

УДК 577.322.24

Биоинформационно-структурный подход к поиску новых оксидаз D-аминокислот

Д. Л. Атрошенко^{1,2}, Д. И. Головина¹, Е. П. Сергеев¹, М. Д. Шеломов¹, А. Г. Ельченинов²,
И. В. Кубланов^{1,2}, Т. А. Чубарь¹, А. А. Пометун^{1,2}, С. С. Савин¹, В. И. Тишков^{1,2*}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

²Федеральный 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 глицинооксидаз. 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, глицинооксидаза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DAAO – оксидаза D-аминокислот; GOX – глицинооксидаза.

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 α -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 имиотриптофаном (PDBID 1DDO). Положение боковых радикалов D-аминокислот выбирали исходя из потенциально возможных взаимодействий субстрата с DAAO.

Расчет RMSD между структурами проводили по C α -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. xylophilus* 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)⁺-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

Multiple sequence alignment of DAAs from various species. The table shows amino acid sequences for NhyDAA, GchDAA, MycDAA, SavDAA, ScoDAA, CthDAA, RhoDAA, RtaDAA, RxyDAA, RzaDAA, AprDAA, TvaDAA, OpaDAA2, NcrDAA, FsoDAA, RemDAA, CboDAA, OpaDAA4, OpaDAA1, PpaDAA1, SpoDAA, OpaDAA3, OpaDAA5, OpaDAA5P, RtoDAA, NhaDAA, NhaGOX, PaeGOX, and NaIGOX. Gaps are represented by dashes.

Continuation of the multiple sequence alignment from the previous block, showing sequences for NhyDAA, GchDAA, MycDAA, SavDAA, ScoDAA, CthDAA, RhoDAA, RtaDAA, RxyDAA, RzaDAA, AprDAA, TvaDAA, OpaDAA2, NcrDAA, FsoDAA, RemDAA, CboDAA, OpaDAA4, OpaDAA1, PpaDAA1, SpoDAA, OpaDAA3, OpaDAA5, OpaDAA5P, RtoDAA, NhaDAA, NhaGOX, PaeGOX, and NaIGOX.

Continuation of the multiple sequence alignment from the previous block, showing sequences for NhyDAA, GchDAA, MycDAA, SavDAA, ScoDAA, CthDAA, RhoDAA, RtaDAA, RxyDAA, RzaDAA, AprDAA, TvaDAA, OpaDAA2, NcrDAA, FsoDAA, RemDAA, CboDAA, OpaDAA4, OpaDAA1, PpaDAA1, SpoDAA, OpaDAA3, OpaDAA5, OpaDAA5P, RtoDAA, NhaDAA, NhaGOX, PaeGOX, and NaIGOX.

Continuation of the multiple sequence alignment from the previous block, showing sequences for NhyDAA, GchDAA, MycDAA, SavDAA, ScoDAA, CthDAA, RhoDAA, RtaDAA, RxyDAA, RzaDAA, AprDAA, TvaDAA, OpaDAA2, NcrDAA, FsoDAA, RemDAA, CboDAA, OpaDAA4, OpaDAA1, PpaDAA1, SpoDAA, OpaDAA3, OpaDAA5, OpaDAA5P, RtoDAA, NhaDAA, NhaGOX, PaeGOX, and NaIGOX.

Рис 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей оксида 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 DAAO.

