

На правах рукописи

Бакунова Алина Константиновна

**ТРАНСАМИНАЗА D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ
HALISCOMENOBACTER HYDROSSIS:
КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СТРУКТУРА**

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва, 2024 г.

Работа выполнена в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

Научный руководитель:

ведущий научный сотрудник
лаборатории инженерной энзимологии
ФИЦ Биотехнологии РАН
доктор химических наук
Безсуднова Екатерина Юрьевна

Официальные оппоненты:

Шевцова Елена Феофановна, доктор химических наук, главный научный сотрудник, и.о. заведующей лабораторией биомолекулярного скрининга Института физиологически активных веществ Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук.

Габдулхаков Азат Габдрахманович, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы структурных исследований макромолекулярных комплексов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт белка Российской академии наук.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита диссертации состоится « 21 » 11 2024 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы РАН по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 1 и на сайте <http://fbras.ru/>.

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.233.01,
Кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Анализ живых систем и применение ферментов в разных областях синтетической химии невозможны без понимания свойств ферментов – природных катализаторов, способных многократно ускорять химические реакции в «мягких» условиях и осуществлять превращения, которые в неживой природе не происходят. Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты широко распространены в природе, они участвуют в азотистом и энергетическом обмене в клетке, являются ключевыми ферментами метаболизма D-, L-аминокислот, вовлечены в метаболизм углеводов, жиров и т.д. Среди биотехнологически значимых ферментов PLP-зависимые трансминазы успешно зарекомендовали себя в стереоселективном аминировании органических соединений. Несмотря на долгую историю, исследование белковых структур, ассоциированных с пиридоксальвым катализом, сохраняет актуальность с фундаментальной и практической точек зрения: изучение многообразия биохимических реакций, протекающих с участием PLP, углубляет наши представления о взаимосвязи структуры и функции в ферментах, о молекулярных механизмах регуляции клеточного метаболизма, а также дает возможность совершенствовать методы разработки биокатализаторов для биотехнологии.

Среди трансминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена выделяется семейство трансминаз D-аминокислот (D-amino acid transaminase, DATA). DATA катализируют стереоселективный обратимый перенос аминогруппы с D-аминокислоты на α -кетокислоту с образованием новых D-аминокислоты и α -кетокислоты. До настоящего времени описание этого семейства ограничивалось структурно-функциональной характеристикой трансминазы D-аминокислот из *Bacillus* sp. YM-1 и несколькими гомологичными ей DATA. Устройство активного центра этих DATA и их субстратная специфичность сформировали представления о ферментативном D-трансаминировании как об узкоспецифичном процессе. Но в 2016 г. были обнаружены DATA с дополнительной активностью с первичными (R)-аминами, что обозначило структурно-функциональное разнообразие DATA. Актуальным оказались поиск и детальное исследование DATA с активным центром отличным от активного центра канонической DATA из *Bacillus* sp. YM-1. Предметом диссертационной работы является структурно-функциональная характеристика трансминазы D-аминокислот из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis* с неканонической организацией активного центра, которая обеспечивает высокую каталитическую эффективность D-трансаминирования, стереоспецифичность, стабильность и широкую субстратную специфичность трансминазы.

Цель работы и основные задачи исследования. Цель работы – определение структурных основ субстратной специфичности, каталитической эффективности и стереоселективности трансминазы IV типа укладки из *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy). Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Получить препарат рекомбинантной ТА_Halhy.
2. Проанализировать функциональные свойства ТА_Halhy кинетическими и спектральными методами.
3. Получить варианты ТА_Halhy с заменами в активном центре и проанализировать их функциональные свойства.
4. Получить и проанализировать кристаллические структуры ТА_Halhy и её вариантов, как в холоформе, так и в комплексах с ингибиторами.
5. Оценить возможность применения ТА_Halhy в синтезе оптически чистых D-аминокислот.

Научная новизна. В геноме бактерии *H. hydrossis* обнаружен ген, кодирующий последовательность новой PLP-зависимой трансминазы IV типа укладки, которая характеризуется отличной от известных ранее трансминаз D-аминокислот организацией активного центра. Проведена структурно-функциональная характеристика рекомбинантной формы новой трансминазы. Описан новый активный центр у трансминаз D-аминокислот. Обнаружены некоторые новые закономерности взаимосвязи структуры и функции у трансминаз, в том числе структурные детерминанты дополнительной активности с ароматическими первичными (R)-аминами. Впервые проведен детальный анализ предстационарной кинетики трансминаз D-аминокислот методом «остановленного потока».

Теоретическая и практическая значимость. Комплексный метод исследования взаимосвязи структуры и функции PLP-зависимой трансминазы D-аминокислот из *H. hydrossis* позволил охарактеризовать новый активный центр у трансминаз, ключевыми аминокислотными остатками которого являются три остатка аргинина и остаток лизина. При этом установлена многофункциональность остатков аргинина и эффективность точечных замен в таком активном центре. Кроме того, продемонстрирована роль удаленных от кофактора аминокислотных остатков в стабилизации рабочей конформации PLP через сеть нековалентных взаимодействий. Далее показана возможность применения трансминазы из *H. hydrossis* как биокатализатора синтеза разнообразных ароматических и алифатических D-аминокислот с энантиомерным избытком более 99%. Обоснованы практические достоинства нового активного центра трансминазы D-аминокислот, а именно: высокая каталитическая эффективность, стереоселективность и возможность регулирования активности. Стоит отметить, что важной характеристикой трансминаз и PLP-зависимых ферментов вообще является стабильность холофермента. Нестабильность холофермента негативно сказывается на выходе целевого продукта, поскольку приводит к накоплению менее стабильной и неактивной апоформы и, как следствие, остановке реакции. В ходе исследований трансминазы из *H. hydrossis* определены факторы, стабилизирующие PLP в активном центре, предложены подходы к стабилизации холофермента в реакционных условиях, предложены подходы к 100% реактивации холофермента. В ходе

исследований в банк данных белковых структур (Protein Data Bank) депонированы пять структур (PDB коды 7P7X, 8AHU, 8RAF, 8RAI, 8YRT).

Методология и методы исследования

В рамках данной работы использованы следующие методы и подходы: биоинформатика (построение множественных выравниваний белковых структур, подбор праймеров, оптимизация генов для экспрессии в *E. coli*); методы генетической инженерии (полимеразная цепная реакция, выделение фрагментов ДНК и плазмид); методы молекулярной биологии (трансформация, экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*, электрофорез ДНК и белков); хроматографические методы (гель-фильтрация, аффинная и обращенно-фазовая хроматография); спектральные методы (спектрофотометрия, спектрофлуометрия, круговой дихроизм); методы стационарной и предстационарной кинетики; методы кристаллизации белков, рентгеноструктурный анализ и методы визуального анализа структур.

Положения, выносимые на защиту:

1. При неканонической организации активного центра трансаминаза из *H. hydrossis* характеризуется высокой стереоселективностью трансаминирования и специфичностью связывания D-аминокислот и α -кетокислот.
2. Деаминирование специфических и неспецифических субстратов происходит по единому механизму через сходные промежуточные соединения.
3. Остатки аргининов активного центра трансаминазы из *H. hydrossis* многофункциональны, они участвуют в связывании субстратов, в стабилизации активной формы кофактора, в стабилизации функционального димера.
4. Воздействие типичного для трансаминаз ингибитора D-циклосерина на трансаминазу из *H. hydrossis* обратимо. Реактивация трансаминазы возможна при добавлении избытка PLP.
5. Трансаминаза из *H. hydrossis* эффективна в стереоселективном аминировании α -кетокислот.

Личный вклад соискателя

Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Автор принимал непосредственное участие в постановке научных задач, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных результатов и их представлении. Автор благодарит А.Ю. Николаеву (НИЦ «Курчатовский институт») за помощь в кристаллизации трансаминазы, к.б.н. К.М. Бойко и И.О. Матюту (ФИЦ Биотехнологии РАН) за проведение рентгеноструктурного эксперимента, к.б.н. Т.В. Ракитину (ИБХ имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) за помощь в создании экспрессионного вектора, д.х.н., профессора В.А. Кузьмина и к.х.н. А.А. Костюкова (ИБХФ имени Н.М. Эммануэля) за помощь в проведении эксперимента по кинетике быстрых полуреакций. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя является определяющей.

Степень достоверности полученных результатов обеспечена использованием современных методов исследования, проведением независимых экспериментов с использованием положительных и отрицательных контролей, и подтверждается воспроизводимостью значений измерений. Все эксперименты проводились на сертифицированном оборудовании. Полученные данные анализировали с использованием современных методов статистической обработки.

Финансовая поддержка

Представленная работы была поддержана грантом Российского Научного Фонда (РНФ) № 19-14-00164.

Публикации и апробация работы

По теме научной работы было опубликовано пять статей в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных конференциях (XV Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием в Саратове в 2021 году; VI съезд биохимиков России в Сочи-Дагомыс в 2022 году; 13th BGRS/SB в Новосибирске в 2022 году; 7th International Conference on Novel Enzymes в Грайфсвальде, Германия, в 2023 году; 13-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применение» в Суздале в 2023 году; X Всероссийская научная молодежная школа-конференция «Химия, физика, биология: пути интеграции» в Москве в 2024 году).

Структура и объем работы

Работа состоит из разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 131 странице и содержит 41 рисунок, 19 таблиц, 1 приложение и 240 ссылок.

Список сокращений

ТА – трансаминаза, DATA – трансаминаза D-аминокислот, TA_Halhy – DATA из *Haliscomenobacter hydroxsis*, bsDATA – DATA из *Bacillus* sp. YM-1, (R)-ATA – (R)-селективная аминтрансаминаза, BCAT – трансаминаза разветвленных L-аминокислот; (R)-PEA – (R)-(+)-1-фенилэтиламин, ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, КД – круговой дихроизм, КФБ – К-фосфатный буфер, PCA – рентгеноструктурный анализ, CHES – N-циклогексил-2-аминоэтансульфоновая кислота, NAD – никотинамидадениндинуклеотид, PLP – пиридоксаль-5'-фосфат, PMP – пиридоксамин-5'-фосфат, PDB – банк данных белковых структур, TEV-протеаза – протеаза из *Tobacco Etch Virus*, WT – дикий тип.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика DATA

Трансаминазы D-аминокислот (DATA, EC 2.6.1.) – это пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты, катализирующие стереоселективный и обратимый перенос аминогруппы с D-аминокислоты (субстрат аминодонор) на α -кетокислоту (субстрат аминокцептор) с образованием новой α -кетокислоты и новой D-аминокислоты. DATA превращают D-аминокислоты и α -кетокислоты с разнообразными боковыми группами. В бактериальной клетке DATA катализируют синтез D-глутамата для клеточной стенки (**Рис. 1**), синтез D-аминокислот для пептидов-антибиотиков и сигнальных молекул.

