

Федеральное государственное учреждение «Федеральный Исследовательский Центр
«Фундаментальные Основы Биотехнологии» Российской Академии Наук»
Институт Биохимии имени А.Н. Баха

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»
Химический факультет
Кафедра химической энзимологии

На правах рукописи

Шилова Софья Александровна

**Особенности организации активного центра неканонической
трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense***

1.5.4 Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:
д.х.н. Безсуднова Екатерина Юрьевна
д.х.н., проф. Клячко Наталья Львовна

Москва – 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Общие сведения о трансаминазах	11
1.2. Трансаминазы IV типа укладки PLP-связывающего домена	15
1.3. Трансаминазы D-аминокислот (ДААТ)	21
1.4. Биокатализ и применение трансаминаз	26
1.4.1. Ферменты и биокатализ	26
1.4.2. Трансаминазы как биокатализаторы	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	36
2.1. Материалы и реактивы	36
2.2. Основные методы работы с ДНК и бактериальными клетками	37
2.2.1. Электрофорез ДНК	37
2.2.2. Определение концентрации ДНК	37
2.2.3. Рестрикция плазмидных ДНК	37
2.2.4. Выделение ДНК-фрагментов из агарозного геля	37
2.2.5. Лигирование фрагментов ДНК	38
2.2.6. Приготовление компетентных клеток <i>E. coli</i>	38
2.2.7. Трансформация клеток <i>E. coli</i>	38
2.2.8. Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>E. coli</i>	39
2.2.9. Сайт-направленный мутагенез	39
2.2.10. Проверочный ПЦР на колониях клеток <i>E. coli</i>	39
2.3. Основные методы анализа белков	40
2.3.1. Электрофорез белков в денатурирующих условиях	40
2.3.2. Определение концентрации белков	41
2.3.3. Спектральный анализ	41
2.4. Получение рекомбинантных форм ферментов	41
2.4.1. Клонирование генов ферментов	41
2.4.2. Создание вариантов AmicoTA	42
2.4.3. Препаративная экспрессия генов ферментов	43
2.4.4. Выделение и очистка рекомбинантных форм ферментов	43
2.5. Анализ функциональных свойств AmicoTA и вариантов	45
2.5.1. Определение активности трансаминаз	45
2.5.2. Определение рН- и температурных профилей	47
2.5.3. Определение термостабильности трансаминаз	48
2.5.5. Анализ «утечки» PLP из активного центра и встраивания PLP в активный центр	49
2.5.6. Определение выходов и энантиомерных избытков продуктов синтеза D-аминокислот	49
2.6. Рентгеноструктурный анализ	51
2.6.1. Получение кристаллов AmicoTA и вариантов	51
2.6.2. Сбор и обработка дифракционных данных. Уточнение структур AmicoTA и вариантов	52
2.6.3. Анализ полученных структур	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ	56
3.1. Получение рекомбинантной формы AmicoTA	56
3.2. Функциональная характеристика AmicoTA	57
3.2.1. Спектр аминокислот AmicoTA	57
3.2.2. Зависимость активности AmicoTA от рН и температуры	58

3.2.3.	Кинетические параметры реакций трансаминирования, катализируемых AmicoTA	59
3.2.4.	Спектры PLP-формы AmicoTA при различных pH.....	60
3.2.5.	Термостабильность AmicoTA	61
3.2.6.	«Утечка» PLP из активного центра AmicoTA.....	62
3.2.7.	Взаимодействие AmicoTA с аналогами субстратов – обратимыми ингибиторами	63
3.3.	Структура AmicoTA.....	65
3.3.1.	Структура функционального димера AmicoTA.....	65
3.3.2.	Организация активного центра AmicoTA	67
3.3.3.	Структура комплексов AmicoTA с субстратами и ингибиторами.....	70
3.4.	Варианты AmicoTA и их свойства	76
3.4.1.	Выбор аминокислотных замен в последовательности AmicoTA.....	76
3.4.2.	Функциональная характеристика вариантов AmicoTA	76
3.4.3.	Структурный анализ вариантов AmicoTA.....	81
3.5.	Множественное структурное выравнивание DAAT	85
3.6.	Синтез D-аминокислот, катализируемый AmicoTA.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		93
ВЫВОДЫ.....		95
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ		96
ПРИЛОЖЕНИЕ.....		97
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....		99

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ААТ – аспаратаминотрансфераза из *Escherichia coli*
- АДГ – аланиндегидрогеназа
- а.о. – аминокислотный остаток
- 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
- ЛДГ – лактатдегидрогеназа из мышц кролика
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РСА – рентгеноструктурный анализ
- ТА – трансминаза
- ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
- Трис – 2-амино-2-гидроксиметилпропан-1,3-диол
- ТФА – трифторуксусная кислота
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота
- AmicoTA – трансминаза D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense*
- atDAAT – трансминаза D-аминокислот из *Arabidopsis thaliana*
- BCAT – трансминаза разветвленных L-аминокислот
- bsDAAT – трансминаза D-аминокислот из *Bacillus* sp. YM-1
- bsphDAAT – трансминаза D-аминокислот из *Bacillus sphaericus*
- btDAAT – трансминаза D-аминокислот из *Burkholderia thailandensis*
- CHES – N-циклогексил-2-аминоэтансульфоновая кислота
- CpuTA – трансминаза *Curtobacterium pusillum*
- DAAT – трансминаза D-аминокислот
- eBCAT – трансминаза разветвленных L-аминокислот из *Escherichia coli*
- Halhy – трансминаза D-аминокислот из *Haliscomenbacter hydrossis*
- HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

IsDAAT – трансаминаза D-аминокислот из *Lactobacillus salivarius*
MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
MOPS – 3-(N-морфолино)-пропансульфоновая кислота
Ms – метансульфонил
mtDAAT – трансаминаза D-аминокислот из *Mycobacterium tuberculosis*
NAD – никотинамидадениндинуклеотид
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 ((R)-(+)-1-phenylethylamine)
RMSD – среднеквадратичное отклонение положений атомов
SK1DAAT – трансаминаза D-аминокислот из *Geobacillus toebii* SK1
T_{0,5} – температура полуперехода между нативным и денатурированным состоянием белка
Ts – п-толуолсульфонил
TEV-протеаза – протеаза вируса гравировки табака (*Tobacco Etch Virus*)
WT – дикий тип

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования. В настоящее время в биотехнологии все более широко внедряются схемы получения оптически чистых органических соединений с включением реакций, катализируемых природными и модифицированными ферментами. По мере углубления наших знаний в области энзимологии, биохимии и биоинженерии ферментативный катализ становится эффективным конкурентом и экологичной альтернативой металлокатализу и органическому синтезу. Разработка схем биотехнологических процессов, выбор биокатализатора и оптимизация фермента под определенные условия синтеза требуют понимания механизмов ферментативных реакций и детальных структурно-функциональных характеристик ферментов. Кроме того, ограниченное число изученных ферментов и недостаточное понимание взаимосвязи их структуры и функции сдерживает внедрение ферментативного катализа в производство, поэтому поиск и характеристика новых ферментов остаются актуальными задачами как для расширения наших фундаментальных знаний в области биохимии, так и для разработки биокаталитических технологий.

Пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые трансаминазы IV типа укладки PLP-связывающего домена являются биотехнологически значимыми ферментами (*R*)-стереоселективного аминирования органических соединений, они превращают прохиральные кетосоединения в оптически чистые амины и аминокислоты. Однако трансаминазы как биокатализаторы обладают рядом ограничений, среди которых узкая субстратная специфичность, ингибирование продуктом реакции и диссоциация холофермента на кофактор и апофермент. Поэтому исследование природного разнообразия трансаминаз, особенностей организации их активного центра и механизмов связывания субстратов не только углубляет наше понимание взаимосвязи *последовательность-структура-функция* в трансаминазах и, в целом, в ферментах, но и создает подходы для эффективной оптимизации ферментов-биокатализаторов для стереоселективного аминирования. Среди трансаминаз IV типа PLP-укладки выделяют семейство трансаминаз D-аминокислот, которые катализируют стереоселективный перенос аминогруппы с D-аминокислоты на α -кетокислоту с образованием новых D-аминокислоты и α -кетокислоты. Охарактеризованных на сегодня природных трансаминаз D-аминокислот немного и все они гомологи со сходной организацией активного центра. Очевидное из анализа метагеномных библиотек и аннотированных геномов биоразнообразие трансаминаз IV типа PLP-укладки указывает на малую изученность этого

суперсемейства и на перспективы результативного поиска новых трансаминаз D-аминокислот с отличной от известной организацией активного центра. Таким образом, поиск и анализ новых трансаминаз D-аминокислот является актуальным исследованием как для целей углубления нашего понимания взаимосвязи структуры и функции ферментов, так и для разработки эффективных подходов к изменению субстратной специфичности трансаминаз для целей биотехнологии.

Цель работы и основные задачи исследования.

Цель работы – установление структурных основ субстратной специфичности трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense* (AmicoTA).

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получение рекомбинантной формы AmicoTA.
2. Функциональная характеристика AmicoTA различными спектральными и кинетическими методами.
3. Получение и анализ пространственной структуры трансаминазы.
4. Получение вариантов AmicoTA с заменами аминокислотных остатков в активном центре и структурно-функциональная характеристика вариантов.
5. Тестирование AmicoTA в синтезе оптически чистых D-аминокислот.

Научная новизна. Поиск новых трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена выявил в геноме бактерии *Aminobacterium colombiense* последовательность новой трансаминазы (GenBank код: WP_013049219) с отличным от известных к настоящему моменту у трансаминаз IV типа PLP-укладки составом аминокислотных остатков в активном центре. Проведенная структурно-функциональная характеристика новой трансаминазы позволила отнести ее к трансаминазам D-аминокислот с неканонической организацией активного центра. В данной работе в результате рентгеноструктурного анализа впервые получена структура комплекса трансаминазы D-аминокислот со специфическим субстратом D-глутаматом (PDB код: 8AYK), а также с нециклической формой ингибитора D-циклосерина (PDB код: 8AIE).

Теоретическая и практическая значимость работы. В результате проведенных исследований установлен молекулярный механизм узнавания субстратов у неканонической трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense*, этот механизм можно считать

универсальным для группы неканонических PLP-зависимых трансаминаз D-аминокислот. Показана возможность применения новой трансаминазы для получения оптически чистых D-аминокислот. Получен вариант фермента с активностью в диапазоне pH 4,5-6,0, что открывает возможности разработки ферментативного стереоселективного аминирования не только в слабо-щелочных, но и в кислых средах. По результатам исследований в банк данных белковых структур (Protein Data Bank) депонированы семь структур (PDB коды 8AHR, 8ONJ, 8ONL, 8AYK, 8AIE, 8AYJ, 8ONN).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Специфическое связывание субстратов и высокая стереоселективность трансаминирования наблюдается у трансаминазы D-аминокислот с неканонической организацией активного центра.
2. Аминокислотные остатки активного центра трансаминазы D-аминокислот из *A. colombiense* задействованы не только в связывании субстратов и катализе, но и отвечают за поддержание рабочей конформации активного центра и за стабильность функционального димера.
3. Функционирование трансаминазы D-аминокислот из *A. colombiense* при кислых значениях pH достигается в результате одной аминокислотной замены в активном центре фермента K237A.
4. Трансаминаза D-аминокислот из *A. colombiense* эффективна в стереоселективном синтезе D-аминокислот.

Методология и методы исследования. В рамках данной работы использованы следующие методы и подходы: биоинформатика (построение множественных выравниваний белковых структур и последовательностей, подбор праймеров, оптимизация генов для экспрессии в *Escherichia coli*); методы генетической инженерии (полимеразная цепная реакция, рестрикция, лигирование, выделение фрагментов ДНК и плазмид); методы молекулярной биологии (трансформация, экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli*, разрушение клеток *E. coli*, электрофорез ДНК в агарозном геле, белковый денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле); хроматографические методы (аффинная, гель-проникающая, анионообменная и обращенно-фазовая хроматографии); спектральные методы (спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, круговой дихроизм); кинетические методы;

методы кристаллизации белков, рентгеноструктурный анализ и методы визуального анализа структур.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов, представленных в работе, обеспечена использованием современных методов исследования, проведением независимых экспериментов с использованием положительных и отрицательных контролей, и подтверждается их воспроизводимостью. Все эксперименты проведены на сертифицированном оборудовании в трех и более повторах. Полученные данные проанализированы с использованием современных методов статистической обработки. Результаты работы были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных **конференциях** (Современная химическая физика – на стыке физики, химии и биологии в Черногловке в 2021 году; 13th BGRS/SB в Новосибирске в 2022 году; 5th EurasianBioChem в Анкаре (Турция) 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) и на III Объединенном научном **форуме** физиологов, биохимиков и молекулярных биологов в Сочи-Дагомысе в 2021 году.

Публикации. По теме научной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 6 тезисов докладов на международных и российских научных конференциях.

Личный вклад автора. Во всех опубликованных работах вклад автора является определяющим. Автор принимал активное участие в постановке научных задач, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных результатов и их представлении. Кристаллизация ферментных препаратов [публикации 1, 3, 4] проведена совместно с А.Ю. Николаевой (НИЦ «Курчатовский институт»). Рентгеноструктурный анализ [публикации 1, 3, 4] проведен совместно с К.М. Бойко (к.б.н., ФИЦ Биотехнологии РАН) и И.О. Матютой (ФИЦ Биотехнологии РАН). Автор благодарит Т.В. Ракитину (Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН) за создание и предоставление векторной конструкции рЕТ-21d-HisTEV. Автором была проведена значительная работа над текстом статей. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя является определяющей.

Связь работы с государственными программами. Представленная работа выполнена при поддержке грантом Российского Научного Фонда (РНФ) № 19-14-00164

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 113 страницах и содержит 36 рисунков, 20 таблиц, 2 приложения и 199 ссылок.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о трансаминазах

Трансаминазы (ТА, аминотрансферазы, КФ 2.6.1) это пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты, катализирующие стереоселективный перенос аминогруппы с аминодонора (аминокислота или амин) на aminoакцептор (кетокислота, альдегид или кетон) с образованием хиральной аминокислоты/амин и нового кетосоединения (Рисунок 1). Полная реакция трансаминирования протекает по механизму «пинг-понг» и является суммой двух последовательных полуреакций: (1) дезаминирование аминодонора с образованием кетопродукта и (2) аминирование aminoакцептора (кетосубстрата) с образованием аминопродукта [1,2].

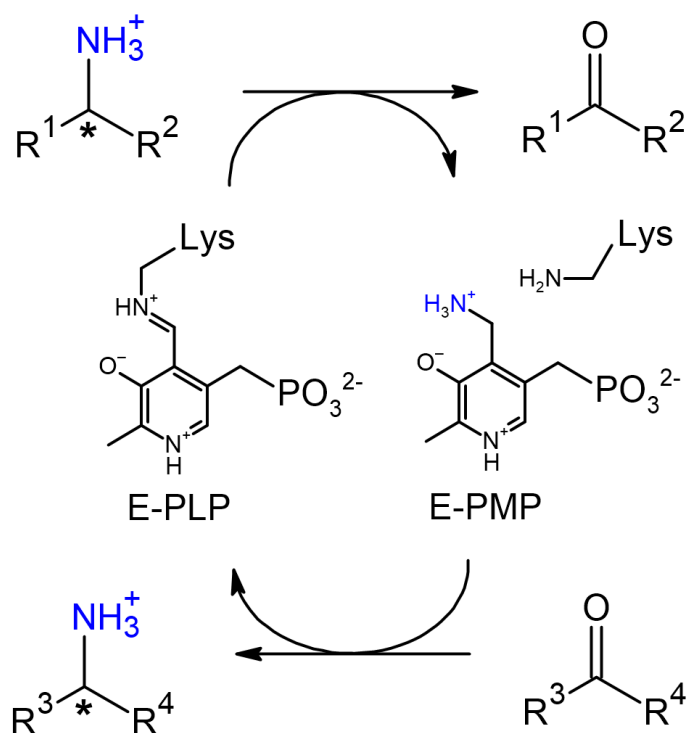


Рисунок 1. Полная реакция трансаминирования.

Кофактор PLP, ковалентно связанный с каталитическим лизином через иминную связь (основание Шиффа), выполняет роль переносчика аминогруппы между субстратами. Каждый каталитический оборот заканчивается регенерацией PLP-формы кофактора. На сегодня охарактеризованы как (*S*)-, так и (*R*)-стереоспецифичные трансаминазы [3–8]. По субстратной специфичности выделяют α -трансаминазы (аминогруппа субстрата/продукта расположена в

α -положении к карбоксильной группе (α -аминокислоты)) и ω -трансаминазы (аминогруппа субстрата/продукта удалена от карбоксильной группы (β -, γ -аминокислоты и т.д.) или карбоксильная группа отсутствует (амины)) [3,9].

Ферментативное трансаминирование было открыто в конце 1930-х годов советским ученым Александром Евсеевичем Браунштейном и его сотрудниками в институте экспериментальной медицины имени А.М. Горького в Москве [10,11]. Исследования лаборатории проф. Браунштейна [1,10–12], проф. Снела (Snell, США) [13–15], проф. Кирша (Kirsch, США) [2,16–18] [53,69–71], проф. Фазеллы (Fasella, Италия) [19–21], проф. Хаяши (Hayashi, Япония) [22–25], проф. Тони (Toney, США) [26–30], а также получение первой структуры аспаратаминотрансферазы в лаборатории проф. Браунштейна [31] привели к созданию стройной теории пиридоксалевого катализа и установлению основных стадий реакции трансаминирования.

Трансаминазы относятся к многочисленному классу PLP-зависимых ферментов, который по типу трехмерной укладки PLP-связывающего домена (PLP-укладка) разделяется на семь суперсемейств (I–VII) [3,9]. Трансаминазы принадлежат к суперсемействам I и IV типа укладки. Трансаминазы I типа (суперсемейство аспаратаминотрансфераз) представляют самое обширное и разнообразное по типу субстратов суперсемейство PLP-зависимых ферментов, но проявляют исключительно (*S*)-стереоспецифичность [3,9]. Трансаминазы IV типа (суперсемейство D-аланинтрансаминаз) проявляют (*S*)- и (*R*)-стереоспецифичность и включают три семейства: трансаминазы разветвленных L-аминокислот (branched-chain L-amino acid aminotransferase, BCAT, КФ 2.6.1.46), трансаминазы D-аминокислот (D-amino acid aminotransferase, DAAT, КФ 2.6.1.21) и (*R*)-селективные аминтрансаминазы (R-ATA, КФ 2.6.1.B21) [3,32].

Структурно трансаминазы обоих типов укладки являются α/β глобулярными белками (Рисунок 2 А, Б) [3,32]. Их функциональной единицей является гомодимер с двумя симметричными активными центрами, образованными аминокислотными остатками обеих субъединиц. В активном центре холоформы кофактор PLP образует ковалентную связь с каталитическим лизином (Рисунок 2 В). Помимо общей структуры PLP-связывающего домена, принципиальным отличием между трансаминазами I и IV типа является положение кофактора PLP. В трансаминазах I типа он обращен *si*-стороной к белковой глобуле, а *re*-стороной – ко входу в активный центр, тогда как в трансаминазах IV типа наоборот,

re-стороной – к белковой глобуле, а *si*-стороной – ко входу в активный центр (Рисунок 2 В) [3]. Для определения положения остатков относительно кофактора активный центр условно разделяют на два кармана – О-карман со стороны гидроксильной группы кофактора и Р-карман со стороны его фосфатной группы. Несмотря на различия общей структуры принципы координации кофактора в обоих типах трансаминаз схожи: полярные аминокислотные остатки связывают фосфатную группу, гидроксильную группу и N1 атом (Рисунок 3); пиридиновое кольцо ограничено боковой группой гидрофобного остатка с одной стороны и атомами основной цепи петли или β -поворота с другой стороны [32,33].

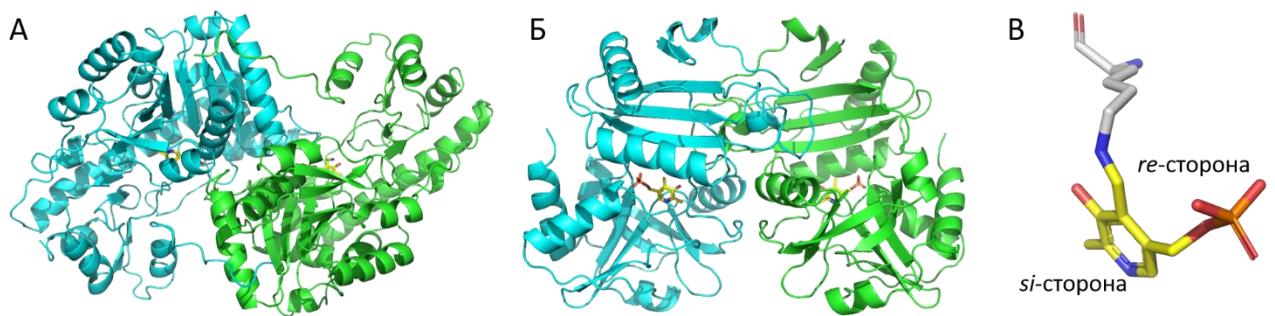


Рисунок 2. Структуры трансаминаз. Функциональные димеры (А) аспартатаминотрансферазы из *E. coli* (PDB код: 1AMQ) и (Б) трансаминазы D-аминокислот из *Bacillus* sp. YM-1 (PDB код: 1DAA). (В) Молекула PLP, ковалентно связанная с остатком каталитического лизина (внутренний альдимин).

Наиболее подробно механизм реакции трансаминирования изучен на примере аспартатаминотрансферазы из *E. coli* (ААТ, трансаминаза I типа PLP-укладки) [16,18,21,24–27,34] и считается универсальным для других трансаминаз, в том числе для трансаминаз IV типа. На рисунке 3 представлена схема первой полуреакции трансаминирования. В исходной холоформе трансаминазы кофактор PLP ковалентно связан с ϵ -аминогруппой каталитического лизина через основание Шиффа и образует так называемый внутренний альдимин. В такой форме C4'-атом кофактора при образовавшейся иминной группе ($R_2C=NH_2^+$) более электрофилен, чем при альдегидной группе ($R_2C=O$) исходной молекулы PLP. После образования комплекса Михаэлиса между ферментом и субстратом происходит нуклеофильное замещение ϵ -аминогруппы каталитического лизина аминогруппой аминокислоты (амин/аминокислота) с образованием внешнего альдимина. Далее протекает стереоспецифичный перенос протона с C α -атома на C4'-атом, так называемый 1,3-перенос протона, через образование нестабильного хиноидного промежуточного соединения с образованием кетимина. Эта стадия катализируется по механизму общесосновного катализа

ϵ -аминогруппой каталитического лизина [16]. В трансминазах I типа укладки 1,3-пернос протона происходит на *si*-стороне кофактора, тогда как в трансминазах IV типа – на *re*-стороне (Рисунок 2 В) [3]. Далее происходит гидролиз кетимина через образование карбиноламина до кетопродукта и кофактора в форме пиридоксамин-5'-фосфат (PMP). Вторая полуреакция происходит в обратном порядке через те же промежуточные соединения с образованием аминопродукта и регенерацией внутреннего альдимины. Так как PLP- и PMP-формы трансминаз имеют разные максимумы поглощения, протекание полуреакций возможно регистрировать спектрофотометрически.

Для эффективной инициации трансальдиминирования (первая стадия полуреакции – нуклеофильная атака C4'-атома кофактора аминогруппой субстрата) аминогруппа субстрата должна быть депротонированной (повышается нуклеофильность аминогруппы), а иминный азот кофактора – протонированным (повышается электрофильность C4'-атома при иминном азоте) [21] (Рисунок 3). Однако аминогруппы аминов и аминокислот преимущественно протонированы при pH, оптимальных для большинства трансминаз (pH 7-9) [35–38]. Для ААТ установлено, что в активной форме фермента иминный азот внутреннего альдимины депротонирован, и при формировании комплекса Михаэлиса между ферментом и аминокислотой один из протонов с протонированной аминогруппы субстрата переходит на иминный азот внутреннего альдимины [21,24] (Рисунок 3). Таким образом, образуется комплекс, благоприятный для инициации трансальдиминирования.

