

УДК 577.3

ИССЛЕДОВАНИЕ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОСКОПИИ КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ КОНФОРМАЦИИ ФЛАВИНАДЕНИНДИНУКЛЕОТИДА – КОФЕРМЕНТА ОКСИДАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ

© 2023 г. Ж.В. Бочкова*, В. Лю**, Н.А. Браже*, А.А. Жгун***, Г.В. Максимов*,#

*Биологический факультет, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 2/12, Москва, 119234, Россия

**Биологический факультет Университета МГУ-ППИ,

ул. Гоцзидасюеюань, 1, район Лунган, Даюньсиньчэн, Шэньчжэнь, Провинция Гуандун, 518172, Китай

***ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Ленинский просп., 33/2, Москва, 119071, Россия

#E-mail: gmaximov@mail.ru

Поступила в редакцию 10.06.2023 г.

После доработки 26.06.2023 г.

Принята к публикации 05.07.2023 г.

С помощью серебряных наночастиц зарегистрированы и проанализированы спектры гигантского комбинационного рассеяния оксидазы D-аминокислот из почки свиньи, а также выявлены характерные спектральные параметры изменения конформации кофактора флавинадениндинуклеотида при активации фермента D-аминокислотами. Установлено, что от субстратной специфичности фермента зависит время, в течение которого регистрируются изменения конформации флавинадениндинуклеотида: в присутствии D-аланина на это требуется несколько секунд, а в присутствии D-серина — минуты.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния, серебряные наноструктуры, FAD, оксидаза D-аминокислот.

DOI: 10.31857/S000630292305006X, EDN: PGUDSC

Известно, что оксидаза D-аминокислот (DAAO) является флавопротеином, активным центром которого служит флавинадениндинуклеотид (FAD). DAAO вступает в окислительно-восстановительные реакции селективно с D-аминокислотами (преимущественно нейтральными, такими как D-аланин, D-пролин и D-серин) [1]. На первой стадии ферментативной реакции образуется промежуточный комплекс (так называемый *ripple complex*), включающий восстановленный фермент и производную аминокислоты — иминокислоту [2]. Далее, в аэробных условиях фермент окисляется кислородом, продуцируя пероксид водорода (H_2O_2), а иминокислота гидролизуется с образованием

соответствующей α -кетокислоты и аммиака [3].

Известно, что фермент DAAO содержится в клетках дрожжей (например, *Rhodotorula gracilis*, *Trigonopsis variabilis* [4]) и тканей высших организмов, в том числе человека. Различия в функциональности фермента DAAO, полученного из разных источников, определяются минимальными отличиями в его трехмерной структуре [5]. Начиная с 1940-х годов структура фермента и его физиологическая роль активно изучались. С одной стороны, DAAO представляет интерес в качестве участника катаболизма D-аминокислот, вовлеченных в регуляторные процессы, например, нейромодулятора D-серина в центральной нервной системе. D-серин является ко-агонистом N-метил-D-аспаратных рецепторов (NMDAR) и накапливается в астроцитах. Там же синтезируется фермент DAAO, который контролирует доступность этой аминокислоты в синапсах, в конечном счете влияя на уровень активации

Сокращения: DAAO — оксидаза D-аминокислот, FAD — флавинадениндинуклеотид, КР — комбинационное рассеяние, ГКР — гигантское комбинационное рассеяние.

NMDAR-рецепторов, критически важных для обучения и памяти [5].

С другой стороны, H_2O_2 , как продукт реакции, также может влиять на ряд клеточных процессов в качестве сигнальной молекулы, окислителя и защитного агента. Так, нарушения в продукции H_2O_2 за счет изменений работы DAAO связывают с хроническими болезнями почек, где этот фермент содержится в наибольшем количестве [6]. Ранее была доказана роль DAAO в нейронах спинного мозга, как фактора, участвующего в развитии гиперчувствительности к боли [7]. Также известно, что в эпителиальных клетках кишечника фермент DAAO метаболизирует D-аминокислоты, образуемые микробиотой, и выделяемый пероксид водорода защищает организм от возбудителя холеры и участвует в изменении состава микробиоты [8].