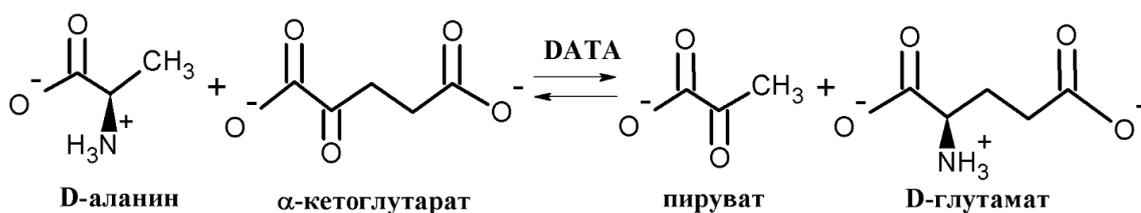


Рис 1. Схема реакции трансминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом.

DATA принадлежат к PLP зависимым ферментам IV типа укладки наряду с трансаминазами разветвленных L-аминокислот (BCAT) и (R)-селективными аминотрансаминазами ((R)-АТА). Структуры ТА IV типа укладки гомологичны (**Рис. 2**), разную субстратную специфичность определяет разный аминокислотный состав элементов вторичных структур, формирующих активный центр (**Табл. 1**). В 2010 г. сотрудники лаборатории проф. Борншойера [Nat Chem Biol. 2010; 6: 807] выделили консервативные характеристические мотивы в аминокислотных последовательностях ТА IV типа укладки, которые определяют их субстратную специфичность, что позволило далее предсказывать свойства ТА по последовательности. Однако разнообразие аннотированных последовательностей ТА не исчерпывалось описанными мотивами, и нами была обнаружена ТА из *Haliscomenobacter hydrossis* (ТА_Halhy, UniProt код: F4KWH0), аминокислотный состав активного центра которой не включал ни один из известных характеристических мотивов (**Табл. 1**). Неканоническая ТА_Halhy была выделена в рекомбинантной форме, закристаллизована, структура получена (PDB код 7P7X) и отличная от канонических ТА организация активного центра подтверждена. Решено было изучить особенности функционирования новой ТА_Halhy.

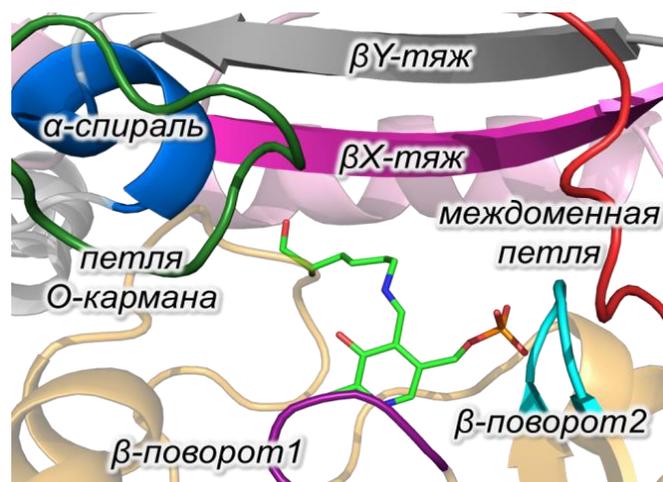


Рис. 2. Активный центр трансаминазы IV типа укладки.

Табл. 1. Состав активного центра канонических ТА IV типа укладки (голубой) и ТА_Halhy (розовый). Характеристические мотивы выделены жирным.

ТА	Аминокислотные остатки, формирующие активный центр
BCAT из <i>E. coli</i>	³¹ Y xxxx F x G x R ⁴⁰ ... ⁹⁵ Y x R ⁹⁷ ... ¹⁰⁷ M x V ¹⁰⁹ ... ¹⁹⁴ GAGE ¹⁹⁷ ... ²⁵⁶ G TAA ²⁵⁹
DATA из <i>Bacillus</i> sp. YM-1	²⁶ F xxxx Y x V x K ³⁵ ... ⁸⁶ H x Y ⁸⁸ ... ⁹⁸ R x H ¹⁰⁰ ... ¹⁷⁸ GSSS ¹⁸¹ ... ²⁴⁰ S TTS ²⁴³
(R)-ATA из <i>A. fumigatus</i>	⁵³ H xxxx Y x V x S ⁶² ... ¹¹³ F x E ¹¹⁵ ... ¹²⁵ x R x ¹²⁷ ... ²¹³ GSGF ²¹⁶ ... ²⁷³ T TAG ²⁷⁶
ТА_Halhy	²⁸ R xxxx F x Y x L ³⁷ ... ⁸⁸ G x R ⁹⁰ ¹⁷⁷ SARS ¹⁸⁰ ... ²³⁸ S TIK ²⁴¹

Каталитические свойства трансаминазы из *H. hydrossis* (ТА_Halhy)

Получение рекомбинантной формы ТА_Halhy

Рекомбинантную ТА_Halhy получали из биомассы штамма-продуцента *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, несущего экспрессионную плазмиду со вставкой целевого гена. Рекомбинантную ТА_Halhy, содержащую 6-His-фрагмент на N-конце, отделяли с помощью металл-хелатной хроматографии. Для кристаллизации 6-His-фрагмент отщепляли TEV-протеазой, дополнительно проводили очистку методом гидрофобной хроматографии и гель-фильтрации, по результатам которой ТА_Halhy в растворе гомодимер, молекулярный вес одной субъединицы составляет 32,1 кДа. (Рис. 3).

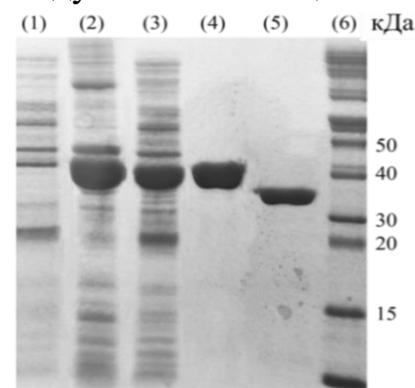


Рис. 3. Электрофореграмма образцов препаратов, содержащих ТА_Halhy, на этапах наращивания и очистки. Клеточный лизат до (1) и после (2) индукции ИПТГ; (3) растворимая фракция после УЗ обработки и центрифугирования; (4) фракция ТА_Halhy с 6-His-фрагментом после металл-хелатной хроматографии; (5) фракция ТА_Halhy после отщепления 6-His-фрагмента, гидрофобной хроматографии и гель-фильтрации; (6) стандарты.

Субстратная специфичность ТА_Halhy в реакциях трансаминирования

Активность в полных реакциях трансаминирования с аминокислотами определяли по второй ферментативной реакции с лактадегидрогеназой или гидроксиглутаратдегидрогеназой, в реакциях с аминокислотами D-лейцином и D-фенилаланином – хроматографическим методом. ТА_Halhy строго специфична к D-аминокислотам, активности с L-аминокислотами и первичными аминами не наблюдалось (Табл. 2). Наибольшая активность ТА_Halhy в реакции трансаминирования D-аланин + α-кетоглутарат наблюдается при pH 8,0-8,5 и 40 °C (Рис. 4).

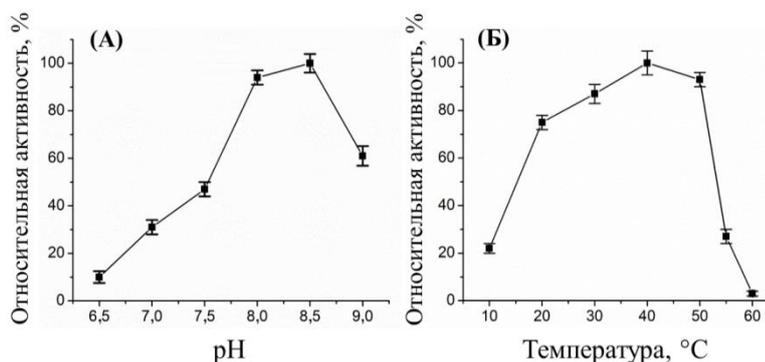


Рис. 4. Зависимость активности ТА_Halhy от pH (А) и температуры (Б) в реакции трансаминирования D-аланин + α-кетоглутарат.

Наилучшими субстратами ТА_Halhu являются D-глутамат и пируват. При этом ТА_Halhu характеризуется одной из наибольших каталитических констант реакции трансаминирования среди описанных ДАТА.

Табл. 2. Кинетические параметры реакций трансаминирования, катализируемых ТА_Halhu в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С.

Субстрат	Косубстрат	V_{max} , U/мг	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , М ⁻¹ с ⁻¹
α-Кетоглутарат	D-аланин	260 ± 7	146 ± 4	2,3 ± 0,2	63000 ± 7000
D-аланин	α-Кетоглутарат	260 ± 7	146 ± 4	23 ± 1	6300 ± 400
Пируват	D-глутамат	380 ± 10	215 ± 6	2,1 ± 0,1	103000 ± 8000
D-глутамат	Пируват	380 ± 10	215 ± 6	10,3 ± 0,7	21000 ± 2000
D-лейцин	α-Кетоглутарат	18,5 ± 0,7	10,5 ± 0,4	83 ± 8	130 ± 20
D-фенилаланин	α-Кетоглутарат	5,1 ± 0,4	2,9 ± 0,2	10 ± 1	320 ± 70
L-аланин	α-Кетоглутарат /пируват	Нет активности			
L-лейцин					
(R)-PEA					
(S)-PEA					

Термостабильность холофермента и апофермента ТА_Halhu

Термостабильность холо- и апоформы ТА_Halhu проанализированы двумя способами: (1) по остаточной активности при инкубировании при заданной температуре; (2) по температуре полуперехода ($T_{0,5}$) из нативного состояния в денатурированное при нагревании в диапазоне 20-80 °С методом кругового дихроизма (КД). Инкубирование холо- и апоформы ТА_Halhu в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С не приводило к агрегации, остаточная активность спустя четверо суток составляла более 90% от начальной. Температура полуперехода из нативного состояния в денатурированное совпала для холо- и апофермента и составила $56,4 \pm 0,5$ и $57,0 \pm 0,8$ °С, соответственно. Таким образом, холо- и апоформа ТА_Halhu стабильны при 40 °С, устойчивы к агрегации и сохраняют активность в течение длительного времени.

