

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А.Н. БАХА

На правах рукописи

Бакунова Алина Константиновна

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

Специальность 1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
д.х.н. Безсуднова Екатерина Юрьевна

Москва, 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые ферменты.....	11
1.1.1. Свойства пиридоксаль-5'-фосфата в водных растворах.....	12
1.1.2. Каталитические свойства пиридоксаль-5'-фосфата.....	15
1.2. Механизм реакции трансаминирования	18
1.3. Депротонирование субстрата на стадии трансаминирования.....	20
1.4. Пространственная структура трансаминаз и связывание кофактора	23
1.5. Стабильность холофермента трансаминаз	25
1.6. Трансаминазы IV типа укладки	27
1.7. Канонические и неканонические трансаминазы D-аминокислот	29
1.8. Взаимодействие трансаминаз с ингибитором D-циклосерином.....	34
1.9. Применение трансаминаз	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1. Материалы и реактивы	41
2.2. Методы работы с ДНК и бактериальными клетками	41
2.2.1. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	41
2.2.2. Трансформация клеток <i>E. coli</i>	42
2.2.3. Электрофорез ДНК.....	42
2.2.4. Рестрикция и лигирование плазмидных ДНК.....	42
2.2.5. Выделение ДНК из клеток <i>E. coli</i> и из агарозного геля.....	43
2.2.6. Сайт-направленный мутагенез	43
2.2.7. Отбор колоний клеток <i>E. coli</i>	43
2.3. Методы анализа белков	44
2.3.1. Определение концентрации белков	44
2.3.2. Электрофорез белков в денатурирующих условиях	44
2.3.3. Спектральный анализ	44
2.4. Получение рекомбинантных форм ферментов	45
2.4.1. Клонирование генов ферментов.....	45
2.4.2. Получение вариантов TA_Halhu аминокислотными заменами	45
2.4.3. Препаративная экспрессия генов ферментов.....	46
2.4.4. Выделение и очистка ферментов	47
2.4.5. Получение PLP-формы и PMP-формы холофермента и апофермента.....	49
2.5. Анализ функциональных свойств TA_Halhu и вариантов.....	49
2.5.1. Определение активности трансаминаз	49
2.5.2. Определение рН- и температурного оптимумов реакций трансаминирования.....	52
2.5.3. Определение термостабильности WT TA_Halhu и вариантов.....	52
2.5.4. Анализ ингибирования TA_Halhu D-циклосерином.....	53
2.5.5. Анализ утечки кофактора из активного центра TA_Halhu.....	54
2.5.6. Определение константы диссоциации PLP-формы холофермента	55

2.5.7.	Определение выхода продукта и энантиомерного избытка в реакциях стереоселективного аминирования α -кетокислот, катализируемых TA_Halhy	55
2.6.	Рентгеноструктурный анализ.....	58
2.6.1.	Получение кристаллов TA_Halhy и вариантов.....	58
2.6.2.	Сбор и обработка дифракционных данных. Решение и уточнение структур TA_Halhy и вариантов	59
2.6.3.	Анализ кристаллических структур	61
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ		62
1.1.	Каталитические свойства трансаминазы из <i>H. hydrossis</i> (TA_Halhy).....	62
1.1.1.	Получение TA_Halhy в рекомбинантной форме	62
1.1.2.	Субстратная специфичность TA_Halhy в реакциях трансаминирования	63
1.1.3.	Термостабильность холофермента и апофермента TA_Halhy	64
1.1.4.	Спектральные свойства TA_Halhy.....	65
1.1.5.	Анализ полуреакций TA_Halhy с D-аминокислотами	66
1.1.5.1.	Общий ход кинетических кривых и стадия III.....	67
1.1.5.2.	Стадии I и II полуреакций TA_Halhy	70
1.1.5.3.	Кинетическая схема полуреакций	74
1.2.	Структурный анализ TA_Halhy	77
1.2.1.	Структура холофермента	77
1.2.2.	Структура комплекса TA_Halhy с D-цикloserином.....	80
1.3.	Свойства вариантов TA_Halhy: взаимосвязь структуры и функции	83
1.3.1.	Выбор аминокислотных замен	83
1.3.2.	Участие остатков R28*, R90 и R179 в стабилизации функционального димера и в связывании субстратов TA_Halhy.....	83
1.3.3.	Структурные детерминанты активности варианта R90I с первичными ароматическими (R)-аминами.....	89
1.3.4.	Участие остатков R28*, R90 и R179 в связывании кофактора и стабилизации холофермента.....	91
1.4.	Взаимодействие TA_Halhy с D-цикloserином.....	95
1.4.1.	Ингибирование TA_Halhy D-цикloserином.....	95
1.4.2.	Анализ продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином	97
1.4.3.	Реактивация TA_Halhy PLP и α -кетоглутаратом.....	98
1.5.	Применение TA_Halhy в стереоселективном аминировании α -кетокислот.....	101
1.5.1.	Оценка эффективности TA_Halhy в трехферментной системе.....	101
1.5.2.	Стабилизация холофермента TA_Halhy в реакционных условиях.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....		106
ВЫВОДЫ		108
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....		109
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....		112

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
- ГГДГ – (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназа из *Acidaminococcus fermentans*
- ГДГ – глюкозодегидрогеназа из *Pseudomonas* sp.
- ДДС – додецилсульфат натрия
- ДМСО - диметилсульфоксид
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДТТ – дитиотреитол
- ИПА – изопропиламин
- ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
- КД – круговой дихроизм
- КФБ – К-фосфатный буфер
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа из мышц кролика
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РСА – рентгеноструктурный анализ
- ТА – трансаминаза
- ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
- Трис – 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол
- ТФА – трифторуксусная кислота
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- AcPh – ацетофенон
- ААТ – аспартат-аминотрансфераза
- AR – аланинрацемаза
- AmicoTA – трансаминаза D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense*
- Blsa_TA – трансаминаза D-аминокислот из *Blastococcus saxobsidece*
- BCAT – трансаминаза разветвленных L-аминокислот
- bsDATA – трансаминаза D-аминокислот из *Bacillus* sp. YM-1
- CHES – N-циклогексил-2-аминоэтансульфоновая кислота
- CpuTA – трансаминаза из *Curtobacterium pusillum*
- DATA – трансаминаза D-аминокислот
- eBCAT – трансаминаза разветвленных L-аминокислот из *Escherichia coli*
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота
- МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
- MgiTA – DATA из *Microbacterium ginsengisoli*

MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота

NAD – никотинамидадениндинуклеотид

OASS – ацетилсерин-сульфгидрилазы

TaTT – трансаминаза из *Thermobaculum terrenum*

TA_Halhy – трансаминаза D-аминокислот из *Haliscomenobacter hydroxsis*

PDB – банк данных белковых структур

PLP – пиридоксаль-5'-фосфат

PMP – пиридоксамин-5'-фосфат

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

(R)-ATA – (R)-селективная аминтрансаминаза

(R)-PEA – (R)-(+)-1-фенилэтиламин

RMSD – среднеквадратичное отклонение положений атомов

T_{0,5} – температура полуперехода между нативным и денатурированным состоянием белка

TEV-протеаза – протеаза вируса гравировки табака (*Tobacco Etch Virus*)

WT – дикий тип

ВВЕДЕНИЕ

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 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-трансминировании 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-трансминирования, стереоспецифичность, стабильность и широкую субстратную специфичность трансминазы.

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость. Комплексный метод исследования взаимосвязи структуры и функции PLP-зависимой трансаминазы D-аминокислот из *H. hydrossis* позволил охарактеризовать новый активный центр у трансаминаз, 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 трансаминазы из *H. hydrossis* как биокатализатора синтеза разнообразных ароматических и алифатических D-аминокислот с энантиомерным избытком более 99%. Обоснованы практические достоинства нового активного центра трансаминазы D-аминокислот, а именно: высокая каталитическая эффективность,

стереоселективность и возможность регулирования активности. Стоит отметить, что важной характеристикой трансаминаз 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 трансаминазы 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, спектрофлуориметрия, 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. hydroxylis* 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Пиридоксаль-5'-фосфат-зависимые ферменты

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP) – является примером одного из самых распространенных кофакторов в живых системах. PLP участвует в метаболических реакциях широкого ряда, так, например, обнаружены PLP-зависимые ферменты, которые участвуют в метаболизме аминокислот, глицерофосфолипидов, биосинтезе жирных кислот, гема, биотина и т.д, а также в энергетическом обмене клетки. Ферменты, использующие PLP как кофактор катализируют такие реакции как, трансаминирование, рацемизация, декарбоксилирование, ретроальдольное расщепление, α - и β -элиминирование/замещение, фосфолиз и т.д. [1]. Реакции, катализируемые PLP-зависимыми ферментами, незаменимы в метаболизме: они участвуют в энергетическом обмене, в зависимости от типа трехмерной структуры выделяют семь групп ферментов (I-IV) [2,3]. Все PLP-зависимые ферменты за исключением V группы вовлечены в метаболизм азота. Трансаминазы обнаружены в I и IV группах. В PLP-зависимых ферментах в активном центре формируется основание Шиффа (другое название внутренний альдимин) между кофактором PLP и остатком лизина. В основе механизма действия пиридоксальных ферментов лежат превращения Шиффовых оснований PLP. Исследованию спектральных свойств, кислотно-основных и таутомерных равновесий Шиффовых оснований PLP посвящено множество работ [4–16]. Советские ученые принимали активное участие в изучении и развитии пиридоксалевого катализа. В 1930-х годах в институте экспериментальной медицины имени А.М. Горького в Москве начались первые работы под руководством Александра Евсеевича Браунштейна, которые положили начало исследованию ферментативного трансаминирования и метаболизма аминокислот [17,18]. В 1953 году А.Е. Браунштейн и М.М. Шемякин выдвинули общую теорию пиридоксалевого катализа [19]. Она включала в себя особенности электронных свойств кофактора, которые обеспечивают разные типы химических превращений, а также постулировала обязательное участие белковой молекулы в обеспечении протекания химической реакции и ее специфичности. В 1954 году группа американских ученых под руководством Снела (Snell) сформулировали схожие положения [20]. В 1978 году группой А.Е. Браунштейна совместно с Б.К. Вайнштейном и сотрудниками института кристаллографии имени В.А. Шубникова была получена первая пространственная структура аспартат-аминотрансферазы [21].

1.1.1. Свойства пиридоксаль-5'-фосфата в водных растворах

В водном растворе свободный PLP существует в форме альдегида и в гидратированной форме, последняя начинает доминировать только при рН ниже 5 [8]. PLP содержит три ионизируемые функциональные группы (**Рис. 1.1**). Значения рКа составляют 3,6 и 8,3 для ОЗ' и N1 атома, соответственно, значения рКа фосфатной группы составляют 2,4 и 6,4. При этом авторы отмечают, что при рН в диапазоне от 3,6 до 8,3 протон принадлежит частично N1 атому, а частично ОЗ' атому, а при указанном диапазоне рН протон на ~60% связан с N1 атомом, т.е. кислотно-основное равновесие PLP имеет сложный характер [15]. При образовании альдимины, основания Шиффа между альдегидной группой PLP и первичным амином, кислотно-основные свойства функциональных групп PLP меняются. Так электроноакцепторный эффект иминной группы снижает рКа N1 атома до 5,8, при этом ОЗ' атом остается депротонированным вплоть до рН 4, рКа фосфатной группы также снижаются (экспериментально определить значения рКа ОЗ' атома и фосфатной группы оказалось невозможно из-за гидролиза основания Шиффа при рН ниже 4) [15]. рКа иминного азота составляет 11,4, таким образом, при физиологических значениях рН иминный азот альдимины протонирован, N1, ОЗ' атомы и фосфатная группа депротонированы (**Рис. 1.1**).

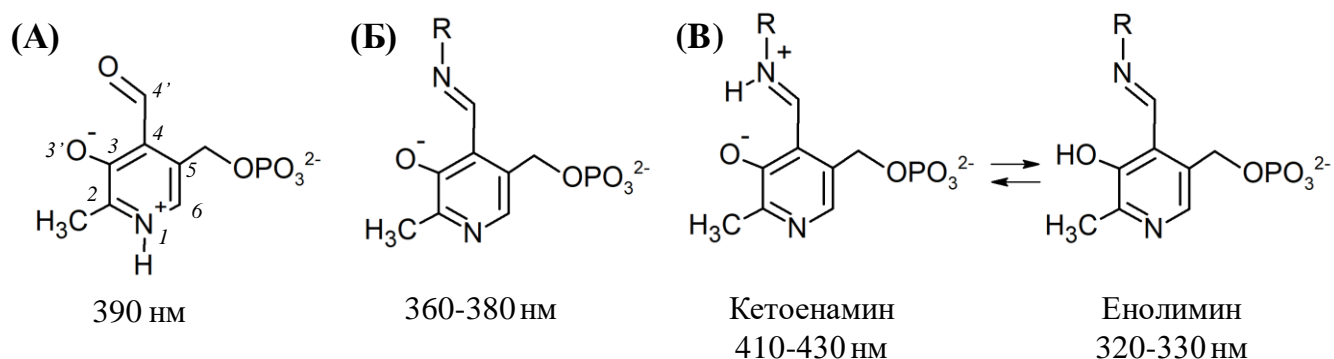


Рис. 1.1. Структурные формулы PLP (А), депротонированного (Б) и протонированного основания Шиффа PLP с первичным амином в двух таутомерных формах (В).

Спектральные свойства PLP во многом зависят от заместителя у С4' атома. PLP в форме альдегида имеет максимум поглощения при 390 нм, депротонированный альдимин – при 360-370 нм, а протонированный – при 410-420 нм [9]. В растворе альдимин в протонированной форме может иметь форму енолимина, в этом случае протон находится на ОЗ' атоме, и кетоенамина, в этом случае протон располагается на иминном атоме азота, при этом в водных растворах преобладает кетоенаминная форма (**Рис. 1.1**). Две таутомерные формы различаются спектральными свойствами: енолимин имеет максимум поглощения при ~330 нм, а максимум

флуоресценции (возбуждение при 330 нм) может наблюдаться при двух длинах волн ~390 нм и ~520 нм; кетонамин имеет максимум поглощения при ~410 нм, максимум флуоресценции (возбуждение при 410 нм) при ~520 нм [6,16]. Известно, что таутомерное равновесие сдвигается в сторону енолимина при переходе от полярного растворителя к неполярному, а протонирование N1 атома смещает равновесие в сторону кетонамина [7,14].

Кислотно-основные свойства функциональных групп PLP меняются при связывании кофактора в активном центре фермента, окружение каждой группы уникально внутри каждой группы PLP-зависимых ферментов, это позволяет тонко регулировать электронные свойства кофактора и путь, по которому протекает реакция (**Таблица 1.1**) [22–24].

Табл. 1.1. Разнообразие PLP-зависимых ферментов и координации функциональных групп PLP в них.

Фермент	Тип укладки	Тип реакции	N1	O3'	Фосфатная группа	Ароматическое кольцо	PDB коды
Аспартат-аминотрансфераза	I	Трансаминирование	D	N, Y	S, T, S, R, Y	W	1ARS
Треонин-альдолаза, Серингидроксиметилтрансфераза,	I	α -элиминирование	D	S, H / R	S, G, S, Y, H / T, G, R	H	4RJY, 2DKJ
Орнитиндекарбоксилаза, диалкилглициндекарбоксилаза	I	Декарбоксилирование	D	W (N γ) / E	T, S, S, S, S, H / T, A, G, H ₂ O	H / W	1ORD, 1ZOD
Сериндегидратаза, триптофан-синтаза, О-ацетилсерин сульфгидрилаза	II	β -элиминирование / β -замещение	C / S	N	G, G, G, G, L / G, G, G, S, N	F / H	1PWH, 1TTQ, 1Y7L
Цистатионин- γ -лиаза, Цистатионин- γ -синтаза	II	γ -элиминирование / γ -замещение	D	N	S, S, S, R, Y / S, S, S, R, Y	Y	6LE4, 1CS1
Аланинрацемаза	III	Рацемизация	R	R	Y, G, I, S, Y	H	2VD8
Трансаминаза D-аминокислот	IV	Трансаминирование	D	Y	T, T, I, R	L	1DAA
Гликогенфосфорилаза	V	Фосфоролит	H ₂ O	-	H ₂ O, H ₂ O, K, T, G	Y	1GPB
D-лизин-5,6-аминомутаза, лизин-2,3-аминомутаза	VI, VII	Радикальная изомеризация	S / H ₂ O	N / H ₂ O	S, T, Y, R, R / S, Y, Y, R, R	Y	1XRS, 2A5H

1.1.2. Каталитические свойства пиридоксаль-5'-фосфата

В активных центрах PLP-зависимых ферментов кофактор ковалентно связан с ϵ -аминогруппой каталитического остатка лизина, образуя внутренний альдимин (Рис. 1.2). Имин более электрофилен, чем альдегидная группа несвязанного PLP, это обуславливает повышенную реакционную способность данной формы кофактора. Во всех PLP-зависимых ферментах переход из внутреннего во внешний альдимин протекает по единому механизму нуклеофильного замещения при C4' атоме. Далее реакционные пути расходятся (Рис. 1.2). Переход из внутреннего альдимина во внешний может осуществляться через стадию образования промежуточного соединения – геминального диамина (гем-диамин). Мнения некоторых авторов по данному вопросу расходятся. Методом рентгеноструктурного анализа гем-диамин наблюдали в кристаллической структуре PLP-зависимой ГДФ-4-кето-6-дезоксид-D-манноза-3-дегидратазы [25], а методом электронной спектроскопии в реакции L-серин-глиоксалат-трансминазы с аналогом субстрата D-серином [26]. Также существует интересная гипотеза, что в гем-диаминах O3' атом кофактора содействует переносу протона с ϵ -аминогруппы каталитического остатка лизина на α -аминогруппу субстрата [24,27,28]. Расчетными методами на примере орнитиндекарбоксилазы показали, что в переносе протона может участвовать молекула воды или остаток тирозина активного центра [29].

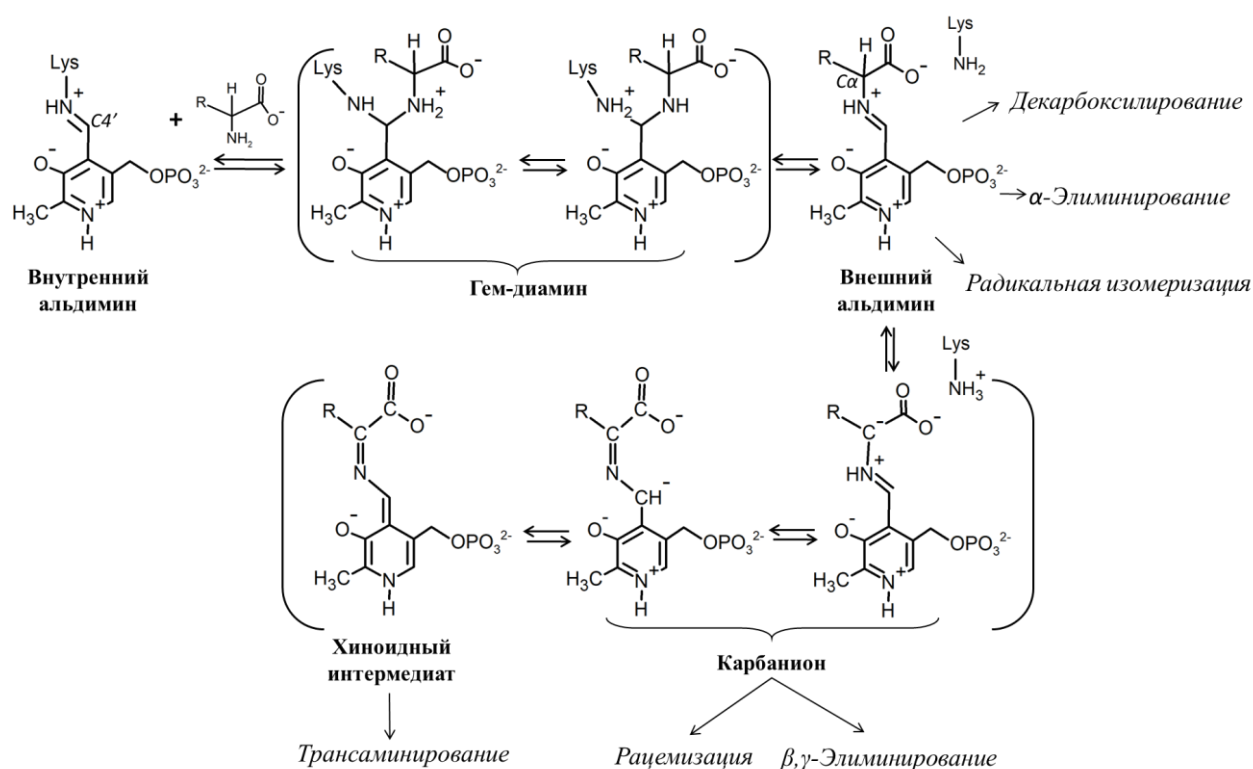


Рис. 1.2. Разнообразие реакций, катализируемых PLP-зависимыми ферментами.

Реакционный путь определяется не только ионным состоянием функциональных групп кофактора PLP, но и геометрией расположения боковых групп субстрата относительно плоскости кофактора. Разрыв связи у C α атома, как демонстрируют работы на модельных реакциях в растворе, считается самой энергозатратной стадией в пиридоксальном катализе [30–32]. Впервые принцип, согласно которому в активном центре PLP-зависимых ферментов происходит разрыв определенной связи, был сформулирован Г. Дунатаном (H. Dunathan) в 1966 г. [33]. Согласно данной гипотезе, расщепляется именно та σ -связь, которая оказывается перпендикулярной плоскости пиридинового кольца PLP. Так, декарбоксилазы катализируют разрыв связи между C α атомом и карбоксильной группой, а трансминазы – C α -H связь. Эффект гиперсопряжения с π -системой ослабляет разрывающуюся связь и стабилизирует образующийся карбанион [24,33]. Таким образом, электроноакцепторные свойства гетероароматического кольца PLP обеспечивают гетеролитический разрыв связи у C α атома во всех семействах PLP-зависимых ферментов за исключением семейства аминотуз, катализ в данном семействе протекает по радикальному механизму [34].

Отрыв протона у C α атома, который катализирует боковая группа остатка лизина, сопровождается образованием карбаниона, дальнейшая судьба которого также различна в зависимости от строения активного центра и ионного состояния внешнего альдимида (**Рис. 1.2**). Теоретические расчеты показывают, что протонирование N1 атома PLP способствует протонированию образующегося карбаниона по C4' атому как в случае реакции трансминирования, а не по C α атому как в случае реакции рацемизации [35]. Вообще экспериментальные работы на модельном Шиффовом основании PLP и глицина показывают, что образование основания Шиффа снижает рKa протона у C α атома глицина с ~29 до ~23, а протонирование N1 атома PLP снижает рKa ещё на 5 единиц до 17, тем самым значительно облегчая разрыв C α -H связи [30–32]. Интересно отметить, что протонирование O3' атома PLP снижает рKa до 11, а вместе с протонированием α -карбоксильной группы глицина рKa снижается до 6, однако такие ионные формы внешнего альдимида не рассматривают как функционально значимые [31]. Традиционно предположение об ионной форме внутреннего и внешнего альдимидов основывается на анализе спектральных свойств (поглощение и испускание), а также на анализе локального окружения PLP в активном центре [36–40]. Для реакции трансминирования протонированное состояние функциональных групп кофактора подробно исследовано для аспартат-аминотрансферазы (ААТ) из *E.coli* спектральными методами, методами ЯМР и нейтронной дифракцией [27,36–42]. Определено, что во внешнем альдимиде N1 атом протонирован, O3' атом депротонирован, иминный атом азота депротонирован в рабочем диапазоне рН (7,0-8,0). При этом во внутреннем альдимиде иминный атом азота

протонирован, протонное состояние других функциональных групп не меняется [41]. Интересно отметить, что в структуре, полученной методом нейтронной дифракции протонированный иминный азот внутреннего альдимины не образует водородную связь с O3' атомом, как предполагалось ранее, вместо этого протон делится между иминным азотом и α -карбоксовой группой субстрата [41].

Роль N1 атома азота PLP и его протонированного состояния в катализе была проанализирована в сравнительном ключе для ферментов I, II и III типа укладки (**Таблица 1.1**). В структуре ААТ (I тип укладки) N1 атом протонирован и формирует солевой мостик с D222 [40,41]. Наличие остатка аспартата (рКа боковой группы составляет 3,71) вблизи N1 атома повышает его рКа на 3 единицы, стабилизируя протонированное состояние N1 атома. В структуре O-ацетилсерин-сульфгидриказы из *Salmonella typhimurium* (OASS, II тип укладки) N1 атом образует водородную связь с S272, оставаясь, вероятно, в депротонированной форме [43]. В структуре аланинрацемазы из *Bacillus stearothermophilus* (AR, III тип укладки), остаток R219 препятствует протонированию N1 атома поскольку располагается на расстоянии водородной связи от него [44]. Замена D222A в ААТ приводила к снижению каталитической активности в 10^5 раз [45], замена R219A в AR – в 10^5 раз [46], а замена S272A в OASS – в четыре раза [47]. Для дальнейшего анализа роли N1 атома в пиридоксальном катализе были сконструированы ААТ, AR и OASS со связанным в активном центре аналогом PLP с заменой N1 атома на атом углерода – 1-дезапиридоксаль-5'-фосфатом (дезаPLP) [48]. Каталитическая активность дезаPLP-ферментов снизилась в 10^8 раз для ААТ, в 700 раз для AR и в 250 раз для OASS. Полученные результаты показывают, что реакции рацемизации и β -элиминирования не требуют образования долгоживущего карбаниона в отличие от реакции трансаминирования, более того было показано, что реакция β -элиминирования может протекать по одностадийному согласованному механизму (E2-механизм), который полностью исключает образование карбаниона [43].

Таким образом, стабилизация карбаниона за счет его резонансной формы – хиноидного интермедиата – необходима для реакции трансаминирования, а нестабильность карбаниона направляет реакцию по пути рацемизации [49]. Суммируя, активный центр фермента тонко модулирует электроноацепторную силу PLP, сводя к минимуму нежелательные побочные реакции, при этом сохраняя возможность протекания требуемой реакции [48].

Интересно отметить, что фосфатная группа кофактора PLP для некоторых ферментов не только служит якорем, удерживающим кофактор в активном центре, но и может непосредственно участвовать в катализе. Так, семейство гликогенфосфоорилазы принципиально отличается от

остальных PLP-зависимых ферментов: общий основно-кислотный катализ в активном центре осуществляет фосфатная группа PLP [50,51]. Однако весь каталитический цикл гликогенфосфорилазы PLP в активном центре ковалентно связан с остатком лизина, это защищает высокоактивную альдегидную группу PLP от компонентов клетки. Кислотно-основной катализ фосфатной группой также, вероятно, имеет место в реакции β -элиминирования, катализируемой сериндегидратазой [52]. Такая каталитическая роль фосфатной группы обеспечивается соответствующим аминокислотным окружением, которое тонко регулирует её кислотно-основные свойства. В активном центре сериндегидратазы отсутствует остаток аргинина вблизи фосфатной группы PLP, это приводит к повышению рKa, что дает ей возможность принимать протон (**Таблица 1.1**).

1.2. Механизм реакции трансаминирования

Механизм реакции трансаминирования был установлен для ААТ (I тип укладки). Работы по изучению кинетики и анализу кристаллических структур трансаминазы, проведенные в лабораториях проф. Браунштейна [17,18,21,53,54], проф. Снела (Snell, США) [55–57], проф. Фазеллы (Fasella, Италия) [58–60], проф. Хаяши (Hayashi, Япония) [38,39,61,62], проф. Кирша (Kirsch, США) [63–66], проф. Тони (Toney, США) [27,48,67–69] позволили определить ключевые промежуточные соединения и основные стадии реакции трансаминирования. Позднее ключевые интермедиаты были обнаружены в реакциях, катализируемых другими трансаминазами, что позволяет считать предложенный механизм универсальным [26,37,70].

Трансаминазы катализируют обратимый стереоселективный перенос аминогруппы с аминокислоты/аминна на кетокислоту/кетон (**Рис. 1.3**). Реакция протекает по механизму двойного замещения фермента, или "пинг-понг" механизму.

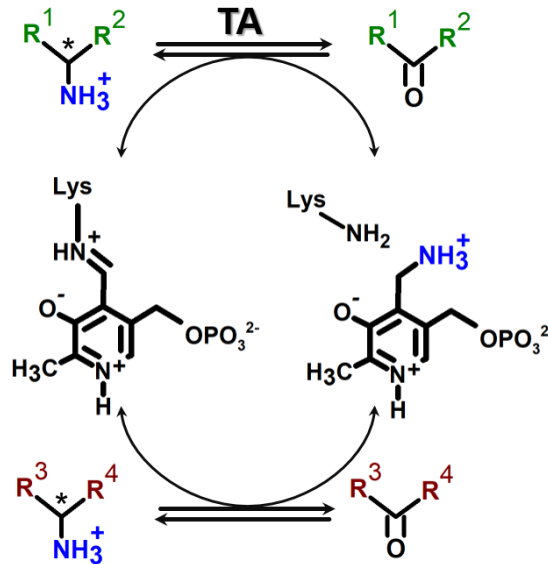


Рис. 1.3. Полная реакция трансаминирования.

Реакцию трансаминирования, то есть полный каталитический цикл можно разделить на две полуреакции: окислительное деаминирование субстрата-аминодонора (первая полуреакция) и последующее восстановительное аминирование субстрата-аминоакцептора (вторая полуреакция). Схема полуреакций приведена на **Рис. 1.4**: первая полуреакция между PLP-формой ТА и субстратом-аминодонором протекает слева направо, вторая полуреакция между PMP-формой ТА и субстратом-аминоакцептором протекает в обратном направлении через те же промежуточные соединения.

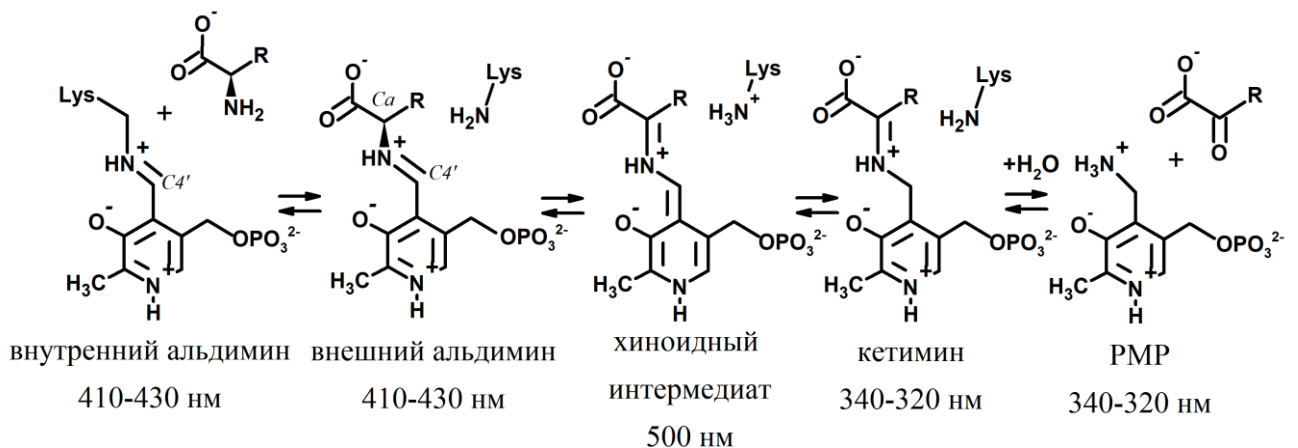


Рис. 1.4. Схема полуреакции трансаминирования с указанием максимумов поглощения промежуточных соединений.

На первом этапе первой полуреакции аминогруппа аминокислоты/амин (аминодонор) атакует C4' атом внутреннего альдимина по механизму нуклеофильного замещения с

образованием внешнего альдимины. Далее ϵ -аминогруппа лизина катализирует стереоспецифичный 1,3-перенос протона по механизму общесосновного катализа. Существует два механизма 1,3-перенос протона (1) в два этапа с отщеплением α -протона внешнего альдимины с образованием карбаниона (или хиноидного интермедиата) на первом этапе, и с переносом протона ϵ -аминогруппой остатка лизина на $C4'$ атом кофактора с образованием кетимина на втором этапе или (2) по согласованному механизму, когда отщепление и присоединение протона происходят в одну стадию при содействии ϵ -аминогруппы остатка лизина и фенольной группы остатка тирозина. Образование хиноидного интермедиата детектировали в полуреакциях серин-глиоксилат ТА из *Hyphomicrobium methylovorum* с медленными субстратами [26], также его накопление фиксировали при введении аминокислотных замен в активном центре ААТ из *E.coli* [71,72]. Кинетическим изотопным методом для трансаминазы разветвленных L-аминокислот из *Mycobacterium tuberculosis* и митохондриальной ААТ из сердца свиньи показано, что 1,3-перенос протона происходит согласованно без промежуточного образования хиноидного интермедиата [73,74]. Для диалкилглициндекарбоксилазы из *Pseudomonas cepacia*, одна из двух полуреакций которой является окислительное деаминирование, изотопный анализ показал, что 1-3-перенос протона протекает последовательно в две стадии [75]. Независимо от способа в результате 1,3-переноса протона образуется кетимин, который далее гидролизует по двойной связи $C=N$. Финальными продуктами реакции являются кетокислота и кофактор в форме пиридоксамин-5'-фосфата (PMP). Вторая полуреакция происходит строго в обратном порядке с образованием новой аминокислоты, а кофактор возвращается в исходную PLP-форму. Стадия 1,3-переноса протона является скоростью лимитирующей, однако в некоторых работах на основе результатов кинетического изотопного анализа предполагают, что скоростью лимитирующими стадиями также могут являться стадия гидролиза кетимина и даже стадия высвобождения продукта из активного центра [73,76]. Две формы ТА (PLP- и PMP-форма) обладают разными спектральными свойствами, таким образом за одним полуоборотом фермента (т.е. полуреакцией) можно наблюдать спектрофотометрически (Рис. 1.4).

1.3. Депротонирование субстрата на стадии трансиминирования

Первая полуреакция начинается с трансиминирования или нуклеофильной атаки аминогруппы субстрата $C4'$ атома PLP (Рис. 1.4). Для протекания нуклеофильной атаки аминогруппа субстрата должна быть депротонирована. При этом показано, что для эффективной нуклеофильной атаки иминный атом внутреннего альдимины должен быть протонирован, это повышает электрофильность $C4'$ атома [22]. Другими словами, в комплексе Михаэлиса аминокислота должна быть депротонирована, а внутренний альдимин протонирован. Однако при

оптимальных для трансминирования нейтральных рН аминогруппа аминокислот протонирована, так как значение рКа варьируется в диапазоне рН 9-10. Таким образом, из приведенных в литературе экспериментальных данных следует, что в реакцию вступают (1) протонированная аминокислота и депротонированный внутренний альдимин, эта комбинация сопровождается переносом протона на иминный азот внутреннего альдимины [62] или (2) протонированная аминокислота и протонированный внутренний альдимин и тогда возникает вопрос депротонирования субстрата или его активации [77–79]. Вопрос депротонирования субстрата для нуклеофильной атаки в подробностях исследовался для ААТ и ТА ароматических аминокислот (I тип укладки) и было предложено, что протон с аминогруппы аминокислоты переносится на депротонированный внутренний альдимин [39,80,81]. У этих ТА максимальная активность наблюдается при рН 7,0-8,0, и при этих рН иминный азот их внутреннего альдимины существует в депротонированном состоянии (рКа внутреннего альдимины этих ТА составляет 6,6-6,8) [36,37]. Такое низкое значение рКа внутреннего альдимины по сравнению с альдиминем PLP и амина в растворе (рКа больше 11) объясняют несколькими факторами: (1) протонирование N1 атома PLP понижает рКа иминной группы на 2,5 единицы [82]; (2) электростатический эффект от двух остатков аргинина активного центра понижает рКа на 0,7 [80]; (3) напряжение, выводящее иминную группу из плоскости пиридинового кольца, понижает рКа на 2,8 [39]. Источником напряжения являются остаток лизина, ковалентно связанный с PLP, а также остатки, участвующие в координации функциональных групп кофактора, вместе они физически препятствуют расположению иминной двойной связи в плоскости кофактора, делая протонирование иминной группы неблагоприятным. Напряжение выражается в том, что в холоферменте ТА I типа укладки иминная связь внутреннего альдимины выведена из плоскости пиридинового кольца PLP (двугранный угол C3-C4-C4'-N составляет 46-91°) (PDB коды 1ARS, 5VJZ). Альтернативной гипотезе напряжения является гипотеза внутримолекулярных электронных сил, которые стабилизируют неплоскую конформацию внутреннего альдимины [41]. После образования комплекса Михаэлиса протон с аминокислоты предположительно переносится на иминный атом азота. Данная гипотеза подтверждается структурами внутреннего и внешнего альдиминов ААТ, полученными методом нейтронной дифракции [41]. Однако такой перенос протона требует значительного повышения рКа основания Шиффа при связывании субстрата. Было показано, что при образовании комплекса Михаэлиса с дикарбоновой кислотой нейтрализуются положительные заряды двух аргининов активного центра, а также происходит частичная релаксация напряжения за счет ослабления связи между O3' атомом и боковой группой остатка N194, наблюдаемая релаксация является следствием конформационных перестроек [39,80]. Экспериментально рассчитанное значение рКа внутреннего альдимины в

таком комплексе Михаэлиса (PLP-форма ТА + дикарбоновая кислота - аналог субстрата) составляет 8,8 [83]. Напряжение внутреннего альдимины также рассматривается как дестабилизация исходного состояния, что в свою очередь можно отнести к механизму ускорения ферментативной реакции [84].

Интересно, что описанный выше механизм не применим для других представителей ТА I типа укладки, например ω -амин ТА из *Sphaerobacter thermophilus* и *Vibrio fluvialis* [85,86], аланин-глиоксилат-трансаминазы человека [87] и орнитин-трансаминазы человека [88]. Показано, что их внутренний альдимин в рабочих условиях протонирован, так как спектры поглощения холоферментов имеют максимум при ~ 410 нм с плечом при ~ 330 нм, которые соответствуют протонированному внутреннему альдимины в кетонаминной и енолиминной форме, соответственно. Вопрос депротонирования субстрата аминодонора для данных ТА в литературе не обсуждается.

Аналогичная ситуация наблюдается для трансаминаз IV типа укладки, иминный азот их внешнего альдимины сохраняет протонированное состояние до pH 10 [73,78,89–92], тогда как оптимум каталитической активности лежит в диапазоне pH 7,0-9,0. За последние 20 лет для разных ТА данного суперсемейства был предложен ряд механизмов активации субстрата. Так, для трансаминаз разветвленных L-аминокислот была выдвинута гипотеза, согласно которой в комплексе Михаэлиса перед нуклеофильной атакой протон с аминогруппы субстрата сбрасывается в отрицательно заряженную область, сформированную фосфатной группой PLP и α -карбоксовой группой L-аминокислоты, такой перенос протона энергетически выгоден, поскольку ослабляет электростатическое отталкивание двух отрицательно заряженных групп [79]. В случае трансаминаз D-аминокислот ввиду противоположной стереоселективности α -карбоксовая группа субстрата связывается в активном центре с противоположной стороны от фосфатной группы кофактора [78,93,94]. На основе молекулярно-динамических расчетов был предложен механизм, при котором протон с аминогруппы D-аминокислоты переносится на её α -карбоксовую группу, при этом α -карбоксовая группа протонируется, а отрицательно заряженная O3' группа PLP может стабилизировать её с помощью водородной связи [78]. Предложенные механизмы, однако, не могут быть реализованы в случае ферментов активных с субстратами без α -карбоксовой группы, таких как (R)-селективные аминтрансаминазы. В одной из работ было предположено, что в депротонировании субстрата участвует гистидин активного центра, который «стягивает» протон с аминогруппы амина на себя опосредовано через молекулу воды [77]. Однако обнаруживаются гомологичные ферменты, у которых соответствующее остатку гистидина положение занимают остатки лейцина или аргинина [95,96],

это ставит под сомнение универсальность предложенного механизма. Вопрос депротонирования субстрата поднимался и для других PLP-зависимых ферментов [28,52]. Например, согласно механизму реакции, предложенному для сериндегидратазы из печени крысы, протон с аминогруппы серина переносится на фосфатную группу PLP, осуществление кислотно-основного катализа фосфатной группой оказывается возможным за счет её аминокислотного окружения в активном центре: в ее связывании участвуют только остатки глицина (а именно их главная цепь), и на расстоянии водородной связи не обнаруживается остатка аргинина, как в случае трансаминаз (**Таблица 1.1**), это повышает рКа фосфатной группы. Для фермента из *Xanthomonas oryzae* с цистатионин- γ -лиазной активностью был предложен перенос протона с аминогруппы субстрата на O3' атом PLP, который далее катализирует согласованный перенос протона между атомами азота гем-диамина (**Рис. 1.2**) [28].

Таким образом, на сегодняшний день нет общего стройного механизма, согласно которому осуществляется депротонирование аминогруппы субстрата на первой стадии полуреакции – нуклеофильной атаке по C4' атому PLP.

1.4. Пространственная структура трансаминаз и связывание кофактора

Трансаминазы относятся к PLP-зависимым ферментам I и IV типа укладки. Функциональной единицей трансаминаз является гомодимер, субъединица которого имеет α/β -структуру (**Рис. 1.5А,Б**). Однако некоторые ТА в растворе существуют в виде тетрамера (два функциональных димера) или гексамера (три функциональных димера) [91,92,97,98]. Два симметричных активных центра формируются остатками обеих субъединиц. В структуре ТА I типа кофактор обращен к белковой глобуле *si*-стороной, тогда как в структурах ТА IV типа – *re*-стороной, т.е. 1-3-перенос протона, катализируемый остатком лизина, протекает на *si*- и *re*-стороне, соответственно (**Рис. 1.5В**) [1,99].

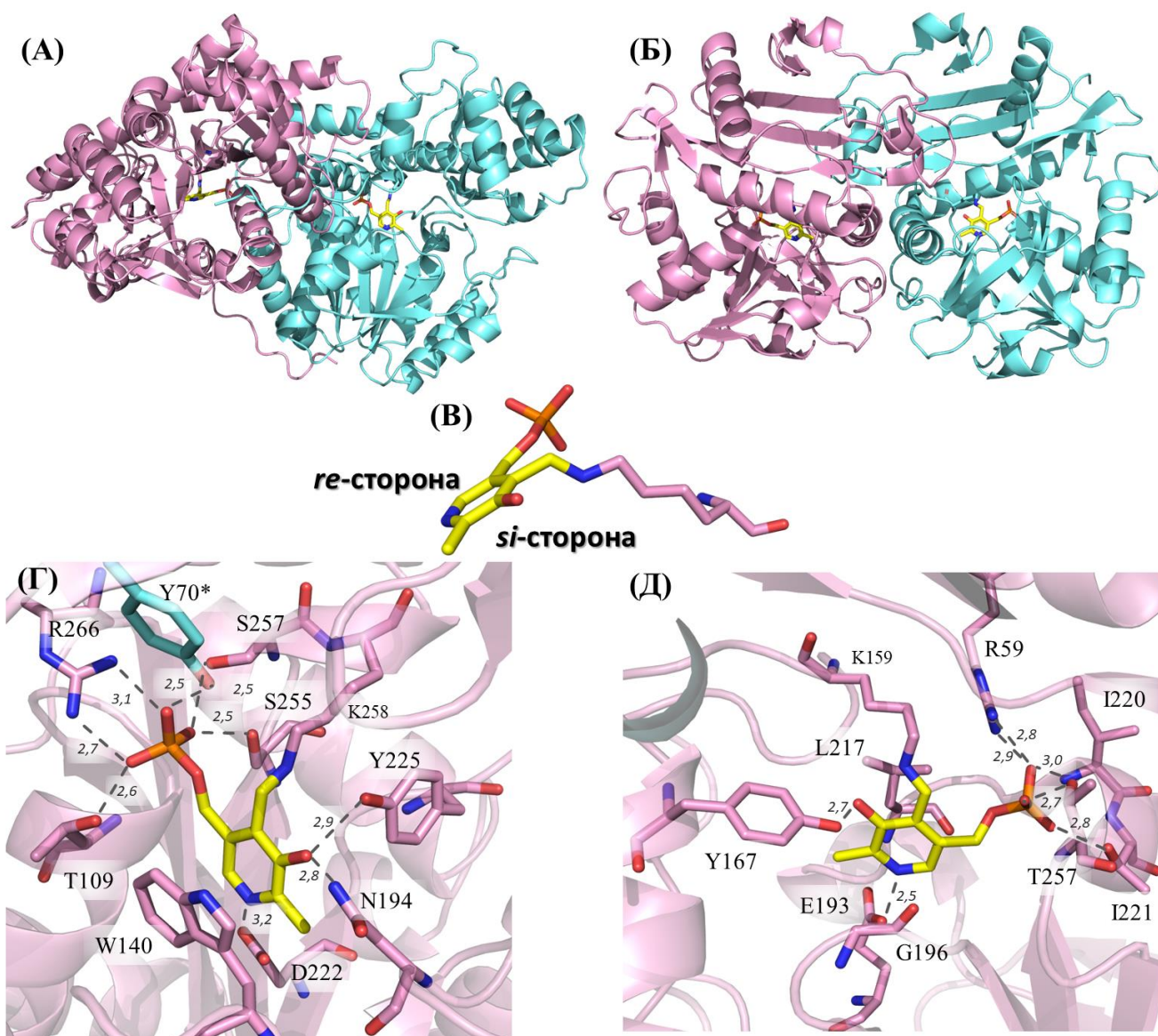


Рис. 1.5. Структура ТА. (А) Функциональный димер ААТ из *E. coli* (I тип укладки, PDB код 1ARS). (Б) Функциональный димер ТА разветвленных L-аминокислот из *E. coli* (eVCAT, IV тип укладки, PDB код 1H1K). (В) Молекула PLP, связанная с каталитическим остатком лизином, с указанием *si*- и *re*- сторон. (Г, Д) Связывание PLP в активном центре ААТ (Д) и eVCAT (Е). Молекула PLP показана желтым, остатки активных центров розовым и голубым. Каждая полипептидная цепь в димерах покрашена отдельным цветом. Расстояния указаны в ангстремах и показаны пунктиром.