В последнее время DAAO приобретает значимость в качестве инструмента локальной контролируемой продукции H_2O_2 для проведения исследований влияния активных форм кислорода на конкретные процессы, например, синаптическую передачу в нейронах [9] и в качестве биосенсера на различные D-аминокислоты [10].

Ввиду перспективности использования DAAO в биотехнологии, как селективного инструмента детекции D-аминокислот и способа локальной генерации H_2O_2 , становятся актуальными исследования различных этапов реакции DAAO с D-аминокислотами. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) позволяет зафиксировать изменения в конформациях молекулярных структур, особенно обладающих сопряженными связями, каковыми являются флавиновые кофакторы. Сигнал КР можно усилить за счет эффекта плазмонного резонанса при использовании наноструктур благородных металлов [11].

В связи с этим мы поставили целью исследовать изменение конформации FAD при взаимодействии DAAO с D-аминокислотами при помощи спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) с использованием серебряных плазмонных наноструктур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

С помощью метода ГКР мы исследовали конформацию кофактора-FAD очищенного препарата оксидазы D-аминокислот, выделенной из почки свиньи, (Shanghai Yuanye Bio-Technology Co Ltd, Китай) в окисленной форме и при внесе-

нии избытка аминокислот D-аланина или D-серина.

Спектры ГКР регистрировали на конфокальном КР-микроспектрометре NTEGRA Spectra (NT-MDT, Зеленоград, Россия), соединенном с инвертированным микроскопом IX-71 (Olympus, Япония) в диапазоне $300-2000\text{ см}^{-1}$, с шагом измерения 0.8 см^{-1} , регистратор – CCD-детектор с Пельтье-охлаждением (-50°C).

Кристаллический препарат DAAO (получен из почки свиньи, Shanghai Yuanye Bio-Technology Co Ltd, Китай) растворяли в натрий-фосфатном буфере (конечная концентрация белка 1 мг/мл). Раствор объемом 20 мкл помещали на дно чашки Петри со стеклянным основанием (Metex), затем в каплю опускали фрагмент стекла с серебряными наноструктурами так, чтобы сторона с напыленными серебряными наноструктурами была повернута ко дну чашки Петри – навстречу лазерному лучу. Фокусировали лазер на слое жидкости около наноструктурированной поверхности, при этом использовали объектив $20\times$ с числовой апертурой 0.45 ; диаметр области регистрации $\sim 800\text{ нм}$. Использовали лазерное возбуждение с длиной волны 532 нм и мощностью лазера не более 1 мВт , время накопления сигнала варьировало в разных сериях экспериментах и составляло 1 или 60 с .

Реакцию DAAO с субстратом инициировали, примешивая к капле раствора (1 мг/мл) эквивалентную по объему каплю раствора D-аланина (100 мМ) или D-серина (100 мМ) в натрий-фосфатном буфере. Для регистрации динамики сигнала КР от FAD-группы DAAO из почки свиньи в присутствии субстратов спектр снимали каждую секунду на протяжении первой минуты с момента внесения D-аминокислоты, а затем с интервалом в минуту.

Синтез серебряных наноструктур осуществляли по методике, разработанной ранее [12]. Для начала 2.93 г нитрата серебра растворяли в 40 мл воды Milli-Q. Параллельно растворяли 7 г NaOH в 30 мл воды и затем приливали тонкой струей при перемешивании к раствору нитрата серебра. Выпавший в ходе реакции осадок оксида серебра трижды промывали водой Milli-Q (по 100 мл), затем к нему при постоянном перемешивании добавляли 25 мл воды Milli-Q и 5 мл концентрированного раствора аммиака. В результате получали прозрачный раствор – аммиачный комплекс серебра. Покровные стекла, отмытые в детергенте и выдержанные в течение 5 мин в ультразвуковой ванне, высушивали на воздухе и помещали в тер-

