

## НАУЧНЫЙ ОБЗОР

УДК 577.152.113

## БЕЛКОВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ ЛАКТАТОКСИДАЗЫ

**Елизавета Дмитриевна Беляева**<sup>1</sup>, **Наталья Владимировна Комарова**<sup>1</sup>,  
**Александр Евгеньевич Кузнецов**<sup>1</sup><sup>1</sup> Институт нанотехнологий микроэлектроники Российской академии наук**Автор, ответственный за переписку:** Наталья Владимировна Комарова,  
nat.v.kom@gmail.com**Аннотация.** Лактатоксидаза (КФ 1.1.3.2) – практически значимый фермент, широко применяемый для обнаружения L-лактата в медицинской диагностике и пищевой промышленности. В обзоре обобщаются результаты белковой инженерии лактатоксидаз в целях уточнения механизма действия фермента и улучшения его эксплуатационных характеристик.**Ключевые слова:** лактатоксидаза, ферменты, лактат, диагностика, мутации

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2024-65-2-144-151

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке Министерства промышленности и торговли Российской Федерации [номер контракта 20411.1950192501.11.003].**Для цитирования:** Беляева Е.Д., Комарова Н.В., Кузнецов А.Е. Белковая инженерия лактатоксидазы // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 2. С. 144–151.

## SCIENTIFIC REVIEW

## PROTEIN ENGINEERING OF LACTATE OXIDASE

**Elizaveta D. Belyaeva**<sup>1</sup>, **Natalia V. Komarova**<sup>1</sup>, **Alexander E. Kuznetsov**<sup>1</sup><sup>1</sup> Institute of Nanotechnology of Microelectronics of the Russian Academy of Sciences**Corresponding author:** Natalia V. Komarova, nat.v.kom@gmail.com**Abstract.** Lactate oxidase (EC 1.1.3.2) has substantial practical importance as an enzyme extensively used in medical diagnostics and the food sector for detection of L-lactate. This study provides a comprehensive summary of the outcomes obtained from protein engineering studies conducted on lactate oxidases. The primary objectives of these investigations were to elucidate the underlying mechanism of action of the enzyme and enhance its operational features.**Keywords:** lactate oxidase, enzymes, lactate, diagnostics, mutations**Financial support.** The work is supported by Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation [contract number 20411.1950192501.11.003].**For citation:** Belyaeva E.D., Komarova N.V., Kuznetsov A.E. Protein engineering of lactate oxidase // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. 2024. T. 65. № 2. S. 144–151.

Лактатоксидаза (LOX, КФ 1.1.3.2) представляет собой флавопротеин из группы оксидаз  $\alpha$ -гидроксикислот. Фермент катализирует реакцию окисления L-лактата с использованием кислорода, что приводит к образованию пирувата и перекиси водорода [1]. LOX характеризуется высокой специфичностью к L-лактату. Фермент представляет собой гомотетрамер, каждая из субъединиц которого имеет массу около 44 кДа [2].

Лактатоксидаза используется в медицине для мониторинга уровней L-лактата в биологических образцах, что необходимо для диагностики различных заболеваний, таких как сепсис, гипоксия, травмы, митохондриальные нарушения [3], лейкопения [26], опухолевые заболевания [4], сахарный диабет [5] и гипоксическая ишемическая энцефалопатия новорожденных [6]. Лактатоксидаза может быть использована в качестве диагностического инструмента в спортивной медицине для оценки выносливости спортсменов путем измерения уровней лактата в крови [7]. Кроме того, обнаружение лактата в продуктах питания и напитках может способствовать определению срока их годности и общего качества, что делает лактатоксидазу ценным инструментом в области производства пищевых продуктов [8]. В винодельческой промышленности лактатоксидаза является важным инструментом для контроля процесса брожения вина и обеспечения высокого качества этого продукта [9].

В настоящее время возрастает интерес к пониманию взаимосвязи структуры и функции лактатоксидазы и инженерии белка для улучшения характеристик фермента. Избирательное модифицирование аминокислот в остове позволяет влиять на активность фермента, а также его термостабильность и специфичность, что может способствовать расширению спектра областей применения лактатоксидазы.