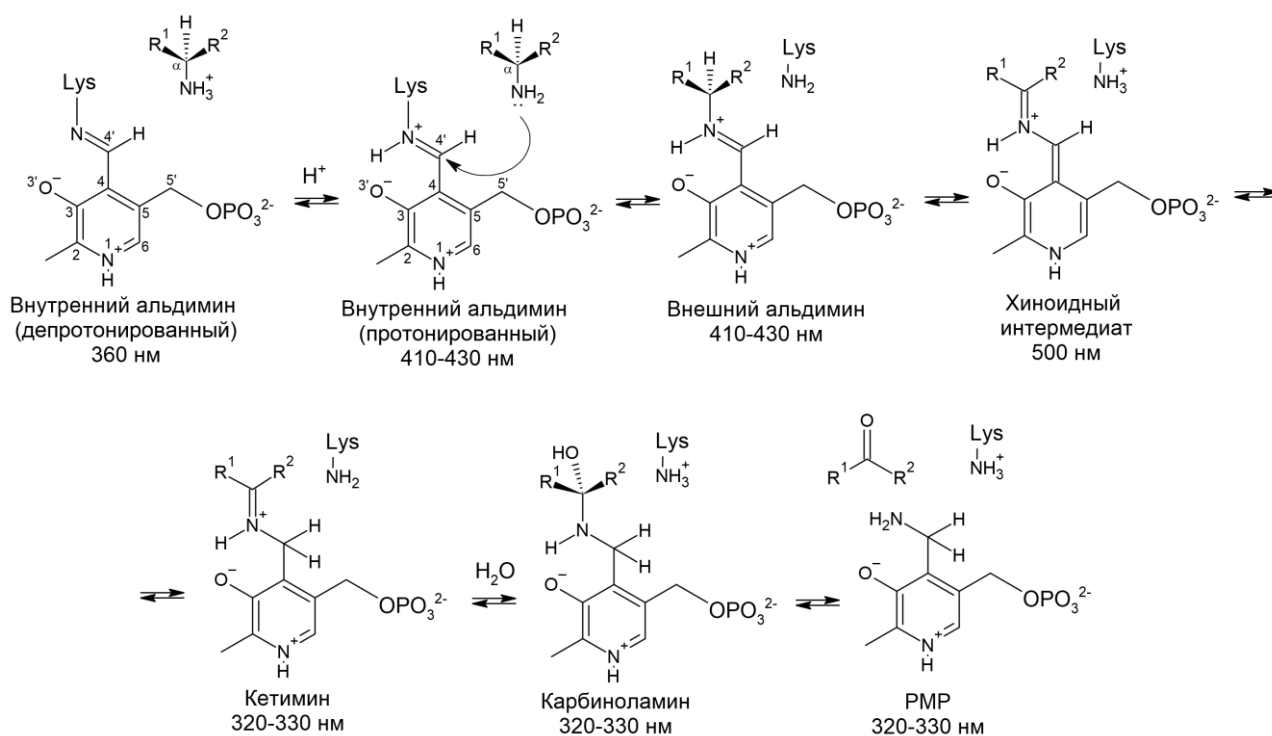


Рисунок 3. Схема первой полуреакции трансаминирования с указанием максимумов поглощения промежуточных соединений.

1.2. Трансаминазы IV типа укладки PLP-связывающего домена

Трансаминазы IV типа укладки PLP-связывающего домена включают семейства трансаминаз, активные с амино- и кетосоединениями с α -карбоксовой группой и без нее (BCAT, DAAT, R-ATA) [3,32]. Трансаминазы IV типа PLP-укладки интересны тем, что в рамках одной геометрии активного центра реализуются химические превращения не только с разными по структуре субстратами, но и с отличными стереоцентрами [32]. Эталонными (тестовыми) реакциями природных BCAT являются трансаминирование между алифатическими L-аминокислотами с разветвленной боковой цепью (L-лейцин, L-изолейцин, L-валин) и α -кетоглутаратом, природных DAAT – трансаминирование между D-глутаматом и пируватом, а R-ATA – трансаминирование между (R)-(+)-1-фенилэтиламином (R-PEA) и пируватом (Рисунок 4) [32]. R-ATA способны аминировать кетоны, однако из-за низкой реакционной способности кетонов необходимы дополнительные методы смещения равновесия реакции в сторону продуктов – оптически активных аминов [39,40].

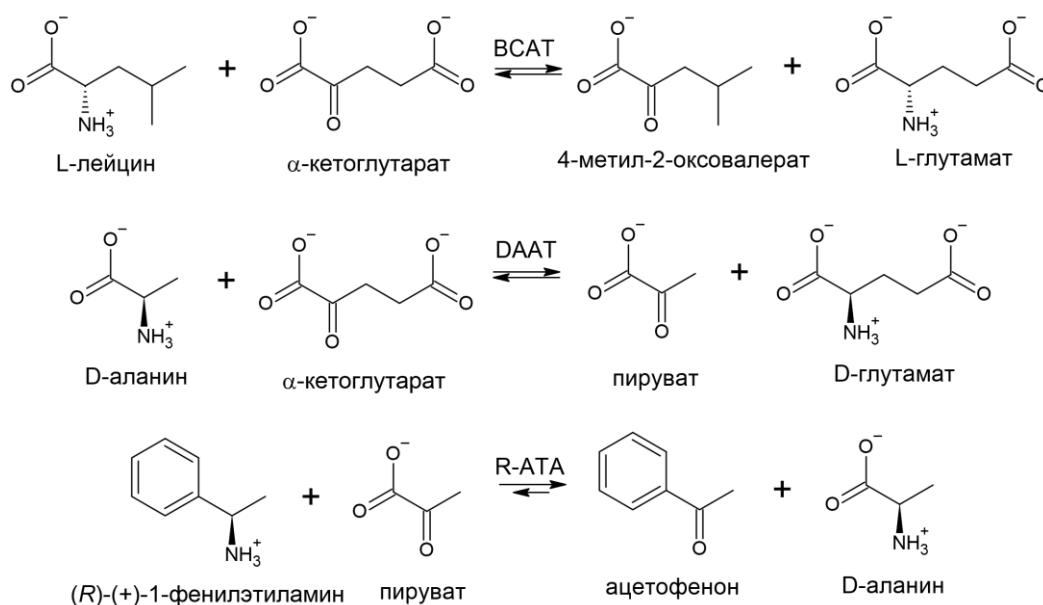


Рисунок 4. Реакции трансминирования, катализируемые BCAT, DAAT и R-АТА.

Для трансаминаз IV типа PLP-укладки открытым остается вопрос о протонированных состояниях внутреннего альдимины и аминокислоты на первой стадии трансминирования – образовании внешнего альдимины (Рисунок 3). Для этих ферментов не наблюдается депротонирования иминного азота внутреннего альдимины при всех рабочих значениях pH [41–44]. В BCAT α-карбоксильная группа субстратов связывается рядом с сайтом связывания фосфатной группы кофактора PLP. Было выдвинуто предположение, что протон с α-аминогруппы субстрата мигрирует к паре отталкивающихся отрицательно заряженных карбоксильной группы субстрата и фосфатной группы кофактора, стабилизируя тем самым их сближение [45]. В случае DAAT α-карбоксильная группа субстратов связывается с противоположной стороны от сайта связывания фосфатной группы кофактора [46], и аналогичный способ депротонирования аминогруппы субстрата невозможен. Отсутствие α-карбоксильной группы у аминов также исключает подобный механизм депротонирования субстратов в R-АТА. Для R-АТА из *Aspergillus fumigatus* выдвинуто предположение, что остаток H53, расположенный в О-кармане активного центра, может участвовать в депротонировании аминогруппы аминсубстратов [47].

Субъединица трансаминаз IV типа PLP-укладки состоит из двух доменов, соединенных междоменной петлей: малый домен с N-конца α/β-структуры и большой домен с C-конца структуры псевдобарреля (Рисунок 5 А) [32,48–50]. Хотя функциональной единицей трансаминаз является гомодимер, в растворе некоторые BCAT и R-АТА представляют собой тетрамеры (димер функциональных димеров) или гексамеры (тример функциональных

димеров), тогда как все описанные в литературе DAAT в растворе являются димерами [38,44,51–54]. Предположительно дополнительная олигомеризация может увеличивать стабильность трансаминаз. Активный центр трансаминаз IV типа PLP-укладки расположен на стыке двух субъединиц и образован остатками малого и большого доменов одной субъединицы и остатками малого домена соседней субъединицы [32,48,49,55]. Несколько консервативных элементов вторичной структуры формируют их активный центр: со стороны входа активный центр ограничен β -поворотом1; β X- и β Y-тяжи одновременно формируют O- и P-карманы со стороны белковой глобулы; O-карман также сформирован α -спиралью и петлей с соседней субъединицы; P-карман дополнительно сформирован междоменной петлей и β -поворотом2 (Рисунок 5 Б).

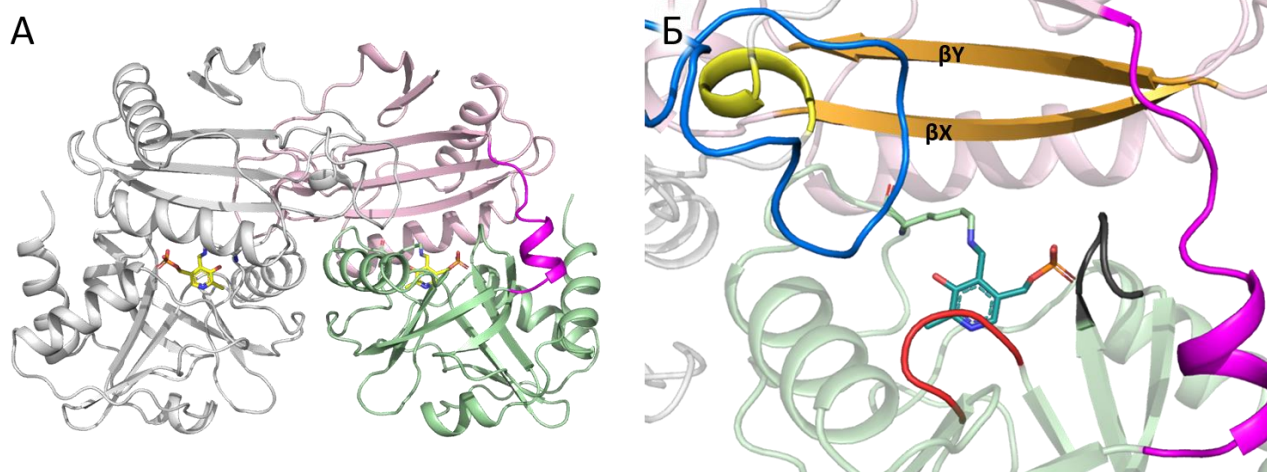


Рисунок 5. Структура трансаминаз IV типа PLP-укладки. (А) Функциональный димер bsDAAT (PDB код: 4DAA). Малый домен субъединицы показан светло-розовым цветом, большой домен – светло-зеленым, межсубъединичная петля – малиновым, соседняя субъединица – серым. (Б) Активный центр bsDAAT. β X- и β Y-тяжи показаны оранжевым цветом, петля O-кармана – синим, α -спираль O-кармана – желтым, β -поворот1 – красным, β -поворот2 – черным, междоменная петля – малиновым.

У BCAT и R-ATA наблюдается движение и структурирование нерегулярных элементов вторичной структуры междоменной петли и петли O-кармана в результате связывания субстратов в активном центре [45,55–58] (Рисунок 6 А, Б). Остатки и связи, координирующие и стабилизирующие кофактор PLP, также являются консервативными для трансаминаз IV типа PLP-укладки (Рисунок 6 В): (1) гидроксильная группа кофактора образует водородную связь с гидроксильной группой остатка тирозина (Y31 в DAAT из *Bacillus* sp. YM-1 (bsDAAT)) напрямую или через молекулу воды; (2) N1 атом пиридинового кольца кофактора образует водородную связь с боковой группой остатка глутамата (E177 в bsDAAT); (3) фосфатная группа кофактора образует водородные связи с боковыми группами остатка аргинина (R50 в

bsDAAT) и двух остатков треонинов (T205 и T241 в bsDAAT), атомами азота основной цепи α -спирали и β -поворота² в Р-кармане, а также молекулами воды [48,49,55]. Консервативный остаток глутамата в трансминазах обеспечивает протонированную форму N1 атома, необходимую для стабилизации хиноидного промежуточного соединения в ходе реакции трансминирования [34]. Водородная связь между гидроксильной группой PLP и остатком тирозина, предположительно, также контролирует электронное состояние кофактора [59]. Помимо водородных связей положение кофактора PLP стабилизировано гидрофобными взаимодействиями между пиридиновым кольцом и остатком лейцина со стороны белковой глобулы и атомами основной цепи β -поворота¹ со стороны входа в активный центр [60,61].

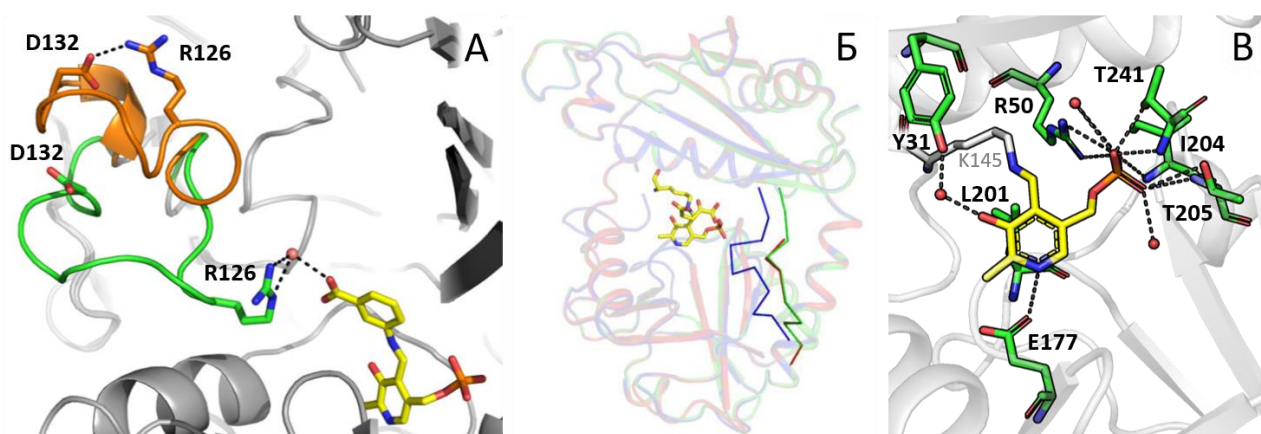


Рисунок 6. Движение петель в трансминазах и связывание кофактора в активном центре трансминаз. (А) Наложение петель О-кармана комплекса R-АТА из *A. fumigatus* с ингибитором м-карбоксифенилом (желтый) в открытой (оранжевый) и закрытой (зеленый) конформациях (PDB код: 4UUG). (Б) Наложение субъединиц ВСАТ из *G. acetivorans* в холоформе (красный) (PDB код: 5СМ0) и в комплексе с α -кетоглутаратом (желтый) в открытой (зеленый) и закрытой (синий) конформациях (PDB код: 5Е25). (В) Сайт связывания кофактора PLP в активном центре bsDAAT (PDB код: 4DAA). PLP образует основание Шиффа с остатком К145. Остатки, взаимодействующие с PLP, показаны зеленым цветом. Молекула PLP показана желтым цветом, молекулы воды – красными шариками. Пунктиром показаны водородные связи.

Стереоспецифичность трансминаз IV типа PLP-укладки определяется способом связывания субстратов в активном центре и их положением относительно кофактора, что в свою очередь определяется аминокислотными остатками активного центра [8,32]. В 2010 году группа профессора Боншойера выделила аминокислотные последовательности мотивов, определяющих специфичность ВСАТ, DAAT и R-АТА (Таблица 1) [8]. На основе этих мотивов можно находить ферменты с аналогичной функцией из других организмов.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности характеристических мотивов, определяющие специфичность BCAT, DAAT и R-АТА

ТА	Мотив1	Мотив2	Нумерация соответствует
BCAT	³¹ Y _{XXXX} FEG[LMI][KR] ⁴⁰	⁹⁵ Y[ILV]R _{XX} ⁹⁹ ... ¹⁰⁷ [LMVI]G[VL]	BCAT из <i>Escherichia coli</i>
DAAT	²⁶ F _{XXXX} YEVI[KR _X] ³⁵	⁸⁶ X[ILV]Y[LIMF]Q ⁹⁰ ... ⁹⁸ R _X H ¹⁰⁰	DAAT из <i>Bacillus</i> sp. YM-1
R-АТА	⁵³ [HR] _{XXXX} YD[VT] _X [STANP] ⁶²	¹¹³ [FY]V[EQNAW] _{XX} ¹¹⁷ ... ¹²⁶ R _{XX} ¹²⁸	R-АТА из <i>Nectria haematococca</i>

В BCAT α-карбоксильная группа субстратов связывается в Р-кармане активного центра, и ключевыми остатками в ее связывании являются Y95 и R97, расположенные на βY-тяже (Рисунок 7). Остаток Y95 поляризуется гуанидиновой группой остатка R97 и образует водородную связь с одним из атомов кислорода α-карбоксильной группы субстрата. Второй атом кислорода α-карбоксильной группы субстрата формирует водородную связь с атомами азота основной цепи консервативного β-поворота ²⁵⁶GТАА²⁵⁹ (Рисунок 7) [8,32,48]. В DAAT α-карбоксильная группа субстратов связывается в О-кармане активного центра через триаду аминокислот: Y31 с βX-тяжа и R98*, H100* (* здесь и далее обозначает остаток соседней субъединицы функционального димера) с петли О-кармана (Рисунок 7) [8,32,46]. В R-АТА бензольное кольцо R-PEA и α-карбоксильная группа пирувата связываются в О-кармане, а метильная группа обоих субстратов – в Р-кармане (Рисунок 7) [8]. Связывание таких разных по размеру и свойствам функциональных групп в О-кармане R-АТА в первую очередь определяется петлей О-кармана [62,63]. Данная петля содержит положительно заряженный остаток аргинин (R126* в R-АТА из *Nectria haematococca*), который связывает α-карбоксильную группу пирувата. Также эта петля способна отклониться от активного центра, создавая при этом дополнительное пространство для связывания объемного R-PEA (Рисунок 6 А) [57,63]. Подход поиска ферментов по характеристическим мотивам позволил значительно расширить биотехнологически востребованное семейство R-АТА [8].

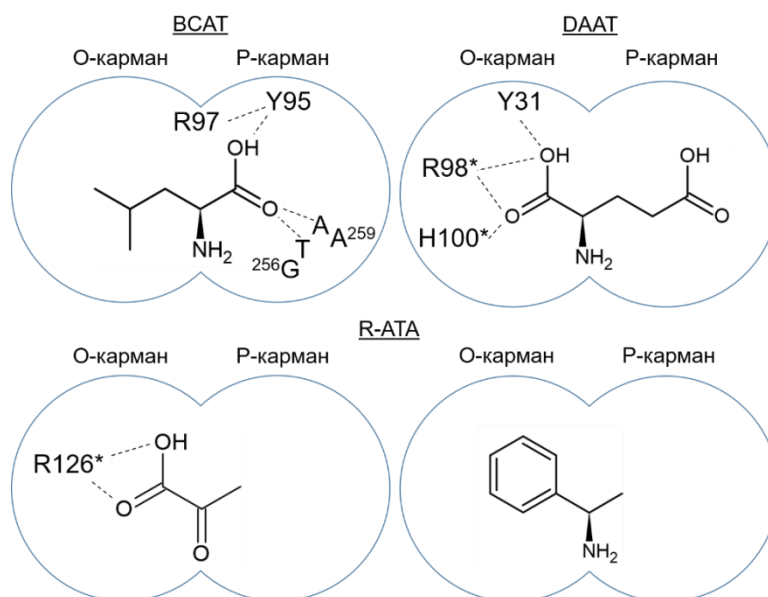


Рисунок 7. Схемы связывания субстратов в активных центрах ВСАТ (L-лейцин), ДААТ (D-глутамат) и R-АТА (пируват слева и R-РЕА справа). Нумерация остатков соответствует ВСАТ из *Escherichia coli*, ДААТ из *Bacillus* sp. УМ-1, R-АТА из *Nectria haematococca*. (*) обозначает остаток соседней субъединицы функционального димера.

В ходе поиска новых трансаминаз исследователями были обнаружены трансаминазы IV типа PLP-укладки, проявляющие широкую субстратную специфичность. В 2016 году описаны ДААТ, активные и с (*R*)-аминами, из *C. pusillum* (CpuTA) и *M. ginsengisoli* [64]. Обе трансаминазы были обнаружены в ходе культивирования бактерий из почвенных образцов в среде, содержащей (*R*)-амины как единственные источники азота. В 2019 году описаны ВСАТ, также активные и с (*R*)-аминами, из *Thermobaculum terrenum* [121] и *Haliangium ochraceum* [65]. Эти ферменты были обнаружены в результате биоинформатического анализа последовательностей трансаминаз. Примечательно, что трансаминазы из *T. terrenum* и *H. ochraceum* способны переносить аминогруппу с (*R*)-аминов на α -кетокислоты с образованием L-аминокислот. Помимо субстратной специфичности, все четыре трансаминазы отличаются от канонических ВСАТ, ДААТ и R-АТА аминокислотным составом их активных центров. В 2020 году группой проф. Боншойера были предприняты попытки инженерии канонических ВСАТ из *Escherichia coli* (eBCAT) и bsDAAT с целью введения дополнительной активности с (*R*)-аминами [66]. На начальном этапе, исходя из анализа структур ВСАТ, ДААТ и R-АТА, были обнаружены «горячие точки» в активных центрах eBCAT и bsDAAT, в которых аминокислотные замены приводили к появлению начального уровня активности с (*R*)-аминами. Последующие попытки повышения активности с (*R*)-аминами варианта eBCAT путем рационального дизайна и направленной эволюции не привели к каким-либо успешным результатам. Тогда как в случае bsDAAT последующие биоинформатический анализ,

компьютерный дизайн, сайт-направленный мутагенез и направленная эволюция привели к получению варианта с шестью аминокислотными заменами в активном центре, проявляющего активность с (R)-аминами на уровне классических R-АТА.

1.3. Трансаминазы D-аминокислот (ДААТ)

ДААТ катализируют реакцию трансаминирования между D-аминокислотой и α -кетокислотой и обнаружены в бактериях и растениях [35]. В бактериях ДААТ необходимы для синтеза D-глутамата из α -кетоглутарата и D-аланина (Рисунок 4) [67,68]. D-глутамат вместе с D-аланином входят в состав пептидогликана – важнейшего компонента клеточной стенки бактерий [67]. В связи с этим ДААТ являются потенциальными мишенями для поиска и дизайна молекул с антибактериальным действием [69]. В растениях ДААТ, как предполагается, задействованы в метаболизме D-аланина, D-глутамата и D-аспартата, необходимых для их роста [70].
















На сегодня описаны свойства нескольких бактериальных ДААТ: ДААТ из *Bacillus* sp. YM-1 (bsDAAT) [41], *Bacillus sphaericus* (bsphDAAT) [71], *Geobacillus toebii* SK1 (SK1DAAT) [72], *Lactobacillus salivarius* (lsDAAT) [73], *Curtobacterium pusillum* (CpuTA) [64] и *Haliscomenbacter hydrossis* (Halhy) [42], а также одной растительной ДААТ из *Arabidopsis thaliana* (atDAAT) [70]. Среди них известны кристаллические структуры bsDAAT (PDB код: 1DAA, 3DAA, 4DAA), CpuTA (PDB код: 5K3W) и Halhy (PDB код: 7P7X), а также двух предполагаемых ДААТ из *Burkholderia thaliandensis* (btDAAT, PDB код: 4TM5) и *Mycobacterium tuberculosis* (mtDAAT, PDB код: 6Q1R). Наибольшую ферментативную активность в реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом демонстрируют bsDAAT и Halhy (Таблица 2). Константы Михаэлиса к D-аланину и α -кетоглутарату в среднем не превышают 4 мМ, однако константы Михаэлиса к D-аланину для Halhy и к α -кетоглутарату для atDAAT составляют 23 и 27 мМ соответственно.

Таблица 2. Кинетические параметры полной реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом, катализируемой DAAT.

