

АННОТАЦИЯ

*научно-квалификационной работы Бакуновой Алины Константиновны на тему
«Взаимосвязь структуры и функции трансаминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis*»*

(06.06.01 Биологические науки, 1.5.4 Биохимия)

В данной работе представлена структурно-функциональная характеристика новой трансаминазы IV типа укладки пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-связывающего домена – трансаминазы D-аминокислот (DATA) из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy) в рекомбинантной форме. Фермент принадлежит к малоизученной группе неканонических трансаминаз D-аминокислот, которые отличаются от канонических организацией субстрат-связывающего сайта. TA_Halhy строго специфична к D-аминокислотам и характеризуется одной из наибольших каталитических констант среди известных DATA. Анализ полуреакций TA_Halhy с D-аминокислотами позволил выделить элементарные стадии процесса: образование внешнего альдимины, 1-3 перенос протона; и предположить согласованный механизм 1-3 переноса протона без образования хиноидного интермедиата.

Методом рентгеноструктурного анализа получены пространственные структуры TA_Halhy и ее варианта R90I в холоформе и с ингибиторами D-цикloserином и фенилгидразином, что позволило провести детальный структурный анализ TA_Halhy. Установлено, что в активном центре TA_Halhy связывание субстратов регулируется тремя остатками аргинина и оста-ком лизина, два остатка, R28* и R90, являются консервативными в группе неканонических DATA, третий, R179, встречается только у двух представителей семейства DATA. Особенности устройства активного центра и взаимосвязь структуры и функции TA_Halhy были проанализированы кинетическими и спектральными методами, включая спектрофотометрию, КД спектроскопию и спектрофлуориметрию, методами точечного мутагенеза и кристаллографии. По результатам анализа показана многофункциональность консервативных остатков аргининов. Помимо связывания субстратов остатки R28* и R90 стабилизируют кофактор, а также функциональный димер. Остаток R179 участвует только в связывании α -карбоксильной группы субстрата.

Изменение субстратной специфичности TA на сегодняшний день остается сложной задачей, несмотря на значительный прогресс в методах белковой инженерии. В ходе работы был получен вариант TA_Halhy с одиночной аминокислотной заменой R90I активный в реакциях с природными субстратами D-аминокислотами, а также с субстратами без α -карбоксильной группы, первичными (R)-аминами. Карбоксильная группа является ключевой для распознавания и связывания природных субстратов в трансаминазах. Поэтому определение структурных основ продуктивного связывания субстратов без карбоксильной группы является важным знанием для разработки биокатализаторов синтеза сложных органических молекул. Анализ структуры холофермента варианта R90I и комплекса с аналогом субстрата, фенилгидразином, а также анализ структур гомологичных неканонических DATA позволил выявить причины пластичности активного центра.

В работе исследовано взаимодействие TA_Halhy с ингибитором D цикloserином методами спектрофотометрии, спектрофлуоресценции и кристаллографии, что позволило проанализировать особенности строения и функционирования активного центра TA_Halhy.

Проведенный в работе анализ показал, что TA_Halhy высоко эффективна в реакциях аминирования алифатических и ароматических α -кетокислот с различной боковой группой, энантиомерный избыток продуктов, D-аминокислот, превышает 99%. Высокая операционная стабильность, эффективное восстановление холофермента, высокие скорости трансаминирования и высокая стереоселективность – очевидные достоинства TA_Halhy, которые делают новую DATA привлекательным объектом для разработки биокатализатора с целью получения оптически чистых D-аминокислот.