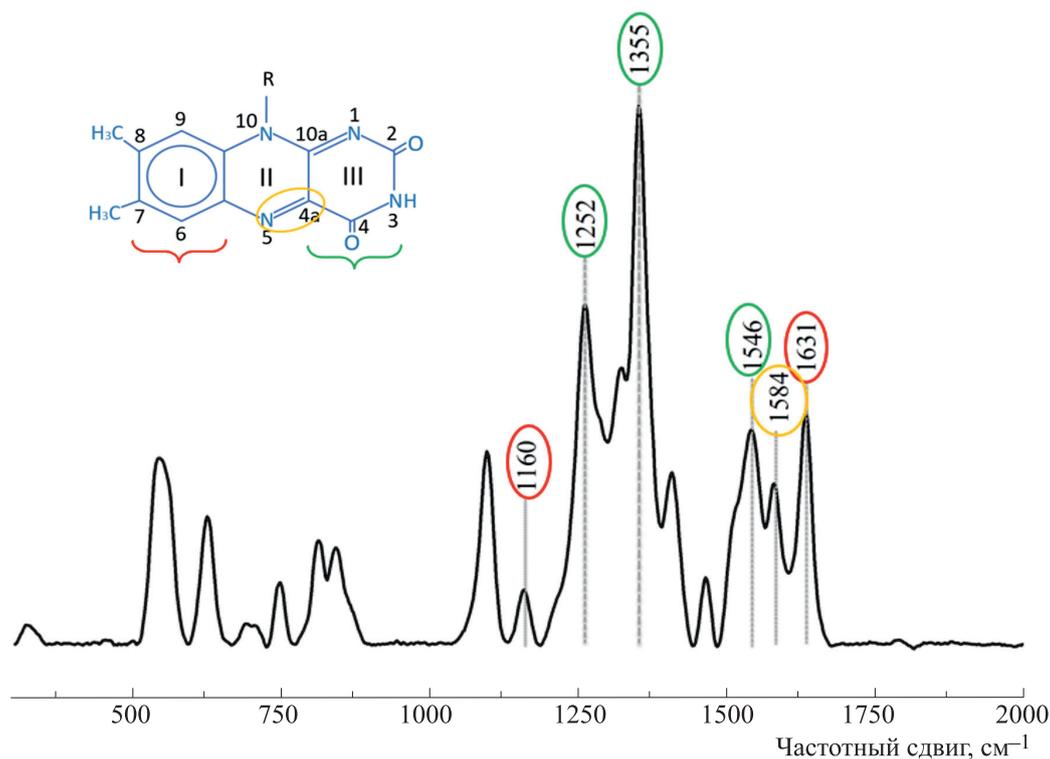


Рис. 1. Спектр ГКР фермента DAAO (раствор фермента в концентрации 1 мг/мл) в окисленном состоянии. Спектр соответствует спектру окисленного кофактора-FAD. Длина волны возбуждения – 532 нм, мощность лазера – не более 1 мВт на область регистрации с диаметром 800 нм, время накопления спектра 60 с. Разными цветами обведены положения максимумов характерных пиков на спектре и соответствующие им группы атомов на структурной формуле FAD.

мически устойчивый стеклянный стакан на 1 л, который устанавливали на поверхность, предварительно разогретую до 380°C. Раствор аммиачного комплекса серебра переливали в емкость ультразвукового распылителя (Альбедро ПМП, ТУ 9444-001-49917419-2010, Россия) (30 мл) и распыляли на поверхность покровных стекол медленными круговыми движениями при нагревании до 380°C, делая перерывы по 5 мин через каждые 3 мин. Расстояние сопла распылителя до покровных стекол составляло 1.5–2.0 см. Далее стекла выдерживали в течение 15 мин при 400°C, после чего охлаждали и упаковывали в светонепроницаемые капсулы. В результате на стеклах формировались сложные иерархические наноструктуры из металлического серебра в виде пересекающихся колец максимальным диаметром в районе 50 мкм, покрытых сферическими частицами с диаметром от нескольких единиц до десятков нм. Полученные наноструктуры сохраняли плазмонные свойства в течение нескольких месяцев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлен спектр ГКР FAD-группы DAAO в окисленной форме. Отметим, что регистрация КР-спектров без использования серебряных наноструктур при тех же параметрах измерения и концентрации фермента не позволяла определить положение отдельных пиков в одной группе (данные не представлены). В результате анализа ГКР-спектров показано, что среди полос наиболее выражены пики с положениями максимумов 1630, 1584, 1546, 1355, 1252, 1160 см^{-1} , связанные с колебанием связей в одном из трех ароматических колец кофермента FAD (табл. 1).