DAAT	Условия	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мМ	
			D-аланин	α -кетоглутарат
bsDAAT [72]	100 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 50 °С	134 ± 2	2,5 ± 0,2	3,1 ± 0,1
SK1DAAT [72]	100 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 50 °С	47 ± 2	2,5 ± 0.1	0,7 ± 0,1
lsDAAT [73]	100 мМ К-фосфатный буфер, рН 7,5, 30 °С	≈ 12,6	1,05	3,78
atDAAT [70]	100 мМ Трис-НСl, рН 8,5, 37 °С	3,4	1,0	27
Halhy [42]	50 мМ К-фосфатный буфер, рН 8,0, 40 °С	146 ± 4	23 ± 1	2,3 ± 0,2

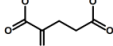
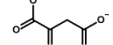
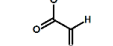
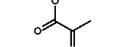
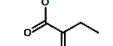
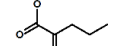
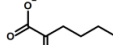
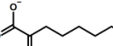
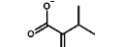
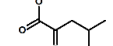
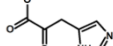
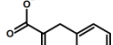
Субстратная специфичность описанных DAAT к различным аминокислотам (D-аминокислотам) и аминокислотам (α -кетокислотам) различается между собой. Относительные уровни активности DAAT в реакциях с аминокислотами и аминокислотами приведены в таблицах 3 и 4 соответственно. Очевидно, что дифференциация субстратов свойственна всем описанным DAAT, кроме lsDAAT и atDAAT. В bsDAAT, SK1DAAT и Halhy наиболее выражена дифференциация субстратов в активном центре. Они проявляют высокую специфичность к α -кетоглутарату (кетоаналогу D-глутамата), а также к субстратам малых объемов с неразветвленной боковой группой – аминокислотам D-аланину, D- α -аминобутирату, D-аспартату и к их кетоаналогам – пирувату, α -кетобутирату и оксалоацетату, а также к α -кетовалерату. Спектр субстратов bsphDAAT немного шире. Помимо субстратов малого объема bsphDAAT также проявляет высокий уровень активности с гидрофобными субстратами большего объема – D-норвалин, D-метионин, D-норлейцин, D-фенилаланин и 2-оксогексаноат. Широкую субстратную специфичность проявляют lsDAAT и atDAAT, которые активны не только с гидрофобными субстратами, но и с D-гистидином и заряженными аминокислотами. CruTA выделяется способностью одинаково эффективно катализировать деаминацию аминокислоты D-аланина и аминов R-PEA и (R)-1-аминотетралина.

Таблица 3. Относительные активности (%) DAAT в реакциях трансаминирования между α -кетоглутаратом и различными аминодонорами.

Аминодонор	Структура аминодонора	bsDAAT [41]	bsphDAAT [71]	SK1DAAT [72]	lsDAAT [73]	atDAAT [70]	Halhy [42]	CpuTA [64]	
D-аланин		100	100	100	100	100	100	100	
D- α -аминобутират		98	97	89	90	-	-	-	
D-норвалин		34	83	8.2	83	-	-	-	
D-норлейцин		5	46	-	71	-	-	-	
D-валин		3,2	-	1.9	83	9	-	-	
D-лейцин		2,4	8	-	83,5	17	1,4	-	
D-фенилаланин		0,9	32	-	0	76	-	-	
D-триптофан		9,1	4	4,9	-	42	-	-	
D-метионин		19	61	0,7	89	82	-	-	
D-гистидин		1,9	6	1,9	75	32	-	-	
D-аспартат		60	30	70	0	30	-	-	
D-лизин		0,8	3	-	-	-	-	-	
D-аргинин		1	6	-	5	32	-	-	
R-PEA		Нет активности							81*
(R)-1-аминотетралин		Нет активности							112*
Относительная активность, %		80	60	40	20	0			

* -активность в реакции с пируватом
 прочерк – нет данных

Таблица 4. Относительные активности DAAT в реакциях трансаминирования между D-аланином и различными аминокцепторами (α -кетокислотами).

Аминокцептор	Структура аминокцептора	Относительная активность, %					
		bsDAAT [41]	bspDAAT [71]	SK1DAAT [72]	IsDAAT [73]	Halhy* [74]	
α -кетоглутарат		100	100	100	100	-	
оксалоацетат		20	57	-	91	-	
глиоксилат		24	34	-	220	-	
пируват		-	-	-	-	100	
α -кетобутират		144	100	110	400	24	
α -кетовалерат		70	88	-	103	1,9	
2-оксогексаноат		14	61	-	90	0,06	
2-оксооктаноат		-	-	-	39	-	
3-метил-2-оксобутират		3,7	3	13	102	-	
4-метил-2-оксовалерат		3,1	11	-	-	0,2	
индол-3-пируват		-	-	-	200	0,4	
фенилпируват		2,3	12	2	45	0,5	
Относительная активность, %		100	80	60	40	20	0

*-относительные активности в реакциях трансаминирования между D-глутаматом и различными аминокцепторами (α -кетокислотами)

прочерк – нет данных

Механизм связывания субстратов в DAAT наиболее подробно был изучен на примере bsDAAT. Остатки, участвующие в связывании субстратов, были идентифицированы в структурах комплексов с ингибитором D-цикloserином [75] и с субстратом D-аланином [46]. В DAAT α -карбоксильная группа субстратов (D-аминокислот и α -кетокислот) связывается в O-кармане активного центра триадой аминокислот, которые образуют так называемую «карбоксилатную ловушку», - Y31, R98* и H100* (Рисунок 8 А). Боковая цепь остатка R98*, по-видимому, оказывает наибольшее влияние на связывание субстратов, так как образует солевой мостик с α -карбоксильной группой. Замена этого остатка на метионин привела к снижению k_{cat} в реакции D-аланин + α -кетоглутарат в 10 000 раз [76]. Остаток Y31, однако, также критичен для активности bsDAAT – аминокислотная замена Y31A привела к снижению k_{cat} на 3 порядка [43]. В структурах замечено, что этот остаток, помимо координации

субстратов, участвует и в координации гидроксильной группы кофактора [49]. Боковая группа субстратов DAAT связывается в Р-кармане активного центра. Методом точечного мутагенеза показано, что остаток K35 в bsDAAT участвует в связывании γ -карбоксильной группы α -кетоглутарата [43]. При замене K35A константа специфичности (k_{cat}/K_M) фермента к α -кетоглутарату понизилась на один порядок, тогда как к гидрофобному α -кетоиовалерату не изменилась. В 2008 году была представлена функциональная характеристика растительной DAAT из *Arabidopsis thaliana* (atDAAT) с уникальной аминокислотной последовательностью [70]. В ее последовательности отсутствуют аминокислотные остатки канонической «карбоксилатной ловушки». Вместо остатков Y31, R98* и H100*, характерных для bsDAAT, в atDAAT находятся F109, F176* и L178*. Остатки, участвующие в координации кофактора в atDAAT, при этом такие же, как у других трансаминаз IV типа PLP-укладки. Позже, в 2016 году, структурно и функционально была описана новая DAAT из *Curtobacterium pusillum* (CpuTA), аминокислотный состав которой также отличался от канонической bsDAAT [64]. В структуре CpuTA вместо канонической «карбоксилатной ловушки» в О-кармане расположены два положительно заряженных остатка R51* с α -спирали и K177 с β X-тяжа (Рисунок 8 Б). В аминокислотной последовательности atDAAT присутствуют аналогичные остатки – R104* и R166 [70]. Характеристические мотивы bsDAAT, atDAAT и CpuTA приведены в таблице 5.

Таблица 5. Аминокислотные последовательности характеристических мотивов bsDAAT, atDAAT и CpuTA.

ТА	Мотив1	Мотив2
bsDAAT	²⁶ FXXXXYEVVK ³⁵	⁸⁷ IYFQ ⁹⁰ ... ⁹⁸ RxH ¹⁰⁰
atDAAT	¹⁰⁴ RXXXXVFDTAL ¹¹³	¹⁶⁵ LRYW ¹⁶⁸ ... ¹⁷⁶ FxL ¹⁷⁸
CpuTA	⁵¹ RXXXXVFETIA ⁶⁰	¹¹⁶ AKLI ¹¹⁹ ... ¹²⁵ EGE ¹²⁷

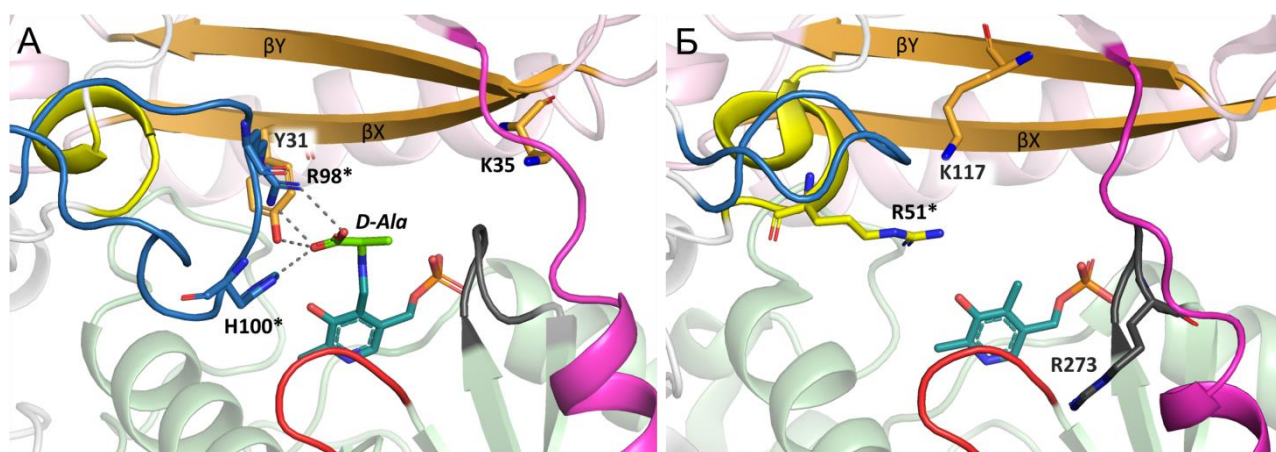


Рисунок 8. Варианты организации активного центра DAAT. (А) Активный центр bsDAAT в комплексе с D-аланином (PDB код: 3DAA). (Б) Активный центр CruTA (PDB код: 5K3W). Малый домен одной субъединицы представлен светло-розовым цветом, большой домен – светло-зеленым, соседняя субъединица – серым. О-карман расположен слева от PLP, Р-карман – справа от PLP. и α -Спираль О-кармана показана желтым цветом, петля О-кармана – синим, β X- и β Y-тяжи – оранжевым, междоменная петля – малиновым, β -поворот1 – красным и β -поворот2 – черным. Остатки соседней субъединицы функционального димера обозначены звездочкой (*).

Таким образом, на сегодня известно два варианта организации активного центра у природных DAAT, при этом корреляция между профилем субстратной специфичности и строением активного центра не очевидна. bsDAAT и гомологичные ей bsphDAAT, SK1DAAT и lsDAAT отличаются дифференциацией субстратов, среди них lsDAAT выделяется широкой субстратной специфичностью. Среди гомологичных DAAT CruTA, Halhu и atDAAT только CruTA активны как с D-аминокислотами, так и с первичными (R)-аминами. У atDAAT наблюдается широкая субстратная специфичность, включая активность с D-аспаратом и D-аргинином. Взаимосвязь структуры и функции в DAAT остается невыясненным вопросом. Исследования в этой области полезны не только для углубления наших знаний о строении ферментов, но и имеют практическое значение, так как позволяют грамотно планировать работы по оптимизации свойств биокатализаторов для конкретного биотехнологического процесса.

1.4. Биокатализ и применение трансминаз

1.4.1. Ферменты и биокатализ

Ферменты способны катализировать весь природный спектр химических превращений, в том числе окислительно-восстановительные реакции, реакции замещения, присоединения, отщепления, перегруппировки, перициклические реакции и т.д. [77–79]. Ферменты

(биокатализаторы), как и любой катализатор, увеличивают скорость реакций за счет снижения энергетического барьера реакции [77,79]. По сравнению с химическими катализаторами ферменты обладают рядом преимуществ, которые являются следствием их сложной молекулярной структуры и оптимизации в результате длительной эволюции и адаптации организма-хозяина к условиям жизнедеятельности. Главными достоинствами ферментов являются: высокая избирательность связывания субстратов (региоспецифичность и стереоспецифичность), эффективное превращение субстратов в «мягких» природных условиях и биоразлагаемость [80,81]. Каталитические свойства ферментов человек начал применять с незапамятных времен, используя процесс ферментации (брожения) для изготовления кисломолочных, хлебобулочных изделий и алкогольных напитков, а также для выделки кожи, размягчения мяса и т.д. [82–85]. Ферментация применялась человеком на протяжении многих тысячелетий, но только в 19 веке пришло понимание роли микроорганизмов, а позже и ферментов в этих процессах [86,87]. Тогда же выяснилось, что ферменты сохраняют свои каталитические свойства и вне живых организмов, что привело к развитию новой научной дисциплины – энзимологии. Параллельно с изучением ферментов происходило масштабирование производственных процессов с участием микроорганизмов и ферментов [86]. Биокаталитические процессы стали применять и в синтетической химии для производства 6-аминопенициллановой кислоты, некоторых аминокислот, молочной, янтарной, 3-гидроксипропионовой кислот, акриламида и т.д. [88–92].

В 20 веке в результате индустриализации общества и масштабного развития таких областей химической промышленности, как производство искусственных удобрений, красителей, нефтепродуктов, полимеров и других химикатов, беспрецедентно увеличилось количество вредных выбросов в окружающую среду, возникла угроза глобальной экологической катастрофы [93,94]. В связи с этим обозначилась необходимость принципиально пересмотреть масштабы и методы химического производства. Сегодня в химической промышленности наблюдается переход от традиционной концепции, ориентированной исключительно на выход получаемого продукта, к концепции «зеленой химии», направленной на максимальное использование сырья, устранение отходов и предотвращение использования токсичных веществ [93]. Ферменты и ферментативные процессы по параметрам безопасности и каталитическим функциям соответствуют современным требованиям химической промышленности. Большой потенциал заложен в области получения биотоплива (биоэтанол, биодизель и биоводород), которое производится из возобновляемых ресурсов (растительных и животных отходов) путем воздействия

микроорганизмами или чистыми ферментами [95,96]. Интерес к ферментам неуклонно растет и у химиков-синтетиков [97–99]. Развитие вычислительных методов и внедрение искусственного интеллекта в области медицинской химии и биологии позволяет конструировать уникальные молекулы, являющиеся эффективными лекарственными средствами [100,101]. Многие из таких молекул имеют сложную структуру, и классических методов органической химии оказывается недостаточно для разработки эффективных способов их получения. Учитывая стерео- и региоселективность ферментов, их применение на отдельных стадиях многостадийного синтеза уникальных молекул позволяет сократить количество стадий, побочных продуктов, снизить энергопотребление и, таким образом, значительно повысить выход оптически активного продукта, удешевить технологический процесс и снизить экологическую нагрузку на окружающую среду [97,99,102,103]. Однако при всех достоинствах природные ферменты имеют два принципиальных недостатка, ограничивающих их применение в биотехнологии: (1) ферменты лабильны в условиях химического синтеза (высокая концентрация субстратов/продуктов, повышенная температура, присутствие органических растворителей и т.д.), (2) субстратная специфичность ферментов ограничена природными соединениями [80,97,102,104]. Все это делает применение ферментов для синтеза уникальных молекул невозможным без предварительной модификации и оптимизации их свойств под конкретную задачу.

Эффективная модификация и оптимизация ферментов стали возможными благодаря достижениям в области биохимии, биотехнологии и биоинженерии. Так, источником стабильных ферментов являются микроорганизмы, обитающие в экстремальных природных условиях (высокие температуры, высокое содержание солей/кислот/щелочей) [105,106]. Кроме того, для повышения стабильности ферментов в условиях химического синтеза подбирают определенные добавки, химически модифицируют ферменты, иммобилизируют их на твердые носители и т.д. [107,108]. Колоссальный прогресс в области биоинженерии за последние несколько десятилетий позволил перейти к системной и высокорезультативной модификации свойств ферментов такими инструментами, как направленная эволюция и рациональный дизайн, создавая библиотеки вариантов ферментов как базы для самых разных целевых разработок [104,109,110]. Ускорению и увеличению продуктивности методов белковой инженерии способствует развитие методов высокопроизводительного скрининга библиотек ферментов, а также методов компьютерного моделирования и машинного обучения [110,111]. Благодаря развитию инструментов расширения гинетического кода возник новый подход в инженерии ферментов – включение неканонических аминокислот в их

последовательность [112,113]. В настоящее время у биоинженеров и биохимиков есть возможность как модифицировать природную активность фермента, так и создавать ферменты с активностью, не наблюдаемой в природе. Сегодня разрабатываются в лабораторных условиях и внедряются в производство биокаталитические реакции как одностадийные процессы хирального разделения, восстановительного аминирования, окисления спиртов и т.д., так и в составе многоступенчатых ферментных каскадов и как часть многостадийного химического синтеза [80,97,103,114–116].

1.4.2. Трансаминазы как биокатализаторы

Аминосоединения находят свое применение в разных областях как добавки против коррозии металлов [117], компоненты косметических и парфюмерных средств [118], различных красителей [119] и др. Амины являются структурными блоками многих синтетических лекарственных средств (лиздексамфетамин (психостимулятор) [120], лабеталол (лекарство для лечения сердечных заболеваний) [121], репаглиндин (противодиабетический препарат) [122], ривастигмин (препарат, замедляющий развитие деменции) [123], долутегравир (препарат против ВИЧ) [124] и др.) и препаратов для сельского хозяйства (дифлуметорим, ципродинил (противогрибковые препараты) [125], продиамин, биалафос (гербициды) [126,127] и др.) (Рисунок 9). Для эффективного применения синтетических препаратов особенно важна хиральная чистота целевого энантиомера [97,99,103]. Получение оптически чистых аминосоединений, таким образом, является одной из ключевых задач в области органического синтеза. Стереоселективное аминирование кетосоединений в результате ферментативного трансаминирования является результативной альтернативой классическим подходам тонкого органического синтеза для получения оптически активных аминосоединений. Основными преимуществами трансаминаз как биокатализаторов является рециркуляция кофактора в ходе катализируемой реакции и их высокая стереоселективность. Рециркуляция кофактора выгодна в биотехнологическом синтезе, так как не требуется его регенерация, что необходимо, например, для NAD(P)-зависимых ферментов [128]. Избыток хирального продукта в реакции с природными немодифицированными трансаминазами превышает 99% [4–7,129]. Трансаминазы IV типа PLP-укладки особенно привлекательны в биокатализе как катализаторы (*R*)-стереоселективного присоединения аминогруппы. Только эти трансаминазы могут катализировать получение энантиомерно чистых (*R*)-аминов из прохиральных кетонов. Трансаминазы с широкой субстратной специфичностью типа CpuTA могут служить

универсальными стартовыми точками для создания биокатализаторов с определенными свойствами.

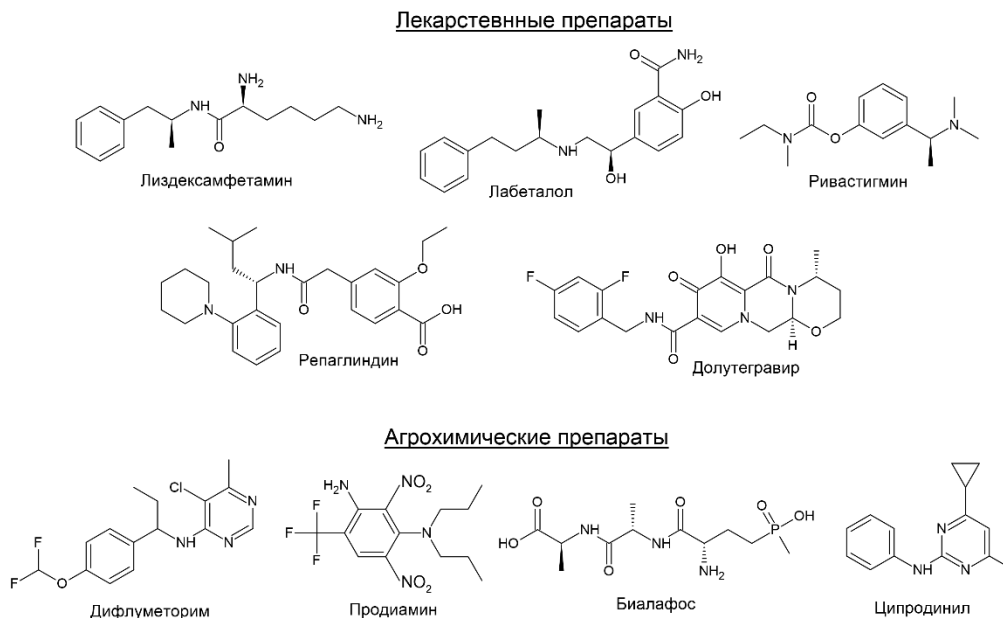


Рисунок 9. Примеры аминов, являющихся лекарственными и агрохимическими препаратами.

В настоящее время выделяются два основных подхода применения трансминаз для синтеза хиральных аминов: (1) разделение рацемических смесей и (2) асимметрическое аминирование прохиральных кетонов/кетокислот. В литературе описано множество примеров применения данных подходов для получения оптически чистых аминов, аминспиртов, аллильных аминов, α -, β - и γ -аминокислот и т.д. различного строения [138,158–164]. При разделении рацемата аминов один из энантиомеров превращается в кетопродукт (Рисунок 10 А, первая стадия). Таким образом, получается смесь целевого хирального амина и побочного кетопродукта (кетоаналог целевого хирального амина). Впервые производство хиральных аминов таким методом продемонстрировала компания Celgene в конце 20-го века, что вызвало множество новых исследований в данной области [131]. Повышение атомной эффективности разделения рацемата возможно достичь путем введения второй ферментативной стадии с энантиокомплементарной трансминазой, которая превращает побочный кетопродукт в целевой хиральный амин (Рисунок 10 А, вторая стадия) [131,162,165].

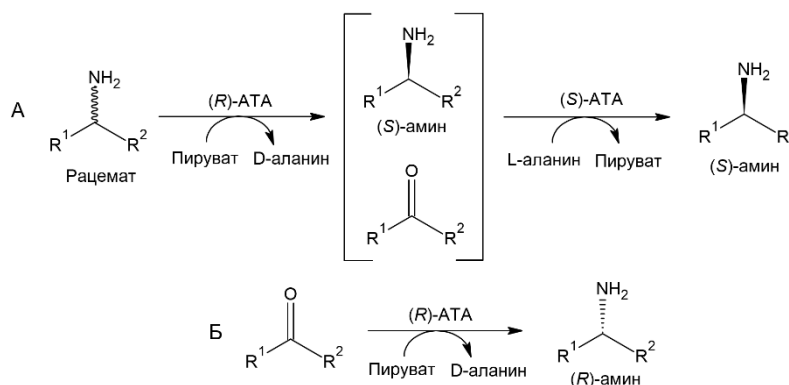


Рисунок 10. Схемы стратегий применения трансминаз для получения хиральных аминов. (А) Разделение рацемата аминов и (Б) асимметрическое аминирование кетосоединений.

В асимметрическом синтезе прохиральные кетоны/кетокислоты аминируются до соответствующих хиральных аминов/аминокислот (Рисунок 10 Б). Дополнительное повышение атомной эффективности здесь возможно в результате рециркуляции аминокислоты [149,150,152]. Стратегия асимметрического аминирования была применена в производственных циклах компаний Merck и Pfizer для получения ряда фармацевтических препаратов: ситаглиптин (препарат для лечения сахарного диабета 2-го типа) [166], суворексант (препарат против бессонницы) [167], гласдегид (PF-04449913, препарат для лечения миелоидного лейкоза) [168], МК-7246 (препарат для лечения органов дыхания) [169], вернакалант (препарат для лечения аритмии сердца) [170] и сакубитрил (препарата для лечения сердечной недостаточности) [171] (Рисунок 11). Во всех случаях в качестве биокатализаторов использовали модифицированные трансминазы: (S)-селективная из *Vibrio fluvialis* или (R)-селективная из *Arthrobacter* sp. Инженерия ферментов включала классическую направленную эволюцию, компьютерный анализ и моделирование комплексов ферментов с субстратами, а также сайт-направленный мутагенез.

