

## ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ЭВОЛЮЦИОННОГО ПРЕДШЕСТВЕННИКА МОНОАМИНОКСИДАЗ А И В ЧЕЛОВЕКА.

Т. П. СИНГЕР, В. Л. ЯНКОВСКАЯ, М. БЕРНАРД,  
К. КРОНИН, С. О. САБЛИН

\*Department of Biochemistry and Biophysics and <sup>#</sup>Biopharmaceutical Sciences, University of California San Francisco, CA 94121, USA and <sup>H</sup>Molecular Biology Division, Department of Veterans Affairs Medical Center, San Francisco, CA 94121, USA

Новый тип флавин-зависимой моноаминоксидазы был недавно выделен из *Aspergillus niger* и клонирован в *E. coli* [1, 2]. Свойства этой моноаминоксидазы, а также существенная часть первичной последовательности аналогичны моноаминоксидазам из высших организмов, что, возможно, свидетельствует о том, что новый фермент является эволюционным предшественником митохондриальных ферментов. Новый фермент отличается от MAO А и В тем, что он растворим, локализован в пероксисомах и имеет нековалентно связанный FAD в качестве кофактора.

Мы продолжили характеризацию MAO-N, экспрессированной в рекомбинантной форме в *E. coli*, в отношении специфичности к субстратам и ингибиторам, а также оптимизировали условия очистки для выделения фермента в гомогенном состоянии. Так как некоторые наблюдения предшествующих исследователей данного фермента не удалось воспроизвести и по всей видимости, являются ошибочными, мы вновь исследовали субстратную специфичность, взаимодействие с обратимыми и необратимыми ингибиторами, а также другие каталитические и молекулярные свойства фермента. MAO-N имеет существенно более высокие значения каталитической скорости в реакциях окисления многих алифатических и ароматических аминов, по сравнению с любой моноаминоксидазой из животных организмов. По некоторым проявлениям субстратной специфичности фермент более аналогичен моноаминоксидазе В, в других случаях, как, например, двухфазная кинетика окисления ряда субстратов, фермент более схож с MAO А. В противоположность результатам, опубликованным ранее [1,2], обнаружено, что MAO-N не катализирует окисление серотонина, норадреналина, дофамина и других биогенных аминов. MAO-N необратимо ингибируется (-)депренилом и хлоргилином, образуя флавоцианиновый аддукт в положении N(5) флавинового кофактора, подобно тому, что наблюдается в случае ферментов из животных тканей. Скорость инактивации значительно выше при взаимодействии с хлоргилином, что также указывает на большую аналогию нового фермента с моноаминоксидазой А. Определены константы диссоциации MAO-N для ряда обратимых ингибиторов и их значения сравнены с соответствующими значениями для MAO А и В. Сравнение снова показало большую аналогию моноаминоксидазы N с MAO А, а не с MAO В. В настоящей статье также описаны эксперименты по направленному мутагенезу для получения фермента с ковалентно связанным FAD, а также эксперименты по обратимому удалению кофактора.

Принятые сокращения: ДТТ) дитиотрейтол; MAO) моноаминоксидаза; MPP<sup>+</sup>, 1-метил-4-фенилпиридиний; МРТР) 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

**Ключевые слова:** моноаминоксидаза N, очистка, экспрессия, молекулярные свойства, направленный мутагенез

**ВВЕДЕНИЕ.** Митохондриальные моноаминоксидазы А и В из животных тканей относятся к ряду наиболее популярных объектов исследования. Большое число статей посвящено их субстратной специфичности, взаимодействию с обратимыми и необратимыми ингибиторами, биогенезу, их физиологической роли и роли в различных заболеваниях, а

также, определению и сравнению первичной последовательности моноаминоксидаз из разных источников. Тем не менее, некоторые важные аспекты, такие как, третичная структура и структура субстрат связывающих центров, остаются неизвестными, прежде всего потому, что усилия кристаллизовать эти ферменты и следовательно, определить третичную и четвертичную структуру, были безуспешны. Главная причина неудач в попытках кристаллизовать MAO A и B заключается в склонности ферментов этого класса к агрегации в процессе их экстракции из внешней мембраны митохондрий и последующей очистки, что приводит к образованию неструктурированных образований при использовании процедур, используемых в кристаллизации этих белков.

Возможное разрешение этой проблемы пришло недавно, когда Shilling и Lerch [1] опубликовали выделение флавин-зависимой моноаминоксидазы из гриба *Aspergillus niger*, названной MAO-N. В отличие от моноаминоксидаз из животных организмов, данный фермент является цитоплазматическим. Он не проявляет тенденции к агрегации, легко экстрагируется в растворимую фракцию в процессе разрушения клеток и может быть относительно легко очищен с использованием традиционных методов. Фермент из грибов является гомотетрамером, молекулярная масса субъединицы равна 55,6 кДа, несколько меньше, по сравнению со всеми известными моноаминоксидазами A и B, и, что является наиболее интересным, в отличие от всех известных моноаминоксидаз содержит нековалентно связанный кофактор FAD. Авторы вышеупомянутой статьи провели также работы по клонированию, определению первичной последовательности и экспрессии MAO-N *E.coli* [2]. Фермент из грибов имеет высокую гомологию в аминокислотной последовательности с моноаминоксидазами A и B человека, хотя пентапептид, с которым ковалентно связан флавиновый кофактор в животных моноаминоксидазах [3], отсутствует, что согласуется с тем, что в MAO-N кофактор связан нековалентно. Высокая гомология в аминокислотной последовательности, а также то обстоятельство, что фермент проявляет промежуточную специфичность по отношению к субстратам и ингибиторам по сравнению с MAO A и B из животных тканей, позволило авторам сделать заключение о том, что MAO-N/ возможно, является предшественником моноаминоксидаз животных.

Так как Shilling и Lerch прекратили работы по MAO-N (персональное заявление д-ра B. Shilling) мы решили возобновить исследования в этой области с тем, чтобы наиболее полно охарактеризовать фермент в отношении субстратной и ингибиторной специфичности, кинетического механизма катализа, усовершенствовать процедуру очистки, и, таким образом, подготовить базу для кристаллизации фермента и определения его структуры. Учитывая высокую гомологию MAO-N с моноаминоксидазами человека, определение структуры MAO-N существенно облегчит подобные исследования в направлении определения структуры моноаминоксидаз из высших организмов. Настоящая статья обобщает результаты наших исследований по этому интересному ферменту.

**МЕТОДИКА.** Условия роста клеток. Клетки *E. coli* BL21 (DE3) были трансформированы экспрессионным вектором pECME-3 [3], любезно предоставленным д-ром Shilling и содержащим ген, кодирующий MAO-N. Культуру клеток выращивали в 50 мл среды Luria-Bertani (LB), содержащей 100 мкг/мл ампициллина, в 250 мл колбе при постоянном перемешивании при 37°C. Через 12 часов 4x8 мл этой клеточной суспензии было перенесено в стерильные пробирки, клетки были осаждены центрифугированием и использованы для инокуляции 4x300 мл среды LB содержащей 100 мкг/мл ампициллина, помещенных в колбы емкостью 1 л. После 12 часов инкубации при постоянном перемешивании и температуре 30°C, содержимое каждой колбы было использовано для инокуляции четырех ферментеров, объемом 10 л каждый, и выращивание клеток продолжали в тех же условиях. Когда оптическая плотность клеточной суспензии достигла 5,6 при

500 нм, клетки были собраны при 4°C центрифугированием в центрифуге с непрерывным потоком типа Sharples. Выход составил 220 г клеток, которые хранились при -80° С. В отличие от опубликованной процедуры [2], клетки растили без добавления индуктора.