Анализ полуреакций ТА_Halhu с D-аминокислотами

Полная реакция трансаминирования протекает по механизму двойного замещения фермента и состоит из двух последовательных полуреакций. В первой полуреакции аминогруппа с субстрата переносится на кофактор PLP, который переходит в форму пиридоксамин-5'-фосфата (PMP) (Рис. 5). Вторая полуреакция протекает в обратном направлении. При изучении ТА хорошо зарекомендовал себя метод полуреакций (полуоборот молекулы фермента) как анализ связывания одного субстрата в активном центре в отсутствие ингибирования вторым субстратом. Ранее детальный анализ кинетики полуреакций ДАТА не проводился.

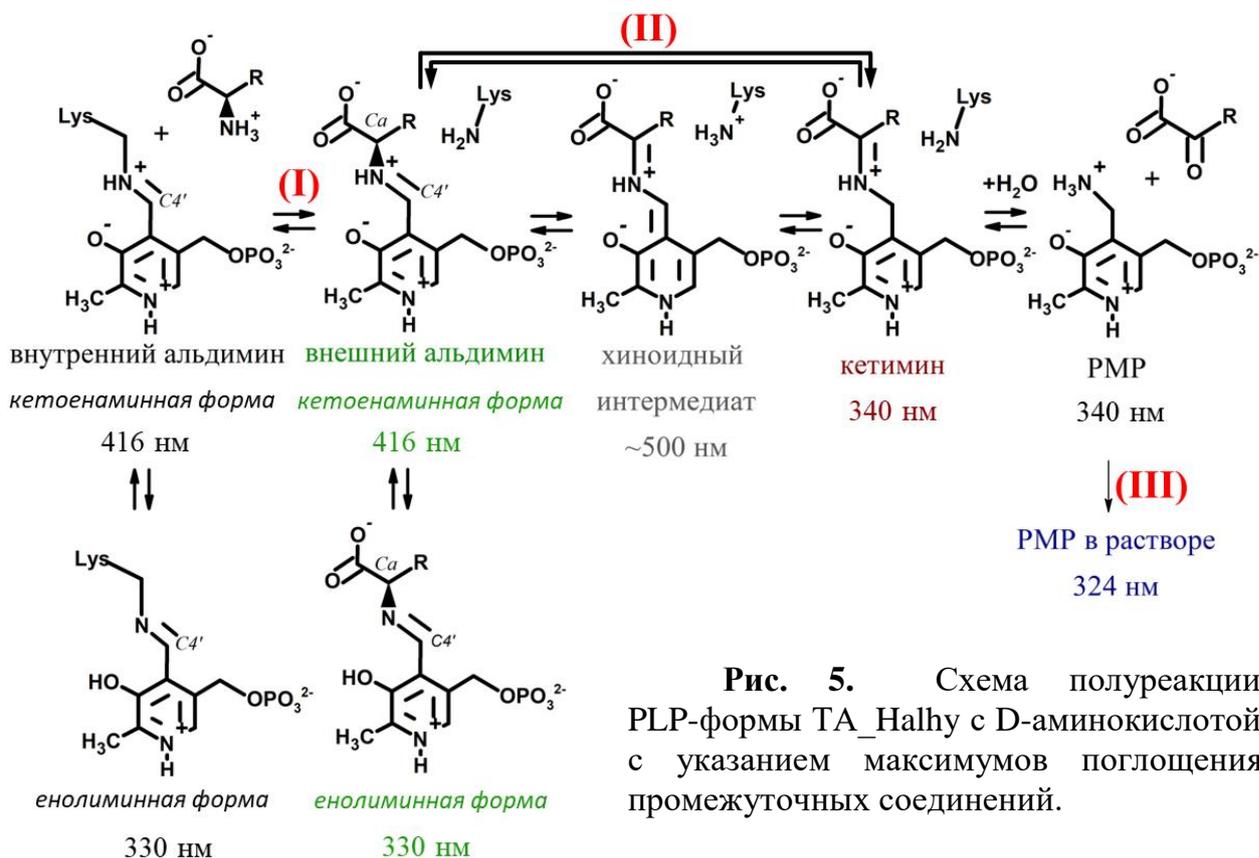


Рис. 5. Схема полуреакции PLP-формы TA_Halhy с D-аминокислотой с указанием максимумов поглощения промежуточных соединений.

В полуреакциях PLP-формы TA_Halhy с субстратами (D-глутаматом, D-аланином, D-лейцином и D-фенилаланином) методом «остановленного потока» наблюдали стадии I и II (быстрые спектральные изменения: 0,1-200 секунд), а методом обычной УФ-видимой спектрофотометрии наблюдали медленную стадию III (в течение 40 минут). Стадия I соответствовала переходу из внутреннего альдимина во внешний альдимин; II – переходу из внешнего альдимина в кетимин (1-3-перенос протона); III – диссоциации PMP-формы TA_Halhy (выход PMP из активного центра и сдвиг равновесия полуреакции в сторону образования PMP формы фермента и далее апофермента) (Рис. 5, 6).

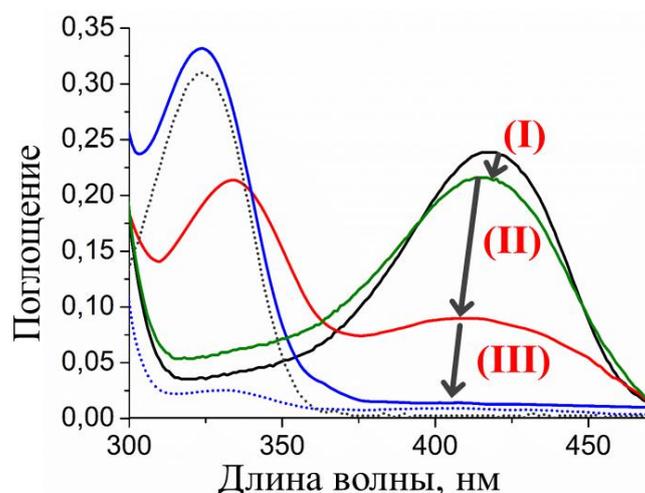
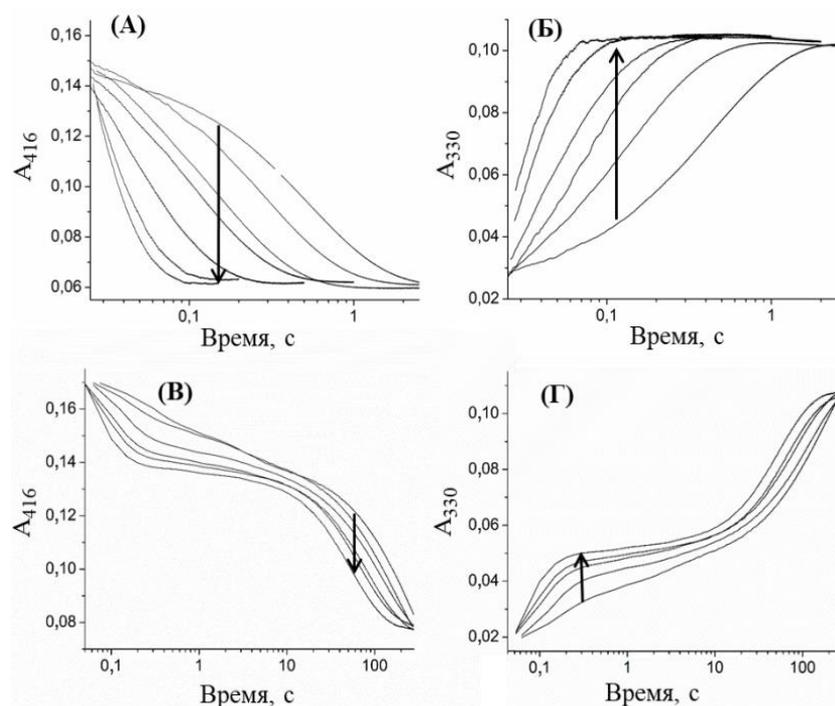


Рис. 6. Изменения спектра поглощения 25 мкМ TA_Halhy в ходе полуреакции: внутренний альдимин (черный), внешний альдимин TA_Halhy и α-метиллейцина – аналога субстрата без атома водорода у Ca атома (зеленый), TA_Halhy после инкубирования с D-лейцином (10 мМ) в течение трех (красный) и 40 минут (синий) с последующей сменой буфера (синий, пунктирная); спектр поглощения 25 мкМ свободного PMP (серый, пунктирная) в 50 мМ КФБ, pH 8,0.

За ходом полуреакций при разных концентрациях субстратов следили при двух длинах волн 416 и 330 нм (**Рис. 7**). Значения наблюдаемых констант скоростей **I**, **II** и **III** стадии получали обработкой кинетических кривых уравнением: $A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty) \times \exp(-k_{\text{obs}}t)$. Стадию **I** детектировали только с D-лейцином и D-фенилаланином, для D-глутамата и D-аланина стадия **I** происходила в течение мертвого времени прибора (~18 мс). Спектральные изменения на стадии **I** объясняются разным соотношением *енолиминной* и *кетонаминной форм* альдиминов (**Рис. 6**). Стадия **III** наблюдалась для всех субстратов, константа скорости процесса не зависела от типа и концентрации субстрата и составила $0,0024 \pm 0,0004 \text{ с}^{-1}$. Таким образом, наблюдали все интермедиаты полуреакции, кроме хиноидного.