Несмотря на различную пространственную структуру молекула PLP в активных центрах ТА обоих суперсемейств координированы сходным образом (Рис. 1.5Г,Д). Фосфатная группа связана остатком аргинина, остатками аминокислот с полярной боковой группой, а также атомами основной цепи. Протонированный N1 атом образует солевой мостик с отрицательно заряженным остатком глутамата или аспартата. ОЗ' атом связан остатком тирозина (в случае ТА IV типа) или остатками аспарагина и тирозина (в случае ТА I типа). Положение кофактора

дополнительно стабилизировано взаимодействием с его ароматическим кольцом: в случае ТА I-типа это π - π взаимодействие с остатком триптофана; в случае ТА IV типа – σ - π взаимодействие с боковой группой лейцина, расположенного со стороны белковой глобулы, а со стороны входа в активный центр взаимодействие с атомом азота главной цепи (G196). Роль некоторых остатков в связывании PLP была подтверждена сайт-направленным мутагенезом. Так, замена L201A (L217 на **Рис. 1.5Д**) в ТА D-аминокислот (IV тип укладки) приводила к быстрой инактивации фермента, вероятно, из-за повышенной подвижности кофактора [100]. Замена Y70F в ААТ из *E.coli* приводила к снижению константы диссоциации комплекса фермента с PLP в 100 раз [101].

Для ААТ из *E.coli* показано, что остаток Y225, координирующий O3' атом PLP важен для катализа, так как поддерживает правильное протонированное состояние внутреннего альдимины [71]. Замена Y225F приводила к снижению каталитической константы в 400 раз. Показано, что внутренний альдимин варианта при нейтральных pH находится в протонированном состоянии из-за увеличения его pKa на две единицы. Важность водородной связи между O3' атомом PLP и аминокислотными остатками – донорами протонов – была показана и для других PLP-зависимых ферментов. Предполагается, что такая водородная связь усиливает электроакцепторные свойства кофактора и, следовательно, эффективность катализа [27,102]. Роль N1 атома кофактора и его координации подробно рассмотрена в Разделе 1.1.2.

1.5. Стабильность холофермента трансминаз

Стабильность холофермента ТА (комплекса апофермента и кофактора) зависит от сродства апофермента к кофактору, литературные данные по сродству апофермента к PLP варьируются в широком диапазоне. Например, для ААТ из *E.coli* константа диссоциации комплекса фермента с PLP ($K_{d(PLP)}$) составляет 0,0004 нМ [101] – это наименьшие из известных в литературе значений для ТА. $K_{d(PLP)}$ для других ТА I типа укладки, например, для аланин-глиоксилат ТА человека $K_{d(PLP)}$ составляет 0,3 мкМ [87], а для (S)-селективных ω -трансминаз – 12-60 мкМ [98]. Для трансминаз IV типа укладки литературных данных о $K_{d(PLP)}$ нет. Вторая форма кофактора, PMP, не имеет ковалентной связи с апоферментом и координирована водородными связями и электростатическими взаимодействиями, и, следовательно, связана с ферментом менее прочно. Для ААТ из *E.coli* $K_{d(PMP)}$ составила 1,3 нМ, что в 3000 раз ниже, чем для PLP [101]. Работ, направленных на повышение стабильности холофермента с помощью рационального дизайна, немного. Например, для ω -ТА из *Chromobacterium violaceum* сродство к PLP было повышено в три раза путем модификации второй координационной сферы кофактора [98].

Для многих PLP-зависимых ферментов диссоциация холофермента (т.е. выход кофактора из активного центра), приводящая к образованию апофермента, является одним из путей инактивации, так как апофермент часто более склонен к денатурации и агрегации, чем холофермент [103–107]. Предполагают, что образование апофермента происходит преимущественно вследствие выхода из активного центра нековалентно связанного PMP [105,106]. В ходе ферментативной реакции в стационарной фазе PLP- и PMP-формы существуют в динамическом равновесии, однако диссоциация PMP-формы холофермента ТА приводит к накоплению апофермента и его денатурации, а также смещению равновесия в сторону PMP-формы фермента. Было показано, что добавление избытка аминоксубстрата к ТА приводит к снижению термостабильности: наблюдалось понижение времени полуинактивации и температуры плавления фермента [105,108]. С другой стороны, увеличение концентрации кетосубстрата, а также добавление кофактора PLP в реакционную смесь или в буфер для хранения повышает время полуинактивации и температуру плавления ТА [105,108,109]. То есть, стабилизация ТА достигается путем смещения в условиях реакции динамического равновесия в сторону более стабильной PLP-формы холофермента или связыванием образующегося апофермента со свободным PLP. Однако отмечается, что добавление большого избытка кофактора может снижать каталитическую активность ТА, поскольку при этом наблюдается замещение PMP на PLP в активном центре, это подавляет вторую полуреакцию и, соответственно, скорость синтеза аминоксубпродукта [105]. В лабораторных исследованиях ТА в реакционной смеси всегда присутствует свободный PLP (10-100 мкМ) для поддержания концентрации рабочей формы фермента на постоянном уровне [89,90,110,111]. В условиях, приближенных к производственным процессам, концентрацию PLP в реакционных смесях повышают до 2-5 мМ [112,113].

Для некоторых ТА обнаружены структурные различия между холо- и апоферментом. Для ω -ТА (I тип укладки) из *C. violaceum* и *V. fluvialis* обнаружено, что некоторые элементы вторичной структуры в отсутствие кофактора либо неупорядочены, либо имеют конформацию отличную от холофермента, стоит отметить что изменения в структуре наблюдаются не только в активном центре, но и в межсубъединичном контакте [114,115]. Для ω -ТА из *C. violaceum* предложенная схема необратимой инактивации вследствие потери кофактора включала стадию диссоциации функционального димера на мономеры [116]. Интересно, что добавление не только кофактора PLP, но и иона фосфата, способствовало более длительному сохранению димерной формы фермента, подобный эффект объясняется тем, что в связывании фосфатной группы участвуют остатки обеих субъединиц (**Рис. 1.5Г**). Можно сделать вывод, что наличие фосфатной группы структурирует разупорядоченные элементы вторичной структуры, стабилизирует

межсубъединичный контакт и глобулу в целом [117]. Суммируя литературные данные, можно заключить, что PLP рассматривается как определяющий структурный фактор стабильности холофермента ТА.

1.6. Трансаминазы IV типа укладки

Суперсемейство трансаминаз IV типа укладки включает ферменты с исключительно разнообразной субстратной специфичностью. Выделяют три семейства: трансаминазы разветвленных L-аминокислот (BCAT, EC 2.6.1.46), трансаминазы D-аминокислот (DATA, EC 2.6.1.21) и (R)-селективные аминтрансаминазы активные с первичными (R)-аминами и кетонами ((R)-ATA, EC 2.6.1.B21). Каждая субъединица ТА IV типа укладки включает два домена, соединенных междоменной петлей (**Рис. 1.6**). Малый домен имеет α/β -структуру, большой домен представляет собой псевдобаррель [94,118–120]. Две субстрат-связывающих области можно выделить в активном центре: O-карман – со стороны O3' атома кофактора и P-карман – со стороны фосфатной группой PLP (**Рис. 1.6Б**). Элементы вторичной структуры, формирующие активный центр, консервативны внутри суперсемейства и включают: β X- и β Y-тяжи, β -поворот1 и 2, петлю O-кармана и междоменную петлю [94,118–120]. Аминокислотный состав каждого элемента различается между семействами, определяя субстратную специфичность (**Таблица 1.2**) [94]. В 2010 г. группа проф. Борншойера выделила характеристические мотивы – фрагменты аминокислотной последовательности (на β X- и β Y-тяжах и петле O-кармана) [121]. Поиск и анализ таких характеристических мотивов новой последовательности ТА позволяют отнести ее к одному из трех семейств. Последующий систематический анализ показывает, что аминокислотные составы β -поворота 1 и 2 также консервативны внутри каждого из трех семейств (**Таблица 1.2**) [97].

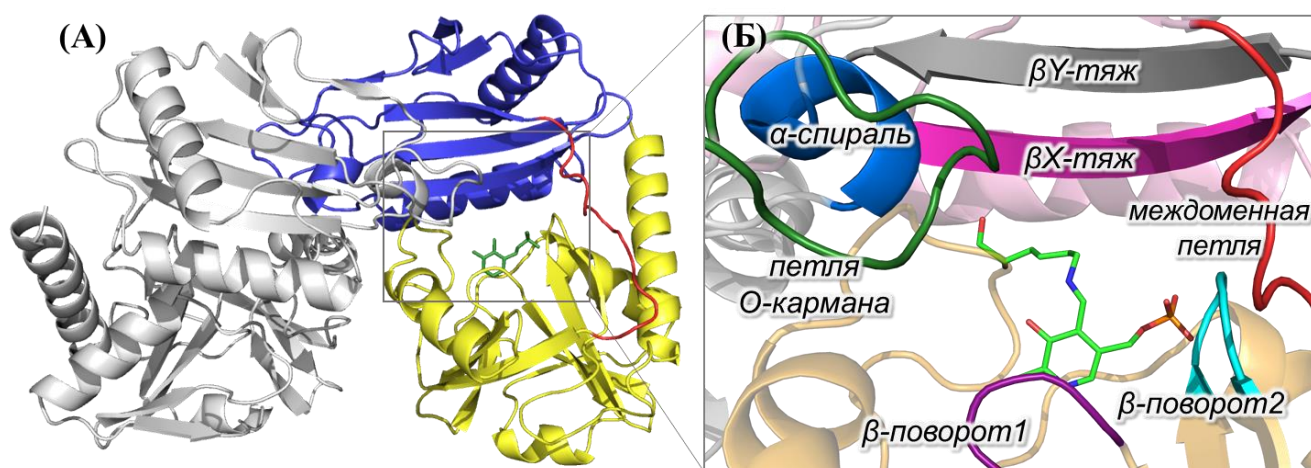


Рис. 1.6. Структура трансаминаз IV типа укладки. (А) Функциональный димер ТА. В правой субъединице синим обозначен малый домен, желтым – большой домен, красным – междоменная петля, серым – соседняя субъединица. Зеленым цветом обозначена молекула PLP. (Б) Активный центр ТА: малиновым и чёрным отмечены β X- и β Y-тяжи, соответственно, темно зелёным – петля О-кармана (относится к соседней субъединице), синим – α -спираль О-кармана (относится к соседней субъединице), фиолетовым и голубым – β -поворот1 и β -поворот2, соответственно. Зеленым отмечены молекула PLP и каталитический остаток лизина.

Табл. 1.2. Элементы вторичной структуры и их аминокислотный состав, которые образуют активный центр семейств BCAT, DATA и (R)-АТА суперсемейства ТА IV типа укладки. Подчеркнуты аминокислотные остатки, входящие в характеристические мотивы, предложенные группой проф. Борншойера [121].

ТА	Аминокислотные остатки, формирующие активный центр						PDB код
	α -спираль	β X-тяж	β Y-тяж	Петля О-кармана	β -поворот1	β -поворот2	
BCAT из <i>E. coli</i>	<u>31</u> <u>Y</u> xxxx <u>F</u> x <u>G</u> x <u>R</u> <u>40</u> ... <u>95</u> <u>Y</u> x <u>R</u> <u>97</u> ... <u>107</u> <u>M</u> x <u>V</u> <u>109</u> ... <u>194</u> GAGE ¹⁹⁷ ... <u>256</u> GTA <u>A</u> ²⁵⁹						1HK
DATA из <i>Bacillus</i> sp. YM-1	<u>26</u> <u>F</u> xxxx <u>Y</u> x <u>V</u> x <u>K</u> <u>35</u> ... <u>86</u> <u>H</u> x <u>Y</u> <u>98</u> ... <u>98</u> <u>R</u> x <u>H</u> <u>100</u> ... <u>178</u> GSSS ¹⁸¹ ... <u>240</u> STTS ²⁴³						1DAA
(R)-АТА из <i>Aspergillus fumigatus</i>	<u>53</u> <u>H</u> xxxx <u>Y</u> x <u>V</u> x <u>S</u> <u>62</u> ... <u>113</u> <u>F</u> x <u>E</u> <u>115</u> ... <u>125</u> x <u>R</u> x ¹²⁷ ... <u>213</u> GSGF ²¹⁶ ... <u>273</u> TTAG ²⁷⁶						4CHI

Важно отметить, что с помощью такого *in silico* алгоритма был обнаружен ряд биотехнологически значимых ферментов стереоселективного аминирования – (R)-АТА [96,121–123]. Однако с 2016 года были обнаружены BCAT и DATA с характеристическими мотивами активного центра отличными от канонических, приведенных в Таблице 1.2, новые BCAT и DATA проявляли широкую субстратную специфичность и/или имели дополнительную активность с первичными (R)-аминами. Так, были описаны BCAT с широкой субстратной специфичностью из *Thermoproteus uzoniensis* [124] и *Vulcanisaeta moutnovskia* [125]. Также были

описаны ВСАТ из *Thermobaculum terrenum* [97] и *Haliangium ochraceum* [126], активные в реакциях как с L-аминокислотами, так и с (R)-аминами, и ДАТА из *Curtobacterium pusillum* [127], *Microbacterium ginsengisoli* [127], и *Blastococcus saxobsidenc* [128], активные с D-аминокислотами и (R)-аминами. Другими словами, канонические мотивы не охватывают всего разнообразия ТА IV типа укладки, хотя и позволяют определить субстратную специфичность ТА по аминокислотной последовательности. Поиск последовательностей новых трансаминаз с аминокислотным составом активного центра, отличным от канонических, является эффективным подходом для обнаружения ферментов с оригинальной субстратной специфичностью. Трансаминазы с широкой субстратной специфичностью и дополнительной активностью – это полезные базовые модели для разработки биокатализаторов стереоселективного аминирования органических соединений со сложной структурой.

1.7. Канонические и неканонические трансаминазы D-аминокислот

ДАТА катализируют перенос аминогруппы с D-аминокислоты на α -кетокислоту. В качестве субстратов ДАТА могут выступать различные D-аминокислоты и α -кетокислоты. На сегодняшний день ДАТА обнаружены в бактериях и растениях [78,89,90,110,111,119,127–130]. В бактериях ДАТА задействованы в биосинтезе D-глутамата из α -кетоглутарата и D-аланина (Рис. 1.7), последний образуется из L-аланина в реакции рацемизации, катализируемой аланинрацемазой [131]. D-глутамат и D-аланин – это важные компоненты пептидогликана, который входит в состав клеточной стенки бактерий. Предполагают, что в растениях ДАТА участвуют в метаболизме D-аланина, D-глутамата и D-аспартата, которые требуются для процессов роста и развития [129]. У млекопитающих ДАТА не обнаружены, однако в тканях млекопитающих, в том числе и человека находят свободные D-аминокислоты. Основным ферментом катаболизма D-аминокислот у млекопитающих является оксидаза D-аминокислот [132]. D-аминокислоты проявляют множество биологических функций, например, D-аспартат функционирует как нейромедиатор и играет важную роль в процессах обучения и памяти [133], D-серин вовлечен в процессы развития и эндокринные функции [134], D-триптофан регулирует хемотаксис лейкоцитов [135].

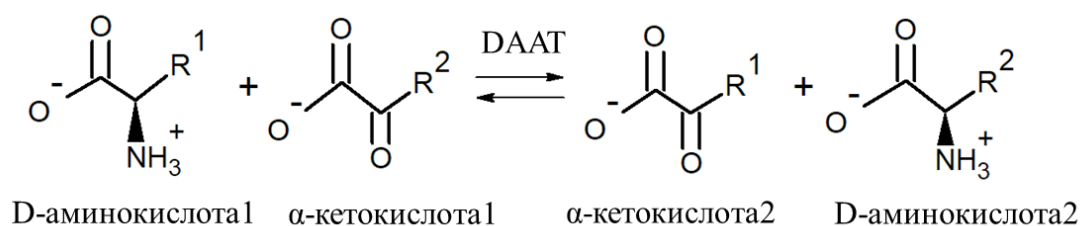


Рис. 1.7. Схема реакции трансаминирования, катализируемая DATA.

Исторически первой была подробно изучена бактериальная DATA из *Bacillus* sp. YM-1 (bsDATA). Анализ кристаллических структур холофермента bsDATA и комплексов с D-аланином и D-циклосерином (PDB коды 1DAA, 3DAA и 2DAA) показал, что α -карбоксильную группу субстратов связывают в O-кармане три остатка Y31, R98*, H100* ((*)) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера), формирующие так называемую карбоксилатную ловушку (**Рис. 1.8А**) [93,136]. Анализ вариантов bsDATA показал, что замена R98*М приводит к снижению каталитической константы (k_{cat}) реакции *D*-аланин + α -кетоглутарат в 10 000 раз [137]. Замена Y31А или Y31Q приводит к снижению k_{cat} в 1000 или в 100 раз, соответственно [138,139]. Однако, остаток Y31 помимо связывания субстрата также участвует в связывании PLP, координируя его O3' атом. Таким образом, снижение каталитической активности при замене Y31А может быть связано не только с ухудшением связывания α -карбоксильной группы субстрата, но и с изменением электронных свойств кофактора. γ -Карбоксильная группа природного субстрата D-глутамата предположительно связывается в Р-кармане остатком K35, замена которого на аланин селективно снижает константу специфичности к α -кетоглутарату [138].

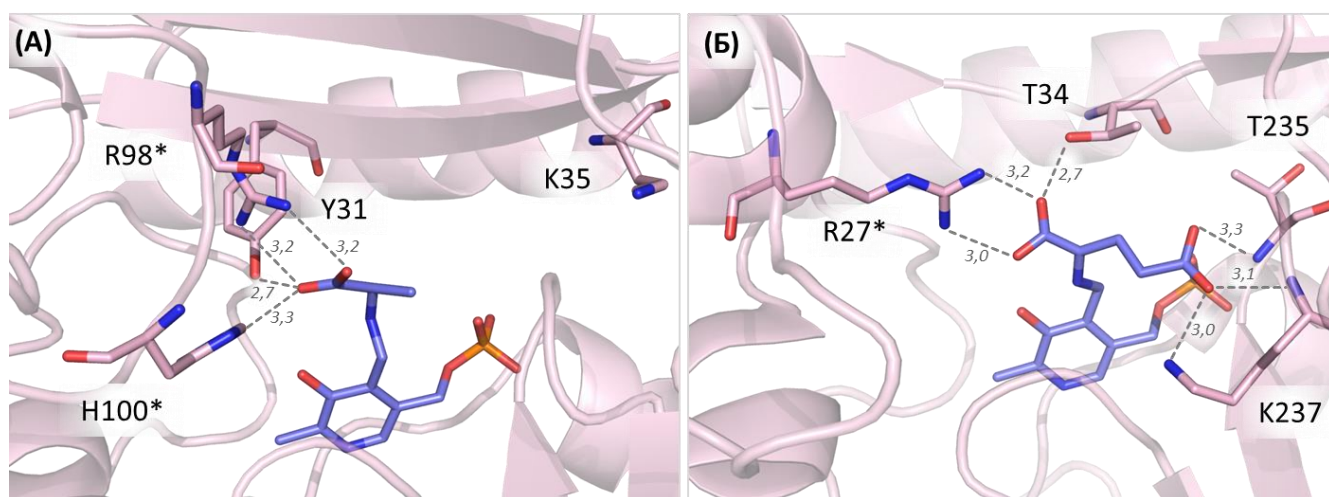


Рис. 1.8. Связывание субстратов в активных центрах канонических и неканонических DATA. (А) Активный центр канонической DATA из *Bacillus* sp. YМ-1 в комплексе с D-аланином (PDB код 3DAA). (Б) Активный центр неканонической DATA из *A. colombiense* (PDB код 8AYK). Аминокислотные остатки активного центра показаны розовым, аддукты PLP и субстратов – сиреневым. Остатки соседней субъединицы функционального димера отмечены звездочкой (*). Пунктиром отмечены водородные связи, расстояния указаны в ангстремах (Å).

В 2016 году были описаны две DATA с другим, чем у канонической bsDATA мотивом активного центра (**Таблица 1.3**) [127]. Позднее было показано, что данная группа ТА характеризуется консервативным мотивом **R-[RK]** [78,128]. В результате изучения DATA из *Aminobacterium colombiense* (AmicoTA) методами рентгеноструктурного анализа и точечного мутагенеза предложен механизм связывания субстратов в активном центре новой неканонической группы DATA (**Рис. 1.8Б**) [78,140]. α -Карбоксильную группу субстрата в О-кармане связывают остатки R27*, H175 и T34, при этом R27* играет ключевую роль в связывании субстрата, так как его замена приводит к инактивации фермента. γ -Карбоксильную группу D-глутамата в Р-кармане связывает боковая группа остатка K237 и атомы азота основной цепи остатков T235 и K237. Для ТА из *S. pusillum* (CpuTA) в качестве остатков, координирующих α -карбоксильную группу, предлагаются R51* и K117 [127]; для ТА из *B. saxobsidence* (BlasaTA) – R34*, S41, R96, и T191 [128] (**Таблица 1.3**).

Табл. 1.3. Аминокислотный состав структурных элементов, формирующих активный центр DATA. Множественное структурное выравнивание DATA из *Bacillus* sp. YM-1 (bsDATA, PDB код: 1DAA) [119], *C. pusillum* (CpuTA, 5K3W) [127], *Microbacterium ginsengisoli* (MgiTA, UniProt код: A0A1P8SD74, для анализа использовали модель структуры, полученную с помощью сервера AlphaFold) [127], *B. saxobsidense* (BlasaTA, 8PNW) [128], *M. tuberculosis* (mtDATA, 6Q1R), и *A. colombiense* (AmicoTA, 8AYK) [78]. Консервативные аминокислотные остатки выделены **жирным**. bsDATA как репрезентативный представитель канонических DATA выделена серым цветом, неканонические DATA – без цвета. (*) – петля О-кармана не участвует в формировании активного центра у неканонических DATA.

	О-карман		Р-карман	О-карман	Вход	Р-карман
DATA	α -спираль О-кармана	β X-тяж	β Y-тяж	Петля О-кармана	β -поворот1	β -поворот2
bsDATA	²⁴ YGF ²⁷	²⁹ GV ^{YE} VVKVY ³⁷	⁸⁵ GHI ^Y FQVT ⁹²	⁹⁸ RAH ¹⁰⁰	¹⁷⁸ GSSS ¹⁸¹	²⁴⁰ STTS ²⁴³
CpuTA	⁴⁹ ITRG ⁵²	⁵⁴ GV ^{FET} IAVI ⁶²	¹¹⁴ LFAKLILT ¹²¹	*	²⁰⁸ GPTS ²¹¹	²⁷⁰ SSVR ²⁷³
MgiTA	⁴² ITRG ⁴⁵	⁴⁷ GV ^{FET} IAVI ⁵⁵	¹¹¹ AVIKLILS ¹⁰⁸	*	¹⁹⁷ APTA ²⁰⁰	²⁵⁹ SSVR ²⁶²
BlasaTA	³² LGRG ³⁵	³⁷ GI ^{FES} VAVV ⁴⁵	⁹³ GVCRLFLT ¹⁰⁰	*	¹⁸⁹ GPTS ¹⁹²	²⁵¹ SGVR ²⁵⁴
mtDATA	²⁴ AVRG ²⁷	²⁹ GV ^{FET} LLVR ³⁷	⁸⁷ GALRLIYS ⁹⁴	*	¹⁸³ GPRS ¹⁸⁶	²⁵² SSMT ²⁵⁵
AmicoTA	²⁵ IQRG ²⁸	³⁰ GV ^{FET} ISTH ³⁸	⁸⁵ TMV ^R PYIT ⁹²	*	¹⁷³ GSHS ¹⁷⁶	²³⁴ GTVK ²³⁷

Среди DATA неканонической группы CpuTA, MgiTA и BlasaTA отличаются дополнительной активностью с первичными (R)-аминами [127,128]. Такая субстратная специфичность предполагает связывание в О-кармане активного центра как α -карбоксильной группы D-аминокислоты/ α -кетокислоты, так и гидрофобной группы первичного (R)-амина. Связывание в одной области активного центра двух разных по природе боковых групп субстратов не редкое явление для ТА IV типа укладки. Так, О-карман BCAT сформирован неполярными и полярными аминокислотными остатками, которые чередуются между собой. Сайт, образованный боковыми группами остатков аргинина и тирозинов и атомом азота основной цепи петли О-кармана, связывает γ -карбоксильную группу α -кетоглутарата, а гидрофобные включения обеспечивают координацию неполярных боковых групп разветвленных L-аминокислот (**Рис. 1.9А**) [79,118,141]. (R)-АТА активны с разнообразными первичными (R)-аминами, а также с пируватом и D-аланином. Двойное субстратное узнавание достигается за счет подвижности петли О-кармана, на которой располагается остаток аргинина, связывающий α -карбоксильную группу субстрата. В закрытом положении петли остаток аргинина направлен в активный центр и способен связывать α -карбоксильную группу в О-кармане, тогда как открытое положение петли, по-видимому, обеспечивает связывание гидрофобных заместителей

первичных (*R*)-аминов в О-кармане (**Рис. 1.9Б**) [142,143]. Стоит отметить большую длину петли О-кармана у изученных (*R*)-АТА (18 остатков) по сравнению с остальными ТА IV типа укладки (14-16 остатков).

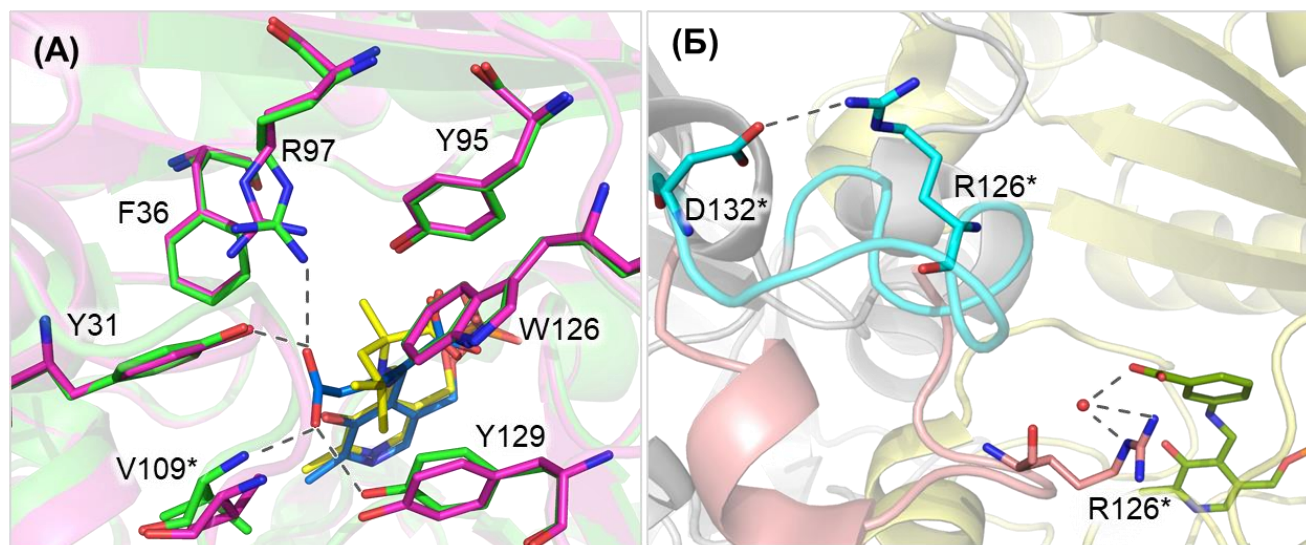


Рис. 1.9. Реализация связывания двух разных по природе боковых групп субстратов в активных центрах BCAT и (*R*)-АТА. (А) Наложение активных центров комплексов BCAT из *E.coli* с L-глутаматом (зеленый, PDB код 1IYE) и L- α -метиллейцином (розовый, PDB код 1IIL). Аддукт PLP и L-глутамата показан синим, аддукт PLP и L- α -метиллейцина – желтым. (Б) Активный центр комплекса (*R*)-АТА из *A. fumigatus* с м-карбоксифенилом (PDB код 4UUG), голубым и розовым отмечена петля О-кармана в открытом и закрытом положениях, соответственно, зеленым отмечен аддукт PLP с ингибитором. Оранжевым отмечен аддукт PLP и фенилгидразина. Остатки соседней субъединицы функционального димера отмечены звездочкой (*). Пунктиром отмечены водородные связи.

Разнообразие субстратной специфичности при одинаковой геометрии активного центра у ТА IV типа укладки порождает иллюзию возможности изменения субстратной специфичности ТА путем перебора остатков активного центра. Несколько таких попыток было предпринято. В 2020 году группой проф. Борншойера была проведена работа по инженерии канонических BCAT из *E. coli* (eBCAT) и bsDATA с целью введения дополнительной активности с первичными (*R*)-аминами [144]. Сравнительный анализ структур BCAT, DATA и (*R*)-АТА позволил идентифицировать остатки в активных центрах eBCAT и bsDATA, замены которых приводили к появлению детектируемой активности с (*R*)-PEA (3,5-12 мU/мг). В работе с применением методов рационального дизайна и направленной эволюции также были предприняты попытки увеличить активности с (*R*)-аминами варианта eBCAT, которые однако оказались не успешными. В то время для bsDATA провели дополнительный компьютерный дизайн и ко-эволюционный анализ, в результате введения предсказанных *in silico* шести аминокислотных

замен остатков активного центра в области связывания субстратов, активность в реакции (*R*)-*PEA* + *α*-кетоглутарат достигла 0,3 U/мг в 50 mM CHES буфере, pH 9,0, при 30 °C, что сопоставимо с активностью классических природных (*R*)-АТА (0,1-10 U/мг) [96,121–123]. Однако, полученный вариант был практически неактивен в реакции *D*-глутамат + пируват. Таким образом, авторы показали принципиальную возможность введения активности с первичными (*R*)-аминами в канонических АТА и предположили эволюционное родство между АТА и (*R*)-АТА. В 2021 году на примере ВСАТ из *T. terreum* (ТаТТ) активной в реакциях с L-аминокислотами и с (*R*)-аминами была проанализирована возможность сужения субстратной специфичности АТА с широкой до активности только с первичными (*R*)-аминами [145]. Методом рационального дизайна удалось увеличить константу специфичности к (*R*)-фенилэтиламину в 100 раз. Проведенный структурно-функциональный анализ вариантов ТаТТ позволил заключить, активный центр ТаТТ уникален: наблюдаемая широкая субстратная специфичность природного фермента не является результатом простой комбинации остатков, характерных для ВСАТ и (*R*)-АТА. Стоит отметить, что при исследовании ряда вариантов AmicoАТА (группа неканонических АТА) не удалось обнаружить активности с первичными (*R*)-аминами [78]. Таким образом, изменение субстратной специфичности АТА остается сложной задачей для белковой инженерии.

1.8. Взаимодействие трансаминаз с ингибитором D-цикloserином

Ингибиторы применяют как эффективные инструменты для изучения механизма действия ферментов, исследования особенностей строения и функционирования активного центра. D-цикloserин является циклическим аналогом D-серина или D-аланина и ингибитором PLP-зависимых ферментов: трансаминаз, декарбоксилаз и рацемаз [136,146–149]. Это соединение применяют в терапии туберкулеза, механизм действия препарата основан на ингибировании PLP-зависимой аланинрацемазы из *Mycobacterium tuberculosis* [150]. Взаимодействие D-цикloserина с кофактором PLP в активном центре фермента протекает подобно субстратам аминокислотам. На первой стадии образуется внешний альдимин, далее аминогруппа остатка лизина катализирует стереоселективный 1-3 перенос протона с образованием кетимина – аддукта РМР и кетопроизводного D-цикloserина (Рис. 1.10). Последующее отщепление протона от Cβ атома приводит к образованию аддукта гидроксиизоксазола и РМР (изоксазол). Исторически описанный путь превращения считался необратимым за счет образования стабильного ароматического изоксазола [136,146,147]. Недавние исследования с использованием методов ЯМР и флуоресцентной спектроскопии показали, что изоксазол может превращаться в оксим, образованный PLP формой кофактора и β-аминоокси-D-аланином, в результате гидролиза D-цикloserина до β-аминоокси-D-аланина (раскрытая форма D-цикloserина) с последующей

внутримолекулярной перегруппировкой, как в растворе, так и в активном центре аланинрацемаз [151]. Более того для аланин-глиоксилат трансминазы человека предлагается третий путь превращения D-циклосерина в активном центре фермента с образованием PMP формы кофактора, реакция протекает через образование раскрытого кетимина, с последующим гидролизом [148]. Анализ кристаллографических данных комплексов PLP-зависимых ферментов с D-циклосерином показал, что в большинстве депонированных структур встречается изоксазол (PDB коды: 5U3F, 3E6E, 1VFS, 1EPV, 2DAA) [136,146,147,152,153] или циклический альдимин (PDB коды: 2RJH, 1I2L, 1D7S, 5FAJ, 3TCM, 4D9F) [149,154–157]. Однако также в активных центрах наблюдался циклический кетимин (PDB код 1D7U) [149] и PMP [148] (PDB код 6RV0). Совокупность результатов спектральных, кинетических, ЯМР и кристаллографических исследований позволяет представить взаимодействие D-циклосерина и PLP в активном центре ферментов в виде схемы (Рис. 1.10), демонстрирующей обратимость всех стадий реакции.

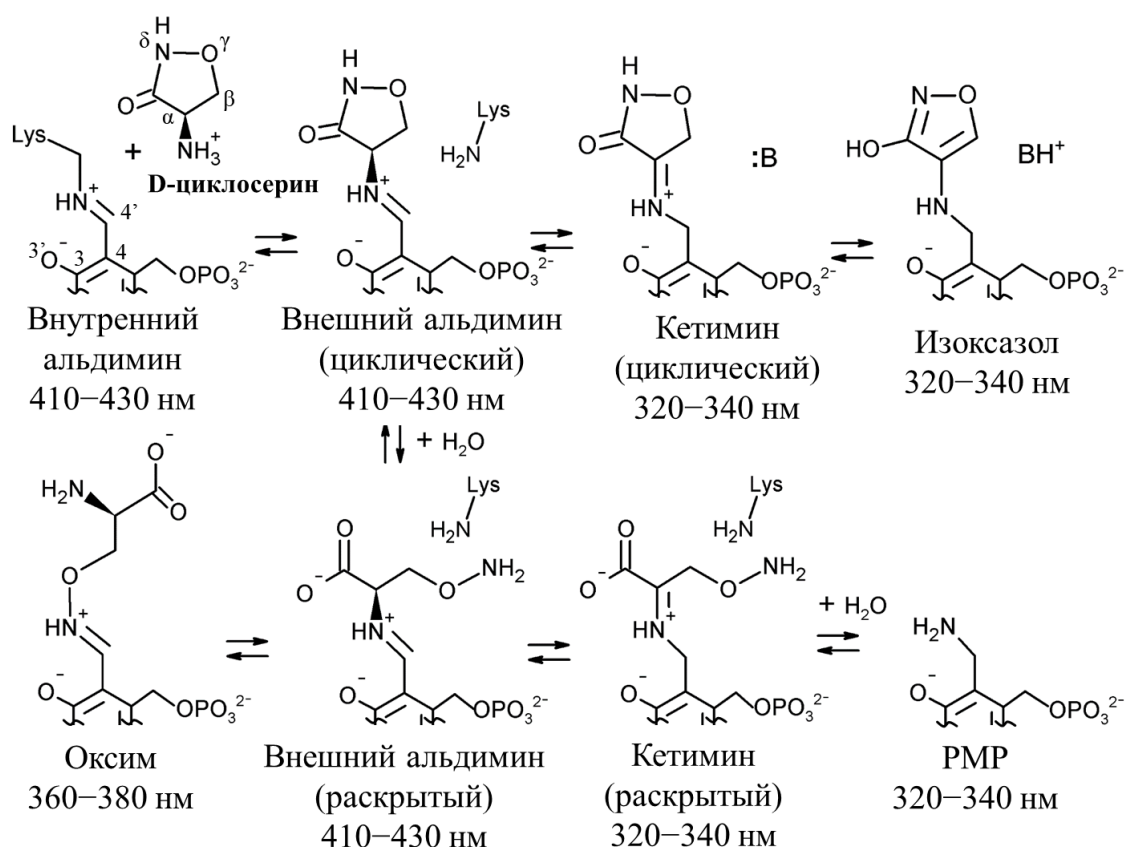


Рис. 1.10. Схема превращения D-циклосерина в активном центре PLP-зависимых ферментов с указанием максимумов поглощения образующихся соединений.

В работах, посвященных взаимодействию трансминаз с D-циклосерином сообщается как об обратимом, так и о необратимом ингибировании. Так, для bsDATA и трансминазы разветвленных L-аминокислот из *M. tuberculosis* показано, что D-циклосерин необратимо

ингибирует ферменты при pH 8,0-8,5 [147,158], однако при pH 6,5-7,5 активность bsDATA восстанавливается путем диализа в присутствии избытка PLP [158]. Ингибирование аланин-глиоксилат-трансминазы человека D-циклосерином обратимо [148]. В то время как основным продуктом взаимодействия BCAT из *M. tuberculosis* и bsDATA является изоксазол [136,147], для аланин-глиоксилат ТА было показано образование оксима и РМР формы кофактора, изоксазола не обнаружено [148]. Описанные ТА имеют разную укладку, а также разный состав функциональных групп активного центра.

Для некоторых ферментов эффективность ингибирования D-циклосерином увеличивается со временем. Такое поведение объясняется схожестью механизмов превращения D-циклосерина и субстратов в активных центрах PLP-зависимых ферментов. Максимальная степень ингибирования будет достигнута через некоторое время тогда, когда скорость связывания ингибитора с ферментом меньше, чем скорость полуреакции ТА с субстратом [146–148].

1.9. Применение трансминаз

Ферменты давно зарекомендовали себя как эффективные биокатализаторы синтеза широкого спектра соединений [159–163]. Однако ряд «недостатков» природных ферментов, таких как узкая субстратная специфичность, низкая термостабильность и устойчивость в водно-органических средах, ограничения по концентрации субстратов, требования кофакторов и т.д. сдерживает их широкое применение в органическом синтезе. Подходы для разработки эффективных биокатализаторов развиваются и совершенствуются с каждым годом и включают в себя методы направленной эволюции в комбинации с высокопроизводительным скринингом для отбора вариантов с улучшенными свойствами, рационального дизайна с активным внедрением искусственного интеллекта и т.д. для отбора вариантов с улучшенными свойствами [164,165]. Развитие в данной области невозможно без глубокого понимания взаимосвязи структурой и функцией фермента. И несмотря на быстро развивающиеся методы машинного обучения, главным источником знаний в этой области на сегодня остаются экспериментальные данные, получаемые путем анализа каталитических свойств и структур природных трансминаз, а также их мутантных вариантов.

Оптически активные аминосоединения представляют собой важнейшие структурные блоки для синтеза различных лекарственных препаратов, пестицидов и других соединений со сложной структурой [166]. Около 40% всех синтезируемых лекарственных препаратов в своей химической структуре имеют фрагмент хирального амина [167]. Поэтому подходы к эффективному синтезу аминосоединений продолжают разрабатываться и совершенствоваться.

Химический катализ, зарекомендовавший себя в промышленности, имеет серьёзные недостатки, такие как жёсткие условия проведения реакций (высокие температура и давление), дорогие хиральные лиганды и токсичные метало-катализаторы [168–170]. На пути к «зеленой химии» для синтеза хиральных аминсоединений активно разрабатываются биокаталитические подходы с применением разных типов ферментов: аминдегидрогеназ [171,172], липаз [173] иминоредуктаз [174,175] и трансаминаз [176–183]. Каждый из указанных типов ферментов имеет свои достоинства и недостатки. Например, аминдегидрогеназы позволяют добиться рекордной атомной экономии (atom economy), поскольку в качестве источника азота используется ион аммония, а побочным продуктом является вода, однако аминдегидрогеназы редко встречаются в природе, и природные ферменты катализируют реакции только с α -кетокислотами [171,172]. Некоторые липазы обладают высокой активностью и высокой стереоселективностью, однако, поскольку их используют для кинетического разделения рацематов, максимальный теоретический выход процесса составляет 50%. Иминоредуктазы позволяют синтезировать оптически чистые вторичные и третичные (*R*)- и (*S*)-амины, однако склонность C=N связи к гидролизу в водной среде вносит определенные сложности для широкого применения иминоредуктаз [174,175].

В качестве преимуществ трансаминаз, как биокатализаторов, можно отметить следующее. Трансаминазы катализируют прямое аминирование прохиральных кетосоединений с высоким энантиомерным избытком продукта (более 99%) [176–180,183–185]. При этом среди природных трансаминаз находятся как (*R*)-, так и (*S*)-стереоселективные ферменты [1,121,176,178–180], что расширяет перспективы их применения. Трансаминазы не требуют регенерации дорогостоящего кофактора PLP, что, например, необходимо в случае NAD(P)-зависимых дегидрогеназ [186], поскольку к концу одного каталитического оборота кофактор PLP возвращается в свою исходную форму. Природные трансаминазы разнообразны по своей субстратной специфичности, обнаруживаются трансаминазы специфичные к субстратам с аминогруппой у α -, β -, γ - и ω -положениях относительно карбоксильной группы, а также трансаминазы активные с субстратами без карбоксильной группы [1,187].

Однако трансаминазы не лишены недостатков. Так, трансаминазная реакция является обратимой: значение термодинамической константы равновесия реакции варьируется в пределах единицы [188,189]. Для смещения равновесия в сторону целевых продуктов необходимо удаление копродукта из реакционной смеси. Революционным прорывом для биотехнологического применения ТА стало использование изопропиламина в качестве аминодонора. Преимуществом изопропиламина помимо его дешевизны является легкое

удаление из реакционной смеси продукта его деаминации, ацетона [190,191]. Другим подходом для смещения равновесия ГА реакции стало применение сопряженных ферментативных реакций [192–195]. Лактатдегидрогеназу, аланиндегидрогеназу и диаминопимелатдегидрогеназу наиболее часто применяют в таких сопряженных системах [192–195]. При этом могут возникнуть дополнительные трудности, так в случае дегидрогеназ требуется регенерация кофактора NAD(P)H, для решения этой проблемы в систему вводят третий фермент, например, глюкозодегидрогеназу, формиатдегидрогеназу или алкогольдегидрогеназу, которые восстанавливают NAD(P)H с использованием в качестве восстановителя дешевые глюкозу, формиат или этанол, соответственно [192,194,195]. Использование каскадных реакций позволяет применять аммиак как самый дешевый аминокислотный донор: дегидрогеназа L-аминокислот или D-селективная мезо-диаминопимелат дегидрогеназа катализируют восстановительное аминирование α -кетоглутарата или пирувата, соответственно, а образующийся L-глутамат или D-аланин ГА используют в качестве аминокислотного донора, либо на прямую, либо после реакции рацемизации, катализируемой подходящей рацемазой [195–197]. Для трансаминаз свойственно ингибирование как продуктами, так и субстратами, для устранения этих эффектов применяют стратегию постепенного добавления субстрата и удаления продукта из реакционной смеси [198,199]. Помимо этого, природные трансаминазы отличаются узкой субстратной специфичностью, для введения активности с неприродными субстратами необходимы многочисленные раунды рационального дизайна и направленной эволюции [123,198–203].