### **Механизм реакции, трехмерная структура и строение активного центра**

LOX катализирует окисление L-лактата кислородом до пирувата и пероксида водорода, используя флавиномононуклеотид (FMN) в качестве кофактора (рисунок, А) [1]. Реакция протекает по механизму «пинг-понг» с последовательным протеканием двух полуреакций восстановления и окисления [2, 10–12]. На первом этапе реакции субстрат ( $\alpha$ -гидроксикислота) окисляется ферментом до кетокислоты, а флавин восстанавливается до гидрохинона (восстановительная

полуреакция). Структурные данные и результаты расчетных экспериментов свидетельствуют о том, что восстановительная полуреакция протекает сначала с безбарьерным процессом переноса протона от  $\alpha$ -гидроксильной группы L-лактата к остатку гистидина в активном центре, а затем происходит прямой перенос гидрид-иона от  $\alpha$ -углеродного атома L-лактата к положению N5 изоаллоксазинового кольца FMN [10, 13]. На втором этапе (окислительная полуреакция) восстановленный FMN вновь окисляется кислородом [13]. Окислительная полуреакция может осуществляться по карбанионному механизму, как это происходит в большинстве ферментов семейства оксидаз L-гидроксикислот [14]. Однако нельзя исключать, что вторая полуреакция протекает посредством прямого гидридного переноса, как, например, в оксидазах D-аминокислот [15]. На данный момент экспериментальных свидетельств в пользу реализации того или иного механизма окислительной полуреакции не получено [14, 15]. Интересно, что ферменты группы оксидаз  $\alpha$ -гидроксикислот проявляют значительные различия в активности своего кофактора FMN в восстановленном состоянии при взаимодействии с молекулярным кислородом. Для лактатоксидазы коэффициент скорости окисления FMN молекулярным кислородом составляет  $1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Этот показатель свидетельствует о высокой реакционной способности фермента по отношению к кислороду [16].

В настоящий момент в базе данных PDB приведены трехмерные структуры LOX из *Aerococcus viridans* (avLOX), *Pediococcus acidilactici* (paLOX) и *Enterococcus hirae* (ehLOX). Для avLOX решены 12 вариантов структур с различными субстратами для фермента дикого типа и мутантных форм в разных условиях и в комплексе с различными лигандами, включая лактат и пируват (PBD 2ZFA, 2NLI [13], 2J6X [11], 7F20, 7F21, 7F22, 7F1Y [17], 2DU2 [18], 4RJE [16], 4YL2 [19], 2E77 [20], 5EBU [21]). AvLOX, благодаря высокой стабильности, широко применяется для создания биосенсоров, а ее свойства хорошо изучены [1, 2, 11, 16, 18–23]. PaLOX коммерчески доступна наравне с avLOX и используется для детекции L-лактата [24–27]. Для paLOX известны три структуры (PBD 6RHS, 6RHT для фермента дикого типа и 6R9V для мутантной формы Ala94Gly) [28]. Однако экспериментально показано, что этот фермент, аннотированный как paLOX, на самом деле не является лактат-оксидазой, поскольку рекомбинантный фермент не проявляет активности к лактату, а коммерческий

препарат raLOX на самом деле представляет собой avLOX [28]. Исследования активности нативной raLOX при этом не проводились. Для ehLOX известна структура фермента дикого типа (PDB 6M73) и одного мутантного белка с заменой M207L (6M74) [29]. Все ферменты являются гомотетрамерами. Белковые субъединицы LOX структурно схожи между собой, а также другими белками семейства флавиновых оксидаз, имея характерную укладку из восьми чередующихся  $\alpha$ -спиралей и параллельных  $\beta$ -листов [18]. На рисунке, Б, В представлена структура avLOX.

Строение активного центра ниже описано на примере avLOX (рисунок, Г). Активный сайт avLOX схож с активными сайтами других ферментов из семейства оксидаз  $\alpha$ -гидроксикилот [20]. Шесть аминокислотных остатков (Tyr<sup>40</sup>, Tyr<sup>146</sup>, Arg<sup>181</sup>, Tyr<sup>215</sup>, His<sup>265</sup>, Arg<sup>268</sup>) образуют активный центр фермента. Tyr<sup>40</sup>, Tyr<sup>146</sup>, Arg<sup>181</sup>, Arg<sup>268</sup> и His<sup>265</sup> могут образовывать водородные взаимодействия с L-лактатом, позиционируя молекулу субстрата в активном центре. Tyr<sup>146</sup> взаимодействует с кетогруппой C2 лактата [21]. Arg<sup>181</sup> и Arg<sup>268</sup> (высококонсервативные остатки во всех ферментах семейства оксидаз  $\alpha$ -гидроксикилот)