Полуреакция завершалась образованием апофермента и свободного РМР, что указывало на низкое сродство апофермента к РМР.

Рис. 7. Изменение интенсивности поглощения при 416 нм и 330 нм во времени для полуреакций 25 мкМ TA_Halhy в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С с D-аланином (А, Б) и D-лейцином (В, Г) при наблюдении методом «остановленного потока». Стрелки указывают направление увеличения концентрации субстрата.

Значения наблюдаемых констант скоростей стадий **I** и **II** зависели гиперболически от концентрации субстратов, и совпали для наблюдений при 416 и 330 нм. Такое совпадение констант для стадии **II** допускает согласованный механизм 1,3-переноса протона без образования хиноидного интермедиата. Для описания концентрационных зависимостей была предложена кинетическая схема (**Рис. 9**) и уравнения (1), (2). Стадию образования комплекса Михаэлиса EPLP•S рассматривали как равновесную. Рассчитанные константы стадий приведены в **Табл. 3**.

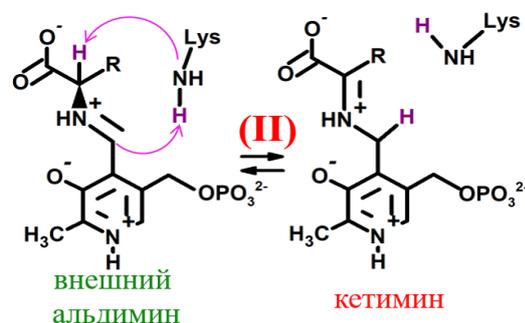
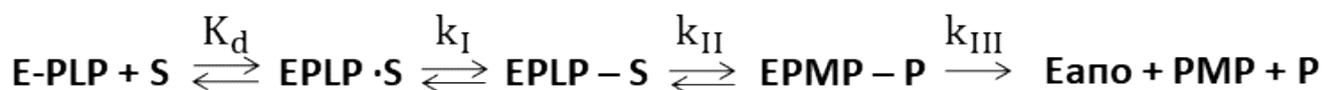


Рис. 8. Согласованный механизм 1,3-переноса протона.



$$k_{obs I} = \frac{k_I \times [S]}{K_{dI} + [S]} + k_r \quad (1), \quad k_{obs II} = \frac{k_{II}^{app} \times [S]}{K_{dII}^{app} + [S]} + k_r \quad (2).$$

Рис. 9. Кинетическая схема полуреакции. EPLP – внешний альдимин, S – субстрат, EPLP·S – нековалентный комплекс фермент-субстрат, EPLP–S – внешний альдимин, EPMP–P – кетимин, E_{apo} – апофермент, P – продукт, PMP – PMP в растворе. Уравнения (1,2): k_r отражает вклад обратной реакции.

Табл. 3. Кинетические параметры полуреакций PLP-формы TA_Halhu с D-аминокислотами в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 40 °С.

<i>Стадия I:</i>				
Субстрат	Параметры			
	k_I, c^{-1}	K_{dI}, mM	$k_I/K_{dI}, c^{-1} M^{-1}$	k_r, c^{-1}
D-лейцин	36 ± 5	66 ± 23	540 ± 260	$1,6 \pm 0,9$
D-фенилаланин	70 ± 10	60 ± 25	1200 ± 660	3 ± 2
<i>Стадия II:</i>				
Субстрат	Параметры			
	k_{II}^{app}, c^{-1}	K_{dII}^{app}, mM	$k_{II}^{app}/K_{dII}^{app}, c^{-1} M^{-1}$	k_r, c^{-1}
D-глутамат	250 ± 10	$1,8 \pm 0,4$	140000 ± 40000	12 ± 8
D-аланин	133 ± 7	520 ± 50	260 ± 40	0
D-лейцин	$0,040 \pm 0,002$	88 ± 6	$0,45 \pm 0,05$	0
D-фенилаланин	$0,052 \pm 0,006$	40 ± 10	$1,3 \pm 0,5$	0

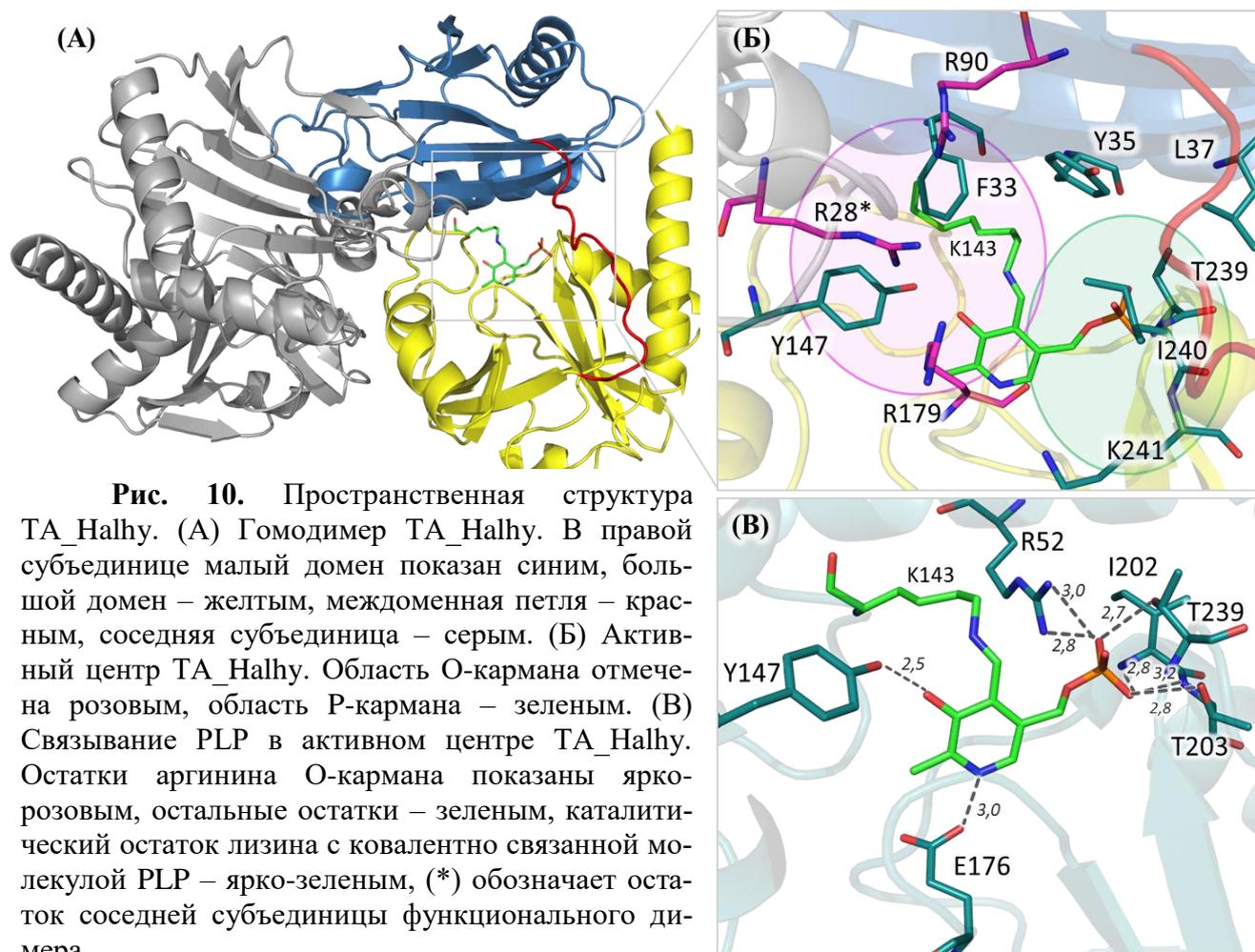
По результатам анализа полуреакций субстраты можно разделить на специфические – D-глутамат и неспецифические – D-аланин, D-лейцин и D-фенилаланин. Связывание D-аланина в наибольшей степени отражает связывание α -карбоксылной группы, введение γ -карбоксылной группы (D-глутамат) увеличивало константу специфичности ($k_{II}^{app}/K_{dII}^{app}$) в 500 раз, при этом введение гидрофобной боковой группы (D-лейцин и D-фенилаланин) снижало – в 200 раз (Табл. 3). Подобное наблюдение указывает на чувствительность TA_Halhu к боковой группе D-аминокислоты. Для уточнения особенностей связывания субстратов в активном центре TA_Halhu проведена кристаллизация и получены структуры холофермента и комплекса с D-циклосерином.

Структурный анализ TA_Halhu

Структура холофермента

Пространственная структура PLP-формы холофермента TA_Halhu определена методом РСА с разрешением 2,0 Å (PDB код: 7P7X). Организация функционального гомодимера TA_Halhu типична для TA IV типа укладки (Рис. 10А). Субъединица имеет α/β структуру и состоит из двух доменов: малый домен

(остатки 1-114) и большой домен (остатки 128-281), которые соединены между-
 менной петлей (остатки 115-127) (**Рис. 10А**). О-карман (со стороны фенольной
 группы PLP) активного центра ТА_Halhy образован тремя остатками аргинина:
 R28* (* здесь и далее обозначает остаток соседней субъединицы функционально-
 го димера), R90 и R179 (**Рис. 10Б**), ароматическими остатками F33, Y35 и Y147, и,
 таким образом, представляет собой положительно заряженную область с гидро-
 фобными включениями. Р-карман (со стороны фосфатной группы PLP) образован
 остатками L37, T239, I240, и K241 и открыт растворителю вследствие удаленного
 положения междуомной петли, что характерно для канонических DATA.



В активном центре ТА_Halhy молекула PLP ковалентно связана с каталитическим остатком лизина K143 и координирована остатками через систему нековалентных взаимодействий, которые консервативны среди известных ТА IV типа укладки (**Рис. 10В**). Такая координация кофактора поддерживает не только ориентацию, но и рабочее ионное состояние его функциональных групп.

Структура комплекса ТА_Halhy с D-цикloserином

Комплексы ТА_Halhy с субстратами не удалось исследовать методом РСА из-за быстрого превращения субстратов и выхода продуктов из активного центра.

