

ОКСИДАЗА D-АМИНОКИСЛОТ: ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ПРИМЕНЕНИЕ

©2008 г. С. В. ХОРОНЕНКОВА^{1,3}, В. И. ТИШКОВ,^{1,2*}

¹ Химический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва;

² Институт биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва;

³ ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», Москва

I. Введение. II. Физиологическая роль D-аминокислот в клетках эукариот и регуляция их уровня оксидазой D-аминокислот. III. Практическое применение оксидазы D-аминокислот. IV. Исследование структуры TvDAAO *Trigonopsis variabilis*. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Оксидаза D-аминокислот (КФ 1.4.3.3, DAAO) является FAD-содержащим ферментом. Она катализирует окислительное дезаминирование D-аминокислот. В результате реакции образуются пероксид водорода и иминокислота. Далее иминокислота неферментативно гидролизуется до α -кетокислоты и иона аммония.

Характерной особенностью всех DAAO является высокая специфичность именно к D-изомерам аминокислот, в то время как с L-формами каталитическая активность практически не детектируется.

Впервые DAAO была описана Кребсом в 1935 году [1]. Этот фермент достаточно широко распространен в природе – от микроорганизмов до млекопитающих. В последнем случае DAAO локализована в различных тканях мозга, почках и печени, причем ее наличие в печени зависит от вида организма. Например, у свиньи фермент присутствует

Принятые сокращения: DAAO – оксидаза D-аминокислот; pkDAAO, TvDAAO и RgDAAO – оксидазы D-аминокислот из почек свиньи, дрожжей *Trigonopsis variabilis* и *Rhodotorula gracilis* соответственно; NMDA – N-метил-D-аспартат; МТОМК – 4-метилтио-2-оксомаляновая кислота; 7-АЦК – 7-аминоцефалоспоровая кислота.

*Адрес для корреспонденции: vitishkov@gmail.com, vit@enz.chem.msu.ru

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 08-04-01703) и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа У.М.Н.И.К., госконтракт № 5635р/8091).

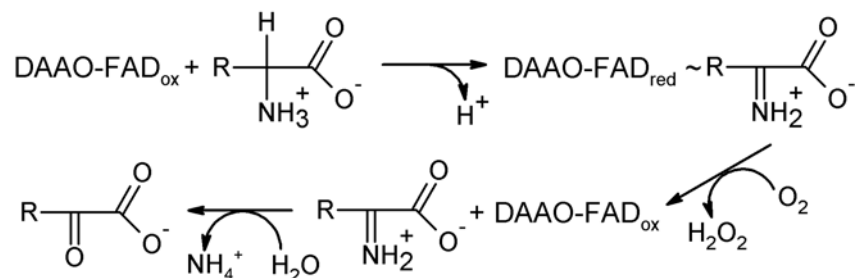


Схема 1.

и в печени, и в почках, а у мыши – только в почках. До конца 80-х годов прошлого столетия систематических исследований DAAO не проводилось: изучение ферментов позвоночных из-за их малого содержания и низкой стабильности, а DAAO из микроорганизмов (за исключением фермента из дрожжей *Trigonopsis variabilis*) в то время не представляла практического интереса. Фактически все исследования проводились с двумя ферментами – из почек свиньи (pkDAAO) и дрожжей *Trigonopsis variabilis* (TvDAAO). pkDAAO изучалась как модельный FAD-содержащий фермент. На основе TvDAAO пытались создать биокатализаторы для получения из природного антибиотика цефалоспорина C 7-аминоцефалоспоровой кислоты (7-АЦК). Однако из-за низкой операционной стабильности такой биокатализатор в то время так и не был создан.

Интерес ученых к DAAO начал активно расти с середины 90-х гг. XX века. Это было связано сразу с несколькими факторами. Во-первых, многочисленные экспериментальные данные свидетельствовали об исключительно важной роли D-аминокислот в жизнедеятельности организма. Во-вторых, методы генетической инженерии позволили создать различные рекомбинантные штаммы – продуценты оксидазы D-аминокислот, что позволило решить проблему получения фермента в достаточных количествах. И, в-третьих, секвенирование целых геномов прокариот и эукариот, создало предпосылки для поиска и клонирования генов новых DAAO. За прошедшие 5 лет вышло несколько обзоров по исследованию структуры и механизма действия фермента [2, 3]. Последний обзор, посвященный свойствам DAAO из микроорганизмов, был опубликован в 2008 г. [4]. В то же время отсутствуют обзоры, суммирующие информацию о физиологической роли D-аминокислот и DAAO и применении этого фермента в аналитических целях и для медицинской диагностики. В настоящем обзоре мы попытались восполнить этот пробел и проанализировать имеющиеся данные в этой области.

II. ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ D-АМИНОКИСЛОТ В КЛЕТКАХ ЭУКАРИОТ И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ УРОВНЯ ОКСИДАЗОЙ D-АМИНОКИСЛОТ

У микроорганизмов ДААО обеспечивает использование экзогенных D-аминокислот в качестве источника углерода, азота и энергии [5]. В случае эукариот его роль заключается в поддержании определенного уровня D-аминокислот в клетке. Поскольку D-аминокислоты участвуют в регуляции самых разнообразных процессов (старение, деятельность нервной системы, секреция гормонов и т.д.), то изменение активности ДААО в клетке самым непосредственным образом сказывается на организме в целом. Например, было установлено, что наличие избыточного количества некоторых D-аминокислот в тканях мозга мыши способствует длительной потенциации* в гиппокампе (отделе мозга, отвечающем за долговременную память) и пространственному обучению. Авторы проводили обучение в водном лабиринте Морриса обычных и мутантных мышей, у которых был удален ген *daao* [6]. Было показано, что мутантные мыши обучались значительно быстрее, чем особи из контрольной группы. Другие наиболее важные случаи участия ДААО в жизнедеятельности позвоночных будут рассмотрены ниже.