*Очистка моноаминоксидазы N.* 10-15 г клеток, выращенных как описано в предыдущем параграфе, были разморожены и гомогенизированы при 0° С в пропорции 40 мл на 15 г клеток в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.2, содержащем 1 мМ ЭГТА, 1 мМ дитиотрейтола (ДТТ), ингибиторы протеаз такие, как бензамидин, пепстатин А, лейпептин, апротинин и бестатин, каждый в концентрации 1 мкг/мл, а также 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (PMSF). Клетки были разрушены под высоким давлением за два цикла с использованием прибора French Press. В промежутках между циклами в клеточный гомогенат добавляли нескольких миллиграммов ДНКазы для уменьшения вязкости раствора. Гомогенат центрифугировали при 20000 g в течение 15 мин. Осадок ресуспендировали в половине изначального объема того же буферного раствора и повторно осаждали центрифугированием. Надосадочный раствор после первого и второго центрифугирования объединяли и использовали для получения очищенного препарата моноаминоксидазы N. Дальнейшую очистку фермента проводили на ионообменном сорбенте ЦЭАЭ-сефарозе CL-6В, помещенным в колонку размером 2,5x44 см, используя в качестве стартового буфера 10 мМ раствор натрий-фосфатного буфера, содержащего ДТТ, перечисленные выше ингибиторы протеаз и 1 мМ ЭДТА. Элюция проводилась при скорости потока от 0,5 до 1 мл/мин линейным градиентом фосфата в интервале 10-250 мМ. Фракции, объемом 5 мл, были анализированы на ферментативную активность и концентрацию белка (поглощение при 280 нм). Фракции с наивысшим уровнем специфической активности (отношение ферментативной активности к концентрации белка) были объединены, сконцентрированы до объема приблизительно 5 мл и разбавлены равным объемом буферного раствора, содержащего 50 мМ фосфат натрия, 1,7 М сульфата аммония, а также ДТТ, ЭДТА, ингибиторы протеаз (кроме бензамидина и PMSF) и доведенного до значения pH 7,2 (буферный раствор Б). Следующая стадия очистки включала хроматографию на сорбенте с обратной фазой. Колонка, размером 1x24 см была заполнена сорбентом фенил-сефароза (Phenyl Sepharose 6 Fast Flow, low substitution, Pharmacia) и уравновешена при комнатной температуре раствором, содержащим в равных соотношениях буферный раствор, (50 мМ фосфат натрия), а также ДТТ, ЭДТА и ингибиторы протеаз и доведенного до значения pH 7,2 (буферный раствор А), и буферный раствор Б. Хроматография проводилась с использованием системы FPLC (Pharmacia) при изменении соотношения буферных растворов А и Б. Фракции объемом 4-5 мл, собирали в пробирки, помещенные на лед. После нанесения фермента колонку промывали раствором, содержащим равные объемы буферных растворов А и Б до тех пор, пока поглощение при 280 нм не уменьшилось до базового уровня. Затем, колонку промывали раствором, содержащим 77% буферного раствора А и 23% буферного раствора Б. Фермент элюировали раствором, содержащим буферы А и Б в соотношении 5:15. Собранные фракции исследовали на ферментативную активность. Фракции, содержащие наибольшую удельную активность, были объединены, сконцентрированы до объема 2,5 мл и обессолены на колонке PD-10 (Pharmacia).

На последней стадии очистки образец фермента хроматографировали с использованием коммерческой колонки Моно-Q HR 10/10 (Pharmacia) при комнатной температуре. Фракции были собраны в пробирки, помещенные на лед. Объем каждой собранной фракции составлял 0,5 мл. Колонка была уравновешена в буферном растворе, содержащем 10 мМ фосфата натрия, 1 мМ ДТТ и ингибиторы протеаз, как и прежде, и доведенного до значения pH 7,2 (буферный раствор С). После нанесения фермента на колонку фермент элюировали плавным градиентом от раствора, содержащего 86 % С и 14 % Д



(буферный раствор Д содержал буферный раствор С и хлорид натрия в концентрации 1 М) до раствора, содержащего 85% С и 15% Д. Профиль элюции приведен на рис. 1. Фракции, содержащие наибольшую удельную активность фермента, объединяли и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Направленный мутагенез в MAO-N.** Замещение аланина на цистеин в положении 429 последовательности моноаминоксидазы N проводили олигонуклеотид-направленным мутагенезом согласно описанному методу [4] с использованием стандартного коммерческого набора (Clontech Transformer site-directed mutagenesis kit). Матрицей служил pUC18, содержащий фрагмент *Sph I/BamH I*, содержащий 471 нуклеотидную пару с 3'-конца

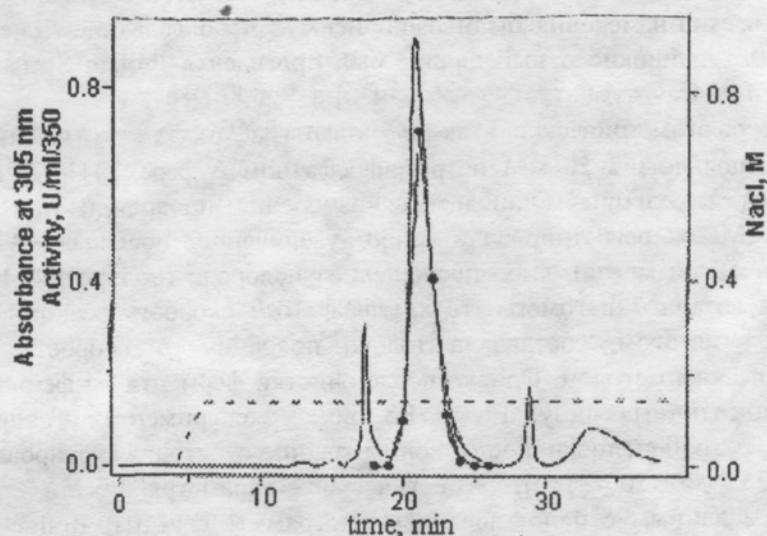


Рис 1. Хроматография MAO N на Моно Q после хроматографии на. Поглощение при 305 nm (—) и активность MAO N (units/ml) (---) показаны на левой ординате, и градиент хлорида натрия (· · ·) обозначен на правой ординате.

последовательности, кодирующей моноаминоксидазу N, полученной из экспрессионного вектора pECME-3, и клонированного в *Sph I/BamH I* сайты pUC18. Мутагенез был проведен с использованием oMAO-N1 (5'-GAG.TTT.GCG.AAG.GGC.TGC.TGG.TTC.TTC.TCT.AGG.C-3'; Life Technologies)) в качестве праймера для мутации и *Trans Oligo Nde I / Nco I* (5'-GAG.TGC.ACC.ATG.GGC.GGT.GTG.AAA.T-3'), в качестве selection primer (последний был предоставлен в качестве контрольного компонента в Transformer kit). Подчеркнуты основания, которые отличаются от матрицы-мишени (target template).

