

УДК 577.322.24

# Биоинформационно-структурный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот

Д. Л. Атрошенко<sup>1,2</sup>, Д. И. Головина<sup>1</sup>, Е. П. Сергеев<sup>1</sup>, М. Д. Шеломов<sup>1</sup>, А. Г. Ельченинов<sup>2</sup>,  
И. В. Кубланов<sup>1,2</sup>, Т. А. Чубарь<sup>1</sup>, А. А. Пометун<sup>1,2</sup>, С. С. Савин<sup>1</sup>, В. И. Тишков<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071 Россия

\*E-mail: vitishkov@gmail.com

Поступила в редакцию 22.08.2022

Принята к печати 29.09.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11812

**РЕФЕРАТ** Оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3) играет важную роль в жизни и прокариот, и эукариот – как низших (дрожжи и грибы), так и высших (млекопитающие). В геномах архей гены DAAO пока не найдены. При этом даже внутри одной группы организмов (бактерии, дрожжи и грибы, млекопитающие) DAAO характеризуются очень низкой гомологией аминокислотных последовательностей. Особенно это выражено у бактериальных DAAO. Высокая вариабельность первичных структур DAAO сильно ограничивает поиск генов новых ферментов в известных геномах. В результате многие гены DAAO (если не большинство) остаются или неаннотированными, или неправильно аннотированными. Нами предложен подход, в котором биоинформатические методы в сочетании с анализом общей структуры и структуры активного центра используются для подтверждения того, что найденный ген кодирует именно оксидазу D-аминокислот и предсказания возможного типа ее субстратной специфичности. С помощью поиска по гомологии получают набор кандидатных последовательностей, проводят моделирование третичной структуры отобранных ферментов и сравнивают их с экспериментальными и модельными структурами известных DAAO. Показана эффективность предложенного подхода для дискриминации DAAO и глициноксидаз. С использованием этого подхода в шести штаммах экстремофильных бактерий найдены гены новых DAAO, и впервые в мире один ген идентифицирован в геноме галофильных архей. Предварительные эксперименты подтвердили предсказанную специфичность DAAO из *Natronosporangium hydrolyticum* АСРА39 в отношении D-Leu и D-Phe.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** оксидаза D-аминокислот, первичная структура, третичная структура, моделирование, AlphaFold 2, глициноксидаза.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** DAAO – оксидаза D-аминокислот; GOX – глициноксидаза.

## ВВЕДЕНИЕ

Любая клетка представляет собой сложнейшую мультиферментную систему открытого типа, причем в зависимости от сложности и специфики состояния функционирования организма один и тот же фермент может выполнять разную физиологическую роль. Ярким примером является оксидаза D-аминокислот (DAAO, КФ 1.4.3.3). В бактериях, дрожжах и микроскопических грибах основная роль этого фермента сводится к утилизации экзогенных D-аминокислот (в первую очередь D-Ala) [1, 2]. У высших эукариот – позвоночных и особенно у млекопитающих, основная роль DAAO

заключается в поддержании определенного уровня D-аминокислот, которые являются регуляторами важнейших процессов, в первую очередь нервной деятельности. Например, снижение уровня D-Ser в спинномозговой жидкости за счет повышенной активности DAAO ассоциировано с шизофренией [3, 4]. При болезнях Альцгеймера и Паркинсона в нервных тканях наблюдается повышение уровня D-Ala [4, 5]. Поэтому актуальным представляется поиск эффективных и специфичных ингибиторов DAAO человека. Оксидаза D-аминокислот также широко используется на практике [6–9]. Например, DAAO из дрожжей *Trigonopsis variabilis* используется

в двухферментном биокаталитическом процессе получения 7-аминоцефалоспороновой кислоты (7-АЦК) из цефалоспорина С [10, 11]. Это позволяет сократить расход органических растворителей в 400 раз по сравнению с ранее используемым чисто химическим процессом. Производство 7-АЦК, используемого в качестве исходного синтона для получения полусинтетических цефалоспоринов различных поколений, достигает нескольких тысяч тонн в год.

Практическое применение фермента требует использования биокатализатора с определенными свойствами. В природе не существует универсального фермента. Его активность и специфичность определяются той ролью, которую он выполняет в природе. В большинстве биотехнологических процессов субстраты и условия проведения реакции отличаются от природных. Поэтому при разработке нового процесса, метода анализа и в прочих случаях для каждого из них проводится доводка свойств биокатализатора к требованиям процесса. Это, как правило, выполняется с помощью методов белковой инженерии. Совершенно очевидно, что в качестве исходного объекта оптимальным представляется использование фермента, свойства которого наиболее близки к требуемым. С этой целью проводят поиск генов в секвенированных геномах, число которых постоянно возрастает. У оксидаз D-аминокислот из дрожжей и грибов клонированы гены и изучены свойства ферментов всего из 7 источников – *Fusarium solani* (FsoDAAO) [12], *Trigonopsis variabilis* (TvaDAAO) [13], *Rhodospiridium toruloides* (ранее *Rhodotorula gracilis*) (RtoDAAO) [14], *Pichia pastoris* (PpaDAAO) [15], *Candida boidinii* (CboDAAO) [16], *Rasamsonia emersonii* штамм YA (RemDAAO) [17] и *Ogataea parapolyomorpha* DL-1 [18]. Причем в последнем случае идентифицировали, клонировали и экспрессировали в *E. coli* гены пяти разных DAAO (OpaDAAO1 – OpaDAAO5) и одной D-аспартатоксидазы (DASPO). В случае бактерий в настоящее время клонированы и описаны всего три фермента – из *Rubrobacter xylophilus* (RxyDAAO), *Streptomyces coelicolor* (ScoDAAO) и *Arthrobacter protophormiae* (AprDAAO) [9]. Ни одна из бактериальных DAAO на практике не применяется. В настоящее время данные о присутствии потенциальных генов *daao* в геноме архей в литературе и базах данных отсутствуют. Основной причиной такого состояния в исследовании и применении бактериальных DAAO являются трудности поиска генов фермента в геномах бактерий. Всего идентифицировано немногим более 10 генов DAAO и все они найдены в геномах бактерий, принадлежащих к *Acinetobacteria* [7, 9]. Сложность поиска связана с тем, что аминокислотные последовательности

DAAO очень переменчивы. Поэтому традиционный широко используемый поиск по гомологии представляет собой очень непростую задачу. Кроме того, существует близкородственный фермент – глициноксидаза (GOX), которая очень часто появляется при поиске DAAO по гомологии с известными ферментами данного типа.

Второй важный момент в поиске новых DAAO – отбор кандидатов со свойствами, наиболее близкими к требуемым. Обычные DAAO за исключением высокоспецифичной D-аспартатоксидазы проявляют широкую субстратную специфичность. В зависимости от источника спектр субстратной специфичности сильно варьируется и активность с разными D-аминокислотами может отличаться на порядок и более. Более того, в ряде случаев к субстратной специфичности DAAO могут предъявляться особые требования. Например, при разработке методов диагностики нейродегенеративных заболеваний требуются DAAO, активные с D-Ser, но не с D-Ala и наоборот [5]. Поэтому для выбора DAAO с желаемой субстратной специфичностью (если ее описание отсутствует) приходится проводить клонирование, экспрессию и очистку ферментов, изучать их каталитические свойства и отбирать лучший. Совершенно очевидно, что данная процедура трудоемка, продолжительна и затратна.