образуют ионные связи с обоими атомами кислорода карбоксилатной группы лактата [10]. His<sup>265</sup> принимает протон от молекулы субстрата для последующего прямого переноса гидрид-иона от субстрата на FMN [23]. При этом Arg<sup>181</sup> и Arg<sup>268</sup> участвуют в стабилизации промежуточного состояния и нейтрализуют отрицательный заряд, возникающий в переходном состоянии при удалении протона из положения  $\alpha$ -углерода His<sup>265</sup> [22]. Мутагенез аналогичных остатков аргинина в схожих флавиновых ферментах подтверждает важность подобного строения активного центра для стабилизации первой полуреакции [30–34]. Помимо рассмотренных шести аминокислотных остатков, напрямую взаимодействующих с молекулой субстрата, активность фермента опосредованно зависит от остатков Tyr<sup>215</sup>, Asp<sup>174</sup> и Lys<sup>221</sup>. Tyr<sup>215</sup> образует слабую водородную связь с карбонильным атомом кислорода пирувата [21]. Этот остаток играет роль в поддержании конфигурации фермента, а также контролирует вход субстрата и выход продукта реакции [21]. Кроме того, Tyr<sup>215</sup> может влиять на селективность реакции [20]. Asp<sup>174</sup> и Lys<sup>221</sup> увеличивают основность His<sup>265</sup> для ускорения депротонирования субстрата [10, 13]. Остатки Tyr<sup>40</sup>, Pro<sup>93</sup>, Gln<sup>144</sup>, Tyr<sup>146</sup>,

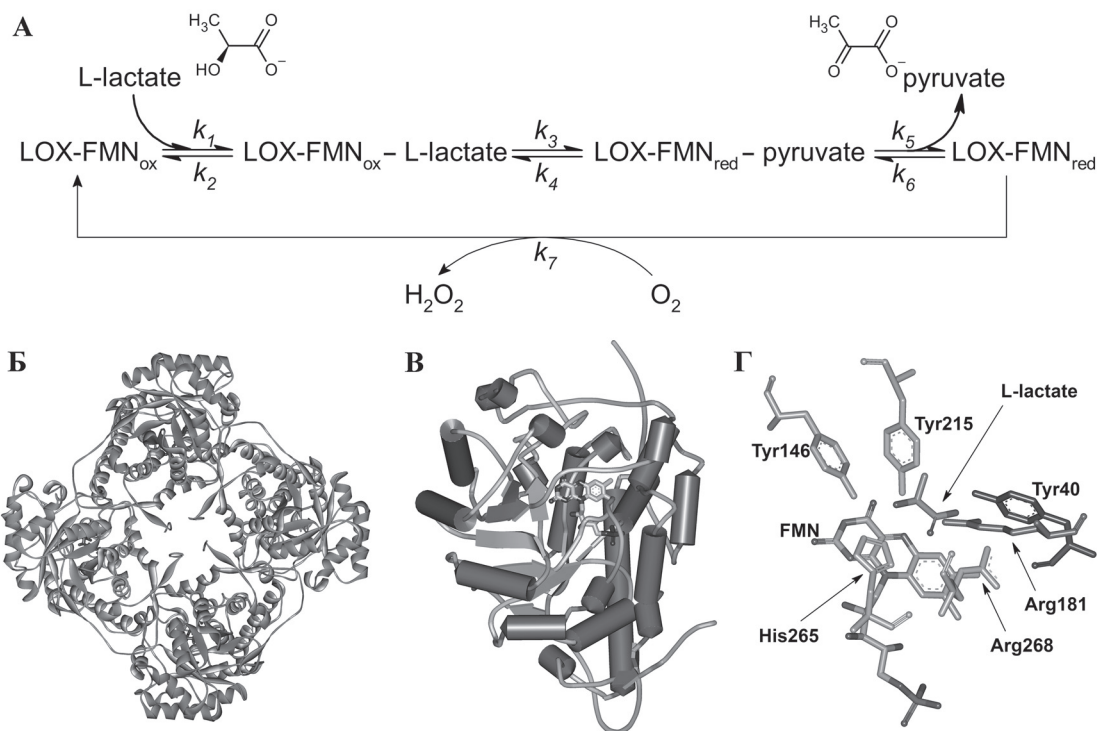


Схема реакции, катализируемой лактатоксидазой (А); олигомерная структура лактатоксидазы (PDB 2J6X) (Б); структура субъединицы лактатоксидазы (В); строение активного центра лактатоксидазы (Г)

Thr<sup>172</sup>, Lys<sup>241</sup>, Asp<sup>296</sup>, Arg<sup>300</sup> и Arg<sup>320</sup> участвуют в связывании FMN [11].

### **Влияние аминокислотных замен на свойства лактатоксидазы**

Абсолютное большинство работ по мутагенезу LOX выполнено на примере фермента из *Aerococcus viridans*. Исследования роли отдельных аминокислотных остатков в структуре и функции LOX можно условно разделить на следующие направления: установление механизма работы фермента, инженерия его субстратной специфичности, повышение термостабильности, ковалентная модификация поверхности.