Мутанты были идентифицированы секвенированием ДНК с использованием обратного праймера. В одном из отобранных мутантов определили первичную последовательность вставки по всей длине с использованием pUCпраймеров, и мутированный фрагмент был переклонирован во фрагмент pECME-3 вектора, содержащий 5626 нулеотидных пар, с использованием рестрикционных сайтов *Sph I/Bam I* (Для этого потребовалась частичная рестрикция вектора нуклеазой *Sph I*). Полученный рекомбинантный вектор pECME (A429C) был анализирован рестриктивным анализом и секвенированием с использованием праймера, содержащего последовательность T7 терминатора (Novagen) для подтверждения правильности вставки. Вектор pECME-3 (A429C) был использован для трансформации клеток *E.coli*, линии BL21 (DE3), для экспрессии MAO-N.

**Определение нуклеотидной последовательности** было проведено с использованием деаза-G набора для секвенирования (deazaG Sequencing kit, U.S., Biochemical Corp.), а также,



"labelon" матриц с двухспиральной ДНК (labelon double stranded templates), приготовленных по методу, указанному в руководстве к деаза-Г набору. Неправильно терминированные фрагменты, которые способны продуцировать перекрестные образования, были удалены реакций с концевой деоксинуклеотидил-трансферазой (Promega) [5]. Пирофосфатаза, приложенная к деаза-Г набору была добавлена во все реакции, проводимые по секвенированию, для минимизации пирофосфотолита, и являлась особенно важным компонентом в реакции расширенной терминации с деоксинуклеотидилтрансферазой.

*Аналитические и другие методы.* Измерения флуоресценции были проведены с использованием самокорректирующегося спектрофлуориметра Hitachi F-4010. Все спектрофотометрические измерения были выполнены с использованием спектрофотометра Kontrol Uvikon 810. Аминокислотный анализ был проведен в Protein Structure Laboratory, University of California, Davis.

Как спектрофотометрические, так и полярографические измерения активности фермента были выполнены в 50 мМ натрий фосфатном буфере, pH 7,2, при 30° C, по начальным скоростям реакции. Стандартные измерения проводили при концентрации бензиламина 2 мМ и регистрировали либо увеличение поглощения при 250 нм (спектрофотометрический метод), либо поглощение кислорода (полярографический метод). Из-за присутствия каталазы в гомогенате клеток *E. coli* скорость реакции, определенная полярографическим методом, составляла только половину от скорости, определенной спектрофотометрическим методом. Однако после очистки фермента на фенил-сефарозе, оба метода давали идентичные результаты. Во всех экспериментах, направленных на исследование субстратной специфичности, концентрацию субстрата варьировали в широком диапазоне (от 25 до 500 раз). Кинетические параметры были рассчитаны по экспериментальным данным с использованием программы Enzfitter. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорд [6].

*Реагенты и реактивы.* Если специально не оговорено, все субстраты и ингибиторы, используемые в работе, были либо получены, как описано ранее [7-10], либо высшей степени чистоты, доступной из коммерческих компаний Sigma и Calbiochem. N-Метил-стирилпиридиниевые производные были любезно предоставлены д-ром S.M.N.Efange, University of Minnesota.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** *Выделение и молекулярные свойства.* Первоначально была сделана попытка следовать методу опубликованному для выделения моноаминоксидазы N из *A. niger* [1], так как процедура выделения фермента, экспрессированного в *E. coli*, опубликована не была. Авторы ссылались на то, что для выделения экспрессированного фермента использовалась аналогичная методика [2]. Однако попытка воспроизвести опубликованную методику не привела к получению очищенного препарата фермента. Вероятно, одной из причин неудачи послужило то, что условия элюции на моно-Q колонке не были приведены в исходной статье, к тому же, у нас были трудности в воспроизведении опубликованных результатов также и на более ранних этапах выделения фермента. Более серьезной проблемой оказалась неопределенность в данных по специфической активности, приведенных для очищенного фермента. Так, например, в таблице 2 [1] приведено значение специфической активности 70330 мкмоль окисленного бензиламина/мин/мг белка, что необычайно высоко для флавин-содержащих ферментов. В то же время, в таблице 3 той же статьи опубликовано значение числа оборотов 199, что соответствует значению специфической активности 215. Даже эта существенно меньшая величина завышена примерно на порядок, поскольку согласно нашим данным, значение специфической активности для гомогенного препарата MAO N, экспрессированного в *E. coli* и определенное в аналогичных условиях, равно 25-27.

Специфическая активность фермента в клеточном экстракте *E. coli* находится в пределах 0,12-0,14 ед/мг. Таким образом, степень очистки фермента с использованием нашего метода равна  $200 \pm 15$ . Выход фермента, вероятно, может быть увеличен, если оптимизировать условия роста клеток. По данным электрофоретического анализа препарат фермента содержал следовые количества примесей после очистки на Моно-Q колонке (Рис.2). В качестве последующей стадии определения чистоты препарата, образец фермента, содержащий белок в концентрации 6 мг/мл, был подвергнут аминокислотному анализу и анализу на содержание флавина. Согласно результатам анализа концентрация белка, определенная в данном образце,  $108 \pm 10$  наномолей/мл образца, находится в хорошем согласии с концентрацией флавина,  $113 \pm 6$  наномолей/мл образца.

После ДЕАЕ хроматографии фермент может храниться при  $-10^\circ \text{C}$  в 50 % глицерине без потери активности. На более поздних стадиях очистки фермент хранили при  $-80^\circ \text{C}$ . Исследования стабильности фермента в различных интервалах pH проводили при  $20^\circ \text{C}$  с

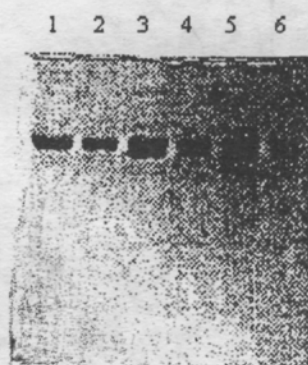


Рис 2. Электрофорез моноаминоксидазы N в SDS/полиакриламидном геле. Различные образцы MAO N фракционировали через 10% полиакриламидный гель. Дорожки 5 и 6 - образец MAO N после ДЕАЕ хроматографии, дорожки 3 и 4 - образец основной фракции после хроматографии на фенилсефарозе, дорожки 1 и 2 - образец основной фракции после моно-Q хроматографии.

использованием высокоочищенного фермента после стадии Моно-Q. MAO N инкубировали в течение 10 мин в буфере с заданным значением pH с последующим измерением остаточной активности образца при pH 7,2. В условиях эксперимента фермент был стабилен в интервале pH между 6,0 и 8,5. При значениях pH ниже 5,5 наблюдалось умеренное падение активности, в то время как при значениях pH выше 9,0 потеря активности была существенной. При pH 7,2 и концентрации белка 2,8 мг/мл фермент мог храниться без потери активности при  $0^\circ \text{C}$  в течение 4 часов. Добавление сывороточного альбумина не только не приводило к стабилизации белка, а напротив, вызывало прогрессивную инактивацию фермента.

**Кристаллизация.** Наиболее высокоочищенная фракция моноаминоксидазы N после Моно-Q хроматографии была закристаллизована д-ром Е. Саблиной (Molecular Structure Group, Department of Biophysics and Biochemistry, UCSF). Результаты по кристаллографическому анализу третичной структуры фермента будут представлены в последующей публикации.