Нами предложен биоинформационно-структурный подход, который позволяет с высокой достоверностью показать принадлежность кандидатных ферментов именно к DAAO, дискриминировать их от глицинооксидаз, а также, используя корреляцию между субстратной специфичностью и экспериментальными и модельными структурами известных DAAO, высказать обоснованное предположение о спектре субстратной специфичности. Особый акцент сделан на использовании данных о ферментах из термотолерантных дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1 (пять OpaDAAO и OpaDASPO), поскольку пять из шести ферментов демонстрируют необычные зависимости стабильности и активности от pH среды, а также имеют очень интересный и перспективный спектр субстратной специфичности. Этот подход успешно апробирован на ряде последовательностей из экстремофильных бактерий. Впервые в мире показано наличие гена *daao* в геноме галофильной археи.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Биоинформатический поиск генов потенциальных DAAO

Поиск новых DAAO по гомологии проводили с помощью программы BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih>).

gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) против базы данных транслированных белковых последовательностей из геномов экстремофильных бактерий. В качестве основной базы использовали базу UniProt NCBI. Также проводили поиск в геномах бактерий и архей, последовательности которых были секвенированы в ходе выполнения работ в рамках Соглашения № 075-15-2021-1396 от 26.10.2021 (Федеральная научно-техническая программа развития генетических технологий на 2019–2027 годы). Для дальнейшей работы отбирали последовательности, показавшие наиболее высокую гомологию.

Множественное выравнивание отобранных последовательностей и ряда известных последовательностей бактерий и дрожжей проводили с помощью программы Clustal X 1.83.

### Построение и анализ модельных структур DAAO

Для построения модельных структур ферментов использовали открытый онлайн-сервер для AlphaFold2 [19, 20]. Для множественного выравнивания использовали MMseqs2, для каждой модели было выполнено по три цикла уточнения предсказания. Генерировали по пять моделей, лучшую выбирали по rLDDT [19]. Все полученные структуры имели rLDDT более 90. Молекулу FAD встраивали, проводя оптимизацию положения в глобуле и геометрии связей в программе Coot [21].

Докинг субстратов проводили при помощи программы AutoDock [22] с ускорением на GPU [23]. Для проведения докинга использовали следующие параметры: *ga\_pop\_size* = 150, *ga\_num\_evals* = 25000000, *ga\_run* = 20, *ga\_mutation\_rate* 0.02÷0.08, Solis-Wets-метод. Результаты докинга отбирали, ориентируясь на положения карбоксильной группы, аминогруппы и C $\alpha$ -атома D-аминокислоты, подходящих для катализа реакции. Соответствующие положения выбирали на основании кристаллических структур RtoDAAO в комплексе с D-аланином/иминопиперидатом (PDBID 1C0P) и rkDAAO (из почек свиньи) в комплексе с иминотриптофаном (PDBID 1DDO). Положение боковых радикалов D-аминокислот выбирали исходя из потенциально возможных взаимодействий субстрата с DAAO.

Расчет RMSD между структурами проводили по C $\alpha$ -атомам, используя команду “align” пакета программ PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0, Schrödinger, LLC). Для расчета RMSD использовали пять циклов отклонений структурных выбросов (параметр “cycles”).

Визуализацию структур проводили также с помощью программы PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0, Schrödinger, LLC).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Поиск новых DAAO из экстремофильных бактерий и архей по гомологии

Поиск новых потенциальных DAAO проводили по базе UniProt NCBI для геномов бактерий и совместной базе секвенированных геномов экстремофильных микроорганизмов МГУ имени М.В. Ломоносова и ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН. В качестве референсных использовали аминокислотные последовательности ферментов из дрожжей *R. toruloides* (более известных как *R. gracilis*), *T. variabilis*, *C. boidinii*, *O. parapolyomorpha* DL-1 (пять DAAO и одна DASPO) и бактерий *A. protophormiae*, *R. xylanophilus* и *S. coelicolor*. Подробная информация об источниках последовательностей DAAO, рассмотренных в данной работе, представлена в табл. 1. В случае бактерий использовали последовательности только тех ферментов, для которых была точно показана оксидазная активность. В первую очередь новые ферменты сравнивали с наиболее хорошо изученными DAAO из *R. toruloides* и *T. variabilis*. Особое внимание было уделено пяти DAAO и одной DASPO из дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1, поскольку это единственный на настоящий момент организм, у которого получено и изучено такое количество паралоогичных ферментов. Гены *daao* и *daspo* из дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1 клонировали и экспрессировали в клетках *E. coli* в активной форме. Четыре DAAO и DASPO получены в высокоочищенном виде, определены их каталитические параметры с D-аминокислотами и изучены зависимости активности и стабильности при различных значениях pH, а также изучена термостабильность при значениях pH, оптимальных для стабильности. Аминокислотные последовательности DAAO позвоночных не использовали, поскольку они изначально имели низкую гомологию с ферментами микроорганизмов [1, 2, 9].

В результате поиска гомологов DAAO в бактериальных геномах, депонированных в UniProt NCBI, найдено большое количество кандидатных последовательностей, но уровень гомологии не превышал 30%. Экспертная оценка результатов поиска показала, что абсолютное большинство последовательностей с уровнем гомологии менее 23% не могут быть отнесены к DAAO. Поэтому для дальнейшей работы были отобраны только последовательности из термофильных бактерий с гомологией 24–30%. Экспертная оценка этих белков по консервативным остаткам (см. следующий раздел) позволила сузить набор до последовательностей, характерных для DAAO и GOX. Аналогичный набор процедур использовали при поиске генов потенциальных DAAO

в геномах экстремофилов и архей в базе МГУ имени М.В. Ломоносова и ФИЦ Биотехнологии РАН.

### Сравнение аминокислотных последовательностей новых DAAO с известными ферментами из бактерий, дрожжей и грибов

На *рис. 1* представлена часть результатов множественного выравнивания найденных последовательностей (названия новых ферментов выделены полужирным курсивом) и последовательностей референсных DAAO. Чтобы не загромождать и так большой рисунок, на нем не приведены все результаты поиска в базе UniProt NCBI. Мы оставили только найденные последовательности пяти DAAO из экстремофильных микроорганизмов и не привели данные для глицинооксидаз. Однако проведено также множественное выравнивание последовательностей глицинооксидаз и построены модельные структуры, по результатам анализа которых они и были отнесены к GOX. Из базы геномов МГУ и ФИЦ Биотехнологии РАН после экспертной оценки были отобраны четыре последовательности – по одной из бактерий *Natronosporangium hydrolyticum* ACRA39 [24] и *Natroglycomyces albus* ACRA22 [25] (этот фермент в результате оказался глицинооксидазой), и две из архей *Natrarchaeobius halalkaliphilus* AArch4 [26]. Кроме того, в выравнивании представлены последовательности из двух патогенов – *Mycobacterium tuberculosis* (MycDAAO) и *Pseudomonas aeruginosa* (PaeGOX), также найденные нами в результате поиска по гомологии. Белок *P. aeruginosa* в базе NCBI аннотирован как DAAO.

Множественное выравнивание отобранных последовательностей проводили с помощью программы Clustal X 1.83 (*рис. 1*). Использование этой программы обусловлено тем, что она сама выстраивает иерархию в гомологии заданных последовательностей. Результаты такого выравнивания дали достаточно ожидаемые результаты. Как следует из *рис. 1*, в зависимости от источника ферменты четко разделены на две группы – сверху находятся бактериальные DAAO, за ними следуют ферменты дрожжей и грибов, сразу за ними – DAAO из архей, а затем глицинооксидазы. Вторым интересным моментом является то, что наиболее высокую гомологию с бактериальными DAAO имеет широко применяемая и хорошо изученная TvaDAAO, в то время как вторая, даже более полно изученная RtoDAAO, находится в самом конце списка перед археями.