Однако был получен и проанализирован комплекс TA_Halhu с ингибитором D-циклосерином. Пространственная структура комплекса, полученного настаиванием кристаллов PLP-формы холофермента в растворе D-циклосерина, была определена с разрешением 1,4 Å (PDB код 8AHU). Электронная плотность в активном центре соответствовала кетимину, образованному PLP и D-циклосерином, занимающему два положения (**Рис. 11А**). В первом положении боковая группа остатка K241 связывает карбонильный атом кислорода D-циклосерина в Р-кармане через молекулу воды. Во втором положении боковые группы остатков R28* и R179 образуют водородные связи с О γ атомом кетимина.

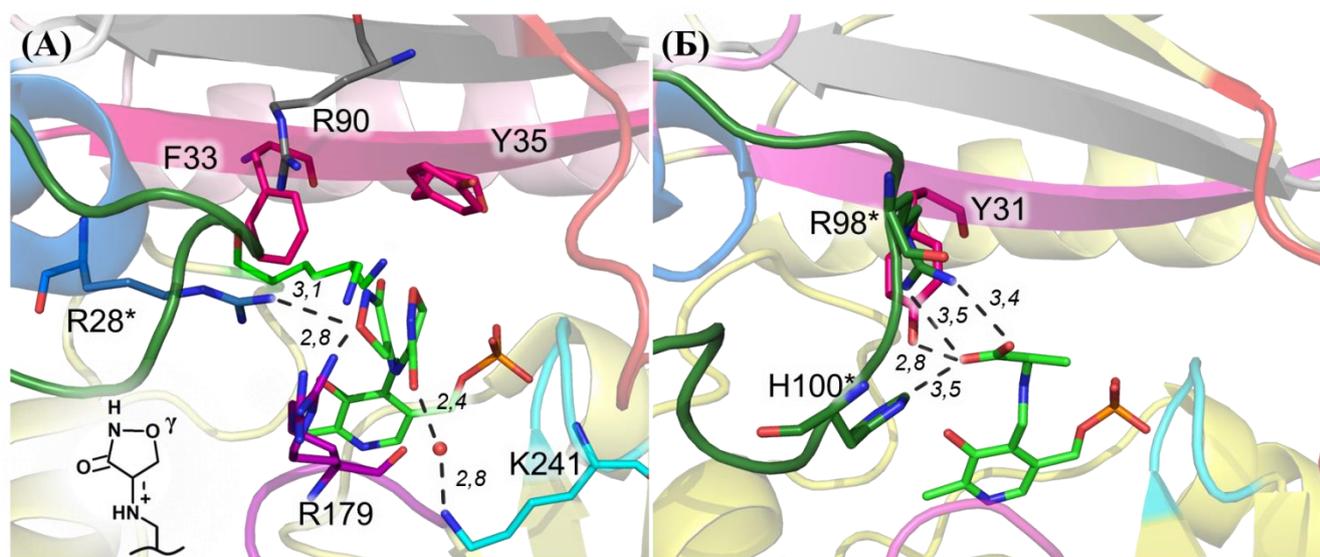


Рис. 11. Механизмы связывания субстратов в активных центрах TA_Halhu и канонической bsDATA. (А) Связывание аддукта D-циклосерина и PLP в активном центре TA_Halhu. (Б) Связывание D-аланина в активном центре канонической bsDATA (PDB код 4DAA). Расстояния указаны в ангстремах и показаны черной пунктирной линией. Остатки соседней субъединицы гомодимера обозначены (*).

Анализ полученных структур позволил выделить следующие особенности организации активного центра TA_Halhu. (1) Активный центр TA_Halhu отличается четырьмя положительно заряженными остатками: R28*, R90, R179 и K241. DATA и вообще TA IV типа укладки с таким активным центром до настоящего момента неизвестны. Учитывая специфичность TA_Halhu исключительно к D-аминокислотам, можно сделать вывод, что R28* и R179 координируют α -карбоксильную группу субстратов в О-кармане, а K241 координирует γ -карбоксильную группу D-глутамата и α -кетоглутарата в Р-кармане. Участие остатка R90 в связывании субстрата не очевидно. (2) Механизм связывания α -карбоксильной группы в О-кармане активного центра TA_Halhu отличается от канонической bsDATA (**Рис. 11Б**): остатки О-петли TA_Halhu не участвуют в формировании сайта связывания, при этом субстрат-связывающие остатки располагаются на регулярных элементах вторичной структуры – α -спираль и β -поворот

(Рис. 11А). (3) Активный центр TA_Halhy остается открытым после связывания субстрата/ингибитора, междоменная петля не меняет своего положения как это наблюдается в структурах комплексов BCAT и (R)-АТА. По-видимому, в TA_Halhy, как и в канонической bsDATA, активный центр остается открытым в ходе каталитического превращения, что не мешает высокой стереоселективности D-трансаминирования и не приводит к побочной реакции рацемизации. (4) Остатки Р-кармана определяют чувствительность активного центра TA_Halhy к боковой группе субстрата. Положительно заряженный остаток K241 в Р-кармане способствует эффективному связыванию субстратов с отрицательно заряженными боковыми группами.

Свойства вариантов TA_Halhy: взаимосвязь структуры и функции

Проведено структурное выравнивание TA_Halhy и гомологов, обнаружено, что в позициях R28* и R90 TA_Halhy у всех охарактеризованных неканонических DATA имеются положительно заряженные остатки. Положительно заряженный остаток в позиции R179 встречается только у двух неканонических DATA: TA_Halhy и TA из *M. tuberculosis* (PDB код 6Q1R) и вообще нетипичен для TA IV типа укладки. Для определения функции остатков аргинина О-кармана TA_Halhy были получены три варианта фермента с единичными аминокислотными заменами: R28*I, R90I и R179I. Такая стратегия позволила оценить вклад положительно заряженной гуанидиновой группы, при сохранении объема, занимаемого алифатической частью боковой группы остатка аргинина.

Участие остатков R28*, R90 и R179 в стабилизации функционального димера и в связывании субстратов TA_Halhy

По результатам гель-фильтрации все варианты в растворе гомодимеры. Стабильность гомодимеров вариантов оценивали методом КД по температуре полуперехода из нативного состояния в денатурированное ($T_{0.5}$) (Табл. 4). Замены R28*I и R179I не повлияли на $T_{0.5}$, для варианта R90I наблюдали снижение $T_{0.5}$, что указывает на вклад остатка R90 в стабилизацию функционального димера. Кинетические параметры полных реакций, катализируемых вариантами, приведены в Табл. 4. Вариант R28*I оказался неактивен с любой D-аминокислотой в полуреакциях и в полных реакциях трансаминирования, что соответствует ключевой роли остатка R28* в связывании α -карбоксильной группы субстрата в О-кармане. Варианты с заменами R90I и R179I оказались менее активны с D-аминокислотами, чем WT, при этом у варианта R90I обнаружена дополнительная активность с (R)-PEA – эталонным субстратом (R)-АТА. Последующий анализ полуреакций с первичными аминами показал, что вариант R90I активен только с ароматическими (R)-аминами (с ароматическим заместителем у $C\alpha$ атома). Снижение активности варианта R179I согласуется с участием остатка R179 в связыва-

нии D-цикloserина в активном центре (**Рис. 11А**). Причины снижения активности при замене R90I неочевидны. Замены R90I и R179I не повлияли на оптимальный рН реакции трансминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом. рН оптимум реакции между (R)-PEA и α -кетоглутаратом, катализируемой вариантом R90I, составил 9,0-9,5.

Табл. 4. Кинетические параметры реакции трансминирования D-аланин + α -кетоглутарат, катализируемой WT TA_Halhy и вариантами, в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 25 °С, и реакции трансминирования (R)-PEA + α -кетоглутарат в CHES буфере, рН 9,0, катализируемой вариантом R90I при 25 °С. Температуру полуперевода ($T_{0,5}$) между нативным и денатурированным состояниями вариантов определяли методом КД в 20 мМ Na-фосфатном буфере, рН 8,0, при постоянной скорости прогрева 1 °С/мин. $T_{0,5}$ WT составляет $56,4 \pm 0,5$ °С.

Субстрат	Косубстрат	Параметры				$T_{0,5}$, °С
		V_{max} , U/мг	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , с ⁻¹ М ⁻¹	
R28*I вариант						
Нет активности						$54,2 \pm 0,6$
R90I вариант						
D-аланин	α -кетоглутарат	24 ± 1	24 ± 1	77 ± 4	180 ± 20	$52,0 \pm 0,5$
α -кетоглутарат	D-аланин	24 ± 1	$13,6 \pm 0,7$	22 ± 1	620 ± 60	
(R)-PEA	α -кетоглутарат	$0,16 \pm 0,01$	$0,091 \pm 0,006$	13 ± 1	7 ± 1	
α -кетоглутарат	(R)-PEA	$0,16 \pm 0,01$	$0,091 \pm 0,006$	$0,7 \pm 0,1$	130 ± 30	
R179I вариант						
D-аланин	α -кетоглутарат	37 ± 1	$21,1 \pm 0,6$	132 ± 2	160 ± 10	$56,0 \pm 0,5$
α -кетоглутарат	D-аланин	37 ± 1	$21,1 \pm 0,6$	$37,0 \pm 0,6$	570 ± 50	

В ходе исследований были получены кристаллические структуры варианта R90I в PLP-форме (PDB код 8RAF, разрешение 2,0 Å) и в комплексе с аналогом субстрата (R)-PEA, фенилгидразином, методом настаивания кристаллов холофермента в растворе лиганда (PDB код 8RAI, разрешение 2,0 Å). Электронная плотность в активном центре варианта в PLP-форме соответствовала молекуле PLP, ковалентно связанной с каталитическим остатком лизина (**Рис. 12А**). Электронная плотность варианта в комплексе соответствовала аддукту молекулы PLP и фенилгидразина – аналогу внешнего альдимины, образованного PLP и (R)-PEA (**Рис. 12Б,В**). Кофактор в активном центре варианта R90I сохранил положение и ориентацию как у WT: все нековалентные взаимодействия, координирующие PLP, сохранились. Достоверные изменения наблюдались в положениях боковых групп остатков, формирующих O-карман.