Пионером в промышленном применении трансаминаз является американская компания Celgene [204]. Компания Celgene разработала схему крупномасштабного синтеза (*S*)-1-метоксиизопропиламина и (*S*)-2-амино-3-метилбутана – прекурсоров гербицидов – из соответствующих кетонов [205]. Трансаминазы успешно применяют для синтеза и более сложных препаратов. Самым знаменитым примером является синтез противодиабетического препарата ситаглиптина из прохирального кетона. Эффективный биокатализатор для этой цели (выход продукта составляет 92%, а энантиомерный избыток – 99,95%) был разработан компанией Merck на основе природной трансаминазы, не имеющей детектируемой активности с целевым субстратом, путем нескольких раундов направленной эволюции [113]. В качестве примеров можно привести и другие фармацевтические препараты, в синтезе которых применяются трансаминазы: препарат для лечения сердечной недостаточности – сакубитрил [206], органов дыхания – МК-7246 [207], аритмии сердца – вернакалант [208], миелоидного лейкоза – гласдегиб [209] и снотворный препарат – суворексант [210] (Рис. 1.11). Во всех приведенных примерах биотехнологические процессы разработаны компаниями Merck&Co и Pfizer на основе модифицированных (*S*)-

селективной ТА из *V. fluvialis* (I тип укладки) или (*R*)-селективной ТА из *Arthrobacter* sp. KNK168 (IV тип укладки).

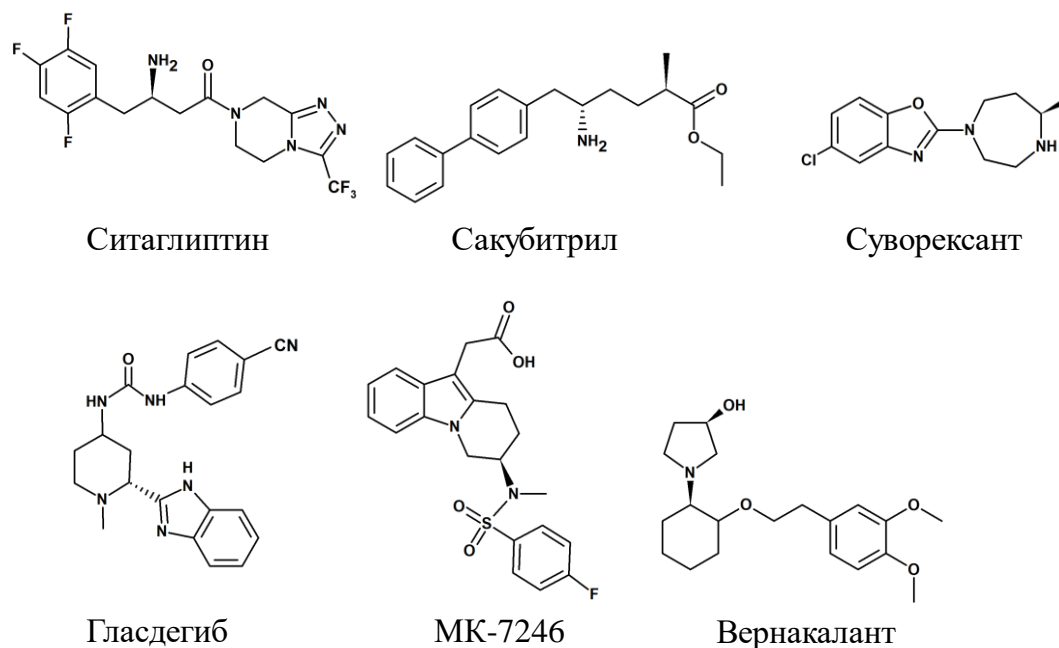


Рис. 1.11. Структурные формулы фармацевтических препаратов, для промышленного синтеза которых применяют ТА.

DATA и их варианты пока не используются в качестве биокатализаторов в промышленных процессах. DATA перспективны для синтеза оптически чистых D-аминокислот. D-аминокислоты широко распространены в природных и синтетических антибиотиках, кроме того они являются строительными блоками ряда молекул с терапевтическим действием и соединений, применяемых в сельском хозяйстве и пищевой индустрии (**Рис. 1.12**) [211–213]. Таким образом, разработка эффективного биотехнологического синтеза оптически чистых D-аминокислот остается актуальной задачей. На сегодня предложен ряд ферментативных каскадных процессов для синтеза D-аминокислот, где ключевой стадией является аминирование α -кетокислоты, катализируемое DATA [195–197,214,215]. Однако во всех предложенных процессах используется только одна DATA из *Bacillus* sp. YM-1. Поиск и структурно-функциональная характеристика новых DATA расширит фундаментальное понимание взаимосвязи структуры и функции, которое необходимо для направленного модифицирования структуры DATA для конкретной практической задачи.

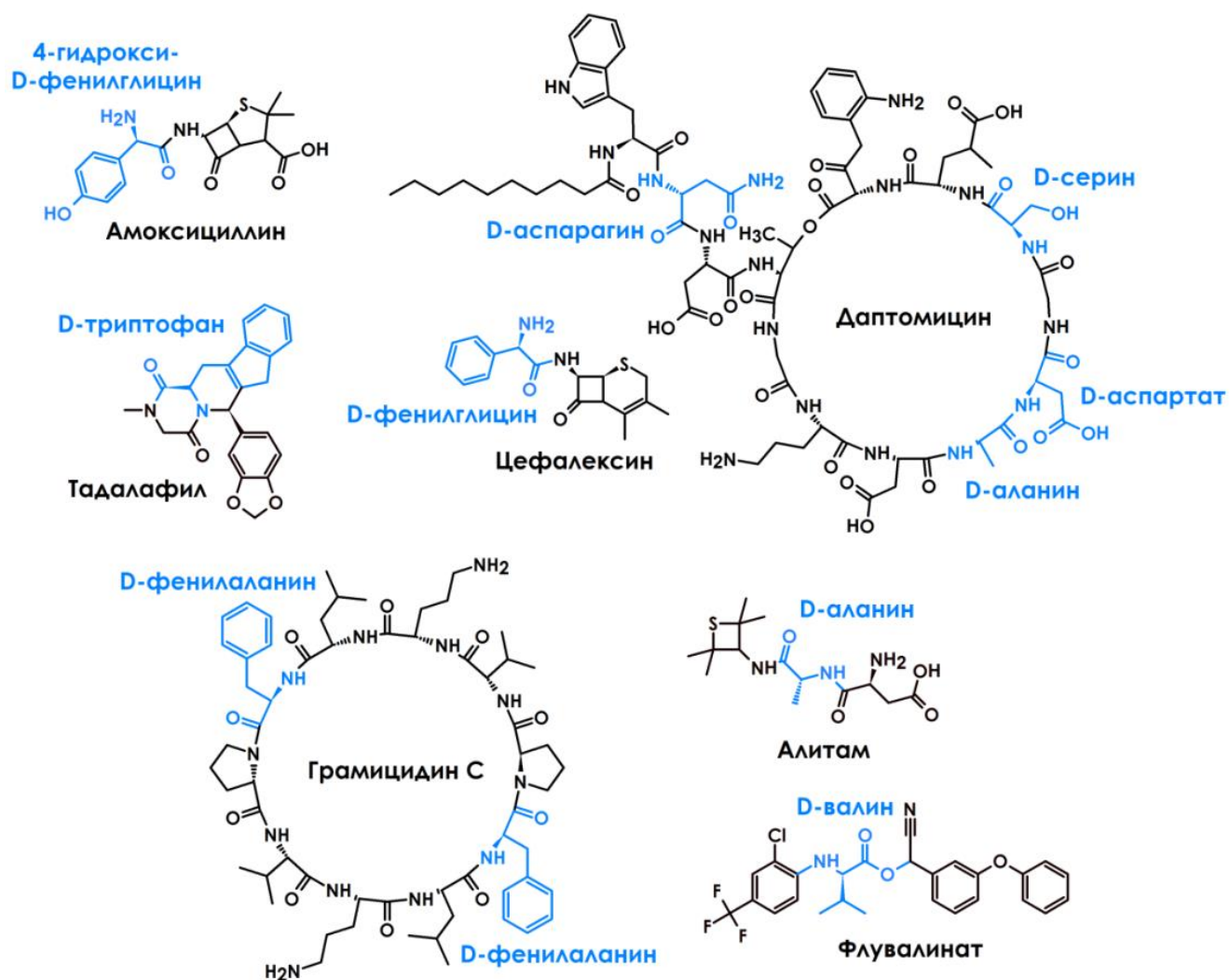


Рис. 1.12. Структурные формулы медицинских препаратов (амоксициллин, тадалафил, цефалексин, даптомицин, грамицидин С), биологически активного соединения, применяемого в сельском хозяйстве (флувалинат) и вещества, используемого в пищевой индустрии (алитам). Структурные фрагменты D-аминокислот выделены голубым цветом.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и реактивы

При проведении всех экспериментов использовали компоненты буферных систем, органические растворители, субстраты, ингибиторы и коммерческие субстраты высочайшей степени очистки от производителей Sigma, Thermo Fischer Scientific (США), Roche (Швейцария), AppliChem, Serva, Acros Organics, Fluka (Германия), Диа-М, Хеликон, Химмед (Россия). Для приготовления буферных растворов, а также субстратов использовали деионизованную воду, полученную с помощью системы Milli-Q Gradient (Millipore, США).

Работы по наработке рекомбинантных ферментов, клонированию и мутагенезу проводили с применением штаммов *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS (Novagen, Германия) и *E. coli* Mach1 T1 (Thermo Fischer Scientific, США). Праймеры для мутагенеза, а также синтетические гены были синтезированы российскими компаниями: ООО Сервис-Ген, ООО СкайДжин и ЗАО Евроген. Для экспрессии целевых генов использовали плазмидный вектор pET-21d (Novagen, Германия). В данный вектор были добавлены 6-гистидиновый фрагмент и сайт узнавания протеазы из *Tobacco etch virus* (TEV-протеаза), полученный вектор (pET-21d-HisTEV) позволял получать ферменты с указанными фрагментами на N-конце [216].

Автор выражает благодарность с.н.с., к.б.н. Ракитиной Татьяне Владимировне Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН за помощь в проведении работ по клонированию и экспрессии WT TA_Halhy, а также предоставление вектора pET-21d-HisTEV и pET-21d (несущего ген TEV-протеазы с 6-His-фрагментом на N-конце).

2.2. Методы работы с ДНК и бактериальными клетками

2.2.1. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

Компетентные клетки получали по следующему протоколу. Ночную культуру клеток *E. coli* Mach1 T1 разбавляли десятикратно в среде LB, содержащую триптон (10 г), дрожжевой экстракт (5 г), NaCl (10 г) и Трис-НСl, рН 7,5 (20 мМ) в 1 литре дистиллированной воды, и растили при температуре 37 °С до достижения значения $A_{600} = 0,5$ в колбе Эрленмейера (1 л) при постоянном помешивании (180 об/мин). Далее клетки охлаждали до 4 °С, и работы проводили во льду. Клетки отделяли от питательной среды центрифугированием (4000 об/мин, 20 минут) и ресуспендировали в буфере состава: 30 мМ К-ацетат, рН 5,8, 10 мМ CaCl₂, 100 мМ RbCl, 50 мМ MnCl₂, 15% (v/v) глицерина, и оставляли на льду на 30 минут. Далее удаляли супернатант с

помощью центрифугирования. Клетки ресуспендировали в буфере состава: 10 mM MOPS, pH 6,8, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15% (v/v) глицерин, оставляли на льду на 20 минут, использовали сразу или хранили при -70 °C.

2.2.2. Трансформация клеток *E. coli*

К компетентным клеткам *E. coli* (50-100 мкл) добавляли либо реакционную смесь после лигирования (10 мкл), либо плазмидную ДНК (1-3 мкл, 25-75 мкг/мл) и инкубировали во льду 20 минут. В водном термостате клетки нагревали до 42 °C в течение двух минут (тепловой шок), далее переносили в лед и оставляли на 5 минут. После добавляли среду LB (500 мкл), инкубировали при перемешивании (180 об/мин) при 37 °C в течение 1 часа и высевали клетки (100-200 мкл) на чашку Петри с твердой средой LB (среда LB с добавлением 1,5% агарозы). При работе со штаммом Mach1 T1 добавляли ампициллин до концентрации 100 мкг/мл, при работе со штаммом Rosetta(DE3)pLysS добавляли ампициллин до концентрации 100 мкг/мл и хлорамфеникол до концентрации 20 мкг/мл. Клетки росли при 37 °C не более 20 часов при постоянном помешивании (180 об/мин).

2.2.3. Электрофорез ДНК

Для проведения электрофореза ДНК использовали в 1-2% агарозный гель, содержащий 40 mM Трис и 20 mM уксусную кислоту, pH 8,4, 1 mM ЭДТА и 0,5 мкг/мл бромистый этидий. С применением PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories, США). Рабочее напряжение составляло 80 В. Смесь ДНК-фрагментов стандартных масс GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fischer Scientific, США) применяли для определения молекулярной массы фрагментов. Для визуализации полос ДНК использовали УФ-трансиллюминатор (Vilber Lourmat, Германия) с фиксированной длиной волны излучения 254 нм.

2.2.4. Рестрикция и лигирование плазмидных ДНК

Реакционная смесь для проведения рестрикции содержала: векторную ДНК (концентрация до 10 мкг/мл), эндонуклеазы рестрикции NdeI (0,4 Ед/мкл) и HindIII (0,4 Ед/мкл) (Fermentas, Латвия), и буфер состава: 10 mM Трис-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1 мг/мл БСА. Реакцию проводили при 37 °C в течение 2 часов.

Лигирование векторной ДНК и ДНК-вставки (молярное соотношение 1:3) проводили в буфере состава: 50 mM Трис-HCl, pH 7,6, 1 mM АТФ, 10 mM MgCl₂, 50% (w/v) ПЭГ-8000, 1 mM

ДТТ, в присутствии T4 ДНК-лигазы (Fermentas, Латвия). Реакционную смесь инкубировали в течение 2 часов при 25 °С, и использовали для трансформации.

2.2.5. Выделение ДНК из клеток *E. coli* и из агарозного геля

Для выделения плазмидной ДНК из клеток использовали коммерческий набор Plasmid miniprep (Евроген, Россия). Для выделения ДНК из агарозного геля проводили препаративный ДНК-электрофорез, после чего вырезали полосы с целевыми фрагментами ДНК, которые перемещали в пробирки. Обработку геля и выделение ДНК проводили с использованием набора Cleanup S-Cap (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Выделенные препараты ДНК хранили при -20 °С. Чистоту фрагментов ДНК анализировали с помощью ДНК-электрофореза.

2.2.6. Сайт-направленный мутагенез

Для проведения сайт-направленного мутагенеза применяли метод ПЦР с одним праймером по ранее описанной методике [217,218]. Для чего к плазмидной ДНК, с геном целевого фермента, в концентрации 10 нг/мкл добавляли праймер с требуемой нуклеотидной заменой в концентрации 0,8 мкМ и реактивы из коммерческого набора Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия). Для проведения ПЦР использовали амплификатор T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США). Реакцию проводили в следующем режиме: 95 °С в течение 3 мин (I); 95 °С – 30 с (II); 50-60 °С в течение 40 с (III); 72 °С в течение 7 мин (IV); стадии II, III, IV повторяли 18 раз, заключительным этапом было выдерживание смеси при 72 °С в течение 8 минут.

2.2.7. Отбор колоний клеток *E. coli*

Отбор колоний клеток *E. coli* с плазмидой, несущую целевую мутацию, проводили методом ПЦР. Для этого в реакционную смесь для ПЦР добавляли проверочный праймер (Check-праймер) и один из универсальных T7 праймеров в концентрациях по 0,8 мкМ. Выросшие на чашке Петри одиночные колонии переносили в пробирки со смесью ПЦР. В процессе реакции синтезировался ПЦР продукт известной длины исключительно в присутствии гена с внесенной мутацией. Реакционная смесь после мутагенезного ПЦР служила в качестве положительного контроля, а вектор, несущий ген дикого типа – в качестве отрицательного контроля. Реакционная смесь также содержала все необходимые компоненты для ПЦР из набора TaqDNA Polymerase dNTP mix (Евроген, Россия). ПЦР проводили в следующем режиме 95 °С в течение 3 мин (I); 96 °С – 5 мин (II); 50 °С в течение 25 с (III); 72 °С в течение 1 мин (IV); стадии II, III, IV повторяли

30 раз, заключительным этапом было выдерживание смеси при 72 °С в течение 8 минут. За протеканием ПЦР следили с помощью ДНК-электрофореза.

2.3. Методы анализа белков

2.3.1. Определение концентрации белков

Для определения концентрации белков использовали теоретический коэффициент экстинкции, рассчитанный в программе (<https://web.expasy.org/protparam/>) с помощью спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 280 нм.

2.3.2. Электрофорез белков в денатурирующих условиях

Для проведения белкового электрофореза использовали электрофоретическую ячейку Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США) в комплекте с источником постоянного тока PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories), рабочее напряжение составляло 200 В. Для проведения электрофореза готовили 12% полиакриламидный гель. Состав разделяющего геля: 11,8% (м/в) акриламид, 0,3% (м/в) бисакриламид, 0,6 М Трис-НСl, рН 8,8, 0,07 мМ ТЕМЕД, 0,1% (м/в) ДДС, 0,1% (м/в) персульфат аммония. Состав концентрирующего геля: 3,7% (м/в) акриламид, 0,1% (м/в) бисакриламид, 0,6 М Трис-НСl, рН 8,8, 0,07 мМ ТЕМЕД, 0,1% (м/в) ДДС, 0,1% (м/в) персульфат аммония. Электродный буфер содержал 0,025 М Трис, 0,192 М глицин, рН 8,2, 0,1% ДДС. Пробоподготовку проводили следующим образом: к пробе белка добавляли двукратный объем буфера состава 100 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 0,05% (м/в) бромфеноловый синий, 2% (м/в) ДДС, 1 М β-меркаптоэтанол, 30% (v/v) глицерин, прогревали при 98 °С в течение 20 минут до полной денатурации. На каждую дорожку наносили 15 мкг общего белка. Полосы белка фиксировали и окрашивали с помощью раствора, содержащего метанол (40% v/v), уксусную кислоту (10% v/v) и Кумасси R-250 (0,3% m/v) в течение 1 часа при 75 °С, избыток красителя удаляли уксусной кислотой (7% v/v) при постоянном помешивании.

2.3.3. Спектральный анализ

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis в 1 мл кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см в диапазоне длин волн 250-550 нм, концентрация белка не превышала 1,3 мг/мл (38 мкМ). Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Япония) в 1 мл кварцевой кювете

с длиной оптического пути 1 см в диапазоне длин волн 300-600 нм, при длине волны возбуждения 297 нм, концентрация белка не превышала 0,17 мг/мл (5 мкМ).

2.4. Получение рекомбинантных форм ферментов

2.4.1. Клонирование генов ферментов

Из аннотированного генома бактерии *Haliscomenobacter hydrossis* штамма DSM 1100 [219] была взята последовательность гена Halhy_2446, кодирующего TA_Halhy (UniProt код: F4KWH0). Последовательность гена Acfer_0976, кодирующего (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназу (ГГДГ) была взята из аннотированного генома бактерии *Acidaminococcus fermentans* штамма ATCC 25085 [220]. С помощью программы Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>) ген целевого белка оптимизировали для более эффективной экспрессии в клетках *E. coli*. Для последующего упрощения манипуляций с геном вводили нуклеотидные последовательности сайтов эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII на 5'- и 3'-концы гена, соответственно. Векторную конструкцию pAPG110 со вставкой модифицированной последовательности гена обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и HindIII. Целевой фрагмент ДНК отделяли от реакционной смеси с помощью препаративного ДНК-электрофореза и далее выделяли из полосы геля. ДНК-фрагмент с липкими концами лигировали с плазмидным вектором pET-21d-HisTEV, предварительно обработанным эндонуклеазами рестрикции NdeI и HindIII. Клетки *E. coli* Mach1 T1 трансформировали лигазной смесью, далее вектор pET-21d-HisTEV с целевым геном выделяли и использовали для трансформирования клеток *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS или хранили при -25 °С. Последовательность гена TA_Halhy подтверждали секвенированием.

Автор выражает благодарность с.н.с., к.т.н. Колгановой Татьяне Владимировне и м.н.с. Баслерову Роману Валерьевичу ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН за проведение секвенирования ДНК фрагментов методом Сенгера.

2.4.2. Получение вариантов TA_Halhy аминокислотными заменами

Введения одиночных и двойных аминокислотных замен в последовательность TA_Halhy проводили методом сайт-направленного мутагенеза. Для этого проводили ПЦР с мутантным праймером, далее реакционную смесь обрабатывали ДНКазой Dpn I (0,1 Ед/мкл), инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. Клетки *E. coli* Mach1 T1 трансформировали полученной смесью и растили на твердой среде LB в присутствии 100 мкг/мл ампициллина. Выросшие одиночные колонии отбирали с помощью проверочного ПЦР, как описано выше. Список используемых

праймеров приведен в **Таблице 2.1**. ПЦР смесь анализировали с помощью ДНК-электрофореза. Отобранные колонии использовали для выделения целевых плазмид. Нуклеотидные последовательности вариантов TA_Halhy подтверждали секвенированием. Отобранные плазмиды, несущие ген TA_Halhy с целевой нуклеотидной заменой использовали для трансформации клеток *E. coli* штамма Rosetta(DE3)pLysS.

Табл. 2.1. Последовательности праймеров, используемы на этапах мутагенезного ПЦР и проверочного ПЦР (Check).

Название праймера	Последовательность
HalR28I.R; CheckHalR28I.F;	5'-AAGATACCATAGCCGATCAGGATGCTCAGGTC-3' 5'-GACCTGAGCATCCTGAT-3'
HalR90I.F; CheckHalR90I.F;	5'-TGAAGCGGGTATCATTCTGGTGCTGACGG-3' 5'-TCGTGAAGCGGGTATCAT-3'
HalR179G.R; CheckHalR179G.F;	5'-AGGAAGAAGTTAGAGCCAGCGCTTTCACGAATCC-3' 5'-CAGGAAGAAGTTAGAGCC-3'
HalR179I.R; CheckHalR179I.F;	5'-AGGAAGAAGTTAGAGATAGCGCTTTCACGAATCC-3' 5'-GATTCGTGAAAGCGCTAT-3'
HalF33L.F; CheckF33L.F;	5'-GCTACGGTATCTTGGACTACTTTCTCGCTC-3' 5'-TACGGCTACGGTATCTTG-3'
HalR28H.R; CheckHalR28H.F;	5'-AAGATACCATAGCCATGCAGGATGCTCAGGTC-3' 5'-GACCTGAGCATCCTGCAT-3'
HalF33Y.F; CheckHalF33Y.R;	5'-GCTACGGTATCTATGACTACTTTCTCGCTCG-3' 5'-CGAGCGAGAAAGTAGTCAT-3'
HalF33H.F; CheckHalF33H.F;	5'-GGCTACGGTATCCATGACTACTTTCTCGCTCG-3' 5'-GCGGCTACGGTATCCAT-3'
HalY35H.F; CheckHalY35H.F;	5'-CGGTATCTTTGACCATTTTCTCGCTCGTGAAGGC-3' 5'-CTACGGTATCTTTGACCAT-3'

2.4.3. Препаративная экспрессия генов ферментов

Экспрессию целевых генов проводили в клетках *E. coli* штамма Rosetta(DE3)pLysS. Для этого ночную культуру клеток, трансформированную вектором pET-21d-HisTEV со вставкой целевого гена, разбавляли 100-кратно в среде LB, содержащей ампициллин в концентрации 100

мкг/мл и хлорамфеникол в концентрации 30 мкг/мл. Клетки растили при 37 °С, при постоянном покачивании (180 об/мин) в течение ~4 часов до достижения значения $A_{600} = 0,8$. После чего снижали температуру до 30 °С и индуцировали экспрессию, добавляя в среду 0,2 мМ ИПТГ, и растили клетки в течение 20 часов. Далее клетки отделяли от питательной среды центрифугированием и использовали для последующего выделения целевых ферментов.

2.4.4. Выделение и очистка ферментов

Буферы, которые применяли на этапах выделения и очистки указаны в В **Таблице 2.2**. После сбора клеток их ресуспендировали в буфере 1, охлаждали во льду и разрушали обработкой ультразвуком в режиме: амплитуда – 75%, импульс – 5 с, покой – 15 с, в течение 20 минут, в качестве источника звуковых волн применяли Vibra-Cell VCX130 (Sonic and materials, США). После обработки к лизату добавляли ДНКазу (Sigma, США) из расчета 0,005 мг на 1 мл лизата, и проводили центрифугирование в течение 45 минут при 18 000 об/мин и 4 °С для удаления нерастворимой примеси. Перед нанесением на колонку HisTrap HP объемом 5 мл (Cytiva, США), уравновешенную буфером 2 супернатант фильтновали с помощью фильтра с размером пор 0,45 мкм (Millipore, США). Далее колонку промывали 30-кратным объемом буфера 3. В завершение целевой фермент элюировали линейным градиентом буфера 4. После элюирования к ТА добавляли кофактор PLP до концентрации 1 мМ и выдерживали в течение 1 часа при 25 °С. Далее ферменты переводили в буфер 5, концентрацию белка довели до 15-20 мг/мл с помощью центрифужного концентратора (30 кДа MWCO, Millipore, США), добавляли глицерин до концентрации 50% (v/v) и хранили при -20 °С. Выделение вспомогательных ферментов – TEV-протеазу и ГГДГ – проводили аналогично. За ходом хроматографии следили по интенсивности поглощения при двух длинах волн 280 нм и 416 нм (в случае ТА). Получаемые фракции анализировали по специфической активности, чистоту оценивали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях. Для подтверждения аминокислотных последовательностей использовали метод МАЛДИ. Анализ активности с и без 6-гистидиновых-фрагментов показал незначительные отличия (менее 10%) поэтому для функциональной характеристики с использовали ферменты с 6-гистидиновым-фрагментом.

Табл. 2.2. Составы буферов, используемых на стадиях выделения и очистки рекомбинантных форм ферментов.

Буфер	Состав
1	50 мМ К-фосфатный буфер (КФБ), pH 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 0,5 М мочевины, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мМ ПМСФ, 10% (v/v) глицерин, 0,2 мг/мл лизоцим и 100 мкМ PLP для трансаминаз
2	50 мМ КФБ, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 1 мМ ПМСФ и 0,1% (v/v) тритон
3	50 мМ КФБ, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазол и 100 мкМ PLP для ТА
4	50 мМ КФБ, pH 8,0, 500 мМ NaCl, 500 мМ имидазол и 100 мкМ PLP для ТА
5	50 мМ КФБ, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол и 400 мкМ PLP для ТА
6	50 мМ КФБ, pH 7,5, 10% глицерин, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 100 мкМ PLP
7	50 мМ HEPES, pH 8,0, 100 мМ NaCl и 100 мкМ PLP, 1 мМ ДТТ
8	20 мМ HEPES, pH 8,0, 1 М (NH ₄) ₂ SO ₄ и 100 мкМ PLP
9	20 мМ HEPES, pH 8,0, и 100 мкМ PLP

Для проведения работ по кристаллизации у ТА_Halhy и её вариантов отщепляли 6-His-фрагмент, и вводили дополнительные стадии очистки: гель-фильтрацию и гидрофобную хроматографию. Реакционная смесь для отщепления 6-His-фрагмента содержала целевой фермент в концентрации 2 мг/мл и TEV-протеазу (1 мг протеазы на 10 мг фермента) в буфере 6, смесь выдерживали при 4 °С в течение 20 часов. Целевой фермент отделяли от продуктов протеолиза и TEV-протеазы повторной металл-хелатной аффинной хроматографией на колонке HisTrap HP, уравновешенной буфером 4, перед которой проводили диализ реакционной смеси против буфера 4. К собранной фракции целевой ТА добавляли PLP в концентрации 1 мМ и инкубировали в течение 1 часа при 25 °С. WT ТА_Halhy дополнительно очищали с помощью гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL (Cytiva, США), уравновешенной буфером 7. Вариант ТА_Halhy R90I очищали с помощью гидрофобной хроматографии с использованием колонки HiTrap Desalting (Cytiva, США), уравновешенной буфером 8. Предварительно препарат переводили в тот же буфер с помощью колонки HiTrap Desalting. Целевой фермент элюировали

линейным градиентом буфера 9. Далее проводили гель-фильтрацию в буфере 7. Фракцию, которая соответствует димерной форме TA_Halhy концентрировали до 15 мг/мл и использовали для кристаллизации.

Автор выражает благодарность м.н.с. Каменихиной Инне Анатольевне и м.н.с. Исайкиной Татьяне Юрьевне ЦКП «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Битехнологии РАН за проведение анализов МАЛДИ.

2.4.5. Получение PLP-формы и PMP-формы холофермента и апофермента

Для получения PLP-формы TA_Halhy и ее вариантов препарат фермента в концентрации 2 мг/мл (60 мкМ) выдерживали 40 минут при 40 °С в присутствии кофактора PLP (500 мкМ) и α -кетоглутарата (20 мМ). После чего фермент переводили в другой буфер, используя колонку HiTrap Desalting, уравновешенную 50 мМ К-фосфатным буфером (КФБ), pH 8,0, для удаления несвязавшегося PLP и кетосубстрата. Насыщение TA_Halhy PLP оценивали по соотношению A_{416}/A_{280} .

PMP-форму TA_Halhy и ее вариантов получали путем выдерживания PLP-формы TA (2 мг/мл или 60 мкМ) с D-аланином (500 мМ) 30 минут при 20 °С. Далее препарат переводили в другой буфер, используя колонку HiTrap Desalting, уравновешенную 50 мМ К КФБ, pH 8,0, для удаления D-аланина.

Апоформу TA_Halhy и ее вариантов получали путем выдерживания PLP-формы TA (2 мг/мл или 60 мкМ) с D-аланином (500 мМ) в течение 1 часа при 40 °С. Далее препарат переводили в другой буфер, используя колонку HiTrap Desalting, уравновешенную 50 мМ КФБ, pH 8,0, для удаления D-аланина и свободного PMP.

2.5. Анализ функциональных свойств TA_Halhy и вариантов

2.5.1. Определение активности трансаминаз

Функциональный анализ проводили с рекомбинантными формами TA_Halhy и вариантов с неотщепленным 6-His-фрагментом на N-конце. Каждое измерение проводили в трех повторностях. Полученные экспериментальные данные анализировали с помощью программы OriginPro версия 8,0 (OriginLab, США).

Метод полуреакций

Взаимодействие PLP-формы TA с аминокислотами анализировали спектрофотометрически с использованием планшетного спектрофотометра SPECTROstar Omega или спектрофотометра SX20, оснащённого установкой «остановленного потока» (Applied

Photophysics, Surrey, UK). За ходом полуреакции следили при длинах волн 330 и 416 нм. Снижение интенсивности поглощения при 416 нм соответствует расходованию внутреннего альдимида ТА, а рост интенсивности поглощения при 330 нм соответствует образованию кетимида (**Рис. 1.4**). Концентрация субстратов превышала концентрацию фермента более чем в 100 раз, это позволяло свести полуреакцию к реакции первого порядка. Наблюдаемую константу скорости полуреакции k_{obs} определяли аппроксимацией уравнением (1) зависимости интенсивности поглощения от времени:

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty) \times \exp(-k_{obs}t), \quad (1)$$

где A_t – значение интенсивности поглощения в момент времени t , A_0 – значение интенсивности поглощения в начальный момент времени, A_∞ – предельное значение интенсивности поглощения.

Кинетические параметры полуреакций трансаминирования рассчитывали по уравнению (2):

$$k_{obs} = \frac{k_{max}[S]}{K_d + [S]} + k_r, \quad (2)$$

где, $[S]$ – концентрация субстрата, k_{max} – максимальная константа скорости полуреакции, K_d – константа диссоциации фермент-субстратного комплекса, k_r – константа скорости, отражающая вклад обратной реакции, k_{max}/K_d – константа специфичности.

Автор выражает благодарность профессору, д.х.н. Владимиру Александровичу Кузьмину и к.х.н. Алексею Александровичу Костюкову (институт биохимической физики имени Н.М. Эммануэля) за помощь в проведении экспериментов по быстрой кинетике полуреакций.

ЛДГ и ГГДГ метод

Для определения активности ТА в полных реакциях трансаминирования, где в качестве аминокетона выступал D-аланин или D-глутамат, применяли вторую сопряженную ферментативную реакцию с NAD-зависимыми лактатдегидрогеназой (ЛДГ метод) из мышц кролика (Roche, Швейцария) или рекомбинантной (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназой (ГГДГ метод) из *A. fermentans*, соответственно. За образованием пирувата или α -кетоглутарата следили спектрофотометрически при 340 нм по окислению NADH ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) в сопряженной ферментативной реакции с ЛДГ или ГГДГ, соответственно, с помощью планшетного спектрофотометра SPECTROstar Omega в 96-лучночных УФ-планшетах (Greiner Bio-One, Германия). В случаях, когда в качестве кетосубстрата использовали индолпируват или 4-гидроксибензилпируват, за окислением NADH следили при 450 нм ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ввиду высокого поглощения данных соединений при 340 нм. Анализ активности проводили в

присутствии 1-250 мМ D-аланина и 0,3-80 мМ α -кетокислоты или 0,5-30 мМ D-глутамата и 0,2-150 мМ α -кетокислоты, 0,05-20 мкг/мл (1,5-600 нМ) ТА, 30 мкМ PLP, 330 мкМ NADH и 2 U/мл ЛДГ или ГДГ соответственно. Реакцию инициировали добавлением α -кетоглутарата после прогрева реакционной смеси в течение 10 минут. Удельную активность ТА_Halhy рассчитывали из начального линейного участка снижения интенсивности поглощения при 340 нм со временем. Единицу активности ТА_Halhy определяли как количество фермента, необходимого для образования 1 мкмоль пирувата или α -кетоглутарата в минуту, что соответствует окислению 1 мкмоль NADH в минуту.

Стандартная реакция

Стандартную реакцию трансаминирования *D-аланин + α -кетоглутарат* проводили в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 40 °С, концентрации D-аланина и α -кетоглутарата составляли 5 мМ и 2 мМ, соответственно, в присутствии 30 мкМ PLP, 330 мкМ NADH и 2 U/мл ЛДГ.

ВЭЖХ метод

Для определения активности ТА в полных реакциях трансаминирования, где в качестве аминоконатора выступал D-лейцин или D-фенилаланин применяли метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ метод). За ходом реакции следили по накоплению 4-метил-2-оксовалерата или фенилпирувата – продуктов реакции. Анализ активности проводили в присутствии 5-160 мМ D-лейцина или D-фенилаланина и 0,5-10 мМ α -кетоглутарата, 0,008-0,04 мг/мл (0,24-1,2 мкМ) ТА_Halhy, 30 мкМ PLP в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 40 °С. Для определения концентрации 4-метил-2-оксовалерата или фенилпирувата использовали линейный калибровочный график зависимости площади пика от концентрации 3-метил-2-оксовалерата или фенилпирувата, с помощью ВЭЖХ (Akta Purifier, США) с УФ-детектором на колонке C-18 (Zorbax, Eclipse XDB-C18, (Agilent, США)), детекцию продуктов проводили при 210 нм. В фиксированные временные точки из реакционной смеси отбирали аликвоты и прогревали до 95 °С в течение 10 минут для остановки реакции. Удельную активность ТА_Halhy рассчитывали из начального линейного участка накопления продукта от времени. Единицу активности ТА_Halhy определяли, как количество фермента, необходимого для образования 1 мкмоль 3-метил-2-оксовалерата или фенилпирувата в минуту.

AcPh метод

Для определения активности ТА в полных реакциях трансаминирования, где в качестве аминоконатора выступал (R)-PEA применяли прямой спектрометрический метод. За ходом реакции следили по накоплению ацетофенона (AcPh) – продукта реакции, при длине волны 245

нм ($\epsilon(\text{AcPh}) = 11,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Анализ активности проводили в присутствии 1-30 мМ (R)-PEA и 0,1-10 мМ α -кетоглутарата, 0,02-0,1 мг/мл (0,6-3 мкМ) TA_Halhu, 30 мкМ PLP. Удельную активность TA_Halhu рассчитывали из начального линейного участка увеличения оптической плотности при 245 нм со временем. Единицу активности TA_Halhu определяли как количество фермента, необходимого для образования 1 мкмоль ацетофенона в минуту.

Кинетические параметры полных реакций трансминирования определяли с помощью уравнения (3). Для этого фиксировали концентрацию одного из двух субстратов и получали зависимости наблюдаемой скорости реакции (V) от концентрации второго субстрата и наоборот.

$$V = \frac{V_{max}[A][B]}{K_M^A[B] + K_M^B[A] + [A][B]}, \quad (3)$$

где $[A]$ и $[B]$ – концентрации субстратов А и В, соответственно, V_{max} – максимальная скорость реакции, K_M^A и K_M^B – константы Михаэлиса для субстратов А и В, соответственно.

2.5.2. Определение pH- и температурного оптимумов реакций трансминирования

Влияние pH и температуры на активность TA_Halhu и вариантов анализировали в полной реакции трансминирования между D-аланином (5 мМ) и α -кетоглутаратом (2 мМ) ЛДГ методом, а также в полной реакции между (R)-PEA (5 мМ) α -кетоглутаратом (2 мМ) AcPh методом. pH зависимости реакций определяли при 30 °C или 25 °C в смешанном буфере 25 мМ Трис-HCl / 25 мМ КФ, pH 6,0-9,0, и в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0-10,0. Для определения оптимума температуры ферментативную активность опрежеляли в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при температурах 15-60 °C.

2.5.3. Определение термостабильности WT TA_Halhu и вариантов

Кинетический метод определения термостабильности и операционной стабильности

Кинетический метод определения стабильности был основан на определении остаточной активности ТА при выдерживании при заданной температуре в разных условиях через фиксированные промежутки времени. Для анализа термостабильности TA_Halhu препарат переводили в 50 мМ КФБ, pH 8,0, без PLP для апофермента и с добавлением 100 мкМ PLP для PLP-формы холофермента при 40 °C. Для анализа термостабильности в реакционных условиях (операционная стабильность) препарат TA_Halhu переводили в 100 мМ КФБ, pH 7,5, с добавлением 50 мМ D-глутамата и 50 мМ 3-метил-2-оксобутарата или фенилфирувата, и 100 мкМ PLP и выдерживали при 30 °C. Концентрация ТА во всех экспериментах составляла 1 мг/мл

(30 мкМ). Далее отбирали аликвоты и определяли остаточную активность в стандартной реакции, описанной ранее.

Анализ термической денатурации

Для анализа термической денатурации применяли метод кругового дихроизма. За ходом денатурации следили по изменению значения молярной эллиптичности $[\theta]$ при 210 нм с помощью спектрополяриметра Chirascan с термостатируемой ячейкой Пельтье (Applied Photophysics, Великобритания). Для этого препарат ТА_Halhy переводили в 20 мМ Na-фосфатный буфер, рН 8,0, и далее нагревали от 25 до 80 °С со скоростью 1 °С/мин в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм. Концентрация ТА составляла 0,3 мг/мл (10 мкМ). Температуру полуперехода из нативного состояния в денатурированное ($T_{0,5}$) определяли из зависимости молярной эллиптичности от температуры, аппроксимируя экспериментальные значения уравнением Больцмана.

Автор выражает благодарность Баранову Олегу Евгеньевичу ЦКП «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН за помощь при исследовании термической денатурации методом КД.

2.5.4. Анализ ингибирования ТА_Halhy D-цикloserином

Анализ ингибирования ТА_Halhy D-цикloserином проводили по полным кинетическим кривым реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом в присутствии D-цикloserина в разных концентрациях (3-50 мкМ) при 40 С. Кинетику связывания ингибитора с ТА_Halhy изучали в стандартной реакции, ТА_Halhy с D-цикloserином предварительно не инкубировали.

Полные кинетические кривые аппроксимировали интегральным уравнением для медленно связывающегося ингибитора (4) [221]:

$$A_{340}(t) = A_{340(0)} - v' \times t - \frac{v_0 - v'}{k_{\text{инг}}} \times (1 - \exp(-k_{\text{инг}} \times t)), \quad (4)$$

где $A_{340}(t)$ – значение интенсивности поглощения при 340 нм в момент времени t ; $A_{340(0)}$ – значение интенсивности поглощения при 340 нм в начальный момент времени; v' – скорость ферментативной реакции после установления равновесия между ферментом и ингибитором; v_0 – начальная скорость ферментативной реакции; $k_{\text{инг}}$ – наблюдаемая константа скорости ингибирования.

Параметры ингибирования рассчитывали по уравнению (5) [221]:

$$k_{\text{инг}} = k_{\text{diss}} \times \left(1 + \frac{[I]}{K_i^{\text{app}}}\right), \quad (5)$$

где k_{diss} – константа скорости диссоциации комплекса фермент-ингибитор, $[I]$ – концентрация ингибитора, $K_I^{app} = \frac{k_{diss}}{k_{ass}}$ – константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор при заданной концентрации субстрата, k_{ass} – константа скорости ассоциации фермента с ингибитором.

За выходом РМР из активного центра при разложении продуктов взаимодействия ТА_Nalhy с D-цикloserином следили по убыли интенсивности поглощения при 337 нм. За образованием PLP-формы при добавлении α -кетоглутарата к продуктам взаимодействия ТА_Nalhy и D-цикloserина следили по росту интенсивности поглощения при 416 нм. Для расчета наблюдаемых констант скоростей (k_{obs}) экспериментальные значения аппроксимировали уравнением кинетики первого порядка (6).

$$A_t = A_\infty + (A_0 - A_\infty) \times \exp(-k_{obs} \times t), \quad (6)$$

где A_t – значение интенсивности поглощения в момент времени t , A_∞ – предельное значение интенсивности поглощения, A_0 – значение интенсивности поглощения в начальный момент времени. Каждое измерение проводили в трёх повторностях.

2.5.5. Анализ утечки кофактора из активного центра ТА_Nalhy

Процесс утечки (выхода) кофактора PLP из активного центра ТА_Nalhy и вариантов анализировали с помощью кюветного спектрофотометра Evolution 300 UV-Vis. Максимумы в спектрах поглощения кофактора PLP в растворе без ТА и связанного с каталитическим лизином в активном центре и различны, так первый имеет максимум при длине волны 388 нм, а второй – при длине волны 416 нм. Для наблюдений была выбрана длина волны 450 нм, при которой вклад свободного PLP в поглощение минимальный, и изменение интенсивности поглощения наилучшим образом соответствует убыли PLP-формы холофермента. Скорость выхода PLP из активного центра оценивали по убыли интенсивности поглощения при 450 нм. Для этого PLP-форму ТА в концентрации 1,3 мг/мл (36 мкМ) инкубировали в КФБ, рН 8,0, при 25, 30 и 40 °С, в присутствии или отсутствии субстратов аминодонора и аминокцептора.

За выходом РМР из активного центра ТА_Nalhy следили аналогично при длине волны 337 нм (спектр поглощения РМР-формы ТА_Nalhy имеет максимум при 337 нм, спектр свободного РМР в КФБ, рН 8,0 – при 324 нм). Для этого РМР-форму ТА инкубировали в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С.

Начальный линейный участок наблюдаемой кинетической кривой использовали для определения константы скорости утечки кофактора по уравнению (7):

$$k_{\text{diss}} = -\frac{1}{A_0} \times \frac{dA}{dt}, \quad (7)$$

где A_0 – значение интенсивности поглощения в начальный момент времени $t=0$.