Как уже отмечалось, при поиске генов целевых ферментов в новых источниках используют подход, основанный на гомологии белков, выполняющих одинаковую функцию (например, катализируют одну и ту же реакцию). В ряде случаев такие фермен-

ты обладают очень высокой гомологией в области субстратсвязывающих и каталитического доменов, и тогда решение такой задачи не представляет особого труда. В качестве примера можно привести NAD(P)<sup>+</sup>-зависимую формиатдегидрогеназу (ФДГ), состоящую из двух идентичных субъединиц и не содержащую в активном центре кофакторов. Степень гомологии между ФДГ даже из эволюционно удаленных источников (например, бактерии и высшие растения) составляет не менее 55%, а при множественном выравнивании наблюдается большое количество достаточно протяженных (до 10–15 аминокислотных остатков) консервативных последовательностей во всех участках активного центра [27–29]. В DAAO уровень гомологии не превышает 30%, что намного ниже. В этом случае информация о консервативных и каталитически важных аминокислотных остатках могла бы помочь аннотации гена. Однако в случае DAAO этот подход малоэффективен. Характерной особенностью механизма действия FAD-содержащих ферментов является перенос гидрид-иона с субстрата на изоаллоксазиновое кольцо кофактора без значимого участия аминокислотных остатков фермента, основная роль которых сводится к формированию необходимой для катализа конформации активного центра и участию ряда остатков в связывании FAD и D-аминокислот. В случае кофактора обязательно наличие на N-конце фермента характеристической (fingerprint) последовательности GxGxxG [30]. Для связывания карбоксильной группы аминокислоты считалось обязательным наличие в активном центре остатков аргинина и тирозина (R285 и Y223 в RtoDAAO и R302 и Y243 в TvaDAAO). Аналогичные остатки присутствуют и в ферментах млекопитающих [1, 2]. Однако расширение выборки сравниваемых последовательностей свидетельствует, что консервативными остаются только характеристическая последовательность в FAD-связывающем домене и остаток аргинина, участвующий в связывании субстрата за счет взаимодействия с карбоксильной группой. Отметим, что подвижность этого остатка Arg сильно ограничивает соседний консервативный остаток пролина (пара ArgPro, *рис. 1*, четвертый ряд выравнивания). Остаток тирозина (*рис. 1*, третий ряд выравнивания, середина) консервативным не является – в двух из шести оксидаз OraDAAO, а также в двух бактериальных ферментах – MycDAAO и GthDAAO, в этом положении находятся отличающиеся по своим свойствам остатки Met, Phe, Ala и Cys. Кроме того, указанная пара признаков не может использоваться для аннотации фермента в качестве DAAO, поскольку эта же пара (характеристическая последовательность и пара консервативных остатков ArgPro) присутствует во всех глицинок-

# ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

## CIUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

NhyDAAO	-----MAEVDLVLCG	CG	CTTAVLAETG	-----RRVTVKATEPAR	-----TTSVAVAGLWMPYLVRFVD	-----KVTAWGAATLTELRLTADLPD	-----TTGVRRTNGVVL
GchDAAO	-----MDVLVLCG	CG	TTAVLAELAG	-----HVLVRAEPPHA	-----TTSVAAAGLWMPYLAQPR	-----VRLRWAEKSLALTELAAPH	-----DTGVHLASGKGV
MycDAAO	-----MAGTQGVIVCG	CG	TSATCLAEAG	-----WVPRVWAAALPQ	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----KVRGVIKQSLHVFRLDARDP	-----ATGVMTPALSV
SavDAAO	-----MTRDGRGSEVIVCG	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
ScDAAO	-----METELDDERDGEVIVCG	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----LAQAWALRSLSDFVEELAAARPG	-----QTGVRMLEG-VL
CchDAAO	-----MTRSRALVLCG	CG	LACARLLQAG	-----YVVTITRQPKFS	-----TTSVAAALWYPPYCAPRE	-----KALPWSKATFEELLRQHRDQ	-----VGVVPTTFITL
RhoDAAO	-----MVLVLCG	CG	TTAVLAELAG	-----HVLVRAEPPHA	-----TTSVAAAGLWMPYLAQPR	-----VRLRWAEKSLALTELAAPH	-----DTGVHLASGKGV
RtaDAAO	-----MDLVLCG	CG	TSATCLAEAG	-----WVPRVWAAALPQ	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----KVRGVIKQSLHVFRLDARDP	-----ATGVMTPALSV
RxyDAAO	-----MTRDGRGSEVIVCG	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
RraDAAO	-----MTRDGRGSEVIVCG	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
AprDAAO	-----MFTAPLRTVLCG	CG	SAEHLAELAG	-----HQVTVAYDQELAE	-----CVSSVAAAWYPPYCAPRE	-----AADKLLADSLARFQSEHP	-----ETGDLRGLRLAV
TvaDAAO	-----MAKIVIVCG	CG	TTAVLAELAG	-----HVLVRAEPPHA	-----TTSVAAAGLWMPYLAQPR	-----VRLRWAEKSLALTELAAPH	-----DTGVHLASGKGV
OpadAAO2	-----MAKIVIVCG	CG	TTAVLAELAG	-----HVLVRAEPPHA	-----TTSVAAAGLWMPYLAQPR	-----VRLRWAEKSLALTELAAPH	-----DTGVHLASGKGV
NcrDAAO	-----MS-TIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
FsoDAAO	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
RemDAAO	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
ChDAAO	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
OpadAAO4	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
OpadAAO1	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
PpaDAAO1	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
SpoDAAO1	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
OpadAAO3	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
OpadAAO5	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
OpadA5PO	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
RtoDAAO	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
NhaDAAO	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
NhaGOX	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
PaeGOX	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ
NaIGOX	-----MSTIVVVC	CG	TTAVLAESG	-----RRVWVTRPEVER	-----TTSVAVAGLWMPYLAQPR	-----SARAWALTSFDVVEELATRPG	-----RTGVRMVEG-VQ

Рис 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей оксидов D-аминокислот из дрожжей, бактерий и архей (названия бактерий зеленого, синим и черным соответствием). Соответствие названий смотри в табл. 1. Новые последовательности DAAO, проанализированные в данной работе, выделены полужирным курсивом. Зеленым фоном в выравнивании указаны остатки, которые ранее считались консервативными для связывания D-аминокислоты в активном центре DAAO. Зеленым фоном в выравнивании выделен остаток Tyr, который ранее считался консервативным для связывания D-аминокислоты в активном центре