### **Установление механизма работы фермента**

Выявление остатков, ответственных за осуществление каталитической функции фермента, имеет первостепенную важность для понимания механизма катализа. Выбор положения остатков для мутагенеза в этом случае, как правило, основывается на структурных данных: замены вводятся в тех положениях, где аминокислоты очевидно или потенциально способны взаимодействовать с субстратом, продуктом, кофактором или ключевыми остатками активного центра.

Замена остатков аргинина в положении 181 и 268 на лизины подтвердила их непосредственную роль в каталитической функции LOX [22]. У мутантной формы Arg181Lys наблюдалось снижение скорости реакции восстановления окисленного флавина в 12 раз по сравнению с диким типом фермента, 11-кратное ослабление связывания лактата и 20-кратное ослабление связывания пировиноградной кислоты. Замена Arg268Lys и двойная замена Arg181Lys/Arg268Lys приводят к существенному снижению скорости восстановления фермента. В случае замены Arg268Lys комплекс фермент-субстрат не был обнаружен [22]. Все это в полной мере согласуется с описанной выше способностью Arg<sup>181</sup> и Arg<sup>268</sup> стабилизировать переходное состояние фермент-субстратного комплекса и компенсировать отрицательный заряд, возникающий на His<sup>265</sup> в процессе катализа.

Остаток Tyr<sup>191</sup> образует слабую водородную связь с Tyr<sup>40</sup>, который, в свою очередь, входит в состав активного центра. Мутантные формы Tyr191Phe, Tyr191Leu, Tyr191Ala обладали более низкой активностью в сравнении с ферментом дикого типа. Изучение их кинетических характеристик позволило установить, что Tyr<sup>191</sup> контролирует выход пирувата из полости фермента, синхронизируя этапы высвобождения продукта

реакции с восстановлением и окислением флавина [19]. Другой остаток тирозина Tyr<sup>215</sup>, расположенный в одной и той же петле 4, что и Tyr<sup>191</sup>, имеет схожую функцию, контролируя доступ субстрата и выход продукта из активного центра, что было подтверждено кинетическими исследованиями мутантных форм с заменами Tyr215Phe и Tyr215His [21]. Остатки Ser<sup>175</sup> и Gln<sup>269</sup> формируют микроокружение ключевого каталитического остатка His<sup>265</sup>. Замены Gln269Asn и Gln269Glu приводят к существенному снижению активности avLOX. Замена Ser175Ala привела к повышению активности фермента, вероятно, за счет уменьшения рКа His<sup>265</sup> [35]. Исходя из структурных данных, можно предположить, что остатки Asp<sup>174</sup> и Lys<sup>221</sup> участвуют в переносе протона от молекулы субстрата, по цепочке взаимодействуя с His<sup>265</sup>. Замены Asp174Ala, Asp174His, Lys221Ala, Lys221Ser были введены в avLOX для того, чтобы экспериментально подтвердить гипотезу о значимости Asp<sup>174</sup> и Lys<sup>221</sup> для функционирования фермента. Действительно, было выявлено, что эти замены приводят к полной потере ферментативной активности [13]. Замена остатков Asn<sup>212</sup> и Ser<sup>178</sup>, также находящихся вблизи активного центра avLOX, на серин и аспарагин соответственно привела к потере активности фермента. Сообщается, что эти остатки оказывают влияние на вход субстрата в каталитическую полость [13].

### **Инженерия каталитической функции лактатоксидазы**

Основным субстратом LOX является лактат, который и выступает целевым аналитом для значительного числа биосенсоров на основе LOX. В связи с этим изменение субстратной специфичности по основному субстрату в случае LOX не востребовано. Однако LOX зависима от кислорода, и снижение этой зависимости весьма интересно для биосенсорных приложений. В связи с этим в ряде работ предпринимались попытки изменить с помощью рационального дизайна функцию белка с оксидазной на дегидрогеназную, т.е. заменить специфичность к кислороду на специфичность к другим соединениям, которые могли бы выступать в качестве медиатора для переноса электронов от восстановленного флавина к электроду в случае электрохимических биосенсоров. В предположении, что остаток Ala<sup>96</sup> является частью гидрофобного канала, связывающего кислород, была предложена его замена на лейцин [36]. Введение объемного остатка в этом случае затруднило проникновение кислорода к активному центру. В результате оксидазная активность

avLOX уменьшилась, а сродство фермента к медиатору несколько увеличилось [36].

В структуре ehLOX была выявлена функция Met<sup>207</sup> как регулятора доступа кислорода к FMN [29]. Этот остаток привлекает внимание тем, что существенно меняет свою конформацию в комплексе с D-лактатом. Насыщающий мутагенез в положении 207 выявил, что замена Met207Leu существенно снижает сродство ehLOX к кислороду и практически не уменьшает ее активности в дегидрогеназной реакции. При этом равнозначная замена в avLOX не дает такого же результата [29].