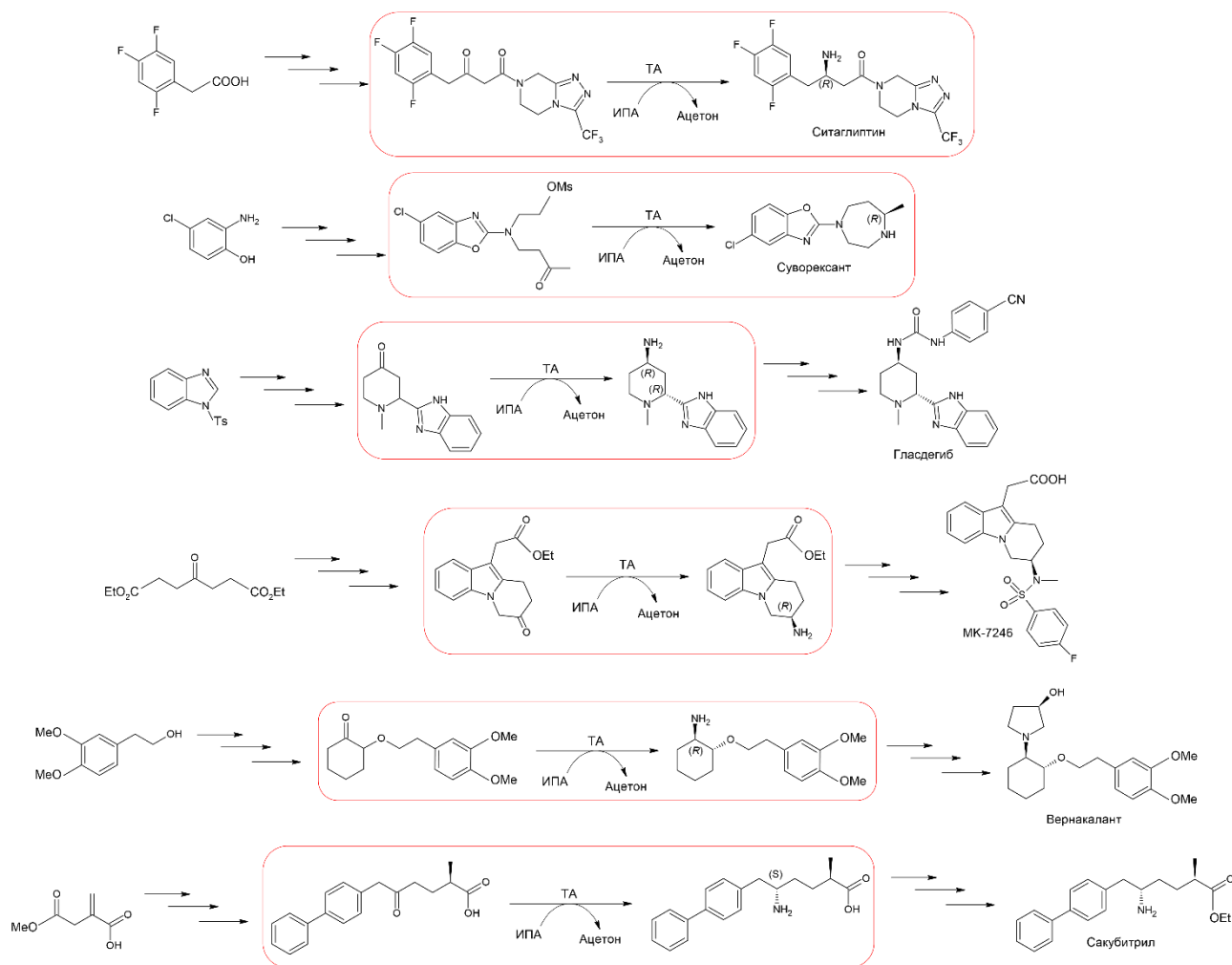


Рисунок 11. Схемы синтезов фармацевтических препаратов, включающие стадии с применение биокатализаторов на основное трансминаза. ИПА – изопропиламин, Ms – метансульфонил, Ts - п-толуолсульфонил.

В биокатализе перспективными также являются DAAT для синтеза D-аминокислот различного строения. D-аминокислоты проявляют множество биологических функций: помимо структурных компонентов бактериальной клеточной стенки и регуляции роста растений, являются нейромодуляторами и иммуномодуляторами у млекопитающих, присутствуют в различных пищевых продуктах в качестве усилителей вкуса и аромата, а также являются структурными блоками многих молекул, обладающих терапевтическим действием [154,172–174] (Рисунок 12). Получение D-аминокислот, таким образом, актуально как для прикладных, так и для фундаментальных областей химии, биологии, медицины, сельского хозяйства, пищевой промышленности и др. Химически D-аминокислоты получают из молекул-предшественников (кетонов, альдегидов, карбоновых кислот и др.) в результате нескольких стадий превращения иногда с использованием стереоселективных металлокатализаторов и органических катализаторов [175,176]. Однако, как уже было

отмечено ранее, классические методы органического синтеза оптически чистых соединений значительно уступают биокаталитическим подходам по ряду параметров: стерео- и региоселективность, биосовместимость и ресурсосбережение. На сегодня описан ряд ферментов, участвующих в метаболизме D-аминокислот, и предложено несколько биокаталитических путей получения различных D-аминокислот, включающие DAAT в качестве ключевых ферментов [74,152,177–180].

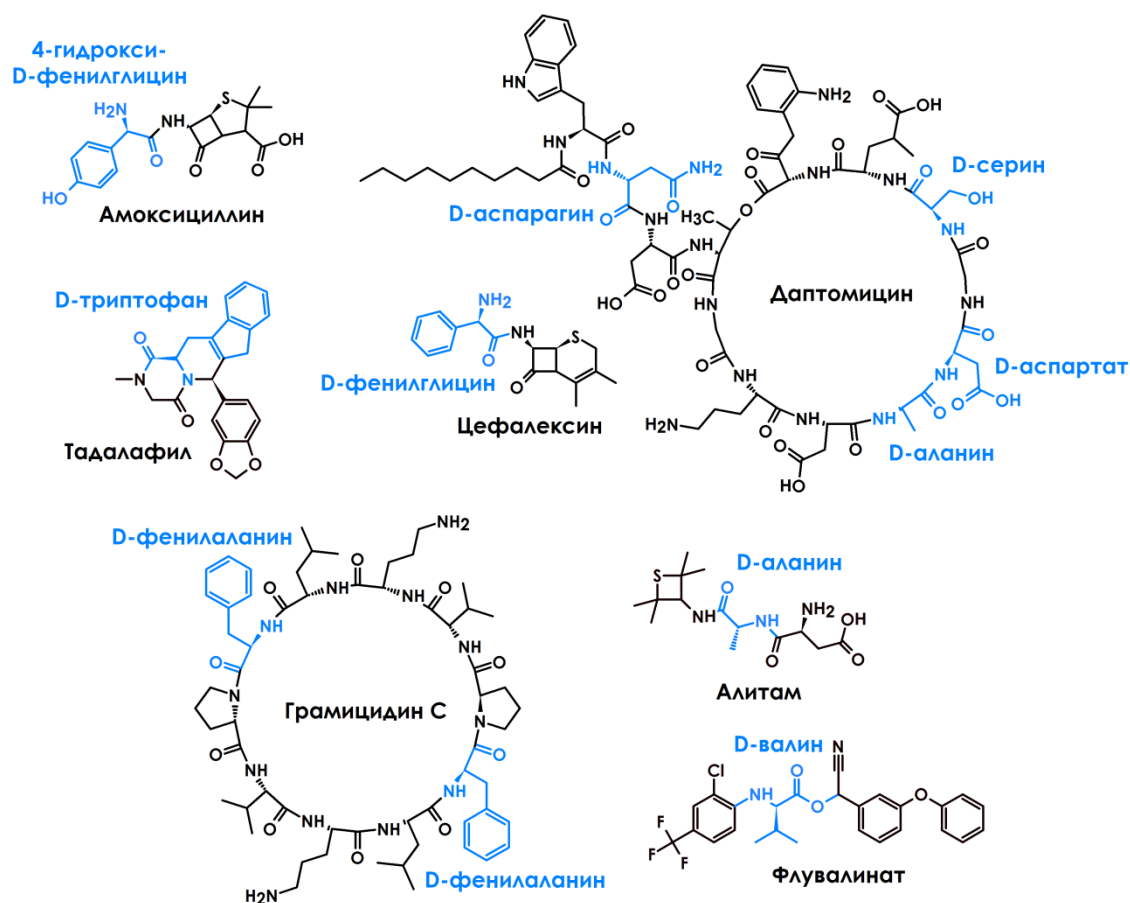


Рисунок 12. Структурные формулы соединений, содержащих D-аминокислоты в качестве структурных блоков (выделены голубым), которые используются в медицине (амоксициллин, тадалафил, цефалексин, даптомицин, грамицидин С), сельском хозяйстве (флувалинат) и пищевой индустрии (алитам).

Как биокатализаторы трансминазы, однако, имеют несколько недостатков. Помимо нестабильности ферментов как таковых в промышленных условиях, трансминазы отличаются узкой субстратной специфичностью, ингибируются субстратом или продуктом, кроме того ферментативная реакция трансминирования обратима (термодинамическая константа равновесия реакции трансминирования – около единицы) [5,7,8,32,39,40,130,131]. Для повышения стабильности трансминаз применяется подбор стабилизирующих добавок, иммобилизация и введение аминокислотных замен методами белковой инженерии [39,40,130–

135]. Для повышения активности трансаминаз с природными субстратами и введения активности с неприродными субстратами используют методы белковой инженерии (направленная эволюция, рациональный дизайн, введение неприродных аминокислот в аминокислотную последовательность фермента) [39,40,131,135–138]. Для снижения эффекта ингибирования трансаминаз субстратом (при высоких концентрациях в промышленных условиях) предложены стратегия постепенного добавления субстрата в реакционную смесь и подбор неингибирующих субстратов [39,40,131,139]. Устранение ингибирования трансаминаз продуктом реакции достигается выведением продукта из реакционной смеси физическими, энзиматическими и химическими методами (Рисунок 13) [39,40,131,140–142]. Удаление кетопродукта также способствует смещению равновесия реакции трансаминирования в сторону целевого аминокислотного продукта. Известны примеры изменения свойств ферментов методами белковой инженерии для целей снижения эффекта ингибирования трансаминаз субстратами/продуктами [135,143].

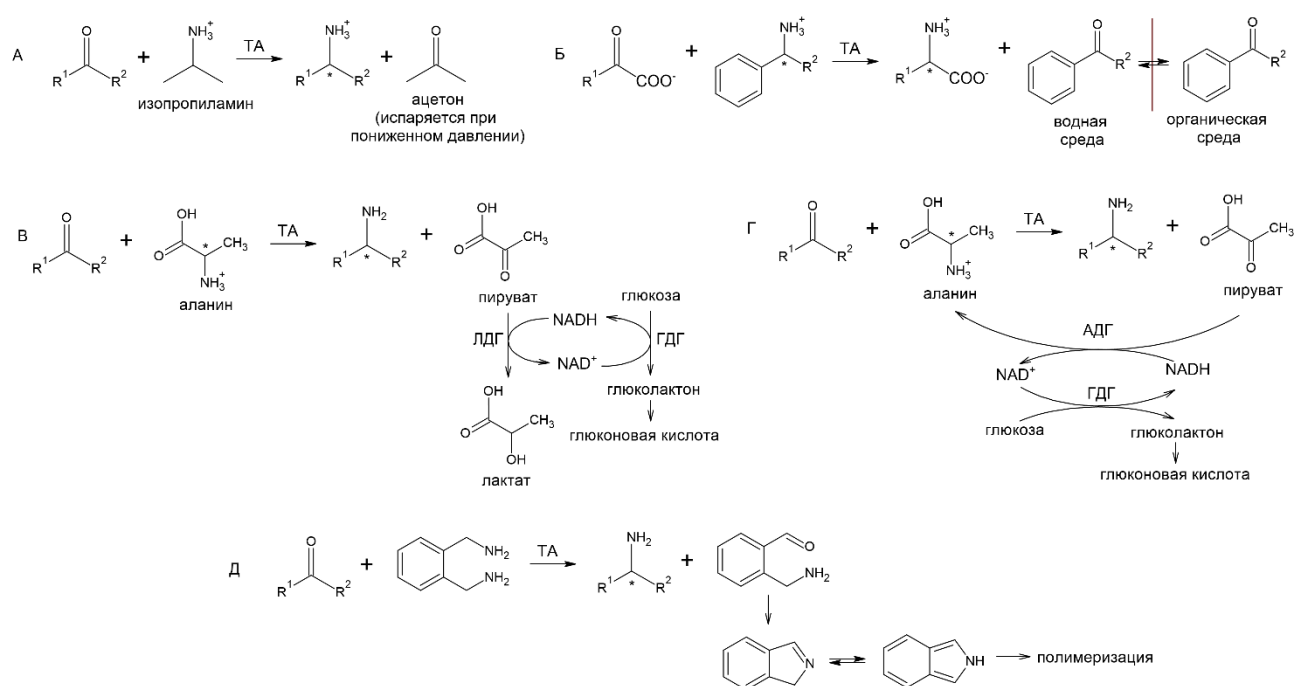


Рисунок 13. Примеры подходов к снижению ингибирования кетопродуктом и смещению равновесия ферментативной реакции трансаминирования в сторону продуктов. (А) Удаление летучего продукта путем снижения давления, (Б) экстракция продукта в несмешивающуюся органическую фазу; (В, Г) энзиматические методы выведения продукта; (Д) выведение продукта путем полимеризации. ТА – трансаминаза, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, ГДГ – глюкозодегидрогеназа, АДГ – аланиндегидрогеназа.

Использование легкодоступного изопропиламина в качестве аминокислотного донора (Рисунок 13

А) [144] приводит к продукту деаминирования ацетону, который обладает низкой

реакционной способностью и высокой летучестью. Как результат, практически отсутствует ингибирование фермента, а выходы продуктов реакций достигаются 97-99% [5,145–147]. Однако не каждая трансаминаза может деаминировать изопропиламин. Проведение реакций в двухфазных системах способствует экстракции кетопродукта в органическую фазу, что также снижает эффект ингибирования и смещает равновесие реакции в сторону целевого аминокпродукта (Рисунок 13 Б) [39,40,131,148]. Широкое распространение получили энзиматические методы смещения равновесия реакции трансаминирования (Рисунок 13 В, Г) [149–151]. L- или D-аланин являются аминокдонорами для многих (*S*)- или (*R*)-селективных трансаминаз соответственно. Смещение равновесия трансаминазной реакции здесь возможно с помощью лактатдегидрогеназы (ЛДГ), которая превращает пируват (кетопродукт) в лактат. Также возможна регенерация L- или D-аланина ферментами аланиндегидрогеназой (АДГ) или диаминопимелатдегидрогеназой соответственно [149–152]. Последняя катализирует восстановительное аминирование L-2-амино-6-оксогептандиоата, но также способна превращать некоторые α -кетокислоты в соответствующие D-аминокислоты и наиболее активна с пируватом [153]. Применяемые дегидрогеназы являются NAD(P)-зависимыми. Для таких систем возможна рециркуляция нестабильного и достаточно дорогого кофактора NAD(P)H путем окисления дешевых глюкозы, формиата или этанола глюкозодегидрогеназой, формиатдегидрогеназой или алкогольдегидрогеназой соответственно [149,151,152]. Для смещения равновесия трансаминазной реакции также предложено использовать так называемые «умные» аминокдоноры, которые превращаются в высокореакционные копродукты [72,154–157]. Например, ксилитендиамины (Рисунок 13 Д) в результате реакции трансаминирования превращаются в аминокальдегиды, далее происходит их внутримолекулярная циклизация и таутомеризация с образованием изоиндоллов, которые, в свою очередь, полимеризуются и легко удаляются из реакционной смеси [157]. Такие аминокдоноры пока не нашли широкого применения в биокатализе, так как не все трансаминазы с ними активны, а также ввиду их высокой стоимости.

Таким образом, трансаминазы, безусловно, пригодны для асимметрического аминирования кетосоединений. Однако эффективное их использование в биотехнологиях невозможно без преодоления перечисленных выше природных особенностей как ферментов, так и реакции трансаминирования. Поэтому создание биотехнологии на основе природных трансаминаз требует как детального понимания взаимосвязи структуры и функции этих ферментов, так и разработки системы смещения равновесия реакции.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и реактивы

На всех стадиях генно-инженерных и микробиологических манипуляций, выделения, очистки и кристаллизации ферментов, а также анализа их свойств использовали компоненты буферных систем (K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , CH_3COONa , Трис, CHES, HEPES, MOPS), соли (NaCl, RbCl, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $(NH_4)_2S_2O_8$), кислоты (соляная, уксусная, фосфорная), щелочи (KOH, NaOH), спирты (метанол, этанол, глицерин) и пр. (дрожжевой экстракт, триптон, агар, агароза, бромистый этидий, ампициллин, хлорамфеникол, ИПТГ, имидазол, ЭДТА, мочевиная, β -меркаптоэтанол, ДТТ, PMSF, акриламид, ДДС, ТЕМЕД, глицин, кумасси R250, ПЭГ и пр.) наивысшей доступной степени чистоты от производителей Sigma (США), Acros Organics (Германия), AppliChem (Германия), Serva (Германия), Fluka (Германия), Thermo Fischer Scientific (США), Хеликон (Россия), Диа-М (Россия), Химмед (Россия). Субстраты, включая оптически чистые аминокислоты и амины, кетокислоты, кофакторы PLP, NADH и NAD^+ и ферменты ЛДГ, ГДГ были наивысшей степени чистоты от производителей Sigma (США), Roche (Швейцария) и Acros Organics (Германия). Все растворы были приготовлены на основе деионизованной воды, полученной в результате очистки дистиллированной воды на системе Milli-Q Gradient (Millipore, США) до 18,1-18,3 МОм/см.

Рекомбинантные формы ферментов, используемые в работе, были получены в ходе гетерологической экспрессии соответствующих генов в штамме-продуценте *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (Novagen, Германия). Для генно-инженерных манипуляций, включающих клонирование и мутагенез, использовали клетки *E. coli* штамма Mach1 T1 (Thermo Fischer Scientific, США). Синтетический ген AmicoTA был синтезирован ООО Сервис-Ген (Россия). Синтетический ген (*R*)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназы из *Acidaminococcus fermentans* (ГГДГ) был синтезирован ООО СкайДжин (Россия). Олигонуклеотидные последовательности для сайт-направленного мутагенеза были синтезированы ЗАО Евроген (Россия). Гены ферментов клонировали в плазмидный вектор pET-21d, модифицированный с целью экспрессировать белки с 6-His-фрагментом и сайтом узнавания протеазы вируса гравировки табака (*Tobacco etch virus*, TEV-протеаза) на N-конце (pET-21d-HisTEV) [181]. TEV-протеазу экспрессировали в составе вектора pET-21d с не отщепляемым 6-His-фрагментом на C-конце. Плазмиды pET-21d-HisTEV и pET-21d, несущую ген TEV-протеазы, были любезно предоставлены с.н.с., к.б.н. Ракитиной Татьяной Владимировной (Институт биоорганической

химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН). Для клонирования генов и мутагенеза использовали эндонуклеазы рестрикции NdeI и HindIII, T4 ДНК-лигазу, ДНКазу Dpn и буферы R, T4 и Tango от производителя Fermentas (Латвия).

Автор глубоко признателен с.н.с., к.б.н. Ракитиной Татьяне Владимировне за помощь в проведении работ по клонированию и экспрессии WT AmicoTA.

2.2. Основные методы работы с ДНК и бактериальными клетками

2.2.1. Электрофорез ДНК

Электрофорез ДНК проводили в 1% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, в Трис-ацетатном электродном буфере (40 мМ Трис, 20 мМ уксусной кислоты, 1 мМ ЭДТА, рН 8,4) при напряжении 85-90 В. В качестве источника тока использовали PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories, США). ДНК в геле визуализировали на УФ-трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Германия) при длине волны 254 нм. В качестве контроля использовали смесь стандартов ДНК-фрагментов GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fischer Scientific, США).

2.2.2. Определение концентрации ДНК

Концентрацию двухцепочечной ДНК определяли спектрофотометрически при длине волны 260 нм, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{260} = 0,02 \text{ (мг/мл)}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, на планшетном спектрофотометре SPECTROstar Omega (BMG Labtech, Германия), в микропланшете LVis (BMG Labtech, Германия).

2.2.3. Рестрикция плазмидных ДНК

Рестрикцию плазмидных ДНК (5-10 мкг/мл) проводили в 1-кратном буфере R (10x буфер R: 100 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ MgCl₂, 1 М KCl, 10 мг/мл БСА) в присутствии эндонуклеаз рестрикции NdeI (0,4 Ед/мкл) и HindIII (0,4 Ед/мкл) при 37 °С в течение 1 часа.

2.2.4. Выделение ДНК-фрагментов из агарозного геля

После проведения препаративного ДНК-электрофореза нужные полосы с фрагментами ДНК вырезали из геля и помещали в пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Выделение ДНК-фрагментов из геля проводили с помощью специального набора Cleanup S-Cap (Евроген,

Россия) согласно рекомендациям производителя. Выделенные фрагменты ДНК сразу использовали для работы или хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.5. Лигирование фрагментов ДНК

Лигирование целевых фрагментов ДНК проводили в 1-кратном буфере Т4 (10х буфер Т4: 500 мМ Трис-НСl, рН 7,6, 100 мМ MgCl₂, 10 мМ АТФ, 10 мМ ДТТ, 50% (w/v) ПЭГ-8000) в присутствии Т4 ДНК-лигазы (1,5 Ед/мкл) при 10-15 °С в течение 14-16 часов. Молярное отношение векторной ДНК и ДНК-вставки в реакционной смеси было не менее 1:3.

2.2.6. Приготовление компетентных клеток *E. coli*

10 мл ночной культуры клеток *E. coli* разбавляли в 10 раз (до 100 мл) в среде LB (на 1 л воды – 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl и 3 мл 1 М Трис-НСl, рН 7,5) и растили в стеклянной колбе объемом 1 л на качалке (180 об/мин) при 37 °С и максимальной аэрации до достижения оптической плотности при 600 нм 0,3-0,6. Затем клетки переносили в пластиковые пробирки объемом 50 мл, остужали до 4 °С, центрифугировали 15 минут при 4 °С, 3000 об/мин и удаляли супернатант. Затем охлажденные клетки ресуспендировали в 33 мл буфера RF1 (30 мМ К-ацетат, рН 5,8, 100 мМ RbCl, 50 мМ MnCl₂·4H₂O, 10 мМ CaCl₂·2H₂O, 15% глицерина), инкубировали во льду в течение 15 минут, центрифугировали и удаляли супернатант. Затем клетки ресуспендировали в 8 мл буфера RF2 (10 мМ MOPS, рН 6,8, 10 мМ RbCl, 75 мМ CaCl₂·2H₂O, 15% глицерин), инкубировали во льду в течение 15 минут, переносили в пластмассовые пробирки и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.7. Трансформация клеток *E. coli*

Для трансформации к 100 мкл компетентных клеток *E. coli* добавляли 10 мкл реакционной смеси после лигирования или 1-3 мкл 25-50 мкг/мл чистой плазмидной ДНК и выдерживали во льду 20-30 минут. Затем клетки подвергали тепловому шоку при 42 °С в водном термостате (SIA ELM1, Латвия) в течение 2 минут и охлаждали на льду в течение 5 минут. После добавляли 500 мкл среды LB, растили клетки на качалке (180 об/мин) при 37 °С в течение 1 часа и высевали клетки на чашку Петри с твердой средой LB с добавлением 1,5% агарозы, а также с добавлением 30 мкг/мл ампициллина в случае клеток *E. coli* Mach1 или 30 мкг/мл ампициллина и 20 мкг/мл хлорамфеникола в случае клеток *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Колонии на чашках Петри выращивали при 37 °С в течение 14-16 часов.

2.2.8. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*

Плазмидную ДНК выделяли из клеток *E. coli* Mach1 с помощью набора Plasmid miniprep (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Одиночную колонию с чашки Петри инокулировали в 4 мл среды LB, содержащую 30 мкг/мл ампициллина, и растили на качалке (180 об/мин) при 37 °С и максимальной аэрации в течение 14-16 часов. Полученную суспензию клеток использовали для выделения плазмидной ДНК, которую затем сразу использовали в работе или хранили при -20 °С.

2.2.9. Сайт-направленный мутагенез

Сайт-направленный мутагенез проводили с помощью ПЦР с одним праймером на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) по методике, описанной в работах [182,183]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 5-10 нг/мкл ДНК-матрицы (плазмидная ДНК, содержащая ген фермента), 0,8 мкМ праймера, несущего нуклеотидную замену, а также ДНК-полимеразу, смесь дезоксинуклеотидов и буфер, взятых из специального набора Encyclo Plus PCR kit (Евроген, Россия) в концентрациях, рекомендуемых производителем. ПЦР проводили в следующем режиме: 1-я стадия – 95 °С, 30 с; 2-я стадия – 55 °С, 30 с; 3-я стадия – 72 °С, 6,5 мин; всего 18 циклов. В конце смесь выдерживали еще 7 минут при 72 °С.