2.5.6. Определение константы диссоциации PLP-формы холофермента

Константы диссоциации PLP-формы холофермента TA_Halhy и вариантов определяли методом флуоресцентного титрования по тушению триптофановой флуоресценции. Для этого апофермент (1 мкМ) инкубировали с PLP в разных концентрациях от 0,5 до 80 мкМ в КФБ, pH 8,0, при 25 °С. По истечении 24 ч регистрировали спектры флуоресценции растворов с максимумом при 350 нм при длине волны возбуждения 297 нм. Для расчета константы диссоциации K_d экспериментальные значения аппроксимировали уравнением (8):

$$Y = Y_{\text{max}} \times \frac{[E]_0 + [PLP]_0 + K_d - \sqrt{([E]_0 + [PLP]_0 + K_d)^2 - 4 \times [E]_0 \times [PLP]_0}}{2 \times [E]_0}, \quad (8)$$

где $[E]_0$ и $[PLP]_0$ исходные концентрации апофермента TA_Halhy и PLP, соответственно, Y величина тушения флуоресценции при определенной концентрации добавленного PLP, Y_{max} величина тушения, когда все молекулы фермента связаны с PLP.

2.5.7. Определение выхода продукта и энантиомерного избытка в реакциях стереоселективного аминирования α -кетокислот, катализируемых TA_Halhy

Были проанализированы следующие реакции трансаминирования *D*-глутамат + 2-оксобутират / 2-оксовалерат / 3-метил-2-оксобутират / 3-метил-2-оксовалерат / 4-метил-2-оксовалерат / 2-оксогексаноат / фенилпируват / индолпируват / 4-гидроксифенилбутират / 2-оксо-4-фенилбутират. Так как реакция трансаминирования обратима, в систему добавляли два дополнительных фермента. ГГДГ восстанавливала α -кетоглутарат (копродукт реакции трансаминирования) до (*R*)-гидроксиглутарата с помощью NADH. Глюкозодегидрогеназа (ГДГ) из *Pseudomonas* sp. (Sigma, США) восстанавливала образовавшийся NAD^+ до NADH путем окисления *D*-глюкозы. Реакционная смесь содержала 50 мМ *D*-глутамат, 50 мМ α -кетокислоту, 100 мкМ PLP, 150 мМ *D*-глюкозу, 1 мМ NADH, 1 мг/мл TA_Halhy (4-70 U/мл, в зависимости от субстрата), 0,01 мг/мл ГГДГ (180 U/мл), 0,6 мг/мл ГДГ (30 U/мл) в 100 мМ КФБ, pH 7,5. Реакции проводили при 30 °С в течение 72 часов. Индолпируват брали в концентрации 10 мМ ввиду высокой скорости его неферментативного окисления в буфере [222], а время проведения синтеза было сокращено до двух часов. Для анализа реакционной смеси предварительно отделяли белковый компонент ультрацентрифугированием с помощью концентраторов Amicon-Ultra-15 (30 кДа MWCO, Millipore, США). *D*-тирозин и *D*-гомофенилаланин плохо растворимы в водных

растворах при нейтральных значениях pH, поэтому они переходили в осадок, для растворения которого к реакционной смеси добавляли HCl до концентрации 0,3 М. Для удаления денатурированного белка применяли ультрацентрифугирование. В отобранных аликвотах анализировали содержание продукта – D-аминокислоты, или исходного соединения – α -кетокислоты. Условия проведения ВЭЖХ и объемы удерживания соединений приведены в **Таблице 2.3**. Аликвоту (10 мкл) наносили на колонку C-18 с применением ВЭЖХ при 25 °С, элюирование проводили в изократическом режиме со скоростью потока 1 мл/мин. За ходом хроматографии следили по интенсивности поглощения при фиксированной длине волны.

Табл. 2.3. Объемы удерживания α -кетокислот и D-аминокислот в ходе ВЭЖХ.

Соединение	Буфер для элюции	Детектирование	Время удерживания, мл
2-Оксобутират	20 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 2,2, 5% (v/v) метанол	210 нм	3,0
2-Оксовалерат			7,4
3-Метил-2-оксобутират			6,1
3-Метил-2-валерат			15,7
4-Метил-2-валерат	20 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 3,0, 15% (v/v) метанол	280 нм	8,6
2-Оксогексаноат			5,8
D-фенилаланин			4,3
D-триптофан	20 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 2,2, 5% (v/v) метанол	280 нм	6,2
D-тирозин			3,9
2-Оксо-4-фенилбутират	20 мМ NaH ₂ PO ₄ , pH 3,0, 30% (v/v) метанол	210 нм	9,5

Энантиомерный избыток продуктов анализировали хроматографически с предварительной модификацией образовавшихся D-аминокислот 1-фтор-2,4-динитрофенил-5-L-аланинамидом (реагент Мерфи, Sigma, США) [127]. Реакцию дериватизации проводили в ацетонитриле до концентрации 55% (v/v) с добавлением NaHCO_3 до концентрации 20 мМ. Для этого к аликвоте низкомолекулярной фракции реакционной смеси добавляли реагент Мерфи (как минимум двукратный мольный избыток по отношению к аминсоединению), смесь выдерживали при 50 °С в течение 2 часов общий объем смеси составлял 45 мкл. Реакцию останавливали добавлением HCl до концентрации 18 мМ и метанола до концентрации 15% (v/v). Полученную смесь диастереомеров разделяли с помощью ВЭЖХ на колонке C-18 в градиентном режиме, скорость потока составляла 1 мл/мин. Буфер А содержал 0,1% (v/v) трифторуксусную кислоту (ТФУ) (Sigma, США) в воде, буфер В – 0,1% (v/v) ТФУ в метаноле. За ходом хроматографии следили по значению поглощения при 340 нм. Условия проведения ВЭЖХ и времена удерживания модифицированных аминокислот приведены в **Таблице 2.4**.

Табл. 2.4. Объемы удерживания дериватизованных D- и L- изомеров аминокислот.

Соединение	Время удерживания, мл		Условия элюции
	L-изомер	D-изомер	
Норвалин	16,0	18,6	градиент от 20 до 70% % буфера В за 15 минут
Валин	16,5	19,4	
Норлейцин	17,8	22,0	
Изолейцин	17,6	21,6	
Лейцин	17,4	20,8	
Фенилаланин	17,1	20,0	
Триптофан	16,0	17,7	
Тирозин	20	29	
Гомофенилаланин	20,1	26,3	
Гомоаланин	19,2	21,7	градиент от 10 до 70% % буфера В за 20 минут

2.6. Рентгеноструктурный анализ

2.6.1. Получение кристаллов TA_Halhu и вариантов

Для выбора условий кристаллизации WT TA_Halhu и варианта R90I использовали наборы для кристаллизации от производителя Hampton Research и Molecular Dimensions Inc (США). Для смешивания очищенного препарата белка (15 мг/мл) в 96-луночных планшетах (Hampton Research, США) с раствором-осадителем использовали роботизированную систему Rigaku (Rigaku Americas Corporation, США) методом диффузии в парах в варианте «сидячей капли». Использовали следующие соотношения объемов раствора белка и осадителя: 1:1, 1:2 и 2:1 (суммарный объем 0,2 мкл), в соседнем резервуаре находился раствор-осадителя в объеме 50 мкл, после чего планшеты оставляли при 4 или 15 °С. Первичные условия кристаллизации холофермента WT TA_Halhu были следующие: 0,1 М Ацетат натрия pH 5,2, 23% (m/v) ПЭГ 3350, 4 °С; холофермента варианта R90I: 60% (v/v) Tacsimate, pH 7,0, 0,1 М Бис-Трис пропан pH 7,0, 15 °С. Последующую оптимизацию условий проводили методом диффузии в парах в варианте «висячей капли» в 24-луночных планшетах (Hampton Research) вручную. Суммарный объем составлял 3 мкл, в соседнем резервуаре находился раствор-осадителя в объеме 500 мкл. Кристаллы холофермента TA_Halhu и варианта R90I достигали максимального размера через ~1 недели и представляли собой сростки пластинчатых монокристаллов с максимальным размером грани пластины около 100 мкм. Результаты оптимизации приведены в **Таблице 2.5**.

Табл. 2.5. Результаты оптимизации условий кристаллизации.

Препарат	Условия кристаллизации
PLP-форма холофермента TA_Halhu	Условие 1: 0,1 М Ацетат натрия pH 4,8, 18% (m/v) ПЭГ 3350, 4 °С
	Условие 2: 45% (v/v) Tacsimate pH 7,0, 0,1 М Бис-Трис пропан, pH 7,0, 15 °С
PLP-форма холофермента варианта R90I	45% (v/v) Tacsimate pH 7,0, 0,1 М Бис-Трис пропан pH 7,0, 15 °С

Кристаллы комплекса WT TA_Halhy с D-цикloserином получали настаиванием кристаллов холофермента TA_Halhy, полученных в условиях 1, в растворе осадителя с добавлением D-цикloserина в концентрации 10 мМ в течение 10 секунд. Для получения кристаллов комплекса варианта R90I с фенилгидразином проводили настаивание кристаллов PLP-формы холофермента варианта R90I в течение 15 секунд в растворе осадителя в присутствии 50 мМ фенилгидразина.

Автор выражает благодарность Николаевой Алене Юрьевне НИЦ «Курчатовский институт» и м.н.с. Варфоломеевой Ларисе Александровне и м.н.с. Матюте Илье Олеговичу ФИЦ «Биотехнологии» РАН за помощь в проведении работ по кристаллизации TA_Halhy.

2.6.2. Сбор и обработка дифракционных данных. Решение и уточнение структур TA_Halhy и вариантов

Перед рентгеноструктурным экспериментом одиночные кристаллы в течение 10 секунд выдерживали в противорастворе с добавлением 15% (v/v) глицерина, далее помещали кристаллы в петлю и замораживали в струе жидкого азота. Дифракционные данные собирали при 100 К с помощью следующих станций-источников рентгеновского излучения: станция BL41XU синхротронного источника Spring8 (Япония) (кристаллы WT TA_Halhy в комплексе с D-цикloserином); рентгеновский дифрактометр Rigaku OD XtaLAB Synergy-S (ИОХ РАН, Россия) (кристаллы холофермента варианта TA_Halhy с заменой R90I и его комплекса с фенилгидразином); ID23-1 (ESRF, Франция) (кристаллы холофермента WT TA_Halhy и комплекса с D-цикloserином). Сбор данных проводили при 100 К.

Обработку кристаллографических данных проводили в программах CrysAlisPro [223], Pointless [224], Dials [225]. В программе MOLREP [226] проводили решение структур с помощью метода молекулярного замещения. Структура BCAT из *Geoglobus acetivorans* (PDB код: 5E25) выступала в качестве стартовой модели при решении структуры PLP-формы холофермента WT TA_Halhy. Для решения структуры варианта и структур комплексов моделью выступала структура PLP-формы холофермента WT TA_Halhy (PDB код: 7P7X. Уточнение структур проводили с помощью программы REFMAC5 из пакета CCP4 [227]. Для последующего ручного уточнения моделей, а также для визуализации электронной плотности использовали программу COOT [228]. В **Таблице 8** указаны данные рентгеноструктурного анализа.

Табл. 2.6. Данные рентгеноструктурного анализа для WT TA_Halhy и варианта.

	PLP-форма холофермента			Комплексы	
	WT TA_Halhy		TA_Halhy вариант R90I	WT TA_Halhy с D-циклосерином	TA_Halhy вариант R90I с фенилгидразином
	Условие 1	Условие 2			
Источник излучения	ID30A-3. ESRF	Rigaku OD XtaLAB Synergy-S		BL41XU. Spring8	Rigaku OD XtaLAB Synergy- S
Длина волны, Å	0,97	1,54	1,54	0,9	1,54
Температура, К	100	100	100	100	100
Детектор	Eiger X4M	HyPix- 6000HE	HyPix- 6000HE	Pixel Dectris Eiger X 16M	HyPix-6000HE
Диапазон вращения на одно изображение, °	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3
Расстояние детектор- кристалл, мм	131,78	36	40	250	36
Полный диапазон вращения, °	160	360	360	180	360
Пространственная группа	C2	C2	C2	C2	C2
a; b; c, Å	86,88; 71,75; 52,99	86,04; 71,90; 52,02	85,39; 72,63; 52,24	86,9; 71,94; 53,09	85,75; 72,75; 52,34
α ; β ; γ , °	90,0; 100,96; 90,0	90,00; 100,14; 90,00	90,0; 100,8; 90,0	90,00; 101,47; 90,00	90,0; 100,8; 90,0
Разрешение, Å	52,03–2,00 (2,04–2,00)	21,96–2,00 (2,05–2,00)	21,77–2,00 (2,05–2,00)	42,52–1,41 (1,43–1,41)	20,82–2,00 (2,05–2,00)
Полнота набора, %	97,4 (92,5)	99,7 (97,6)	99,4 (95,0)	99,7 (99,9)	99,7 (96,8)
Число независимых рефлексов	21396 (1419)	21090 (1484)	21132 (1470)	61465 (3027)	21415 (1528)
I/ σ , I	5,2 (1,9)	23,7 (4,9)	7,0 (3,1)	6,5 (0,6)	23,0 (7,1)
R_{meas} , %	13,4 (57,6)	7,5 (39,1)	18,3 (43,4)	8,6 (4,7)	6,6 (30,4)
$CC_{1/2}$, %	98,7 (87,1)	99,8 (92,6)	98,9 (92,0)	99,8 (94,6)	99,9 (96,2)
R_{fact} , %	18,0	14,5	19,4	17,2	15,6
R_{free} , %	24,4	19,0	23,6	20,3	19,6
Средний B-фактор					
Белок	27,9	23,2	15,3	22,8	21,1
Вода	30,5	27,5	20,6	32,8	28,7
Лиганд	25,5	24,9	13,7	25,3	29,4
Число неводородных атомов					
Белок	2272	2315	2280	2306	2334
Лиганды	15	15	15	29	29
Растворитель	171	116	187	267	205
Всего	2458	2446	2482	2608	2568
Среднеквадратичные отклонения					
Валентные углы, град	1,95	2,01	1,81	2,006	1,68
Длины связей, Å	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01
График Рамачандрана					
Наиболее благоприятные, %	92,5	96,4	96,8	97,9	97,1
Допустимые, %	5,7	3,2	3,2	2,1	2,9
Код PDB	7P7X	8YRT	8RAF	8AHU	8RAI

Автор выражает благодарность с.н.с., к.б.н. Бойко Константину Михайловичу и м.н.с. Матюте Илье Олеговичу ФИЦ Биотехнологии РАН за проведение сбора и обработки данных рентгеноструктурного анализа.

2.6.3. Анализ кристаллических структур

Построение пространственных структур и их визуальный анализ проводили в программах COOT и PyMOL версия 4.6 (Schrodinger, США). Для анализа межсубъединичных контактов использовали программу PDBePISA [229]. Структурное выравнивание и сравнение проводили в программе PDBeFOLD [230].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

1.1. Каталитические свойства трансаминазы из *H. hydrossis* (TA_Halhy)

1.1.1. Получение TA_Halhy в рекомбинантной форме

Ген (Halhy_2446), кодирующий PLP-зависимую трансаминазу IV типа укладки (UniProt код: F4KWH0), был обнаружен геноме аэробной грамотрицательной бактерии *Haliscomenobacter hydrossis*. Проведенный анализ выравнивания аминокислотных последовательностей охарактеризованных трансаминаз IV типа укладки позволил отнести новую трансаминазу к неканоническим DATA (Таблица 1.3, Таблица 3.1). Степень идентичности последовательности TA_Halhy с другими неканоническими DATA составила 31% и 26% для AmicoTA и VlasaTA, соответственно.

Табл. 3.1. Мотивы аминокислотной последовательности канонических ТА IV типа укладки (голубой) и неканонических DATA (розовый). Жирным выделены остатки консервативного мотива **R-[RK]** неканонических DATA.

ТА	Аминокислотные остатки, формирующие активный центр	Идентичность, %
BCAT из <i>E. coli</i>	³¹ YxxxxFxGxR ⁴⁰ ... ⁹⁵ YxR ⁹⁷ ... ¹⁰⁷ MxV ¹⁰⁹ ... ¹⁹⁴ GAGE ¹⁹⁷ ... ²⁵⁶ GTAA ²⁵⁹	24
DATA из <i>Bacillus</i> sp. YM-1	²⁶ FxxxxYxVxK ³⁵ ... ⁸⁶ HxY ⁸⁸ ... ⁹⁸ RxH ¹⁰⁰ ... ¹⁷⁸ GSSS ¹⁸¹ ... ²⁴⁰ STTS ²⁴³	26
(R)-ATA из <i>A. fumigatus</i>	⁵³ HxxxxYxVxS ⁶² ... ¹¹³ FxE ¹¹⁵ ... ¹²⁵ xRx ¹²⁷ ... ²¹³ GSGF ²¹⁶ ... ²⁷³ TTAG ²⁷⁶	24
CpuTA	⁴⁶ RxxxxFxTx A ⁶⁰ ... ¹¹⁵ F xK ¹¹⁷ ²⁰⁸ GPTS ²¹¹ ... ²⁷⁰ SSVR ²⁷³	30
TA_Halhy	²⁸ RxxxxFxYxL ³⁷ ... ⁹⁸ G xR ⁹⁰ ¹⁷⁷ SARS ¹⁸⁰ ... ²³⁸ STIK ²⁴¹	100

Для получения TA_Halhy в рекомбинантной форме синтетический ген Halhy_2446 клонировали в плазмиду pET-21d-6HisTEV, которой далее трансформировали клетки *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS. Рекомбинантную TA_Halhy с 6-His-фрагментом на N-конце нарабатывали в количестве 40-50 мг с 1 г клеток. Аминокислотную последовательность TA_Halhy подтверждали масс-спектрометрически. Для кристаллизации 6-His-фрагмент отщепляли и вводили дополнительные стадии очистки: гель-фильтрацию и гидрофобную хроматографию. По результатам гель-фильтрации TA_Halhy в растворе находится в димерной форме (Рис. 3.1А). Выход очищенной TA_Halhy составлял 60% относительно препарата с 6-His-фрагментом. Для функциональной характеристики использовали TA_Halhy с 6-His-фрагментом; активности препаратов TA_Halhy с 6-His-фрагментом и без него различались незначительно, менее 10%. На Рис. 3.1Б представлена электрофореграмма фракций TA_Halhy на этапах экспрессии гена в клетке, выделения и очистки белка.

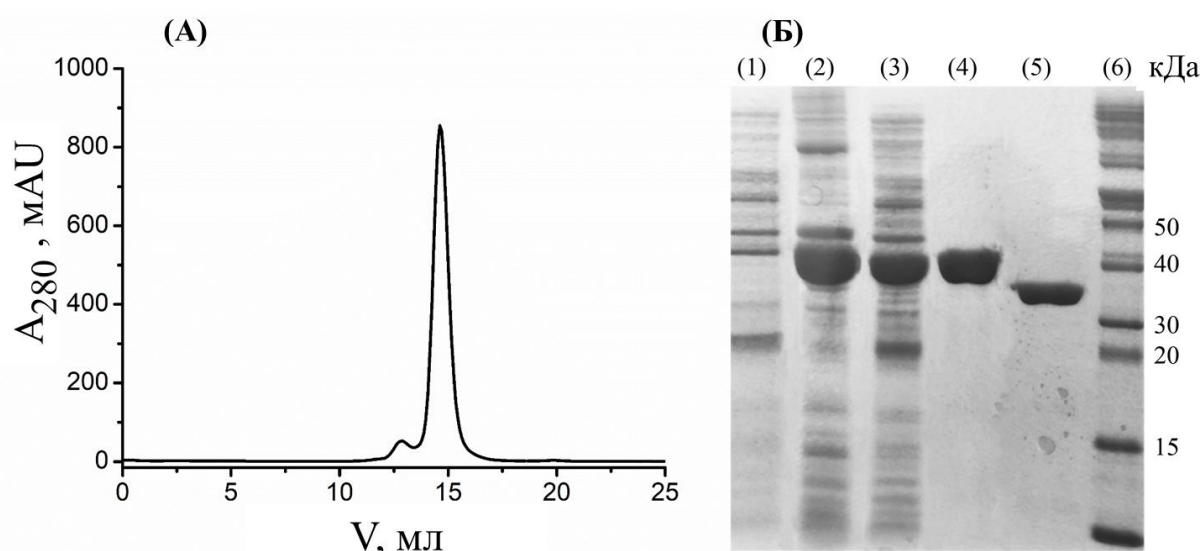


Рис. 3.1. Получение препарата TA_Halhu. (А) Хроматограмма гель-фильтрации TA_Halhu. Основной пик соответствует димерной форме TA_Halhu. (Б) Электрофореграмма фракций TA_Halhu в ходе получения белка. Клетки *E.coli* до (1) и после (2) индукции; (3) растворимая фракция после обработки ультразвуком с последующим отделением нерастворимой части; (4) фракция TA_Halhu с 6-His-фрагментом после металл-хелатной хроматографии; (5) фракция TA_Halhu после отщепления 6-His-фрагмента, гидрофобной хроматографии и гель-фильтрации; (6) стандарты белков Page Ruler Unstained Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific, США).

1.1.2. Субстратная специфичность TA_Halhu в реакциях трансминирования

Субстратную специфичность TA_Halhu анализировали в полных реакциях трансминирования, в качестве субстратов использовали эталонные субстраты TA IV типа укладки. Кинетические параметры реакций, катализируемых TA_Halhu приведены в **Таблице 3.2**. Проведенный анализ показал, TA_Halhu активна только с D-аминокислотам, активности с L-аминокислотами и первичными (*R*)- и (*S*)-аминами нет.

Табл. 3.2. Кинетические параметры реакций трансминирования, катализируемых TA_Halhu, в 50 мМ КФБ, pH 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-лейцин	α-Кетоглутарат /пируват	Нет активности			
L-аланин					
(<i>S</i>)-PEA					
(<i>R</i>)-PEA					

Влияние pH и температуры на активность TA_Halhy исследовали в реакции трансминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом (Рис. 3.2). Оптимальные pH и температура реакции составили 8,0-8,5 и 40 °С, соответственно.

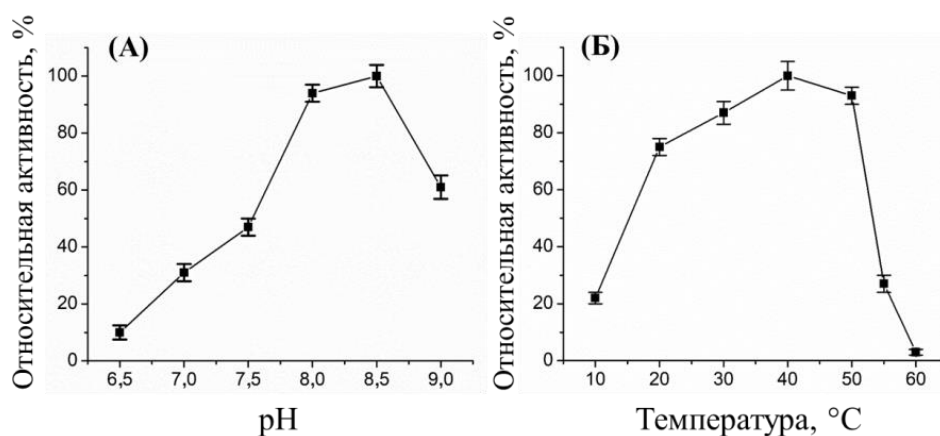


Рис. 3.2. Зависимости активности TA_Halhy от pH (А) и температуры (Б) в реакции трансминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат. 100% соответствует 27 ± 2 U/мг в смешанном буфере 25 мМ Трис-НСl и 25 мМ К-фосфат при 30 °С (А) и 50 ± 3 U/мг в 50 мМ КФБ, pH 8,0 (Б). Экспериментальные значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Кинетические параметры полных реакций трансминирования представлены в **Таблице 3.2**. Наилучшими субстратами TA_Halhy являются D-глутамат и пируват. При этом TA_Halhy характеризуется одной из наибольших каталитических констант реакции трансминирования среди описанных DATA. Для сравнения, k_{cat} в реакции трансминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат составляет 134 ± 2 с⁻¹ для bsDATA (pH 8,5, 50 °С) [138], 10 ± 1 с⁻¹ для AmicoTA (pH 9,0, 60 °С) [78] и $8,1 \pm 0,3$ с⁻¹ для BlasaTA (pH 8,0, 40 °С) [128].

1.1.3. Термостабильность холофермента и апофермента TA_Halhy

Для анализа термостабильности холофермента и апофермента TA_Halhy применяли два подхода: (1) определение температуры полуперехода ($T_{0.5}$) белка из нативного состояния в денатурированное при наблюдении за сигналом кругового дихроизма (КД) в ходе нагревания в диапазоне 20-80 °С; (2) определение остаточной активности фермента в процессе выдерживания при определенной температуре. Инкубирование PLP-формы холофермента и апофермента в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 40 °С не приводило к агрегации, остаточная активность спустя четверо суток составляла более 90% (Рис. 3.3А). Температуры полуперехода из нативного состояния в денатурированное для холофермента и апофермента составили $56,4 \pm 0,5$ и $57,0 \pm 0,8$ °С, соответственно (Рис. 3.3Б). Таким образом апофермент TA_Halhy стабильна, сохраняет

способность к реактивации и не агрегирует в течение четырех суток, другими словами, PLP не вносит вклад в термостабильность функционального димера.

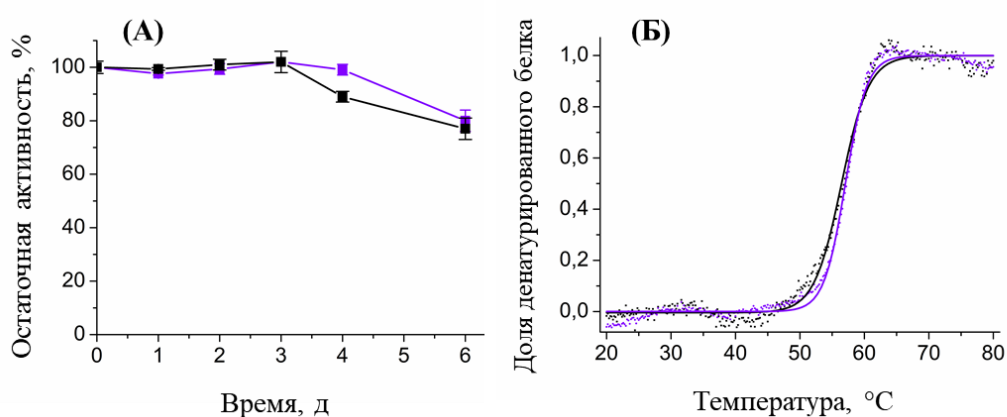


Рис. 3.3. Стабильность PLP-формы холофермента (черный) и апофермента (фиолетовый) TA_Halhy. (А) Зависимость остаточной активности TA_Halhy (1 мг/мл) от времени при инкубации в КФБ, pH 8,0, при 40 °С (в присутствии 100 мкМ PLP в случае PLP-формы). 100% соответствует 50 ± 3 (черный) и 52 ± 4 (фиолетовый) U/мг. Экспериментальные значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение. (Б) Зависимость доли денатурированной TA_Halhy (0,3 мг/мл) от температуры в 20 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8,0 при анализе методом КД.

1.1.4. Спектральные свойства TA_Halhy

PLP-форма холофермента TA_Halhy имеет максимумы поглощения при 280 нм и 416 нм с плечом при 330 нм (**Рис. 3.4А**). При 280 нм поглощают боковые группы ароматических остатков, при 416 нм поглощает протонированное основание Шиффа PLP и ϵ -аминогруппы каталитического остатка лизина – внутренний альдимин в кетоенаминной форме, плечо при 330 нм соответствует енолиминной форме протонированного внутреннего альдимиона (**Рис. 3.4Б,В**). Протонированная форма внутреннего альдимиона TA_Halhy стабильна и наблюдается в диапазоне pH 6,0-10,0 (**Рис. 3.4Б**).

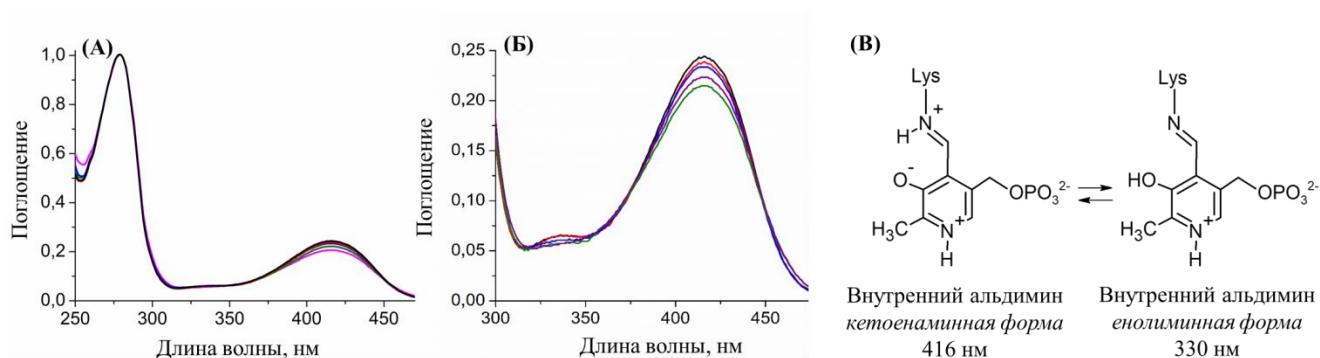


Рис. 3.4. Ионное состояние PLP-формы холофермента TA_Halhy. (А,Б) Спектры поглощения холофермента (25 мкМ) в разных буферах: 50 мМ MES рН 6,0 (черный); 50 мМ HEPES рН 7,0 (красный), рН 8,0 (синий); 50 мМ CHES рН 9,0 (фиолетовый), рН 10,0 (зеленый), в диапазоне длин волн от 250 до 470 нм (А) и от 300 до 470 нм (Б). (В) Кетонаминная и енолиминная формы внутреннего альдимида TA_Halhy.

Таким образом, внутренний альдимин TA_Halhy функционирует в протонированной форме, аналогично известным DATA и BCAT и вообще TA IV типа укладки [73,78,89–91]. Кроме того, при оптимальных рН реакции (8,0-8,5), катализируемой TA_Halhy, аминогруппа D-аминокислоты протонирована на 90% и более (рКа = 9-10 [231]) и образование комплекса Михаэлиса только с депротонированной формой D-аминокислоты малоэффективно. Учитывая высокую активность TA_Halhy, логично ожидать, что образование комплекса Михаэлиса сопровождается депротонированием субстрата-D-аминокислоты при общесновном катализе функциональной группой в активном центре или при общесновном катализе α -карбоксылной группой субстрата, которую при этом стабилизирует ОЗ' атом PLP (см. Раздел 1.3).

1.1.5. Анализ полуреакций TA_Halhy с D-аминокислотами

Метод полуреакций – это удобный подход для исследования связывания в активном центре ТА одного субстрата в отсутствие ингибирования вторым субстратом. Собственно полуреакция (Рис. 3.5) представляет собой полуоборот молекулы фермента и переход из PLP-формы в РМР-форму с образованием продукта-кетокислоты и его выходом из активного центра.

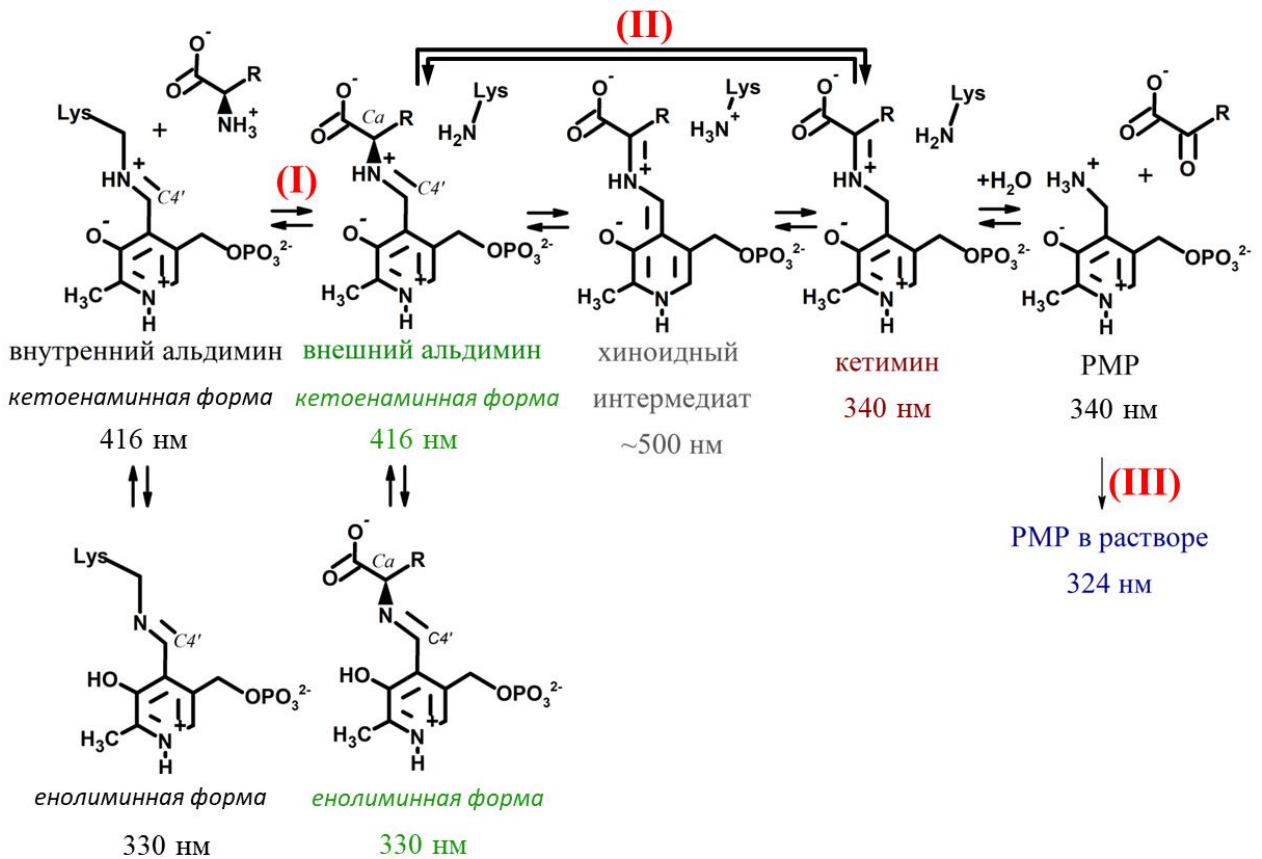


Рис. 3.5. Схема полуреакции PLP-формы TA_Halhy с аминокислотой.

Так как TA_Halhy это быстрый фермент для анализа его полуреакций с аминокислотами использовали метод «остановленного потока». Анализ проводили с четырьмя D-аминокислотами – D-аланином, D-глутаматом, D-лейцином и D-фенилаланином. Ранее детальный анализ кинетики полуреакций DATA не проводился.

1.1.5.1. Общй ход кинетических кривых и стадия III

Кинетические кривые полуреакций, наблюдаемые методом «остановленного потока», приведены на **Рис. 3.6**. На кинетических кривых полуреакции при 416 и 330 нм с D-аланином и D-глутаматом наблюдали одну стадию, т.е. одностадийный переход из исходных соединений в продукты (стадия II) (**Рис. 3.6А-Г**). В случае с D-лейцином и D-фенилаланином на кинетических кривых полуреакций наблюдали две стадии, т.е. двухстадийный процесс (стадии I и II) (**Рис. 3.6Д-З**).

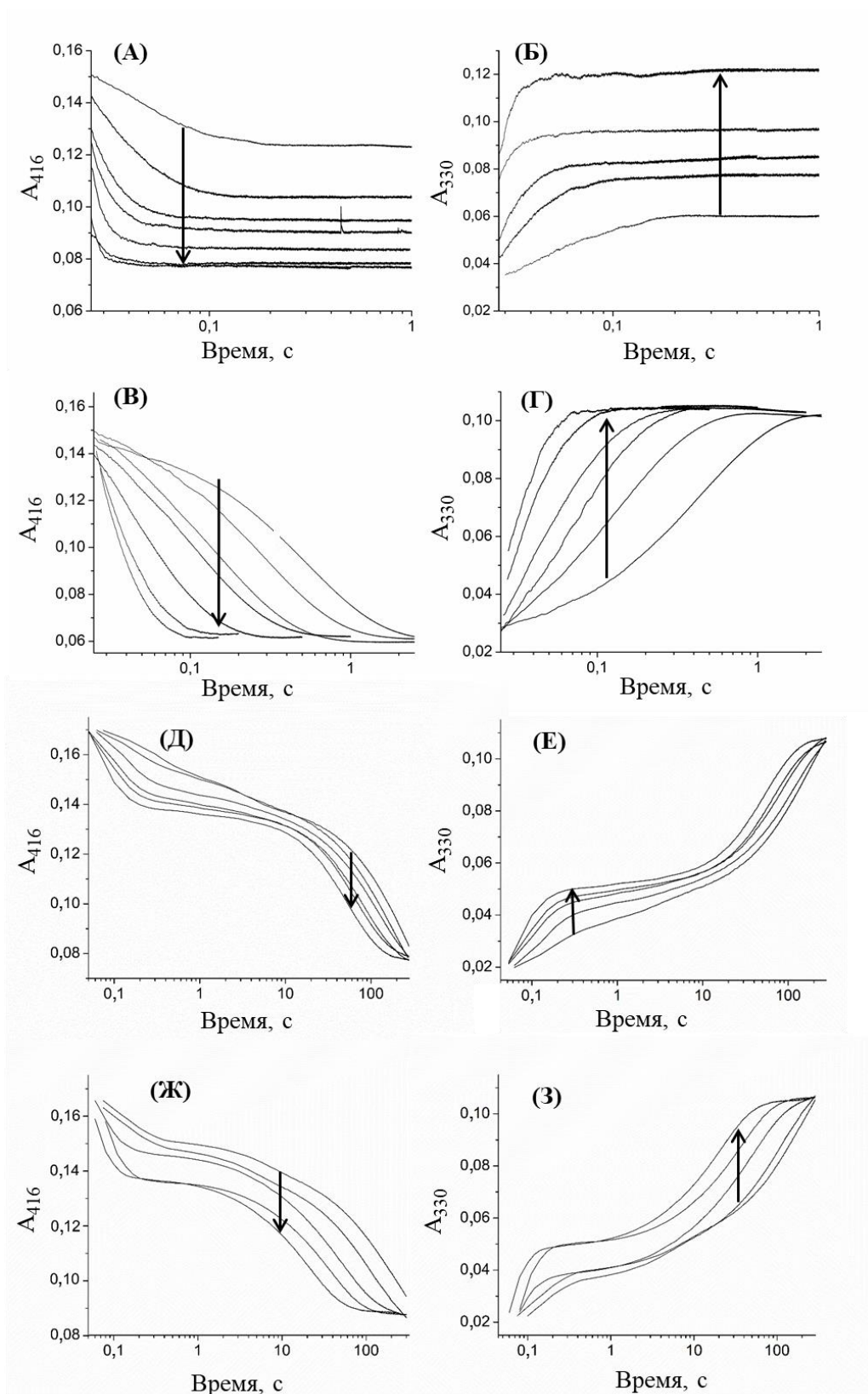


Рис. 3.6. Изменение интенсивности поглощения при наблюдении методом «остановленного потока» при 416 нм и 330 нм во времени для полуреакций 25 мкМ ТА_NalHy в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С с D-глутаматом (А, Б), D-аланином (В, Г), D-лейцином (Д, Е) и D-фенилаланином (Ж, З). Повышение концентрации субстрата отмечено стрелкой.

Для всех проанализированных субстратов наблюдали не только быстрые спектральные изменения (0,1-200 секунд) (стадии I и II), но и медленную стадию III (в течение 40 минут), (Рис. 3.5, Рис. 3.7). Наблюдаемые константы каждой стадии полуреакций получали обработкой экспериментальных кинетических кривых уравнением 1 (см. Раздел 2.5.1), каждая стадия имела моноэкспоненциальный характер. Константа скорости стадии III не зависела от субстрата и его концентрации и составила $0,0022 \pm 0,0005 \text{ с}^{-1}$ для D-глутамата, $0,0030 \pm 0,0006 \text{ с}^{-1}$ для D-аланина, $0,0026 \pm 0,0004 \text{ с}^{-1}$ для D-лейцина и $0,0020 \pm 0,0003 \text{ с}^{-1}$ для D-фенилаланина. Дополнительно полуреакции исследовали в спектральном режиме с помощью UV-Vis и КД спектроскопии, что позволило идентифицировать промежуточные соединения полуреакций и объяснить стадии I, II и III. Рассмотрим полуреакцию с D-лейцином в спектральных условиях.

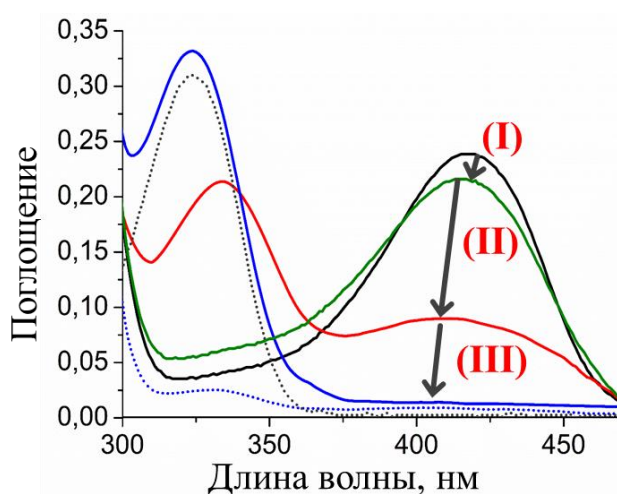


Рис. 3.7. Изменения спектра поглощения 25 мкМ TA_Halhy в ходе полуреакции: внутренний альдимин (черный), внешний альдимин TA_Halhy и α -метиллейцина – аналога субстрата без атома водорода у C α атома (зеленый), TA_Halhy после инкубирования с D-лейцином (10 мМ) в течение трех (красный) и 40 минут (синий) в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 40 °С с последующей сменой буфера (синий, пунктирная); спектр поглощения 25 мкМ свободного РМР (серый, пунктирная) в 50 мМ КФБ, pH 8,0.

Взаимодействие PLP-формы TA_Halhy с D-лейцином приводило к резкому снижению интенсивности поглощения при 416 нм и появлению максимума поглощения при 340 нм (стадии I и II) (Рис. 3.7). Последующее выдерживание реакционной смеси в течение 40 минут приводило к медленному снижению поглощения при 416 нм (стадия III). При этом максимум поглощения при 340 нм сдвигался в коротковолновую область, финальный спектр имел максимум при 324 нм, что соответствует поглощению свободного РМР. Спектр после перевода препарата в другой буфер соответствовал апоферменту TA_Halhy, т.е. кофактор в активном центре отсутствовал (Рис. 3.7). Анализ КД спектров также подтвердил выход РМР из активного центра на временах

стадии III. Если подробнее, то КД спектр PLP-формы TA_Halhy имел минимум при 416 нм, добавление к препарату D-лейцина приводило к появлению минимума при 340 нм, который при дальнейшем выдерживании исчезал (кофактор, несвязанный в активном центре, не дает сигнала КД в области 300-500 нм) (Рис. 3.8). Таким образом, поглощение при 340 нм соответствовало РМР, связанному в активном центре TA_Halhy. В классическом пиридоксальном катализе в полуреакции устанавливается равновесие между внутренним альдимином и РМР-формой ТА, при этом равновесие зависит от субстрата и определяется соотношением констант специфичности ТА к продукту-кетокислоте, и субстрату-D-аминокислоте [61]. В случае TA_Halhy выход РМР из активного центра приводил к полному превращению PLP-формы фермента, то есть равновесие в полуреакции не устанавливалось (Рис. 3.7). Наблюдаемый выход РМР из активного центра TA_Halhy указывал на низкое сродство апофермента к РМР.

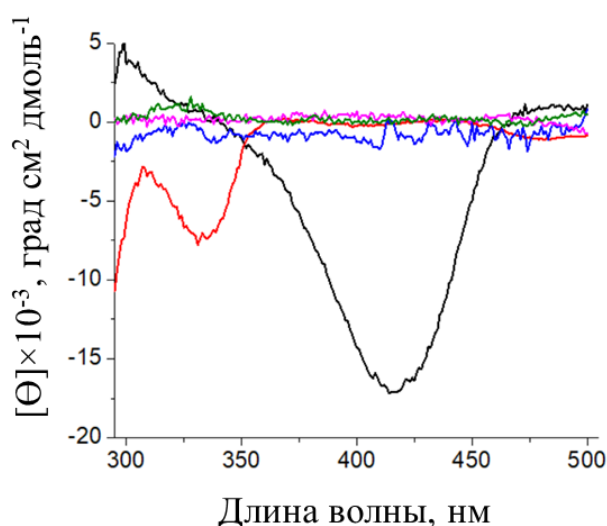


Рис. 3.8. КД спектры PLP-формы TA_Halhy (24 мкМ) до (черный) и после инкубирования с D-лейцином (10 мМ) в течение трех (красный) и 40 минут (голубой) в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С. КД спектры свободных PLP (зеленый) и РМР (розовый) в концентрациях 24 мкМ.