В литературе описана попытка изменения функции avLOX в сторону монооксигеназной реакции [37]. Лактатмонооксигеназа (LMO) катализирует реакцию превращения L-лактата в ацетат, CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>O. LMO имеет большое структурное сходство с LOX, и в том числе схожую организацию активного центра, включая использование FMN в качестве кофактора. Механизмы реакций LOX и LMO также близки. Разница между ними заключается в том, что после окислительной полуреакции молекула пирувата не диссоциирует до присоединения кислорода, и поэтому становится возможным окислительное декарбоксилирование пирувата кислородом [1]. Для изменения функционала avLOX на основе анализа гомологии оксидаз  $\alpha$ -гидроксикислот была выбрана замена Ala95Gly как характерная для монооксигеназ [37]. Авторы предположили, что увеличение полости с обратной стороны кольца FMN за счет удаления боковой цепи аланина может способствовать более длительному пребыванию кислорода в активном центре, что и может привести к декарбоксилированию пирувата. Однако на практике наблюдалось усиление дегидрогеназной активности. Дихлорфенолиндофенол стал субстратом, более предпочтительным, чем кислород. Замена оказала влияние на микросреду области C4 $\alpha$ -N5 FMN, снижая ее гидрофобность и способствуя образованию водородных связей с флавином. Это снизило реактивность мутантного фермента с кислородом. При ухудшении каталитических параметров по отношению к лактату фермент стал более реакционноспособен с более объемными субстратами. Последнее было достигнуто за счет расширения полости активного центра. Продукты реакции при этом остались неизменными [37].

#### **Повышение термостабильности белка**

Несмотря на то, что avLOX обладает достаточно высокой температурной стабильностью, получение еще более стабильных форм белка

представляет практический интерес. LOX широко востребована для получения биосенсоров [38], срок хранения которых тем дольше, чем стабильнее фермент.

Повышения стабильности LOX добиваются в основном с помощью направленной эволюции. Например, двойная замена Glu160Gly/Val198Ile привела к увеличению периода полуинактивации avLOX при 70 °C в 20 раз по сравнению с ферментом дикого типа [39, 40]. Интересно, что одиночная замена Val198Ile не внесла значимых изменений в свойства фермента, а замена Glu160Gly не повышала стабильность фермента в той же мере, как в случае двойной замены. Это означает, что выраженный эффект термостабилизации оказался возможен только лишь при комбинировании обеих замен [40]. Авторы работы предположили, что замена глутамата на глицин в положении 160 уменьшает электростатическое отталкивание между отрицательными зарядами Glu<sup>160</sup> и Glu<sup>130</sup> в структуре белка. Однако изучение термостабильности пяти вариантов одиночного мутанта лактатоксидазы в положении 160 (Glu160Ala, Glu160Gln, Glu160His, Glu160Arg и Glu160Lys) показало, что объем боковой цепи аминокислоты в этом положении в основном способствует термостабильности лактатоксидазы [39]. Механизм аддитивного эффекта замен Glu160Gly и Val198Ile остается необъясненным. При этом кинетические свойства двойного мутанта ухудшились в сравнении с ферментом дикого типа:  $K_M$  по отношению к лактату выросла на порядок без существенного изменения  $k_{кат}$ . При этом установлено, что на кинетические свойства влияет замена Val198Ile [39]. Эта же группа исследователей, приняв за основу для продолжения экспериментов по направленной эволюции двойной мутант Glu160Gly/Val198Ile, получила шеститочечный мутант Glu160Gly/Val198Ile/Gly36Ser/Thr103Ser/Ala232Ser/Phe277Tyr. Удалось добиться повышения термостабильности в 36 раз в сравнении с ферментом дикого типа и в два раза в сравнении с avLOX с исходной двойной заменой. Кинетические характеристики варианта с шестью заменами не отличались от таковых для формы Glu160Gly/Val198Ile [41].

В работе [42] направленная эволюция использовалась для поиска положений аминокислотных остатков, потенциально оказывающих существенное влияние на стабильность белка. Затем в этих положениях выполнялся насыщающий мутагенез с последующим комбинированием полученных вариантов. В общей сложности было получено несколько десятков вариантов LOX,