**Флавиновый кофактор.** Природа флавинового кофактора моноаминоксидазы N не была исследована ранее. Анализ данных по флуоресценции кофактора, выделенного из высокоочищенного препарата фермента, померенных до и после кислотного гидролиза [11],

позволил установить, что кофактором является FAD. Коэффициент молярного поглощения флавинового кофермента равен  $10500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  в пересчете на субъединицу фермента, 55.6 кДа. Значительно меньшее значение 6500 в статье, опубликованной ранее [1], явно ошибочно и свидетельствует о том, что препарат фермента, использованный в данной работе, содержал значительное количество примесей.

На рис. 3 представлены спектры моноаминоксидазы N в процессе восстановления фермента в анаэробных условиях. Спектр 1 соответствует спектру окисленного фермента, спектр 2 является спектром анионного семихинона флавина полученного после добавления 1 электрон-эквивалента дитионита, и спектр 3 соответствует спектру полностью восстановленного фермента после добавления избытка дитионита. Таким образом, моноаминоксидаза N является классической флавин-содержащей оксидоредуктазой, в которой анионная форма полувосстановленного флавинового кофактора может быть получена в устойчивой форме, и, в соответствии с этим, фермент ингибируется сульфитом, к которому проявляет высокое сродство.

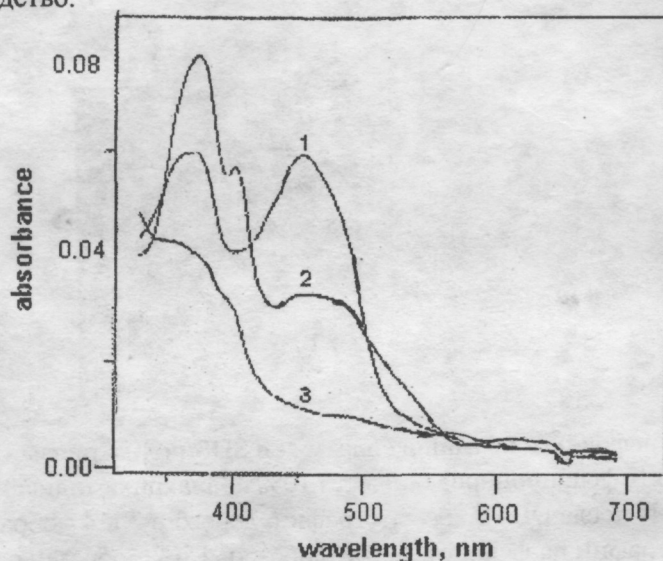


Рис. 3. Спектры окисленной (1), частично (одноэлектронно) восстановленной (2) и полностью восстановленной (3) MAO N в 50 mM NaPi, pH 7.2. Концентрация фермента - 4,6 мкМ. Одноэлектронное восстановление фермента генерировали добавлением одного эквивалента стандартизованного раствора дитионита в анаэробных условиях, а полностью восстановленный фермент получали при добавлении избытка дитионита натрия.

Нами была сделана также попытка обратимо удалить флавиновый кофактор. Процедура приготовления апофермента включала равновесный диализ против 2 М раствора бромид калия при 0°C в присутствии и в отсутствие ДТТ в течение 10 часов. Однако последующая инкубация апофермента с FAD привела к восстановлению менее чем 15 % изначальной ферментативной активности. Другие методы, такие как обработка хлоридом кальция, обработка 5 М гуанидином, а также гель-фильтрация восстановленного фермента, привели к необратимому удалению флавинового кофактора.

*Направленный мутагенез в MAO N.* В таблице 1 приведено сравнение первичных последовательностей в области флавин-связывающего участка для шести моноаминоксидаз



Таблица 1. Сравнение первичной последовательности моноаминоксидаз в области связывания флавина

			↓ Fl	
MGFILARKADRLAKLHKEIRKKKICELYAKVLGSQEALHPVHYEEK	----	NWCEEQYSGGCYTAYFP-PGIMTQYGRVI		MAO A человека
MGFILARKADRQAKLHKDIRKRKICELYAKVLGSQEALYPVHYEEK	----	NWCEEQYSGGCYTAYFP-PGIMTQYGRVI		MAO A крысы
MGFILARKADRLAKVHKDIRKRKICERYAKVLGSQEALHPVHYEEK	----	NWCQEYSGGCYTAYFP-PGIMTQYGRVI		MAO A быка
MGFILAHKARKLARLTKEERLKKLCELYAKVLGSLEALEPVHYEEK	----	NWCEEQYSGGCYTAYFP-PGILTQYGRVL		MAO B человека
MGFILAHKARKLVRLTKEERLRKLCELYAKVLNSQEALQPVHYEEK	----	NWCEEQYSGGCYTAYFP-PGILTQYGRVL		MAO B крысы
MGFILARKCRKLCGLTKEERKKRICEIYSRVLGSEEALHPVHYEEK	----	NWCCEEYSGGCYTAYFP-PGILTQYGRVL		MAO фореи
VCF-----GTDANHIQPDDEDVRE-----TLKAVGQLAPGTFGVKRLVFHNWVKDEFAKGAW--FFSRPGMVSECLQGL				MAO-N <i>A. niger</i>
с *	с с с	* с * * с *	** с с с с * а	с * с ** с с с с с с с

Стрелкой указан аминокислотный остаток (цистеин), с которым ковалентно связан флавин (за исключением MAO N). Звездочками и точками указаны идентичные и консервативные аминокислотные остатки, соответственно.

из животных организмов и моноаминоксидазы N. Очевидно, что последовательность, первоначально определенная для бычьей моноаминоксидазы B [3], является консервативной для всех MAO из животных организмов и существенно отличается для MAO-N. Интересным является вопрос о том, как повлияет замена аминокислот на данном участке последовательности моноаминоксидазы N на связывание FAD, в частности, замена аланина на цистеин в положении 429, с которым ковалентно связан кофактор у животных моноаминоксидаз. Кодон, кодирующий аланин (GCG), в структурном гене *for* моноаминоксидазы N был заменен на TGC, кодирующий цистеин, как описано в разделе "Методика". В процессе определения последовательности в мутантном фрагменте было замечено, что существует ряд различий в последовательности данного фрагмента по сравнению с опубликованной последовательностью для MAO N ([2] Genbank L38858). Данные различия были также обнаружены в этом фрагменте до проведения мутагенеза. Так, вместо опубликованного A в положении 1043 был обнаружен T, вместо C в положении 1349 -G, вместо C (1351) - G и вместо T (1357) - G. (Следует отметить, что данные позиции относятся структурной последовательности гена, после удаления интронов, так что в позиции 1 находится A, кодирующий начальный метионин). Следовательно, аминокислотными остатками в положениях 348 и 450 являются метионин и глицин, а не лизин и аргинин.

Мутантный фермент, экспрессированный в *E. coli*, был очищен согласно процедуре, описанной в разделе "Методика". Специфическая активность и содержание флавина были определены после каждой стадии очистки. Согласно нашим данным, замещение аланина на цистеин в MAO-N не приводит к ковалентному связыванию FAD кофактора к ферменту. Предварительные результаты показали, что мутантный фермент имеет более низкое значение каталитической константы скорости реакции, по сравнению с природным белком.