2.2.10. Проверочный ПЦР на колониях клеток *E. coli*

Для поиска колоний клеток *E. coli*, несущих плазмиду с нужной мутацией, проводили проверочный ПЦР с двумя праймерами на колониях. Первым праймером (Check-праймер) была олигонуклеотидная последовательность длиной 18-21 нуклеотидов, комплементарная участку гена с введенной нуклеотидной заменой. При этом на 3'-конце праймера были 1-3 нуклеотида, комплементарные нуклеотидной замене и не комплементарные соответствующему участку в гене WT. Если нуклеотидная замена находилась ближе к 5'-концу гена, то Check-праймер конструировали в прямом направлении, если ближе к 3'-концу, то в обратном. Вторым праймером использовали стандартный T7-праймер в прямом или обратном направлении, в зависимости от направления Check-праймера. Таким образом, в присутствии плазмидной ДНК, несущей нуклеотидную замену, в ходе ПЦР накапливался фрагмент ДНК определенной длины. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала два праймера в концентрациях по 0,8 мкМ, а также Taq ДНК-полимеразу, буфер и смесь

дезоксинуклеотидов, взятых из набора TaqDNA Polymerase dNTP mix (Евроген, Россия) в концентрациях, рекомендуемых производителем. В пробирки с приготовленной ПЦР-смесью инокулировали одиночные колонии с чашки Петри и проводили ПЦР в следующем режиме: 1-я стадия – 95 °С, 20 с; 2-я стадия – 49 °С, 20 с; 3-я стадия – 72 °С, 50 с; всего 25 циклов. В конце смесь выдерживали еще 5 минут при 72 °С. В качестве отрицательного контроля использовали плазмидную ДНК-матрицу, несущую ген WT, в качестве положительного контроля – реакционной смеси после ПЦР-мутагенеза. По окончании проверочного ПЦР пробы анализировали с помощью ДНК-электрофореза.

2.3. Основные методы анализа белков

2.3.1. Электрофорез белков в денатурирующих условиях

Электрофорез белков в денатурирующих условиях проводил в 12,6% полиакриламидном геле в электрофоретической ячейке Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США) при постоянном напряжении 190 В. В качестве источника тока использовали PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories). Составы растворов и их объемы для приготовления полиакриламидных гелей приведены в таблице 6. Электрофорез проводили в электродном буфере (0,025 М Трис, 0,192 М глицин, рН 8,2, 0,1% ДДС). Перед внесением в гель к 5 мкл белковой пробы добавляли 20 мкл буфера для образцов (200 мМ Трис-НСl, рН 6,8, 2% ДДС, 20% глицерин, 0,7 М β-меркаптоэтанол, 0,05% бромфеноловый синий). Белковые образцы с буфером инкубировали при 97 °С в течение 10 минут. На дорожку наносили 3-6 мкг белка. По окончании электрофореза гель окрашивали раствором Кумасси G-250 (0,3% Кумасси G-250, 40% метанола и 10% уксусной кислоты) в течение 45 минут при 75 °С и затем удаляли лишнюю краску с геля, выдерживая его в 7% уксусной кислоте.

Таблица 6. Состав и объем растворов для приготовления 1 пластины ПААГ

Компоненты геля	Разделяющий гель (12,6% акриламид)	Концентрирующий гель (5% акриламид)
Раствор акриламида (30% акриламида, 0,8% бисакриламида), мл	2,4	0,5
Буфер разделяющего геля (1,5 М Трис-НСl, рН 8,8), мл	3,0	-
Буфер концентрирующего геля (0,5 М Трис-НСl, рН 6,8), мл	-	1,5
Вода, мл	0,6	2,0
ТЕМЕД, мкл	6,0	3,0
10% ДДС, мкл	60,0	30,0
10% Персульфат аммония, мкл	30,0	15,0

2.3.2. Определение концентрации белков

Концентрацию белков определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм, используя рассчитанный коэффициент экстинкции (<https://web.expasy.org/protparam/>) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре Evolution 300 UV0Vis (Thermo Fisher Scientific, США).

2.3.3. Спектральный анализ

Спектры поглощения регистрировали в 1 мл кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре Evolution 300 UV-Vis в диапазоне длин волн 190-550 нм. Спектры флуоресценции регистрировали в 1 мл кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см на флуориметре FluoroMax-4 (Horiba Scientific, Япония) в диапазоне длин волн 350-600 нм и 390-600 нм при возбуждении при длинах волн 328 нм и 380 нм соответственно.

2.4. Получение рекомбинантных форм ферментов

2.4.1. Клонирование генов ферментов

Последовательности генов Amico_1844, кодирующего AmicoTA, и Acfer_0976, кодирующего ГГДГ, были взяты из аннотированных геномов *Aminobacterium colombiense* (штамм DSM 12261/ALA-1) [184] и *Acidaminococcus fermentans* (штамм ATCC 25085) [185] соответственно и оптимизированы для экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* с помощью онлайн сервиса Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>). На 5'- и 3'-концы оптимизированных последовательностей добавляли последовательности сайтов эндонуклеаз

рестрикции NdeI и HindIII соответственно, и итоговые последовательности генов синтезировали в составе плазмидного вектора pAPG110. Полученные вектора с синтетическим генами обрабатывали парой эндонуклеаз рестрикции NdeI и HindIII. Далее реакционную смесь разделяли с помощью препаративного ДНК-электрофореза, нужные ДНК-фрагменты вырезали и выделяли из геля. Выделенные ДНК-фрагменты лигировали с вектором pET-21d-HisTEV, обработанным теми же эндонуклеазами рестрикции. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* Mach1, из них выделяли плазмидный вектор pET-21d-HisTEV, несущий целевой ген, которым затем трансформировали клетки *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Во всех полученных плаزمидах проверяли последовательности целевых генов путем их секвенирования.

Автор благодарен сотрудникам ЦКП «Биоинженерия» ФИЦ Биотехнологии РАН с.н.с. Колгановой Татьяне Владимировне и м.н.с. Баслерову Роману Валерьевичу за проведение экспериментов по секвенированию ДНК.

2.4.2. Создание вариантов AmicoTA

Одиночные и двойные аминокислотные замены в последовательности AmicoTA вводили методом сайт-направленного мутагенеза. После мутагенезного ПЦР в реакционную смесь добавляли ДНКазу Dpn (0,1 Ед/мкл) и инкубировали ее при 37 °С в течение 2 часов, далее этой смесью трансформировали клетки *E. coli* Mach1, которые после растили на чашках Петри. Выросшие одиночные колонии проверяли на наличие плазмид, несущих ген AmicoTA с введенными нуклеотидными заменами, методом проверочного ПЦР с колоний. Список праймеров для мутагенеза и проверочного ПЦР приведен в таблице 7. Смеси проверочного ПЦР анализировали с помощью ДНК-электрофореза, отбирали по 2 колонии, несущие целевую нуклеотидную замену, выделяли из них плазмидную ДНК и проверяли ее последовательность методом секвенирования ДНК. После клетки *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS трансформировали плазмидной ДНК pET-21d-HisTEV, несущей ген AmicoTA с целевой нуклеотидной заменой.

Таблица 7. Олигонуклеотидные последовательности праймеров для введения одиночных и двойных аминокислотных замен в последовательность AmicoTA, а также для отбора клонов, несущих соответствующую замену.

Название	Последовательность праймера (5' - 3')
AmicoR27*L.Fwd	GACTTGATCATTCAGTTAGGTGTAGGCGTATTT
AmicoR27*Lcheck.Fwd	CGACTTGATCATTCAGTT
AmicoR88L.Fwd	TGCGAAACGATGGTTCTGCCGTATATCACCGG
AmicoR88Lcheck.Fwd	TGCGAAACGATG GTTCTG
AmicoK99*A/H101*A.Fwd	GTGACTCTTTCGGCGCGGACGCTCTGTTTCAGCAGCTC
AmicoK99*A/H101*Acheck.Fwd	CTCTTTCGGCGCGGACGC
AmicoE113A.Fwd	TACTTCGTTATCTTTGCGGAAATCCGTAACCA
AmicoE113Acheck.Fwd	GCTACTTCGTTATCTTTGC
AmicoS174P/H175T.Fwd	GAGATCGTCGAAGGTCCTACTAGCACGTTTTTTCTG
AmicoS174P/H175Tcheck.Fwd	GATCGTCGAAGGTCCTAC
AmicoK237A.Fwd	ATCACTGGAACGGTCGCGGAACTGCTGCCGGTA
AmicoK237Acheck.Rev	TACCGGCAGCAGTTCCG

2.4.3. Препаративная экспрессия генов ферментов

Гены, кодирующие аминокислотные последовательности WT AmicoTA, вариантов AmicoTA, ГГДГ и TEV-протеазы, экспрессировали в клетках *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Для препаративной экспрессии сначала получали 30 мл ночной культуры клеток, которую затем разбавляли в 100 раз (до 3 л) в среде LB в присутствии 20 мкг/мл ампициллина и 30 мкг/мл хлорамфеникола и разливали по 250 мл в 12 колб объемом 1 л. Клетки растили на качалке (180 об/мин) при 37 °С до значения оптической плотности при 600 нм 0,6-0,8, затем охлаждали до 25 °С, индуцировали экспрессию 0,2 мМ ИПТГ и инкубировали клетки около 18 часов на качалке (180 об/мин) при 25 °С. После клетки центрифугировали, удаляли супернатант и для хранения замораживали при -70 °С.

2.4.4. Выделение и очистка рекомбинантных форм ферментов

Составы буферов, используемых на стадиях выделения и очистки рекомбинантных форм ферментов, приведены в таблице 8. Размороженные клетки ресуспендировали в буфере 1, охлаждали во льду и обрабатывали ультразвуком в течение 10-15 минут на приборе Vibra-Cell VCX130 (Sonic and materials, США) в следующем режиме: импульс – 5 с, покой – 10 с, амплитуда – 65%. Затем добавляли 0,005 мг/мл ДНКазы (Sigma, США) и откручивали

разрушенные клетки в течение 45 минут при 18 500 об/мин и 4 °С. Далее супернатант фильтровали через 0,45 мкм фильтр (Millipore, США) и наносили на 5 мл колонку HisTrap HP (Cytiva, США), уравновешенную буфером 2 (здесь и далее скорость потока на колонке HisTrap HP была 1 мл/мин). Адсорбированный на колонке фермент с 6-His-фрагментом затем промывали буфером 3 и элюировали линейным градиентом от буфера 3 к буферу 4, пропустив 10 объемов колонки буфера 4. В случае трансаминаз после элюции белок инкубировали с 1 mM PLP в течение 1 часа при 25 °С, далее ферменты концентрировали на концентраторах с мембраной, размер пор которой составлял 30 кДа (Millipore, США), переводили в буфер 5, разбавляли глицерином в два раза и хранили при -20 °С. Ферменты с 6-His-фрагментом использовали для проведения функциональной характеристики AmicoTA WT и вариантов. Аминокислотные последовательности ферментов и их вариантов подтверждали методом MALDI.

Автор благодарен сотрудникам ЦКП «Промышленные биотехнологии» м.н.с. Каменихиной Инне Анатольевне и м.н.с. Исайкиной Татьяне Юрьевне за проведение масс-спектрометрических анализов для подтверждения аминокислотных последовательностей целевых ферментов.

Таблица 8. Составы буферов, используемых на стадиях выделения и очистки рекомбинантных форм ферментов.

Буфер	Состав
1	50 mM К-фосфат (50 mM Трис-HCl в случае TEV-протеазы), pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM имидазол, 0,5 M мочевины, 5 mM β-меркаптоэтанол, 1 mM ПМСФ, 10% глицерин, 0,2 мг/мл лизоцим и 100 мкМ PLP в случае трансаминаз
2	50 mM К-фосфат (50 mM Трис-HCl в случае TEV-протеазы), pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM имидазол, 1 mM ПМСФ и 0,1% тритон
3	50 mM К-фосфат (50 mM Трис-HCl в случае TEV-протеазы), pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM имидазол и 100 мкМ PLP в случае трансаминаз
4	50 mM К-фосфат (50 mM Трис-HCl в случае TEV-протеазы), pH 8,0, 500 mM NaCl, 500 mM имидазол и 100 мкМ PLP в случае трансаминаз
5	50 mM К-фосфат (50 mM Трис-HCl в случае TEV-протеазы), pH 8,0, 100 mM NaCl, 5 mM β-меркаптоэтанол и 100 мкМ PLP в случае трансаминаз
6	50 mM HEPES, pH 7,5, 10% глицерин, 1 mM ЭДТА, 5 mM β-меркаптоэтанол, 100 мкМ PLP
7	50 mM HEPES, pH 8,0, 100 mM NaCl и 100 мкМ PLP
8	20 mM HEPES, pH 8,0, 20 mM NaCl
9	20 mM HEPES, pH 8,0, 500 mM NaCl
10	20 mM HEPES, pH 8,0, 50 mM NaCl, 100 мкМ PLP, 1 mM ДТТ

Для кристаллизации AmicoTA WT и вариантов отщепляли 6-His-фрагмент и проводили дополнительные стадии очистки. Фракцию фермента с 6-His-фрагментом инкубировали в течение ночи при 4 °С с TEV-протеазой (1 мг протеазы на 10 мг фермента), имеющей 6-His-фрагмент, в буфере 6. Затем реакционную смесь переводили в буфер 4 с помощью диализа (2 часа при 25 °С) и наносили на колонку HisTrap HP, уравновешенную этим же буфером. TEV-протеаза с 6-His-фрагментом, а также отщепленный от фермента 6-His-фрагмент сорбировались на колонке, тогда как свободный от 6-His-фрагмента фермент проходил не сорбируясь. Собранную фракцию AmicoTA WT или варианта без 6-His-фрагмента инкубировали с 1 mM PLP в течение 1 часа при 25 °С, концентрировали до 10-15 мг/мл и подвергали гель-проникающей хроматографии на колонке Superdex 200 10/300 GL (Cytiva, США), уравновешенную буфером 7. Собранную фракцию димера в ходе гель-проникающей хроматографии дополнительно очищали с помощью анионообменной хроматографии (АОХ). Фракцию фермента переводили в буфер 8 с помощью колонки для обессоливания HiTrap Desalting (Cytiva, США) и наносили на колонку MonoQ 10/100 GL (Cytiva, США), уравновешенную этим же буфером и элюировали адсорбированный на колонке фермент линейным градиентом от буфера 8 к буферу 9, пропустив 10 объемов колонки буфера 9. Для кристаллизации использовали основную фракцию PLP-формы AmicoTA в ходе АОХ, которую затем переводили в буфер 10 с помощью колонки HiTrap Desalting, концентрировали до 15-17 мг/мл и замораживали при -70 °С. Процесс отщепления 6-His-фрагмента и чистоту полученных белковых препаратов контролировали с помощью белкового электрофореза в денатурирующих условиях. Белковые фракции в ходе хроматографии детектировали спектрофотометрически при длинах волн 280 нм и 410 нм в случае трансаминаз.

2.5. Анализ функциональных свойств AmicoTA и вариантов

2.5.1. Определение активности трансаминаз

Для анализа функциональных свойства AmicoTA WT и вариантов использовали их рекомбинантные формы с 6-His-фрагментом на N-конце. Все значения ферментативной активности измеряли минимум в трех повторениях. Полученные кинетические кривые и концентрационные зависимости анализировали с помощью программы OriginPro (OriginLab, США).

Метод полуреакций трансаминирования

Скорость полуреакции трансаминирования PLP-формы AmicoTA WT или вариантов с различными аминодонорами регистрировали спектрофотометрически по убыли оптической плотности в области 410-415 нм в ходе превращения внутреннего альдимина фермента в кетимин (Рисунки 3, 14). Полуреакции анализировали между 35 мкМ PLP-формой AmicoTA и 0,5-500 мМ аминодонорами. Так как субстрат находится в значительном избытке по отношению к ферменту, каждую полуреакцию рассматривали как реакцию первого порядка, и константу скорости полуреакции k_{obs} определяли из аппроксимации зависимости поглощения $A_{410-415}$ от времени уравнением (1):

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

где A_t – поглощение во время t , ΔA – изменение поглощения за период $t = 0$ и $t = \infty$, A_∞ – конечное поглощение и k_{obs} – наблюдаемая константа скорости первого порядка.

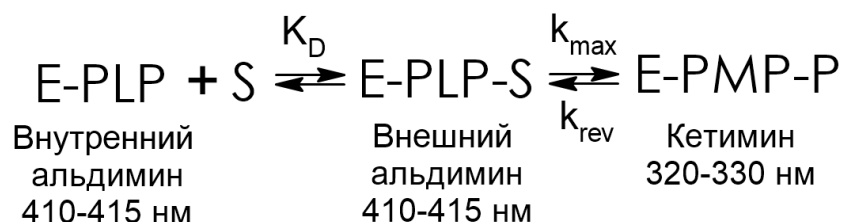


Рисунок 14. Схема первой полуреакции трансаминирования с указанием максимумов поглощения промежуточных соединений. E – фермент, S – субстрат, P – продукт.

Кинетические параметры полуреакций трансаминирования (Рисунки 3, 14): k_{max} (максимальная константа скорости), K_D (константа диссоциации фермент-субстратного комплекса), k_{max}/K_D (константа специфичности) и k_{rev} (константа скорости обратной реакции) определяли из аппроксимации зависимости наблюдаемой константы скорости полуреакции (k_{obs}) от концентрации субстратов ($[S]$) уравнением (2):

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

ЛДГ и ГГДГ метод

Скорость реакций трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом и между D-глутаматом и пируватом определяли по второй ферментативной реакции с NAD-зависимыми лактатдегидрогеназой (ЛДГ метод) из мышц кролика (Roche, Швейцария) и рекомбинантной (R)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназой (ГГДГ метод) из *A. fermentans* (см.

п. 2.4.3. и 2.4.4.) соответственно. Скорость реакций регистрировали спектрофотометрически при 340 нм по убыли кофактора NADH ($\epsilon(\text{NADH}) = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) в ходе восстановления продукта реакции трансаминирования пирувата в случае ЛДГ метода или α -кетоглутарата в случае ГГДГ метода на планшетном спектрофотометре SPECTROstar Omega в 96-лучночных УФ-планшетах (Greiner Bio-One, Германия). Анализ активности проводили в присутствии 5-500 мМ D-аланина и 0,5-20 мМ α -кетоглутарата или 1-30 мМ D-глутамата и 10-500 мМ пирувата, 0,01-1 мкМ AmicoTA WT или варианта, 60 мкМ PLP, 330 мкМ NADH и 4 U/мл ЛДГ или ГГДГ соответственно. Реакцию запускали добавлением D-аминокислоты после прогрева реакционной смеси в течение 10 минут. Стандартную реакцию трансаминирования проводили в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0, при 60 °C с 50 мМ D-аланином и 5 мМ α -кетоглутаратом. Ферментативную активность определяли по тангенсу угла наклона начального линейного участка кинетической кривой. Одна единица ферментативной активности (U) соответствует количеству фермента, который катализирует превращение 1 мкмоль субстрата в продукт за минуту.

Кинетические параметры полных реакций трансаминирования: V_{max} (максимальная скорость), K_M^A , (константа Михаэлиса субстрата А) и K_M^B (константа Михаэлиса субстрата В) определяли из аппроксимации зависимости наблюдаемой скорости реакции (V) от концентрации субстрата при фиксированной концентрации косубстрата уравнением (3):

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

2.5.2. Определение pH- и температурных профилей

Влияние pH и температуры на активность AmicoTA WT и вариантов анализировали в полной реакции трансаминирования между 50 мМ D-аланином и 5 мМ α -кетоглутаратом ЛДГ методом. pH-оптимум реакций определяли при 30 °C в следующих буферах: 50 мМ Na-ацетат, pH 4,0-5,6, смешанный буфер 25 мМ Трис-HCl / 25 мМ К-фосфат, pH 5,8-9,0, 50 мМ CHES, pH 9,0-10,0. Температурную зависимость определяли в диапазоне 30-70 °C в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8,0 или 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5,2. Для измерения ферментативной активности при 65 и 70 °C из реакционной смеси отбирали аликвоты через определенные промежутки времени и замораживали их. Затем определяли концентрацию образовавшегося пирувата в аликвоте с помощью ЛДГ при 25 °C в 100 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,0,

используя линейный калибровочный график – зависимость активности ЛДГ от концентрации пирувата.

2.5.3. Определение термостабильности трансаминаз

Анализ термической денатурации

Денатурацию ферментов с повышением температуры анализировали с помощью кругового дихроизма. Измеряли изменение молярной эллиптичности $[\theta]$ при 210 нм 10 мкМ фермента в 20 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8,0, в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 мм. Измерения проводили на КД-дихрографе Chirascan с термостатируемой ячейкой Пельтье (Applied Photophysics, Великобритания). Нагревание от 35 до 93 °С проводили со скоростью 1 °С/мин. Среднюю температуру термической денатурации ($T_{0,5}$) рассчитывали из аппроксимации зависимости молярной эллиптичности от температуры уравнением Больцмана (4):

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x - x_0)/C}} + A_2, \quad (4)$$

где A_1 – начальное значение молярной эллиптичности, A_2 – конечное значение молярной эллиптичности, x_0 – средняя температура полуперехода белка из нативного состояния в денатурированное (средняя температура термической денатурации $T_{0,5}$), C – коэффициент крутизны кривой.

Автор благодарен сотруднику ЦКП «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН инженеру Баранову Олегу Евгеньевичу за помощь в проведении экспериментов по круговому дихроизму.

Кинетические методы определения термостабильности ферментов

Термостабильность AmicoTA также характеризовали по определению остаточной ферментативной активности в стандартной реакции трансаминирования. 30 мкМ PLP-формы фермента инкубировали в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0 в присутствии 100 мкМ PLP при различных температурах. Помимо термостабильности в буфере анализировали операционную стабильность AmicoTA в тех же условиях в присутствии 100 мМ D-лейцина и 20 мМ α -кетоглутарата.

2.5.5. Анализ «утечки» PLP из активного центра и встраивания PLP в активный центр

«Утечку» (выход) PLP из активного центра AmicoTA и встраивания PLP в активный центр анализировали спектрофотометрически. Присутствие связанного кофактора PLP в активном центре контролировали по спектрам поглощения в области 300-500 нм. PLP, связанный внутри активного центра фермента через основание Шиффа, имеет максимум поглощения при 410 нм, тогда как свободный PLP имеет максимум поглощения при 390 нм. Скорость «утечки» PLP из активного центра регистрировали по убыли оптической плотности при 430 нм, чтобы минимизировать вклад свободного PLP в поглощение. Константу скорости диссоциации ($k_{\text{дисс}}$) комплекса AmicoTA с PLP рассчитывали из линейного участка кинетической кривой с помощью уравнения (5):

$$k_{\text{дисс}} = -\frac{1}{A_0} \times \frac{dA}{dt}, \quad (5)$$

где A_0 – значение поглощения в начальный момент времени.