для каждого из которых были изучены свойства. Наблюдалась значительная отрицательная корреляция между стабильностью и кинетическими свойствами белка при простом комбинировании замен, найденных направленной эволюцией. Результаты насыщающего мутагенеза помогли скорректировать замены таким образом, чтобы уменьшить негативное влияние на кинетические свойства при значительном повышении температурной стабильности. Наиболее интересными представляются варианты Asp70Met/Arg141Phe/Asp164Leu/Phe239Leu, обладающий самой высокой температурной стабильностью, и Asp70Met/Arg141Phe/Asp164Ile/Phe239Leu, для которого потеря активности была минимальной в сравнении с другими термостабильными вариантами (17% от специфической активности фермента дикого типа). Повышение термостабильности LOX при замене остатка Asp<sup>70</sup> на гидрофобные аминокислоты авторы [42] объясняют его близостью к гидрофобной области контактирующей субъединицы, т.е. фактически этот эффект объясняется созданием дополнительного гидрофобного взаимодействия в межсубъединичном контакте. Остаток Asp<sup>164</sup>, вероятно, ослабляет электростатическое отталкивание между Glu<sup>160</sup> и Glu<sup>130</sup>, дестабилизирующий эффект которых уже отмечался выше. Замены Arg<sup>141</sup> и Asp<sup>164</sup> на гидрофобные аминокислоты приводят к стабилизации белковой глобулы за счет возникновения гидрофобных взаимодействий между  $\alpha 2$  и  $\alpha 3$  спиралью белковой глобулы. Замена Phe<sup>239</sup> способствует формированию гидрофобных контактов в этой же области, что подтверждается аддитивными эффектами при комбинировании замен в 141, 164 и 239 положениях [42].

Рациональный дизайн также применялся для повышения температурной стабильности avLOX [43]. Поскольку работа была выполнена до получения реальных трехмерных структур avLOX, выбор аминокислотных замен основывался на модельной структуре, которая была построена на основе глицинооксидазы, обладающей 35%-й гомологией с avLOX. В качестве предпосылок использовали три подхода к стабилизации белков. Усиление взаимодействий внутри или между  $\alpha$ -спиралью является одним из них. Предполагалось, что замена Ala106Tyr/Lys приведет к усилению взаимодействий между спиралью  $\alpha 1$  и  $\alpha 2$  за счет новых водородных взаимодействий, замена Thr103Glu – к стабилизации спирали  $\alpha 1$ , а замена Trp331Glu – к стабилизации спирали  $\alpha 8$  за счет введения ионных мостиков. Однако на практике все эти замены привели к обратному

эффекту – ухудшению термостабильности фермента. Вторым подходом для стабилизации avLOX является уменьшение дезамидирования аспарагина при повышении температуры, поскольку в случае дезамидирования образуется отрицательный заряд, потенциально дестабилизирующий молекулу. Для этого проводили замену Asn<sup>154</sup> на треонин и изолейцин. Эти замены не оказали реального эффекта на термостабильность avLOX. Третий подход был основан на стабилизации межсубъединичного контакта. Замена Ala<sup>68</sup> на валин и лейцин и замена Arg<sup>347</sup> на лейцин должны были привести к увеличению гидрофобных взаимодействий. Замены Glu272Gln и Glu303Gln были предложены для удаления электростатического отталкивания между субъединицами. Среди них только последний вариант с заменой Glu303Gln обладал более высокой стабильностью, но при этом его активность была очень низкой до термической обработки. Можно предположить, что причиной неудавшихся экспериментов по рациональному дизайну является неточность модельной структуры [43].

### *Ковалентная модификация поверхности*

Сайт-направленная ковалентная модификация поверхности различными агентами может быть востребована для создания биосенсоров. Например, для уже упомянутой ранее avLOX с заменой Ala96Leu проводили замены ряда остатков на лизин, через который фермент можно модифицировать медиатором электронов N-метилфеназоний этилсульфатом (PES) для более эффективного переноса электрона от FMN [44]. Такая модификация нужна для разработки биосенсоров с прямым трансфером электронов от фермента к электроду. Были выбраны несколько полярных остатков на поверхности фермента вблизи активного центра: Glu<sup>26</sup>, Glu<sup>48</sup>, Ser<sup>178</sup>, Arg<sup>183</sup>, Glu<sup>207</sup> и Asn<sup>212</sup>. Замены Glu26Lys, Glu48Lys, Ser178Lys и Asp184Lys приводили к инактивации фермента, вероятно, из-за неблагоприятных структурных изменений в avLOX. Замены Arg183Lys, Glu207Lys и Asn212Lys показали равную или даже более высокую ферментативную активность по сравнению с активностью дикого типа. Особенно интересен с практической точки зрения вариант с заменой Asn212Lys. Для этой формы наблюдалось существенное снижение оксидазной активности и увеличение дегидрогеназной. Эти эффекты можно объяснить формированием электростатического взаимодействия между боковой цепью Lys<sup>212</sup> и боковой цепью Asp<sup>184</sup>, в результате чего происхо-

дит изменение положения главной цепи, включая аминокислоту Leu<sup>211</sup>, которая может затруднять доступ кислорода к каналу доступа в активный центр [44].