CLUSTAL X (1.83) multiple sequence alignment

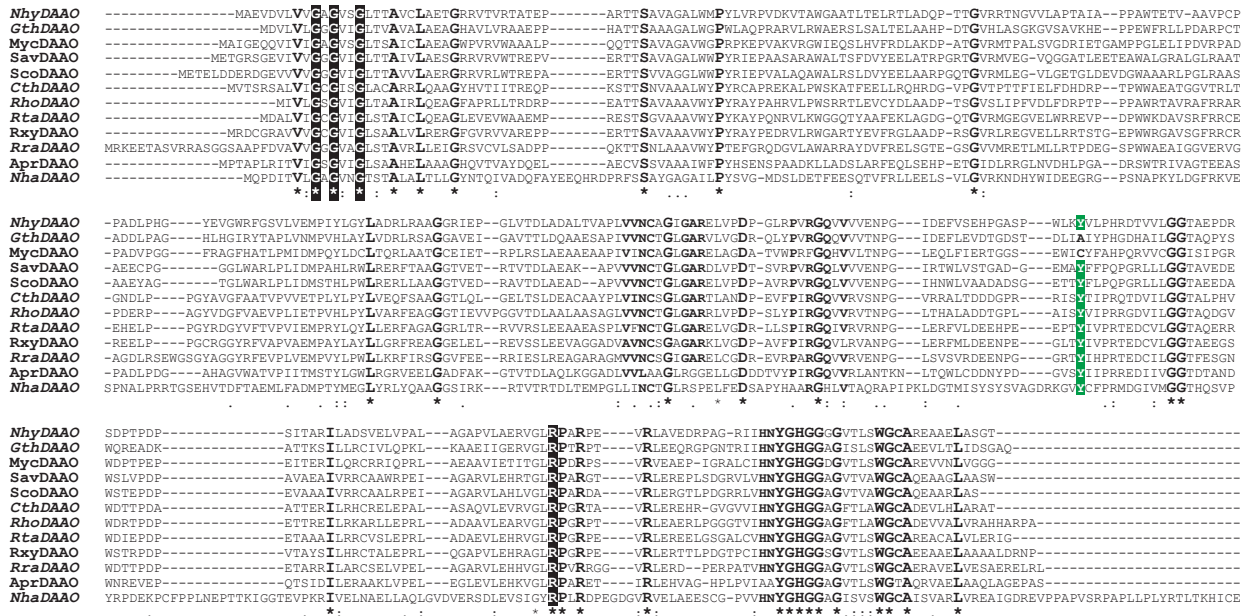


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей оксидаз D-аминокислот из бактерий и архей после отсеивания последовательностей глициноксидаз. Соответствие названий смотри в табл. 1. Новые последовательности DAAO, проанализированные в данной работе, выделены полужирным курсивом. Зеленым фоном 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 C-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 цефалоспориин C, в то время как остальные DAAO, имеющие в этой части выравнивания делеции, цефалоспориин C не окисляют. Например, SboDAAO специфична к небольшому аминокислотному, 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, OraDAAO1 (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	GthDAAO	<i>Gandjariella thermophila</i>	WP_137812914.1
2	CthDAAO	<i>Chloracidobacterium thermophilum</i> B	WP_014099936.1
3	RtaDAAO	<i>Rubrobacter taiwanensis</i>	WP_132692836.1
4	RraDAAO	<i>Rubrobacter radiotolerans</i> DSM 5868	WP_084263988.1
5	RbaDAAO	<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	PaeGOX	<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	NhyDAAO	<i>Natronosporangium hydrolyticum</i> АСРА39	lcl CP070499.1_prot_QSB16697.1_2115
27	NalGOX	<i>Natroglycomyces albus</i> АСРА22	lcl CP070496.1_prot_QSB06127.1_824
Археи			
28	NhaDAAO	<i>Natrarchaeobius halalkaliphilus</i> AArch4	2642575300
29	NhaGOX	<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)⁺, 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 глициноксидов*