РЕГУЛЯЦИЯ УРОВНЯ D-СЕРИНА

Среди работ, опубликованных в течение последних 5–7 лет, около 50% исследований посвящено изучению роли D-Ser в качестве нейромодулятора рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA), которые играют важную роль во многих патофизиологических процессах. Так, было показано, что комбинация аллелей гена *G72* и гена ДААО увеличивает вероятность развития шизофрении [7–9]. Повышение уровня экспрессии гена *G72* [10] приводит к росту активности ДААО в тканях мозга человека. Это, в свою очередь, вызывает снижение уровня D-Ser, который с высоким сродством может взаимодействовать с глицин-связывающим сайтом NMDA-рецепторов [11]. Поэтому уменьшение концентрации D-Ser снижает функциональную активность NMDA-рецепторов, что и является одной из причин развития шизофрении [12–15]. В последнее время именно эта гипотеза принята за рабочую, так как

* длительная потенцияция (ДП) – усиление синаптической передачи между двумя нейронами, сохраняющееся на протяжении длительного времени после воздействия на синаптический проводящий путь. ДП участвует в механизмах синаптической пластичности, обеспечивающих нервную систему живого организма возможностью адаптироваться к изменяющимся условиям внешней среды.

в ее пользу свидетельствуют многочисленные экспериментальные данные [16]. Следует также отметить, что NMDA-рецепторы играют важную роль в регуляции ряда других физиологических процессов, таких, например, как обучаемость и память [17], развитие эпилепсии [18] и др. В то же время другими исследователями не обнаружено взаимосвязи между полиморфизмом генов *daao* и белка pGL72 и предрасположенностью к шизофрении [19–20].

Регуляция секреции гормонов

Одним из важнейших регуляторов гормональной секреции является D-аспарагиновая кислота. D-Asp в значительных количествах присутствует в тканях головного мозга, причем с возрастом концентрация D-аспартата увеличивается со скоростью до 0,14% в год [21–22]. Наиболее высокая концентрация D-Asp наблюдается в железах внутренней секреции [23–24]. Физиологическая функция D-Asp заключается в регуляции секреции таких гормонов, как мелатонин [25], пролактин [26], тестостерон [27], лютеинизирующий гормон и гормон роста [28]. Содержание D-Asp также увеличивается с возрастом в хрусталике, дентине, коленном хряще и белом веществе головного мозга [29–32].

Регуляция кровяного давления

N^G-нитроаргинин существует в клетке в виде L- и D-изомеров, причем изначально синтезируется N^G-нитро-D-Arg, из которого затем образуется L-форма. Оба соединения причастны к повышению кровяного давления, однако реакция организма на D-изомер значительно медленнее и меньше по величине, чем в случае L-формы [33–34]. Детальные исследования показали, что высокая активность N^G-нитро-D-Arg связана с тем, что он является высокоэффективным ингибитором фермента NO синтазы [35] – одного из ключевых регуляторов различных процессов в клетке, включая возникновение артериальной гипертензии [36]. Пролонгированное действие N^G-нитро-D-Arg обусловлено достаточно медленным процессом его рацемизации в почках. Установлено, что одним из основных ферментов, катализирующих процесс рацемизации N^G-нитро-D-аргинина, является почечная ДААО [37].

Регуляция уровня D-аланина

Значительные концентрации D-Ala обнаружены в тканях ракообразных и двустворчатых моллюсков. В условиях солевого стресса эта аминокислота накапливается во всех тканях. Абе (Abe H.) с соавт. [38]

предположили, что D-Ala играет важную роль в регуляции внутриклеточного осмотического давления. При болезни Альцгеймера содержание D-Ala в сером веществе головного мозга примерно в 2,2 раза выше, чем у здоровых людей [39]. Кроме того, в спинномозговой жидкости таких больных отмечено повышенное содержание свободных D-Asp и D-Ser и общего количества D-аминокислот [40]. Данный эффект объясняют совокупным действием двух факторов – снижением активности DAAO и повышением активности соответствующих рацемаз по сравнению с таковыми в организме здорового человека.

Регуляция уровня D-пролина

В клетке концентрация D-Pro вместе с D-Leu находится на четвертом месте после D-Ser, D-Asp и D-Ala [41, 42]. В настоящее время в литературе идет дискуссия о физиологической роли D-Pro. В клетках долгоживущих тканей (дентин, зубная эмаль, хрусталик и др.) наблюдается четкая корреляция между возрастом человека и концентрацией D-оксипролина и D-аспартата [22, 31]. Активно обсуждаются данные о нейро-, гепато- и нефротоксичности D-пролина для крыс [43–44]. Изучение содержания D-Pro в различных тканях обычных и мутантных мышей (у которых ген *daao* отсутствовал) показало, что у последних D-Pro в значительных количествах накапливается в почках, а его избыток выводится из организма естественным путем [45].

III. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ

В настоящее время оксидаза D-аминокислот находит все более широкое применение на практике (рис. 1).

Определение D-аминокислот и активности оксидазы D-аминокислот

Как уже отмечалось выше, D-аминокислоты играют важную роль в регуляции жизнедеятельности различных организмов. В случае ряда заболеваний в тканях мозга, сыворотке крови, спинномозговой жидкости наблюдаются значительные изменения как концентрации определенных D-аминокислот, так и активности самой DAAO. Поэтому высокочувствительные методы определения D-аминокислот и самого фермента в биологических образцах могут быть использованы для ранней диагностики и мониторинга ряда заболеваний. Однако реальных разработок в этом направлении очень мало. Фактически только в начале 2008 г. появились две статьи на эту тему. Перно (Pernot P.) с



Рис. 1. Области практического применения оксидазы D-аминокислот.

соавт. разработали микробиосенсор для определения концентрации D-Ser *in vivo* [42]. Биосенсор размером 25×150 мкм представлял собой цилиндрический платиновый микроэлектрод, покрытый слоем селективного к пероксиду водорода медиатора поли-*m*-фенилендиамином. На поверхность электрода путем простой адсорбции наносили фермент (в основном RgDAAO и для сравнения – pkDAAO). В опытах *in vivo* для защиты фермента на поверхность биосенсора наносили дополнительную мембрану из Нафтона.