Известно, что у восстановленной формы флавина меньше характерных пиков на КР-спектрах по сравнению с окисленной формой, что обусловлено изменениями в делокализации π -электронных орбиталей в N(5)- и N(10)-атомах [16]. При добавлении к DAAO субстрата D-аланина уже в течение 10 с были выявлены изменения полос спектра ГКР, которые через 60 с стабилизировались.

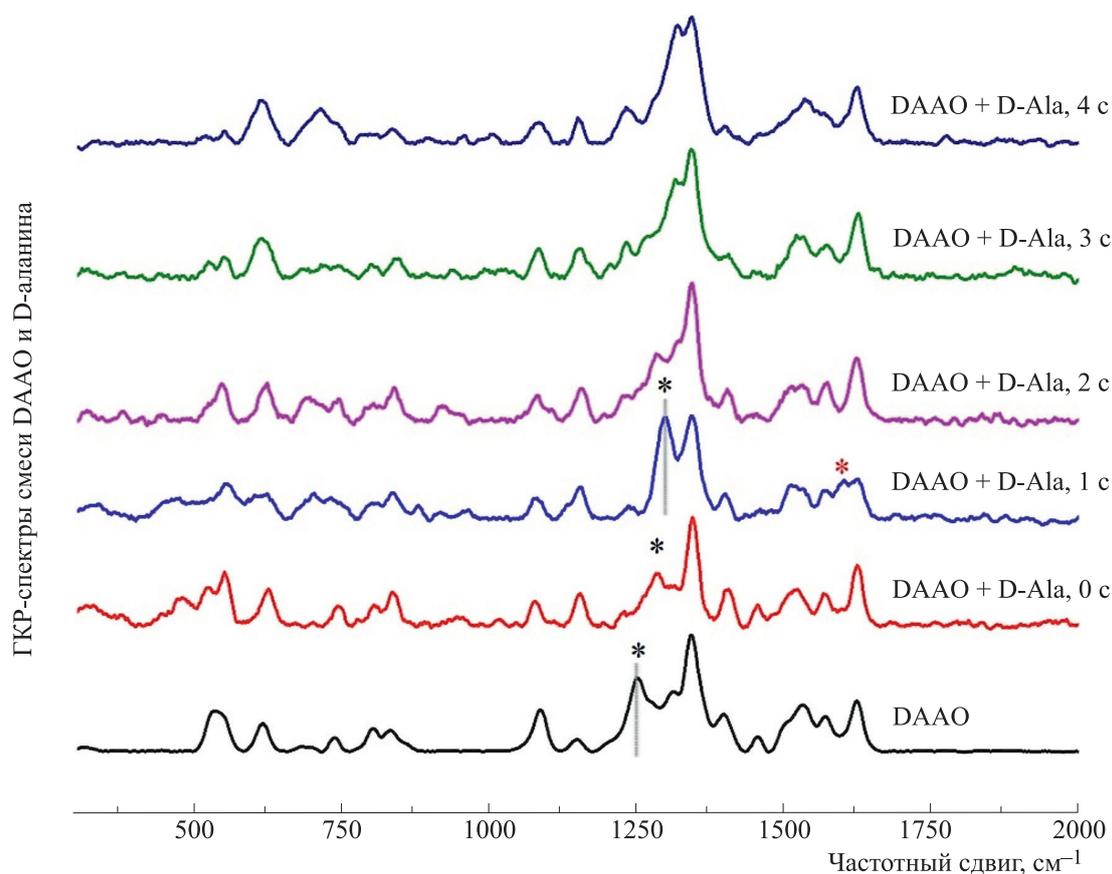


Рис. 2. ГКР-спектр DAAO при внесении избытка субстрата D-аланина (концентрация DAAO – 1 мг/мл, конечная концентрация D-аланина в растворе с ферментом – 50 мМ). Длительность регистрации спектров составляла 1 с. На спектре, зарегистрированном через 1 с после внесения D-аланина (спектр с пометкой «1 с»), звездочкой отмечен пик 1612 см^{-1} , соответствующий восстановленной молекуле FAD. Символом # на спектрах «0 с» и «1 с» отмечен сдвиг пика 1252 см^{-1} к положению около 1300 см^{-1} , что, вероятно, обусловлено изменением вклада колебаний водородной связи в положении кольца III молекулы FAD-группы при стабилизации комплекса с D-аланином.