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	0.64	0.00

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

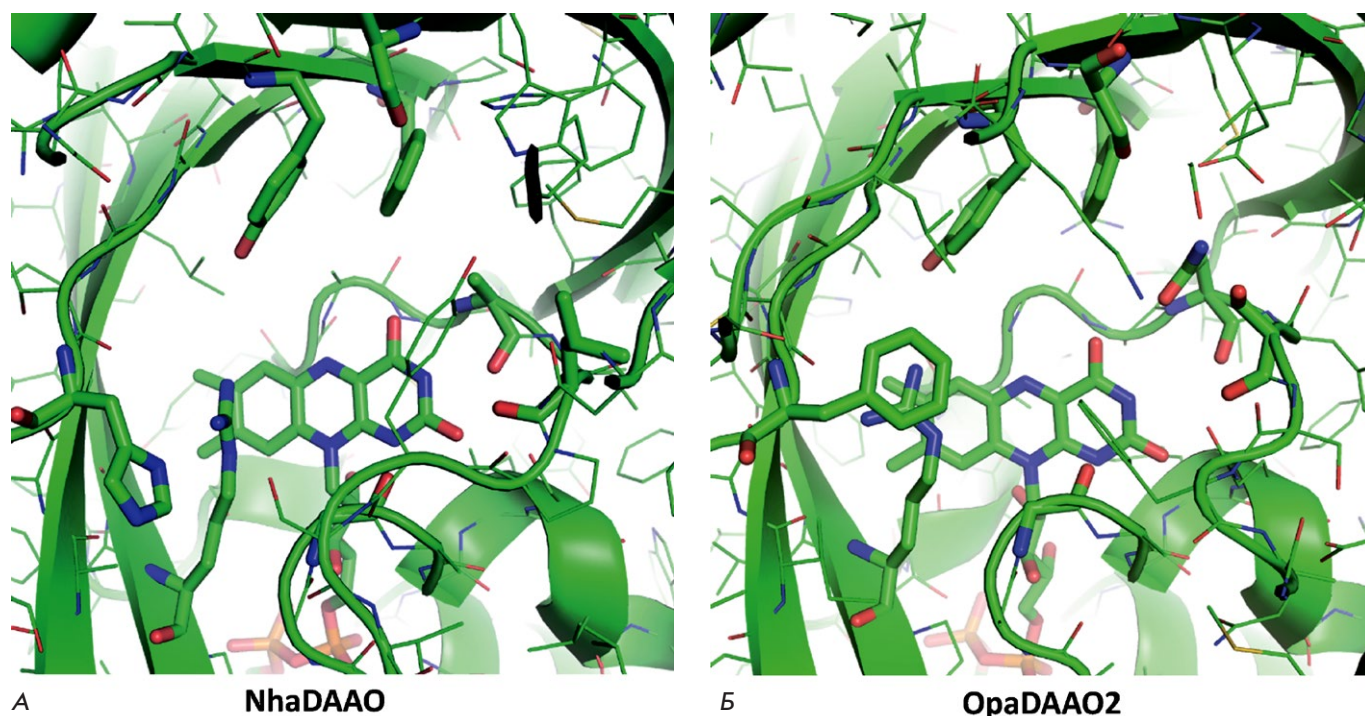


Рис. 3. Модельные структуры активных центров NhaDAAO из архей *N. halalkaliphilus* AArch4 (А) и OpaDAAO2 из метилотрофных дрожжей *O. parapolymorpha* DL-1 (Б)

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

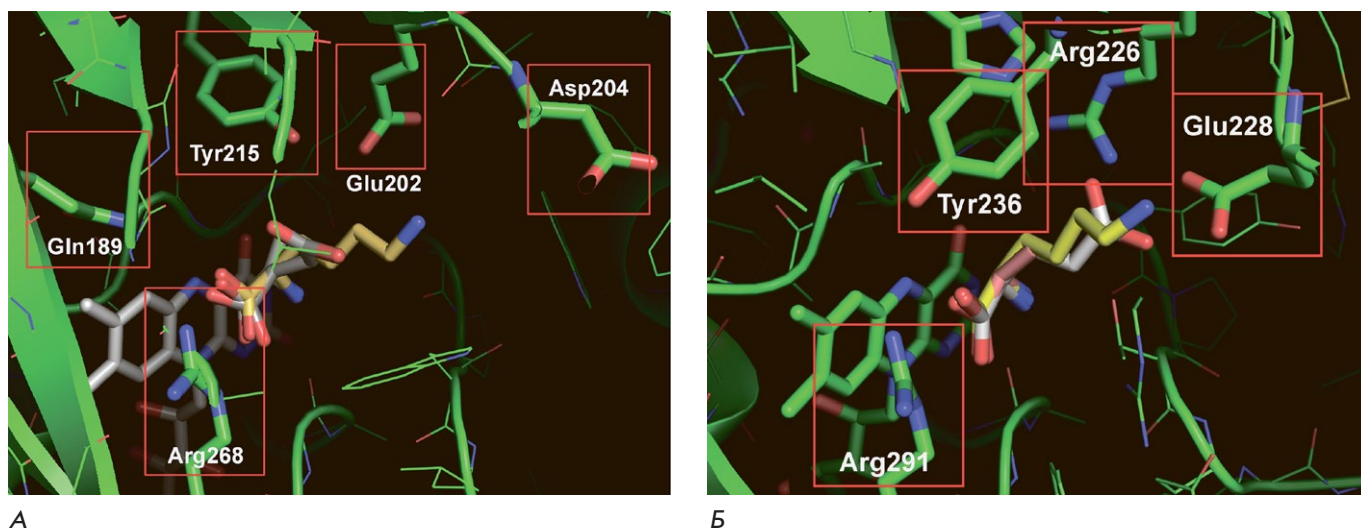


Рис. 4. Докинг D-Ala, D-Asp и D-Lys в активный центр DAAO из *G. thermophila* (А) и докинг D-Ala, D-Glu и D-Lys в активный центр DAAO из *R. radiotolerans* DSM 5868 (Б)

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 архей *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., Cespuaglio 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., Elcheninov A.G., 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