Биосенсор на основе RgDAAO обладал более высокой чувствительностью при определении D-Ser (9,2 пА/мМ в диапазоне концентраций 0,1–500 мкМ) по сравнению с таковым на основе pkDAAO (6,5 пА/мМ). Теоретический предел обнаружения D-Ser для первого биосенсора составил 16 нМ. Однако более важным параметром, обеспечивающим превосходство биосенсора на основе RgDAAO, была более высокая селективность детекции D-Ser. Это достигалось за счет лучшего соотношения активностей RgDAAO с D-Ser и другими основными D-аминокислотами клетки (100:5,5 и 100:104 для пар D-Ser/D-Asp и D-Ser/D-Ala соответственно). В случае pkDAAO отношения активностей для пар D-Ser/D-Asp и D-Ser/D-Ala были 100:36,8 и 100:165 соответственно. Следует подчеркнуть, что практически равные активности RgDAAO для пары D-Ser/D-Ala не позволяют селективно определять D-Ser при равной концентрации D-Ala. Высокая селективность при определении D-Ser *in vivo* была достигнута за счет того, что содержание D-Ala в тканях мозга в норме не превышает 7% от содержания D-Ser. Очевидно, что в случае патологий, при которых наблюдается возрастание концентрации D-Ala или снижение таковой для D-Ser, корректное определение концентрации последнего будет невозможно. Для этого в биосенсоре нужно

использовать фермент, который в идеале не должен обладать активностью ни с D-Ala, ни с D-Asp.

В нашей лаборатории были проведены эксперименты по направленному мутагенезу DAAO из дрожжей *T. variabilis* (TvDAAO) [46]. Фермент дикого типа неактивен с D-Asp, однако D-Ala является его хорошим субстратом [47]. В результате направленного мутагенеза были получены три мутантные формы TvDAAO, которые не проявляли активности с D-Ala. Кроме того, один из мутантов был неактивен и с D-Pro, который также может накапливаться в клетках в значительных количествах (см. выше). По сравнению с ферментом дикого типа у одного мутанта каталитическая активность с D-Ser была повышена на 30%, а у двух других она практически не изменилась. Таким образом, все три полученные мутантные формы TvDAAO могут быть использованы в микробиосенсорах для селективного определения D-Ser даже в присутствии многократного избытка D-Ala, D-Asp и D-Pro [48].

Достаточно широкая субстратная специфичность DAAO была использована при создании биосенсоров для комплексного определения содержания D-изомеров аминокислот в пищевых продуктах и напитках. D-аминокислоты (в первую очередь D-Ala) являются компонентами клеточной стенки бактерий. Поэтому их наличие в пищевых продуктах является маркером бактериального заражения [49]. Подробная информация о работах, выполненных до 2006 г., содержится в обзоре [4]. В 2007 г. была опубликована статья [50] с описанием амперометрического биосенсора на основе DAAO, иммобилизованной на графитовом печатном электроде, поверхность которого была модифицирована берлинской лазурью. Для увеличения отклика поверхность электрода была дополнительно модифицирована углеродными нанотрубками. Величина регистрируемого сигнала линейно зависела от концентрации D-Ala в диапазоне от 5 до 200 мкМ.

Для детекции самой DAAO были разработаны разнообразные методы [51–61]. В большинстве из них используется сопряженная реакция окисления органических соединений пероксидом водорода, катализируемая пероксидазой хрена [52]. Наличие большого количества субстратов для пероксидазы позволяет детектировать ферментативную активность с помощью спектро- [56] и флуориметрии [60], в гелях [52, 53] и непосредственно в срезах тканей [57, 58]. Недавно был предложен высокочувствительный метод детекции активности DAAO в сложных смесях и системах, включая скрининг библиотек рекомбинантных клонов клеток *E. coli*, экспрессирующих различные мутанты TvDAAO [61]. Чувствительность определения фермента составила 0,13 нг в образце ($1,6 \cdot 10^{-15}$ молей).

*Диагностика и профилактика психосоматических
и онкологических заболеваний*

Как уже отмечалось выше, при некоторых психосоматических заболеваниях (как шизофрения, болезнь Альцгеймера и Паркинсона), наблюдаются значительные изменения уровня некоторых D-аминокислот – D-Ser, D-Ala, D-Asp в плазме крови, сером и белом веществе головного мозга, спинномозговой жидкости. Результаты определения D-аминокислот в норме и патологии создали предпосылки для выработки критериев по диагностике и мониторингу перечисленных заболеваний [39, 40, 62–64].

Исследования на мутантных мышцах с отсутствующим геном *daao* показали, что в организме не наблюдается никакого эффекта, компенсирующего пониженную или нулевую активность ДААО. Это открывает возможности для поиска ингибиторов фермента, которые обеспечивают лечение шизофрении путем стимуляции NMDA-рецепторов за счет увеличения концентрации D-серина в тканях мозга [65]. Другим разрабатываемым подходом лечения является повышение эффективности действия NMDA-рецепторов за счет перорального или инъекционного введения D-Ser в организм дополнительно к антипсихотической профилактике заболевания [66–68]. Для реализации первого подхода авторами [69] была разработана методика высокоэффективного скрининга активности ДААО в целых клетках для автоматизированного поиска ингибиторов фермента. В результате первичного скрининга было отобрано 1966 потенциальных ингибиторов для дальнейших исследований. Другие авторы [70] на основании подобных экспериментов предложили использовать в качестве лекарственного средства 5-метилпиразол-3-карбоновую кислоту. Результаты тестирования показали, что разовая инъекция ингибитора в организм крысы действительно приводит к значительному увеличению содержания D-Ser в коре головного мозга и среднем мозге, причем его непрерывное введение в течение 4-х недель не вызывало побочных эффектов.

Допамин является эффективным средством профилактики и лечения болезни Паркинсона [71]. Недавно было установлено, что D-3,4-дигидроксифенилаланин (D-DOPA) является лучшим субстратом человеческой ДААО по сравнению с D-Ser [72]. Величина каталитической эффективности (отношение k_{cat}/K_M) для D-DOPA была в 14 раз выше, чем с D-Ser. Таким образом, ДААО обеспечивает эффективный альтернативный метаболический путь превращения D-DOPA в допамин.

Еще одной интересной и перспективной областью применения оксидазы D-аминокислот является ее использование для диагностики некоторых видов рака. Было установлено, что парентеральное введение в организм человека с раковой опухолью растворов, содержащих D-аминокислоты, приводит к повышению качества усвоения питательных веществ (nutritional status) и ингибированию роста раковых клеток [73, 74]. Позже исследования на крысах показали, что в раковых клетках активность DAAO является нулевой [75].

Коллективом японских авторов [76, 77] было предложено использовать DAAO, конъюгированную с полиэтиленгликолем, для антираковой терапии. Было показано, что в организме мыши, пораженной раком, происходит аккумуляция введенной rkDAAO в клетках опухоли, т.е. происходит адресная доставка антиракового агента. Если через некоторое время начать вводить в организм животного D-пролин (эта D-аминокислота является одним из лучших субстратов для rkDAAO), наблюдается существенное подавление роста раковых клеток. Это связано с увеличением концентрации H_2O_2 и других продуктов окислительного метаболизма в клетках опухоли. При этом в здоровых органах (почки, печень, клетки мозга) DAAO не накапливается и содержание продуктов окислительного метаболизма не изменяется. Для увеличения времени жизни в организме фермент иммобилизовали на полиэтиленгликоле.