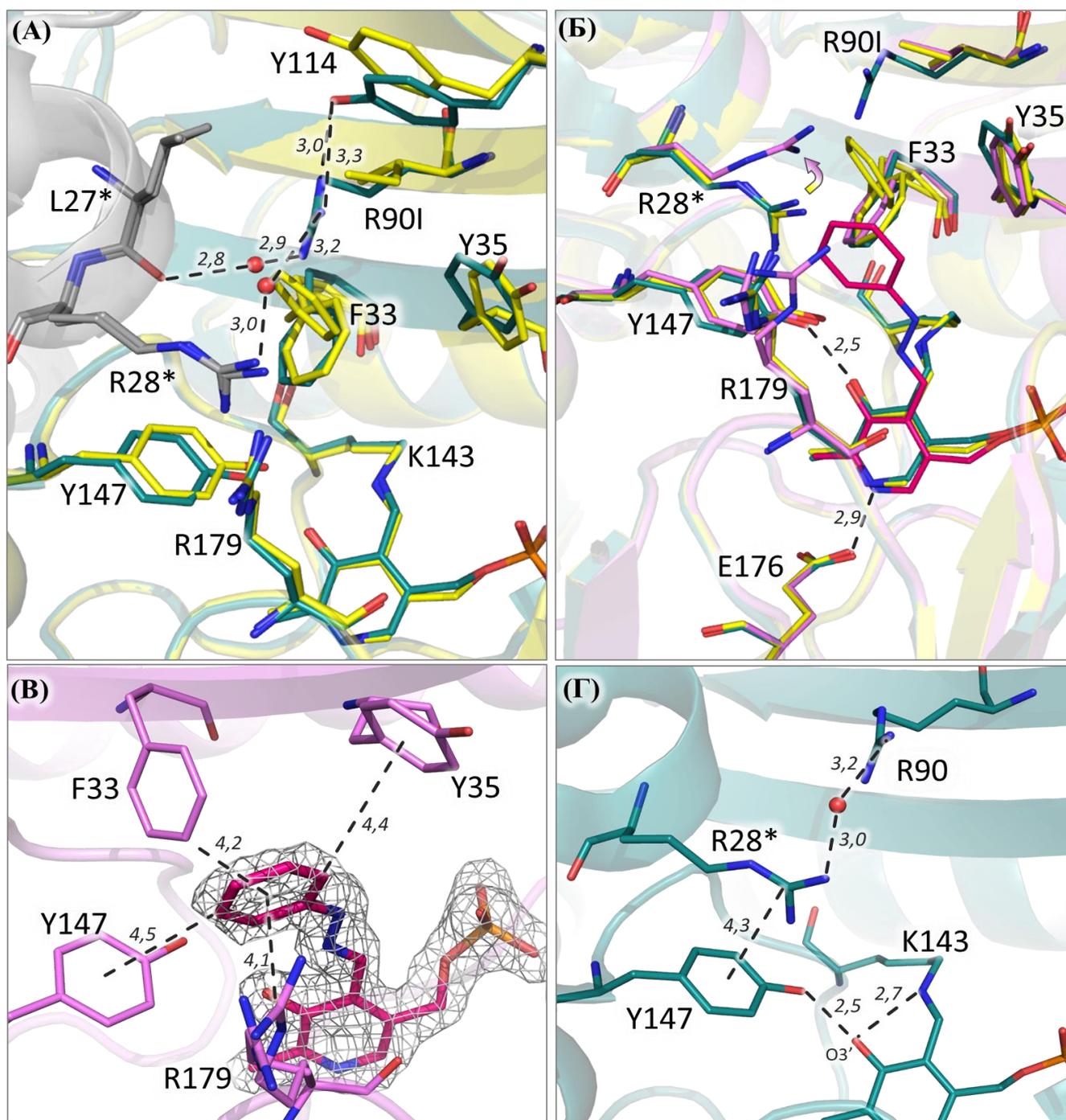


Рис. 12. Активные центры WT TA_Nalhy и варианта R90I. (А) Наложение остатков активных центров PLP-форм холоферментов WT (зеленый) и варианта R90I (желтый). (Б) Наложение активных центров WT в PLP-форме и варианта R90I в PLP-форме и в комплексе с фенилгидразином (светло розовый). (В) Связывание фенилгидразина в активном центре варианта R90I. 2Fo-Fc карта электронной плотности аддукта PLP и фенилгидразина на уровне срезки 1,0 σ . (Г) Координация PLP в активном центре WT TA_Nalhy. Аддукт PLP и фенилгидразина показан розовым, электронная плотность показана сетчатой поверхностью, водородные связи показаны черными пунктирными линиями, длины указаны в ангстремах (\AA). Остатки соседней субъединицы гомодимера обозначены (*).

Замена R90I привела к разрушению некоторых водородных связей в межсубъединичном контакте (**Рис. 12А**), это согласуется со снижением $T_{0,5}$ варианта R90I. Также изменились положения боковых групп остатков F33 и Y114 (**Рис. 12А**). В структуре комплекса гуанидиновая группа остатка R28* развернута относительно своего положения в WT, также у остатка R179 появилось второе положение (**Рис. 12Б**). Подвижность боковой группы остатка R28* в структуре WT ограничена электростатическим отталкиванием остатка R90, в варианте такое ограничение снято. По-видимому, подвижность остатка R28* приводит к ухудшению связывания α -карбоксильной группы субстрата в активном центре варианта R90I и, как результат, к снижению V_{max} в полной реакции трансаминирования между α -кетоглутаратом и D-аланином, а также увеличению констант Михаэлиса для обоих субстратов.

Структурные детерминанты активности DATA с первичными ароматическими (R)-аминами

Вариант R90I активен с D-аминокислотами и ароматическими первичными (R)-аминами, что означает продуктивное связывание в O-кармане активного центра как отрицательно заряженной α -карбоксильной группы, так и объемной гидрофобной группы. Замена R90I приводит к повышению подвижности объемных боковых групп остатков активного центра TA_Halhy, в том числе остатка R28* (**Рис. 12Б**). Подвижность R28* позволяет молекуле фенилгидразина разместиться в O-кармане так, что возникают стабилизирующие взаимодействия: π - π взаимодействия ее фенильной группы с боковыми группами остатков F33, Y35 и Y147, и π -катион взаимодействие с гуанидиновой группой остатка R179 (**Рис. 12Б**). Таким образом, подвижность остатка R28* определяет активность варианта R90I с ароматическими первичными (R)-аминами.

Кроме варианта R90I, дополнительную активность с первичными ароматическими (R)-аминами наблюдали ранее у неканонических DATA из *C. pusillum* (PDB код 5K3W) и *B. saxobsidens* (8PNW). Проведенный анализ структур DATA из *C. pusillum* и *B. saxobsidens* показал аналогичную подвижность боковых групп положительно заряженных остатков O-кармана, что подтверждает выводы из анализа структуры R90I. Пластичность активных центров неканонических DATA является преимуществом на старте разработки биокатализатора стереоселективного аминирования.

Участие остатков R28*, R90 и R179 в связывании кофактора и стабилизации холофермента

Варианты R90I и R179I в условиях реакции при 40 °C инактивировались в течение двух минут, в то время как WT не терял активности минимум час, поэтому кинетический анализ вариантов проводили при 25 °C. Для выявления причин инак-

тивации вариантов R90I и R179I был проанализирован процесс утечки кофактора из холофермента (выход кофактора из активного центра) в условиях реакции (в присутствии субстратов) и в буфере (**Рис. 13**). Константы скорости утечки кофактора в присутствии субстратов в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С составили $0,032 \pm 0,002$, $0,33 \pm 0,03$ и $0,059 \pm 0,003$ мин⁻¹ для WT, вариантов R90I и R179I, соответственно. Параметры утечки кофактора в буфере приведены в **Табл. 5**. Полученные результаты указывают на снижение сродства фермента к PLP при заменах R28*I и R90I. Остаток R179 по-видимому не участвует в связывании кофактора.

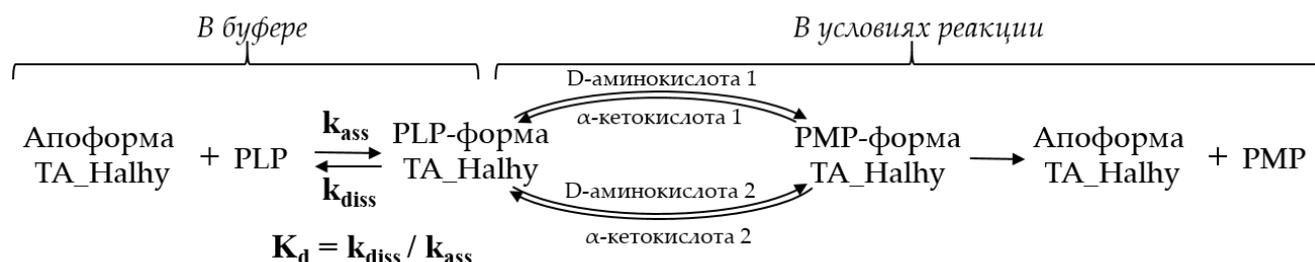


Рис. 13. Схема утечки кофактора.

Табл. 5. Константа диссоциации, константы скорости диссоциации и ассоциации апофермента с PLP в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 25 °С для вариантов TA_Halhy.

Вариант TA_Halhy	K_d , мкМ	k_{diss} , мин ⁻¹	k_{ass} , мМ ⁻¹ мин ⁻¹
WT	$1,9 \pm 0,3$	$0,0027 \pm 0,0003$	$1,4 \pm 0,4$
R28*I	44 ± 7	$0,027 \pm 0,002$	$0,6 \pm 0,1$
R90I	28 ± 3	$0,0070 \pm 0,0008$	$0,25 \pm 0,06$
R179I	$2,2 \pm 0,4$	$0,0035 \pm 0,0008$	$1,6 \pm 0,6$

Таким образом, инактивацию варианта R90I в ходе трансаминазной реакции при 40 °С можно объяснить увеличением константы скорости утечки кофактора, что приводит к быстрому накоплению неактивного апофермента, а также снижением константы скорости ассоциации апофермента с PLP. Причины инактивации варианта R179I менее очевидны. Можно предположить, что из-за снижения каталитической активности вклад утечки кофактора в реакцию становится более выраженным, и наблюдаемая инактивация соответствует превращению кофактора в РМР-форму, которая далее выходит из активного центра (**Рис. 13**).