**Кинетические свойства.** В процессе исследования субстратной специфичности моноаминоксидазы N концентрация аминов была варьирована в широком диапазоне для того, чтобы определить вероятные случаи двухфазной кинетики наблюдаемой для MAO-A [8-9]. Причина проявления двухфазной кинетики, наблюдаемой для многих субстратов MAO A (но не характерной для MAO B) заключается в том, что субстрат может образовывать комплекс не только с окисленной, но и с восстановленной формой фермента. В зависимости от соотношения сродства субстрата к обеим формам фермента может происходить изменение скорости-лимитирующей стадии при изменении концентрации субстрата. Подробный анализ причин наблюдаемой двухфазной кинетики опубликован нами ранее [8].

Окисление большинства производных МРТР протекало по типу двухфазной кинетики, в то время как кинетика окисления первичных и вторичных аминов подчинялась уравнению Михаэлиса-Ментен (Табл.2). Типичный случай двухфазной кинетики представлен на рис. 4 на примере окисления *цис*-1-метил-4-(*о*-Br-фенилэтинил)-1,2,3,6-тетрагидропиридина моноаминоксидазой N.

Важным фактором в оценке каталитических свойств моноаминоксидаз является взаимодействие фермента с кислородом. В случае MAO-A, константа Михаэлиса для кислорода в присутствии подавляющего большинства субстратов значительно ниже, по сравнению с концентрацией кислорода в водном растворе [12]. Поэтому флуктуации в концентрации кислорода не оказывают существенного влияния на кинетику реакций, катализируемых моноаминоксидазой A. В случае моноаминоксидазы B, значение  $K_m$  для кислорода в присутствии многих субстратов сравнимо или даже выше по сравнению с концентрацией кислорода в водном растворе. Таким образом, реакции, катализируемые моноаминоксидазой B, чувствительны к флуктуациям в концентрации растворенного кислорода [12-14].

Table 2 Сравнение субстратной специфичности моноаминоксидаз N, A, и B

Субстрат	MAO N <i>Aspergillus</i>			MAO A (человеческая)			MAO B (печень быка)	
	Km1 mM	Km2 mM	TN	Km1 mM	Km2 mM	TN	Km mM	TN
Бензиламин	0.30		1,400	0.9 <sup>b</sup>		1.2 <sup>b</sup>	0.36 <sup>b</sup>	600 <sup>b</sup>
Фенилэтиламин	1.63		940	0.50 <sup>b</sup>		45 <sup>b</sup>	0.067 <sup>b</sup>	217 <sup>b</sup>
(атм. давление)								
Кинурамин			0	0.15 <sup>b</sup>		159 <sup>b</sup>	0.084 <sup>b</sup>	165 <sup>b</sup>
n-Пропиламин			326					
n-Бутиламин	0.51		2,230					
n-Амиламин	0.25		4,900					
n-Гексиламин	0.33		4,790					
n-Гептиламин	0.046		3,180					
Адреналин			~ 0	3.0 <sup>a</sup>		92 <sup>a</sup>	~ 0	
Норадреналин			~ 0	3.3 <sup>a</sup>		92 <sup>a</sup>	~ 0	
Дофамин			~ 0					
Серотонин			0	0.40		168	0.28	4.6
Тирамин				0.07 <sup>a</sup>		157 <sup>a</sup>		
MPTP	0.033	1.2	2,730*	0.08	9.8	86	0.39	204
2'-метил-MPTP	0.29		168	0.044	4.4	220	0.28	357
2'-этил-MPTP	0.54		56	0.06	3.2	197	0.77	227
3'-Cl-MPTP	0.125		1,120	0.043	99	1120	0.19	215
3'-метил-MPTP	0.39		1,690	0.057	12.7	159	0.20	130
3'-CF <sub>3</sub> -MPTP	0.19		1,270	0.23		49	0.36	185
2'-CF <sub>3</sub> -MPTP			~ 0	0.23		42	0.20	104
4-BZ-TP	0.0064	2.3	2790*	0.17		17	0.083	222
o-MeO-THS,cis	0.02	0.64	154*	0.025	0.49	37	0.27	25
o-MeO-THS,trans	0.03	1.83	151*	0.029	0.48	31	2.1	33
o-Br-THS,cis	0.011	4.12	69*	0.01	0.28	27	0.28	30
o-Br-THS,trans	0.0015	0.13	122*	0.009	0.23	11	0.12	74
p-Br-THS,cis	0.018	7.0	6.9*	0.005	0.30	5	0.11	98
p-Br-THS,trans	0.0022	0.622	580*	0.003	0.38	20	0.41	40
нафтил-THS,cis	0.016	0.82	15*	0.13	0.22	31	0.39	19
нафтил-THS,trans	0.011	1.40	78*	0.15	0.24	31	0.63	13
p-MeO-THS,trans	0.016	0.51	90*	0.01	0.42	20	0.32	20
p-F-THS,trans	0.0089	0.92	427*	0.005	0.30	47	0.60	83

\*сумма  $K_{cat1}$  и  $K_{cat2}$ . Число оборотов при pH 7.2, 30°C, на моль субъединицы флавопротеина в минуту. <sup>a</sup>Из Zeller и др. (1979). <sup>b</sup>Из Tan and Ramsay (1993).

Рис. 5 иллюстрирует влияние различных концентраций кислорода на наблюдаемую скорость окисления 2-фенилэтиламина моноаминоксидазой B. Константа Михаэлиса для кислорода определенная в условиях эксперимента составила 0,7 mM в растворе, насыщенном атмосферным кислородом. Скорость окисления субстрата в стационарных условиях возросла в 4,5 раз при насыщении раствора в атмосфере кислорода. Подобное наблюдалось также в случае окисления бензиламина и MPTP. Таким образом, в отношении кислорода MAO-N проявляет большую аналогию с MAO-B, а не с MAO-A.

В таблице 2 приведено сравнение субстратной специфичности MAO-N со специфичностью MAO-A человека и MAO-B из печени быка. Очевидно, что алифатические



амины, имеющие умеренную длину углеводородной цепи, являются существенно лучшими субстратами для MAO-N. Так, для MAO-N, значения каталитической константы скорости

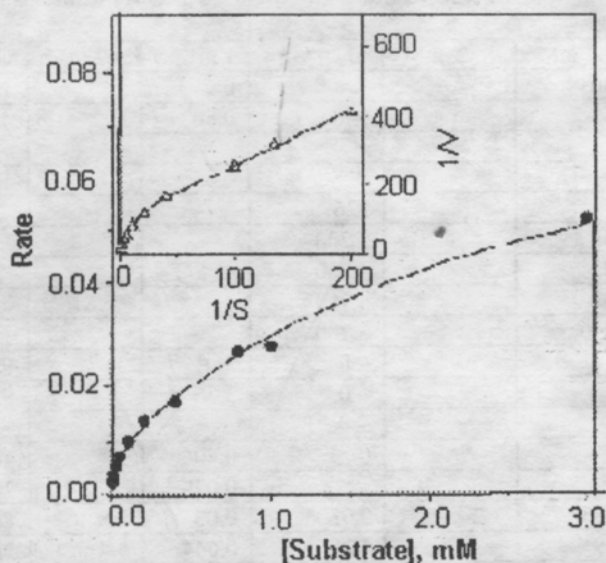


Рис. 4. Стационарная кинетика окисления *cis*-*o*-Br-MTHS моноаминоксидазой N. Появление продукта - 2,3-дигидропиридиния, - регистрировали спектрофотометрически при 350 нм. Среда определения содержала 50 mM фосфат натрия, pH 7.2, уравновешенный на воздухе при 30°C, концентрация фермента - 30 нМ. Реакцию начинали добавлением субстрата. Скорость реакции выражена в условных единицах