Также описана замена Ser218Cys для последующей модификации белка полиэтиленгликолем [45]. Остаток Ser<sup>218</sup> был выбран, потому что находится в низкоконсервативной области в подвижной петле в удалении от активного центра avLOX. Тем не менее, замена его на цистеин привела к выраженному ухудшению кинетических параметров фермента, а также к ухудшению температурной стабильности [45].

### Заключение

Исследования структуры лактатоксидазы позволяют глубже понять молекулярные меха-

низмы ее функционирования. Понимание влияния отдельных аминокислотных остатков на активность и структуру лактатоксидазы имеет решающее значение для разработки улучшенных вариантов LOX. Несмотря на высокую практическую значимость LOX и интерес к ним как к модельным ферментам группы оксидаз  $\alpha$ -гидроксикислот, работ по их белковой инженерии не так много. Не в полной мере выявлены остатки, оказывающие опосредованное влияние на функционирование активного центра. Не решена проблема ухудшения кинетических параметров LOX при повышении термостабильности белка. В связи с этим остается актуальным дальнейшее исследование взаимосвязи между структурой и функцией методами белковой инженерии для лактатоксидазы.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maeda-Yorita K., Aki K., Sagai H., Misaki H., Massey V. // *Biochimie*. 1995. Vol. 77. N 7–8. P. 631.
- Duncan J.D., Wallis J.O., Azari M.R. // *Biochem Biophys Res Commun*. 1989. Vol. 164. N 2. P. 919.
- Allen S.E., Holm J.L. // *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 2008. Vol. 18. N 2. P. 123.
- Pérez-Tomás R., Pérez-Guillén I. // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12. N 11. P. 3244.
- Crawford S.O., Hoogeveen R.C., Brancati F.L., Astor B.C., Ballantyne C.M., Schmidt M.I., Young J.H. // *Int. J. Epidemiol*. 2010. Vol. 39. N 6. P. 1647.
- Van Anh, T.N., Kiem Hao, T., Diem Chi, N.T., Huu Son, N. // *Open Access Maced J. Med. Sci*. 2019. Vol. 7. N 21. P. 3564.
- Parra, A., Casero, E., Vázquez, L., Pariente, F., Lorenzo, E. // *Anal Chim Acta* 2006. Vol. 555. P. 308.
- Przybył M. // *Biotechnology and Food Science*. 2014. Vol. 78. N 1. P. 71.
- Shkotova L.V., Goriushkina T.B., Tran-Minh C., Chovelon J.-M., Soldatkin A.P., Dzyadevych S.V. // *Materials Science and Engineering: C*. 2008. Vol. 28. N 5. P. 943.
- Yildiz I. // *J Mol Struct*. 2023. Vol. 1295. P. 136706.
- Leiros I., Wang E., Rasmussen T., Oksanen E., Repo H., Petersen S.B., Heikinheimo P., Hough E. // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2006. Vol. 62. P. 1185.
- Chaiyen, P., Fraaije, M.W., Mattevi, A. // *Trends Biochem Sci*. 2012. Vol. 37 P. 373.
- Furuichi M., Suzuki N., Dhakshnamoorthy B., Minagawa H., Yamagishi R., Watanabe Y., Goto Y., Kaneko H., Yoshida Y., Yagi H. et al. // *J. Mol. Biol*. 2008. Vol. 378. P. 436.
- Yorita K., Janko K., Aki K., Ghisla S., Palfey B.A., Massey V. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997. Vol. 94. P. 9590.
- Tishkov V.I., Khoronenkova S.V. // *Biochemistry (Moscow)*. 2005. Vol. 70. P. 40.
- Stoisser T., Rainer D., Leitgeb S., Wilson D.K., Nidetzky B. // *FEBS Journal*. 2015. Vol. 282. P. 562.
- Furubayashi N., Inaka K., Kamo M., Umena Y., Matsuoka, T., Morimoto Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2021. Vol. 568. P. 131.
- Umena Y., Yorita, K., Matsuoka T., Kita A., Fukui K., Morimoto Y. // *Biochem Biophys Res Commun*. 2006. Vol. 350. P. 249.
- Stoisser T., Klimacek M., Wilson D.K., Nidetzky B. // *FEBS Journal*. 2015. Vol. 282. P. 4130.
- Li S.J., Umena Y., Yorita K., Matsuoka T., Kita A., Fukui K., Morimoto Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2007. Vol. 358. P. 1002.
- Stoisser T., Brunsteiner M., Wilson D.K., Nidetzky B. // *Sci. Rep*. 2016. Vol. 6. P. 27892.
- Yorita K., Matsuoka T., Misaki H., Massey V. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000. Vol. 97 P. 13039.
- Furuichi M., Suzuki N., Dhakshnamoorthy B., Minagawa H., Yamagishi R., Watanabe Y., Goto Y., Kaneko H., Yoshida Y., Yagi H. et al. // *J. Mol. Biol*. 2008. Vol. 378. P. 436.
- Palmisano F., Rizzi R., Centonze D., Zamboni P.G. // *Biosens. Bioelectron*. 2000. Vol. 15. P. 531.
- Bridge K., Davis F., Collyer S.D., Higson S.P.J. // *Electroanalysis*. 2007. Vol. 19. P. 567.
- Pérez S., Fábregas E. // *Analyst*. 2012. Vol. 137. P. 3854.
- Danilowicz C., Cortón E., Battaglini F., Calvo E.J. // *Electrochim Acta*. 1998. Vol. 43. P. 3525.
- Ashok Y., Maksimainen M.M., Kallio T., Kilpeläinen P., Lehtiö L. // *PLoS One*. 2020. Vol. 15. e0223870.
- Hiraka K., Yoshida, H., Tsugawa W., Asano R., La Belle J.T., Ikebukuro K., Sode K. // *Protein Science*. 2022. Vol. 31. N 10. e4434.