Механизм накопления DAAO именно в раковых клетках не изучался. Одним из возможных объяснений может быть просто более высокий уровень метаболизма раковых клеток по сравнению с нормальными, благодаря чему они более активно захватывают различные соединения из своего окружения. Такой эффект «направленного транспорта» описан для большого количества соединений.

Дальнейшим развитием работы стало использование рекомбинантной rkDAAO, экспрессированной в клетках *E. coli* [78]. Высокая эффективность предложенного антиракового препарата при его совместном введении в организм с D-Pro была показана для различных клеточных линий рака и моделей развития. Кроме того, было установлено, что активность каталазы, разрушающей пероксид водорода, в раковых клетках на 1–2 порядка ниже, чем в нормальных клетках почек, печени, мозга и др. Таким образом, благодаря адресной доставке в опухолевые клетки и генерации цитотоксичных соединений, стабильные конъюгаты DAAO могут быть использованы в качестве специфических антираковых препаратов.

В заключение этого раздела следует отметить, что разработка методов лечения различных заболеваний (в первую очередь рако-

вых и нейродегенеративных), основанных на контроле уровня соответствующих D-аминокислот в клетках определенных тканей путем регуляции активности оксидазы D-аминокислот в этих тканях, является сложной задачей, поскольку DAAO одновременно участвует в регуляции совершенно разных процессов. Один и тот же фермент однонаправлено влияет на уровень различных D-аминокислот (т.е. одновременно или повышает, или снижает их концентрации), однако эффект от такого изменения в зависимости от типа D-аминокислоты может быть противоположным. Например, повышение концентрации D-Ser стимулирует NMDA-рецепторы, в случае D-Ala это может служить указанием возникновения болезни Альцгеймера (см. выше). Выходом из этой непростой ситуации может быть использование тканеспецифичной генотерапии. С помощью такого подхода можно будет в строго определенных тканях вводить в ген фермента замены, приводящие к образованию мутантной DAAO с измененным профилем субстратной специфичности. В этом случае, при неизменном уровне биосинтеза фермента можно селективно влиять на уровень только одной определенной D-аминокислоты. Реализация такого подхода является задачей ближайшего будущего. Возможность тканеспецифического воздействия на ген DAAO была продемонстрирована на мышцах [45]. Результаты наших экспериментов (см. выше) показали, что с помощью направленного мутагенеза можно получать мутантные формы фермента с заданным профилем субстратной специфичности.

Получение физиологически активных соединений

Как уже отмечалось выше, DAAO является ферментом, высокоспецифичным к D-изомерам аминокислот. В зависимости от поставленной задачи это свойство фермента может быть использовано для получения из рацемической смеси или основного продукта ферментативной реакции – α -кетокислот, или природных и неприродных L-аминокислот высокой степени оптической чистоты ($ee > 99$). И α -кетокислоты, и неприродные L-аминокислоты широко используются в качестве предшественников при получении разнообразных лекарственных препаратов.

Впервые для ферментативного синтеза DAAO (фермент из почек свиньи) была использована в 1971 г. для получения L-пипеколиновой кислоты из рацемата за счет окисления D-изомера [79]. L-пипеколиновая кислота является интермедиатом при катаболизме L-Lys и накапливается в организме при функциональных нарушениях пероксисом [80]. Эта кислота играет очень важную роль в организме, в

частности, при возникновении различных нервных заболеваний [81]. Производные L-пипеколиновой кислоты входят в состав лекарственных препаратов, используемых в качестве иммунодепрессантов, для лечения онкологических и нейродегенеративных заболеваний [82]. Позднее *pkDAAO* заменили на более активные и стабильные ферменты из дрожжей *T. variabilis* [83, 84] и *Rhodotorula gracilis* [85]. *TvDAAO* также была использована для получения оптически чистого L-метионина из D-аминокислоты с выходом до 100% в каскадной системе из 4-х ферментов [86]. Получение фенилпирувата с помощью рекомбинантных *TvDAAO* и *RgDAAO* из D-фенилаланина с 99% выходом описано в работах [87, 88]. Для повышения растворимости субстрата и увеличения концентрации кислорода использовали ионные жидкости [89].

4-Метилтио-2-оксомасляная кислота (МТОМК) является одним из важных фармацевтических соединений. Будучи метаболитическим предшественником метионина – сильного индуктора апоптоза, МТОМК используется в качестве антиракового средства. В метионин-зависимых раковых клетках содержание МТОМК ниже, чем в нормальных клетках. Наиболее просто его получать окислительным дезаминированием D-метионина. Недавно был предложен наиболее экономичный и эффективный метод получения 4-метилтио-2-оксомасляной кислоты из рацемической смеси D,L-метионина [90]. Степень превращения D-метионина в реакции составила 98%.

Другим важным соединением, получаемым при участии DAAO, является L-6-гидроксинорлейцин. Это хиральное соединение используется для синтеза Омепатрилата и целого ряда ингибиторов различных металлопротеаз [91]. Омепатрилат является ингибитором ангиотензинпревращающего фермента и нейтральной эндопептидазы и действует как антигипертензивный лекарственный препарат. Метод получения стереоизомера L-6-гидроксинорлейцина из рацемической смеси 6-гидроксинорлейцина с выходом 97% и оптической чистотой 98% описан в работе [92].

L-аминокислоты, содержащие нафталиновую группировку, также представляют большой интерес для получения новых лекарственных форм. Например, L-2-нафтилаланин входит в состав лекарственного пептида Нафарелина (Nafarelin) [93]. Для получения этой аминокислоты из рацемата 2-нафтилаланина был разработан метод, использующий систему из трех ферментов – *RgDAAO*, каталазы и L-аспаратаминотрансферазы [94]. Для повышения активности *RgDAAO* с D-2-нафтилаланином были использованы методы направленного [95] и неупорядоченного («направленная эволюция») [95] мутагенеза,

однако в последнем случае каталитическая эффективность лучших многоточечных мутеинов уступала мутанту RgDAAO Met213Gly, полученному с помощью направленного мутагенеза [96].