2.5.6. Определение выходов и энантиомерных избытков продуктов синтеза D-аминокислот

Выход продуктов определяли в реакциях трансаминирования, катализируемых AmicoTA, D-глутамат + 2-оксобутират, D-глутамат + 2-оксвалерат, D-глутамат + 4-метил-2-оксвалерат, D-глутамат + фенилпируват и D-глутамат + 2-оксо-4-фенилбутират. Для смещения равновесия трансаминазной реакции применяли трехферментную систему. Продукт реакции трансаминирования α -кетоглутарат выводили из реакционной смеси путем его восстановления до (R)-2-гидроксиглутарата ГГДГ, а кофактор NADH регенерировали путем окисления D-глюкозы глюкозодегидрогеназой (ГДГ) из *Pseudomonas* sp. (Sigma, США). Реакции проводили при 30 °C в различных буферах: 100 мМ К-фосфат, pH 7,5 и 100 мМ CHES, pH 9,0. Варьировали концентрации субстратов: (1) 100 мМ D-глутамата, 50 мМ α -кетокислоты, 150 мМ D-глюкозы; (2) 500 мМ D-глутамата, 500 мМ α -кетокислоты, 1 М D-глюкозы (в случае 2-оксо-4-фенилбутират в систему добавляли 20% ДМСО). Также варьировали концентрацию кофактора PLP: 100, 200 и 500 мкМ. Концентрации ферментов и кофактора NADH во всех случаях были одинаковые: 4 мг/мл AmicoTA (около 1 U/мл), 180 U/мл ГГДГ (0,01 мг/мл), 30 U/мл ГДГ (0,6 мг/мл) и 1 мМ NADH. Выход продуктов определяли по убыли концентрации субстрата – α -кетокислоты с помощью ВЭЖХ (Akta Purifier, США) с УФ-Вид-детектором на

колонке C-18 (Zorbax, Eclipse XDB-C18, 5 мкм, 4,6 × 150 мм (Agilent, США)). Реакции останавливали путем отделения низкомолекулярной фракции от белковой с помощью концентраторов Amicon-Ultra-15 (Millipore, США), низкомолекулярную фракцию разбавляли в 10 раз и 20 мкл наносили на колонку. ВЭЖХ проводили при 25 °С в изократическом режиме со скоростью потока 1 мл/мин. В качестве элюирующих буферов использовали: 20 мМ Na-фосфатный буфер, рН 2,2 с добавлением 5% метанола (условия 1) для определения 2-оксобутирата и 2-оксвалерата; 20 мМ Na-фосфатный буфер, рН 3,0 с добавлением 5% метанола (условия 2) для определения 2-оксо-4-фенилбутирата; 20 мМ Na-фосфатный буфер, рН 3,0 с добавлением 15% метанола (условия 3) для определения 4-метил-2-оксвалерата и фенилпирувата. α -Кетокислоты детектировали спектрофотометрически при 210 нм. Объемы удерживания соединений приведены в таблице 9.

Энантиомерный избыток продуктов D-аминокислот (D-гомоаланина, D-норвалина, D-лейцина, D-фенилаланина и D-гомофенилаланина) определяли с помощью ВЭЖХ на колонке C-18. Аминокислотные продукты и оставшийся D-глутамат модифицировали 1-фтор-2,4-динитрофенил-5-L-аланинамидом (реагент Мерфи, Sigma, США) [64]. 10 мкл низкомолекулярной фракции реакционной смеси смешивали с 25 мкл реагента Мерфи (2,5-кратный молярный избыток по отношению к аминокислотам в реакционной смеси) и с 10 мкл 1 М NaHCO₃ и инкубировали 2 часа при 50 °С. Затем реакционную смесь охлаждали до 25 °С, добавляли 3 мкл 4 М HCl и 10 мкл 100% этанола. Полученные диастереомеры разделяли на колонке со скоростью потока 1 мл/мин в градиентном режиме: 10-70% буфера В за 20 мин для разделения диастереомеров гоомоаланина (условия 4); 20-70% буфера В за 15 мин для разделения диастереомеров норвалина, лейцина, фенилаланина и гоомофенилаланина (условия 5). В качестве буфера А использовали 0,1% трифторуксусную кислоту (ТФА) (Sigma, США) в воде, в качестве буфера В – 0,1% ТФА в метаноле. Модифицированные аминосоединения детектировали спектрофотометрически при 340 нм. Объемы удерживания соединений приведены в таблице 9.

Таблица 9. Объемы удерживания соединений в ходе ВЭЖХ.

Соединение		Условия ВЭЖХ	Объем удерживания, мл	
Определение выходов продуктов реакций трансаминирования				
2-Оксобутират		Условия 1	3,7	
2-Оксовалерат			8,6	
2-Оксо-4-фенилбутират		Условия 2	8,7	
4-Метил-2-оксовалерат		Условия 3	7,6	
2-Оксо-4-фенилбутират			11,7	
Определение энантиомерного избытка продуктов D-аминокислот				
После модификации 1-фтор-2,4-динитрофенил-5-L-аланинамидом (реагентом Мерфи)	D-Глутамат		Условия 4	18,9
			Условия 5	15,1
	L-Гомоаланин		Условия 4	19,2
	D-Гомоаланин			21,8
	L-Норвалин		Условия 5	16,0
	D-Норвалин			18,6
	L-Лейцин			17,6
	D-Лейцин			21,1
	L-Фенилаланин			17,0
	D-Фенилаланин			19,9
	L-Гомофенилаланин			20,2
	D-Гомофенилаланин			26,6

2.6. Рентгеноструктурный анализ

2.6.1. Получение кристаллов AmicoTA и вариантов

Начальный скрининг условий кристаллизации проводили на роботизированной системе Rigaku (Rigaku Americas Corporation, США) в специальных 96-луночных планшетах (Hampton Research, США), используя коммерческие наборы растворов-осадителей от производителей Hampton Research и Molecular Dimensions Inc (США), методом диффузии в парах (вариант «сидячая капля»). 15 мг/мл очищенной фракции PLP-формы AmicoTA смешивали с раствором-осадителем в отношениях 1:1, 1:2 (объем капли 0,1 мкл) и 2:1 (объем капли 0,2 мкл) и оставляли планшеты при 25 и 15 °С. Объем раствора-осадителя в лунке был 50 мкл. Условия кристаллизации PLP-формы AmicoTA на начальном скрининге были следующие: 0,2 М NaNO₃, 0,1 М бис-трис пропан, рН 6,5, 20% ПЭГ3350 при отношении фермента к раствору-осадителю в капле 1:1 и 15 °С. Последующая оптимизация условий роста кристаллов AmicoTA была проведена вручную методом диффузии в парах (вариант «висячая капля») в специальных 24-луночных планшетах (Hampton Research). Объем капли был

увеличен до 3 мкл, а объем раствора-осадителя в лунке до 500 мкл. Через две недели кристаллы PLP-формы AmicoTA достигали максимального размера и представляли собой сrostки неправильной огранки размером около 100 мкм. Кристаллы PLP-форм вариантов AmicoTA с аминокислотными заменами R88L и E113A были получены в условиях аналогичных для AmicoTA WT.

Кристаллы комплексов AmicoTA WT с D-глутаматом и D-цикloserином были получены путем настаивания кристаллов PLP-формы AmicoTA в 100 мМ растворе лиганда в течение 5 минут в случае D-глутамата и 2 минут в случае D-цикloserина.

Для получения кристаллов комплексов AmicoTA WT и варианта с аминокислотной заменой E113A с 3-аминооксипропионовой кислотой 40 мМ PLP и 75 мМ 3-аминооксипропионовой кислоты добавляли к ферменту перед кристаллизацией. Условия кристаллизации комплекса AmicoTA WT и варианта E113A с 3-аминооксипропионовой кислотой подбирали аналогично PLP-форме AmicoTA и были следующие: 0,02 М Na/K-фосфат, 0,1 М бис-трис пропан, 20% ПЭГ3350, pH 8,0 в случае WT и pH 6,5 в случае варианта при 15 °C.

Автор глубоко признателен сотруднику НИЦ «Курчатовский институт» Николаевой Алене Юрьевне за проведение полного цикла работ по кристаллизации AmicoTA WT и ее вариантов.

2.6.2. Сбор и обработка дифракционных данных. Уточнение структур AmicoTA и вариантов

Кристаллы PLP-форм и комплексов AmicoTA WT и вариантов в течение нескольких секунд настаивали в соответствующем растворе-осадителе, содержащем 20% глицерина, непосредственно перед сбором дифракционных данных и быстро замораживали в жидком азоте. Дифракционные данные были собраны при 100 К на трех источниках рентгеновского излучения:

1. Станция ID23-1 (ESRF, Франция) (кристаллы PLP-формы AmicoTA WT);
2. Рентгеновский дифрактометр Rigaku OD XtaLAB Synergy-S (ИОХ РАН, Россия) (кристаллы PLP-формы варианта AmicoTA с заменой R88L и комплексов AmicoTA WT с D-глутаматом и D-цикloserином);

3. Станция «Белок» (НИИ «Курчатовский институт, Россия) (кристаллы PLP-формы варианта AmicoTA с заменой E113A и комплексов AmicoTA WT и варианта с заменой E113A с 3-аминоксипропионовой кислотой)

Обработку данных проводили при помощи программы XDS [186] для PLP-формы AmicoTA WT, PLP-форм вариантов AmicoTA с заменами R88L и E113A, а также комплексов AmicoTA WT и варианта с заменой E113A с 3-аминоксипропионовой кислотой, и при помощи программного обеспечения CrysAlisPro [187] для комплексов AmicoTA WT с D-глутаматом и D-цикloserином. Решение структур проводили методом молекулярного замещения с помощью программы MOLREP [188]. В случае PLP-формы AmicoTA WT в качестве начальной модели использовали структуру BCAT из *Geoglobus acetivorans* (PDB код: 5E25), тогда как в остальных случаях использовали структуру PLP-формы AmicoTA WT (PDB код: 8AHR). Уточнение структур проводили с помощью программы REFMAC5 пакета CCP4 [189]. Визуализацию электронной плотности и ручную перестройку моделей осуществляли в графической программе COOT [190]. Изотропный B-фактор и атомы водорода в фиксированных позициях были включены в модель в процессе уточнения. Кристаллографические данные и параметры уточнения полученных структур приведены в таблице 10.

Автор глубоко признателен сотрудникам ФИЦ Биотехнологии РАН с.н.с., к.б.н. Бойко Константину Михайловичу и м.н.с. Матюте Илье Олеговичу за проведение полного цикла работ по рентгеноструктурному анализу.

2.6.3. Анализ полученных структур

Визуальный анализ структур проводили в программах COOT и PyMOL (Schrödinger, США). Выравнивание структур проводили в программе PDBeFOLD [191]. Анализ межсубъединичных контактов проводили в программе PDBePISA [192].

Таблица 10. Кристаллографические данные, параметры съемки кристаллов AmicoTA WT и вариантов и данные уточнения структур.

	PLP-форма			Комплексы			
	AmicoTA WT	AmicoTA R88L	AmicoTA E113A	AmicoTA WT с D-глутаматом	AmicoTA WT с D-циклосерином	AmicoTA WT с 3-амино-оксипропионой кислотой	AmicoTA E113A с 3-аминооксипропионой кислотой
Источник излучения	Станция ID23-1	Rigaku OD XtaLAB Synergy-S	Станция «Белок»	Rigaku OD XtaLAB Synergy-S	Rigaku OD XtaLAB Synergy-S	Станция «Белок»	Станция «Белок»
Длина волны (Å)	0.98	1.54	0.75	1.54	1.54	0.75	0.75
Температура (К)	100						
Детектор	PILATUS 6M	HyPix-6000HE	MARCCD	HyPix-6000HE	HyPix-6000HE	MARCCD	MARCCD
Расстояние детектор-кристалл (нм)	250	36	120	33	36	120	200
Диапазон вращения на одно изображение (°)	0.05	0.3	1.0	0.3	0.25	1.0	1.0
Полный диапазон вращения (°)	120	600	134	300	270	141	214
Пространственная группа	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁	C2
<i>a, b, c</i> (Å)	61.19, 80.97, 98.96	60.79, 88.55, 100.66	61.43, 88.01, 99.77	61.55, 90.01, 90.0	61.97, 90.03, 100.29	50.57, 58.43, 96.72	141.10, 51.3, 205.29
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	50.57, 58.43, 96.72	90.0, 110.03, 90.0
Разрешение (Å)	43.78-1.90 (1.94-1.90)	88.55-1.80 (1.84-1.80)	44.97-1.90 (1.94-1.90)	21.48-1.90 (1.94-1.90)	21.15-1.90 (1.94-1.90)	48.24-1.75 (1.78-1.75)	47.55-2.10 (2.14-2.10)
Полнота набора (%)	93.0 (92.5)	99.6 (95.8)	99.7 (100)	98.8 (83.1)	98.9 (94.7)	98.9 (95.4)	98.0 (96.2)
Число независимых рефлексов	38455 (2643)	50878 (2853)	43170 (2747)	44299 (2898)	44377 (2782)	56226 (2947)	79705 (4502)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	10.1 (1.5)	14.3 (1.0)	10.4 (2.5)	19.3 (2.6)	13.9 (0.5)	4.3 (0.7)	7.9 (1.7)
<i>R</i> _{int} , %	4.7 (42.0)	5.5 (86.0)	7.0 (44.8)	4.7 (47.7)	5.7 (126)	14.8 (97.6)	8.7 (53.8)
<i>CC</i> _{1/2} , %	99.8 (55.8)	99.8 (38.9)	99.7 (73.1)	99.5 (41.7)	99.9 (83.1)	99 (42.5)	99.4 (65.8)
<i>R</i> _{fact} , %	18.9	18.9	21.3	19.5	21.9	20.1	25.6
<i>R</i> _{free} , %	24.5	21.9	26.4	21.1	26.2	23.9	29.8
Общий средний <i>B</i> -фактор	32.8	26.9	28.5	25.8	32.8	16.3	40.9

*В скобках приведены значения для последнего слоя

Продолжение таблицы 10

	PLP-форма			Комплексы			
	AmicoTA WT	AmicoTA R88L	AmicoTA E113A	AmicoTA WT с D-глутаматом	AmicoTA WT с D-циклосерином	AmicoTA WT с 3-амино-оксипропионовой кислотой	AmicoTA E113A с 3-аминооксипропионовой кислотой
Число неводородных атомов							
Белок	4189	4288	4253	4347	4295	4400	10565
Лиганды	30	37	30	82	77	122	88
Растворитель	147	256	271	322	239	406	159
Всего	4366	2581	4554	4751	4611	4928	10812
Среднеквадратичные отклонения							
Длины связей, Å	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02
Валентные углы, град	1.98	1.72	1.80	1.66	1.76	1.88	2.03
График Рамачандрана							
Наиболее благоприятные, %	98.5	99.1	99.1	98.7	98.2	98.5	97.1
Допустимые, %	1.5	0.7	0.9	1.3	1.6	1.3	2.7
Код PDB	8AHR	8ONJ	8ONL	8AYK	8AIE	8AYJ	8ONN

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1. Получение рекомбинантной формы AmicoTA

Поиск по гомологии новых трансминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена с необычной организацией активного центра позволил обнаружить в геноме грамотрицательной бактерии *Amionobacterium colombiense* (AmicoTA) последовательность трансминазы с характеристическими мотивами $^{27}\text{RxxxxFETIS}^{36}$ и $^{87}\text{VRPY}^{90} \dots ^{99}\text{KxH}^{101}$, отличными от канонических характеристических мотивов этого суперсемейства (Таблица 1). Наибольшая степень идентичности AmicoTA наблюдается с BCAT из *A. fulgidus* DSM 4304 (34% идентичности, PDB код: 5MR0), Halhu (идентичность 31%, PDB код: 7P7X) и bsDAAT (идентичность 29%, PDB код: 1DAA).

Синтетический ген AmicoTA (825 п.о.) клонировали в плазмиду pET-21d-6HisTEV. Клетки *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS трансформировали экспрессионной плазмидой с целевым геном. Рекомбинантную форму AmicoTA (321 а.о., с молярной массой субъединицы 33,2 кДа) экспрессировали с 6-His-фрагментом на N-конце. На первой стадии очистки – выделение из клеточного лизата методом металл-хелатной хроматографии – получали около 200-300 мг фермента с 3 л питательной среды чистотой более 90%. Аминокислотную последовательность AmicoTA подтверждали масс-спектрометрически. Рекомбинантную форму фермента с 6-His-фрагментом далее использовали для характеристики функциональных свойств. Для кристаллизации AmicoTA отщепляли 6-His-фрагмент и проводили дополнительные стадии очистки, включающие гель-проникающую хроматографию и анионообменную хроматографию (АОХ). Выход очищенного AmicoTA без 6-His-фрагмента составлял около 50-60% от исходного белка с 6-His-фрагментом. Значения активности AmicoTA с 6-His-фрагментом и без него отличались незначительно (менее 10%). По результатам гель-проникающей хроматографии AmicoTA в растворе является димером (Рисунок 15 А). В ходе АОХ основная фракция PLP-формы AmicoTA элюировалась с колонки при 17 мСм/см (Рисунок 15 Б), эту фракцию использовали для кристаллизации. Электрофореграмма образцов препаратов, содержащих AmicoTA, на этапах наращивания клеток, выделения и очистки фермента представлена на рисунке 15 В.

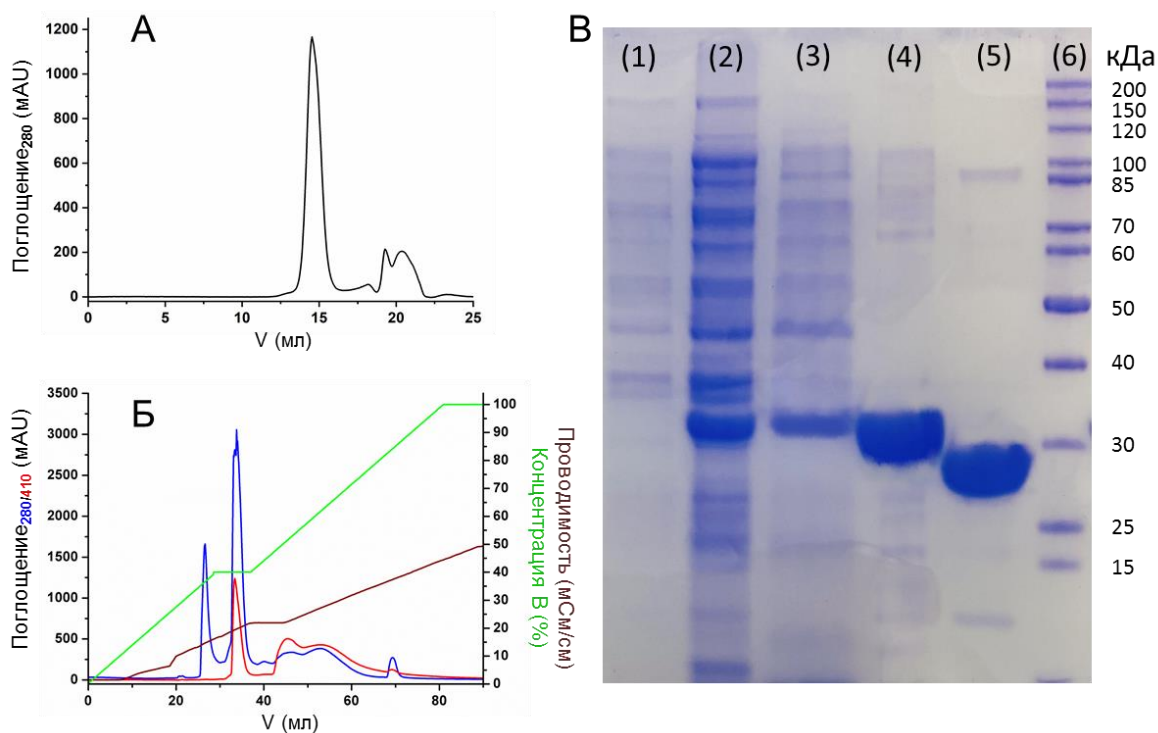


Рисунок 15. Выделение и очистка AmisoTA. (А) Хроматограмма гель-проникающей хроматографии AmisoTA. Основной пик соответствует димеру AmisoTA. (Б) Хроматограмма АОХ AmisoTA. (В) Электрофореграмма образцов фракций AmisoTA на этапах наращивания клеток, выделения и очистки фермента: клеточный лизат перед (1) и после (2) индукции ИПТГ; (3) растворимая фракция клеточного лизата после УЗ обработки и центрифугирования; (4) фракция AmisoTA с 6-His-фрагментом после металл-хелатной аффинной хроматографии; (5) фракция AmisoTA после удаления 6-His-фрагмента, гель-проникающей хроматографии и АОХ; (6) стандарты белков Page Ruler Unstained Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific, США).

3.2. Функциональная характеристика AmisoTA

3.2.1. Спектр аминокислот AmisoTA

Полная ферментативная реакция трансминирования есть сумма двух последовательных полуреакций (Рисунки 1, 3). Спектр субстратов-аминодоноров и субстратов-кетосоединений (аминоакцепторов) удобно определять из анализа специфичности трансаминаз в полуреакциях с аминокислотами/аминоакцептором в отсутствие ингибирования ко субстратом и копродуктом. Анализ активности AmisoTA в полуреакциях с аминокислотами позволил сделать следующие выводы: AmisoTA активна с D-аминокислотами, неактивна с L-аминокислотами и первичными аминами (Таблица 11), наибольшую специфичность фермент проявляет к D-глутамату. Из значений констант специфичности (k_{max}/K_D) очевидна дифференциация субстратов в активном центре фермента: k_{max}/K_D для D-глутамата в 100-1000 раз больше, чем для других D-аминокислот, специфичность к D-глутамату и D-аспартату

различаются в 500 раз. Обратная реакция в указанных условиях не наблюдается. По-видимому, это связано с «утечкой» кофактора в РМР форме из активного центра фермента.

Таблица 11. Кинетические параметры полуреакций PLP-формы AmicoTA (30 мкМ) с аминокислотами в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0, 40 °С.

Аминодонор	$10^3 \times k_{\max}$, с ⁻¹	K_D , мМ	k_{\max}/K_D , М ⁻¹ с ⁻¹
D-глутамат	1080 ± 40	2,1 ± 0,2	515 ± 70
D-аланин	280 ± 10	50 ± 6	5,6 ± 0,8
D-аспартат	118 ± 6	120 ± 15	1,0 ± 0,2
D-лейцин	33 ± 2	100 ± 10	0,33 ± 0,05
D-орнитин	2,1 ± 0,1	10 ± 1	0,21 ± 0,02
D-фенилаланин	2,9 ± 0,2	19 ± 3	0,15 ± 0,03
L-аланин	Нет активности		
L-лейцин	Нет активности		
(R)-(+)-1-фенилэтиламин	Нет активности		
(S)-(+)-1-фенилэтиламин	Нет активности		

3.2.2. Зависимость активности AmicoTA от pH и температуры

Зависимость активности AmicoTA от pH и температуры анализировали в реакции трансаминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат \leftrightarrow *D*-глутамат + пируват в прямом и обратном направлениях (Рисунок 16). AmicoTA катализирует реакции трансаминирования при pH 6,0-10,0 и температуре 30-60 °С. Оптимальные условия для реакции *D*-аланин + α -кетоглутарат составили pH 8,0-9,0 и 60 °С. Оптимальные условия для обратной реакции *D*-глутамат + пируват составили pH 7,0-9,0 и 55 °С.

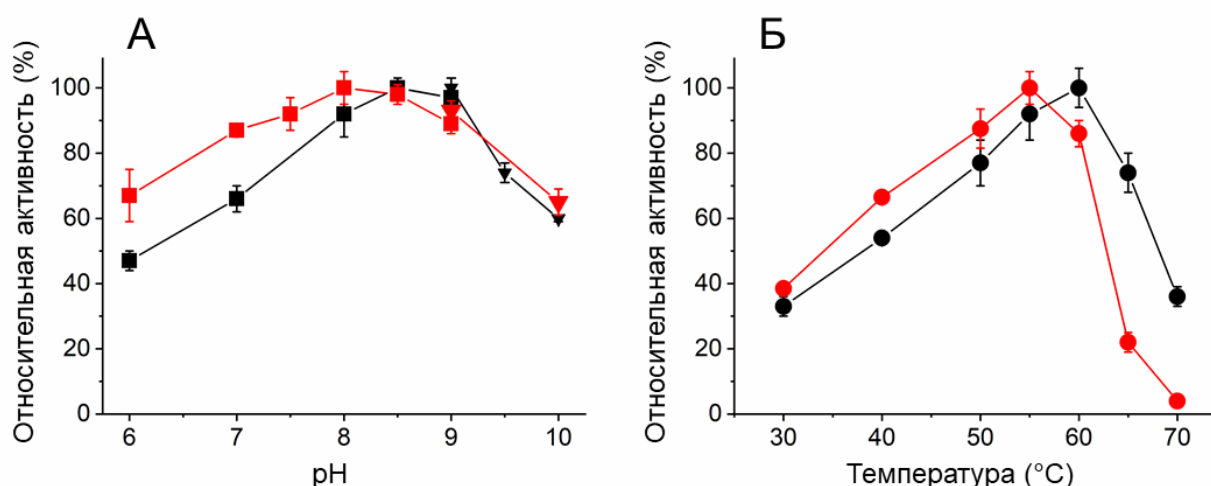


Рисунок 16. Зависимости активности AmicoTA от pH и температуры в реакциях трансаминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат (черные линии) и *D*-глутамат + пируват (красные линии). 100% соответствует $0,62 \pm 0,05$ U/мг ((А), черные линии), $0,26 \pm 0,01$ U/мг ((А), красные линии), $1,55 \pm 0,05$ U/мг ((Б), черные линии) и $0,60 \pm 0,03$ U/мг ((Б), красные линии). Черные/красные квадраты: смешанный буфер 25 мМ Трис-НСl и 25 мМ К-фосфат, pH 6,0-9,0. Черные/красные треугольники: 50 мМ CHES буфер, pH 9,0-10,0. Черные/красные круги: 50 мМ К-фосфатный буфер, pH 8,0. Концентрация AmicoTA 0,001-0,03 мг/мл. Бары соответствуют среднеквадратичному отклонению.