Проведенный анализ показал влияние остатков R28* и R90 на связывание PLP, хоть и напрямую они с ним не взаимодействуют (**Рис. 10В**). Анализ пространственных структур WT TA_Halhy и варианта R90I позволил предположить механизм участия удаленных остатков стабилизации кофактора в активном центре. Обнаружено, что гуанидиновая группа остатка R28* образует π -катион взаимодействие с ароматическим кольцом остатка Y147 (**Рис. 12Г**). В свою очередь остаток Y147 координирует кофактор водородной связью с O3' атомом PLP

(Рис. 12Г). Таким образом, сеть нековалентных взаимодействий, включающая остатки R28* и R90, стабилизирует PLP в активном центре TA_Halhy (Рис. 12Г). Замена R90I повышает подвижность гуанидиновой группы R28*: в структуре комплекса с фенилгидразином во втором положении остатка R28* (Рис. 3.12Б) расстояние между гуанидиновой группой R28* и ароматическим кольцом Y147 составляет 5,7 Å, в то время как в структуре WT – 4,3 Å. Описанные наблюдения согласуются со снижением сродства к PLP у вариантов R28*I и R90I. Участие удаленных остатков в стабилизации кофактора в активном центре DATA показано впервые.

Таким образом, остатки R28* и R90 активного центра TA_Halhy многофункциональны. Остатки R28* и R90 участвуют в связывании субстратов, в стабилизации кофактора и в стабилизации функционального димера. Остаток R179 участвует в связывании α-карбоксильной группы субстрата.

Взаимодействие TA_Halhy с D-цикloserином

D-цикloserин – ингибитор ТА и эффективный инструмент для изучения функционирования их активного центра. Для канонических DATA и ВСАТ продуктом взаимодействия D-цикloserина и PLP является изоксазол (Рис. 14), а само ингибирование – необратимое. Однако в недавних работах по PLP-зависимым ферментам идентифицированы другие продукты взаимодействия, а ингибирование предложено рассматривать как обратимое [Biochem. J. 2019, 476; Nat. Chem. Biol. 2020, 16] (Рис. 14).

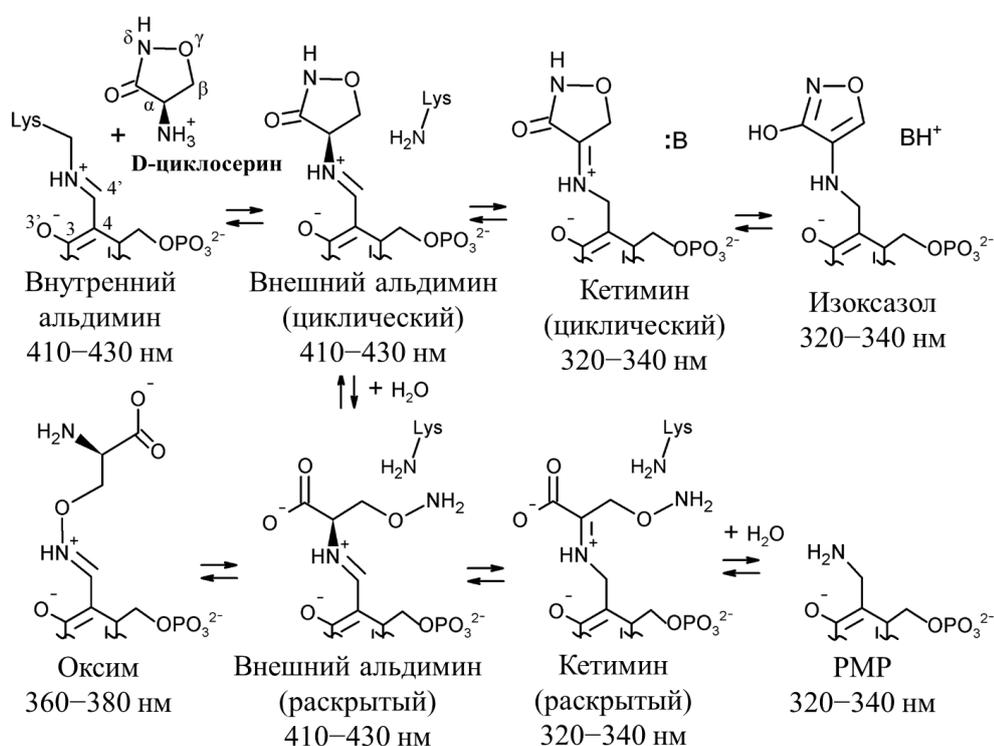


Рис. 14. Схема превращения D-цикloserина в активном центре ТА.

Превращения D-цикло-серина в активном центре TA_Halhy анализировали спектральными методами. Также получена кристаллическая структура комплекса. В реакционной смеси TA_Halhy и D-цикло-серина обнаружены: циклический кетимин, раскрытый кетимин, изоксазол, оксим и PMP (Рис. 14, 15). Циклический кетимин также наблюдался методом РСА в активном центре TA_Halhy (Рис. 11А). При этом оксим полностью выходит из активного центра, что подтверждается спектрами препарата после перевода в другой буфер (Рис. 15).

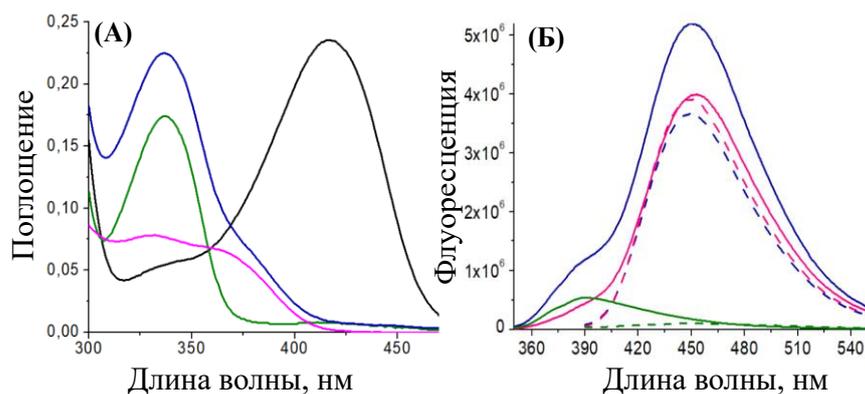


Рис. 15. Взаимодействие PLP-формы холофермента TA_Halhy (25 мкМ) с D-цикло-серином (25 мМ) в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С. (А) Спектр поглощения PLP-формы холофермента TA_Halhy до (черный), после выдерживания с D-цикло-серином в течение 30 минут (синий) и после смены буфера (зеленый). Спектр поглощения низкомолекулярной фракции (розовый). (Б) Спектры флуоресценции продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-цикло-серином до (синий) и после смены буфера (зеленый), спектр флуоресценции низкомолекулярной фракции (розовый) при длинах волн возбуждения 337 нм (сплошная линия) и 380 нм (пунктирная линия).

Ингибирование TA_Halhy D-цикло-серином обратимо. Реактивация холофермента TA_Halhy возможна как добавлением свободного PLP, так и субстратом α -кетоглутаратом. Восстановление PLP-формы фермента оценивали по соотношению A_{416}/A_{280} . Анализ спектров поглощения показывает вытеснение из активного центра аддуктов PLP и D-цикло-серина молекулой PLP, образование внутреннего альдимины и полное

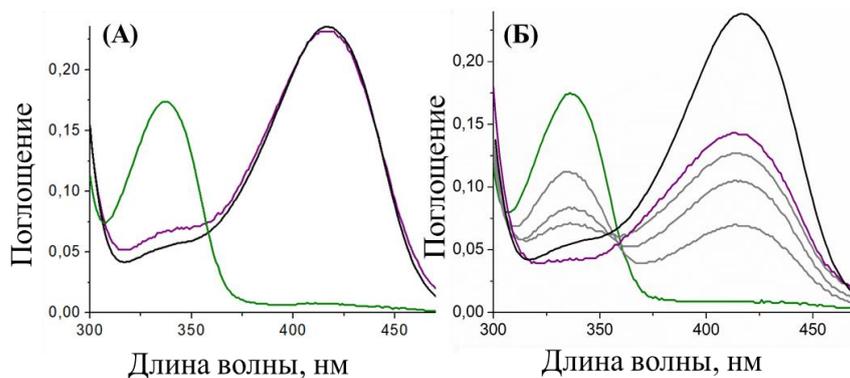


Рис. 16. Реактивация PLP-формы холофермента TA_Halhy. (А) Спектр поглощения PLP-формы TA_Halhy (25 мкМ) до (чёрный) и после выдерживания с D-цикло-серином (25 мМ) с последующей сменой буфера (зелёный), после добавления 250 мкМ PLP и повторной смены буфера (фиолетовый). (Б) Спектр поглощения PLP-формы TA_Halhy до (черный) и после выдерживания с D-цикло-серином с последующей сменой буфера (зеленый), после добавления α -кетоглутарата (10 мМ) спустя 2, 4, 6 (серый) и 24 часа (фиолетовый).

восстановление PLP-формы холофермента (**Рис. 16А**). Реактивация холофермента субстратом возможна через спонтанное образование PMP-формы при превращении D-цикосерина в активном центре TA_Halhy и последующую полуреакцию с α -кетоглутаратом с образованием PLP-формы холофермента (**Рис. 14,16Б**). Проведенные исследования показали обратимость ингибирования: аддукты PLP и ингибитора высвобождаются из активного центра, а образующийся апофермент при добавлении избытка PLP переходит в активный холофермент, при этом стабильность апофермента TA_Halhy вносит определяющий вклад в эффективность данного процесса. Обратимость ингибирования вследствие выхода продуктов ингибирования из активного центра возможна благодаря открытому активному центру TA_Halhy (**Рис. 10Б**).