Конверсия цефалоспоринона С

Возникновение резистентности к антибиотикам является природным свойством микроорганизмов [97]. В связи с повсеместным наличием устойчивости к пенициллиновым антибиотикам цефалоспорины различных поколений являются основными бета-лактамами соединениями, используемыми на практике (более половины от применяемых во всем мире антибиотиков). Исходным соединением для производства разнообразных полусинтетических цефалоспориновых антибиотиков различных поколений является 7-аминоцефалоспориновая кислота (7-АЦК), которую до недавнего времени получали химическим гидролизом природного антибиотика цефалоспоринона С. Недостатками этого метода являются многостадийность, низкий выход целевого продукта и использование большого количества органических растворителей.

В качестве альтернативы химическому был предложен биокаталитический метод получения 7-АЦК с помощью двух ферментов – оксидазы D-аминокислот и глутарилгидролазы. Схема этого процесса представлена на рис. 2.

В настоящее время имеется большое количество разнообразных методов проведения биокаталитического окисления цефалоспоринона С. Подробный анализ этих методов с применением DAAO можно найти в работах [4, 98]. Результаты анализа свидетельствуют, что при относительно высокой стоимости получения фермент не обладает необходимой операционной стабильностью.

Решением проблемы может быть получение мутантных форм фермента с улучшенными каталитическими свойствами и с повышенными температурной и операционной стабильностями. Такие мутантные ферменты для TvDAAO впервые были получены в нашей лаборатории [46, 48]. Два из них имели каталитическую эффективность с цефалоспорином С в 4 и 2 раза выше по сравнению с ферментом дикого типа. Период полуинактивации одного мутанта при 54 °С был в 2,2 раза больше, чем у исходной DAAO [99]. Отметим, что такой эффект был достигнут с помощью точечных аминокислотных замен, выбор которых был сделан на основе построенной нами модельной структуры фермента [3]. Кроме того, были разработаны методики иммобилизации рекомбинантной TvDAAO с выходом по активности до 80% (лучшие аналоги, описанные в литературе, обеспечивали сохранение не более 30% исходной активности).

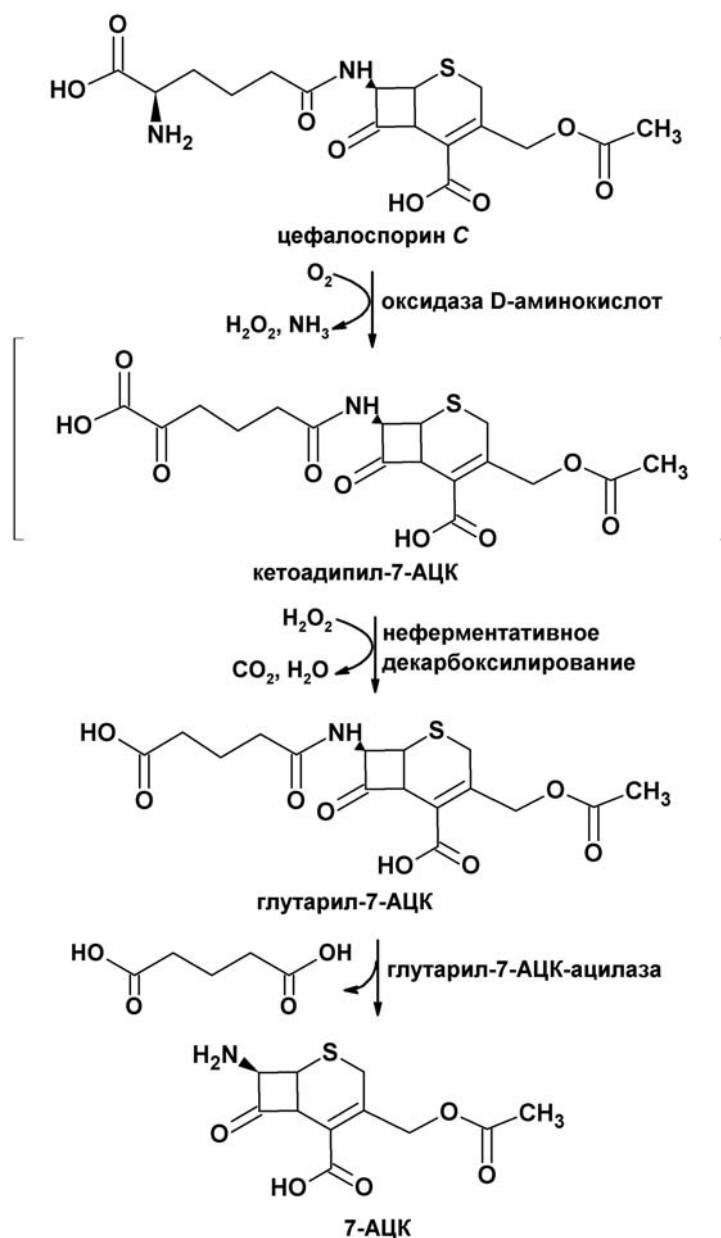


Рис. 2. Получение 7-аминоцефалоспорованой кислоты (7-АЦК) из цефалоспори́на С с помощью двухферментной системы – оксидаза D-аминокислот/глутарил-7-АЦК-ацилаза.

IV. ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ DAAO ИЗ *TRIGONOPSIS VARIABILIS*

Для одного из точечных мутантов TvDAAO были получены кристаллы и решена его структура с разрешением 1,8 Å. Отметим, что в настоящее время известны только три структуры DAAO – из почек свиньи [100], *R. gracilis* [101] и человека [102], причем структура последнего решена только в 2006 г. с разрешением всего 2,5 Å. В случае TvDAAO дикого типа многочисленные попытки, предпринятые за последние 30 лет, так и не привели к получению кристаллов фермента.

На рис. 3 представлена структура мутантной TvDAAO. Как и фермент из *R. gracilis* TvDAAO является димером, однако площадь контакта между субъединицами на 20% меньше по сравнению с таковым в RgDAAO. Активный центр фермента представляет собой объемную полость, что позволяет связывать такие большие молекулы,

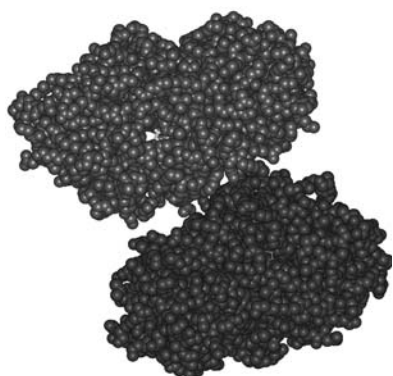


Рис. 3. Структура димера мутантной оксидазы D-аминокислот из *T. variabilis*.