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

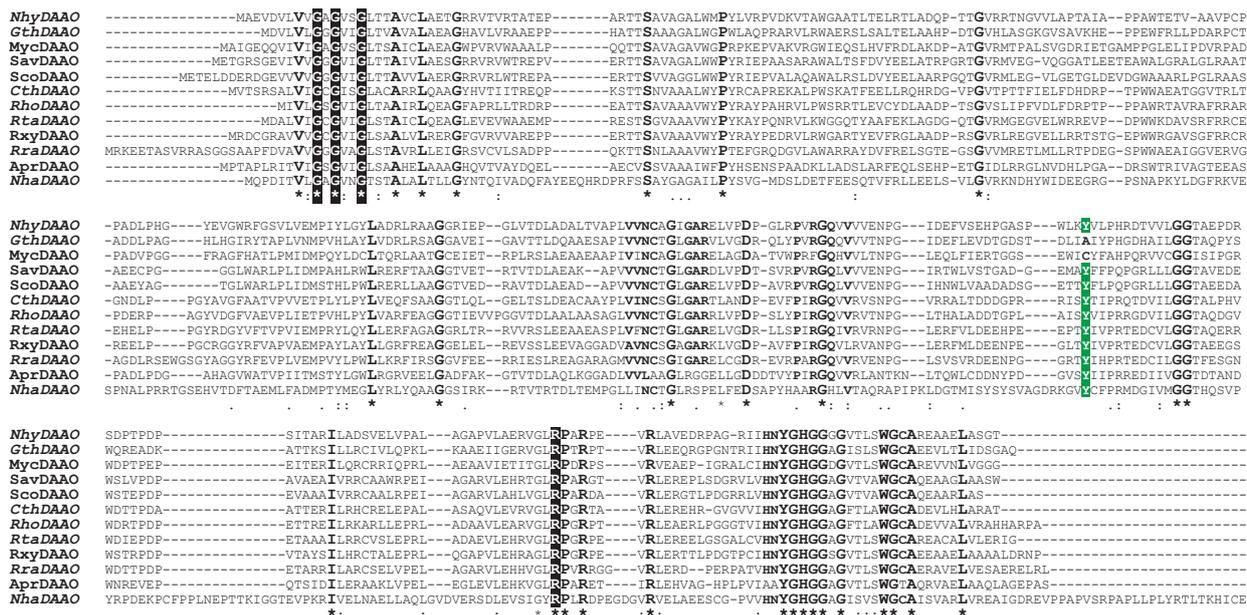


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей оксидаз D-аминокислот из бактерий и архей после отсеивания последовательностей глициноксидаз. Соответствие названий смотри в табл. 1. Новые последовательности DAAO, проанализированные в данной работе, выделены полужирным курсивом. Зеленым фоном в выравнивании выделен остаток Туг, который ранее считался консервативными для связывания D-аминокислоты в активном центре

сидазах. При выравнивании последовательностей только бактериальных DAAO (рис. 2) ситуация более оптимистична. Как следует из рис. 2, в присутствии консервативной для всех оксидаз пары ArgPro в бактериальных ферментах она расширяется до последовательности GxRPxR, а также появляется новая консервативная последовательность YGHGGxG. Однако некоторые глициноксидазы также имеют такие последовательности (на рис. 2 не показано).

Одна из найденных последовательностей принадлежит DAAO из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO). Из рис. 2 хорошо видно, что аминокислотная последовательность этого фермента длиннее, чем у бактериальных DAAO. В выравнивании четко выделяются три большие вставки в районе FAD- и субстратсвязывающих доменов, а также на С-конце. Тем не менее, NhaDAAO содержит тот же набор консервативных остатков, что и в DAAO бактерий. Во втором проанализированном эталоне из *N. halalkaliphilus* AArch4 – глициноксидазы NhaGOX – положение вставок и делеций очень хорошо совпадает с их положением в GOX из *P. aeruginosa* (рис. 1) и других глициноксидазах (не показано).

По результатам сравнения аминокислотных последовательностей можно сделать некоторое предположение о типе субстратной специфичности. При сильном различии в размерах субстрата можно легко заметить разницу в длине участков, формирующих субстратсвязывающий домен, уже на стадии

выравнивания аминокислотных последовательностей. Например, TvaDAAO, RemDAAO и FsoDAAO имеют более длинные последовательности в районе остатков 100–108 (рис. 1, левая часть второго ряда выравнивания). Это обусловлено тем, что эти ферменты способны окислять объемный цефалоспирин С, в то время как остальные DAAO, имеющие в этой части выравнивания делеции, цефалоспирин С не окисляют. Например, SboDAAO специфична к небольшому аминокислотам, в первую очередь к D-Ala [17]. Однако следует отметить, что поиск по гомологии не позволяет отличить классическую DAAO с широким спектром субстратной специфичности от оксидазы D-аминокислот DASPO, специфичной только к D-Asp и D-Glu. Например, OpaDAAO1 (табл. 1) в аннотации генома *O. parapolytormpha* DL-1 указана как D-аспартатоксидаза (DASPO), хотя наши экспериментальные данные свидетельствуют, что это абсолютно не так. Результаты наших исследований показали, что фермент имеет широкий спектр субстратной специфичности и по pH-профилям активности и стабильности он идентичен RtoDAAO и TvaDAAO. Аналогичная ситуация наблюдается и при аннотации генома *Pichia pastoris*. PpaDAAO1, аннотированная в геноме как оксидазы D-аминокислот, в действительности является DASPO, а PpaDAAO2, аннотированная как «гипотетический белок с низкой гомологией с оксидазой D-аминокислот» (hypothetical protein with low similarity to D-amino acid oxidase), это именно DAAO [14].

Таблица 1. Оксидазы D-аминокислот и глицинооксидазы и их источники\*

№	Обозначение	Источник	Код белка в базах данных
NCBI (GeneBank, UniProt)			
Бактерии			
1	<b>GthDAAO</b>	<i>Gandjariella thermophila</i>	WP_137812914.1
2	<b>CthDAAO</b>	<i>Chloracidobacterium thermophilum</i> B	WP_014099936.1
3	<b>RtaDAAO</b>	<i>Rubrobacter taiwanensis</i>	WP_132692836.1
4	<b>RraDAAO</b>	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> DSM 5868	WP_084263988.1
5	<b>RbaDAAO</b>	<i>Rhodothermaceae bacterium</i> RA	ARA94025.1
6	RxyDAAO	<i>Rubrobacter xylanophilus</i>	BAP18969.1
7	MycDAAO	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WP_003899072
8	SavDAAO	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	BAC69383
9	ScoDAAO	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	CAB40690
10	AprDAAO	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	AY306197
11	<b>PaeGOX</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AAP81270
Грибы и дрожжи			
12	TvaDAAO	<i>Trigonopsis variabilis</i>	AY514426
13	NcrDAAO	<i>Neurospora crassa</i>	EAA33029
14	FsoDAAO	<i>Fusarium solani</i>	BAA00692
15	RemDAAO	<i>Rasamsonia emersonii</i>	BBH51408
16	CboDAAO	<i>Candida boidinii</i>	BAB12222
17	PpaDAAO	<i>Pichia pastoris</i> CBS7435	SCV12162
18	SpoDAAO	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_001342883
19	RtoDAAO	<i>Rhodospiridium toruloides (Rhodotorula gracilis)</i>	U60066
20	OpaDAAO1	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013932717
21	OpaDAAO2	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013937260
22	OpaDAAO3	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013934816
23	OpaDAAO4	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013937224
24	OpaDAAO5	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013937169
25	OpaDASPO	<i>Ogataea parapolyomorpha</i> DL-1	XP_013932178
База геномов МГУ имени М.В. Ломоносова и ФИЦ Биотехнологии РАН			
Бактерии			
26	<b>NhyDAAO</b>	<i>Natronosporangium hydrolyticum</i> АСРА39	lcl CP070499.1_prot_QSB16697.1_2115
27	<b>NalGOX</b>	<i>Natroglycomyces albus</i> АСРА22	lcl CP070496.1_prot_QSB06127.1_824
Археи			
28	<b>NhaDAAO</b>	<i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i> AArch4	2642575300
29	<b>NhaGOX</b>	<i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i> AArch4	2642575587

\*Новые последовательности DAAO из экстремофильных микроорганизмов, проанализированные в данной работе, выделены полужирным курсивом.

### Построение модельных 3D-структур и их сравнительный анализ с известными структурами

Как уже отмечалось во «Введении», целью поиска и клонирования новых генов является не просто получение рекомбинантного фермента, а создание биокатализатора с заданными свойствами с использованием в качестве исходного фермента, наиболее

близкого к целевому. В случае DAAO сделать вывод о свойствах (в первую очередь о субстратной специфичности и оптимальном pH-профиле активности) на основе выравнивания просто невозможно. В связи с этим требуется использование дополнительных методов. Для решения поставленной задачи нами предложен подход, основанный на построении модельных трехмерных структур. На первом этапе

модельные структуры новых ферментов сравнивают с экспериментальными и модельными структурами известных оксидаз D-аминокислот и глицинооксидаз.