Оценка эффективности TA_Halhy в стереоселективном аминировании α -кетокислот

TA_Halhy активна с алифатическими и ароматическими α -кетокислотами (**Табл. 6**). Значения максимальной скорости реакции снижается по мере удлинения алифатической боковой группы субстрата. При этом TA_Halhy чувствительна к наличию заместителей у C β атома субстрата. Среди ароматических субстратов фермент наиболее активен в реакциях с фенилпируватом и 4-гидрокси-фенилпируватом. Для оценки эффективности TA_Halhy в стереоселективном аминировании α -кетокислот была разработана трехферментная система (**Рис. 17**). В качестве аминодонора использовали D-глутамат. Для смещения равновесия трансаминазной реакции в сторону образования продукта – D-аминокислоты – применяли (R)-2-гидрокси-глутаратдегидрогеназу (ГГДГ) из *A. fermentas* для вывода α -кетоглутарата из реакционной смеси и глюкозодегидрогеназу (ГДГ) из *Pseudomonas* sp. для регенерации NADH.

Выход D-аминокислоты превысил 90% для большинства α -кетокислот, энантиомерный избыток продуктов превысил 99% (**Табл. 6**). TA_Halhy стабильна в условиях асимметрического синтеза: время полуинактивации превышало 24 часа.

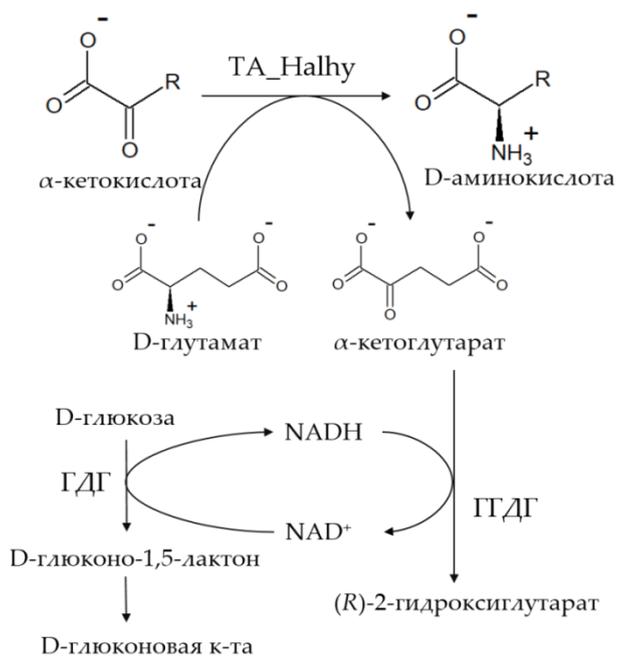


Рис. 17. Схема трехферментной системы для (R)-селективного аминирования α -кетокислот.

Табл. 6. Стереоселективное аминирование α -кетокислот, катализируемое TA_Halhy. V_{max} и k_{cat}/K_m получены в реакции между 10 мМ D-глутаматом и α -кетокислотами (0,2-150 мМ) в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 40 °С. Выходы и энантиомерные избытки (*ee*) D-аминокислот в трехферментной системе (50 мМ D-глутамат, 50 мМ α -кетокислота в 100 мМ КФБ, pH 7,5, при 30 °С) оценивали хроматографически.

Субстрат		V_{max} , U/мг	k_{cat}/K_m , M ⁻¹ c ⁻¹	Выход D-АК, %	<i>ee</i> , %
2-Оксобутират		71 ± 1	25000 ± 2000	99	>99,5
2-Оксовалерат		48 ± 4	2000 ± 200	96	>99,3
3-Метил-2-оксобутират		46 ± 2	1400 ± 200	99	>99,0
2-Оксогексаноат		4,6 ± 0,4	60 ± 10	99	>99,0
3-Метил-2-оксовалерат		17,6 ± 0,4	50 ± 20	90	>99,0
4-Метил-2-оксовалерат		35 ± 2	200 ± 10	98	>99,4
Фенилпируват		35 ± 2	560 ± 70	96	>99,3
Индол-3-пируват		3,7 ± 0,2	420 ± 40	75	>99,6
4-Гидроксифенил-пируват		34 ± 2	2400 ± 400	85	>99,7
2-Окси-4-фенилбутират		6,7 ± 0,4	240 ± 20	99	>99,1

Потеря кофактора в реакции приводит к снижению концентрации активного холофермента и негативно сказывается на выходе целевого продукта (**Рис. 13**). Был проведен подбор условий реакции, стабилизирующих холофермент. Уста-

новлено, что холоформу ТА_Nalhy можно стабилизировать повышением мольного соотношения аминокцептор/аминодонор и снижением температуры (Табл. 7). Полученные результаты повышают эффективность процессов оптимизации ферментов-биокатализаторов.

Табл. 7. Константы скорости утечки кофактора в разных реакционных условиях.

Условия реакции			k_{diss} , мин ⁻¹
Аминодонор	Аминакцептор	T, °C	
100 мМ D-аланин	10 мМ α -кетоглутарат	40	0,048 \pm 0,006
100 мМ D-аланин	10 мМ α -кетоглутарат	30	0,010 \pm 0,001
100 мМ D-аланин	50 мМ α -кетоглутарат	30	0,005 \pm 0,001
50 мМ D-аланин	50 мМ α -кетоглутарат	30	0,0030 \pm 0,0003
50 мМ D-глутамат	50 мМ 2-оксвалерат	30	0,0021 \pm 0,0003

Таким образом, ТА_Nalhy эффективна в стереоселективном аминировании алифатических и ароматических α -кетокислот. Высокая операционная стабильность, эффективная реактивация холофермента, высокие скорости трансаминирования и высокая стереоселективность – явные преимущества ТА_Nalhy как потенциального биокатализатора асимметричного синтеза D-аминокислот.

ВЫВОДЫ

1. Трансаминаза из *H. hydrossis* является «быстрой» трансаминазой D-аминокислот, k_{cat} составляет $215 \pm 6 \text{ с}^{-1}$ в реакции между D-глутаматом и пируватом при 40 °C. Трансаминаза из *H. hydrossis* наиболее специфична к D-глутамату.
2. В полуреакции трансаминазы из *H. hydrossis* с D-аминокислотами определены стадии: (1) образования внешнего альдимина, (2) 1-3-переноса протона, (3) выхода продукта и РМР из активного центра с накоплением апофермента. Образование хиноидного интермедиата не зафиксировано.
3. Остатки R28* и R90 в активном центре трансаминазы из *H. hydrossis* многофункциональны, они участвуют в связывании субстратов, в стабилизации активной формы кофактора, в стабилизации функционального димера. Вариант R90I активен с ароматическими первичными (R)-аминами.
4. D-циклосерин является обратимым ингибитором трансаминазы из *H. hydrossis*. Полная реактивация фермента возможна при добавлении PLP благодаря выходу аддуктов PLP и D-циклосерина из активного центра и стабильности апофермента.
5. Трансаминаза из *H. hydrossis* эффективно катализирует синтез разнообразных ароматических и алифатических D-аминокислот из соответствующих α -кетокислот, энантиомерный избыток продукта D-аминокислоты превышает 99%.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. **Bakunova A.K.**, Nikolaeva A.Y., Rakitina T. V., Isaikina T.Y., Khrenova M.G., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Y. The uncommon active site of D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis*: biochemical and structural insights into the new enzyme // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26(16). – P. 1-18. IF 4,4.
2. **Bakunova A.K.**, Isaikina T.Yu., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic and aromatic D-amino acids catalyzed by transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Catalysts*. – 2022. – Vol. 12(12):1551. – P. 1-17. IF 4,1.
3. **Bakunova A.K.**, Kostyukov A.A., Kuzmin V.A., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Mechanistic aspects of the transamination reactions catalyzed by D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. – 2023. – Vol. 1871(2). – P 1-8. IF 4,1.
4. **Бакунова А.К.**, Матюта И.О., Бойко К.М., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Механизм ингибирования D-циклосеринном трансаминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* // *Биохимия (Москва)*. – 2023. – Т. 88(5). – С. 841-853. IF 2,8.
5. **Bakunova A.K.**, Matyuta I.O., Minyaev M.E., Isaikina T.Yu., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Multifunctionality of arginine residues in the active sites of non-canonical D-amino acid transaminases // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2024. – Vol. 756. – P. 1-10. IF 3,9.

Тезисы докладов:

1. **Бакунова А.К.**, Ракитина Т.В., Бойко К.М., Безсуднова Е.Ю. Трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* – потенциальный биокатализатор синтеза природных и не природных D-аминокислот // *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии: Межвуз. сборник науч. трудов XV Всероссийск. конф. молодых ученых с международ. участием*. – Саратов: Изд-во «Саратовский источник». – 2021. – С. 54-56.
2. **Bakunova A.K.**, Matyuta I.O., Nikolaeva A.Yu, Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Interaction of D-cycloserine with a D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology (BGRS/SB-2022): The Thirteenth International Multiconference*. Institute of Cytology and Genetics, the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. – Novosibirsk: ICG SB RAS. – 2022. – P. 273.
3. **Бакунова А.К.**, Бойко К.М., Николаева А.Ю., Ракитина Т.В., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Трансаминаза из *Haliscomenobacter hydrossis*: причины и смысл перестройки активного центра при диссоциации кофактора пиридоксаль-5'-фосфата // *Научные труды. VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс* – М.: Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 121.
4. **Bakunova A.K.**, Matyuta I.O., Boyko K.M., Khrenova M.G., Popov V.O., Bezsudnova E.Yu. Revealing the structural basis of promiscuous activity of D-amino acid transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Novel Enzymes 2023. 7th International conference on Novel Enzymes*. Greifswald (Germany) – Austria: Published by ChemIT. – 2023. – P. 111.
5. **Бакунова А.К.**, Матюта И.О., Бойко К.М., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Активность трансаминазы из *Haliscomenobacter hydrossis* в реакциях с D-аминокислотами и (R)-аминами: стабилизация и специфичность // *Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения»* – М.: Издательство «Адмирал принт». – 2023. – С. 43.
6. **Бакунова А.К.**, Матюта И.О., Бойко К.М., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Многофункциональность остатков аргинина активного центра неканонической трансаминазы D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydrossis* // *Сборник тезисов докладов X Всероссийской научной молодежной школы-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции»*. – М.: Издательство ФИЦ ХФ РАН. – С. 111-112.