1.1.5.2. Стадии I и II полуреакций TA_Halhy

В литературе в основном описывается одностадийная кинетика моноэкспоненциального вида для полуреакций ТА, которая соответствует образованию кетимина [37,61,232,233]. Однако встречаются работы, в которых образование кетимина в полуреакциях происходит в две стадии. Например, в работах по аланин-глиоксилат ТА человека и диалкилглициндекарбоксилазе из *Burkholderia seracida*, опираясь на КД спектры и спектры поглощения, стадия I была отнесена к образованию внешнего альдимины, а вторая к превращению внешнего альдимины в кетимин [87,234]. Если образование кетимина в полуреакциях с D-глутаматом и D-аланином происходило

в одну стадию, то образование кетимина для D-лейцина и D-фенилаланина происходило в две стадии (**Рис. 3.6**). Две стадии наблюдались как по убыли поглощения при 416 нм, так и по накоплению при 330 нм. Другими словами, для D-лейцина и D-фенилаланина фиксировалось промежуточное соединение. Стоит отметить, что накопления хиноидного интермедиата, максимум поглощения которого ~500 нм, (**Рис. 3.5**) со всеми субстратами не наблюдалось. Чтобы разобраться в наблюдениях, был проведен спектральный анализ взаимодействия PLP-формы TA_Halhy с негидролизуемым аналогом субстрата D-лейцина – D,L- α -метиллейцином, полуреакция с которым останавливается на формировании внешнего альдимины из-за отсутствия атома водорода у C α атома. Инкубирование PLP-формы фермента в присутствии D,L- α -метиллейцина приводило к снижению интенсивности поглощения при 416 нм со сдвигом на 2 нм в коротковолновую область и одновременному росту при 330 нм (**Рис. 3.7**). Таким образом, мы отнесли наблюдаемые в ходе стадии I изменения к образованию внешнего альдимины, таутомерный состав (кетонамин/енолимин) которого отличается от внутреннего альдимины (**Рис. 3.5, 3.7**). Исходя из наблюдаемых спектральных изменений, стадия II была отнесена к переходу из внешнего альдимины в кетимин (1,3-перенос протона) (**Рис. 3.5, 3.7**) для всех субстратов. В литературе описаны случаи изменения спектров поглощения при образовании внешнего альдимины для TA I типа укладки [37,39,81,87,234], аналогичные наблюдения для DATA приведены впервые.

Для того чтобы подтвердить присутствие енолиминной формы внутреннего и внешнего альдимины, а также показать принципиальную возможность изменения равновесия кетонамин/енолимин для альдиминов TA_Halhy были проанализированы спектры флуоресценции внутреннего и внешнего альдиминов и спектры поглощения в присутствии органических растворителей. Для получения внешнего альдимины к PLP-форме TA_Halhy (24 мкМ) добавляли D,L- α -метиллейцин в концентрации 10 мМ. Спектры флуоресценции как внешнего, так и внутреннего альдиминов имели максимум испускания при 513 нм (возбуждение при 416 нм) и два максимума испускания при 380 и 513 нм (возбуждение при 330 нм) (**Рис. 3.9А,Б**). Наличие двух максимумов испускания при возбуждении при 330 нм указывало на присутствие енолиминной формы, тогда как испускание при 513 нм (возбуждение при 416 нм) – кетонаминной формы [6,16]. Добавление к растворам внутреннего и внешнего альдиминов органических растворителей (ДМСО и 1,4-диоксана) приводило к снижению интенсивности поглощения при 416 нм и одновременному росту при 330 нм, данное наблюдение указывало на увеличение концентрации енолиминной формы альдиминов при уменьшении диэлектрической постоянной среды (**Рис. 3.9В-Е**), что согласуется с более ранними работами [4]. Полученный результат подтверждает существование динамического равновесия между енолиминной и

кетонаминной формой внутреннего и внешнего альдиминов TA_Halhu. Проведенный спектральный анализ подтвердил отнесение стадии I полуреакций с D-лейцином и D-фенилаланином к образованию и накоплению внешнего альдимины (**Рис. 3.5**), таутомерное равновесие которого сдвинуто в сторону енолиминной формы в большей степени, чем таутомерное равновесие внутреннего альдимины. Для полуреакций с D-глутаматом и D-аланином образование внешнего альдимины вероятно происходит в течение мертвого времени прибора (~18 мс) и не детектируется, однако не исключено, что образование внешнего альдимины с D-аланином и D-глутаматом не сопровождается спектральными изменениями.

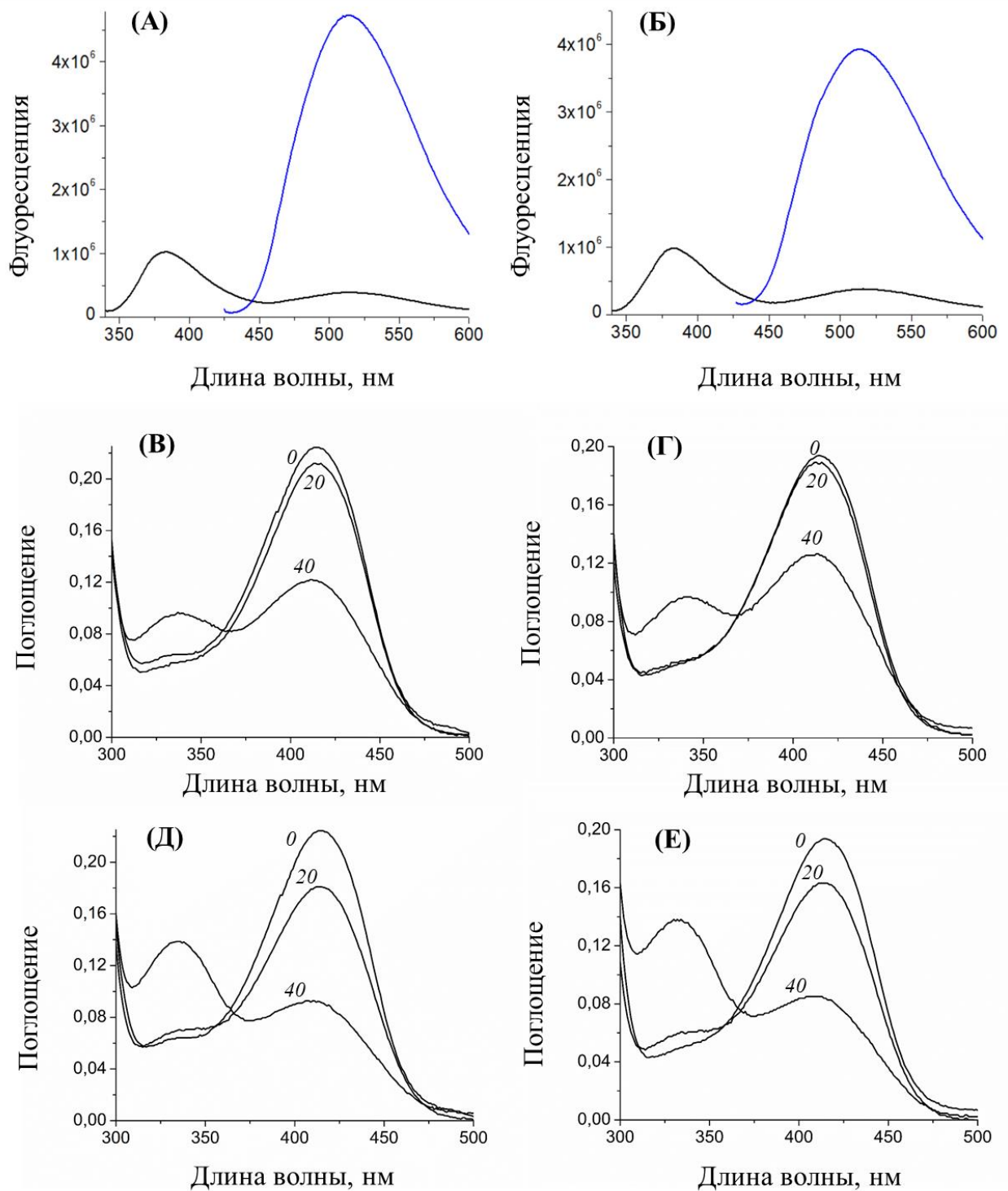


Рис. 3.9. Анализ таутомерного равновесия внутреннего и внешнего альдиминов TA_Nalhy. (А, Б) Спектры флуоресценции внутреннего (А) и внешнего альдиминов (Б) в КФБ, рН 8,0, при 25 °С, концентрация фермента составляла 12 мкМ: возбуждение при 330 нм (черный) и при 416 нм (синий). (В, Г, Д и Е) Спектры поглощения внутреннего (В, Д) и внешнего альдиминов (Г, Д) в КФБ, рН 8,0, при 25 °С, в присутствии разных концентраций ДМСО (В, Г) и 1,4-диоксана (Д, Е) концентрация фермента составляла 25 мкМ. Процентное содержание (v/v) растворителя указано рядом с соответствующим спектром.

1.1.5.3. Кинетическая схема полуреакций

Анализ полуреакций проводили при нескольких концентрациях каждого субстрата и наблюдаемые константы имели зависимость с насыщением от концентрации субстратов как для стадии I, так и для стадии II. Поскольку константы скоростей, стадий I и II много больше стадии III, обратимость на стадиях I и II учитывалась. Обратная реакция проявляла себя в зависимости амплитуды от концентрации субстрата (**Рис. 3.6**) и в том, что экспериментальные зависимости констант скоростей наилучшим образом описывались гиперболой, которая не проходит через начало координат (уравнение 2, Раздел 2.5.1) (**Рис. 3.10**, на рисунке в качестве примера приведена концентрационная зависимость для стадии II полуреакции с D-глутаматом). Таким образом, для стадии I в полуреакциях с D-лейцином и D-фенилаланином и на стадии II в полуреакции с D-глутаматом учитывался вклад обратимости.

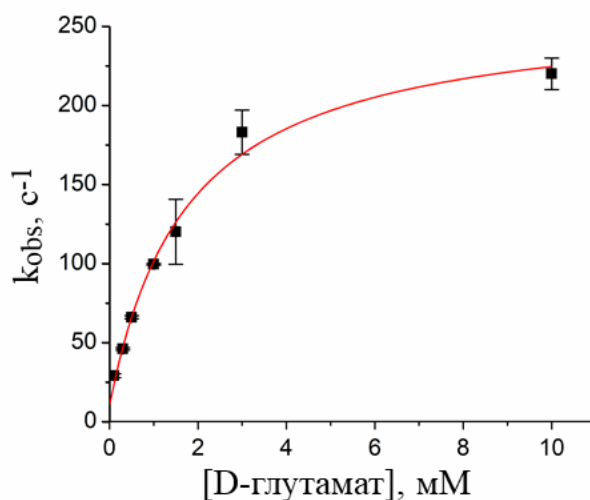


Рис. 3.10. Зависимость наблюдаемой константы скорости стадии II полуреакции с D-глутаматом от его концентрации. Экспериментальные значения показаны как среднее \pm стандартное отклонение. Аппроксимация показана красной линией.

Проведенный анализ и полученные результаты позволили предложить следующую кинетическую схему полуреакции (**Рис. 3.11**). Стадия образования EPLP•S рассматривалась как равновесный процесс, при этом равновесие устанавливалось быстро по сравнению с последующими стадиями. Исходя из анализа экспериментальных данных, полагаем, что $k_I, k_{-I} \gg k_{II}$. Таким образом, наблюдаемые константы стадии I и II можно выразить уравнениями (9) и (10).

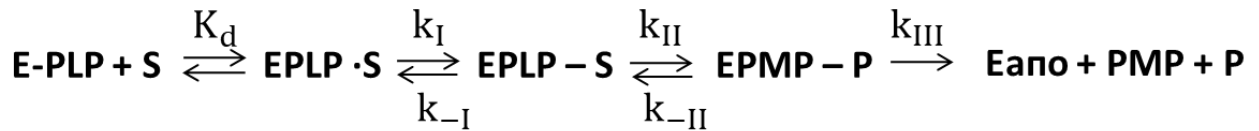


Рис. 3.11. Кинетическая схема полуреакций. EPLP – внешний альдимин, S – субстрат, EPLP•S – комплекс Михаэлиса, EPLP–S – внешний альдимин, EPMP–P – кетимин, Eapo – апофермент, P – продукт, PMP – PMP в растворе.

k

p

b

o

s

d

e

k

l

d

l

l

s

k

p

p

e

p

k

d

s

s

k

d

l

l

a

p

p

r

r

s

k

r

k

r

r

r

Рассчитанные константы стадий приведены в **Таблице 3.3**, их значения 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. Ранее согласованный механизм переноса протона был предложен для BCAT из *M. tuberculosis* по результатам кинетического изотопного эффекта в полуреакциях [73].

В случаях, когда вклад обратной реакции был незначителен, экспериментальные данные аппроксимировали уравнениями, в которых величина k_r была опущена. Величины $k_{II}^{app}/K_{II}^{app}$ и k_I/K_{dI} рассматривали как константу специфичности соответствующей стадии.

Табл. 3.3. Кинетические параметры полуреакций PLP-формы TA_Halhy с D-аминокислотами в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 40 °С.

Стадия I:					
Субстрат	Длина волны, нм	Параметры			
		k_I, c^{-1}	K_{dI}, mM	$k_I/K_{dI}, c^{-1}M^{-1}$	k_r, c^{-1}
D-лейцин	416	36 ± 5	66 ± 23	540 ± 260	$1,6 \pm 0,9$
	330	28 ± 1	50 ± 20	560 ± 240	2 ± 1
D-фенилаланин	416	70 ± 10	60 ± 25	1200 ± 660	3 ± 2
	330	52 ± 6	60 ± 20	870 ± 380	4 ± 1
Стадия II:					
Субстрат	Длина волны, нм	Параметры			
		k_{II}^{app}, c^{-1}	K_{II}^{app}, mM	$k_{II}^{app}/K_{II}^{app}, c^{-1}M^{-1}$	k_r, c^{-1}
D-аланин	416	133 ± 7	520 ± 50	260 ± 40	0
	330	113 ± 6	420 ± 50	270 ± 30	0
D-глутамат	416	250 ± 10	$1,8 \pm 0,4$	140000 ± 40000	12 ± 8
	330	186 ± 8	$1,5 \pm 0,3$	120000 ± 30000	8 ± 5
D-лейцин	416	$0,040 \pm 0,002$	88 ± 6	$0,45 \pm 0,05$	0
	330	$0,043 \pm 0,005$	100 ± 20	$0,4 \pm 0,1$	0
D-фенилаланин	416	$0,052 \pm 0,006$	40 ± 10	$1,3 \pm 0,5$	0
	330	$0,046 \pm 0,008$	50 ± 20	$1,0 \pm 0,5$	0

Анализ обратной полуреакции (PMP-формы TA_Nalhy с кетокислотам) не проводили ввиду быстрой диссоциации (менее 30 минут при 40 °C) PMP-формы TA_Nalhy на свободный PMP и апофермент.

Из анализа полуреакций можно заключить, что D-глутамат является специфическим субстратом для TA_Nalhy, в то время как D-аланин, D-лейцин и D-фенилаланин являются неспецифическими субстратами. Связывание D-аланина в активном центре это преимущественно связывание α -карбоксовой группы, добавление γ -карбоксовой группы (D-глутамат) увеличивало константу специфичности ($k_{II}^{app}/K_{II}^{app}$) в 500 раз, при этом введение гидрофобной боковой группы (D-лейцин и D-фенилаланин) снижало – в 200 раз (Таблица 3.3). Подобное наблюдение указывает на чувствительность TA_Nalhy к боковой группе D-аминокислоты. Интересно отметить, что для D-глутамата наблюдается снижение константы специфичности в полной реакции трансаминирования (k_{cat}/K_m) по сравнению с полуреакцией ($k_{II}^{app}/K_{II}^{app}$), что объясняется конкурентным ингибированием вторым субстратом. Для неспецифических субстратов наблюдается увеличение каталитической константы и/или константы специфичности в полных реакциях (Таблица 3.2) по сравнению с полуреакциями (Таблица 3.3) в 20-200 раз. Схожие наблюдения описаны для трансаминаз разветвленных L-аминокислот из *Thermococcus* sp. SKU-1 [235] и *T. uzoniensis* [124], а также для L-лизин-2-оксокетоглутарат-б-аминотрансферазы из *Flavobacterium lutescence* [236]. Наблюдаемый эффект может быть связан

с активацией фермента вторым специфическим субстратом (α -кетоглутаратом в случае TA_Halhy), однако механизм активации пока не ясен.

1.2. Структурный анализ TA_Halhy

1.2.1. Структура холофермента

Пространственная структура PLP-формы холофермента TA_Halhy определена методом рентгеноструктурного анализа (РСА) с разрешением 2,0 Å (PDB код: 7P7X) (Рис. 3.12). Кристаллическая ячейка содержит одну субъединицу. Анализ межсубъединичных контактов показал, что в кристалле, как и в растворе, TA_Halhy существует в виде гомодимера, площадь межсубъединичного контакта составляет 15% от площади поверхности субъединицы (Рис. 3.12А). Архитектура функционального димера TA_Halhy типична для трансаминаз IV типа укладки [93,94,118,120,142].

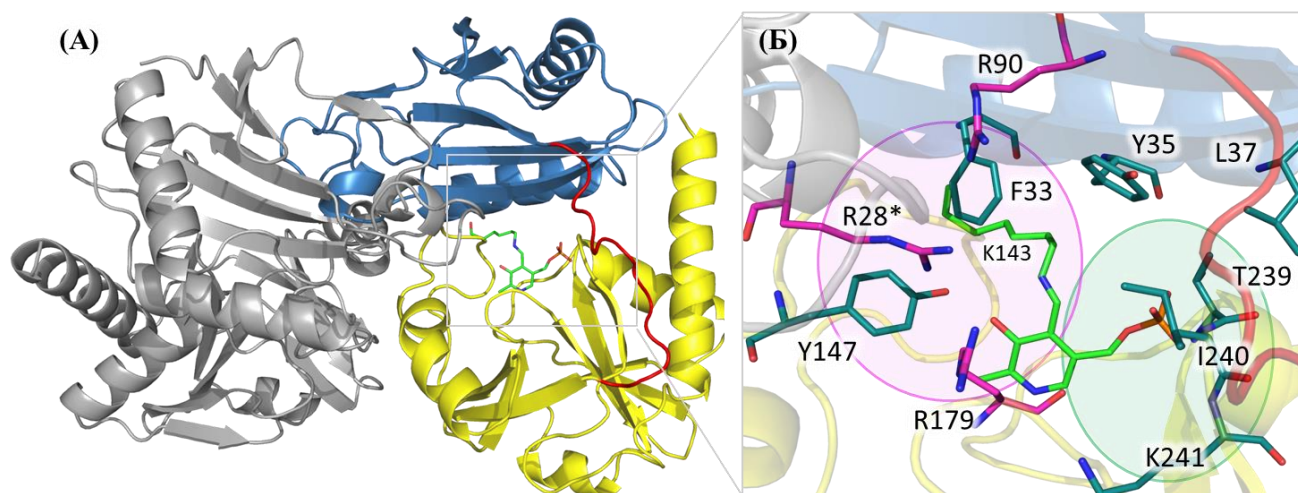


Рис. 3.12. Пространственная структура TA_Halhy. (А) Димер TA_Halhy. В правой субъединице синим отмечен малый домен, желтым – большой домен, красным – междоменная петля, ярко-зеленым отмечена молекула PLP и остаток каталитического лизина, серым – соседняя субъединица. (Б) Активный центр TA_Halhy. Остатки аргинина O-кармана показаны ярко-розовым, остальные остатки – зеленым, область O-кармана отмечена розовым, область P-кармана – зеленым. (*) обозначает остаток соседней субъединицы функционального димера.

Субъединица TA_Halhy имеет α/β структуру. Можно выделить два домена: большой домен, включающий остатки 128-281, и малый домен, включающий остатки 1-114. Междоменная петля соединяет два домена (остатки 115-127) (Рис. 3.12А). Анализ гомологичных структур TA_Halhy выявил его ближайших структурных гомологов: BCAT из *G. acetivorans* (RMSD 1,3 Å, PDB код: 5E25), *Archaeoglobus fulgidus* (1,2 Å, 5MR0) и *E. coli* (1,4 Å, 1I1K), DATA из *Bacillus* sp. YM-1 (1,6 Å, 4DAA) и (R)-ATA из *Aspergillus terreus* (1,6 Å, 4CE5). Междоменная петля TA_Halhy

(115-127) удалена от активного центра и не участвует в его формировании, что характерно для известных DATA. При этом положения β X-тяжа (31-39), β Y-тяжа (87-94), петли O-кармана (96-106), β -поворота1 (177-180) и β -поворота2 (238-241) совпадают с положениям аналогичных элементов в активных центрах других ТА IV типа укладки [93,94,118,120]. O-карман (область рядом с O3' атомом PLP) активного центра ТА_Halhy образован тремя остатками аргинина, R28* (звездочкой (*) отмечается остаток соседней субъединицы димера), R90 и R179, ароматическими остатками F33, Y35 и Y147, и, таким образом, представляет собой положительно заряженную область с гидрофобными включениями. P-карман (область рядом с фосфатной группой PLP) сформирован остатками L37, T239, I240, и K241 и открыт растворителю как в других DATA (**Рис. 3.12Б**).

В активном центре ТА_Halhy молекула PLP ковалентно связана с каталитическим остатком лизина K143 и координирована остатками через систему нековалентных взаимодействий (**Рис. 3.13**), которые консервативны среди известных ТА IV типа укладки [78,93,118,120,127,128,237]. Фосфатная группа удерживается водородными связями с боковыми цепями остатков T203 и T239, а также с атомами азота основной цепи T203 и I202. Помимо этого, она формирует солевой мостик с боковой цепью остатка R52. Атом N1 пиридинового кольца PLP взаимодействует с остатком E176 через солевой мостик, в то время как атом O3' PLP образует водородную связь с остатком Y147. Водородная связь между остатком Y147, расположенным на α -спирали большого домена, и O3' атомом PLP характерна для ВСАТ [79], в то время как в структурах канонических DATA и (R)-АТА O3' атом связывает остаток тирозина (Y31 в bsDATA), расположенный на β X тяже [93,119,120]. В активном центре ТА_Halhy это место занимает остаток F33. Правильная координация кофактора требуется не только для поддержания правильной ориентации молекулы PLP, но и правильного ионного состояния т` функциональных групп.

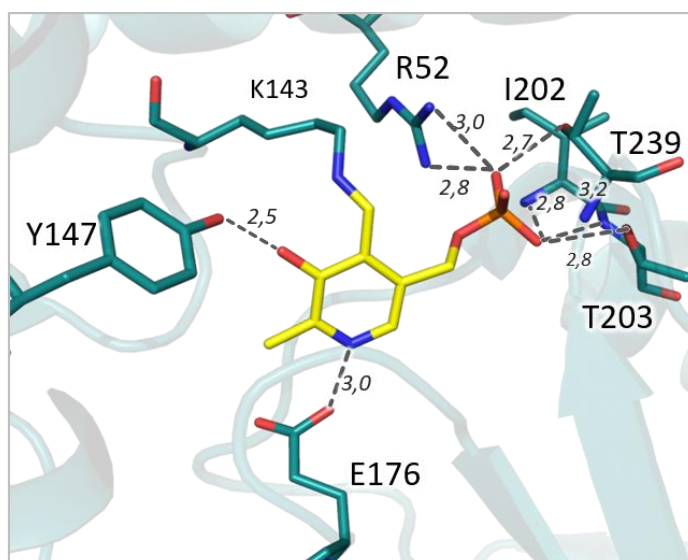


Рис. 3.13. Связывание PLP в активном центре TA_Halhy. Желтым отмечена молекула PLP, зеленым – остатки активного центра. Расстояния указаны в ангстремах и показаны пунктирными линиями.

Стоит отметить, что описанная структура холофермента, а также описанная ниже (см. Раздел 3.2.2) структура комплекса с ингибитором, были получены в неоптимальных условиях для функционирования TA_Halhy – при pH 4,8 (0,1 М Ацетат натрия, 18% (*m/v*) ПЭГ 3350), т.е. возник вопрос о соответствии полученных структур конформации фермента в рабочих условиях. Для прояснения данного вопроса были получены кристаллы холофермента TA_Halhy при pH 7,0 (45% (*v/v*) Tacsimate, 0,1 М Бис-Трис пропан) и определена пространственная структура (PDB код 8YRT). Ход полипептидных цепей структур холофермента, полученных при pH 4,8 и 7,0, совпадал (RMSD по C α атомам составило 0,21 Å), также наблюдалось сходство положений боковых групп остатков активного центра и координации кофактора (**Рис. 3.14**). Такой результат дает основание рассматривать пространственные структуры, полученные при pH 4,8, как соответствующие рабочей конформации фермента.

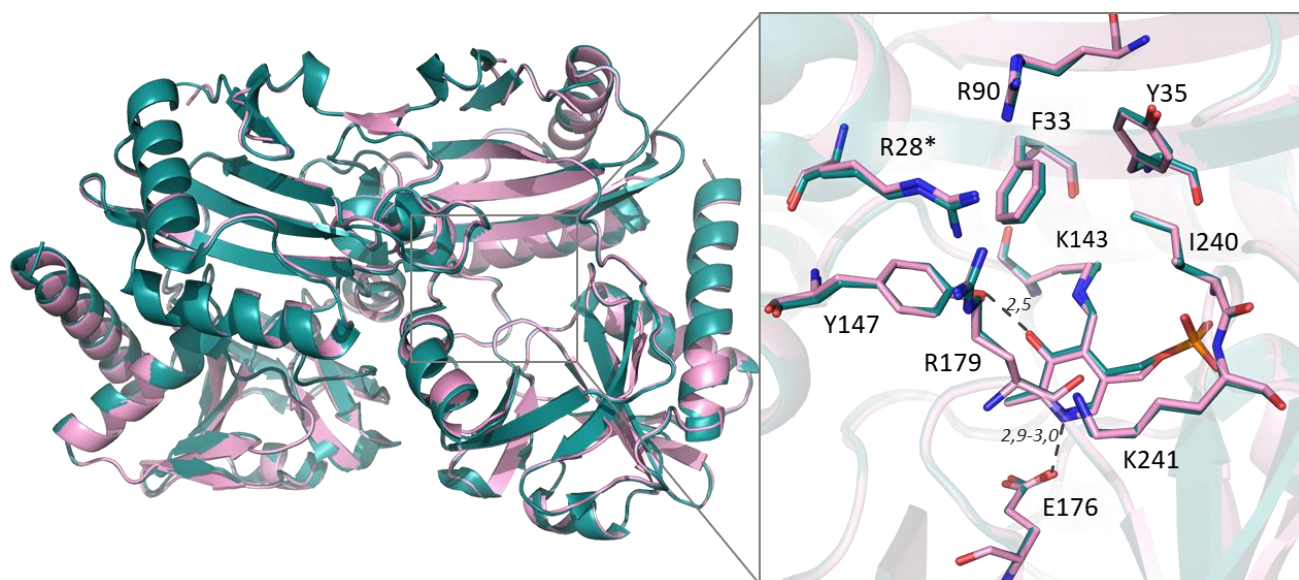


Рис. 3.14. Наложение структур PLP-формы холофермента TA_Halhu, полученных при pH 4,8 (зеленый) и 7,0 (розовый). Звездочкой (*) отмечен остаток соседней субъединицы функционального димера. Пунктиром отмечены водородные связи, длины указаны в ангстремах (Å).

1.2.2. Структура комплекса TA_Halhu с D-циclosерином

Комплексы TA_Halhu с субстратами не удалось исследовать методом РСА из-за быстрого превращения субстратов и выхода продуктов из активного центра. Однако удалось получить и проанализировать комплекс TA_Halhu с ингибитором D-циclosерином. Поскольку D-циclosерин взаимодействует с ТА подобно субстратам-D-аминокислотам (Рис. 1.10), анализ положения аддукта PLP и D-циclosерина в активном центре TA_Halhu позволил уточнить остатки, способные связывать субстрат. Пространственная структура комплекса, полученного настаиванием кристаллов PLP-формы холофермента в растворе D-циclosерина, была определена с разрешением 1,4 Å (PDB код 8AHU). RMSD по Ca атомам между субъединицами функциональных димеров холофермента и комплекса с D-циclosерином составило 0,18 Å, то есть ход полипептидной цепи сохранился, элементы вторичной структуры, формирующие активный центр TA_Halhu, не изменили своего положения (Рис. 3.15). Изменения затронули конформации боковых групп остатков R179 и K143, которые занимают двойные положения в структуре комплекса (Рис. 3.15).

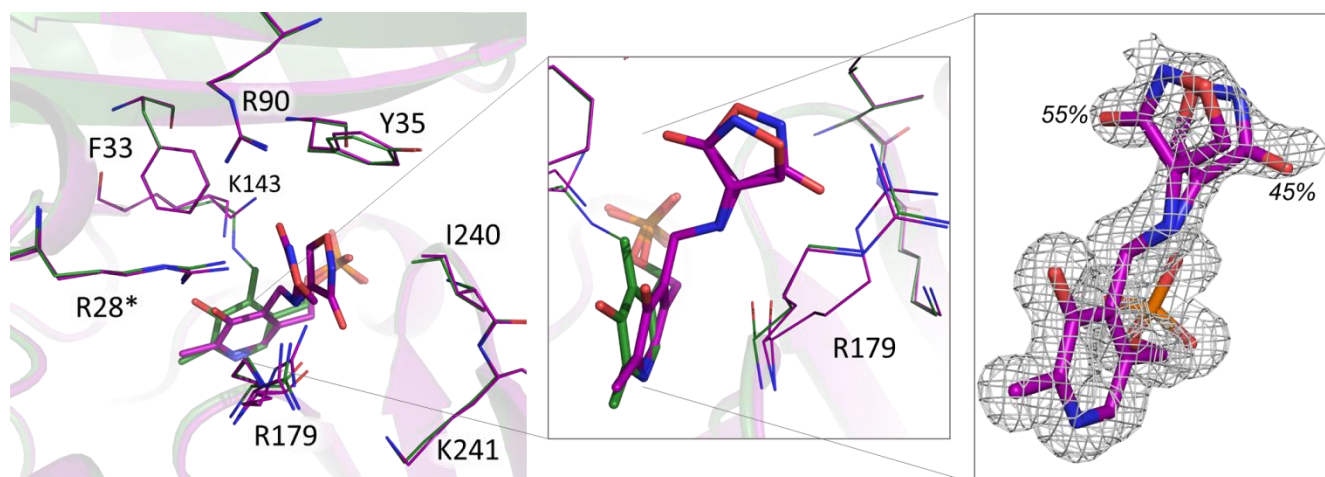


Рис. 3.15. Наложение пространственных структур комплекса TA_Halhy с D-циclosерином (розовый; PDB код 8AHU) и PLP-формы холофермента TA_Halhy (зеленый; PDB код 7P7X), 2Fo-Fc карта электронной плотности показана сетчатой поверхностью на уровне срезки 1,0 σ . Остатки соседней субъединицы гомодимера обозначены (*). Заселенность двух положений аддукта указана в процентах.

Анализ электронной плотности в активном центре показал образование аддукта PLP и D-циclosерина и отсутствие ковалентных связей аддукта с остатками активного центра (**Рис. 3.15**). После реакции с D-циclosерином плоскость пиридинового кольца кофактора отклонилась на 20° относительно связи C6-N1. Такой поворот молекулы PLP характерен для трансаминаз в ходе реакции, которая сопровождается разрывом связи между каталитическим остатком лизинном и молекулой кофактора [93,118]. Анализ электронной плотности показал, что молекула D-циclosерина сохранила циклическую неплоскую форму, что исключает образование ароматического изоксазола, наблюдаемого в активных центрах канонических BCAT из *M. tuberculosis* и bsDATA [136,147] и раскрытых форм D-циclosерина (**Рис. 1.10**). Двугранный угол C3-C4-C4A(C4')-N в аддукте PLP и D-циclosерина составляет $\sim 84^\circ$, это соответствует переходу C4' атома PLP из sp^2 в sp^3 гибридизацию, поскольку в комплексах TA с sp^2 гибридизацией C4' атома данный двугранный угол не превышает 40° [118,238]. Описанное наблюдение позволило нам отнести продукт взаимодействия PLP с D-циclosерином к циклическому кетимину (sp^3 гибридизация), а не к оксиму или внешнему альдиминому (sp^2 гибридизация) (**Рис. 1.10**).

Электронная плотность в активном центре соответствовала двум положениям циклического кетимина (**Рис. 3.16A**). В первом положении боковая группа остатка K241 координирует карбонильный атом кислорода D-циclosерина через молекулу воды (**Рис. 3.16A**). Во втором положении боковые группы остатков R28* и R179 образуют водородные связи с O α атомом кетимина (**Рис. 3.16A**).

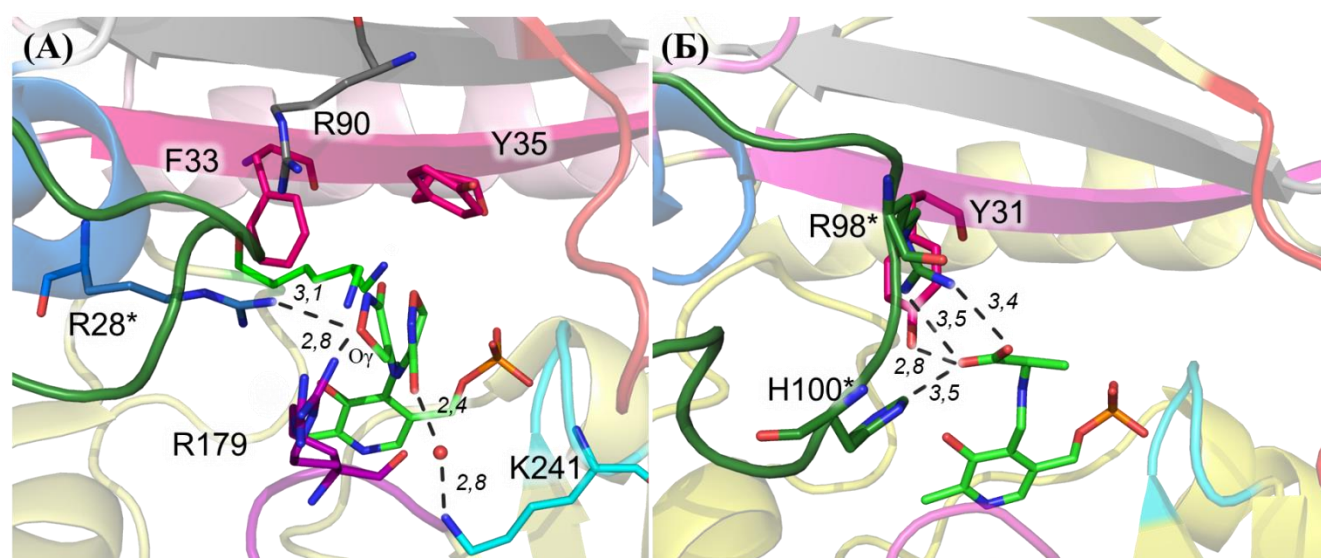


Рис. 3.16. Механизмы связывания субстратов в активных центрах TA_Halhy и канонической bsDATA. (А) Связывание D-циклосерина в активном центре TA_Halhy. (Б) Связывание D-аланина в активном центре канонической bsDATA (PDB код 4DAA). Петля O-кармана показана темно зелёным, β X- и β Y-тяжи – малиновым и чёрным, соответственно, α -спираль O-кармана – синим, β -поворот1 и 2 – фиолетовым и голубым, соответственно. Аддукты PLP и D-циклосерина/D-аланина показаны ярко-зеленым. Расстояния указаны в ангстремах и показаны черной пунктирной линией. Остатки соседней субъединицы гомодимера обозначены (*).

Суммируя проведенный анализ полученных структур, можно выделить следующие особенности организации активного центра TA_Halhy. (1) Активный центр TA_Halhy 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_Halhy исключительно к D-аминокислотам, можно сделать вывод, что R28* и R179 координируют α -карбоксыльную группу субстратов в O-кармане, а K241 координирует γ -карбоксыльную группу D-глутамата и α -кетоглутарата в P-кармане. Участие остатка R90 в связывании субстрата не очевидно. (2) Механизм связывания α -карбоксыльной группы в O-кармане активного центра TA_Halhy отличается от канонической bsDATA (**Рис. 3.16Б**): в формировании сайта TA_Halhy связывания участвуют остатки, принадлежащие регулярным элементам вторичной структуры α -спираль и β -поворот, в то время на O-петле не расположены остатки, связывающие субстрат (**Рис. 3.16А**). (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_Halhu к боковой группе субстрата. Положительно заряженный остаток K241 в Р-кармане способствует эффективному связыванию субстратов с отрицательно заряженными боковыми группами (Рис. 3.16А).

1.3. Свойства вариантов TA_Halhu: взаимосвязь структуры и функции

1.3.1. Выбор аминокислотных замен

В результате структурного выравнивания TA_Halhu и ближайших структурных гомологов (Приложение 1) обнаружено, что положительно заряженные остатки аргинина в позициях R28* и R90 TA_Halhu обнаруживаются во всех охарактеризованных неканонических DATA. Положительно заряженный остаток в позиции R179 нетипичен для TA IV типа укладки и встречается только у двух неканонических DATA (TA_Halhu и TA из *M. tuberculosis* PDB код 6Q1R) (Таблица 1.2, Приложение 1). Для выявления роли остатков аргинина О-кармана активного центра TA_Halhu были получены три варианта 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. Все варианты были получены в растворимой форме и очищены до гомогенности, по результатам гель-фильтрации варианты представляют собой гомодимеры. В работе проанализированы функциональные свойства вариантов, включающие рН- и температурную зависимость катализируемых реакций, субстратную специфичность, сродство к кофактору, стабильность холофермента. Для варианта R90I получена кристаллическая структура холофермента и комплекса с аналогом субстрата, фенилгидразином.

1.3.2. Участие остатков R28*, R90 и R179 в стабилизации функционального димера и в связывании субстратов TA_Halhu

Стабильность функциональных димеров вариантов была проверена анализом температуры полуперехода методом КД (Таблица 3.4.) и гель-фильтрацией на наличие мономеров. По результатам гель-фильтрации все варианты представляли собой гомодимеры. Замены R28*I и R179I не повлияли на стабильность, снижение $T_{0.5}$ варианта R90I указывает на вклад остатка R90 в стабилизацию функционального димера.

Кинетические параметры полных реакций, катализируемых вариантами TA_Halhu приведены в Таблице 3.4. Вариант R28*I оказался неактивен с любой D-аминокислотой в полуреакциях и в полных реакциях трансминирования, то есть R28* оказался принципиально

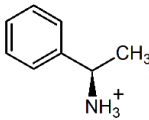
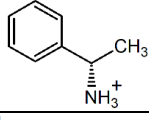
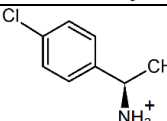
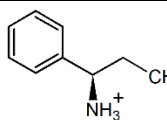
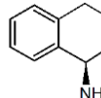
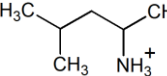
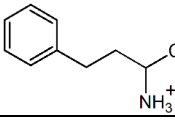
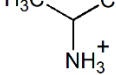
важным для каталитической активности TA_Halhy, что подтверждает его участие в связывании α -карбоксылльной группы субстрата в O-кармане. Варианты с заменами R90I и R179I были менее активны, чем WT, при этом у варианта R90I была обнаружена дополнительная активность с (*R*)-PEA – эталонным субстратом (*R*)-АТА.

Табл. 3.4. Кинетические параметры реакции трансминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат, катализируемой вариантами TA_Halhy, в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 25 °С, и реакции трансминирования (*R*)-PEA + α -кетоглутарат в CHES буфере, pH 9,0, катализируемой вариантом R90I при 25 °С. Температуру полуперехода ($T_{0,5}$) между нативным и денатурированным состояниями вариантов определяли в 20 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8,0, по анализу изменений спектров КД при нагревании. $T_{0,5}$ 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	
(<i>R</i>)-PEA	α -кетоглутарат	$0,16 \pm 0,01$	$0,091 \pm 0,006$	13 ± 1	7 ± 1	
α -кетоглутарат	(<i>R</i>)-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	$0,5$

Снижение активности варианта R179I согласуется с участием остатка R179 в связывании D-цикloserина в активном центре (**Рис. 3.15А**). Причины снижения активности при замене R90I неочевидны и будут обсуждены в следующих разделах. Анализ полуреакций R90I варианта с первичными аминами показал, что вариант активен только с ароматическими (*R*)-аминами, у которых ароматический заместитель расположен у $S\alpha$ атома (**Таблица 3.5**).

Табл. 3.5. Наблюдаемые константы скорости полуреакций PLP-формы варианта R90I (25 мкМ) с первичными аминами в концентрации 10 мМ в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0, при 25 °С.

Субстрат		k_{obs}, c^{-1}
(<i>R</i>)-(+)-1-фенилэтиламин		$0,30 \pm 0,02$
(<i>S</i>)-(-)-1-фенилэтиламин		0
(<i>R</i>)-(+)-1-(4-хлорофенил)-этиламин		$0,033 \pm 0,002$
(<i>R</i>)-(+)-1-фенилпропиламин		$0,10 \pm 0,01$
(<i>R</i>)-(-)-1,2,3,4-тетрагидро-1-нафтиламин		$0,28 \pm 0,02$
(<i>R,S</i>)-1,3-диметилбутиламин		0
(<i>R,S</i>)-1-метил-3-фенилпропиламин		0
Изопропиламин		0

Замены R90I и R179I не повлияли на оптимальный pH реакции трансминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом (**Рис. 3.17**). Таким образом, остатки R90 и R179 не контролируют протонированное состояние функциональных групп активного центра TA_Nalhy. pH оптимум реакции между (*R*)-PEA и α -кетоглутаратом, катализируемой вариантом R90I, составил 9,0-9,5 (**Рис. 3.17**), что выше, чем для большинства описанных природных (*R*)-ATA, pH оптимум которых составляет 8,0-8,5 [77,96,122].

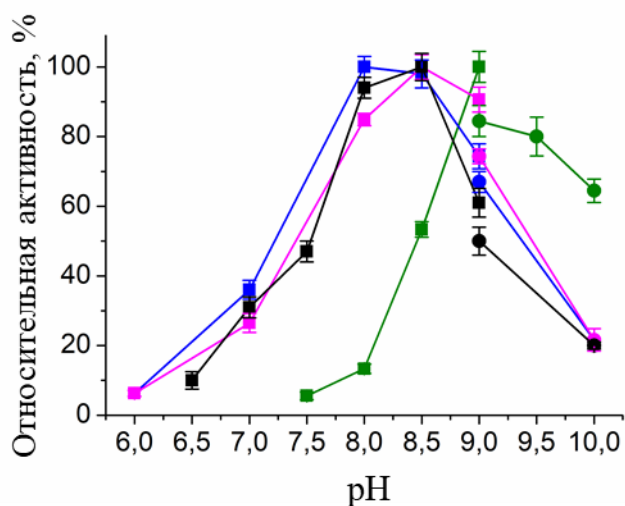


Рис. 3.17. pH зависимость активности WT TA_Halhy (черный) и вариантов R90I (розовый) и R179I (синий) в реакции *D*-аланин + α -кетоглутарат и варианта R90I в реакции (*R*)-PEA + α -кетоглутарат (зеленый) в смешанном буфере 25 мМ К-фосфат и 25 мМ Трис-HCl (■) или 50 мМ CHES буфере (●) концентрация аминокислот составляли 5 и 2 мМ, соответственно. 100% соответствует 27 ± 2 U/мг при 30 °C (черный), $1,6 \pm 0,1$ U/мг (розовый), $1,1 \pm 0,1$ U/мг (голубой) и $0,050 \pm 0,002$ U/мг (зеленый) при 25 °C.