3.2.3. Кинетические параметры реакций трансаминирования, катализируемых AmicoTA

Для реакций *D*-аланин + α -кетоглутарат и *D*-глутамат + пируват определены кинетические параметры из зависимостей активности AmicoTA от концентрации субстратов при фиксированной концентрации косубстрата (Таблица 12). Наиболее эффективно AmicoTA катализирует трансаминирование между α -кетоглутаратом и *D*-аланином, что согласуется с физиологически важным для клетки синтезом *D*-глутамата, компонента клеточной стенки бактерии. Наибольшую специфичность в полной реакции AmicoTA проявляет к α -кетоглутарату.

Таблица 12. Кинетические параметры полных реакций трансаминирования между *D*-аланином и α -кетоглутаратом (в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0) и между *D*-глутаматом и пируватом (в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8,0), катализируемых AmicoTA, 60 °С.

Субстрат	Косубстрат	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , М ⁻¹ с ⁻¹
<i>D</i> -аланин	5 мМ α -кетоглутарат	10 ± 1	470 ± 60	22 ± 6
α -кетоглутарат	500 мМ <i>D</i> -аланин	10 ± 1	$7,2 \pm 0,8$	1400 ± 300
<i>D</i> -глутамат	500 мМ пируват	$1,40 \pm 0,06$	$5,2 \pm 0,6$	270 ± 40
пируват	30 мМ <i>D</i> -глутамат	$1,40 \pm 0,06$	160 ± 20	9 ± 1

3.2.4. Спектры PLP-формы AmicoTA при различных pH

Первой стадией в реакции трансаминирования является трансальдиминирование, то есть аминогруппа субстрата замещает аминогруппу каталитического лизина во внутреннем альдимине (Рисунок 3) [1,193]. ААТ, на примере которой был установлен механизм реакции трансаминирования [16,18,21,24,25], вступает в трансальдиминирование в депротонированной форме и принимает протон от аминогруппы субстрата, в результате комплекс Михаэлиса образуется между трансаминазой в протонированной форме и субстратом в депротонированной форме. Однако для трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена не наблюдается депротонирования иминного азота в оптимальных условиях реакции трансаминирования, другими словами, протонированные состояния субстратов и фермента у этих трансаминаз не выяснены.

Протонированность холофермента AmicoTA проанализирована спектрофотометрически. Мы получили спектры поглощения PLP-формы AmicoTA при различных pH (Рисунок 17): пик при 280 нм соответствует поглощению ароматических остатков белка, пик при 410 нм соответствует поглощению внутреннего альдимиона PLP с ферментом в форме кетимина, а плечо в области 340 нм соответствует енолиминной форме внутреннего альдимиона (Рисунок 18). Отсутствие смещения пика при 410 нм указывает на протонированную форму внутреннего альдимиона в диапазоне pH 7,0-10,0 (Рисунок 17). Спектр поглощения РМР-формы AmicoTA имеет максимум при 280 и 340 нм (Рисунок 17). Отсюда следует, что при запуске реакции трансаминирования с AmicoTA, по-видимому, происходит депротонирование аминогруппы субстрата внутри активного центра или на входе в него. Образование комплекса Михаэлиса между протонированным субстратом и протонированным ферментом считается каталитически неэффективным.

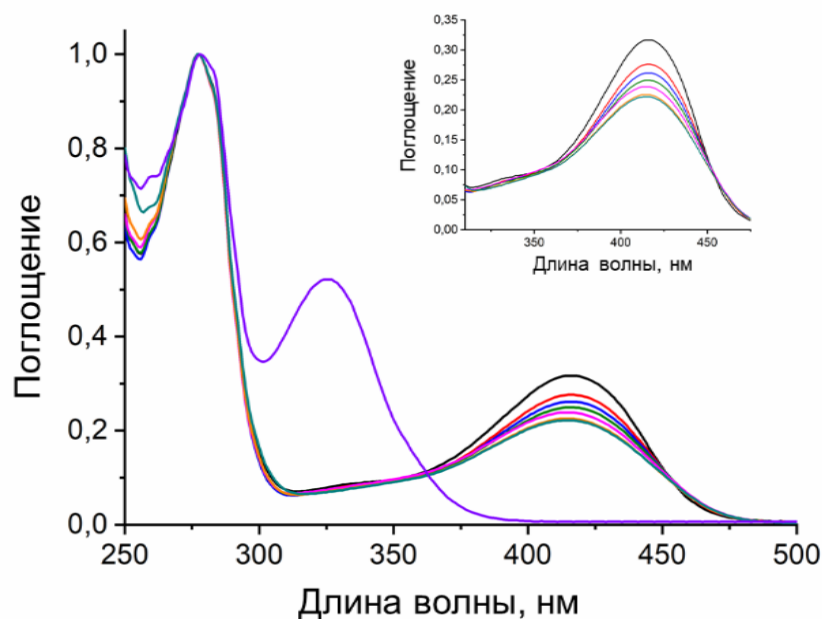


Рисунок 17. Спектры поглощения PLP-формы AmisoTA в различных буферах: смешанный буфер 25 мМ Трис-HCl и 25 мМ К-фосфат pH 7,0 (черный), pH 8,0 (красный), pH 8,5 (синий), pH 9,0 (зеленый), 50 мМ CHES pH 9,0 (розовый), pH 9,5 (оранжевый), pH 10,0 (бирюзовый), и апоформы в 50 мМ CHES pH 9,0 (фиолетовый).

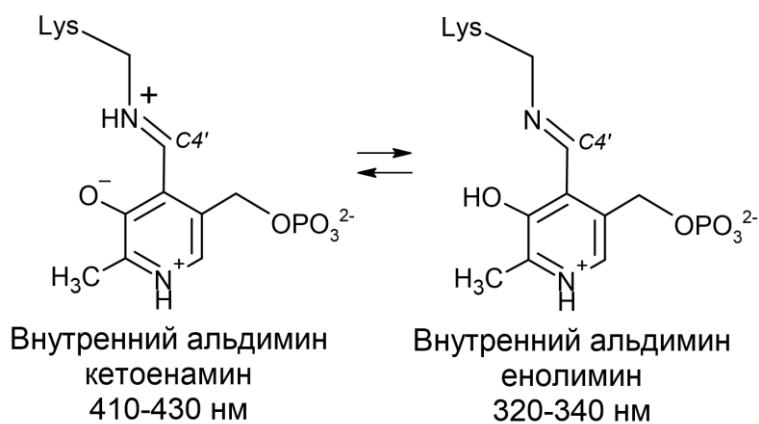


Рисунок 18. Кетоенамин и енолимин внутреннего альдимина с указанием максимумов поглощения.

3.2.5. Термостабильность AmisoTA

Термостабильность PLP-формы AmisoTA проанализирована двумя способами: (1) определен период полуинактивации фермента в процессе инкубирования при заданной температуре по остаточной активности; (2) определена температура полуперехода ($T_{0.5}$) из нативного состояния в денатурированное при нагревании в диапазоне 35-93 °C по анализу изменений спектров КД при нагревании. Период полуинактивации PLP-формы AmisoTA составил около 10 ч при 60 °C, 40 ч при 50 °C и 100 ч при 40 °C (Рисунок 19 А). В реакционных

условиях в присутствии субстратов (100 мМ D-лейцина и 20 мМ α -кетоглутарата) период полуинактивации PLP-формы AmicoTA сократился до 10 мин при 60 °С, 10 ч при 50 °С и 35 ч при 40 °С (Рисунок 19 Б). Эксперименты по определению термостабильности проводили с ферментом в концентрации 1,5 мг/мл (45 мкМ), тогда как в стандартных условиях определения активности (при 60 °С) концентрация фермента значительно ниже (0,001-0,002 мг/мл или 0,03-0,06 мкМ), поэтому в стандартных условиях инактивации фермента не наблюдается в течение часа. $T_{0,5}$ AmicoTA составила $68,9 \pm 0,1$ °С (Рисунок 19 В).

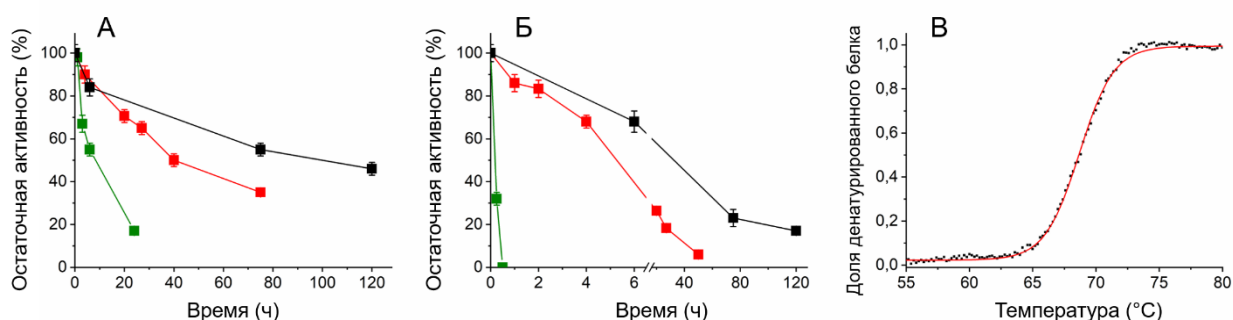


Рисунок 19. Стабильность PLP-формы AmicoTA. Термостабильность AmicoTA (1,5 мг/мл) в буфере (А) и в присутствии субстратов (100 мМ D-лейцина и 20 мМ α -кетоглутарата) (Б) при 40 °С (черные линии), 50 °С (красные) и 60 °С (зеленые) в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0, содержащем 100 мкМ PLP. Бары соответствуют среднеквадратичному отклонению. (В) Зависимость доли денатурированного AmicoTA (10 мкМ) от температуры в 20 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8,0.

3.2.6. «Утечка» PLP из активного центра AmicoTA

Для холоформ трансминаз наблюдается «утечка» (выход) кофактора из активного центра как в условиях реакции, так и в буфере при хранении [194,195]. Анализ AmicoTA показал стабильность ее PLP-формы в условиях хранения в 50 мМ К-фосфатном буфере при pH 7,0-8,0. В присутствии субстратов аминодонора и аминокцептора (реакционные условия) наблюдается накопление апоформы: «утечка» кофактора в результате восстановления PLP до PMP и диссоциации PMP-формы фермента. Константы скорости диссоциации холофермента в ходе реакции между D-аланином и α -кетоглутаратом в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0 при 40 °С представлены в таблице 13. Мы обнаружили, что при увеличении концентрации кетосубстрата в реакционной смеси константа скорости диссоциации холофермента снижается. В то же время встраивание PLP в апоформу AmicoTA происходит мгновенно (за время смешивания растворов, менее 10 с) в широком диапазоне условий: pH 7,0-9,0, 25-50 °С. Таким образом, увеличение концентрации кетосубстрата и добавление свободного PLP стабилизирует PLP-форму AmicoTA в условиях реакции.

Таблица 13. Константы скорости диссоциации комплекса AmicoTA с PLP в 50 мМ CHES буфере, рН 9,0 при 40 °С в разных реакционных условиях.

Условия			k_{diss} , мин ⁻¹
[D-аланин], мМ	[α -кетоглутарат], мМ	[PLP], мкМ	
50	5	0	0,10 ± 0,01
50	5	25	0,17 ± 0,01
50	50	0	0,025 ± 0,003
50	100	0	0,011 ± 0,002
50	300	0	0,007 ± 0,001
150	150	0	0,011 ± 0,002

3.2.7. Взаимодействие AmicoTA с аналогами субстратов – обратимыми ингибиторами

3-аминооксипропионовая кислота и D-циclosерин используются при изучении PLP-зависимых ферментов для уточнения особенностей связывания субстратов, так как 3-аминооксипропионовая кислота является аналогом боковой группы D-глутамата (Рисунок 20), а D-циclosерин – структурным аналогом D-аланина/D-серина (Рисунок 21). Оба соединения обратимо ингибируют трансминазы, так как продукт взаимодействия диссоциирует из их активного центра, образовавшаяся апоформа восстанавливается до холофермента при добавлении PLP [196–198]. Оксим PLP и 3-аминооксипропионовой кислоты имитирует внешний альдимин PLP и D-глутамата. D-циclosерин образует несколько промежуточных соединений с PLP в активном центре трансминаз.

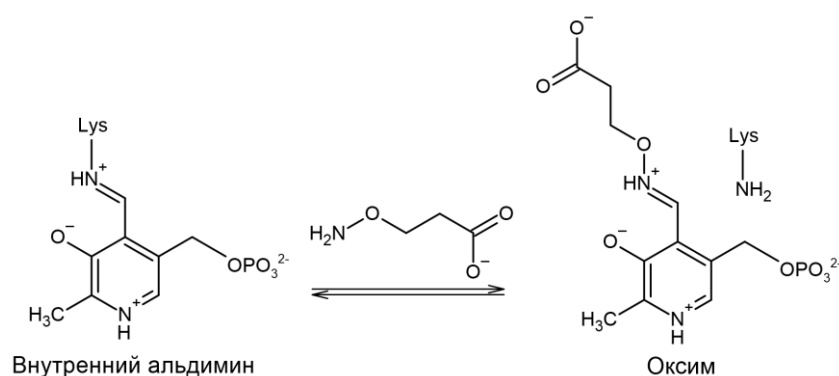


Рисунок 20. Схема взаимодействия 3-аминооксипропионовой кислоты с внутренним альдиминем PLP-зависимых ферментов [198].

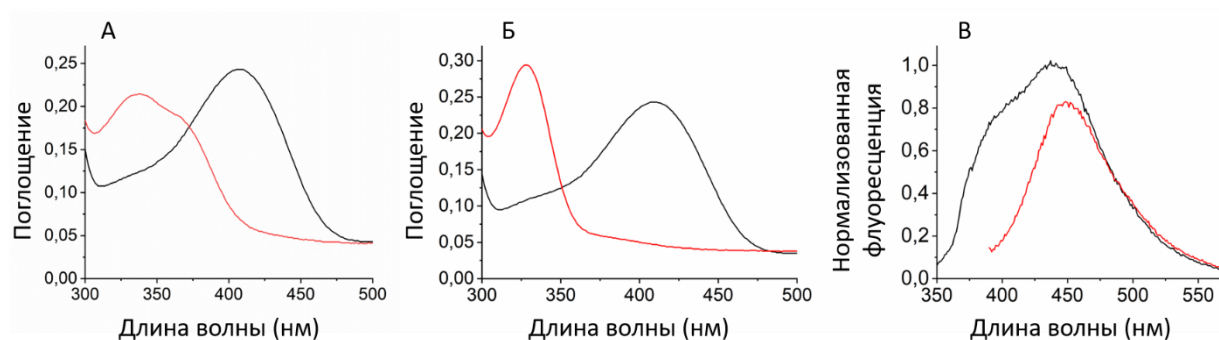


Рисунок 22. Взаимодействие AmicoTA с аналогами субстратов. (А) Спектры поглощения PLP-формы AmicoTA (30 мкМ) до (черный) и после добавления 10 мМ 3-аминооксипропионовой кислоты (красный). (Б) Спектры поглощения PLP-формы AmicoTA (30 мкМ) до (черный) и после добавления 30 мМ D-циклосерина (красный). (В) Спектры флуоресценции продуктов взаимодействия AmicoTA с D-циклосеринном при длине волны возбуждения 328 нм (черный) и 380 нм (красный).

3.3. Структура AmicoTA

3.3.1. Структура функционального димера AmicoTA

Пространственная структура PLP-формы AmicoTA определена методом РСА с разрешением 1,9 Å (PDB код: 8AHR). Кристаллическая ячейка содержит две субъединицы, организованных в димер (Рисунок 23 А). Площадь поверхности, приходящейся на межсубъединичный контакт, составляет 15% от общей площади поверхности каждой субъединицы. Организация димера AmicoTA типична организации функционального димера трансаминаз IV типа PLP-укладки [32,46,48,55,63]. Ближайшими структурными гомологами AmicoTA являются BCAT из *Geoglobus acetivorans* (RMSD 1,5 Å, PDB код: 5E25) и *Archaeoglobus fulgidus* (RMSD 1,6 Å, PDB код: 5MR0), DAAT Halhy (RMSD 1,6 Å, PDB код: 7P7X) и R-ATA из *A. fumigatus* (RMSD 1,6 Å, PDB код: 4CHI).

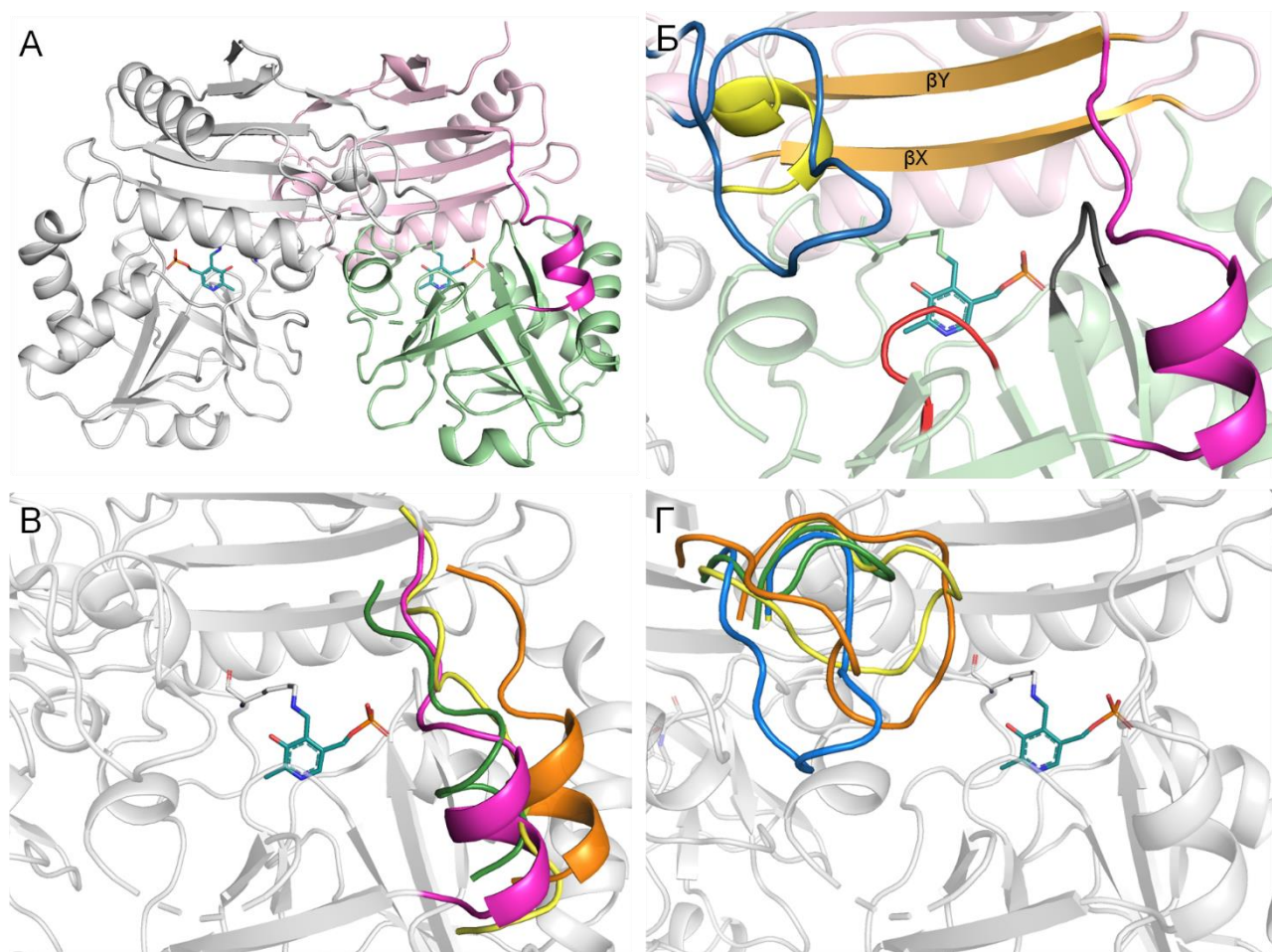


Рисунок 23. Структура AmicoTA. (А) Общий вид димера: в правой субъединице малый домен показан светло-розовым цветом, большой домен – светло-зеленым, междоменная петля – малиновым, соседняя субъединица – серым. Молекула PLP показана бирюзовым цветом. (Б) Общий вид активного центра AmicoTA, сформированного следующими структурными элементами: β X- и β Y-тяжи (оранжевые), петля O-кармана соседней субъединицы (синяя), α -спираль O-кармана соседней субъединицы (желтая), β -поворот1 (красный) и β -поворот2 (черный). (В, Г) Наложение междоменных петель (В) и петель O-кармана (Г) AmicoTA (петля O-кармана – синяя, междоменная петля – малиновая), bsDAAT (оранжевые), CruTA (зеленые) и Halhу (желтые).

Каждая субъединица димера состоит из двух α/β доменов: малый домен (остатки 1-114) и большой домен (остатки 127-275), соединенные междоменными петлями (остатки 115-126) (Рисунок 23 А). Междоменная петля AmicoTA (115-126) удалена от активного центра как в других DAAT (Рисунок 23 Б). Остатки P118 и P120 добавляют жесткости этой петле как в bsDAAT P119 и P121, а на границе полости активного центра со стороны Р-кармана она зафиксирована двумя водородными связями NZ/K117-OE1/E238 и OH/Y123-O/K237. Удаленное от активного центра и зафиксированное положение междоменной петли, по-видимому, является типичным для DAAT (Рисунок 23 В). Петля O-кармана (95-109) также удалена от активного центра в димере AmicoTA, что делает активный центр открытым, в

отличие от других DAAT (Рисунок 23 Б, Г). Положения других элементов вторичной структуры активного центра AmicoTA: β X-тяж (30-37), β Y-тяж (85-92), β -поворот1 (173-176) и β -поворот2 (234-237) такие же как в структурах других трансаминаз IV типа PLP-укладки [32,46,48,55].

3.3.2. Организация активного центра AmicoTA

Димер AmicoTA содержит два идентичных активных центра, сформированных остатками двух малых доменов обеих субъединиц и большого домена одной субъединицы. Молекула PLP ковалентно связана с ϵ -аминогруппой остатка K142 (основание Шиффа) в обоих активных центрах. Фосфатная группа PLP образует типичную для трансаминаз IV типа PLP-укладки сеть водородных связей с боковыми группами остатков R51, T198 и T199, с атомами азота основной цепи остатков T198, T199 и T235, а также водородные связи через молекулы воды с остатками T34, T177, R200 и T233 (Рисунок 24 А). Плоскость пиридинового кольца ограничена боковой группой остатка L195 со стороны белковой глобулы и атомами основной цепи остатков H175 и S176 (β -поворот1) со стороны входа в активный центр (Рисунок 24 А). Остаток Y146 образует водородную связь с гидроксильной группой PLP (Рисунок 24 А). Остаток E172 образует водородную связь с N1 атомом пиридинового кольца PLP (Рисунок 24 А). Примечательно, что консервативный для DAAT остаток E172 координирует N1 атом напрямую в одной субъединице и через молекулу воды в другой субъединице (Рисунок 24 Б). Во всех структурах трансаминаз IV типа PLP-укладки наблюдается координация атома N1 соответствующим остатком глутамата только напрямую [46,48,55,57,64].