Опубликовано много примеров, когда ферменты с низкой гомологией имеют очень близкую пространственную структуру. Наглядным примером является супервторичная структура, называемая укладкой по Россману (Rossmann fold), универсальной для связывания адениновой части различных кофакторов и коферментов – NAD(P)<sup>+</sup>, FAD, ATP, SAM и др. [31]. Использование такого подхода к DAAO до недавнего времени было невозможно в силу отсутствия репрезентативного набора структур. Экспериментальные структуры получены всего для четырех ферментов – RtoDAAO и RemDAAO дрожжей и ферментов из почки свиньи (pkDAAO) и человека (hDAAO). Построена модельная структура TvaDAAO [32]. Однако этот фермент как по первичной (рис. 1), так и по третичной (табл. 2) структуре очень близок к RemDAAO. Кроме того, использованные ранее методы моделирования давали неплохие результаты только при высокой гомологии последовательностей изучаемого фермента и фермента, структура которого используется в качестве основы (template) для построения модельной 3D-структуры. Высокая точность достигалась при гомологии не менее 50–60%, что не соблюдается в случае DAAO. Ситуация кардинально изменилась, когда в 2021 году предложили новый алгоритм построения модельных структур AlphaFold [33]. В 2022 году точность предсказания была существенно улучшена [19]. Использование AlphaFold2 позволяет получить достоверную информацию о структуре как новых ферментов, так и уже описанных DAAO. Такие модельные структуры и построены в нашей работе. Всего выполнено моделирование структур 18 белков (в том числе восьми новых). В табл. 2 представлены результаты попарного сравнения модельных и экспериментальных структур оксидаз D-аминокислот и глицинооксидаз. В данном случае набор анализируемых структур DAAO дополнен двумя экспериментальными структурами DAAO млекопитающих – из почки свиньи и человека, и структурами двух глицинооксидаз. Кроме того, для сравнения использовали и собственные предварительные данные рентгеноструктурного анализа TvaDAAO и OpaDAAO1. Такой расширенный набор позволяет более точно провести сравнение и повысить достоверность отнесения новых белков к DAAO или GOX. Для удобства восприятия результаты сравнения, приведенные в табл. 2, выделены цветом. Зеленым фоном показаны результаты сравнения структур с RMSD до 1 Å, светло-зеленым – с RMSD от 1 до 2 Å, светло-оранжевыми – с RMSD

от 2 до 6 Å и оранжевым – с RMSD выше 6 Å. Можно отметить несколько важных и интересных результатов анализа данных табл. 2.

1. Последняя модификация алгоритма AlphaFold в версии 2022 года [19] действительно позволяет получить модельные структуры с очень высокой точностью. Это хорошо видно при сравнении модельной и экспериментальной структур OpaDAAO1. Среднеквадратичное отклонение между этими структурами составляет всего 0.38 Å. RMSD между модельной и экспериментальной структурами TvaDAAO немного больше – 0.56 Å (в табл. 2 не показано), но следует учитывать, что эти ферменты имеют разную олигомерную структуру (OpaDAAO1 – мономер, TvaDAAO – димер). Высокая точность предсказания структуры OpaDAAO1 приводит к тому, что попарное сравнение модельной и экспериментальной структур OpaDAAO1 с модельными и экспериментальными структурами других ферментов дает практически одинаковые значения RMSD (табл. 2, строки 1 и 8).

2. Наблюдается четкая корреляция между функцией и общей структурой оксидаз D-аминокислот и глицинооксидаз. Величина отклонения RMSD между структурами DAAO не превышает 2 Å, в то время как при сравнении структур DAAO и GOX значение RMSD составляет 3 Å и более (до 15–18 Å). Из общей картины выпадают результаты с NhaDAAO из архей – отклонение модельной структуры от структур других DAAO составляет 2.0–3.5 Å (в случае OpaDAAO3 отклонение достигает даже 4.69 Å). В то же время разница в структуре NhaDAAO с глицинооксидазами намного больше – от 9 до 17 Å. Также отметим, что этот фермент имеет общую структуру, близкую к DAAO человека (RMSD всего 1.96 Å). Такие результаты показывают, что для корректного подтверждения, что данный фермент является DAAO, следует использовать как можно более широкую выборку структур известных оксидаз D-аминокислот. Тем не менее, несмотря на то что результаты общего сравнения структуры NhaDAAO со структурами других DAAO в целом немного выходят за пределы граничного значения 2 Å, анализ гомологии и сравнение общей структуры позволили отнести этот фермент к оксидазам D-аминокислот. Этот вывод полностью подтверждает результаты сравнения структуры активных центров.

### Сравнительный анализ структур активных центров DAAO

На следующем этапе мы сравнили структуры активных центров новых DAAO с известными оксидазами D-аминокислот. Совпадение структуры нового фермента со структурой активного центра другой

Таблица 2. Среднеквадратичное отклонение между структурами оксидов D-аминокислот и глицинооксидаз\*