На рис. 2 представлена серия спектров ГКР, полученных через одну секунду после внесения D-аланина к раствору DAAO. Установлено, что

спустя 1 с появляется пик 1612 см^{-1} (помечен звездочкой на спектре «1 с»), который исчезает на 3-й и последующих секундах и обусловлен либо

Таблица 1. Соотнесение пиков спектра ГКР фермента DAAO с колебаниями связей FAD-группы

Полосы спектра ГКР окисленного FAD из DAAO из почки свиньи, см^{-1}	Предполагаемые колебания связей кофермента FAD	Ссылка
1160	Связи кольца I	[13]
1252	[C(2)-N(3)H-C(4)] кольца III	[13–15]
1355	[C(4a)-C(10a)-N(1)-C(2)] кольца III	[13, 14, 16]
1546	[C(4a)-C(4)], [C(4a)-(10a)] связи кольца III	[15, 16]
1584	[C(4a)-N(5)] кольца II	[13–16]
1631	Связи кольца I	[14, 15]

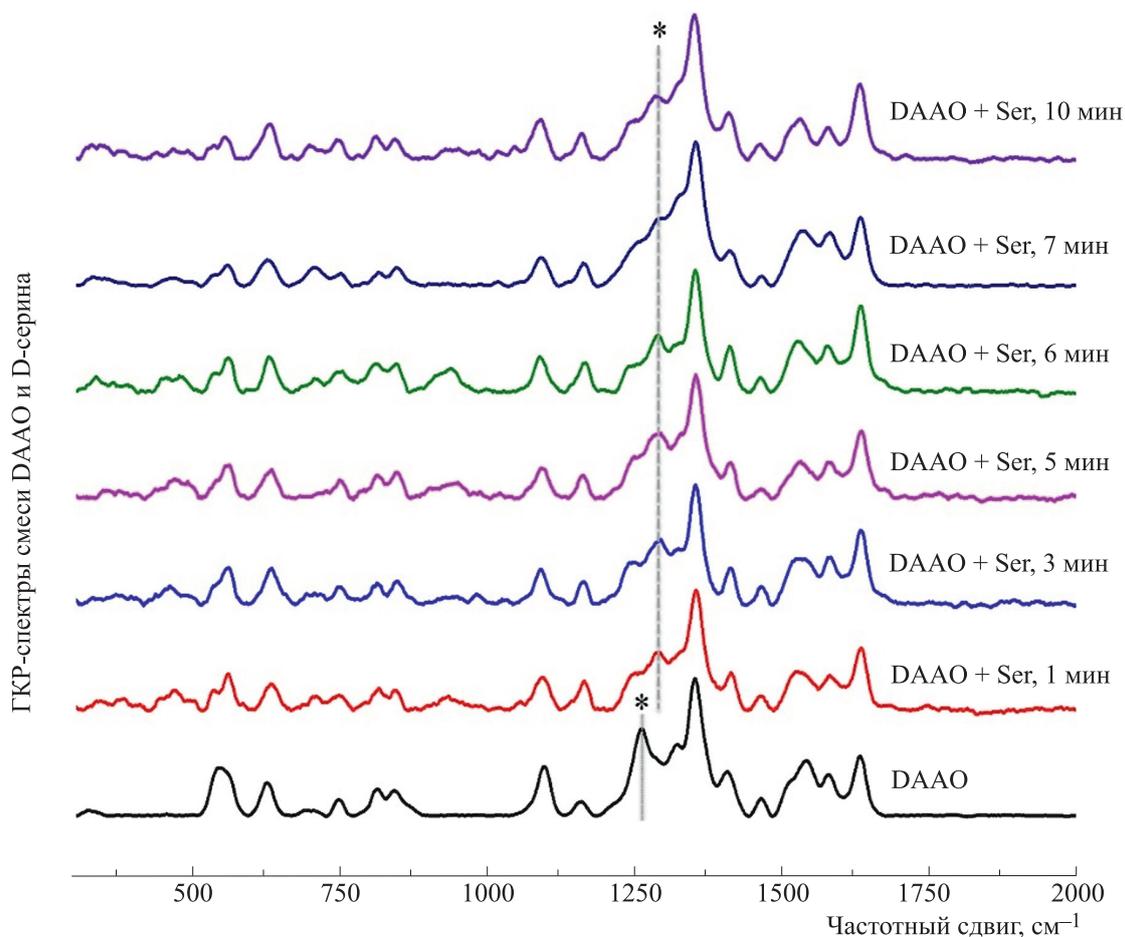


Рис. 3. ГКР-спектры DAAO в присутствии D-серина (концентрация фермента – 1 мг/мл, конечная концентрация D-серина – 50 мМ). Звездочками обозначены изменение положения пика 1252 см^{-1} .

семихинонной формой FAD [17], либо полностью восстановленной формой флавина [18]. Также на КР-спектре полученном через одну секунду после добавления D-аланина, пик 1252 см^{-1} исчезает, но появляется пик в районе 1300 см^{-1} , который также исчезает ко второй и третьей секундам. Подобный сдвиг полос ГКР-спектра флавина был обнаружен при замене водорода в позиции N(3)-H на дейтерий, а также при формировании водородной связи N(3)-H \cdots R [14]. В связи с этим полоса 1252 см^{-1} может служить индикатором состояния взаимодействия N(3)-H \cdots белок.

В ходе ферментативной реакции DAAO с аминокислотой происходит ее дегидрирование и перенос водорода на N(5) флавина. При этом стабилизацию субстрата относительно фермента обеспечивают несколько водородных связей, а после дегидрирования этот процесс осуществляется за

счет также электростатических взаимодействия атомов в молекуле [5].

Вероятно, N(3)-H-группа флавина непосредственно не участвует в ходе ферментативной реакции, но стабилизация молекулы кофактора относительно лиганда может влиять на изменение водородной связи N(3)-H \cdots R, что мы наблюдаем при внесении D-аланина к DAAO. Затем осуществляется повторное окисление восстановленного комплекса «фермент-аминокислота», и на второй секунде мы видим исчезновение пика 1612 см^{-1} , в то время как пик в области 1600 см^{-1} снова смещается в низкочастотную область ГКР-спектра.