30. Rouviere-Fourmy N., Capeillere-Blandin C., Lederer F. // *Biochemistry*. 1994. Vol. 33. P. 798.
31. Gondry M., Dubois J., Terrier M., Lederer F. // *Eur. J. Biochem.* 2001. Vol. 268. P. 4918.
32. Xu Y., Dewanti A.R., Mitra B. // *Biochemistry*. 2002. Vol. 41. P. 12313.
33. Lehoux I.E., Mitra B. // *Biochemistry*. 2000. Vol. 39. P. 10055.
34. Macheroux P., Kieweg V., Massey V., Soderlind E., Stenberg K., Lindqvist Y. // *Eur. J. Biochem.* 1993. Vol. 213. P. 1047.
35. Garcia-Morales R., Zárate-Romero A., Wang J., Vazquez-Duhalt R. // *Chem. Electro Chem.* 2023.
36. Hiraka K., Kojima K., Lin C.-E., Tsugawa W., Asano R., La Belle J.T., Sode K. // *Biosens. Bioelectron.* 2018. Vol. 103. P. 163.
37. Yorita K., Aki K., Ohkuma-Soyejima T., Kokubo T., Misaki H., Massey V. // *J. Biol. Chem.* 1996. Vol. 271. P. 28300.
38. Rathee K., Dhull V., Dhull R., Singh S. // *Biochem. Biophys. Rep.* 2016. Vol. 5. P. 35.
39. Minagawa H., Shimada J., Kaneko H. // *Eur. J. Biochem.* 2003. Vol. 270. P. 3628.
40. Minagawa H., Kaneko H. // *Biotechnol. Lett.* 2000. Vol. 22. P. 1131.
41. Minagawa H., Yoshida Y., Kenmochi N., Furuichi M., Shimada J., Kaneko H. // *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2007. Vol. 64. P. 77.
42. Hamamatsu N., Nomiya Y., Aita T., Nakajima M., Husimi Y., Shibana Y. // *Protein Engineering Design and Selection.* 2006. Vol. 19. P. 483.
43. Kaneko H., Minagawa H., Shimada J. // *Biotechnol Lett.* 2005. Vol. 27. P. 1777.
44. Hiraka K., Kojima K., Tsugawa W., Asano R., Ikebukuro K., Sode K. // *Biosens. Bioelectron.* 2020. Vol. 151. P. 111974.
45. Unterweger B., Stoisser T., Leitgeb S., Birner-Grünberger R., Nidetzky B. // *Bioconjugate Chemistry.* 2012. Vol. 23. N 7. P. 1406.

### **Информация об авторах**

Беляева Елизавета Дмитриевна – инженер отдела микро- и нанoeлектроники и биосенсорики Института нанотехнологий микроэлектроники Российской академии наук (BelyaevaLiza2000@gmail.com);

Комарова Наталья Владимировна – инженер отдела микро- и нанoeлектроники и биосенсорики Института нанотехнологий микроэлектроники Российской академии наук, канд. хим. наук (nat.v.kom@gmail.com);

Кузнецов Александр Евгеньевич – начальник отдела микро- и нанoeлектроники и биосенсорики Института нанотехнологий микроэлектроники Российской академии наук, докт. техн. наук (kae@tcen.ru).

### **Соблюдение этических стандартов**

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

### **Вклад авторов**

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

### **Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 30.10.2023;  
одобрена после рецензирования 12.11.2023;  
принята к публикации 14.11.2023.