окисления аминов с длиной цепи 4-7 углеродных атомов более чем на порядок выше, по сравнению с наибольшим значением опубликованным для MAO-B и в полтора раза выше, по сравнению с MAO-A. Если сравнивать отношение параметров  $k_{cat}/K_m$ , эффективность катализа моноаминоксидазой N становится еще более ярко выраженной. В случае MAO-N величина этого отношения составляет 69100, 19600 и 14500 для гептиламина, амиламина и гексиламина, соответственно, в то время, как наибольшее опубликованное значение этого отношения для MAO-A составляет 238 в случае катализа окисления *цис*-1-метил-4- (*o*-Br-фенил-этинил)-1,2,3,6-тетрагидропиридина [9]. Наибольшее значение отношения  $k_{cat}/K_m$ , наблюдаемое для моноаминоксидазой B в растворе, насыщенном атмосферным кислородом, составляет 3239 и 2675, соответственно (Табл. 2).

При сравнении субстратной специфичности моноаминоксидазы N становится очевидным, что в некоторых отношениях фермент проявляет сходство с MAO-A, в других отношениях - с MAO-B, а некоторые свойства являются уникальными. Так, MAO-N, подобно MAO-A, демонстрирует двухфазную кинетику при окислении МРТР и ряда его аналогов, причем предпочтительными субстратами являются 3'-замещенные производные. С другой стороны, в отличие от MAO-A, фермент не катализирует окисление биогенных аминов. Несмотря на то, что Schilling and Lerch [1] опубликовали, что норадреналин, серотонин и дофамин являются относительно хорошими субстратами для MAO-N, эти данные не нашли подтверждения в наших исследованиях. На основании того факта, что значение коэффициента молярного поглощения при 455 нм, опубликованного данными авторами, было достаточно низким, очевидно, что препарат фермента, используемый авторами, содержал примеси. Следовательно, вполне вероятно, что активность фермента в отношении биогенных аминов была обусловлена примесными компонентами. Сходство MAO-N с

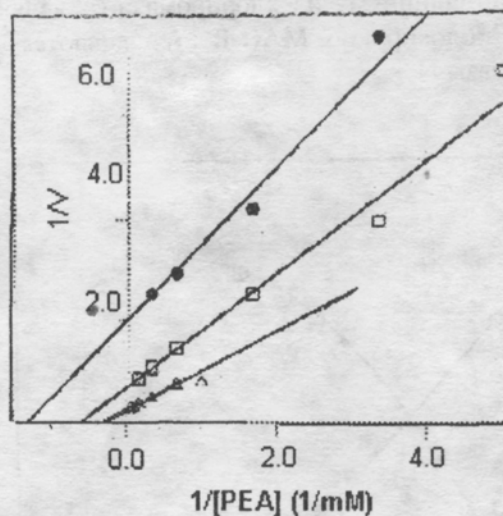


Рис. 5. Влияние различных концентраций кислорода на окисление 2-фенилэтиламина моноаминоксидазой N. Концентрация кислорода была 0,055 mM (●), 0,24 mM (насыщение воздухом) (Δ), и 0,86 mM (□). Концентрации меньше и больше, чем в воздухе получали продуванием буфера азотом или кислородом, соответственно. Буферный раствор, содержащий требуемые концентрации кислорода и субстрата, помещали в полярографическую ячейку с электродом Кларка и уравнивали 5 мин при 30°C. Тонкое доведение концентрации кислорода достигалось продуванием азотом или кислородом по поверхности реакционной смеси. Ячейку закрывали силиконовым колпачком, реакцию начинали добавлением 5 мкл MAO N, и регистрировали потреблением кислорода.

моноаминоксидазой В включает высокие скорости катализа окисления некоторых алифатических аминов, бензиламина, фенилэтиламина, МРТР, и в особенности, 1-метил-4-бензилтетрагидро-пиридина, незначительную скорость катализа окисления большинства биогенных аминов, а также увеличение скорости катализа при более высокой концентрации кислорода. Влияние pH на катализ моноаминоксидазой N. Рис. 6 иллюстрирует влияние pH на кинетические параметры окисления бензиламина моноаминоксидазой N. Максимальная активность при 30°C наблюдалась в интервале pH между 8,2-8,8. Функция константы Михаэлиса уменьшалась линейно в интервале pH от 5,8 до 7,8 с наклоном -1, что свидетельствует о важности участия одной ионогенной группы в связывании субстрата. Вероятно, что данной группой является тиол активного центра фермента. Возрастание функции  $K_m$  в интервале pH выше 8,8 вероятно связано с уменьшением стабильности белка в этой области pH.

*Действие обратимых ингибиторов.* В то время, как данные в таблице 2 свидетельствуют о том, что свойства MAO-N проявляют схожесть со свойствами обеих форм животных моноаминоксидаз, А и В, данные представленные в таблице 3 говорят о том, что MAO-N проявляет большую аналогию с MAO-A, чем с MAO-B. Так, влияние аналогов MPP<sup>+</sup> на активность моноаминоксидазы N аналогично их действию на MAO-A, за исключением самого MPP<sup>+</sup>, который не является достаточно эффективным ингибитором MAO-N и ингибирует этот фермент с такой же эффективностью, как MAO-B. Три производных 1-метилстирилпиридиния являются превосходными конкурентными ингибиторами моноаминоксидаз А и N, однако, не проявляют ингибиторных свойств по отношению к

МАО-В. Гармин, 2-метилгармалиниум и хлорпромазин, являющиеся классическими ингибиторами МАО-А, не блокируют МАО-В и являются также эффективными ингибиторами моноаминоксидазы N.

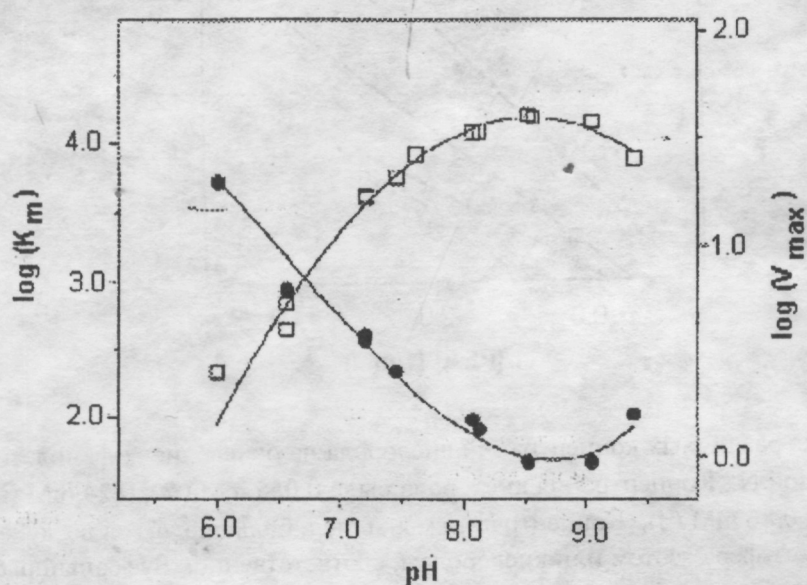


Рис. 6. Влияние pH на кинетические параметры окисления бензиламина катализируемого МАО N. Скорости окисления различных концентраций бензиламина МАО N измеряли в буферном растворе, содержащем 50 мМ уксусной кислоты, монофосфат натрия и борную кислоту, доводя необходимое значение pH NaOH. Буферный раствор (0,99 мл), содержащий МАО N (30 нМ) преинкубировали 5 мин. при 30 °С, реакцию начинали добавлением 10 мкл субстрата для достижения требуемой концентрации в кювете. Реакцию регистрировали спектрофотометрически при 250 нм по накоплению бензальдегида.