На рис. 3 представлены спектры DAAO (1 мг/мл), характеризующие динамику изменения конформации FAD в присутствии D-серина (100 мМ). Известно, что константа Михаэлиса (K_M) реакции человеческого фермента DAAO и

D-серина в четыре раза выше K_M реакции DAAO и D-аланина [19]. Также известно, что относительная активность фермента DAAO, выделенного из почки свиньи, в отношении D-аланина более чем вдвое превышает активность в отношении D-серина [20]. Сказанное согласуется с наблюдаемым эффектом: изменения на спектре FAD-группы DAAO при внесении D-серина происходят в течение более длительного времени. При внесении же D-аланина изменения были выявлены уже на первых секундах ферментативной реакции. Установлено, что при активации DAAO D-серином за 60 с меняется положение пика 1252 см^{-1} и появляется пик в районе 1300 см^{-1} , но в течение 7–10 мин область $1200\text{--}1355\text{ см}^{-1}$ ГКР-спектра FAD перестает изменяться.

Итак, с помощью серебряных наночастиц были зарегистрированы ГКР-спектры и исследованы изменения конформации кофактора-FAD при активации DAAO субстратами с различной специфичностью. Выявлены характерные спектральные полосы с положениями максимумов: $1630, 1584, 1546, 1355, 1252, 1160\text{ см}^{-1}$, связанные с колебаниями групп атомов отдельных колец FAD-группы в окисленном состоянии. Показано, что в ходе окислительно-восстановительной реакции с субстратом происходит смещение пика 1252 см^{-1} в длинноволновую область, что, предположительно, связано с процессами координации активного центра DAAO относительно аминокислоты. Также в случае с взаимодействием фермента с D-аланином удалось зарегистрировать появление пика 1612 см^{-1} , связанного с восстановлением флавиновой части FAD. Мы также обнаружили разницу во времени, необходимом для регистрации изменений в ГКР-спектре FAD-группы фермента DAAO в присутствии D-аланина и D-серина. Так, во взаимодействии DAAO с D-аланином изменения ГКР-спектров происходили в течение нескольких секунд, а при добавлении D-серина для аналогичных результатов требовались минуты, что подтверждает литературные данные о разной активности фермента DAAO при взаимодействиях с указанными аминокислотами.