Для дальнейшего анализа роли остатков аргинина в функционировании активного центра TA_Halhy были получены кристаллические структуры варианта R90I в PLP-форме (PDB код 8RAF) и в комплексе с негидролизуемым аналогом субстрата, фенилгидразином, (PDB код 8RAI) с разрешением 2,0 Å. Электронная плотность в активном центре варианта в PLP-форме соответствовала молекуле PLP, ковалентно связанной с каталитическим остатком лизина (**Рис 3.18А**). Электронная плотность варианта в комплексе соответствовала аддукту молекулы PLP и фенилгидразина – аналогу внешнего альдимины, образованного PLP и (*R*)-PEA (**Рис 3.18Б,В** и **Рис. 3.19**). Кофактор в активном центре холофермента варианта R90I сохранил свое положение и ориентацию. В комплексе с фенилгидразином, пиридиновое кольцо PLP отклонилось на 17° относительно оси проходящей через связь N1-C6, как и в комплексе WT с *D*-циклосерином. Однако координация PLP в активном центре не изменилась: все нековалентные взаимодействия сохранились (**Рис 3.18Б**).

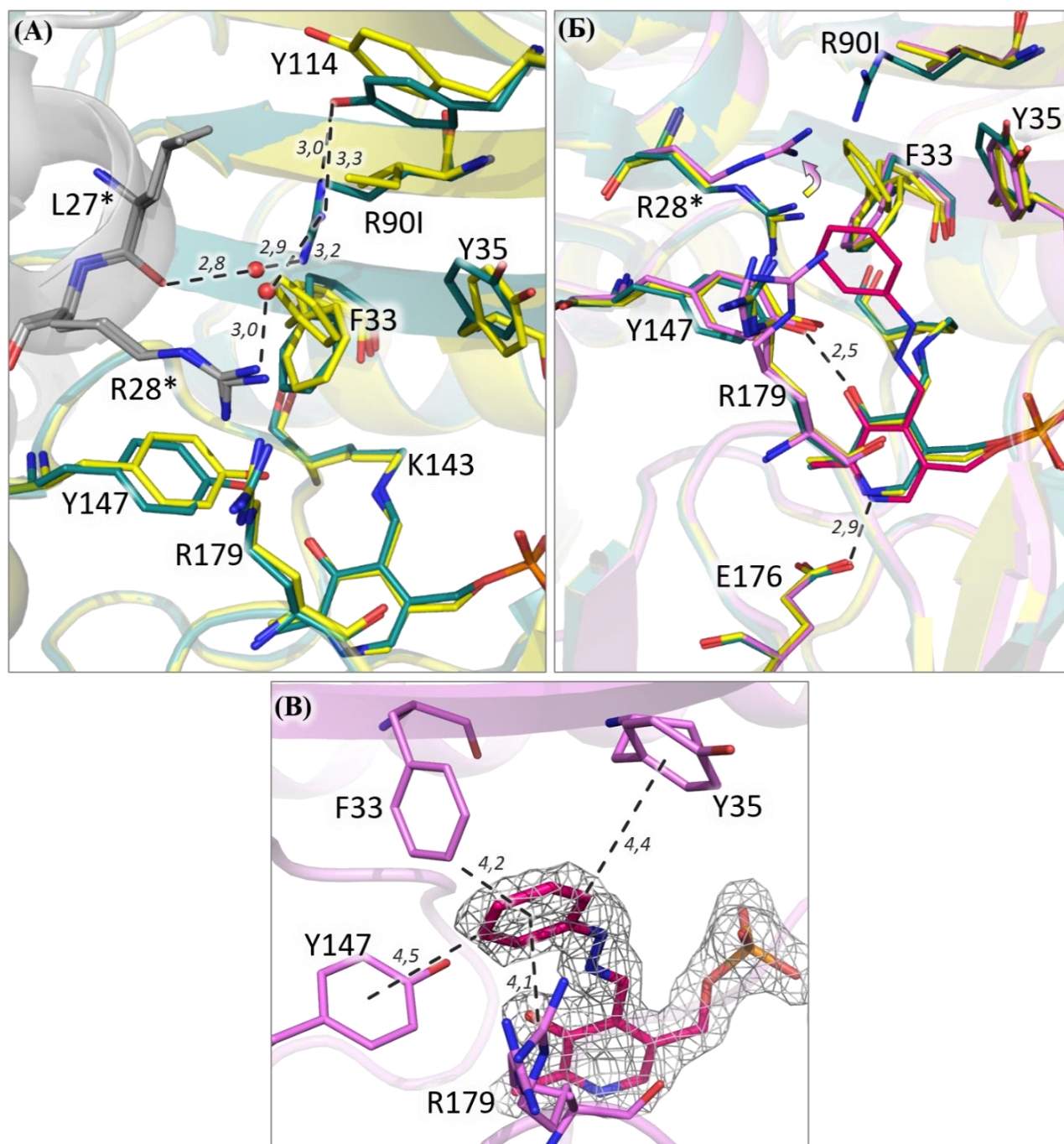


Рис. 3.18. Активные центры WT TA_Halhy и варианта R90I. (А) Наложение остатков активных центров PLP-форм холоферментов WT и варианта R90I. (Б) Наложение активных центров WT в PLP-форме и варианта R90I в PLP-форме и в комплексе с фенилгидразином. (В) Связывание фенилгидразина в активном центре варианта R90I. 2Fo-Fc карта электронной плотности аддукта PLP и фенилгидразина на уровне срезки 1,0 σ . Желтым отмечены остатки TA_Halhy WT, желтым – варианта R90I в PLP-форме, светло-розовым – в комплексе, серым – остатки соседней субъединицы (А), розовым – аддукт PLP и фенилгидразина, сетчатая поверхность соответствует электронной плотности вокруг аддукта, черными пунктирными линиями отмечены водородные связи, длины которых указаны в ангстремах. Звездочкой (*) отмечены остатки соседней субъединицы (*).

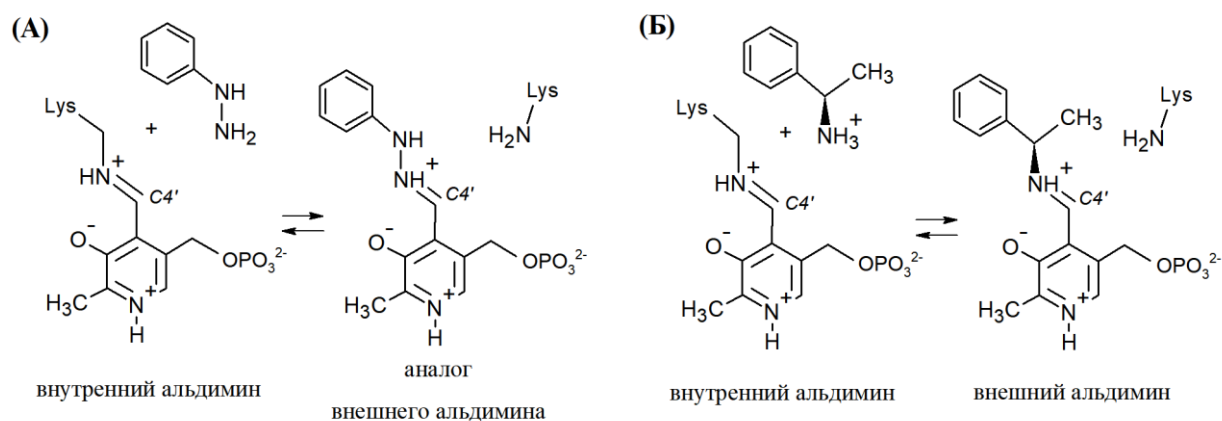


Рис. 3.19. Схема реакции трансиминирования PLP-формы ТА с фенилгидразином (А) и (R)-PEA (Б).

Основные изменения наблюдались в положениях боковых групп остатков O-кармана. Ход полипептидной цепи TA_Halhy при замене R90I не поменялся (RMSD по C α атомами между субъединицами функциональных димеров холоферментов WT и варианта составило 0,21 Å). Замена R90I привела к разрушению некоторых водородных связей в межсубъединичном контакте (**Рис. 3.18А**), это согласуется со снижением T_{0,5} при замене R90I. Конформационные различия в структурах холоферментов наблюдались для боковой группы остатка F33, которая занимает два положения в структуре варианта, и для боковой группы остатка Y114 (**Рис. 3.18А**). В структуре комплекса дополнительно наблюдался разворот боковой группы остатка R28*, а также остатка R179, который имеет два положения (**Рис. 3.18Б**). Подвижность боковой группы остатка R28* в структуре WT ограничена электростатическим отталкиванием с остатком 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 трансиминирования между α -кетоглутаратом и D-аланином, а также повышению констант Михаэлиса для обоих субстратов. Интересно отметить, что попытки получения комплекса WT TA_Halhy с фенилгидразином были неуспешными: наблюдаемая электронная плотность в активном центре указывала на неупорядоченное положение лиганда, что согласуется с отсутствием активности WT в реакциях с первичными (R)-аминами.

1.3.3. Структурные детерминанты активности варианта R90I с первичными ароматическими (R)-аминами

Изменение субстратной специфичности ТА на сегодня остается сложной задачей. Среди неканонических ДАТА обнаруживаются ферменты, имеющие дополнительную активность с первичными (R)-аминами (BlasaТА и CruТА) [127,128]. Активность с D-аминокислотами и первичными (R)-аминами предполагает связывание в одной области активного центра (в О-кармане) как отрицательно заряженной карбоксильной группы, так и объемной гидрофобной группы. Анализ кристаллической структуры R90I варианта в PLP-форме и в комплексе с фенилгидразином позволил предложить структурные детерминанты активности с (R)-PEA у неканонических ДАТА.

Замена R90I привела к повышению подвижности объемных боковых групп остатков активного центра TA_Halhu, в том числе остатка R28* (**Рис. 3.18Б**). Фенильная группа фенилгидразина стабилизирована в О-кармане нековалентными π - π -взаимодействиями с боковыми группами остатков F33, Y35 и Y147, а также π -катион взаимодействием с гуанидиновой группой остатка R179 (**Рис. 3.18В**). Такая эффективная координация фенильной группы лиганда в О-кармане объясняет предпочтение R90I варианта исключительно к (R)-изомеру фенилэтиламина. Подвижность остатка R28* является ключевой для реализации активности варианта R90I одновременно с субстратами с и без α -карбоксильной группы. При анализе гомологичных BlasaТА и CruТА предложенный механизм связывания в активных центрах неканонических ДАТА субстратов как с α -карбоксильной группой, так и без неё подтвердился. В случае BlasaТА остатки О-кармана R34* и R96 (PDB коды 8PNW, 8PNY) занимают двойные положения и не образуют водородных связей с соседними остатками. В случае CruТА на подвижность остатков R51 и K117 (PDB код 5K3W) указывает их высокий В-фактор, а также отсутствие нековалентных взаимодействий с соседними остатками. Таким образом, подвижность положительно заряженных остатков О-кармана обеспечивает необходимую пластичность активных центров для проявления дополнительной активности с первичными (R)-аминами. Пластичность активных центров неканонических ДАТА является преимуществом на старте разработки биокатализатора с заданной субстратной специфичностью.

Принятый механизм реакции трансаминирования предполагает депротонирование аминогруппы субстрата на стадии образования комплекса Михаэлиса. Ранее для (R)-АТА из *A. fumigatus*, для которой (R)-PEA является эталонным субстратом, был предложен механизм сброса протона на остаток гистидина активного центра [77]. В области связывания аминогруппы

субстрата в активном центре TA_Halhy не обнаружено функциональных групп - потенциальных акцепторов протона. Для повышения эффективности варианта R90I в реакциях с (R)-PEA мы ввели остаток гистидина в активный центр в положение соответствующее положению остатка H53 в (R)-ATA (на месте H53 в структуре TA_Halhy располагается R28*). Однако вариант R28*H/R90I был неактивен в полуреакции с (R)-PEA, как и вариант R28*I (Таблица 3.6). Введение остатка гистидина в другие положения в области связывания аминокислотной группы субстрата также не привело к повышению каталитической эффективности (варианты F33H/R90I и Y35H/R90I) (Таблица 3.6). Проведенные исследования подтверждают сложные механизмы регулирования субстратной специфичности в активных центрах ТА. Эти механизмы различаются между семействами и не подлежат копированию при том, что геометрия активных центров сходна. По-видимому, вариант R90I катализирует трансминирование только депротонированной формы первичных (R)-аминов, что объясняет щелочной рН-оптимум этой реакции. В реакционной смеси при рН 9,0 доля депротонированного (R)-PEA составляет 28% от общей концентрации (рKa = 9,41 [239]).

Табл. 3.6. Каталитическая эффективность в полуреакциях вариантов TA_Halhy с (R)-PEA в 50 мМ CHES буфере, рН 9,0, при 25 °С.

Вариант TA_Halhy	$k_{\max}/K_d, \text{c}^{-1} \text{M}^{-1}$
WT	0
R90I	32 ± 2
R28*H/R90I	0
F33H/R90I	$0,45 \pm 0,05$
Y35H/R90I	$1,2 \pm 0,1$
R28*I	0
R28*I/R90I	0
F33L/R90I	$3,9 \pm 0,2$
R90I/R179I	$10,5 \pm 0,5$

Интересно отметить, что объемный, положительно заряженный остаток R179 на входе в активный центр TA_Halhy не препятствует продуктивному связыванию ароматической боковой группы (R)-PEA. В то время как в гомологичных CruTA и VlasaTA, активных с первичными (R)-аминами, на входе в активный центр располагается менее объемный остаток треонина (Рис. 1.3, Приложение 1). Более того, замена остатка R179, так же как и остатка F33, приводила к снижению каталитической эффективности в полуреакциях с (R)-PEA (Таблица 3.6). Полученный результат указывает на важность π -катион и π - π взаимодействий для продуктивного связывания фенильной группы (R)-PEA в О-кармане варианта R90I.

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

Варианты R90I и R179I в условиях реакции при температуре 40 °С инактивировались менее чем за две минуты (Рис. 3.20А,Б), в то время как WT не терял активности как минимум час (Рис. 3.20В), поэтому весь кинетический анализ вариантов проводили при 25 °С.

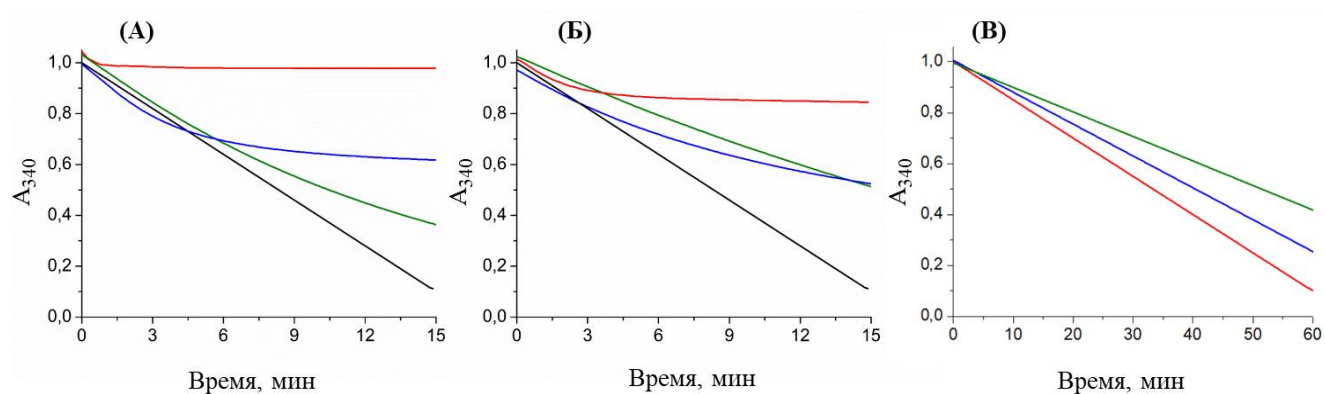


Рис. 3.20. Кинетические кривые полных реакций трансаминирования между D-аланином (5 мМ) и α -кетоглутаратом (2 мМ), катализируемых вариантами R90I (0,02 мг/мл, А), R179I (0,02 мг/мл, Б) и WT (0,0001 мг/мл, В) при температурах 25 (зеленый), 30 (синий) и 40 °С (красный) в 50 мМ КФБ, рН 8,0. Кинетическая кривая для WT TA_Nalhy при 40 °С также приведена на графиках (А и Б) для сравнения (0,0004 мг/мл, черный).

Чтобы объяснить наблюдаемую инактивацию вариантов был проанализирован процесс утечки кофактора (выход кофактора из активного центра) в реакционных условиях и в буфере. Обнаружено, что холофермент WT TA_Nalhy диссоциирует, при этом утечка кофактора наблюдалась как в буфере, так и в реакционной среде. За утечкой кофактора и соответственно снижением концентрации холофермента было выбрано следить спектрофотометрически при длине волны 450 нм. Снижение интенсивности поглощения соответствует выходу PLP из активного центра в раствор, а также переходу PLP-формы фермента в PMP-форму (Рис. 3.21А). В реакционных условиях (т.е. в присутствии субстратов аминодонора и аминокцептора) утечка PLP проходила до полного превращения холофермента TA_Nalhy в апофермент, на это указывал спектр поглощения препарата после смены буфера (Рис. 3.21Б), в то время как для PLP-формы фермента в буфере наблюдался лишь частичный выход кофактора в раствор (Рис. 3.21В). Выдерживание PMP-формы фермента в буфере приводило к полному выходу молекулы PMP из активного центра в течение 40 минут (Рис. 3.21Г).

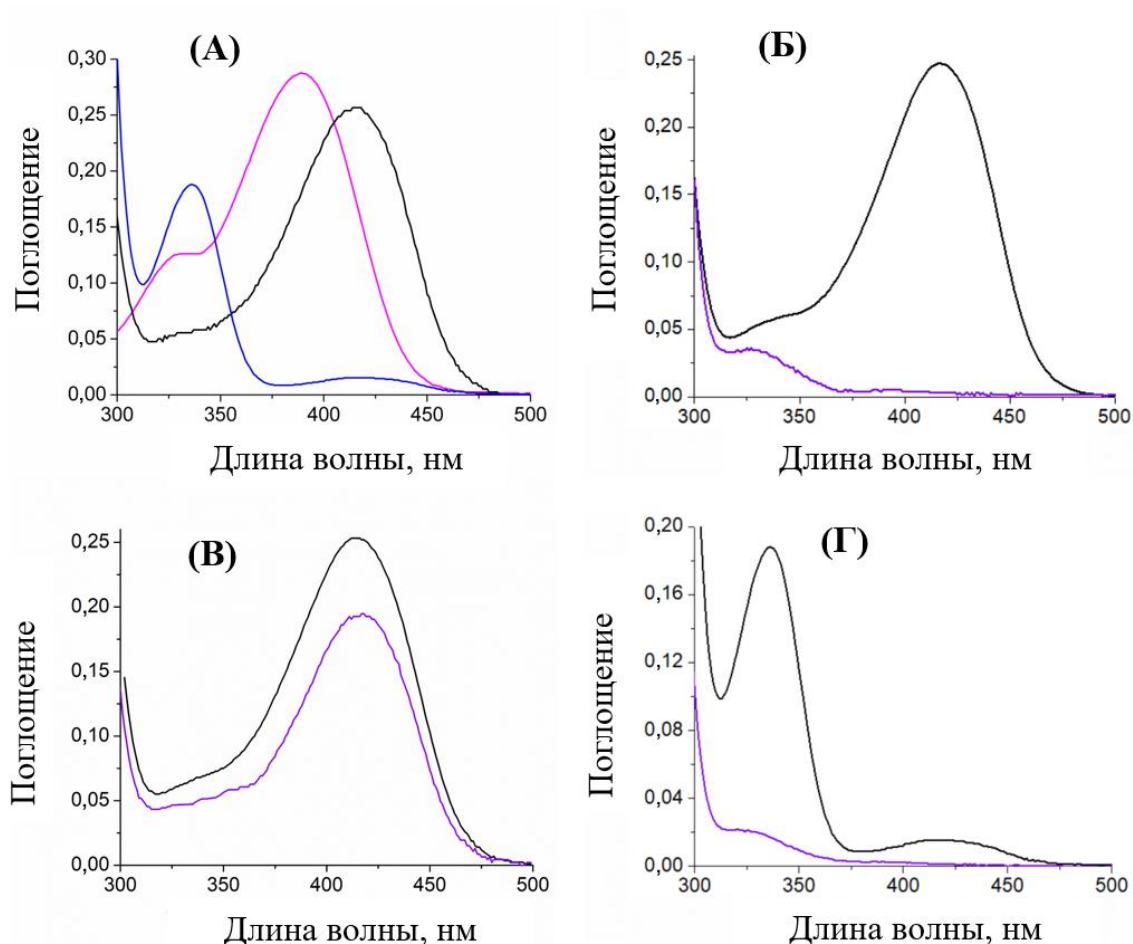


Рис. 3.21. Анализ утечки кофактора из холофермента TA_Halhu в 50 мМ КФБ буфере, рН 8,0, при 40 °С. (А) Спектры поглощения РLP- (черный) и РMP-формы (синий) холофермента TA_Halhu, и свободного РLP (розовый) в концентрациях 25 мкМ. (Б) Спектр поглощения РLP-формы холофермента TA_Halhu (25 мкМ) до (черный) и после выдерживания в присутствии D-аланина (5 мМ) и α -кетоглутарата (2 мМ) в течение 40 минут с последующей сменой буфера (фиолетовый). (В) Спектр поглощения РLP-формы холофермента TA_Halhu (25 мкМ) до (черный) и после выдерживания в буфере без субстратов в течение 40 минут с последующей сменой буфера (фиолетовый). (Г) Спектр поглощения РMP-формы холофермента TA_Halhu (25 мкМ) до (черный) и после (фиолетовый) выдерживания в буфере течение 40 минут с последующей сменой буфера.

Константы скорости утечки кофактора из холоферментов WT, вариантов R90I и R179I составили $0,032 \pm 0,002$, $0,33 \pm 0,03$ и $0,059 \pm 0,003$ мин⁻¹, соответственно, при 40 °С в 50 мМ КФБ, рН 8,0, в присутствии D-аланина (5 мМ) и α -кетоглутарата (2 мМ) (**Рис. 3.22**). Полученный результат указывает на значительное снижение стабильности холофермента при замене R90I. При понижении температуры до 25 °С константа скорости утечки для варианта R90I составила $0,0088 \pm 0,0005$ мин⁻¹, для варианта R179I – $0,0023 \pm 0,0001$ мин⁻¹. То есть процесс замедлился, что позволило проанализировать каталитические свойства вариантов при 25 °С. Поскольку

вариант R28I неактивен в трансминазной реакции, утечку кофактора из его холофермента анализировали только при стоянии в буфере.

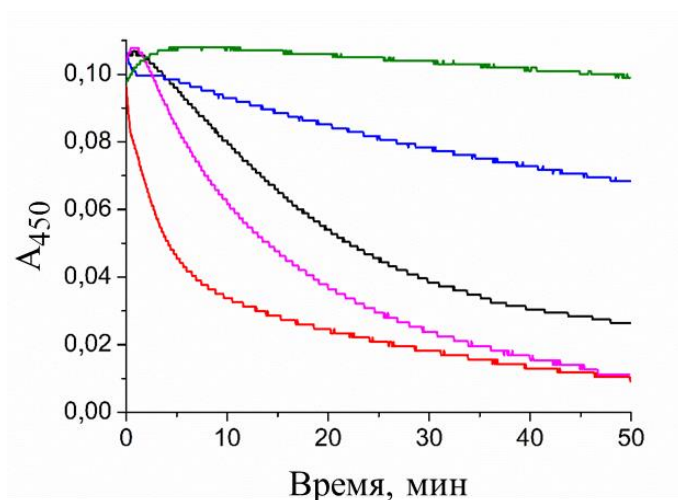


Рис. 3.22. Изменение интенсивности поглощения при 450 нм со временем при выдерживании PLP-формы холофермента WT ТА_Halhy и вариантов (25 мкМ) в 50 мМ КФБ, pH 8,0, в присутствии 2 мМ α -кетоглутарата и 5 мМ D-аланина при 40 °C (красный – вариант R90I, розовый – вариант R179I и черный – WT) и при 25 °C (голубой – вариант R90I и зеленый – вариант R179I).

Константы скорости утечки кофактора в буфере (k_{diss}), константы скорости ассоциации (k_{ass}) и константы диссоциации комплексов вариантов ТА_Halhy с PLP приведены в **Таблице 3.7**. Константу скорости ассоциации апофермента и молекулы PLP рассчитывали по уравнению $K_d = \frac{k_{diss}}{k_{ass}}$, используя экспериментальные значения K_d и k_{diss} . Полученные результаты указывают на снижение сродства фермента к PLP при заменах R28* и R90, замена R179 не влияла на связывание кофактора, то есть R179 не участвует в координации кофактора.

Табл. 3.7. Константа диссоциации, константы скорости диссоциации и ассоциации апофермента с PLP в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 25 °C для вариантов ТА_Halhy.

Вариант ТА_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 трансминазной реакции при 40 °C (**Рис. 3.20А**) 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 (**Рис. 3.20Б**) менее очевидны. Можно предположить, что из-за снижения каталитической активности вариантов вклад утечки кофактора в реакцию становится более выраженным, и наблюдаемая инактивация соответствует превращению кофактора в РМР-форму, которая далее выходит из активного центра.

Остатки R28* и R90 удалены от PLP и напрямую с ним не взаимодействуют (**Рис. 3.12, 3.13**), таким образом, их участие в связывании кофактора и стабилизации холофермента неочевидно. Анализ пространственных структур WT TA_Halhy и варианта R90I позволил предположить механизм стабилизации кофактора в активном центре удаленными остатками R28* и R90. Обнаружено, в WT TA_Halhy гуанидиновая группа остатка R28* образует π -катион взаимодействие с ароматическим кольцом остатка Y147 (**Рис. 3.23**). Замена R90I повышает подвижность остатка R28*: в структуре комплекса с фенилгидразином во втором положении остатка R28* (**Рис. 3.18Б**), расстояние между гуанидиновой группой R28* и ароматическим кольцом Y147 составляет 5,7 Å, в то время как в структуре WT – 4,3 Å. В свою очередь боковая группа Y147 координирует молекулу кофактора за счет формирования водородной связи с O3' атомом PLP (**Рис. 3.23**). Таким образом, сеть нековалентных взаимодействий, включающая остатки R28* и R90, стабилизирует молекулу PLP в активном центре TA_Halhy. Стоит отметить, что остатки R28* и Y147 консервативны внутри группы неканонических DATA, что подтверждает функциональную роль данной пары остатков (Приложение 1). Описанные наблюдения согласуются со снижением сродства TA_Halhy к PLP при заменах R28* и R90I. Участие удаленных остатков в стабилизации кофактора в активном центре DATA показано впервые.

На модельной системе фенол/катион металла было показано, что π -катион взаимодействие повышает донорную способность –ОН группы фенола, это способствует формированию более прочных водородных связей с акцепторами протона [240]. Аналогичные рассуждения допустимы и для активного центра TA_Halhy: подвижность боковой группы остатка R28* при замене R90I приводит к ослаблению π -катион взаимодействия, и тем самым к снижению прочности водородной связи между Y147 и O3' атомом за счёт понижения кислотности фенольной группы Y147. Ослабление водородной связи между кофактором и остатком тирозина также может снижать электроноакцепторные свойства кофактора, и, следовательно, каталитическую эффективность [27,102], что отражается в снижении активности при замене R90I.

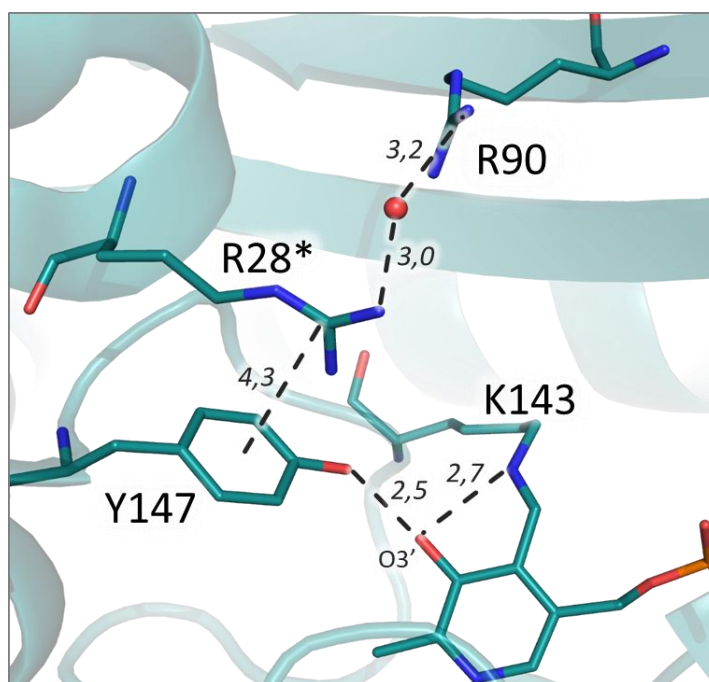


Рис. 3.23. Связывание PLP в активном центре TA_Halhy. Водородные связи показаны черными пунктирными линиями, длины водородных связей указаны в ангстремах. Остатки соседней субъединицы гомодимера обозначены (*).

Таким образом, остатки аргининов R28* и R90 активном центре TA_Halhy многофункциональны. Помимо связывания субстратов остатки R28* и R90 участвуют в стабилизации активной формы кофактора, а также в стабилизации функционального димера. Остаток R179 играет роль только в связывании α -карбоксовой группы субстрата.

1.4. Взаимодействие TA_Halhy с D-цикloserином

D-цикloserин – ингибитор трансаминаз и эффективный инструмент для изучения механизма их действия, исследования особенностей строения и функционирования активного центра. Взаимодействие TA_Halhy с D-цикloserином анализировали кинетическими методами, методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии. Анализ связывания D-цикloserина в активном центре проводили методом рентгеноструктурного анализа (см. Раздел 3.2.2).

1.4.1. Ингибирование TA_Halhy D-цикloserином

Ингибирование TA_Halhy в стандартной реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом развивалось во времени (**Рис. 3.24А**). Из анализа кинетических кривых при разных концентрациях D-цикloserина получали наблюдаемые константы скорости ингибирования, значения которых линейно росли с ростом концентрации D-цикloserина (**Рис.**

3.24Б). При этом значения начальных скоростей не зависели от концентрации ингибитора (Таблица 3.8). Полученные данные указывали на одностадийный механизм образования комплекса фермента с ингибитором: $E + I \leftrightarrow EI$ [221]. Линейная аппроксимация экспериментальных значений констант ингибирования позволила получить параметры процессов образования и диссоциации комплекса фермента с ингибитором. Константа скорости ассоциации фермента с ингибитором (k_{ass}) составила $0,040 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1} \text{ мкМ}^{-1}$, константа скорости диссоциации (k_{diss}) – $0,09 \pm 0,01 \text{ мин}^{-1}$ в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С. D-циклосерин является эффективным ингибитором трансаминазы TA_Nalhy: кажущаяся константа диссоциации комплекса фермент-ингибитор (K_I^{app}) составила $2,2 \pm 0,3 \text{ мкМ}$, что значительно ниже, чем значения используемых концентраций субстратов в трансаминазной реакции (5 мМ D-аланина и 2 мМ α -кетоглутарата) и чем значения констант Михаэлиса для данных субстратов (K_m составляет 23 ± 1 и $2,3 \pm 0,2 \text{ мМ}$ для D-аланина и α -кетоглутарата, соответственно) в тех же условиях.

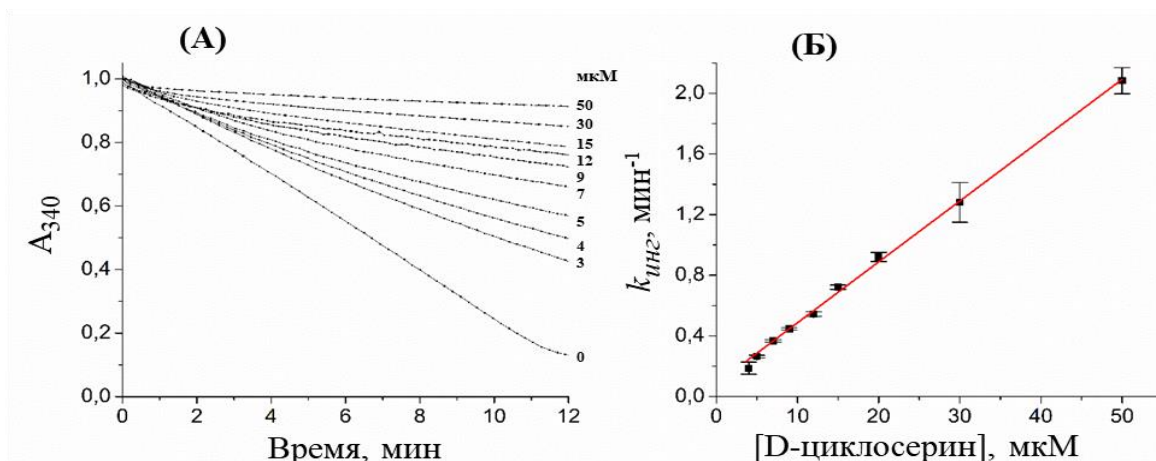


Рис. 3.24. Ингибирование TA_Nalhy D-циклосерином в стандартной реакции трансаминирования D-аланин + α -кетоглутарат. Условия реакции: 5 мМ D-аланин 2 мМ α -кетоглутарат в 50 мМ КФБ, рН 8,0, при 40 °С. (А) Кинетические кривые реакции с добавлением к реакционной смеси разных концентраций D-циклосерина. (Б) Зависимость наблюдаемой константы ингибирования от концентрации добавленного D-циклосерина. Экспериментальные значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение, линейная аппроксимация показана красной линией.

Табл. 3.8. Значения начальных скоростей (v_0) ферментативной реакции при разных концентрациях D-циклосерина. v_0 определяли обработкой кинетических кривых уравнением 4 (см. раздел 2.5.4).

[D-циклосерин], мкМ	v_0 ($\Delta A_{340}/\Delta t$), мин ⁻¹
0	0,137 ± 0,003
3	0,128 ± 0,002
4	0,124 ± 0,003
5	0,126 ± 0,001
7	0,131 ± 0,002
9	0,130 ± 0,003
12	0,132 ± 0,004
15	0,127 ± 0,008
30	0,129 ± 0,006
50	0,135 ± 0,002

1.4.2. Анализ продуктов взаимодействия TA_Halhu с D-циклосерином

Превращения D-циклосерина в активном центре TA_Halhu анализировали методами спектрофотометрии и спектрофлуоресценции (**Рис. 3.25**). При инкубировании PLP-формы холофермента TA_Halhu с D-циклосерином в течение 30 минут наблюдался рост интенсивности поглощения при 337 нм и снижение – при 416 нм, финальный спектр поглощения имел максимум при 337 нм с плечом при 380 нм (**Рис. 3.25А**). Спектр флуоресценции препарата имел максимум испускания при 450 нм (возбуждение при 380 нм) и два максимума при 390 и 450 нм (возбуждение при 337 нм) (**Рис. 3.25Б**). Поглощение при 337 и испускание при 390 нм указывали на присутствие в реакционной смеси продуктов с sp³ гибридизацией C4' атома PLP, к которым относятся циклический кетимин, раскрытый кетимин, изоксазол и РМР (**Рис. 1.10**) [16,241]. Циклический кетимин был обнаружен методом РСА в активном центре TA_Halhu (**Рис. 3.16А**). Плечо при 380 нм в спектре поглощения и максимум при 450 нм в спектре флуоресценции указывали на образование оксима в реакции [241,242]. После отделения TA_Halhu от низкомолекулярных компонентов путем перевода препарата в другой буфер в спектре поглощения фермента остался один максимум при 337 нм, а в спектре флуоресценции – один максимум при 390 нм (при возбуждении при 337 нм). В то же время спектр поглощения фракции низкомолекулярных соединений имел два максимума при 337 и 380 нм, а спектр флуоресценции – максимум при 450 нм с плечом при 390 нм (фракцию низкомолекулярных компонентов получали ультрафильтрацией с использованием центрифужного концентратора (30 кДа MWCO, Millipore, США)). Проведенный анализ показал присутствие оксима среди продуктов

взаимодействия D-циclosерина и TA_Halhy, который полностью высвобождается из активного центра. Среди продуктов также обнаруживаются аддукты PLP и D-циclosерина с sp³ гибридизацией C4' атома, которые частично выходят из активного центра в течение времени наблюдения (30 минут), среди которых циклический кетимин, обнаруженный в активном центре TA_Halhy методом кристаллографии (см. Раздел 3.2.2).

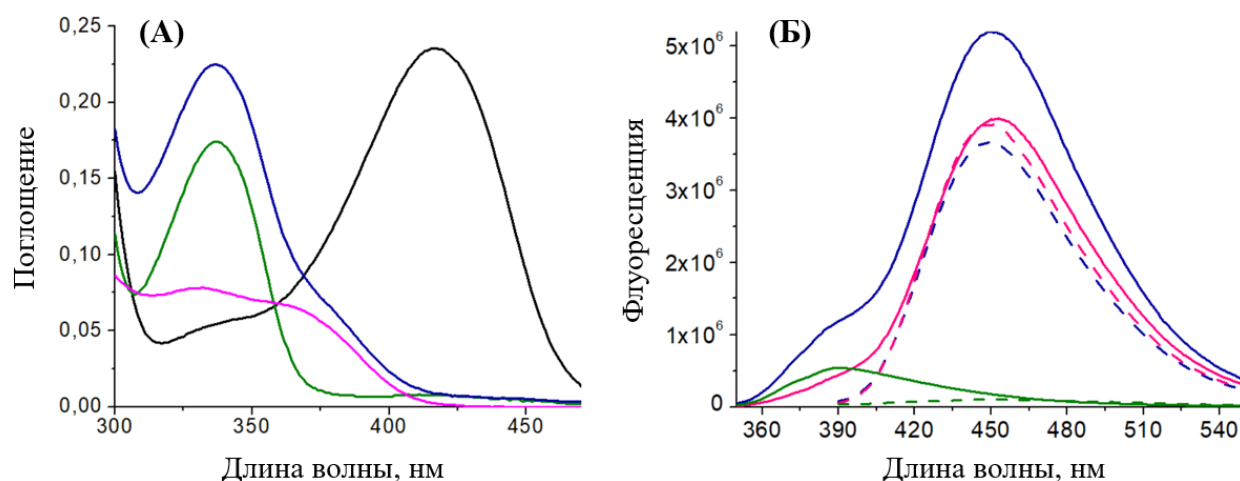


Рис. 3.25. Взаимодействие PLP-формы холофермента TA_Halhy (25 мкМ) с D-циclosеринном (25 мМ) в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 40 °С. (А) Спектр поглощения PLP-формы холофермента TA_Halhy до (черный), после выдерживания с D-циclosеринном в течение 30 минут (синий) и после смены буфера (зеленый). Спектр поглощения низкомолекулярной фракции (розовый). (Б) Спектры флуоресценции продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циclosеринном 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).

1.4.3. Реактивация TA_Halhy PLP и α -кетоглутаратом

Анализ обратимости ингибирования показал, что реактивация PLP-формы холофермента TA_Halhy возможна как добавлением свободного PLP, так и субстрата α -кетоглутарата (**Рис. 3.26**). Обратимость ингибирования анализировали после выдерживания PLP-формы холофермента в присутствии D-циclosерина в течение 30 минут с последующим переводом препарата в другой буфер. Полученный препарат инкубировали в течение часа в присутствии свободного PLP в концентрации 250 мкМ. Анализ спектров поглощения указывал на вытеснение из активного центра аддуктов PLP и D-циclosерина молекулой PLP, образование внутреннего альдимины и полную реактивацию холофермента, активность реактивированного холофермента совпадала с исходной (**Рис. 3.26А**). Выдерживание продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-циclosеринном в присутствии α -кетоглутарата приводило к постепенному снижению интенсивности поглощения при 337 нм и одновременному росту при 416 нм, что соответствовало

образованию внутреннего альдимины, однако в данном случае полная реактивация не достигалась, ввиду диссоциации аддуктов PLP и D-циклосерина из активного центра (**Рис. 3.26Б**). Исходя из схемы взаимодействия D-циклосерина с ТА (**Рис. 1.10**), реактивация PLP-формы холофермента в присутствии α -кетоглутарата возможна только в полуреакции с РМР-формой ТА_Halhy, которая образуется при разложении аддуктов PLP и D-циклосерина. Константа скорости реактивации в данном случае составила $0,32 \pm 0,02 \text{ ч}^{-1}$ (**Рис. 3.26В**). При этом выдерживание препарата в отсутствие PLP и α -кетоглутарата сопровождалось постепенным смещением максимума поглощения с 337 нм до 324 нм, что соответствовало образованию и выходу РМР из активного центра (спектр свободного РМР имеет максимум поглощения при 324 нм, в то время как связанный – при 340 нм) (**Рис. 3.26Г**). Наблюдаемая константа скорости накопления свободного РМР составила $0,37 \pm 0,07 \text{ ч}^{-1}$ (**Рис. 3.26Д**). Сходство величин констант скоростей накопления свободного РМР и реактивации PLP-формы холофермента в присутствии α -кетоглутарата указывает на то, что лимитирующей стадией обоих процессов является образование РМР в активном центре ТА_Halhy.

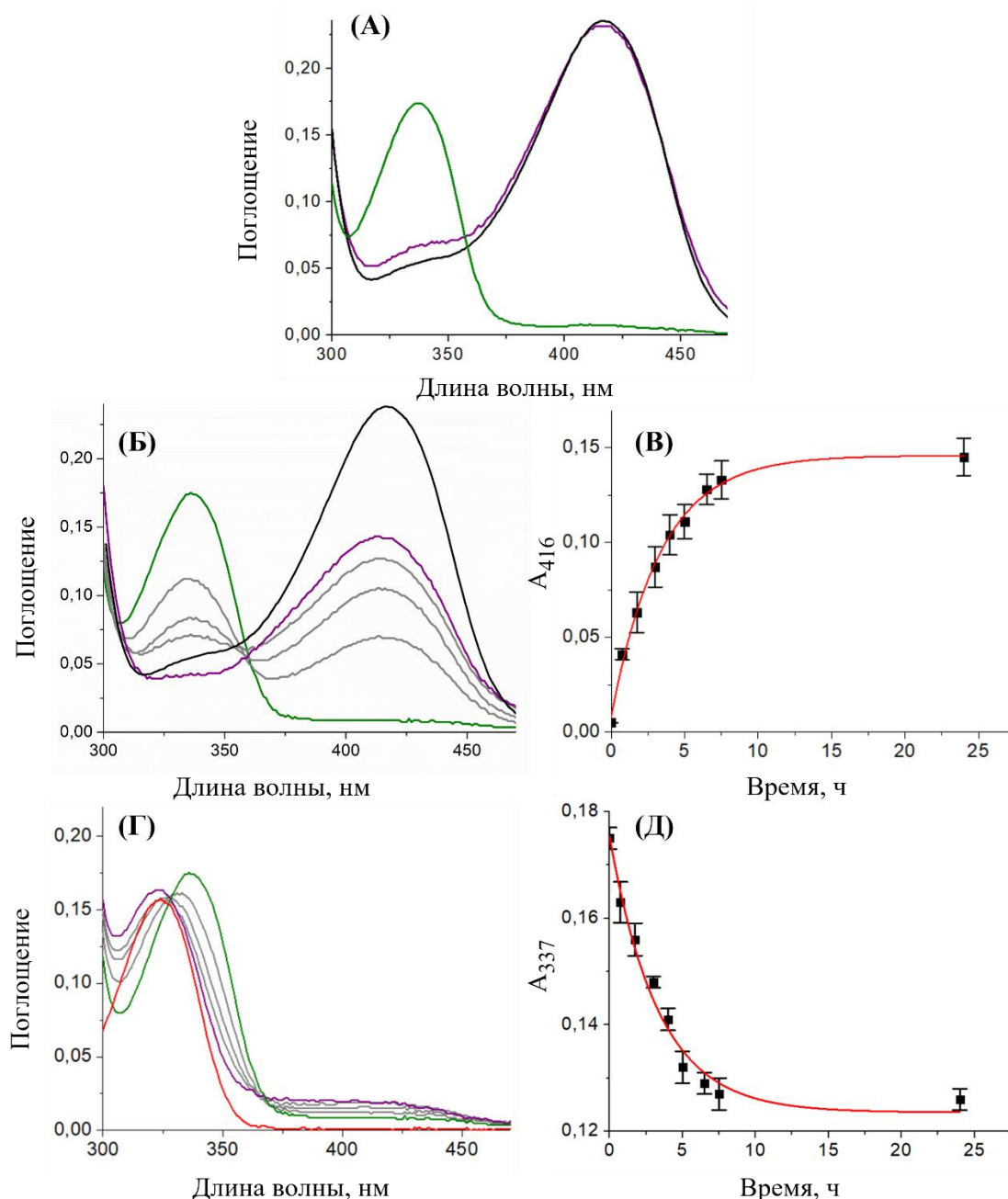


Рис. 3.26. Реактивация PLP-формы холофермента TA_Halhy в 50 мМ КФБ, pH 8,0, при 40 °С. (А) Спектр поглощения PLP-формы холофермента TA_Halhy (25 мкМ) до (чёрный) и после выдерживания с D-циклосерином (25 мМ) с последующей сменой буфера (зелёный), после добавления PLP (250 мкМ) и повторной сменой буфера (фиолетовый). (Б) Спектр поглощения PLP-формы холофермента TA_Halhy до (чёрный) и после выдерживания с D-циклосерином с последующей сменой буфера (зелёный), после добавления α-кетоглутарата в концентрации 20 мМ через 2, 4, 6 (серый) и 24 часа (фиолетовый). (В) Изменение интенсивности поглощения при 416 нм со временем (из спектров Б). (Г) Спектр поглощения PLP-формы холофермента TA_Halhy после выдерживания с D-циклосерином и переводом в новый буфер (зелёный), спустя 2, 4, 6 (серый) и 24 часа (фиолетовый), спектр поглощения 25 мкМ РМР (красный). (Д) Изменение интенсивности поглощения при 337 нм со временем (из спектров Г). Экспериментальные значения (В,Д) показаны точками и представлены как среднее ± стандартное отклонение, аппроксимация показана красной линией.