Недавно мы опубликовали данные о необычном поведении соединений ряда оксадиазолон и оксадиазатион в отношении моноаминоксидаз [15]. Данные соединения конкурентно ингибируют МАО-В из печени крысы в их наномолярной концентрации и ниже, однако, значения их констант ингибирования для фермента формы В из печени быка находятся в микромолярном интервале. Из шести соединений, которые мы исследовали ранее, только одно проявило ингибиторные свойства в отношении МАО-N (последняя строка в таблице 3). Все остальные соединения не имеют никакого эффекта на МАО-N, что снова совпадает со свойствами моноаминоксидазы А.

Действие необратимых ингибиторов. В 1976 году были опубликованы данные, из которых следовало, что взаимодействие производных пропаргиламина, таких как паргиллин, депренил и хлоргиллин, с моноаминоксидазами приводит к необратимой инактивации фермента с образованием аддукта в положении N5 атома ковалентно-связанного кофактора AD [16]. Хорошо установлено, что хлоргиллин является избирательным ингибитором моноаминоксидазы А и блокирует МАО-В только в области его высоких концентраций, в то время как (-)-депренил обладает обратной избирательностью. Все вышеперечисленные производные пропаргиламина ингибируют МАО-N в области их низких концентраций с образованием аддукта, который имеет максимум поглощения при 412 нм, что свидетельствует об образовании флавоцианина, упомянутого ранее.



Нами были продолжены исследования необратимой инактивации фермента хлоргилином и депренилом с тем, чтобы получить количественные характеристики этого процесса. Как показано на рис.7, и хлоргилин, и депренил связываются с МАО-N в соотношении 1:1 при инкубации с ферментом в течение времени, достаточного для протекания необратимой фазы инактивации. Однако сравнение скоростей инактивации показало, что реакция фермента с хлоргилином приблизительно в пять раз быстрее. Таким образом, последний факт также свидетельствует о том, что МАО-N более аналогична моноаминоксидазе А, а не МАО-В. Мы также исследовали взаимодействие транс-фенилциклопропиламина с МАО-N. Как и в случае с МАО В [17-18] инактивация начиналась с быстрой, обратимой реакции ( $K_i = 150$  нМ при  $30^\circ\text{C}$ ), постепенно переходя в необратимую. Зависимая от времени инактивация МАО-N оказывается более сложной, чем МАО-В.

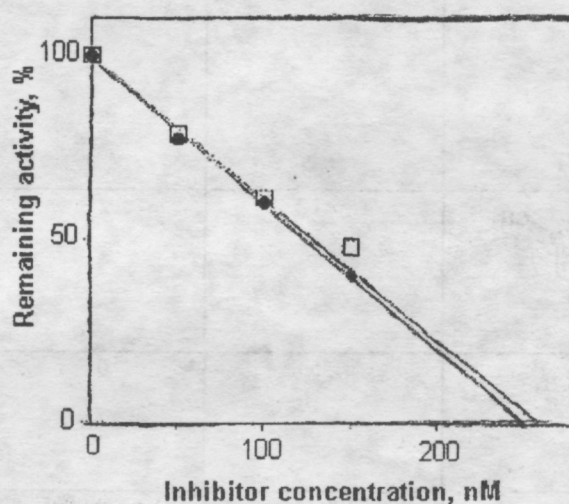
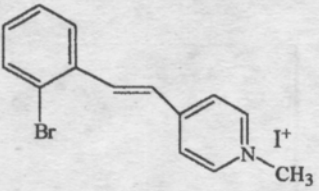

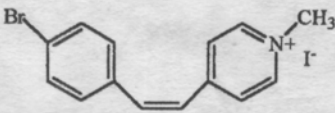
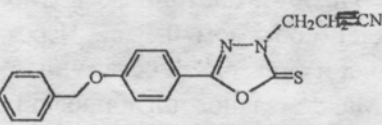
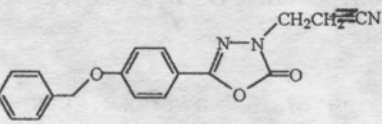


Рис. 7. Инактивация МАО N хлоргилином и (-)-депренилом. МАО N (220 нМ) преинкубировали с хлоргилином (●) или (-)-депренилом (○) в 50 мМ натрий фосфатном буфере, pH 7,2, при комнатной температуре в растворе общим объемом 0,1 мл. Через различные промежутки времени отбирали аликвоты 10 мкл и определяли остаточную активность фермента в присутствии 2 мМ бензиламина. Максимальное ингибирование хлоргилином наблюдали через 4 часа, а депренилом - через 20 часов. Остаточную активность корректировали на потерю активности определяемой в контрольном образце, который инкубировали без ингибитора.

**ОБСУЖДЕНИЕ.** Данные, приведенные нами в этой статье, а также сравнение первичной последовательности МАО-N с моноаминоксидазами животных, которое выявило несколько высоко консервативных участков, свидетельствуют в пользу предположения [1] о том, что фермент из гриба является эволюционным предшественником обеих форм моноаминоксидазы А и В. Данные, представленные в таблицах 2 и 3, указывают на большую аналогию с формой А фермента. Хотя как депренил, высокоизбирательный ингибитор формы В, так и хлоргилин, высокоизбирательный ингибитор формы А, вызывают полную инактивацию МАО-N и связываются с ферментом в эквимольном соотношении, скорость реакции с хлоргилином почти на порядок выше, чем скорость реакции фермента с депренилом.

Table 3. Обратимые ингибиторы MAO

Ингибитор	Ki (μM)		
	MAO N	MAO A	MAO B
MPP <sup>+</sup>	230	3.0	230
2'-этил- MPP <sup>+</sup>	65	4.0	>100
2'-Cl- MPP <sup>+</sup>	114	1.6	-
3'-метил- MPP <sup>+</sup>	18	1.5	206
3'-F- MPP <sup>+</sup>	0.38	10	-
4'-n-пропил- MPP <sup>+</sup>	3.0	0.2	100
4'-t-бутил- MPP <sup>+</sup>	3.8	0.32	35
4'-n-пентил- MPP <sup>+</sup>	1.4	0.13	43
4'-n-децил- MPP <sup>+</sup>	3.8	3.1	51
	5.0	0.53	0
	1.1	2.3	0
	35	0.5	0
Гармин	1003	0.0005	0
2- Метилгармалиниум	37	0.14	0
Хлорпромазин	10	50	1000
	0	~ 0	0.0008 (человек)
	8.3 (IC <sub>50</sub> )	~ 0	0.0011(человек)

Нуль в таблице означает отсутствие ингибирования

Наибольшее отличие фермента из гриба, по сравнению с животными моноаминоксидазами, заключается в наличие нековалентно связанного кофактора FAD, в полном соответствии с фактом о том, что консервативный участок, содержащий пентапептид, к которому присоединен кофермент в MAO A и B [3], отсутствует в MAO-N. Хотя замещение аланина на цистеин (в положении, к которому ковалентно пришит FAD, в случае MAO A и B) методами направленного мутагенеза не привело к образованию MAO-N с

ковалентно связанным флавином, мутантный фермент оставался каталитически активным. Мы планируем продолжить работы по направленному мутагенезу с тем, чтобы выявить структурные закономерности, требуемые для формирования ковалентно связанного кофактора. В этой связи интересно отметить, что ковалентное связывание кофактора FAD не является необходимым фактором для образования флавоцианинового аддукта при взаимодействии фермента с производными пропаргиламина, что подтверждается формированием характеристической полосы поглощения при 412 нм в процессе инактивации.