Предложенный подход на основе спектроскопии ГКР с серебряными плазмонными наноструктурами может быть использован в дальнейших исследованиях механизмов реакции DAAO с D-аминокислотами и определения эффективности генерации H_2O_2 различными формами DAAO.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00006 для Ж.В. Бочковой и Н.А. Браже), а также Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ имени М.В. Ломоносова «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Pollegioni and G. Molla. *Cell Press*, **29** (6), 276 (2011).
2. K. Yagi, K. Okamura, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **146**, 77 (1967).
3. R. Upadhyaya, H. Nagajyothi, and S. G. Bhat. *Process Biochem.*, **35**, 7 (1999).
4. L. Pollegioni, B. Langkau, and W. Tischer, *J. Biol. Chem.*, **268** (19), 1385 (1993).
5. L. Pollegioni, S. Sacchi, and G. Murtas, *Front. Mol. Biosci.*, **5**, 107 (2018).
6. R. Konno, et al. *Arch. Toxicol.*, **74**, 473 (2000).
7. H. Wei, N. Gong, et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **111**, 30 (2013).
8. J. Sasabe, Y. Miyoshi, et al., *Nat. Microbiol.*, **1** (10), 16125 (2016).
9. A. L. Kalinichenko, et al., *Redox Biol.*, **60**, 2213 (2023).
10. S. Moussa, G. Murtas, et al., *ACS Appl. BioMater.*, **4**, 5598 (2021).
11. L. Rodriguez-Lorenzo, L. Fabris, and R. A. Alvarez-Puebla. *Anal. Chim. Acta*, **745**, 10 (2012).
12. A. A. Semenova, E. A. Goodilin, N. A. Brazhe, et al. *J. Mater. Chem.*, **22**, 24530 (2012).
13. Y. Nishina, T. Kitagawa, K. Shiga., *J. Biochem.*, **84**, 925 (1978).
14. T. Kitagawa, Y. Nishina, et al., *Biochemistry*, **18**, 1804 (1979).
15. Y. Nishina, H. Tojo, and K. Shiga, *J. Biochem.*, **104**, 227 (1988).
16. Y. Nishina, R. Miura, and H. Tojo. *J. Biochem.*, **99**, 329 (1986).
17. Y. Nishina, K. Shiga, et al., *J. Biochem.*, **88**, 411 (1980).
18. Y. Nishina, K. Shiga, and R. Miura, *J. Biochem.*, **94**, 1979 (1983).
19. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P14920/entry>.

20. M. Gabler, M. Hensel, and L. Fischer, *Enzyme Microb. Technol.*, **27** (8), 605 (2000).

A Raman Spectroscopic Investigation of Conformation of Flavin Adenine Dinucleotide, a CoEnzyme of D-Amino Acid Oxidase

J. Bochkova*, **W. Liu****, **N.A. Brazhe***, **A.A. Zhgun*****, and **G.V. Maksimov***

**Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 2/12, Moscow, 119234 Russia*

***Department of Biology, MSU-BIT University,
International University Park Road 1, Dayun New Town, Longgang District, Shenzhen,
Guangdong Province, 518172 China*

****Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences,
Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071, Russia*

Based on silver nanoparticles application, surface-enhanced Raman scattering spectra of D-amino acid oxidase from pig kidney were recorded and analyzed. Spectral parameters characteristic of conformational changes in cofactor flavin adenine dinucleotide during activation of the enzyme by D-amino acids were revealed. It was found that enzyme substrate specificity determines the amount of time from the start of the conformational changes of flavin adenine dinucleotide until they no longer occur: in the presence of D-alanine, registration of the said conformational changes takes up just a few seconds, while it takes 10 min in the presence of D-serine .

Keywords: Raman spectroscopy, silver nanostructures, FAD, D-amino acid oxidase