как цефалоспорин *C*. Активный центр имеет два входа. На рис. 3 в середине верхней субъединицы хорошо виден сквозной канал и часть молекулы FAD (показана светло-серым цветом). Подробный анализ структуры фермента и ее связь с механизмом действия можно найти в работе [99]. В заключение этой части отметим, что определение структуры TvDAAO позволило получить инструмент для направленного изучения механизма действия фермента и создания мутантных форм с новыми свойствами.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ литературных данных свидетельствует, что интерес к оксидазе D-аминокислот растет в последнее время очень быстро. Количество публикаций, посвященных как исследованию физиологической роли DAAO, так и ее практическому применению, увеличивается в среднем на 15–20% в год. Особенно хочется отметить успех в исследовании фермента за последние 5 лет. В дополнение к структурам RgDAAO и RgDAAO в 2006 и 2008 гг. были определены структуры еще двух важных оксидаз D-аминокислот – человека и дрожжей *T. variabilis*.

Развитие методов геномики и протеомики позволяет вывести исследования физиологической роли ДААО на качественно новый уровень. В практическом плане следует ожидать появления большого количества биосенсоров на основе мутантных ДААО с определенным спектром субстратной специфичности. Необходимым условием для успешной реализации этих тенденций будет разработка методов и подходов направленного изменения свойств ДААО. Наиболее актуальным и востребованным будет фермент, в котором молекула FAD ковалентно пришта к белковой глобуле подобно некоторым другим оксидазам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Krebs, H.A. (1935) *Biochem. J.*, **29**, 1620–1644.
2. Pilone, M.S. (2000) *Cell. Mol. Life Sci.*, **57**, 1732–1747.
3. Тушков В.И., Хороненкова С.В. (2005) *Биохимия*, **70**, 51–67.
4. Pollegioni, L., Molla, G., Sacchi, S., Rosini, E., Verga, R., Pilone, M.S. (2008) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 1–16.
5. La Rue, T.A., Spencer, J.F.T. (1967) *Can. J. Microbiol.*, **13**, 777–788.
6. Maekawa, M., Watanabe, M., Yamaguchi, S., Konno, R., Hori, Y. (2005) *Neurosci. Res.*, **53**, 34–38.
7. Schumacher, J., Abon Jamra, R., Freudenberg, J., Becker, T., Ohlraun, S., Otte, A.C.J., Tullius, M., Kovalenko, S., Van Den Bogaert, A., Maier, W., Riet-schel, M., Propping, P., Nöthen, M.M., Cichon, S. (2004) *Mol. Psychiatry*, **9**, 203–207.
8. Chumakov, I., Blumenfeld, M., Guer-assimienko, O., Cavarec, L., Palicio, M., Abderrahim, H., Bougueleret, L., Barry, C., Tanaka, H., La Rosa, P., Puech, A., Tahri, N., Cohen-Akenine, A., Delabrosse, S., Lissarrague, S., Picard, F.-P., Maurice, K., Essioux, L., Millasseau, P., Grel, P., Debailleul, V., Simon, A.-M., Caterina, D., Dufaure, I., Malekzadeh, K., Belova, M., Luan, J.-J., Bouillot, M., Sambucy, J.-L., Primas, G., Saumier, M., Boubkiri, N., Martin-Saumier, S., Nasroune, M., Peixoto, H., Delaye, A., Pinchot, V., Bastucci, M., Guillou, S., Chevillon, M., Sainz-Fuertes, R., Meguenni, S., Aurich-Costa, J., Cherif, D., Gimalac, A., Van Duijn, C., Gauvreau, D., Ouellette, G., Fortier, I., Raelson, J., Sherbatich, T., Riazanskaia, N., Rogaev, E., Raeymaekers, P., Aerssens, J., Konings, F., Luyten, W., Macchiardi, F., Sham, P.C., Straub, R.E., Weinberger, D.R., Cohen, N., Cohen, D. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13675–13680.
9. Owen, M.J., Craddock, N., O'Donovan, M.C. (2005) *Trends Genet.*, **21**, 518–525.
10. Korostishevsky, M., Kaganovich, M., Cholostoy, A., Ashkenazi, M., Ratner, Y., Dahary, D., Bening-Abu-Shach, U., Ben Asher, E., Lancet, D., Ritsner, M., Navon, R. (2004) *Biol. Psychiatry*, **56**, 169–176.
11. Nishikawa, T. (2005) *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1561–1565.
12. Cloninger, C.R. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13365–13367.
13. Harrison, P.J., Owen, M.J. (2003) *Lancet*, **361**, 417–419.
14. Hashimoto, A., Yoshikawa, M., Andoh, H., Yano, H., Matsumoto, H., Kawaguchi, M., Oka, T., Kobayashi, H. (2007) *Eur. J. Pharmacol.*, **555**, 17–22.