Таким образом, в результате спектрального анализа определено образование двух продуктов взаимодействия TA_Halhy с D-цикloserином: оксима и PMP. Циклический кетимин был обнаружен методом кристаллографии. Остальные соединения (циклический альдимин, раскрытый альдимин и раскрытый кетимин) также образуются в ходе взаимодействия, так как накопление PMP возможно только в результате превращения этих соединений (**Рис. 1.10**). Изоксазол среди продуктов взаимодействия не обнаружен, однако не исключено его обратимое образование из циклического кетимина (**Рис. 1.10**).

Проведенные исследования показали, что D-цикloserин обратимо ингибирует TA_Halhy: 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 из активного центра возможна благодаря открытому активному центра TA_Halhy (**Рис. 3.12Б**). Реактивация холофермента субстратом возможна через спонтанное образование PMP-формы при превращении D-цикloserина в активном центре TA и последующей полуреакции с α -кетоглутаратом. Обобщая, стоит отметить, что наблюдаемая для разнообразных PLP-зависимых ферментов обратимость ингибирования D-цикloserином снижает эффективность его использования как антибактериального препарата, тем не менее возможно применение D-цикloserина как регулятора активности PLP-зависимых ферментов в экспериментах и при разработке биотехнологических схем.

1.5. Применение TA_Halhy в стереоселективном аминировании α -кетокислот

1.5.1. Оценка эффективности TA_Halhy в трехферментной системе

TA_Halhy активна со многими алифатическими и ароматическими α -кетокислотами (**Таблица 3.9**). Значения максимальной скорости реакции снижается по мере удлинения алифатической боковой группы субстрата. При этом TA_Halhy чувствительна к наличию заместителей у C β атома. Среди ароматических субстратов фермент наиболее активен в реакциях с фенилпируватом и 4-гидроксифенилпируватом.

Табл. 3.9. Стереоселективное аминирование α -кетокислот, катализируемое TA_Halhy. Параметры 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, рН 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, рН 7,5, при 30 °С) оценивали хроматографически.

Субстрат	V	k_{cat}/K_m , М ⁻¹ с ⁻¹	Выход D-АК, %	<i>ee</i> , %
2-Оксобутират		25000 ± 2000		
2-Оксовалерат		2000 ± 200	9	> 9 9
3-Метил-2-оксобутират	46 ± 2	1400 ± 200	99	> 9 9
2-Оксогексаноат	4 6	60 ± 10	99	> 9 9
3-Метил-2-оксовалерат	1 7	50 ± 20	90	> 9 9
4-Метил-2-оксовалерат	35 ± 2	200 ± 10	98	> 9 9
Фенилпируват	35 ± 2	560 ± 70	9	> 9 9
Индол-3-пируват	3 7	420 ± 40	75	> 9 9
4-Гидроксифенил-пируват	34 ± 2	2400 ± 400	85	> 9 9
2-Окси-4-фенилбутират	6 7	240 ± 20	99	> 9 9

Для оценки эффективности TA_Halhy как биокатализатора для синтеза D-аминокислот была опробована каскадная трехферментная система (Рис. 3.27). Смещения равновесия трансминазной реакции в сторону образования продукта – D-аминокислоты – осуществляли путем добавления двух дополнительных ферментов (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназу (ГГДГ) из *A. fermentas* и глюкозодегидрогеназу (ГДГ) из *Pseudomonas* sp. Проведенный анализ показал, что в большинстве реакций выход D-аминокислоты превысил 90% энантиомерный избыток продуктов превысил 99% (Таблица 3.9). TA_Halhy стабильна в условиях асимметрического синтеза: время полуинактивации превышало 24 часа. В качестве аминодонора использовали D-глутамат, как наилучший аминодонор для TA_Halhy.

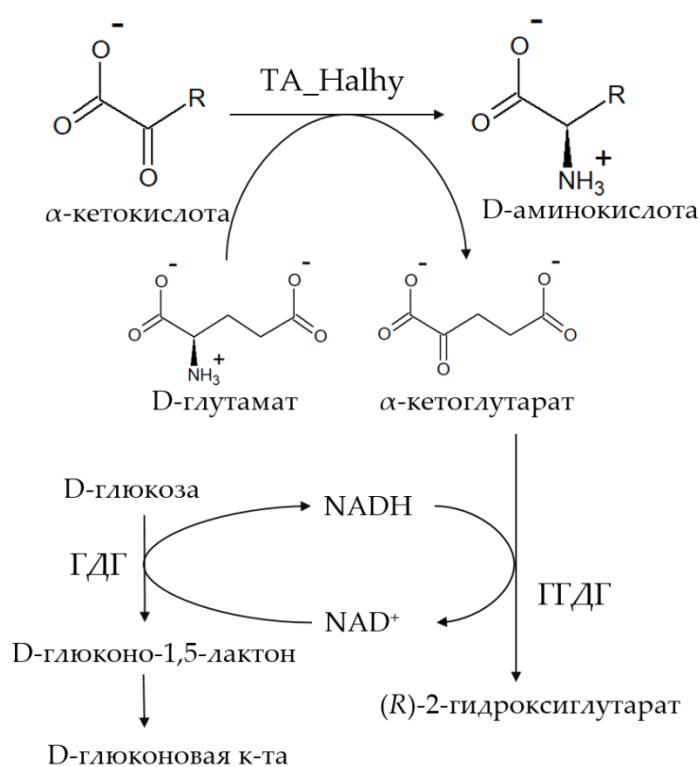


Рис. 3.27. Схема трехферментной системы для (R)-селективного аминирования α-кетокислот.

Таким образом, TA_Halhy эффективна в стереоселективном аминировании алифатических и ароматических α-кетокислот. Можно выделить следующие характеристики TA_Halhy, которые делают ее потенциальным объектом для разработки биокатализатора асимметричного синтеза D-аминокислот – высокая каталитическая активность, высокая стереоселективность, высокая операционная стабильность, эффективная реактивация холофермента.

1.5.2. Стабилизация холофермента TA_Halhy в реакционных условиях

Потеря кофактора в ходе каталитического процесса может негативно сказываться на выходе целевого продукта, поскольку приводит к снижению концентрации активного холофермента и накоплению неактивного и менее стабильного апофермента. Определение условий реакции, стабилизирующих холофермент, повышает эффективность процессов оптимизации ферментов-биокатализаторов.

Потеря кофактора в условиях реакции происходит в результате выхода нековалентно связанного PMP из активного центра TA_Halhy (Рис. 3.21) и может быть описана схемой, приведенной на Рис. 3.28. Для повышения стабильности холофермента были проанализированы следующие факторы: мольное соотношение аминокислот к аминокислотному акцептору, температура и избыток свободного PLP (Рис 3.29А,Б, Таблица 3.10). Было установлено, что холофермент можно стабилизировать повышением мольного соотношения аминокислот/аминокислотный акцептор и снижением температуры, при этом добавление PLP в реакционную смесь не влияет на константу скорости утечки кофактора.

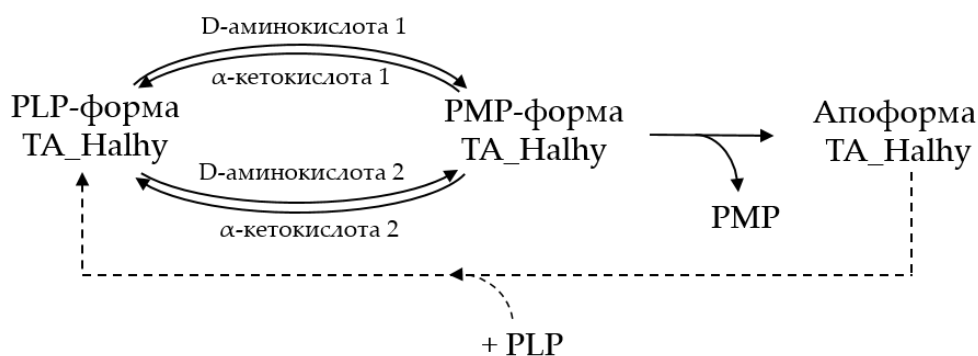


Рис. 3.28. Схема утечки кофактора в условиях реакции.

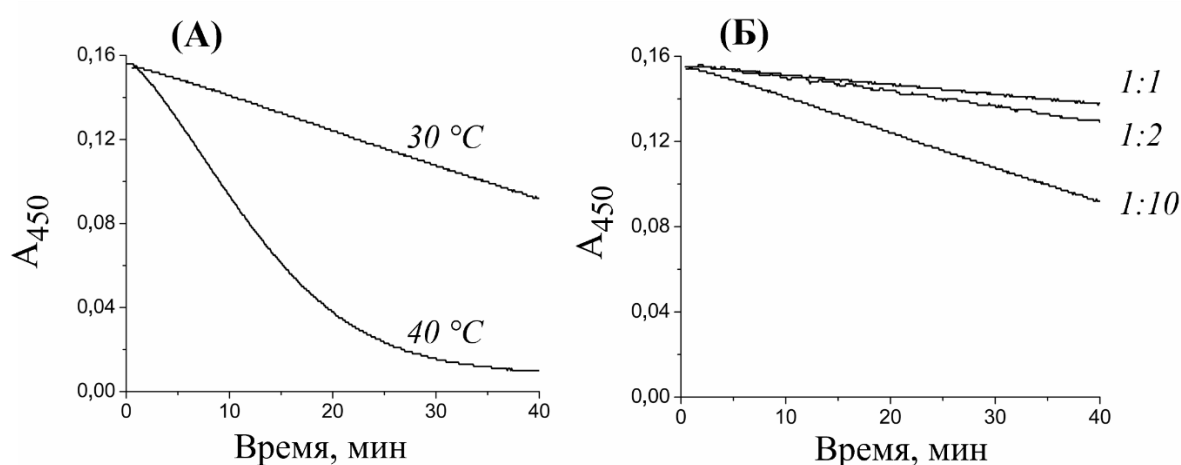


Рис. 3.29. Утечка кофактора из холофермента TA_Nalhy (30 мкМ) в 50 мМ КФБ, pH 8,0. (А) Изменение интенсивности поглощения при 450 нм при выдерживании PLP-формы TA_Nalhy (30 мкМ) в присутствии D-аланина (100 мМ) и α -кетоглутарата (10 мМ) при 30 и 40 °С. (Б) Изменение интенсивности поглощения при 450 нм при выдерживании в присутствии субстратов, взятых в разном мольном соотношении: 10 мМ α -кетоглутарат и 100 мМ D аланин (1:10), 50 мМ α -кетоглутарат и 100 мМ D-аланин (1:2), 50 мМ α -кетоглутарат и 50 мМ D-аланин (1:1) при 30 °С.

Табл. 3.10. Константы скорости утечки кофактора в разных реакционных условиях.

Условия реакции				$k_{\text{дисс}}^{\text{каж}} \text{ мин}^{-1}$
Аминодонор	Аминакцептор	T, °C	[PLP], мкМ	
100 мМ D-аланин	10 мМ α -кетоглутарат	40	0	$0,048 \pm 0,006$
100 мМ D-аланин	10 мМ α -кетоглутарат	40	100	$0,030 \pm 0,004$
100 мМ D-аланин	10 мМ α -кетоглутарат	30	0	$0,010 \pm 0,001$
100 мМ D-аланин	10 мМ α -кетоглутарат	30	100	$0,008 \pm 0,002$
100 мМ D-аланин	50 мМ α -кетоглутарат	30	0	$0,005 \pm 0,001$
50 мМ D-аланин	50 мМ α -кетоглутарат	30	0	$0,0030 \pm 0,0003$
50 мМ D-глутамат	50 мМ 2-оксвалерат	30	0	$0,0021 \pm 0,0003$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые трансминазы широко представлены в природе, высокостереоселективны и являются ключевыми ферментами метаболизма D-, L-аминокислот. При этом их исследования интересны как с фундаментальной точки зрения, так и с точки зрения синтетической химии, где поднимаются вопросы получения оптически чистых аминосоединений с биологической активностью.

Изложенная работа посвящена детальной характеристика новой трансминазы IV типа укладки – трансминазы D-аминокислот (DATA) из бактерии *Haliscomenobacter hydrossis* (TA_Halhy) в рекомбинантной форме. Фермент принадлежит к малоизученной группе неканонических трансминаз 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. Каталитическая константа в реакции трансминирования между D-глутаматом и пируватом при 40 °C составляет $215 \pm 6 \text{ с}^{-1}$. В данной работе впервые проведен детальный анализ предстационарной кинетики DATA методом «остановленного потока». Анализ полуреакций 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.

Была проведена кристаллизация TA_Halhy и ее варианта R90I в холоформе и с ингибиторами D-циклосерином и фенилгидразином. Методом рентгеноструктурного анализа получены пространственные структуры, что позволило провести детальный структурный анализ TA_Halhy. Установлено, что в активном центре TA_Halhy связывание субстратов регулируется тремя остатками аргинина и остатком 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 спекроскопию и спектрофлуориметрию, методами точечного мутагенеза и кристаллографии. По результатам анализа показана многофункциональность консервативных остатков аргининов в активном центре неканонической DATA. Помимо связывания субстратов остатки R28* и R90 участвуют в стабилизации активной формы кофактора, а также в стабилизации функционального димера. Остаток R179 участвует только в связывании α -карбоксильной группы субстрата. В работе впервые показано участие удаленных

остатков в стабилизации кофактора в активном центре ДАТА за счет формирования сети нековалентных взаимодействий.

Изменение субстратной специфичности ТА на сегодняшний день остается сложной задачей, несмотря на значительный прогресс в методах белковой инженерии. В распознавании и связывании природных субстратов в трансаминазах играет ключевую роль карбоксильная группа. В ходе исследования был получен вариант ТА_Halhy с одиночной аминокислотной заменой R90I, который проявлял активность в реакциях с природными субстратами, такими как D-аминокислоты и α -кетокислоты, а также с субстратами, не содержащими α -карбоксильную группу, первичными (*R*)-аминами. Анализ структуры холофермента варианта R90I и комплекса с аналогом субстрата, фенилгидразином, показал, что замена R90I приводит к повышению подвижности объемных боковых групп остатков активного центра, в том числе остатка R28*, делая активный центр пластичным. Данное наблюдение было подтверждено при анализе структур гомологичных неканонических ДАТА.

В работе подробно исследовано взаимодействие ТА_Halhy с ингибитором D-цикloserином методами спектрофотометрии, спектрофлуоресценции и кристаллографии, что позволило проанализировать особенности строения и функционирования активного центра ТА_Halhy. D-цикloserин является эффективным, но обратимым ингибитором ТА_Halhy. Реактивация PLP-формы холофермента возможна добавлением кофактора PLP (полная реактивация), а также кетосубстрата (частичная реактивация). Открытый активный центр ТА_Halhy способствует выходу продуктов ингибирования, образующийся при этом апофермент стабилен, не агрегирует и сохраняет способность к связыванию кофактора.

Проведенный в работе анализ показал, что ТА_Halhy высоко эффективна в реакциях аминирования алифатических и ароматических α -кетокислот с различной боковой группой, энантиомерный избыток продуктов, D-аминокислот, превышает 99%. Нестабильность холофермента негативно сказывается на выходе целевого продукта, в ходе исследований определены факторы, стабилизирующие холофермент в реакционных условиях, предложены подходы к 100% реактивации холофермента. Высокая операционная стабильность, эффективное восстановление холофермента, высокие скорости трансаминирования и высокая стереоселективность – очевидные достоинства ТА_Halhy, которые делают новую ДАТА привлекательным объектом для разработки биокатализатора с целью получения оптически чистых 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 °С. Трансаминаза из *H. hydrossis* наиболее специфична к D-глутамату.
2. В полуреакции трансаминазы из *H. hydrossis* с D-аминокислотами определены стадии: (1) образования внешнего альдимины, (2) 1-3-переноса протона, (3) выхода продукта и PMP 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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

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-цикloserином 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 (3-8 октября 2021) – 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» (г. Суздаль, 25-29 июня 2023 г.) – 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.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

Множественное структурное выравнивание неканонических DATA. Были проанализированы пространственные структуры DATA из *H. hydrossis* (TA_Halhy, PDB код 7P7X), *A. colombiense* (AmicoTA, 8AHR), *C. pusillum* (CpuTA, 5K3W), *B. saxobsidens* (BlasaTA, 8PNY) и *M. tuberculosis* (6Q1R), а также модель DATA из *M. ginsengisoli* (MgiTA, UniProt код A0A1P8SD74), полученную с помощью сервера AlphaFold. Остатки активного центра отмечены жирным.

		R28*	
<i>H. hydrossis</i>	1	---	m l k Y Y N i n G - - - - - q - - - Q - - V - P V E N A T L H V S D L S I L R G Y G I F D Y F L A R E G H P L F L D D 48
<i>A. colombiense</i>	1	---	m N - L C Y I d G - - - - - k - - - F - - L - P L E E A K L P V T D L I I Q R G V G V F E T I S T H S R R P L M L T P 47
<i>M. tuberculosis</i>	1	---	- - - - - M V V T - L - - - - - d - - - G e i L - Q P G M P L L H A D D L A A V R G D G V F E T L L V R D G R A C L V E A 46
<i>C. pusillum</i>	2	- -	t r A - T L L T - V t a p t r p r a a g d a g f - - - V I - A - D F G A P Q V R I T D L G I T R G D G V F E T I A V I D G H P Q A L E L 61
<i>B. saxobsidens</i>	4	---	q R - S V A V - W - - - - - r d g a A v t V - P A H Q P V V T A F D L G L G R G D G I F E S V A V V A G R T P H L A A 54
<i>M. ginsengisoli</i>	1	-	m t w R - F A L I - l e p v a s d d p r t d f d t t f - A p - V - D A S A P A L S I G E L S T Q R G D G I F E S I G V V D R H P Q E V E A 71
		R90	
<i>H. hydrossis</i>	49	Y	L N R F Y R S A A E L Y L E - l p f D K A E L R R Q I Y A L L Q a N e V - - - - R - - E - - - A G I R L V L T G G Y S - - - - - P d g 101
<i>A. colombiense</i>	48	H	L K R L E G S A T A S S I V - M p a T L D E M A R I I R E G I K - K - M - - - - G - - C e - - T M V R P Y I T G G - D - - - - - S f g 98
<i>M. tuberculosis</i>	47	H	L Q R L T Q S A R L M D L P e P - - D L P R W R R A V E V A T Q - R - W - - - - V a s T a d e G A L R L I Y S R G r E - - - - - G g - 100
<i>C. pusillum</i>	62	H	L G R L A H S A A L L D L P e P - - D A A V W R E A V L A G V A d Y - R s r n g D - - G g - e L F A K L I L T R G i E - - - - - G e - 127
<i>B. saxobsidens</i>	55	H	L T R L T R S A A L L G L P - A p - G D Q A W M E M V A A V L A - D - W - - - - P - - A a l e G V C R L F L T R G I G d - - - - - g T - - 107
<i>M. ginsengisoli</i>	72	H	L A R L A H S A E I C D L P V P - - N L A Q W R A A V A R A A A - Q - C - - - - P - e G - - e A V I K L I L S R G i E - - - - - H g - 115
		Y147	
<i>H. hydrossis</i>	102	y	- - t p v N P N L L I M M Y D I P A - S a - w e f S a - - Q G I K I I T H P F Q r - - - - - E L p E V K T I N Y S T G I R m l 154
<i>A. colombiense</i>	99	k	d h l f s S S R Y F V I F E E i R K p D p i l Y - E - - - K G V A L H P I N A E r - - - - - Y L p S T K S I N Y M L S F T - - 151
<i>M. tuberculosis</i>	101	-	- - - - - s A P T A Y V M V S P - V P - A r - v l - G a r r D G V S A I T L D R G l p a d g g d a m p w l l A - S A K T L S Y A V N M A v l 160
<i>C. pusillum</i>	128	-	- - - - - g R P S G W V F V D E - G E - D f - - S - Q q - r L G I R V V T L D R G y r h d v a e t s p w l l A - G A K S L S Y A T N R A a g 185
<i>B. saxobsidens</i>	108	-	- - - - - P P T A L A L L A P - V P - A d - t L - R q r a E G I S V A T L G L G v p a d f r a g a p w l l G - G A K T L S Y A V N M A a q 166
<i>M. ginsengisoli</i>	116	-	- - - - - P T P T A W V T A S A - A P - N y - - A - R p - r A E G I S V V V L D R G l d l a a p a r a p W L L L G A K T L S Y A T N M A a l 174
		R179	
<i>H. hydrossis</i>	155	K	t i k e r G A T D L I Y V D q G E W I R E S A R S N F F L V M p D - - N T I V T A D E K - - I L W G I T R R Q V I D A A R E A G - - - - Y 216
<i>A. colombiense</i>	152	-	- - - - - G A Y E I L Y C P - E G E I V E G S H S T F F L I K - N - - G H L I T A P T S r - A L S G T T R Q I V L E L A R R G N - - - - I 212
<i>M. tuberculosis</i>	161	r	h a a r q G A G D V I F V S t D G Y V L E G P R S T V V I A T - D - - P C L L T P P P W y p I L R G T T Q Q A L F E V A R A K G - - - - Y 230
<i>C. pusillum</i>	186	r	e a a r r G A D D V I F V S s D G Y A L E G P T S N V I V L A - D - - G V V R T P Q T D q g I L A G T T Q A A V F D F F E E R G - - - - Y 228
<i>B. saxobsidens</i>	167	r	h a h d l G A D D V V F T S I E G R L L E G P T S T V V W A A - G - - G T L H T P P V E t g I L P G T T Q A R L F T A A A A D G - - - - W 229
<i>M. ginsengisoli</i>	175	r	e a h r r G A D D A V F A T s D G F L L E A P T A S L V L R R - G - - D V F V T P E P A a g I L H G T T Q L S L F A H L A E R G - - - - F 237
<i>H. hydrossis</i>	217	-	A V E E R R I H I T E L D Q A R E A F F T S T I K G V M A I G Q I D D - R v F - - - G d g T i G K v t Q E L Q D L F V g k v k a y l e t c 281
<i>A. colombiense</i>	213	-	Q V E E R C P L L T E L P E A E E A F I T G T V K E L L P V V R I G D q l - l g - n G - - V p G K l t K H L H Q V Y L s s i v e w l e - - 275
<i>M. tuberculosis</i>	231	-	D C D Y R A L R V A D L F D S Q G I W L V S S M T L A A R V H T L D G - R r L - - - P - - R - T P i a E V F A E L V D a a i v s d r - - - 289
<i>C. pusillum</i>	249	-	P T E Y R R I S A D E L R D A E A L W L V S S V R Q A A P I T A L D D - R e Y - - - P - - V - D A - - A L T A D L N A y l l a r t d l e h 308
<i>B. saxobsidens</i>	230	-	P T S V T P G T V D D L H A A D A V W L L S G V R G A A V V H T V D G - V r R - - - G - - D - G D I s R R V R E L L A - - - - - 281
<i>M. ginsengisoli</i>	238	-	T T A Y E T L P T A A L A D A D A A W L V S S V R L A A P I T A V D G - R a L - - - P - - H - D A - - A F T A E L N A y l l s p r d - - - 294

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Steffen-Munsberg F., Vickers C., Kohls H., Land H., Mallin H., Nobili A., Skalden L., Bergh T. van den, Joosten H.-J., Berglund P., Höhne M., Bornscheuer U.T., Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications // *Biotechnol. Adv.* - 2015. - Vol. 33, № 5. - P. 566–604.
2. Jansonius J.N., Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 1998. - Vol. 8, № 6. - P. 759–769.
3. Percudani R., Peracchi A., The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families // *BMC Bioinformatics* - 2009. - Vol. 10. - P. 1-8.
4. Cortijo M., Llor J., Jimenez J.S., Garcia-Blanco F., Studies on the pyridoxal phosphate site in glycogen phosphorylase b // *Eur. J. Biochem.* - 1976. - Vol. 65, № 2. - P. 521–7.
5. Heinert D., Martell A., Pyridoxine and pyridoxal analogs. VI. Electronic absorption spectra of schiff bases // *J. Am. Chem. Soc.* - 1963. - Vol. 49, № 4. - P. 183–188.
6. Metzler C.M., Cahill A., Metzler D.E., Equilibriums and absorption spectra of Schiff bases // *J. Am. Chem. Soc.* - 1980. - Vol. 102, № 19. - P. 6075–6082.
7. Морозов Ю.В., Алмазов В.П., Савин Ф.А., Бажулина Н.П., Электронная структура и спектры шиффовых оснований пиридоксаль-5'-фосфата и некоторых их аналогов // *Биоорганическая химия* - 1982. - Vol. 8, № 8. - P. 1119–1132.
8. Морозов Ю. В., Бажулина Н. П., Боковой В. А., Кузнецова Н. В., Карташева О. Н., Осипова Т. И., Хурс Е. Н., Спектральные свойства альдиминов пиридоксаль-5'-фосфата с некоторыми ароматическими аминокислотами и их аналогами. Таутомерные и изомерные равновесия // *Биоорганическая химия* - 1998. - Vol. 24, № 8. - P. 631–637.
9. Sharif S., Denisov G.S., Toney M.D., Limbach H.-H., NMR studies of solvent-assisted proton transfer in a biologically relevant schiff base: toward a distinction of geometric and equilibrium H-bond isotope effects // *J. Am. Chem. Soc.* - 2006. - Vol. 128, № 10. - P. 3375–3387.
10. Cambrón G., Fluorescence of the schiff bases of pyridoxal and pyridoxal 5'-phosphate with l-isoleucine in aqueous solutions // *J. Fluoresc.* - 1996. - Vol. 6, № 1. - P. 1–6.
11. Lin Y., Gao J., Internal proton transfer in the external pyridoxal 5'-phosphate Schiff base in dopa decarboxylase // *Biochemistry* - 2010. - Vol. 49, № 1. - P. 84–94.
12. Sharif S., Huot M.C., Tolstoy P.M., Toney M.D., Jonsson K.H.M., Limbach H.-H., ¹⁵N nuclear magnetic resonance studies of acid-base properties of pyridoxal-5'-phosphate aldimines in aqueous solution // *J. Phys. Chem. B* - 2007. - Vol. 111, № 15. - P. 3869–76.
13. Honikel K.O., Madsen N.B., Comparison of the absorbance spectra and fluorescence behavior of

- phosphorylase b with that of model pyridoxal phosphate derivatives in various solvents // *J. Biol. Chem.* - 1972. - Vol. 247, № 4. - P. 1057–64.
14. Vázquez Segura M.A., Donoso J., Muñoz F., García Blanco F., García del Vado M.A., Echevarría G., Photophysical study of the Schiff bases of 5'-deoxypyridoxal and n-hexylamine in cationic micelles // *Photochem. Photobiol.* - 1994. - Vol. 60, № 5. - P. 399–404.
15. Sharif S., Schagen D., Toney M.D., Limbach H.-H., Coupling of functional hydrogen bonds in pyridoxal-5'-phosphate-enzyme model systems observed by solid-state NMR spectroscopy // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - Vol. 129, № 14. - P. 4440–55.
16. Chan-Huot M., Niether C., Sharif S., Tolstoy P.M., Toney M.D., Limbach H.-H., NMR studies of the protonation states of pyridoxal-5'-phosphate in water // *J. Mol. Struct.* - 2010. - Vol. 976, № 1–3. - P. 282–289.
17. Braunstein A.E., The enzyme system of trans-amination, its mode of action and biological significance // *Nature* - 1939. - Vol. 143, № 3623. - P. 609–610.
18. Cooper A.J.L., Meister A., An appreciation of Professor Alexander E. Braunstein. The discovery and scope of enzymatic transamination // *Biochimie* - 1989. - Vol. 71, № 4. - P. 387–404.
19. Braunshtein A.E., Shemiakin M.M., Theory on amino acid metabolism processes catalyzed by pyridoxine enzymes // *Biokhimiia* - 1953. - Vol. 18, № 4. - P. 393–411.
20. Metzler D.E., Ikawa M., Snell E.E., A general mechanism for vitamin B6-catalyzed reactions // *J. Am. Chem. Soc.* - 1954. - Vol. 76, № 3. - P. 648–652.
21. Borisov V.V., Borisova S.N., Kachalova G.S., Sosfenov N.I., Vainshtein B.K., Torchinsky Y.M., Braunstein A.E., Three-dimensional structure at 5 Å resolution of cytosolic aspartate transaminase from chicken heart // *J. Mol. Biol.* - 1978. - Vol. 125, № 3. - P. 275–292.
22. Toney M.D., Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2011. - Vol. 1814, № 11. - P. 1407–1418.
23. Mueser T.C., Drago V., Kovalevsky A., Dajnowicz S., Pyridoxal 5'-phosphate dependent reactions: Analyzing the mechanism of aspartate aminotransferase // *Methods Enzymol.* - 2020. - Vol. 634. - P. 333–359.
24. Toney M.D., Aspartate aminotransferase: an old dog teaches new tricks // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2014. - Vol. 544. - P. 119–27.
25. Cook P.D., Holden H.M., A structural study of GDP-4-keto-6-deoxy-D-mannose-3-dehydratase: caught in the act of geminal diamine formation // *Biochemistry* - 2007. - Vol. 46, № 49. - P. 14215–24.
26. Karsten W.E., Cook P.F., Detection of a gem-diamine and a stable quinonoid intermediate in the reaction catalyzed by serine-glyoxylate aminotransferase from *Hyphomicrobium methylovorum* // *Biochim. Biophys. Acta* - 2009. - Vol. 1790, № 6. - P. 575–80.

27. Chan-Huot M., Dos A., Zander R., Sharif S., Tolstoy P.M., Compton S., Fogle E., Toney M.D., Shenderovich I., Denisov G.S., Limbach H., NMR studies of protonation and hydrogen bond states of internal aldimines of pyridoxal 5'-phosphate acid-base in alanine racemase, aspartate aminotransferase, and poly-L-lysine // *J. Am. Chem. Soc.* - 2013. - Vol. 135, № 48. - P. 18160–75.
28. Ngo H.-P.-T., Cerqueira N.M.F.S.A., Kim J.-K., Hong M.-K., Fernandes P.A., Ramos M.J., Kang L.-W., PLP undergoes conformational changes during the course of an enzymatic reaction // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* - 2014. - Vol. 70, № Pt 2. - P. 596–606.
29. Cerqueira N.M.F.S.A., Fernandes P.A., Ramos M.J., Computational mechanistic studies addressed to the transamination reaction present in all pyridoxal 5'-phosphate-requiring enzymes // *J. Chem. Theory Comput.* - 2011. - Vol. 7, № 5. - P. 1356–1368.
30. Crujeiras J., Rios A., Riveiros E., Richard J.P., Substituent effects on electrophilic catalysis by the carbonyl group: anatomy of the rate acceleration for PLP-catalyzed deprotonation of glycine // *J. Am. Chem. Soc.* - 2011. - Vol. 133, № 9. - P. 3173–83.
31. Toth K., Richard J.P., Covalent catalysis by pyridoxal: evaluation of the effect of the cofactor on the carbon acidity of glycine // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - Vol. 129, № 10. - P. 3013–3021.
32. Richard J.P., Amyes T.L., Crujeiras J., Rios A., Pyridoxal 5'-phosphate: electrophilic catalyst extraordinaire // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2009. - Vol. 13, № 4. - P. 475–483.
33. Dunathan H.C., Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1966. - Vol. 55, № 4. - P. 712–6.
34. Frey P.A., Radical mechanisms of enzymatic catalysis // *Annu. Rev. Biochem.* - 2001. - Vol. 70, № 1. - P. 121–48.
35. Casasnovas R., Salvà A., Frau J., Donoso J., Muñoz F., Theoretical study on the distribution of atomic charges in the Schiff bases of 3-hydroxypyridine-4-aldehyde and alanine. The effect of the protonation state of the pyridine and imine nitrogen atoms // *Chem. Phys.* - 2009. - Vol. 355, № 2–3. - P. 149–156.
36. Inoue Y., Kuramitsu S., Inoue K., Kagamiyama H., Hiromi K., Tanase S., Morino Y., Substitution of a lysyl residue for arginine 386 of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase // *J. Biol. Chem.* - 1989. - Vol. 264, № 16. - P. 9673–81.
37. Hayashi H., Inoue K., Nagata T., Kuramitsu S., Kagamiyama H., *Escherichia coli* aromatic amino acid aminotransferase: characterization and comparison with aspartate aminotransferase // *Biochemistry* - 1993. - Vol. 32, № 45. - P. 12229–39.
38. Yano Y., Kuramitsu S., Tanase S., Morino Y., Kagamiyama H., Role of Asp222 in the catalytic mechanism of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase: the amino acid residue which enhances the function of the enzyme-bound coenzyme pyridoxal 5'-phosphate // *Biochemistry* - 1992. - Vol. 31, №

25. - P. 5878–5887.
39. Hayashi H., Mizuguchi H., Kagamiyama H., The imine-pyridine torsion of the pyridoxal 5'-phosphate schiff base of aspartate aminotransferase lowers its pK(a) in the unliganded enzyme and is crucial for the successive increase in the pK(a) during catalysis // *Biochemistry* - 1999. - Vol. 37. - P. 15076–15085.
40. Jäger J., Moser M., Sauder U., Jansonius J.N., Crystal structures of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase in two conformations // *J. Mol. Biol.* - 1994. - Vol. 239, № 2. - P. 285–305.
41. Dajnowicz S., Johnston R.C., Parks J.M., Blakeley M.P., Keen D.A., Weiss K.L., Gerlits O., Kovalevsky A., Mueser T.C., Direct visualization of critical hydrogen atoms in a pyridoxal 5'-phosphate enzyme // *Nat. Commun.* - 2017. - Vol. 8, № 1. - P. 1-9.
42. Drago V.N., Dajnowicz S., Parks J.M., Blakeley M.P., Keen D.A., Coquelle N., Weiss K.L., Gerlits O., Kovalevsky A., Mueser T.C., An N··H··N low-barrier hydrogen bond preorganizes the catalytic site of aspartate aminotransferase to facilitate the second half-reaction // *Chem. Sci.* - 2022. - Vol. 13, № 34. - P. 10057–10065.
43. Tai C.H., Cook P.F., Pyridoxal 5'-phosphate-dependent alpha,beta-elimination reactions: mechanism of O-acetylserine sulfhydrylase // *Acc. Chem. Res.* - 2001. - Vol. 34, № 1. - P. 49–59.
44. Shaw J.P., Petsko G.A., Ringe D., Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9-Å resolution // *Biochemistry* - 1997. - Vol. 36, № 6. - P. 1329–42.
45. Kamitori S., Okamoto A., Hirotsu K., Higuchi T., Kuramitsu S., Kagamiyama H., Matsuura Y., Katsube Y., Three-dimensional structures of aspartate aminotransferase from *Escherichia coli* and its mutant enzyme at 2.5 Å resolution // *J. Biochem.* - 1990. - Vol. 108, № 2. - P. 175–84.
46. Sun S., Toney M.D., Evidence for a two-base mechanism involving tyrosine-265 from arginine-219 mutants of alanine racemase // *Biochemistry* - 1999. - Vol. 38, № 13. - P. 4058–65.
47. Cook P.F., Alpha,beta-elimination reaction of O-acetylserine sulfhydrylase. Is the pyridine ring required? // *Biochim. Biophys. Acta* - 2003. - Vol. 1647, № 1–2. - P. 66–9.
48. Griswold W.R., Toney M.D., Role of the pyridine nitrogen in pyridoxal 5'-phosphate catalysis: Activity of three classes of PLP enzymes reconstituted with deazapyridoxal 5'-phosphate // *J. Am. Chem. Soc.* - 2011. - Vol. 133, № 37. - P. 14823–14830.
49. Fogle E.J., Liu W., Woon S.-T., Keller J.W., Toney M.D., Role of Q52 in catalysis of decarboxylation and transamination in dialkylglycine decarboxylase // *Biochemistry* - 2005. - Vol. 44, № 50. - P. 16392–404.
50. Helmreich E.J., How pyridoxal 5'-phosphate could function in glycogen phosphorylase catalysis // *Biofactors* - 1992. - Vol. 3, № 3. - P. 159–72.
51. Livanova N.B., Chebotareva N.A., Eronina T.B., Kurganov B.I., Pyridoxal 5'-phosphate as a

- catalytic and conformational cofactor of muscle glycogen phosphorylase b // *Biochemistry. (Mosc).* - 2002. - Vol. 67, № 10. - P. 1089–98.
52. Yamada T., Komoto J., Takata Y., Ogawa H., Pitot H.C., Takusagawa F., Crystal structure of serine dehydratase from rat liver // *Biochemistry* - 2003. - Vol. 42, № 44. - P. 12854–65.
53. Braunstein A. E. Amino Group Transfer // *The Enzymes.* - Acad. Press. - 1973. - Vol. 9. P. 379–481.
54. Ovchinnikov Y.A., Egorov C.A., Aldanova N.A., Feigina M.Y., Lipkin V.M., Abdulaev N.G., Grishin E.V., Kiselev A.P., Modyanov N.N., Braunstein A.E., Polyanovsky O.L., Nosikov V.V., The complete amino acid sequence of cytoplasmic aspartate aminotransferase from pig heart // *FEBS Lett.* - 1973. - Vol. 29, № 1. - P. 31–34.
55. Ayling J.E., Snell E.E., Mechanism of action of pyridoxamine pyruvate transaminase // *Biochemistry* - 1968. - Vol. 7, № 5. - P. 1616–1625.
56. Snell E.E. and Samuel J.D.M. Schiff base intermediates in enzyme catalysis // *The Enzymes Academic Press.* - 1970. - Vol. 2. - P. 335–370.
57. Hayashi H., Tanase S., Yagi T., Esmond E. Snell - The pathfinder of B vitamins and cofactors // *J. Biochem.* - 2010. - Vol. 147, № 4. - P. 451–457.
58. Lis H., Fasella P., Turano C., Vecchini P., On the mechanism of action of glutamic-aspartic transaminase: Intermediate steps in the reaction // *BBA - Biochim. Biophys. Acta* - 1960. - Vol. 45. - P. 529–536.
59. Fasella P., Pyridoxal phosphate. // *Annu. Rev. Biochem.* - 1967. - Vol. 36. - P. 185–210.
60. Fasella P., Giartosio A., Hammes G.G., The Interaction of Aspartate Aminotransferase with α -Methylaspartic Acid // *Biochemistry* - 1966. - Vol. 5, № 1. - P. 197–202.
61. Kuramitsu S., Hayashi H., Hiromi K., Morino Y., Kagamiyama H., Pre-Steady-State Kinetics of *Escherichia coli* Aspartate Aminotransferase Catalyzed Reactions and Thermodynamic Aspects of Its Substrate Specificity // *Biochemistry* - 1990. - Vol. 29, № 23. - P. 5469–5476.
62. Hayashi H., Kagamiyama H., Transient-State Kinetics of the Reaction of Aspartate Aminotransferase with Aspartate at Low pH Reveals Dual Routes in the Enzyme - Substrate Association // *Biochemistry* - 1997. - Vol. 36. - P. 13558–13569.
63. Kirsch J.F., Toney M.D., Hall B., Bronsted analysis of enzymatic proton transfer reactions through site-directed mutagenesis // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 1990. - Vol. 585, - P. 48–57.
64. Toney M.D., Kirsch J.F., Tyrosine 70 fine-tunes the Catalytic Efficiency of Aspartate Aminotransferase // *Biochemistry* - 1991. - Vol. 30, № 30. - P. 7456–7461.
65. Toney M.D., Kirsch J.F., Lysine 258 in aspartate aminotransferase: enforcer of the circe effect for amino acid substrates and general-base catalyst for the 1,3-prototropic shift // *Biochemistry* - 1993. -

Vol. 32, № 6. - P. 1471–1479.

66. Eliot A.C., Kirsch J.F., Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations // *Annu. Rev. Biochem.* - 2004. - Vol. 73, № 1. - P. 383–415.

67. Limbach H.H., Chan-Huot M., Sharif S., Tolstoy P.M., Shenderovich I.G., Denisov G.S., Toney M.D., Critical hydrogen bonds and protonation states of pyridoxal 5'-phosphate revealed by NMR // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* - 2011. - Vol. 1814, № 11. - P. 1426–1437.

68. Griswold W.R., Castro J.N., Fisher A.J., Toney M.D., Ground-state electronic destabilization via hyperconjugation in aspartate aminotransferase // *J. Am. Chem. Soc.* - 2012. - Vol. 134, № 20. - P. 8436–8438.

69. Zhou X., Toney M.D., pH Studies on the mechanism of the pyridoxal phosphate-dependent dialkylglycine decarboxylase // *Biochemistry* - 1999. - Vol. 38, № 1. - P. 311–320.

70. Karsten W.E., Ohshiro T., Izumi Y., Cook P.F., Reaction of serine-glyoxylate aminotransferase with the alternative substrate ketomalonate indicates rate-limiting protonation of a quinonoid intermediate // *Biochemistry* - 2005. - Vol. 44, № 48. - P. 15930–6.

71. Inoue K., Kuramitsu S., Okamoto A., Higuchi T., Morino Y., Kagamiyama H., Tyr225 in aspartate aminotransferase: contribution of the hydrogen bond between Tyr225 and coenzyme to the catalytic reaction // *J. Biochem.* - 1991. - Vol. 576. - P. 570–576.

72. Toney M.D., Kirsch J.F., The K258R mutant of aspartate aminotransferase stabilizes the quinonoid intermediate // *J. Biol. Chem.* - 1991. - Vol. 266, № 35. - P. 23900–3.

73. Amorim Franco T.M., Hegde S., Blanchard J.S., Chemical mechanism of the branched-chain aminotransferase IlvE from *Mycobacterium tuberculosis* // *Biochemistry* - 2016. - Vol. 55, № 45. - P. 6295–6303.

74. Julin D.A., Kirsch J.F., Kinetic isotope effect studies on aspartate aminotransferase: evidence for a concerted 1,3 prototropic shift mechanism for the cytoplasmic isozyme and L-aspartate and dichotomy in mechanism // *Biochemistry* - 1989. - Vol. 28, № 9. - P. 3825–3833.

75. Zhou X., Jin X., Medhekar R., Chen X., Dieckmann T., Toney M.D., Rapid kinetic and isotopic studies on dialkylglycine decarboxylase // *Biochemistry* - 2001. - Vol. 40, № 5. - P. 1367–77.

76. Goldberg J.M., Kirsch J.F., The reaction catalyzed by *Escherichia coli* aspartate aminotransferase has multiple partially rate-determining steps, while that catalyzed by the Y225F mutant is dominated by ketimine hydrolysis // *Biochemistry* - 1996. - Vol. 35, № 16. - P. 5280–91.

77. Xiang C., Ao Y., Höhne M., Bornscheuer U.T., Shifting the pH optima of (*R*)-selective transaminases by protein engineering // *Int. J. Mol. Sci.* - 2022. - Vol. 23, № 23. - P. 15347.

78. Shilova S.A., Khrenova M.G., Matyuta I.O., Nikolaeva A.Y., Rakitina T. V., Klyachko N.L., Minyaev M.E., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Y., To the Understanding of catalysis by D-

amino acid transaminases: a case study of the enzyme from *Aminobacterium colombiense* // *Molecules* - 2023. - Vol. 28, № 5. - P. 1-21.

