterson K., Goff T., Philip I., Gaviria R., Lorenzo N., Tsesarskaia M. // Amino Acids. 2007. Vol. 32. N 1. P. 27.
7. Helfman P.M., Bada J.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1975. Vol. 72. N 8. P. 2891.
8. Hanson R.L., Schwinden M.D., Banerjee A., Brzozowski D.B., Chen B.C., Patel B.P., McNamee C.G., Kodersha G.A., Kronenthal D.R., Patel R.N., Szarka L.J. // Bioorg. Med. Chem. 1999. Vol. 7. N 10. P. 2247.
9. Roff G.J., Lloyd R.C., Turner N.J. // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126. N 13. P. 4098.
10. Nishikawa T. // Biol. Pharm. Bull. 2005. Vol. 28. P. 1561.
11. Jönsson E.G., Saetre P., Vares M., Andreou D., Larsson K., Timm S., Rasmussen H.B., Djurovic S., Melle I., Andreassen O. a., Agartz I., Werge T., Hall H., Terenius L. // Neuropsychobiology. 2009. Vol. 59. N 3. P. 142.
12. Ohi K., Hashimoto R., Yasuda Y., Yoshida T., Takahashi H., Iike N., Fukumoto M., Takamura H., Iwase M., Kamino K., Ishii R., Kazui H., Sekiyama R., Kitamura Y., Azechi M., Ikezawa K., Kurimoto R., Kamagata E., Tanimukai H., Tagami S., Morihara T., Ogasawara M., Okochi M., Tokunaga H., Numata S.,

- Ikeda M., Ohnuma T., Ueno S.I., Fukunaga T., Tanaka T., Kudo T., Arai H., Ohmori T., Iwata N., Ozaki N., Takeda M.* // Schizophr. Res., 2009. Vol. 109. N 1–3. P. 80.
13. *Dey E.S., Flygare S., Mosbach K.* // Appl. Biochem. Biotechnol. 1991. Vol. 27. N 3. P. 239.
14. *Betancor L., Hidalgo A., Fernández-Lorente G., Mateo C., Rodríguez V., Fuentes M., López-Gallego F., Fernández-Lafuente R., Guisan J.M.* // Biotechnol. Prog. 2003. Vol. 19. N 3. P. 784.
15. *Fernández-Lafuente R., Rodríguez V., Mateo C., Fernández-Lorente G., Arminsen P., Sabuquillo P., Guisán J.M.* // J. Mol. Catal. - B Enzym. 1999. Vol. 7. N 1–4. P. 173.
16. *Комарова Н.В., Голубев И.В., Хороненкова С.В., Чубарь Т.А., Тишков В.И.* // Биохимия. 2012. 77. № 10. С. 1423.
17. *Golubeff I.V., Komarova N.V., Ryzhenkova K.V., Chubar T.A., Savin S.S., Tishkov V.I.* // Acta Naturae. 2014. Vol. 6. N 3(22). С. 76.
18. *Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S.* // Biotechnol. Prog. 2004. Vol. 20. N 2. P. 467.
19. *Савин С.С., Чернышев И.В., Тишков В.И., Хороненкова С.В.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2006. Т. 47. № 1. С. 25.
20. *Полторак, О.М., Чухрай Е.С.* // Итоги науки и техники. Биотехнология. 1986. Т. 5. С. 50.
21. *Полторак О.М., Торшин И.Ю., Чухрай Е.С.* // Биохимия. 1998. Т. 63. № 3. С. 360.
22. *Черскова Н., Хороненкова С., Тишков В.* // Изв. АН. Сер. хим. 2010. Т. 59. № 1. С. 262.
23. *Комарова Н.В., Голубев И.В., Хороненкова С.В., Тишков В.И.* // Изв. АН. Сер. хим. 2012. Т. 61. № 7. С. 1489.

Поступила в редакцию 15.03.16

## INFLUENCE OF Met/Leu AMINO ACID CHANGES ON CATALYTIC PROPERTIES AND OXIDATIVE AND THERMAL STABILITY OF YEAST D-AMINO ACID OXIDASE

D.L. Atroshenko<sup>1,2</sup>, I.V. Golubev<sup>1,2</sup>, S.S. Savin<sup>1,2</sup>, V.I. Tishkov<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University; <sup>2</sup>Innovations and High Technologies MSU Ltd; <sup>3</sup>A.N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences; \*e-mail: vitishkov@gmail.com

**Oxidative stability of enzymes is mostly dependent on stability of Cys and Met residues. Three single point mutants with changes Met/Leu of D-amino acid oxidase (DAAO, EC 1.4.3.3) from the yeast *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO) were prepared and characterized. Selection of position for amino acid residue substitution was made based on multiple alignment of different DAAO amino acid sequences and analysis of the TvDAAO structure. It was shown that substrate specificity profile changed for all mutans.  $K_M$  values for small and bulky D-amino acids increased and decreased, respectively. In one case change Met/Leu resulted in 2-3-fold increase of thermal stability. Method to determine stability of TvDAAO in presence of hydrogen peroxide was developed and oxidative stability of wild-type and mutant TvDAAOs was studied. It was shown that all three mutations did not change of the enzyme oxidative stability.**

**Key words:** D-amino acid oxidase, *Trigonopsis variabilis*, site-directed mutagenesis, oxidative stability, thermal stability, catalytic properties.

**Сведения об авторах:** Атрошенко Денис Леонидович – аспирант химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (atrdenis@gmail.com); Голубев Игорь Владимирович – науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. хим. наук (golubeff.msu@gmail.com); Савин Святослав Сергеевич – науч. сотр. химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», канд. биол. наук (savinslava@gmail.com); Тишков Владимир Иванович – профессор химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. лабораторией молекулярной инженерии Института биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН; ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», докт. хим. наук (vitishkov@gmail.com).