Некоторым разочарованием в наших исследованиях до настоящего времени является проблема получения апофермента моноаминоксидазы N, который мог бы быть реконструирован в активный фермент при инкубации с FAD. Это открыло бы возможность для исследования свойств MAO-N при замещении природного кофактора на производные рибофлавина. Проблема заключалась в том, что даже в мягких условиях фермент подвергался необратимой инактивации при удалении FAD, что свидетельствует о том, что кофактор участвует в стабилизации структуры фермента. Мы планируем продолжить наши усилия в решении данной проблемы с использованием методов, позволяющих стабилизировать апофермент.

Главным направлением в нашей работе остается определение третичной структуры MAO-N. Решение этой задачи значительно облегчит разрешению вопросов, связанных с катализом и субстратной специфичностью моноаминоксидаз, в значительной степени будет способствовать работам в области создания новых ингибиторов фермента для нужд медицины, и в меньшей степени облегчит работы по определению третичной структуры моноаминоксидаз A и B человека.

Исследования проведены при финансовой поддержке из фондов The Department of Veteran Affairs.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Schilling, B., and Lerch, K. *Biochim. Biophys. Acta* (1995 a) 1243: 559 -537.
2. Schilling, B. and Lerch, K. *Mol. Gen. Genet.* (1995 b) 247 : 430 -438.
3. Kearney, E.B., Salach, J.I., Walker, W.H., Seng, R.L., Kenney, W., Zeszotek, E., and Singer, T.P. *Eur.J.Biochem.* (1971) 24: 321-327.
4. Deng, W.P. and Nickoloff, J.A., *Anal. Biochem.* (1992) 200: 81-88.
5. Li, M. and Schweizer, H.P. (1993) in *Focus*, Cupo, D. ed., vol. 15, pp.19-20, Life Technologies Inc., Gaithersburg, Md.
6. Bradford, M. M., *Anal. Biochem.* (1976) 72: 248-254.
7. Youngster, S.K., McKeown, K.A., Jin, Y.-Z., Ramsay, R.R., Heikkila, R. E., and Singer, T.P. *J. Neurochem.* (1989) 53 : 1837 -1842.
8. Ramsay, R.R., Sablin, S.O., Bachurin, S.O., and Singer, T.P. *Biochemistry* (1993) 32 : 9025-9030.
9. Sablin, S.O., Krueger, M.J., Singer, T.P., Bachurin, S.O., Khare, A.B., Efange, S.M.N., and Tkachenko, S.E. *J. Med. Chem.* (1994) 37 : 151 -157.
10. Kim, H., Sablin, S.O., and Ramsay, R.R., *Arch. Biochem. Biophys.* (1997) 337: 137-142.
11. Burch H.B. (1957) *Methods Enzymol*, 3, 960-962
12. Ramsay, R.R. and Singer, T.P. *Biochem. Soc. Trans.* (1991) 19: 219-223.



13. Walker, M.C. and Edmonson, D. *Biochemistry* (1994) 33 : 7088 -7098.
14. Husain, M., Edmonson, D., and Singer, T.P., *Biochemistry* (1982) 21: 595-600.
15. Krueger, M., Mazouz, F., Ramsay, R.R., Milcent, R., and Singer, T.P., *Biochem. Biophys. Res. Comms.*(1995) 206 : 556-562.
16. Maycock, A.L., Abeles, R.H., Salach, J.I., and Singer, T.P., *Biochemistry* (1976) 15 : 115-126.
17. McEwen, C.M., Sasaki, G., and Jones, D.C. *Biochemistry* (1969) 8: 3963 - 3972.
18. Paech, C., Salach, J.I., and Singer, T.P. *J. Biol. Chem.* (1980) 255: 2700 -2704.

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN EVOLUTIONARY PRECURSOR OF HUMAN MAO A AND B

THOMAS P. SINGER<sup>\*H#</sup>, VICTORIA YANKOVSKAYA<sup>\*H</sup>, SUZANNE BERNARD<sup>\*H</sup>, CIARAN CRONIN<sup>\*H</sup>, AND SERGEY O. SABLIN<sup>\*H</sup>

<sup>\*</sup>Department of Biochemistry and Biophysics and <sup>#</sup>Biopharmaceutical Sciences, University of California San Francisco, CA 94121, USA and <sup>H</sup>Molecular Biology Division, Department of Veterans Affairs Medical Center, San Francisco, CA 94121, USA

An interesting flavoprotein-type monoamine oxidase (MAO) was recently isolated from *Aspergillus niger* and cloned by Schilling and Lerch (1995a,b) The properties of this MAO, as well as a substantial part of its amino acid sequence resemble those of both MAO A and B from higher animals, raising the possibility that it may be an evolutionary precursor of these mitochondrial enzymes. It differs from MAO A and B in several respects, however, including the fact that it is soluble and of peroxisomal localization and that the FAD is non-covalently attached.

We have overexpressed the fungal enzyme (MAO-N) in *Escherichia coli*, isolated it for the first time in pure form, and, in collaboration with Dr. Elena Sablin, crystallized it. Since several of the observations of previous workers on MAO-N could not be reproduced and seem to be erroneous, we have reexamined its, substrate specificity, interaction with reversible and irreversible inhibitors and other catalytic and molecular properties. MAO-N has a considerably higher turnover number on many aliphatic and aromatic amines than either form of the mammalian enzyme. Some aspects of the substrate specificity resemble those of MAO B, while others are similar to MAO A, including biphasic kinetics in double reciprocal plots. Contrary to the report of Schilling and Lerch (1995a), however, the fungal enzyme does not oxidize serotonin, norepinephrine, dopamine or other biogenic amines. MAO-N is irreversibly inhibited by stoichiometric amounts of both (-)deprenyl and clorgyline in a mechanism-based reaction, forming flavocyanine adducts with N(5) of the FAD, like the mammalian enzymes, but inactivation is much faster with clorgyline than deprenyl, suggesting again a closer resemblance to MAO A than B. The dissociation constants for a large number of reversible competitive inhibitors have been determined for MAO-N and comparison with similar values for MAO A and B again pointed to a much greater similarity to the former than the latter. Experiments designed to change the linkage of the FAD to covalent form by site-directed mutagenesis and to dissociate

**Key Words:** monoamine oxidase N, purification, expression, molecular properties, site-directed mutagenesis