15. Corvin, A., Donohoe, G., McGhee, K., Murphy, K., Kenny, N., Schwai-ger, S., Nangle, J.M., Morris, D., Gill, M. (2007) *Neurosci. Lett.*, **426**, 97–100.
16. MacDonald, A.W., Chafee, M.V. (2006) *Dev. Psychopathol.*, **18**, 853–876.
17. Collingridge, G. (1987) *Nature*, **330**, 604–605.
18. Meldrum, B.S., Akbar, M.T., Chapman, A.G. (1999) *Epilepsy Res.*, **36**, 189–204.
19. Chung, S., Jung, J., Chung, H.Y., Yoo, H.K., Kim, C.Y., Joo, Y.H., Choi, S.E., Hong, J.P. (2007) *Psychiatr. Genet.*, **17**, 313–319.
20. Vilella, E., Costas, J., Sanjuan, J., Guitart, M., De Diego, Y., Carracedo, A., Martorell, L., Valero, J., Labad, A., De Frutos, R., Najera, C., Molto, M.D., Toirac, I., Guillamat, R., Brunet, A., Valles, V., Perez, L., Leon, M., de Fonseca, F.R., Phillips, C., Torres, M. (2008) *J. Psychiatr. Res.*, **42**, 278–288.
21. Man, E.H., Fisher, G.H., Payan, I.L., Cadilla-Perezrios, R., Garcia, N.M., Chemburkar, R., Arends, G. Frey, W.H. (1987) *J. Neurochem.*, **48**, 510–515.
22. Poinar, H.N., Hoss, M., Bada, J. L. Paabo, S. (1999) *Science*, **272**, 864–866.
23. Dunlop, D.S., Neidle, A., McHale, D., Dunlop, D.M., Lajtha, A. (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**, 27–32.
24. Furuchi, T., Homma, H. (2005) *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1566–1570.
25. Takigawa, Y., Homma, H., Lee, J.-A., Fukushima, T., Santa, T., Iwatsubo, T., Imai, K. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248**, 641–647.
26. D'Aniello, G., Tolino, A., D'Aniello, A., Errico, F., Fisher, G.H., Di Fiore, M.M. (2000) *Endocrinology*, **141**, 3862–3870.
27. D'Aniello, A., Di Cosmo, A., Di Cris- to, C., Annunziato, L., Petrucelli, L., Fisher, G. (1996) *Life Sci.*, **59**, 97–104.
28. D'Aniello, A., Di Fiore, M.M., Fi- sher, G.H., Milone, A., Seleni, A., D'Aniello, S., Perna, A.F., Ingrosso, D. (2000) *FASEB J.*, **14**, 699–714.
29. Helfman, P.M., Bada, J.L. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **72**, 2891–2894.
30. Man, E.H., Sandhouse, M., Burg, J., Fisher, G.H. (1983) *Science*, **220**, 1407–1408.
31. Ohtani, S., Matsushima, Y., Ohira, H., Watanabe, A. (1995) *Growth Dev. Aging*, **59**, 55–61.
32. Fisher, G., Lopez, S., Peterson, K., Goff, T., Philip, I., Gaviria, R., Loren- zo, N., Tsesarskaia, M. (2007) *Amino Acids*, **32**, 27–30.
33. Wang, Y.X., Zhou, T., Pang, C.C. (1991) *Eur. J. Pharmacol.*, **200**, 77–81.
34. Wang, Y.X., Poon, C.I., Pang, C.C. (1993) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **265**, 112–119.
35. Wang, Q., Cwik, M., Wright, C.J., Cunningham, F., Pelligrino, D.A. (1999) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **288**, 270–273.
36. Кузнецова Т.Ю., Гаврилов Д.В., Дуданов И.П., Макаревич П.И., Балацкий А.В., Самоходская Л.М., Парфенова Е.В. (2008) *Кардиоло- гия*, **48**, 27–33.
37. Xin, Y.F., Zhou, X.J., Cheng, X., Wang, Y.X. (2005) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **312**, 1090–1096.
38. Abe, H., Yoshikawa, N., Sarower, M.G., Okada, S. (2005) *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1571–1577.
39. Fisher, G.H., D'Aniello, A., Vetere, A., Padula, L., Cusano, G.P., Man, E.H. (1991) *Brain Res. Bull.*, **26**, 983–985.
40. Fisher, G., Lorenzo, N., Abe, H., Fujita, E., Frey, W.H., Emory, C., Fiore, M.M.D., D'Aniello, A. (1998) *Amino Acids*, **15**, 263–269.
41. Hamase, K., Konno, R., Morikawa, A., Zaitzu, K. (2005) *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1578–1584.
42. Pernot, P., Mothet, J.P., Schuvailo, O., Soldatkin, A., Pollegioni, L., Pilone, M., Adeline, M.T., Cespuaglio, R.,

- Marinesco, S.* (2008) *Anal. Chem.*, **80**, 1589–1597.
43. *Kampel, D., Kupferschmidt, R., Lubec, G.* (1990) in *Amino Acids: Chemistry, Biology and Medicine*. Leiden: Escom, 1164–1171.
44. *Schieber, A., Brückner, H., Rupp-Classen, M., Specht, W., Nowitzki-Grimm, S., Classen, H.-G.* (1997) *J. Chromatogr. B*, **691**, 1–12.
45. *Hamase, K., Takagi, S., Morikawa, A., Konno, R., Niwa, A., Zaitso, K.* (2006) *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 705–711.
46. *Тишков В.И., Савин С.С., Хороненкова С.В.* (2008) *Изв. Акад. Наук. Сер. Химическая*, **57**, 1014–1022.
47. *Савин С.С., Чернышев И.В., Тишков В.И., Хороненкова С.В.* (2006) *Вестн. Моск. Ун-та. Сер.2. Химия*, **47**, 25–30.
48. *Тишков В.И., Хороненкова С.В., Савина Л.И.* Мутантные оксидазы D-аминокислот. Заявка на патент РФ № 2007127821 от 23.07.2007.
49. *Friedman, M.* (1999) *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3457–3479.
50. *Wcislo, M., Compagnone, D., Trojanowicz, M.* (2007) *Bioelectrochemistry*, **71**, 91–98.
51. *Watari, H., Isomoto, A., Oda, H., Kuroda, M.* (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 184–186.
52. *Cohen, H.J.* (1973) *Anal. Biochem.*, **53**, 208–222.
53. *Feinstein, R.N., Lindahl, R.* (1973) *Anal. Biochem.*, **56**, 353–360.
54. *Taylor, D.W., Nieman, T.A.* (1986) *J. Chromatogr.*, **368**, 95–102.
55. *Kitzler, J.W., Fridovich, I.* (1988) *Anal. Biochem.*, **174**, 613–617.
56. *Nagata, Y., Shimojo, T., Akino, T.* (1988) *Int. J. Biochem.*, **20**, 1235–1238.
57. *Gossrau, R., van Noorden, C.J., Frederiks, W.M.* (1989) *Histochemistry*, **92**, 349–353.
58. *Frederiks, W.M., Patel, H.R., Marx, F., Gossrau, R., Kooij, A., van Noorden, C.J.* (1990) *Acta Histochem. Suppl.*, **40**, 95–100.
59. *Konno, R.* (1998) *Biol. Proced. Online*, **1**, 27–31.
60. *Hamase, K., Nagayasu, R., Morikawa, A., Konno, R., Zaitso, K.* (2006) *J. Chromatogr. A*, **1106**, 159–164.
61. *Khoronenkova, S.V., Tishkov, V.I.* (2008) *Anal. Biochem.*, **374**, 405–410.
62. *Bruckner, H., Hausch, M.* (1993) *J. Chromatogr.*, **614**, 7–17.
63. *Kumashiro, S., Hashimoto, A., Nishikawa, T.* (1995) *Brain Research*, **681**, 117–125.
64. *Nagata, Y., Borghi, M., Fisher, G.H., D'Aniello, A.* (1995) *Brain Res. Bull.*, **38**, 181–183.
65. *Almond, S.L., Fradley, R.L., Armstrong, E.J., Heavens, R.B., Rutter, A.R., Newman, R.J., Chiu, C.S., Konno, R., Hutson, P.H., Brandon, N.J.* (2006) *Mol. Cell Neurosci.*, **32**, 324–334.
66. *Tsai, G., Yang, P., Chung, L.C., Lange, N., Coyle, J.T.* (1998) *Biol. Psychiatry*, **44**, 1081–1089.
67. *Hashimoto, A., Chiba, Y.* (2004) *Eur. J. Pharmacol.*, **495**, 153–158.
68. *Morikawa, A., Hamase, K., Inoue, T., Konno, R., Zaitso, K.* (2007) *Amino Acids*, **32**, 13–20.
69. *Brandish, P.E., Chiu, C.S., Schneeweis, J., Brandon, N.J., Leech, C.L., Kornienko, O., Scolnick, E.M., Strulovici, B., Zheng, W.* (2006) *J. Biomol. Screen.*, **11**, 481–487.
70. *Adage, T., Trillat, A.C., Quattropiani, A., Perrin, D., Cavarec, L., Shaw, J., Guerassimenko, O., Giachetti, C., Greco, B., Chumakov, I., Halazy, S., Roach, A., Zaratin, P.* (2008) *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **18**, 200–214.
71. *Aminoff, M.J.* (1994) *West J. Med.*, **161**, 303–308.
72. *Kawazoe, T., Tsuge, H., Imagawa, T., Aki, K., Kuramitsu, S., Fukui, K.* (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 385–391.
73. *Naylor, S.L., Busby, L.L., Klebe, R.J.* (1976) *Somatic Cell Genet.*, **2**, 93–111.