Фермент	<i>OpaDAAO1</i>	0.00	0.79	0.43	1.19	1.24	1.37	0.89	0.38	0.93	1.00	1.40	1.33	6.22	7.72	3.50	0.98	2.79	3.13	1.05	4.61	1.23	0.80	0.92	1.52
	<i>OpaDAAO2</i>	0.79	0.00	0.71	0.81	0.74	1.06	0.66	0.82	0.84	0.79	1.46	1.34	5.51	10.29	2.22	0.91	7.72	4.31	0.80	5.66	0.87	0.86	0.79	0.96
	<i>OpaDAAO3</i>	0.43	0.71	0.00	1.14	1.12	1.13	0.89	0.53	1.15	0.83	1.53	2.74	6.20	12.49	4.69	1.00	5.01	13.81	0.82	7.17	1.10	0.88	0.82	1.19
	<i>OpaDAAO4</i>	1.19	0.81	1.14	0.00	0.96	1.30	1.01	1.21	1.17	1.08	2.00	2.33	3.10	21.04	2.21	1.10	3.94	2.79	0.99	3.07	1.31	1.36	1.27	1.15
	<i>OpaDAAO5</i>	1.24	0.74	1.12	0.96	0.00	1.45	0.97	1.16	1.20	1.07	2.99	2.96	3.31	19.18	3.90	1.14	3.72	11.66	1.04	5.26	1.53	1.12	1.16	1.70
	<i>OpaDASPO</i>	1.37	1.06	1.13	1.30	1.45	0.00	1.19	1.36	1.01	1.15	1.58	2.30	2.85	6.44	3.24	0.95	6.71	3.98	1.00	3.76	1.14	1.18	1.04	1.03
	<i>TvaDAAO_RSA</i>	0.89	0.66	0.89	1.01	0.97	1.19	0.00	0.78	0.88	0.73	1.98	1.94	4.33	6.27	3.54	0.95	7.32	4.60	0.84	11.75	0.98	1.21	0.96	1.05
	<i>OpaDAAO1_RSA</i>	0.38	0.82	0.53	1.21	1.16	1.36	0.78	0.00	0.98	0.92	1.45	1.35	5.95	9.63	3.46	1.04	2.94	4.25	1.04	4.87	1.23	0.88	0.93	1.49
	<i>RtoDAAO_1C0P</i>	0.93	0.84	1.15	1.17	1.20	1.01	0.88	0.98	0.00	0.88	1.47	1.52	3.66	3.85	2.05	0.89	7.28	5.70	0.86	3.65	0.86	0.82	0.93	1.16
	<i>RemDAAO_7CT4</i>	1.00	0.79	0.83	1.08	1.07	1.15	0.73	0.92	0.88	0.00	1.56	1.94	4.81	15.72	3.09	0.91	11.83	2.71	0.78	3.79	0.99	1.01	0.96	1.15
	<i>hDAAO_2DU8</i>	1.40	1.46	1.53	2.00	2.99	1.58	1.98	1.45	1.47	1.56	0.00	0.41	4.50	4.52	1.96	1.09	8.68	9.48	1.16	8.13	1.10	1.38	1.12	1.12
	<i>pkDAAO_1KIF</i>	1.33	1.34	2.74	2.33	2.80	2.30	1.94	1.35	1.52	1.94	0.41	0.00	3.78	4.22	2.83	1.05	4.76	4.67	1.08	5.36	1.07	1.31	1.05	1.07
	<i>GOX_ING4</i>	6.12	5.51	6.20	3.10	3.31	2.85	4.33	6.11	3.66	4.81	4.50	3.78	0.00	1.33	17.38	2.31	1.24	1.01	2.15	1.21	3.29	3.56	5.44	2.78
	<i>IDA_Ox_6PXS</i>	7.72	10.29	12.49	21.04	19.18	6.44	6.27	9.63	3.85	14.20	5.03	4.22	1.33	0.00	9.26	4.28	1.13	0.91	2.67	1.45	6.90	2.69	5.01	3.35
	<i>NhaDAAO</i>	3.50	2.25	4.69	2.21	3.90	3.24	3.54	3.46	2.05	3.09	1.96	2.83	17.38	9.26	0.00	1.19	9.48	5.26	0.88	10.28	2.59	1.67	2.01	3.00
	<i>NhyDAAO</i>	0.98	0.91	1.00	1.10	1.14	0.95	0.95	1.04	0.89	0.91	1.09	1.05	2.31	4.28	1.19	0.00	1.95	3.09	0.56	2.19	0.50	0.71	0.46	0.70
	<i>NalGOX</i>	2.79	7.72	5.01	3.94	3.72	6.25	7.32	2.94	7.28	12.83	8.68	4.76	1.24	1.13	16.19	1.95	0.00	1.21	3.99	1.54	1.51	2.43	3.79	5.80
	<i>NhaGOX</i>	3.13	4.31	13.81	2.79	11.66	3.98	4.60	4.25	5.70	2.71	9.48	4.67	1.01	0.91	5.26	3.09	1.21	0.00	2.95	1.16	11.37	5.12	5.19	6.13
	<i>RraDAAO</i>	1.05	0.80	0.82	0.99	1.04	1.00	0.84	1.04	0.86	0.78	1.16	1.08	2.15	2.67	0.88	0.56	3.99	2.95	0.00	2.33	0.52	0.59	0.41	0.61
	<i>PaeGOX</i>	4.61	5.66	7.16	3.07	5.26	3.76	11.75	4.87	3.65	3.79	8.13	5.36	1.21	1.45	10.28	2.19	1.54	1.16	2.33	0.00	3.31	3.67	3.15	2.96
	<i>RbaDAAO</i>	1.23	0.87	1.10	1.31	1.53	1.14	0.98	1.23	0.86	0.99	1.10	1.07	3.29	6.90	2.59	0.50	1.51	11.37	0.52	3.31	0.00	0.56	0.45	0.78
	<i>CthDAAO</i>	0.80	0.86	0.88	1.36	1.12	1.18	1.21	0.88	0.82	1.01	1.38	1.31	3.56	2.59	1.67	0.71	2.43	5.12	0.59	3.67	0.56	0.00	0.63	0.94
	<i>RtaDAAO</i>	0.92	0.79	0.82	1.27	1.16	1.04	0.96	0.93	0.93	0.96	1.12	1.05	5.44	5.01	2.01	0.46	3.79	5.19	0.41	3.15	0.45	0.63	0.00	0.64
	<i>GthDAAO</i>	1.52	0.96	1.19	1.15	1.70	1.03	1.05	1.49	1.16	1.15	1.13	1.07	2.78	3.35	3.00	0.70	5.80	6.13	0.61	2.96	0.78	0.94	0.60	0.00

\*Новые последовательности DAAO, проанализированные в данной работе, выделены полужирным курсивом.

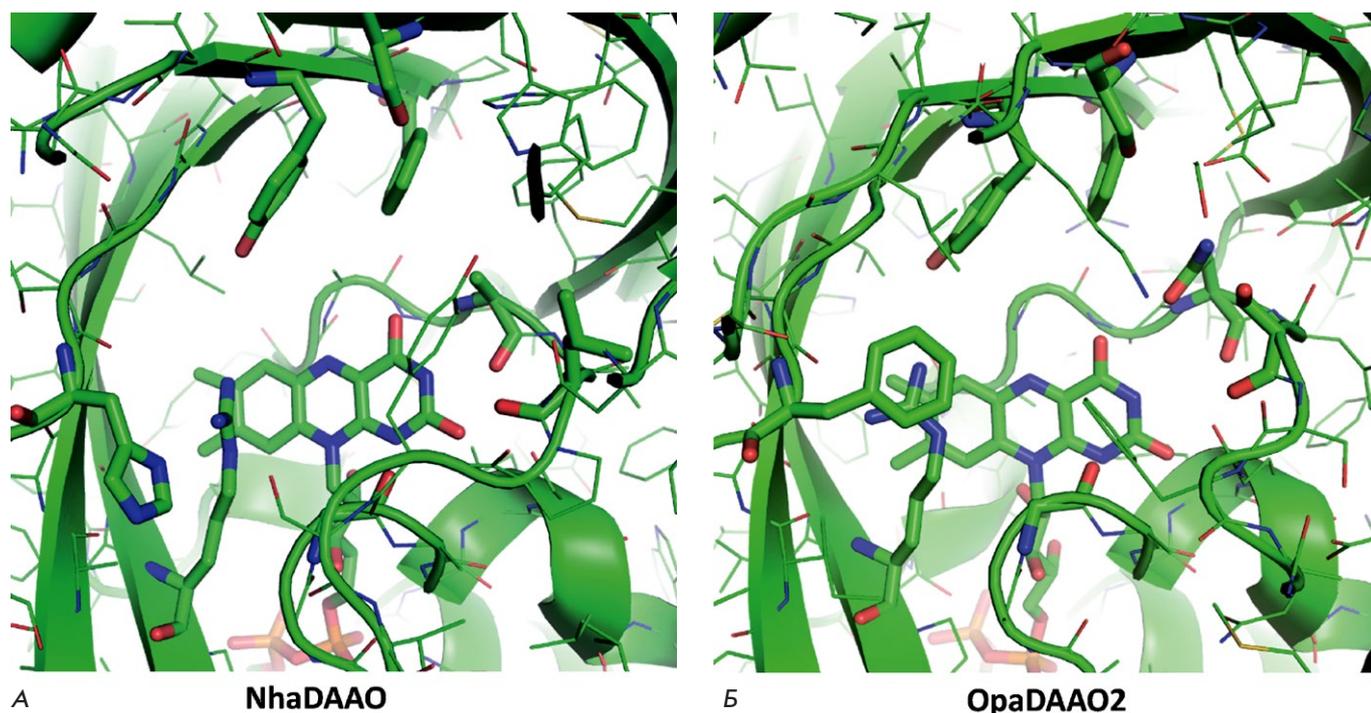


Рис. 3. Модельные структуры активных центров NhaDAAO из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 (А) и OpaDAAO2 из метилотрофных дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1 (Б)