79. Goto M., Miyahara I., Hayashi H., Kagamiyama H., Hirotsu K., Crystal structures of branched-chain amino acid aminotransferase complexed with glutamate and glutarate: true reaction intermediate and double substrate recognition of the enzyme // *Biochemistry* - 2003. - Vol. 42, № 13. - P. 3725–33.

80. Mizuguchi H., Hayashi H., Okada K., Miyahara I., Hirotsu K., Kagamiyama H., Strain is more important than electrostatic interaction in controlling the pKa of the catalytic group in aspartate aminotransferase // *Biochemistry* - 2001. - Vol. 40, № 2. - P. 353–360.

81. Islam M.M., Hayashi H., Mizuguchi H., Kagamiyama H., The substrate activation process in the catalytic reaction of *Escherichia coli* aromatic amino acid aminotransferase // *Biochemistry* - 2000. - Vol. 39, № 50. - P. 15418–28.

82. Kallen, R. G.; Korpela, T.; Martell, A. E.; Matsushima, Y.; Metzler, C. M.; Metzler, D. E.; Morozov, Y. V; Ralston, I. M.; Savin, F. A.; Torchinsky, Y. M.; and Ueno, H. In *transaminases*. John Wiley & Sons, New York: 1985.

83. Yano T., Mizuno T., Kagamiyama H., A hydrogen-bonding network modulating enzyme function: asparagine-194 and tyrosine-225 of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase // *Biochemistry* - 1993. - Vol. 32, № 7. - P. 1810–5.

84. Hayashi H., Mizuguchi H., Miyahara I., Islam M.M., Ikushiro H., Nakajima Y., Hirotsu K., Kagamiyama H., Strain and catalysis in aspartate aminotransferase // *Biochim. Biophys. Acta* - 2003. - Vol. 1647, № 1–2. - P. 103–9.

85. Kwon S., Lee J.H., Kim C.M., Ha H.J., Lee S.H., Lee C.S., Jeon J.-H., So I., Park H.H., Structural insights into the enzyme specificity of a novel ω -transaminase from the thermophilic bacterium *Sphaerobacter thermophilus* // *J. Struct. Biol.* - 2019. - Vol. 208, № 3. - P. 1-10.

86. Shin J.-S., Yun H., Jang J.-W., Park I., Kim B.-G., Purification, characterization, and molecular cloning of a novel amine:pyruvate transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2003. - Vol. 61, № 5–6. - P. 463–71.

87. Cellini B., Bertoldi M., Montioli R., Paiardini A., Borri Voltattorni C., Human wild-type alanine:glyoxylate aminotransferase and its naturally occurring G82E variant: functional properties and physiological implications // *Biochem. J.* - 2007. - Vol. 408, № 1. - P. 39–50.

88. Butrin A., Butrin A., Wawrzak Z., Moran G.R., Liu D., Determination of the pH dependence, substrate specificity, and turnovers of alternative substrates for human ornithine aminotransferase // *J. Biol. Chem.* - 2022. - Vol. 298, № 6. - P. 1-14.

89. Tanizawa K., Masus Y., Asano S., Tanaka H., Sodas K., Thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species. Purification, characterization, and active site

- sequence determination // *J. Biol. Chem.* - 1989. - Vol. 264, № 12. - P. 2445–2449.
90. Yonaha K., Misono H., Yamamoto T., Soda K., D-amino acid aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. Enzymologic and spectrometric properties // *J. Biol. Chem.* - 1975. - Vol. 250, № 17. - P. 6983–6989.
91. Inoue K., Kuramitsu S., Aki K., Watanabe Y., Takagi T., Nishigai M., Ikai A., Kagamiyama H., Branched-chain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: overproduction and properties // *J. Biochem.* - 1988. - Vol. 104, № 5. - P. 777–784.
92. Iwasaki A., Matsumoto K., Hasegawa J., Yasohara Y., A novel transaminase, (*R*)-amine:pyruvate aminotransferase, from *Arthrobacter* sp. KNK168 (FERM BP-5228): purification, characterization, and gene cloning // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2012. - Vol. 93, № 4. - P. 1563–1573.
93. Peisach D., Chipman D.M., Ophem P.W. Van, Manning J.M., Ringe D., Crystallographic study of steps along the reaction pathway of D-amino acid aminotransferase // *Biochemistry* - 1998. - Vol. 37, № 14. - P. 4958–67.
94. Bezsudnova E.Y., Popov V.O., Boyko K.M., Structural insight into the substrate specificity of PLP fold type IV transaminases // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2020. - Vol. 104, № 6. - P. 2343–2357.
95. Konia E., Chatzicharalampous K., Drakonaki A., Muenke C., Ermler U., Tsiotis G., Pavlidis I. V., Rational engineering of *Luminiphilus sylvensis* (*R*)-selective amine transaminase for the acceptance of bulky substrates. // *Chem. Commun. (Camb)*. - 2021. - Vol. 57, № 96. - P. 12948–12951.
96. Telzerow A., Paris J., Håkansson M., González-Sabín J., Ríos-Lombardía N., Gröger H., Morís F., Schürmann M., Schwab H., Steiner K., Expanding the toolbox of *R*-selective amine transaminases by identification and characterization of new members // *ChemBioChem* - 2021. - Vol. 22, № 7. - P. 1232–1242.
97. Bezsudnova E.Y., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., Zeifman Y.S., Rakitina T. V., Suplatov D.A., Popov V.O., Biochemical and structural insights into PLP fold type IV transaminase from *Thermobaculum terrenum* // *Biochimie* - 2019. - Vol. 158 - P. 130–138.
98. Padrosa D.R., Alaux R., Smith P., Dreveny I., López-Gallego F., Paradisi F., Enhancing PLP-binding capacity of class-III ω -transaminase by single residue substitution // *Front. Bioeng. Biotechnol.* - 2019. - Vol. 7, № October. - P. 1–13.
99. Soda K., Yoshimura T., Esaki N., Stereospecificity for the hydrogen transfer of pyridoxal enzyme reactions // *Chem. Rec.* - 2001. - Vol. 1, № 5. - P. 373–384.
100. Sugio S., Kashima A., Kishimoto K., Peisach D., Petsko G.A., Ringe D., Yoshimura T., Esaki N., Crystal structures of L201A mutant of D-amino acid aminotransferase at 2.0 Å resolution: implication of the structural role of Leu201 in transamination. // *Protein Eng.* - 1998. - Vol. 11, № 8. - P. 613–9.
101. Toney M.D., Kirsch J.F., Kinetics and equilibria for the reactions of coenzymes with wild type and

- the Y70F mutant of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase // *Biochemistry* - 1991. - Vol. 30, № 30. - P. 7461–6.
102. Turbeville T.D., Zhang J., Hunter G.A., Ferreira G.C., Histidine 282 in 5-aminolevulinate synthase affects substrate binding and catalysis // *Biochemistry* - 2007. - Vol. 46, № 20. - P. 5972–81.
103. Matsuda N., Hayashi H., Miyatake S., Kuroiwa T., Kagamiyama H., Instability of the apo form of aromatic L-amino acid decarboxylase in vivo and *in vitro*: implications for the involvement of the flexible loop that covers the active site // *J. Biochem.* - 2004. - Vol. 135, № 1. - P. 33–42.
104. Montioli R., Zamparelli C., Borri Voltattorni C., Cellini B., Oligomeric state and thermal stability of apo- and holo- human ornithine δ -aminotransferase // *Protein J.* - 2017. - Vol. 36, № 3. - P. 174–185.
105. Börner T., Rämisch S., Reddem E.R., Bartsch S., Vogel A., Thunnissen A.M.W.H., Adlercreutz P., Grey C., Explaining operational instability of amine transaminases: substrate-induced inactivation mechanism and influence of quaternary structure on enzyme-cofactor intermediate stability // *ACS Catal.* - 2017. - Vol. 7, № 2. - P. 1259–1269.
106. Börner T., Rämisch S., Bartsch S., Vogel A., Adlercreutz P., Grey C., Three in One: Temperature, Solvent and Catalytic Stability by Engineering the Cofactor-Binding Element of Amine Transaminase // *ChemBioChem* - 2017. - Vol. 18, № 15. - P. 1482–1486.
107. Cellini B., Montioli R., Paiardini A., Lorenzetto A., Maset F., Bellini T., Oppici E., Voltattorni C.B., Molecular defects of the glycine 41 variants of alanine glyoxylate aminotransferase associated with primary hyperoxaluria type I // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2010. - Vol. 107, № 7. - P. 2896–2901.
108. Chen S., Campillo-Brocal J.C., Berglund P., Humble M.S., Characterization of the stability of *Vibrio fluvialis* JS17 amine transaminase // *J. Biotechnol.* - 2018. - Vol. 282. - P. 10–17.
109. Merz L.M., Langen L.M. van, Berglund P., The Role of Buffer, Pyridoxal 5'-phosphate and light on the stability of the *Silicibacter pomeroyi* transaminase // *ChemCatChem* - 2023. - Vol. 15, № 2.
110. Kobayashi J., Shimizu Y., Mutaguchi Y., Doi K., Ohshima T., Characterization of D-amino acid aminotransferase from *Lactobacillus salivarius* // *J. Mol. Catal. B Enzym.* - 2013. - Vol. 94. - P. 15–22.
111. Lee S.-G., Hong S.-P., Song J.J., Kim S.-J., Kwak M.-S., Sung M.-H., Functional and structural characterization of thermostable D-amino acid aminotransferases from *Geobacillus* spp. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2006. - Vol. 72, № 2. - P. 1588–94.
112. Gu X., Zhao J., Chen L., Li Y., Yu B., Tian X., Min Z., Xu S., Gu H., Sun J., Lu X., Chang M., Wang X., Zhao L., Ye S., Yang H., Tian Y., Gao F., Gai Y., Jia G., Wu J., Wang Y., Zhang J., Zhang X., Liu W., Gu X., Luo X., Dong H., Wang H., Schenkel B., Venturoni F., Filipponi P., Guelat B., Allmendinger T., Wietfeld B., Hoehn P., Kovacic N., Hermann L., Schlama T., Ruch T., Derrien N., Piechon P., Kleinbeck F., Application of transition-metal catalysis, biocatalysis, and flow chemistry as state-of-the-art technologies in the synthesis of LCZ696 // *J. Org. Chem.* - 2020. - Vol. 85, № 11. - P.

6844–6853.

113. Savile C.K., Janey J.M., Mundorff E.C., Moore J.C., Tam S., Jarvis W.R., Colbeck J.C., Krebber A., Fleitz F.J., Brands J., Devine P.N., Huisman G.W., Hughes G.J., Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture // *Science*. - 2010. - Vol. 329, № 5989. - P. 305–309.

114. Humble M.S., Cassimjee K.E., Håkansson M., Kimbung Y.R., Walse B., Abedi V., Federsel H.J., Berglund P., Logan D.T., Crystal structures of the *Chromobacterium violaceum* ω -transaminase reveal major structural rearrangements upon binding of coenzyme PLP // *FEBS J.* - 2012. - Vol. 279, № 5. - P. 779–792.

115. Shin Y.C., Yun H., Park H.H., Structural dynamics of the transaminase active site revealed by the crystal structure of a co-factor free omega-transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 // *Sci. Rep.* - 2018. - Vol. 8, № 1. - P. 1–9.

116. Ruggieri F., Campillo-Brocal J.C., Chen S., Humble M.S., Walse B., Logan D.T., Berglund P., Insight into the dimer dissociation process of the *Chromobacterium violaceum* (S)-selective amine transaminase // *Sci. Rep.* - 2019. - Vol. 9, № 1. - P. 16946.

117. Chen S., Berglund P., Humble M.S., The effect of phosphate group binding cup coordination on the stability of the amine transaminase from *Chromobacterium violaceum* // *Mol. Catal.* - 2018. - Vol. 446, - P. 115–123.

118. Okada K., Hirotsu K., Hayashi H., Kagamiyama H., Structures of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase and its complexes with 4-methylvalerate and 2-methylleucine: Induced fit and substrate recognition of the enzyme // *Biochemistry* - 2001. - Vol. 40, № 25. - P. 7453–7463.

119. Sugio S., Petsko G.A., Manning J.M., Soda K., Ringe D., Crystal structure of a D-amino acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity // *Biochemistry* - 1995. - Vol. 34, № 30. - P. 9661–9.

120. Thomsen M., Skalden L., Palm G.J., Höhne M., Bornscheuer U.T., Hinrichs W., Crystallographic characterization of the (R)-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus* // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2014. - Vol. 70, № 4. - P. 1086–1093.

121. Höhne M., Schätzle S., Jochens H., Robins K., Bornscheuer U.T., Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification // *Nat. Chem. Biol.* - 2010. - Vol. 6, № 11. - P. 807–813.

122. Jiang J., Chen X., Zhang D., Wu Q., Zhu D., Characterization of (R)-selective amine transaminases identified by *in silico* motif sequence blast. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2015. - Vol. 99, № 6. - P. 2613–21.

123. Slabu I., Galman J.L., Lloyd R.C., Turner N.J., Discovery , engineering , and synthetic application

of transaminase biocatalysts // ACS Catal. - 2017. - Vol. 7. - P. 8263–8284.

124. Bezsudnova E.Y., Stekhanova T.N., Suplatov D.A., Mardanov A. V., Ravin N. V., Popov V.O., Experimental and computational studies on the unusual substrate specificity of branched-chain amino acid aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* // Arch. Biochem. Biophys. - 2016. - Vol. 607. - P. 27–36.

125. Stekhanova T.N., Rakitin A.L., Mardanov A. V, Bezsudnova E.Y., Popov V.O., A novel highly thermostable branched-chain amino acid aminotransferase from the crenarchaeon *Vulcanisaeta moutnovskia* // Enzyme Microb. Technol. - 2017. - Vol. 96, - P. 127–134.

126. Zeifman Y.S., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., Timofeev V.I., Rakitina T. V., Popov V.O., Bezsudnova E.Y., Functional characterization of PLP fold type IV transaminase with a mixed type of activity from *Haliangium ochraceum* // Biochim. Biophys. acta. Proteins proteomics - 2019. - Vol. 1867, № 6. - P. 575–585.

127. Pavkov-Keller T., Strohmeier G.A., Diepold M., Peeters W., Smeets N., Schürmann M., Gruber K., Schwab H., Steiner K., Discovery and structural characterisation of new fold type IV-transaminases exemplify the diversity of this enzyme fold. // Sci. Rep. - 2016. - Vol. 6, № 1. - P. 1-12.

128. Shilova S.A., Matyuta I.O., Petrova E.S., Nikolaeva A.Y., Rakitina T. V., Minyaev M.E., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Y., Expanded substrate specificity in D-amino acid transaminases: a case Study of transaminase from *Blastococcus saxobsidens* // Int. J. Mol. Sci. - 2023. - Vol. 24, № 22. - P. 1-16.

129. Funakoshi M., Sekine M., Katane M., Furuchi T., Yohda M., Yoshikawa T., Homma H., Cloning and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* D-amino acid aminotransferase - D-aspartate behavior during germination // FEBS J. - 2008. - Vol. 275, № 6. - P. 1188–1200.

130. Ophem P.W. van, Peisach D., Erickson S.D., Soda K., Ringe D., Manning J.M., Effects of the E177K mutation in D-amino acid transaminase. Studies on an essential coenzyme anchoring group that contributes to stereochemical fidelity // Biochemistry - 1999. - Vol. 38, № 4. - P. 1323–31.

131. Radkov A.D., Moe L.A., Bacterial synthesis of D-amino acids. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2014. - Vol. 98, № 12. - P. 5363–74.

132. Khoronenkova S. V., Tishkov V.I., D-Amino acid oxidase: Physiological role and applications // Biochem. - 2008. - Vol. 73, № 13. - P. 1511–1518.

133. Errico F., Nisticò R., Giorgio A. Di, Squillace M., Vitucci D., Galbusera A., Piccinin S., Mango D., Fazio L., Middei S., Trizio S., Mercuri N.B., Teule M.A., Centonze D., Gozzi A., Blasi G., Bertolino A., Usiello A., Free D-aspartate regulates neuronal dendritic morphology, synaptic plasticity, gray matter volume and brain activity in mammals. // Transl. Psychiatry - 2014. - Vol. 4, № 7. - P. 1-9.

134. Chieffi Baccari G., Falvo S., Santillo A., Giacomo Russo F. Di, Fiore M.M. Di, D-Amino acids in

- mammalian endocrine tissues // *Amino Acids* - 2020. - Vol. 52, № 9. - P. 1263–1273.
135. Irukayama-Tomobe Y., Tanaka H., Yokomizo T., Hashidate-Yoshida T., Yanagisawa M., Sakurai T., Aromatic D-amino acids act as chemoattractant factors for human leukocytes through a G protein-coupled receptor, GPR109B // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2009. - Vol. 106, № 10. - P. 3930–3934.
136. Peisach D., Chipman D.M., Ophem P.W. Van, Manning J.M., Ringe D., D-Cycloserine inactivation of D-amino acid aminotransferase leads to a stable noncovalent protein complex with an aromatic cycloserine-PLP derivative // *J. Am. Chem. Soc.* - 1998. - Vol. 120, № 10. - P. 2268–2274.
137. Kishimoto K., Yoshimura T., Soda K., Esaki N., Mutation of arginine 98, which serves as a substrate-recognition site of D-amino acid aminotransferase, can be partly compensated for by mutation of tyrosine 88 to an arginyl residue // *J. Biochem* - 1997. - Vol. 122. - P. 1182–1189.
138. Ro H.S., Hong S.P., Seo H.J., Yoshimura T., Esaki N., Soda K., Kim H.S., Sung M.H., Site-directed mutagenesis of the amino acid residues in β -strand III [Val30-Val36] of D-amino acid aminotransferase of *Bacillus* sp. YM-1 // *FEBS Lett.* - 1996. - Vol. 398, № 2–3. - P. 141–145.
139. Ophem P.W. van, Pospischil M.A., Manning J.M., Ringe D., Peisach D., Petsko G., Soda K., Catalytic ability and stability of two recombinant mutants of D-amino acid transaminase involved in coenzyme binding // *Protein Sci.* - 1995. - Vol. 4, № 12. - P. 2578–2586.
140. Shilova S.A., Matyuta I.O., Khrenova M.G., Nikolaeva A.Y., Klyachko N.L., Minyaev M.E., Khomutov A.R., Boyko K.M., Popov V.O., Bezsudnova E.Y., In search for structural targets for engineering d-amino acid transaminase: modulation of pH optimum and substrate specificity // *Biochem. J.* - 2023. - Vol. 480, № 16. - P. 1267–1284.
141. Hirotsu K., Goto M., Okamoto A., Miyahara I., Dual substrate recognition of aminotransferases // *Chem. Rec.* - 2005. - Vol. 5, № 3. - P. 160–72.
142. Skalden L., Thomsen M., Höhne M., Bornscheuer U.T., Hinrichs W., Structural and biochemical characterization of the dual substrate recognition of the (*R*)-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus* // *FEBS J.* - 2015. - Vol. 282, № 2. - P. 407–15.
143. Guan L.J., Ohtsuka J., Okai M., Miyakawa T., Mase T., Zhi Y., Hou F., Ito N., Iwasaki A., Yasohara Y., Tanokura M., A new target region for changing the substrate specificity of amine transaminases // *Sci. Rep.* - 2015. - Vol. 5. - P. 1–8.
144. Voss M., Xiang C., Esque J., Nobili A., Menke M.J., André I., Höhne M., Bornscheuer U.T., Creation of (*R*)-amine transaminase activity within an α -amino acid transaminase scaffold // *ACS Chem. Biol.* - 2020. - Vol. 15, № 2. - P. 416–424.
145. Bezsudnova E.Y., Nikolaeva A.Y., Bakunova A.K., Rakitina T. V, Suplatov D.A., Popov V.O., Boyko K.M., Probing the role of the residues in the active site of the transaminase from *Thermobaculum terrenum* // *PLoS One* - 2021. - Vol. 16, № 7. - P. 1-18.

146. Fenn T.D., Stamper G.F., Morollo A.A., Ringe D., A side reaction of alanine racemase: transamination of cycloserine // *Biochemistry* - 2003. - Vol. 42, № 19. - P. 5775–83.
147. Amorim Franco T.M., Favrot L., Vergnolle O., Blanchard J.S., Mechanism-based inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* branched-chain aminotransferase by d- and l-cycloserine // *ACS Chem. Biol.* - 2017. - Vol. 12, № 5. - P. 1235–1244.
148. Dindo M., Grottelli S., Annunziato G., Giardina G., Pieroni M., Pampalone G., Faccini A., Cutruzzolà F., Laurino P., Costantino G., Cellini B., Cycloserine enantiomers are reversible inhibitors of human alanine:glyoxylate aminotransferase: implications for Primary Hyperoxaluria type 1. // *Biochem. J.* - 2019. - Vol. 476, № 24. - P. 3751–3768.
149. Malashkevich V.N., Strop P., Keller J.W., Jansonius J.N., Toney M.D., Crystal structures of dialkylglycine decarboxylase inhibitor complexes. // *J. Mol. Biol.* - 1999. - Vol. 294, № 1. - P. 193–200.
150. Caminero J.A., Sotgiu G., Zumla A., Migliori G.B., Best drug treatment for multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis // *Lancet. Infect. Dis.* - 2010. - Vol. 10, № 9. - P. 621–9.
151. Chiara C. de, Homšak M., Prosser G.A., Douglas H.L., Garza-Garcia A., Kelly G., Purkiss A.G., Tate E.W., Carvalho L.P.S. de, D-Cycloserine destruction by alanine racemase and the limit of irreversible inhibition // *Nat. Chem. Biol.* - 2020. - Vol. 16, № 6. - P. 686–694.
152. Priyadarshi A., Lee E.H., Sung M.W., Nam K.H., Lee W.H., Kim E.E., Hwang K.Y., Structural insights into the alanine racemase from *Enterococcus faecalis* // *Biochim. Biophys. Acta* - 2009. - Vol. 1794, № 7. - P. 1030–40.
153. Noda M., Matoba Y., Kumagai T., Sugiyama M., Structural evidence that alanine racemase from a D-cycloserine-producing microorganism exhibits resistance to its own product // *J. Biol. Chem.* - 2004. - Vol. 279, № 44. - P. 46153–61.
154. Wu D., Hu T., Zhang L., Chen J., Du J., Ding J., Jiang H., Shen X., Residues Asp164 and Glu165 at the substrate entryway function potently in substrate orientation of alanine racemase from *E. coli*: Enzymatic characterization with crystal structure analysis // *Protein Sci.* - 2008. - Vol. 17, № 6. - P. 1066–76.
155. Tassoni R., Aart L.T. van der, Ubbink M., Wezel G.P. van, Pannu N.S., Structural and functional characterization of the alanine racemase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2017. - Vol. 483, № 1. - P. 122–128.
156. Duff S.M.G., Rydel T.J., McClerren A.L., Zhang W., Li J.Y., Sturman E.J., Halls C., Chen S., Zeng J., Peng J., Kretzler C.N., Evdokimov A., The enzymology of alanine aminotransferase (AlaAT) isoforms from *Hordeum vulgare* and other organisms, and the HvAlaAT crystal structure // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2012. - Vol. 528, № 1. - P. 90–101.

157. Bharath S.R., Bisht S., Harijan R.K., Savithri H.S., Murthy M.R.N., Structural and mutational studies on substrate specificity and catalysis of *Salmonella typhimurium* D-cysteine desulphydrase // *PLoS One* - 2012. - Vol. 7, № 5. - P. 1-14.
158. Soper T.S., Manning J.M., Different modes of action of inhibitors of bacterial D-amino acid transaminase. A target enzyme for the design of new antibacterial agents // *J. Biol. Chem.* - 1981. - Vol. 256, № 9. - P. 4263–4268.
159. Wu S., Snajdrova R., Moore J.C., Baldenius K., Bornscheuer U.T., Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2021. - Vol. 60, № 1. - P. 88–119.
160. Yi D., Bayer T., Badenhorst C.P.S., Wu S., Doerr M., Höhne M., Bornscheuer U.T., Recent trends in biocatalysis // *Chem. Soc. Rev.* - 2021. - Vol. 50, № 14. - P. 8003–8049.
161. Winkler C.K., Schrittwieser J.H., Kroutil W., Power of biocatalysis for organic synthesis // *ACS Cent. Sci.* - 2021. - Vol. 7, № 1. - P. 55–71.
162. Heckmann C.M., Paradisi F., Looking Back: A Short history of the discovery of enzymes and how they became powerful chemical tools // *ChemCatChem* - 2020. - Vol. 12, № 24. - P. 6082–6102.
163. Alcántara A.R., Domínguez de María P., Littlechild J.A., Schürmann M., Sheldon R.A., Wohlgemuth R., Biocatalysis as key to sustainable industrial chemistry // *ChemSusChem* - 2022. - Vol. 15, № 9. - P. 1-11.
164. Ao Y., Pei S., Xiang C., Menke M.J., Shen L., Sun C., Dörr M., Born S., Höhne M., Bornscheuer U.T., Structure- and data-driven protein engineering of transaminases for improving activity and stereoselectivity // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2023. - Vol. 62, № 23. - P. 1-11.
165. Radley E., Davidson J., Foster J., Obexer R., Bell E.L., Green A.P., Engineering enzymes for environmental sustainability // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2023. - Vol. 21, № 62. -P. 1-14.
166. Blakemore D.C., Castro L., Churcher I., Rees D.C., Thomas A.W., Wilson D.M., Wood A., Organic synthesis provides opportunities to transform drug discovery // *Nat. Chem.* - 2018. - Vol. 10, № 4. - P. 383–394.
167. Zhang S., Pozo J. del, Romiti F., Mu Y., Torker S., Hoveyda A.H., Delayed catalyst function enables direct enantioselective conversion of nitriles to NH₂-amines // *Science.* - 2019. - Vol. 364, № 6435. - P. 45–51.
168. Tucker J.L., Green chemistry, a pharmaceutical perspective // *Org. Process Res. Dev.* - 2006. - Vol. 10, № 2. - P. 315–319.
169. Grogan G., Synthesis of chiral amines using redox biocatalysis // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2018. - Vol. 43. - P. 15–22.
170. Steinhuebel D., Sun Y., Matsumura K., Sayo N., Saito T., Direct asymmetric reductive amination // *J. Am. Chem. Soc.* - 2009. - Vol. 131, № 32. - P. 11316–11317.

171. Liu J., Kong W., Bai J., Li Y., Dong L., Zhou L., Liu Y., Gao J., Bradshaw Allen R.T., Turner N.J., Jiang Y., Amine dehydrogenases: Current status and potential value for chiral amine synthesis // *Chem Catal.* - 2022. - Vol. 2, № 6. - P. 1288–1314.
172. Ye L.J., Toh H.H., Yang Y., Adams J.P., Snajdrova R., Li Z., Engineering of amine dehydrogenase for asymmetric reductive amination of ketone by evolving *Rhodococcus* Phenylalanine Dehydrogenase // *ACS Catal.* - 2015. - Vol. 5, № 2. - P. 1119–1122.
173. Ditrich K., Optically active amines by enzyme-catalyzed kinetic resolution // *Synthesis (Stuttg.)*. - 2008. - Vol. 2008, № 14. - P. 2283–2287.
174. Schober M., MacDermaid C., Ollis A.A., Chang S., Khan D., Hosford J., Latham J., Ihnken L.A.F., Brown M.J.B., Fuerst D., Sanganee M.J., Roiban G.-D., Chiral synthesis of LSD1 inhibitor GSK2879552 enabled by directed evolution of an imine reductase // *Nat. Catal.* - 2019. - Vol. 2, № 10. - P. 909–915.
175. Lenz M., Borlinghaus N., Weinmann L., Nestl B.M., Recent advances in imine reductase-catalyzed reactions // *World J. Microbiol. Biotechnol.* - 2017. - Vol. 33, № 11. - P. 1-10.
176. Baud D., Tappertzhofen N., Moody T.S., Ward J.M., Hailes H.C., Stereoselective transaminase-mediated synthesis of serotonin and melatonin receptor agonists // *Adv. Synth. Catal.* - 2022. - Vol. 364, № 9. - P. 1564–1572.
177. Gomm A., O'Reilly E., Transaminases for chiral amine synthesis // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2018. - Vol. 43. - P. 106–112.
178. Mutti F.G., Fuchs C.S., Pressnitz D., Sattler J.H., Kroutil W., Stereoselectivity of four (*R*)-selective transaminases for the asymmetric amination of ketones // *Adva* - 2011. - Vol. 353, - P. 3227–3233.
179. Gavin D.P., Reen F.J., Woods D.F., Genome mining and characterisation of a novel transaminase with remote stereoselectivity // *Sci. Rep.* - 2019. - Vol. 9, - P. 20285.
180. Yu H., Biochemical and structural characterization of an (*R*)-selective transaminase in the asymmetric synthesis of chiral hydroxy amines // *Adv. Synth. Catal.* - 2021. - Vol. 363, - P. 4582–4589.
181. Madsen J.Ø., Woodley J.M., Considerations for the scale-up of *in vitro* transaminase-catalyzed asymmetric synthesis of chiral amines // *ChemCatChem* - 2023. - Vol. 15, № 13.
182. Kelly S.A., Mix S., Moody T.S., Gilmore B.F., Transaminases for industrial biocatalysis: novel enzyme discovery // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2020. - Vol. 104, № 11. - P. 4781–4794.
183. Rodrigues C.J.C., Ferrer M., Carvalho C.C.C.R. de, ω -Transaminase-mediated asymmetric synthesis of (*S*)-1-(4-trifluoromethylphenyl)ethylamine // *Catalysts* - 2021. - Vol. 11, № 3. - P. 1–13.
184. Bachosz K., Zdarta J., Bilal M., Meyer A.S., Jesionowski T., Enzymatic cofactor regeneration systems: A new perspective on efficiency assessment // *Sci. Total Environ.* - 2023. - Vol. 868. - P. 1-15.

185. Grishin N. V., Phillips M.A., Goldsmith E.J., Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases // *Protein Sci.* - 1995. - Vol. 4, № 7. - P. 1291–1304.
186. Krebs H.A., Equilibria in transamination systems // *Biochem. J.* - 1953. - Vol. 54, № 1. - P. 82–86.
187. Tewari Y.B., Kishore N., Goldberg R.N., Luong T.N., An equilibrium and calorimetric study of some transamination reactions // *J. Chem. Thermodyn.* - 1998. - Vol. 30, № 6. - P. 777–793.
188. Wei W, Bhatia, M.B., Lewis C M, Land W, Wang, A., and Matcham, G.W. Improvements in the enzymatic synthesis of chiral amines. (1999).
189. Tufvesson P., Bach C., Woodley J.M., A model to assess the feasibility of shifting reaction equilibrium by acetone removal in the transamination of ketones using 2-propylamine // *Biotechnol. Bioeng.* - 2014. - Vol. 111, № 2. - P. 309–319.
190. Marchini V., Benítez-Mateos A.I., Hutter S.L., Paradisi F., Fusion of formate dehydrogenase and alanine dehydrogenase as an amino donor regenerating system coupled to transaminases // *Chembiochem* - 2022. - Vol. 23, № 21. - P. 1-7.
191. Padrosa D.R., Nissar Z., Paradisi F., Efficient amino donor recycling in amination reactions: Development of a new alanine dehydrogenase in continuous flow and dialysis membrane reactors // *Catalysts* - 2021. - Vol. 11, № 4. - P. 1-13.
192. Schätzle S., Steffen-Munsberg F., Thontowi A., Höhne M., Robins K., Bornscheuer U.T., Enzymatic asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic, aromatic and arylaliphatic amines with (*R*)-selective amine transaminases // *Adv. Synth. Catal.* - 2011. - Vol. 353, № 13. - P. 2439–2445.
193. Zhou H., Meng L., Yin X., Liu Y., Xu G., Wu J., Wu M., Yang L., Artificial biocatalytic cascade with three enzymes in one pot for asymmetric synthesis of chiral unnatural amino acids // *European J. Org. Chem.* - 2019. - Vol. 2019, № 38. - P. 6470–6477.
194. Galkin A., Kulakova L., Yamamoto H., Tanizawa K., Tanaka H., Esaki N., Soda K., Conversion of α -keto acids to D-amino acids by coupling of four enzyme reactions // *J. Ferment. Bioeng.* - 1997. - Vol. 83, № 3. - P. 299–300.
195. Nobuyoshi N., Tanizawa K., Tanaka H., Soda K., Enantioselective synthesis of various D-amino acids by a multi-enzyme system // *J. Biotechnol.* - 1988. - Vol. 8, - P. 243–248.
196. Guo F., Berglund P., Transaminase biocatalysis: optimization and application // *Green Chem.* - 2017. - Vol. 19, № 2. - P. 333–360.
197. Patil M.D., Grogan G., Bommaris A., Yun H., Recent advances in ω -transaminase-mediated biocatalysis for the enantioselective synthesis of chiral amines // *Catalysts* - 2018. - Vol. 8, № 7. - P. 1-25.
198. Weiß M.S., Pavlidis I. V., Spurr P., Hanlon S.P., Wirz B., Iding H., Bornscheuer U.T., Amine

transaminase engineering for spatially bulky substrate acceptance // *ChemBioChem* - 2017. - Vol. 18, № 11. - P. 1022–1026.

199. Pagar A.D., Jeon H., Khobragade T.P., Sarak S., Giri P., Lim S., Yoo T.H., Ko B.J., Yun H., Non-canonical amino acid-based engineering of (*R*)-amine transaminase // *Front. Chem.* - 2022. - Vol. 10, № February. - P. 1–11.

200. Nobili A., Steffen-Munsberg F., Kohls H., Trentin I., Schulzke C., Höhne M., Bornscheuer U.T., Engineering the active site of the amine transaminase from *Vibrio fluvialis* for the asymmetric synthesis of aryl-alkyl amines and amino alcohols // *ChemCatChem* - 2015. - Vol. 7, № 5. - P. 757–760.

201. Martin A.R., DiSanto R., Plotnikov I., Kamat S., Shonnard D., Pannuri S., Improved activity and thermostability of (*S*)-aminotransferase by error-prone polymerase chain reaction for the production of a chiral amine // *Biochem. Eng. J.* - 2007. - Vol. 37, № 3. - P. 246–255.

202. Stirling, D.I., Zeitlin, A.L., and Matcham, G.W. Enantiomeric enrichment and stereoselective synthesis of chiral amines. *Arch. Biochem. Biophys.*, 103(9), 117–118. (1990).

203. Matcham G., Bhatia M., Lang W., Lewis C., Nelson R., Wang A., Wu W., Enzyme and reaction engineering in biocatalysis: synthesis of (*S*)-methoxyisopropylamine (= (*S*)-1-methoxypropan-2-amine) // *Chimia (Aarau)*. - 1999. - Vol. 53, № 12. - P. 584-9.

204. Novick S.J., Dellas N., Garcia R., Ching C., Bautista A., Homan D., Alvizo O., Entwistle D., Kleinbeck F., Schlama T., Ruch T., Engineering an amine transaminase for the efficient production of a chiral sacubitril precursor // *ACS Catal.* - 2021. - Vol. 11, № 6. - P. 3762–3770.

205. Molinaro C., Bulger P.G., Lee E.E., Kosjek B., Lau S., Gauvreau D., Howard M.E., Wallace D.J., O’Shea P.D., CRTH2 Antagonist MK-7246: Synthetic evolution from discovery through development // *J. Org. Chem.* - 2012. - Vol. 77. - P. 2299–2309.

206. Limanto J., Ashley E.R., Yin J., Beutner G.L., Grau B.T., Kassim A.M., Kim M.M., Klapars A., Liu Z., Strotman H.R., Truppo M.D., A highly efficient asymmetric synthesis of vernakalant // *Org. Lett.* - 2014. - Vol. 16, № 10. - P. 2716–2719.

207. Peng Z., Wong J.W., Hansen E.C., Puchlopek-Dermenci A.L.A., Clarke H.J., Development of a concise, asymmetric synthesis of a smoothened receptor (smo) inhibitor: Enzymatic transamination of a 4-piperidinone with dynamic kinetic resolution // *Org. Lett.* - 2014. - Vol. 16, № 3. - P. 860–863.

208. Mangion I.K., Sherry B.D., Yin J., Fleitz F.J., Enantioselective synthesis of a dual orexin receptor antagonist // *Org. Lett.* - 2012. - Vol. 14, № 13. - P. 3458–3461.

209. Kapil S., Sharma V., D-amino acids in antimicrobial peptides: A potential approach to treat and combat antimicrobial resistance // *Can. J. Microbiol.* - 2021. - Vol. 67, № 2. - P. 119–137.

210. Bastings J.J.A.J., Eijk H.M. van, Damink S.W.O., Rensen S.S., D-amino acids in health and disease: A focus on cancer // *Nutrients* - 2019. - Vol. 11, № 9. - P. 1–18.

211. Martínez-Rodríguez S., Martínez-Gómez A.I., Rodríguez-Vico F., Clemente-Jiménez J.M., Heras-Vázquez F.J. Las, Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: An overview // Chem. Biodivers. - 2010. - Vol. 7, № 6. - P. 1531–1548.
212. Pollegioni L., Rosini E., Molla G., Advances in Enzymatic Synthesis of D-Amino Acids // Int. J. Mol. Sci. - 2020. - Vol. 21, № 9. - P. 1-16.
213. Fan A., Li J., Yu Y., Zhang D., Nie Y., Xu Y., Enzymatic cascade systems for D-amino acid synthesis: progress and perspectives // Syst. Microbiol. Biomanufacturing - 2021. - Vol. 1, № 4. - P. 397–410.
214. Boyko K., Gorbacheva M., Rakitina T., Korzhenevskiy D., Vanyushkina A., Kamashev D., Lipkin A., Popov V., Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the histone-like HU protein from *Spiroplasma melliferum* KC3 // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun. - 2015. - Vol. 71, № 1. - P. 24–27.
215. Makarova O., Kamberov E., Margolis B., Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step // Biotechniques - 2000. - Vol. 29, № 5. - P. 970–2.
216. Mikhailova A.G., Rakitina T. V, Timofeev V.I., Karlinsky D.M., Korzhenevskiy D.A., Agapova Y.K., Vlaskina A. V, Ovchinnikova M. V, Gorlenko V.A., Rumsh L.D., Activity modulation of the oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans* by site-directed mutagenesis of amino acid residues surrounding catalytic triad histidine // Biochimie - 2017. - Vol. 139. - P. 125–136.
217. Daligault H., Lapidus A., Zeytun A., Nolan M., Lucas S., Rio T.G. Del, Tice H., Cheng J.-F., Tapia R., Han C., Goodwin L., Pitluck S., Liolios K., Pagani I., Ivanova N., Huntemann M., Mavromatis K., Mikhailova N., Pati A., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Brambilla E.-M., Rohde M., Verbarq S., Göker M., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.-P., Woyke T., Complete genome sequence of *Haliscomenobacter hydrossis* type strain (OT) // Stand. Genomic Sci. - 2011. - Vol. 4, № 3. - P. 352–360.
218. Chang Y.J., Pukall R., Saunders E., Lapidus A., Copeland A., Nolan M., Rio T.G. del, Lucas S., Chen F., Tice H., Cheng J.F., Han C., Detter J.C., Bruce D., Goodwin L., Pitluck S., Mikhailova N., Liolios K., Pati A., Ivanova N., Mavromatis K., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Jeffries C.D., Brettin T., Rohde M., Göker M., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.P., Complete genome sequence of *Acidaminococcus fermentans* type strain (VR4 T) // Stand. Genomic Sci. - 2010. - Vol. 3, № 1. - P. 1–14.
219. Morrison J.F., Walsh C.T., The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. - 1988. - Vol. 61. - P. 201–301.
220. Chowdhury G., Dostalek M., Hsu E.L., Nguyen L.P., Stec D.F., Bradfield C.A., Guengerich F.P., Structural identification of diindole agonists of the aryl hydrocarbon receptor derived from degradation

- of indole-3-pyruvic acid // Chem. Res. Toxicol. - 2009. - Vol. 22, № 12. - P. 1905–1912.
221. Oxford Diffraction /Agilent Technologies UK CrysAlisPRO. Yarnton, England 2013.
222. Evans P., Scaling and assessment of data quality // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2006. - Vol. 62, № 1. - P. 72–82.
223. Kabsch W., XDS. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2010. - Vol. 66, № Pt 2. - P. 125–32.
224. Vagin A.A., Isupov M.N., Spherically averaged phased translation function and its application to the search for molecules and fragments in electron-density maps // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2001. - Vol. 57, № 10. - P. 1451–1456.
225. Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D., Dodson E.J., Emsley P., Evans P.R., Keegan R.M., Krissinel E.B., Leslie A.G.W., McCoy A., McNicholas S.J., Murshudov G.N., Pannu N.S., Potterton E.A., Powell H.R., Read R.J., Vagin A., Wilson K.S., Overview of the CCP4 suite and current developments // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2011. - Vol. 67, № 4. - P. 235–242.
226. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K., Features and development of Coot // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2010. - Vol. 66, № 4. - P. 486–501.
227. Krissinel E., Henrick K., Inference of macromolecular assemblies from crystalline state // J. Mol. Biol. - 2007. - Vol. 372, № 3. - P. 774–797.
228. Krissinel E., Henrick K., Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2004. - Vol. 60, № 12. - P. 2256–2268.
229. Haynes, W. M. Handbook of Chemistry and Physics. CRC Press: New York, NY, USA: 2015.
230. Oue S., Okamoto A., Nakai Y., Nakahira M., Shibatan T., Hayashi H., Kagamiyama H., *Paracoccus denitrificans* aromatic amino acid aminotransferase: a model enzyme for the study of dual substrate recognition mechanism // J. Biochem. - 1997. - Vol. 121, № 1. - P. 161–171.
231. Yennawar N.H., Islam M.M., Conway M., Wallin R., Hutson S.M., Human mitochondrial branched chain aminotransferase isozyme: structural role of the CXXC center in catalysis // J. Biol. Chem. - 2006. - Vol. 281, № 51. - P. 39660–71.
232. Sun S., Bagdassarian C.K., Toney M.D., Pre-steady-state kinetic analysis of the reactions of alternate substrates with dialkylglycine decarboxylase // Biochemistry - 1998. - Vol. 37, № 11. - P. 3876–85.
233. Uchida Y., Hayashi H., Washio T., Yamasaki R., Kato S., Oikawa T., Cloning and characterization of a novel fold-type I branched-chain amino acid aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus* sp. CKU-1. // Extremophiles - 2014. - Vol. 18, № 3. - P. 589–602.
234. Yagi T., Misono H., Yoshimura T., Soda K., Characterization of the half and overall reactions

- catalyzed by L-lysine:2-oxoglutarate 6-aminotransferase // J. Biochem. - 1991. - Vol. 65, - P. 61–65.
235. Telzerow A., Paris J., Håkansson M., González-Sabín J., Ríos-Lombardía N., Schürmann M., Gröger H., Morís F., Kourist R., Schwab H., Steiner K., Amine transaminase from *Exophiala xenobiotica*—crystal structure and engineering of a fold IV transaminase that naturally converts biaryl ketones // ACS Catal. - 2019. - Vol. 9, № 2. - P. 1140–1148.
236. Marković-Housley Z., Schirmer T., Hohenester E., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Karpeisky M.Y., Sandmeier E., Christen P., Jansonius J.N., Crystal structures and solution studies of oxime adducts of mitochondrial aspartate aminotransferase // Eur. J. Biochem. - 1996. - Vol. 236, № 3. - P. 1025–32.
237. Doeker M., Hüttche V., Jupke A., Reactive extraction for the recovery of primary amines from aqueous streams // Sep. Purif. Technol. - 2021. - Vol. 277. - P. 118229.
238. Vijay D., Zipse H., Sastry G.N., On the cooperativity of cation- π and hydrogen bonding interactions // J. Phys. Chem. B - 2008. - Vol. 112, № 30. - P. 8863–8867.
239. Beeler T., Churchich J.E., Reactivity of the phosphopyridoxal groups of cystathionase // J. Biol. Chem. - 1976. - Vol. 251, № 17. - P. 5267–71.
240. Delbaere L.T.J., Kallen J., Markovic-Housley Z., Khomutov A.R., Khomutov R.M., Karpeisky M.Y., Jansonius J.N., Complexes of aspartate aminotransferase with hydroxylamine derivatives: spectral studies in solution and in the crystalline state // Biochimie - 1989. - Vol. 71, № 4. - P. 449–59.