74. Sasamura, T., Matsuda, A., Kokuba, Y. (1999) *Arzneim-Forsch/Drug Res.*, **49**, 541–543.
75. Sasamura, T., Matsuda, A., Kokuba, Y. (2002) *Ann. Clin. Biochem.*, **39**, 595–598.
76. Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Maeda, H. (2002) *Cancer Res.*, **62**, 3138–3143.
77. Fang, J., Sawa, T., Akaike, T., Greish, K., Maeda, H. (2004) *Int. J. Cancer*, **109**, 1–8.
78. Fang, J., Deng, D., Nakamura, H., Akuta, T., Qin, H., Iyer, A.K., Greish, K., Maeda, H. (2008) *Int. J. Cancer*, **122**, 1135–1144.
79. Rodwell, W.V. (1971) *Methods Enzymol.*, **17B**, 174–188.
80. Tranchant, C., Aubourg, P., Mohr M., Rocchiccioli, F., Zaenker, Ch., Warter, J. M., (1993) *Neurology*, **43**, 2044–2048
81. Plecko, B., Hikel, C., Korenke, G.C., Schmitt, B., Baumgartner, M., Baummeister, F., Jakobs, C., Struys, E., Erwa, W., Stöckler-Ipsiroglu, S. (2005) *Neuropediatrics* **36**, 200–205.
82. Maddess, M.L., Tackett, M.N., Ley, S.V. (2008) *Prog. Drug. Res.* **66**, 15–186
83. Berg, C.P., Rodden, F.A. (1976) *Anal. Biochem.*, **71**, 214–222.
84. Huh, J. W., Yokoigawa, K., Esaki, N., Soda, K. (1992) *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 189–190.
85. Buto, S., Pollegioni, L., D'Angiuro, L., Pilone, M.S. (1994) *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 1288–1294.
86. Findrik, Z., Vasic-Racki, D. (2007) *Biotechnol. Bioeng.*, **98**, 956–967.
87. Tan, Q., Song, Q., Zhang, Y., Wei, D. (2007) *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **136**, 279–289.
88. Upadhya, R., Nagajyothi, S., Bhat, S.G. (1999) *Process Biochem.*, **35**, 7–13.
89. Lutz-Wahl, S., Trost, E.M., Wagner, B., Manns, A., Fischer, L. (2006) *J. Biotechnol.*, **124**, 163–171.
90. Garcia-Garcia, M., Martinez-Martinez, I., Sanchez-Ferrer, A., Garcia-Carmona, F. (2008) *Biotechnol. Prog.*, **24**, 187–191.
91. Patel, R.N. (2001) *Biomol. Eng.*, **17**, 167–182.
92. Patel, R.N. (2001) *Adv. Synth. Catal.*, **343**, 6–7.
93. Taylor, P.P., Pantaleone, D.P., Senkpeil, R.F., Fotheringham, I.G. (1998) *Trends in Biotechnology* **16**, 412–418
94. Caligiuri, A., D'Arrigo, P., Gefflaut, T., Molla, G., Pollegioni, L., Rosini, E., Rossi, C., Servi, S. (2006) *Biocatal. Biotrans.*, **24**, 409–413.
95. Caligiuri, A., D'Arrigo, P., Rosini, E., Tessaro, D., Molla, G., Servi, S., Pollegioni, L. (2006) *Adv. Synth. Catal.*, **348**, 2183–2190.
96. Sacchi, S., Rosini, E., Molla, G., Pilone, M.S., Pollegioni, L. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 517–525.
97. Сидоренко С.В., Тишков В.И. (2004) *Успехи биологической химии*, **44**, 263–306.
98. Sonawane, V.C. (2006) *Crit. Rev. Biotechnol.*, **26**, 95–120.
99. Khoronenkova, S.V., Shabalin, I.G., Polyakov, K.M., Tishkov, V.I. (2008) *Biochimie*, **90**, в печати.
100. Mizutani, H., Miyahara, I., Hirotsu, K., Nishina, Y., Shiga, K., Setoyama, C., Miura, R. (1996). *J. Biochem.*, **120**, 14–17.
101. Umhau, S., Pollegioni, L., Molla, G., Diederichs, K., Welte, W., Pilone, M.S., Ghisla, S. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12463–12468.
102. Kawazoe, T., Tsuge, H., Pilone, M.S., Fukui, K. (2006). *Protein Sci.*, **15**, 2708–2717.