описанной ранее оксидазы D-аминокислот однозначно доказывает принадлежность новой DAAO к семейству оксидаз. Структура FAD-связывающего домена должна быть очень близкой во всех DAAO, однако из-за различной специфичности структура субстратсвязывающих доменов должна отличаться достаточно значительно как по объему, так и по типу остатков, участвующих в связывании конкретной D-аминокислоты. Поэтому совпадение структур субстратсвязывающих доменов активного центра позволяет однозначно доказать, что новый фермент относится к семейству DAAO и сделать достаточно достоверный вывод о возможном спектре субстратной специфичности. В этом случае особенно полезно сравнение со структурами активных центров DAAO из дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1, поскольку эти ферменты сильно отличаются друг от друга как по профилю субстратной специфичности, так и по pH-зависимостям активности и стабильности. Наиболее наглядно эффективность такого сравнения видна на примере NhaDAAO из архей. Как отмечено выше, этот фермент имеет заметные отличия от других DAAO как по длине аминокислотной последовательности, так и по общей структуре. Однако результаты сравнения структуры именно активных центров свидетельствуют, что NhaDAAO и OpaDAAO2 имеют практически идентичные активные центры (рис. 3). При выравнивании общих структур по кофактору FAD видно,

что в субстратсвязывающем домене помимо консервативного остатка Arg (см. выше) имеются еще два участвующих в связывании субстрата остатка – Tyr и Phe, расположение которых в активных центрах NhaDAAO и OpaDAAO2 практически идентично. Кроме того, результаты моделирования структуры активного центра самой OpaDAAO2 полностью согласуются с экспериментальными данными, согласно которым наилучшими субстратами являются D-аминокислоты с гидрофобными боковыми группами – D-Phe (самая высокая активность), D-Tyr и D-Leu. Поэтому вполне логично предположить, что таким же спектром субстратной специфичности должна обладать и NhaDAAO. По результатам сравнения с активным центром OpaDAAO3 предсказана также высокая специфичность к D-Leu и D-Phe и фермента из *N. hydrolyticum* АСРА39 (NhyDAAO) (на рис. не показано). В настоящее время ген этого фермента клонирован в нашей лаборатории, проводятся работы по его экспрессии в клетках *E. coli*. Предварительные эксперименты подтвердили, что наилучшим субстратом NhyDAAO являются именно D-Leu и D-Phe (детальное описание получения и изучение свойств NhyDAAO будет представлено в отдельной публикации).

Сравнение структур DAAO показало, что активные центры ферментов из *G. thermophila* (GthDAAO) и из *R. radiotolerans* DSM 5868 (RraDAAO) достаточно уникальны. В GthDAAO в связывании боковых

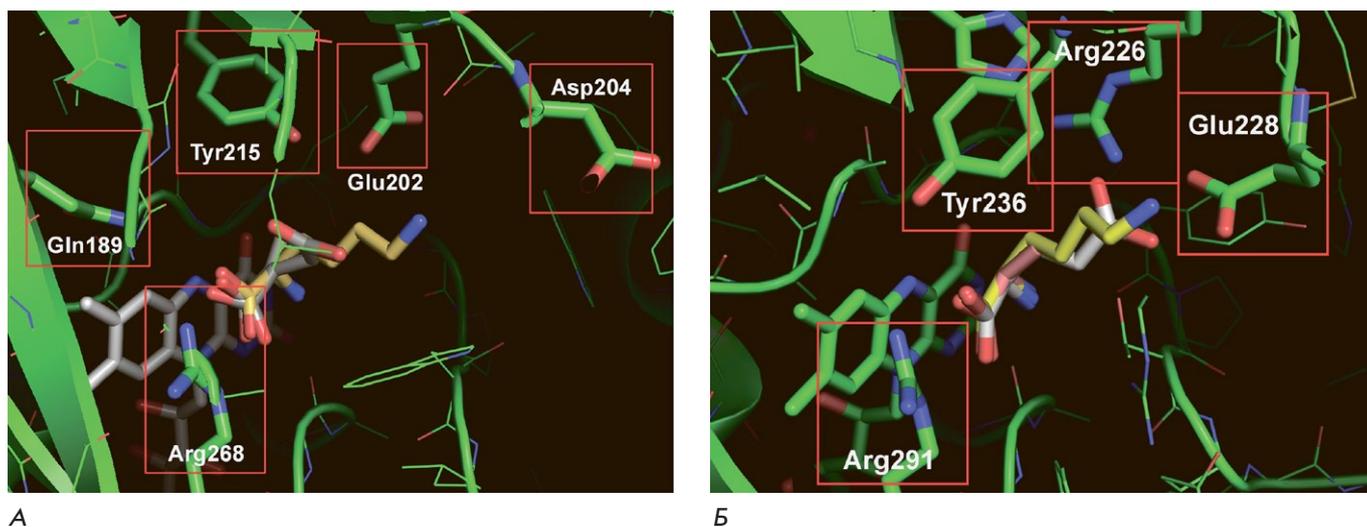


Рис. 4. Докинг D-Ala, D-Asp и D-Lys в активный центр DAAO из *G. thermophila* (А) и докинг D-Ala, D-Glu и D-Lys в активный центр DAAO из *R. radiotolerans* DSM 5868 (Б)

групп субстратов должны принимать участие карбоксильные группы боковых групп остатков Glu202 и Asp204 (рис. 4А). Это предполагает, что данный фермент может быть специфичен к D-Lys и D-Arg, однако докинг различных D-аминокислот свидетельствует, что обе карбоксильные группы остатков Glu202 и Asp204 расположены на довольно большом расстоянии (более 3 Å) от молекулы субстрата. Более интересная картина наблюдается в случае RraDAAO (рис. 4Б). В связывании боковых групп субстрата могут участвовать положительно заряженный остаток Arg226 и отрицательно заряженный остаток Glu228. Докинг в активный центр различных D-аминокислот позволяет предположить, что RraDAAO должна быть специфичной к положительно заряженному D-Lys и потенциально активной с D-Glu. Клонирование гена этого фермента представляет интерес, так как D-Lys является плохим субстратом для всех описанных DAAO.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных экспериментов позволяют сделать несколько выводов.

Введение второго этапа – структурного анализа – при идентификации генов новых оксидаз D-аминокислот, после проведения поиска в геномах по гомологии является высокоэффективной и необходимой процедурой. На этом этапе удается не только однозначно подтвердить принадлежность нового фермента к DAAO, но и предсказать возможный спектр его субстратной специфичности. Достоверность такого предсказания для новой DAAO из бактерий *R. radiotolerans* DSM 5868 высокой активности с D-Leu и D-Phe подтверждена экспериментально.

Аминокислотные последовательности оксидаз D-аминокислот из бактерий имеют низкую гомологию (не более 30%). В ходе анализа последовательностей бактериальных DAAO выявлены новые характерные консервативные участки, которые могут быть использованы для идентификации данных ферментов при их поиске в геномах. Присутствие новых консервативных участков показано и в последовательности DAAO из археи *N. halalkaliphilus* AArch4 (NhaDAAO).

Впервые ген оксидазы D-аминокислот найден в геноме архей. По сравнению с бактериальными DAAO фермент NhaDAAO из архей имеет более длинную аминокислотную последовательность и меньшее сходство общей трехмерной структуры, но результаты структурного анализа однозначно показали, что активный центр NhaDAAO практически идентичен активному центру OpaDAAO2 из метилотрофных дрожжей *O. parapolyomorpha* DL-1. Также в геноме *N. halalkaliphilus* AArch4 идентифицирована глициноксидаза, которая по своей гомологии наиболее близка к GOX из *P. aeruginosa*.

Оксидазы D-аминокислот играют важную роль в функционировании микроорганизмов и млекопитающих. Именно поэтому поиск ингибиторов hDAAO человека является одним из самых активных и актуальных направлений исследований этого фермента [34]. Достоверная идентификация в геноме возбудителя туберкулеза гена оксидазы D-аминокислот (MucDAAO) позволяет рассматривать этот фермент в качестве мишени для разработки нового типа лекарств против туберкулеза. В силу редкой встречаемости DAAO в бактериях и благодаря существенным отличиям этого фермента от других DAAO (в первую очередь от hDAAO) специфические инги-

биторы, связывающиеся именно с МусДААО, могут быть использованы в качестве противотуберкулезных средств. ●

*Авторы декларируют отсутствие  
конфликта интересов.*

*Поиск генов новых оксидаз D-аминокислот  
в геномах экстремофильных бактерий  
и архей выполнен в рамках Соглашения  
№ 075-15-2021-1396 от 26.10.2021  
о предоставлении из федерального бюджета  
грантов в форме субсидий на реализацию*

*отдельных мероприятий Федеральной научно-  
технической программы развития генетических  
технологий на 2019–2027 годы. Клонирование  
генов, экспрессия, выделение, характеристика  
и построение модельных структур  
ферментов из дрожжей *O. parapolymorpha*  
DL-1 выполнены в рамках гранта Российского  
фонда фундаментальных исследований  
(РФФИ № 21-34-70040 мол\_а\_мос.). Анализ  
последовательностей ферментов из патогенных  
микроорганизмов выполнен в рамках  
государственного задания.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tishkov V.I., Khoronenkova S.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. V. 70. № 1. P. 40–54. doi: 10.1007/s10541-005-0050-2
- Pollegioni L., Piubelli L., Sacchi S., Pilone M.S., Molla G. // *Cell Mol. Life Sci.* 2007. V. 64. P. 1373–1394. doi: 10.1007/s00018-007-6558-4
- Chumakov I., Blumenfeld M., Guerassimenko O., Cavarec L., Palicio M., Abderrahim H., Bougueleret L., Barry C., Tanaka H., La R.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 13675–13680. doi: 10.1073/pnas.182412499
- Cheng Y.J., Lin C.H., Lane H.Y. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22(20). P. 10917. doi: 10.3390/ijms222010917
- Pernot P., Mothet J.P., Schuvailo O., Soldatkin A., Pollegioni L., Pilone M., Adeline M.T., Cespuoglio R., Marinesco S. // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 1589–1597. doi: 10.1021/ac702230w
- Khoronenkova S.V., Tishkov V.I. // *Biochemistry (Moscow)*. 2008. V. 73. P. 1511–1518. doi: 10.1134/s0006297908130105
- Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M.S. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2008. V. 78. P. 1–16. doi: 10.1007/s00253-007-1282-4
- Pollegioni L., Molla G. // *Trends Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 276–283. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.01.010
- Takahashi S., Abe K., Kera Y. // *Bioengineered*. 2015. V. 6. P. 237–241. doi: 10.1080/21655979.2015.1052917
- Pollegioni L., Caldinelli L., Molla G., Sacchi S., Pilone M.S. // *Biotechnol. Prog.* 2004. V. 20. P. 467–473. doi: 10.1021/bp034206q
- Atroshenko D.L., Shelomov M.D., Zarubina S.A., Negru N.Y., Golubev I.V., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 4412. doi: 10.3390/ijms20184412
- Isogai T., Ono H., Ishitani Y., Kojo H., Ueda Y., Kohsaka M. // *J. Biochem.* 1990. V. 108. P. 1063–1069. doi: 10.1093/oxford-journals.jbchem.a123306
- Gonzalez F.J., Montes J., Martin F., Lopez M.C., Ferminan E., Catalan J., Galan M.A., Dominguez A. // *Yeast*. 1997. V. 13. P. 1399–1408. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199712)13:15<1399
- Pollegioni L., Molla G., Campaner S., Martegani E., Pilone M.S. // *J. Biotechnol.* 1997. V. 58. P. 115–123. doi: 10.1016/s0168-1656(97)00142-9
- Klompmaker S.H., Kilic A., Baerends R.J., Veenhuis M., van der Klei I.J. // *FEMS Yeast Res.* 2010. V. 10. P. 708–716. doi: 10.1111/j.1567-1364.2010.00647.x
- Yurimoto H., Hasegawa T., Sakai Y., Kato N. // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2001. V. 65. P. 627–633. doi: 10.1271/bbb.65.627
- Shimekake Y., Furuichi T., Abe K., Kera Y., Takahashi S. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 11948. doi: 10.1038/s41598-019-48480-y
- Atroshenko D., Shelomov M., Zhgun A., Avdanina D., Eldarov M., Pometun A., Chubar T., Savin S., Tishkov V. // *FEBS Open Bio*. 2018. V. 8(S1). P. 190. doi: 10.1002/2211-5463.12453
- Jumper J., Hassabis D. // *Nat. Methods*. 2022. V. 19. P. 11–12. doi: 10.1038/s41592-021-01362-6
- Mirdita M., Schutze K., Moriwaki Y., Heo L., Ovchinnikov S., Steinegger M. // *Nat. Methods*. 2022. V. 19. P. 679–682. doi: 10.1038/s41592-022-01488-1
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. P. 486–501. doi: 10.1107/S0907444910007493
- Morris G.M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M.F., Belew R.K., Goodsell D.S., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 30. P. 2785–2791. doi: 10.1002/jcc.21256
- Santos-Martins D., Solis-Vasquez L., Tillack A.F. // *J. Chem. Theory. Comput.* 2021. V. 17. P. 1060–1073. doi: 10.1021/acs.jctc.0c01006
- Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Khijniak T.V., Zaharycheva A.P., Boueva O.V., Ariskina E.V., Bunk B., Sproer C., Evtushenko L.I., Kublanov I.V., Hahnke R.L. // *Appl. Microbiol.* 2022. V. 45. P. 126307. doi: 10.1128/AEM.02193-14
- Sorokin D.Y., Khijniak T.V., Zakharycheva A.P., Elcheninov A.G., Hahnke R.L., Boueva O.V., Ariskina E.V., Bunk B., Kublanov I.V., Evtushenko L.I. // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021. V. 71. P. 04804. doi: 10.1099/ijsem.0.004804
- Sorokin D.Y., Elcheninov A.G., Toshchakov S.V., Bale N.J., Sinninghe Damste J.S., Khijniak T.V., Kublanov I.V. // *Appl. Microbiol.* 2019. V. 42. P. 309–318. doi: 10.1016/j.jsy-apm.2019.01.001
- Alekseeva A.A., Savin S.S., Tishkov V.I. // *Acta Naturae*. 2011. V. 3. P. 38–54. PMID: 22649703
- Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biochemistry (Moscow)*. 2004. V. 69. P. 1252–1267. doi: 10.1007/s10541-005-0071-x.
- Tishkov V.I., Popov V.O. // *Biomol. Eng.* 2006. V. 23. P. 89–110. doi: 10.1016/j.bioeng.2006.02.003
- Baker P.J., Britton K.L., Rice D.W., Rob A., Stillman T.J. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 228. P. 662–671. doi: 10.1016/0022-2836(92)90848-e
- Rao S.T. Rossmann M.G. // *J. Mol. Biol.* 1973. V. 76. P. 241–256. doi: 10.1016/0022-2836(73)90388-4
- Tishkov V.I., Khoronenkova S.V., Cherskova, N.V., Savin S.S., Uporov I.V. // *Moscow Univ. Chem. Bull.* 2010. V. 65. № 3. P. 121–126. doi: 10.3103/S0027131410030028
- Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K., Bates R., Zidek A., Potapenko A., et al. // *Nature*. 2021. V. 596. P. 583–589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2
- Pollegioni L., Sacchi S., Murtas G. // *Front. Mol. Biosci.* 2018. V. 5. P. 107. doi: 10.3389/fmolb.2018.00107