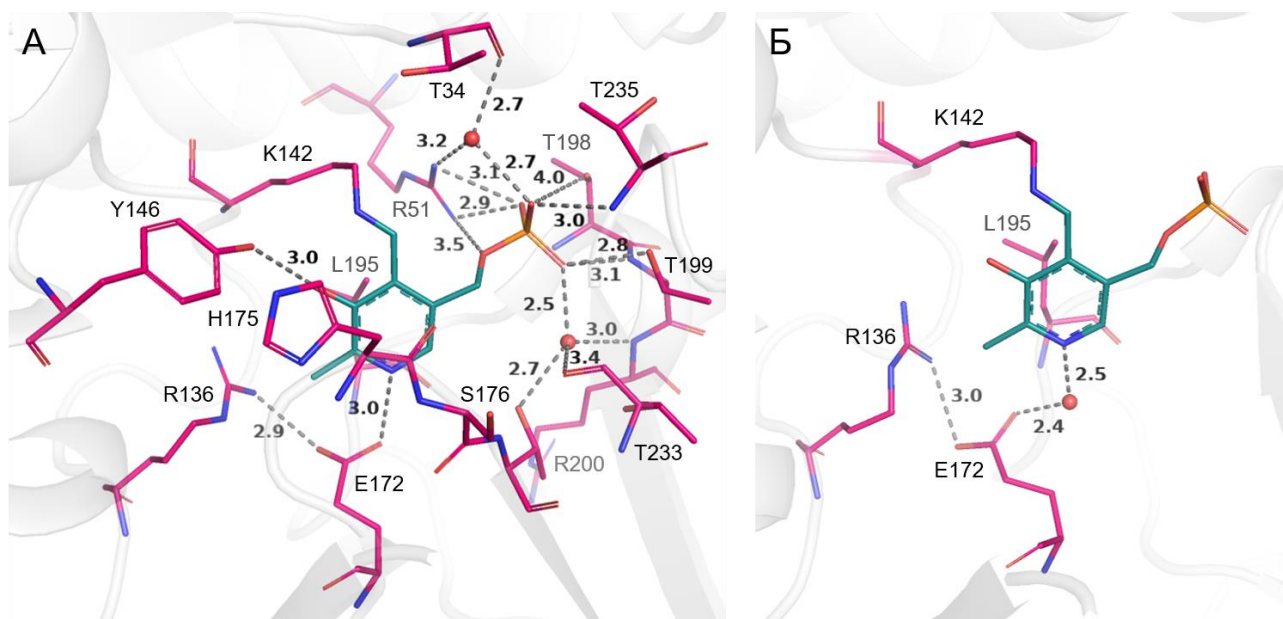


Рисунок 24. Связывание молекулы PLP в AmicoTA. Субъединица А (А) и субъединица В (Б). Молекула PLP показана бирюзовым цветом, молекулы воды показаны красными шариками. Водородные связи показаны пунктиром, а соответствующие расстояния приведены в ангстремах (Å).

О-карман (со стороны гидроксильной группы PLP) AmicoTA является открытым и содержит несколько положительно заряженных остатков и остатков гистидина, которые потенциально могут связывать α -карбоксильную группу субстратов: R27*, R88, K99*, H101* и H175 (Рисунок 25). При этом остатки R27*, K99* и H101* не образуют ни одной водородной связи, тогда как остатки R88 и H175 фиксированы водородными связями с соседними остатками (Рисунок 26).

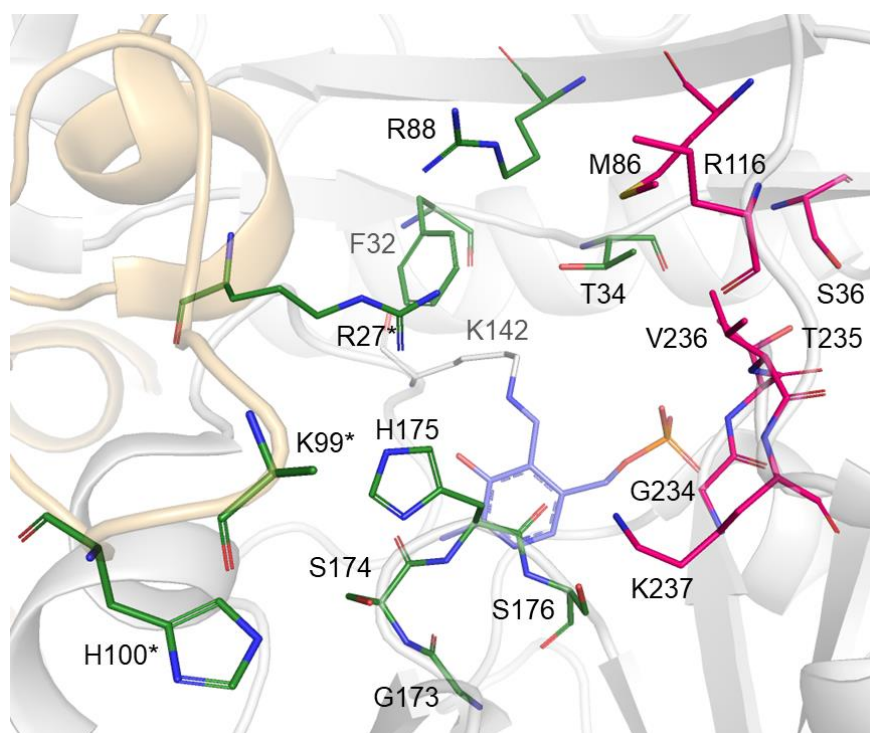


Рисунок 25. Активный центр функционального димера AmicoTA. Соседние субъединицы показаны серым и светло-оранжевым цветами. Остатки O-кармана показаны зеленым цветом, P-кармана – малиновым, молекула PLP показана сиреневым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера.

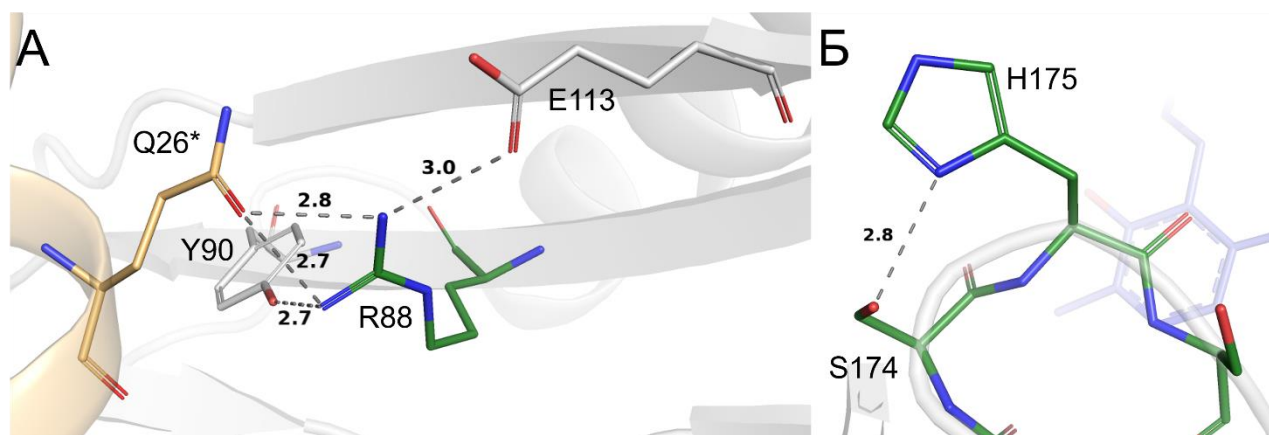


Рисунок 26. Водородные связи, которые образуют остатки R88 и H175 с соседними остатками в структуре PLP-формы AmicoTA. Соседние субъединицы показаны серым и светло-оранжевым цветами. Водородные связи показаны пунктиром, а соответствующие расстояния приведены в ангстремах (Å). (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера.

P-карман (со стороны фосфатной группы PLP) активного центра AmicoTA сформирован остатками S36, M86 и остатками β -поворота²³⁴ GTVK²³⁷ (Рисунок 25). Остаток K237 образует положительный заряд в P-кармане. Междоменная петля содержит остаток R116, который может быть вовлечен в координацию субстратов. Однако электронная

плотность боковой цепи этого остатка не проявляется. Таким образом, в активном центре AmicoTA возможно связывание субстратов как по типу канонической bsDAAT через остатки K99* и H101*, так и по типу неканонической CruTA через остатки R27* и R88 (Рисунок 8).

3.3.3. Структура комплексов AmicoTA с субстратами и ингибиторами

В целях установления механизма связывания субстратов в AmicoTA, были получены структуры его комплексов с субстратом D-глутаматом (разрешение 1,9 Å, PDB код: 8AYK) и аналогами субстратов D-циclosерином (разрешение 1,9 Å, PDB код: 8AIE) и 3-аминооксипропионовой кислотой (разрешение 1,75 Å, PDB код: 8AYJ). Стоит отметить, что в данной работе впервые получена пространственная структура комплекса DAAT со специфическим субстратом D-глутаматом. Кристаллические ячейки всех комплексов содержат две субъединицы, организованных в димер. Структура функционального димера комплексов совпадает со структурой димера холофермента (Рисунок 27). RMSD для атомов C_α между субъединицами холофермента и комплексов не превышает 0,6 Å. Элементы вторичной структуры, в частности петля O-кармана и междоменная петля, формирующие активный центр AmicoTA, не изменили своего положения. Соответственно, остатки канонической «карбоксилатной ловушки» K99* и H101* с петли O-кармана остались удаленными от активного центра и не участвуют в связывании лигандов (Рисунок 27). Электронная плотность боковой группы остатка K99* не проявляется во всех комплексах, также как в PLP-форме AmicoTA. Остаток R116 с междоменной петли также не участвует в связывании ни одного из лигандов.

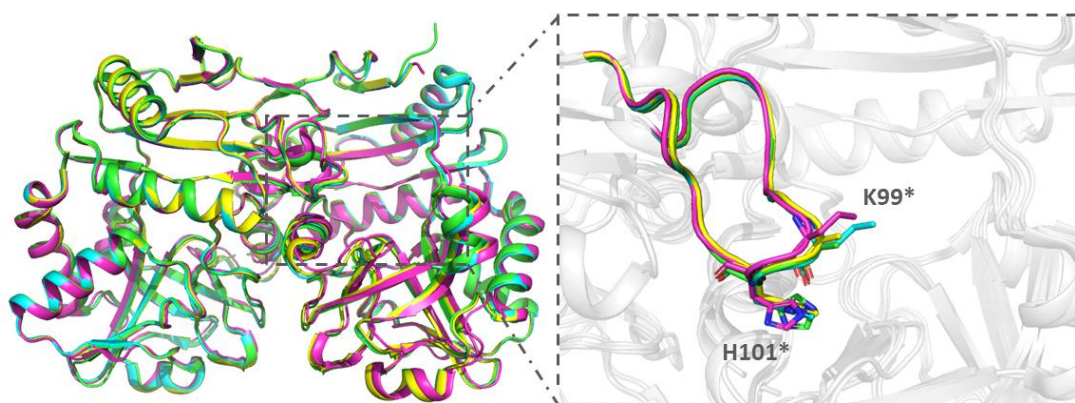


Рисунок 27. Наложение структур функциональных димеров AmisoTA в PLP-форме (ярко-зеленый), в комплексе с D-глутаматом (ярко-голубой), в комплексе с 3-аминооксипропионовой кислотой (малиновый) и в комплексе с D-циклосерином (желтый). В рамке приближен активный центр. Все элементы вторичной структуры кроме петель O-кармана представлены серым цветом для наглядности.

Во всех комплексах лиганды ковалентно связаны с PLP. В комплексе с D-глутаматом в активном центре находится аддукт PLP и D-глутамата с заселенностью 0,7 (Рисунок 28), остальная часть кофактора находится в форме PMP. Двугранный угол C3-C4-C4'-N4' составляет 60° и 40° в субъединице А и В, что соответствует кетиминной форме аддукта. Несколько остатков в активном центре и PLP изменили свою ориентацию при связывании D-глутамата по сравнению с PLP-формой AmisoTA. Пиридиновое кольцо кофактора отклонено на 15° от своего положения в холоферменте вокруг связи N1-C6, высвобожденная боковая цепь каталитического лизина сдвинута в сторону остатка Y146, образовав водородную связь с его OH-группой. α -Карбоксильная группа D-глутамата связана в O-кармане и образует солевой мостик с гуанидиновой группой остатка R27* и водородную связь с гидроксильной группой остатка T34. γ -Карбоксильная группа D-глутамата связана в P-кармане и образует солевой мостик с атомом N ϵ остатка K237 и водородные связи с атомами азота боковой цепи остатков V236 и K237 (Рисунок 28). Боковая группа остатка H175 расположена в непосредственной близости к α -карбоксильной группе субстрата, однако его ориентация, такая же как в холоферменте, неблагоприятна для образования водородной связи с субстратом. Учитывая ограниченную подвижность кристаллов холофермента, делать заключение о роли H175 в связывании субстрата здесь преждевременно. Остаток R88 в связывании D-глутамата не участвует.

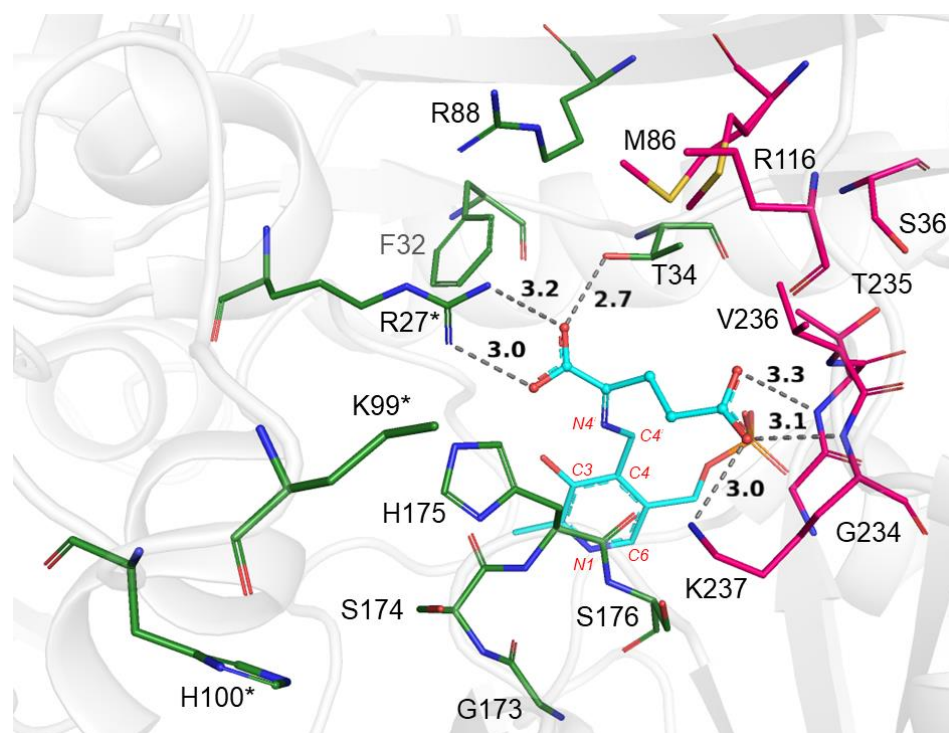


Рисунок 28. Активный центр AmicoTA в комплексе с D-глутаматом. Остатки О-кармана показаны зеленым цветом, Р-кармана – малиновым, кетимин, сформированный PLP и D-глутаматом, – ярко-голубым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера. Водородные связи показаны пунктиром, а соответствующие расстояния приведены в ангстремах (Å). Атомы кофактора подписаны красным.

В комплексе AmicoTA с D-цикloserином в активном центре одной субъединицы находится кетимин, образованный PLP и циклической формой D-цикloserина (кетимин 1, Рисунок 21, Рисунок 29 Б) с заселенностью 0,65, в другой субъединице – кетимин, образованный PLP и разомкнутой формой D-цикloserина (кетимин 2, Рисунок 21, Рисунок 29 В) с заселенностью 0,75. Второе состояние кофактора в обеих субъединицах одинаковое и соответствует РМР. По-видимому, за время настаивания кристалла PLP-формы AmicoTA в растворе D-цикloserина амидная группа последнего частично гидролизуется в активном центре фермента с образованием разомкнутого внешнего альдимины (внешний альдимин 2), который затем частично превращается в кетимин 2 и гидролизуется до молекулы РМР (Рисунок 21). Стоит отметить, что в данной работе впервые был обнаружен аддукт PLP с D-цикloserином в разомкнутой форме в структуре PLP-зависимого фермента. До этого такая форма аддукта предполагалась по результатам идентификации продукта гидролиза этой формы – РМР [196]. Плоскость кольца PLP относительно связи N1-C6 отклоняется на 35° и 25° от своего положения в PLP-форме в субъединицах А и В соответственно (Рисунок 29 А). Положения аминокислотных остатков в активном центре комплекса изменились

незначительно по сравнению с PLP-формой AmicoTA за исключением остатка H175 (Рисунок 29 Б, В). Для него наблюдается двойное положение боковой группы в каждой субъединице. В субъединице А состоянию кофактора в форме кетимина 1 соответствует положение остатка H175, направленного в активный центр, тогда как состоянию кофактора в форме РМР соответствует положение остатка H175, направленного из активного центра (Рисунок 29 Б). В субъединице В состоянию кофактора в форме кетимина 2 соответствует положение остатка H175, направленного из активного центра, тогда как состоянию кофактора в форме РМР соответствует положение остатка H175, направленного в активный центр (Рисунок 29 В). Иминный азот кетимина в обеих субъединицах образует водородную связь с карбонильной группой основной цепи остатка H175 (Рисунок 29 Б, В). В случае кетимина 1 карбонильный кислород лактамной формы D-цикloserина образует водородные связи с молекулой воды и ϵ -аминогруппой остатка K237, аминогруппа оксазолидинного кольца связана с атомом азота основной цепи остатка V236 (Рисунок 29 Б). В субъединице В остатки V236 и K237 также связывают карбоксильную группу кетимина 2. Здесь же остатки R27* и T34 образуют водородные связи с аминогруппой разомкнутого кетимина, рКа которой составляет около 5 [199] (Рисунок 29 В). В условиях кристаллизации AmicoTA аминогруппа разомкнутого кетимина депротонирована и может образовывать водородную связь с гуанидиновой группой аргинина.

В связывании D-цикloserина задействованы те же остатки AmicoTA, что и в связывании D-глутамата – R27*, T34 в O-кармане и V236, K237 в P-кармане. Боковая цепь остатка H175 не участвует в связывании D-цикloserина, однако в этом комплексе наблюдается подвижность данного остатка.

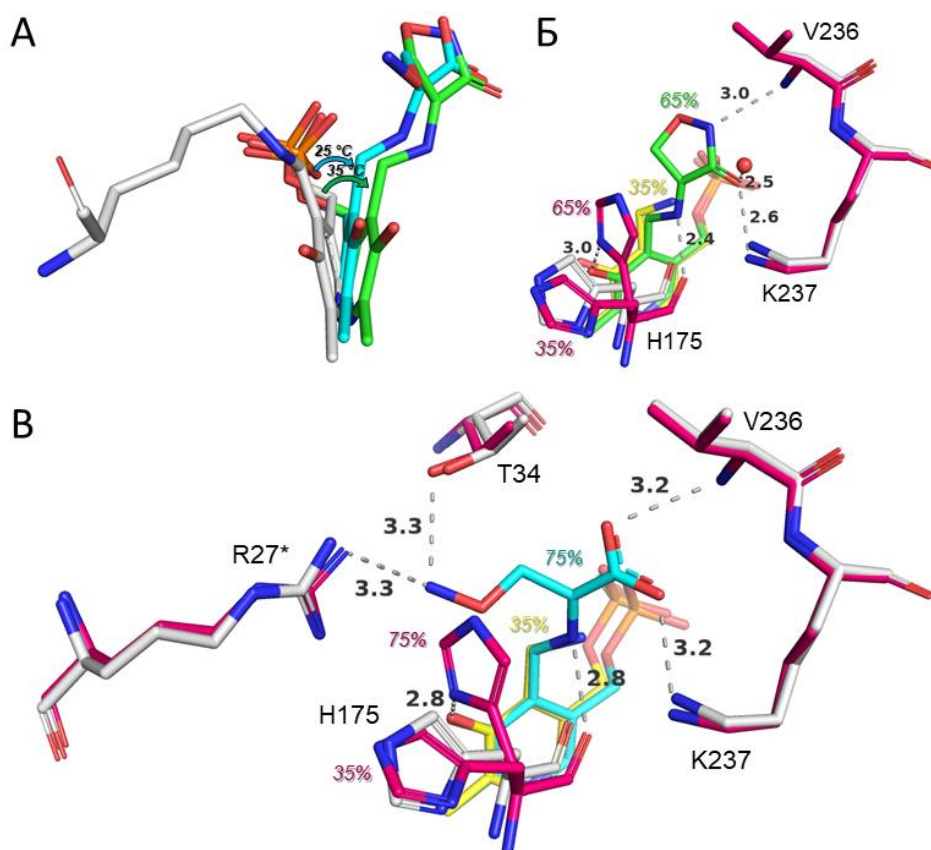


Рисунок 29. Наложение пространственных структур активных центров холофермента и комплекса AmicoTA с D-циклосерином. (А) Наложение кофактора PLP в холоферменте и в комплексе. (Б) и (В) Активные центры комплекса AmicoTA с D-циклосерином в субъединицах А и В соответственно. Серым цветом показаны остатки PLP-формы AmicoTA, малиновым - остатки комплекса, ярко-зеленым - аддукт PLP и циклического D-циклосерина, ярко-голубым – аддукт PLP и разомкнутого D-циклосерина, желтым показана молекула РМР. Водородные связи показаны пунктиром, а соответствующие расстояния приведены в ангстремах (Å). Цифрами указана заселенность соответствующих состояний.

Если комплексы AmicoTA с D-глутаматом и D-циклосерином были получены путем настаивания кристаллов PLP-формы AmicoTA в растворах лигандов, то комплекс AmicoTA с 3-аминооксипропионовой кислотой был получен путем сокристаллизации PLP-формы AmicoTA с лигандом (Рисунок 30). В результате реакции 3-аминооксипропионовой кислоты с внутренним альдимином образуется оксим. В структуре карбоксильная группа оксима связалась в О-кармане активного центра аналогично α-карбоксильной группе D-глутамата в соответствующем комплексе через солевой мостик с гуанидиновой группой остатка R27*, а также через водородные связи с гидроксильной группой остатка Т34 и атомом азота боковой цепи остатка Н175 (Рисунок 30). В данном комплексе остаток Н175 развернут и участвует в связывании карбоксильной группы лиганда.

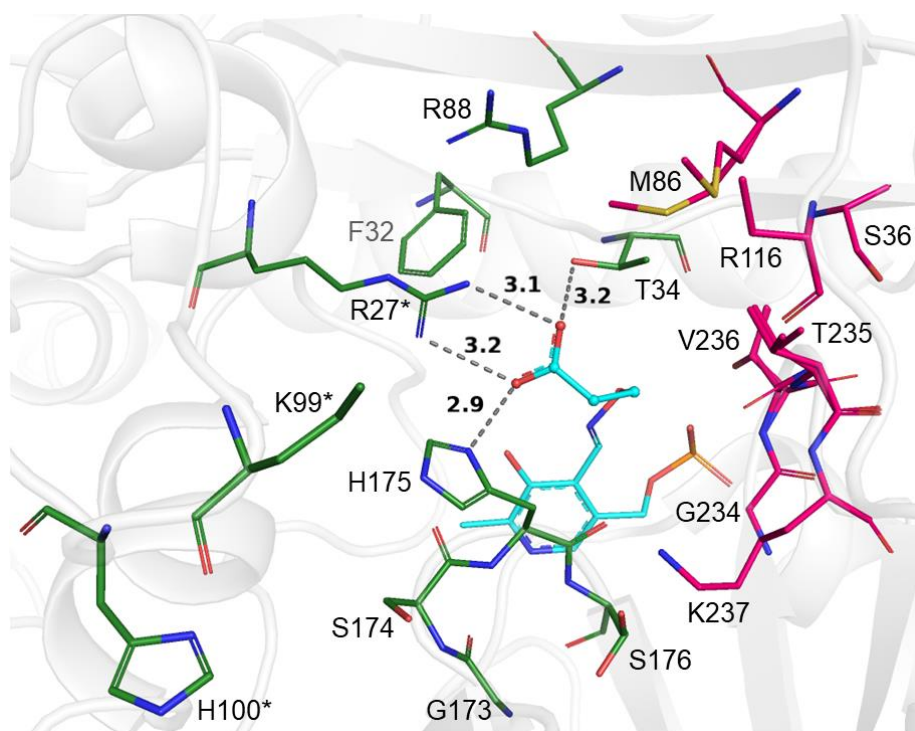


Рисунок 30. Активный центр AmcOxTA в комплексе с 3-аминооксипропионовой кислотой. Остатки О-кармана показаны зеленым цветом, Р-кармана – малиновым, оксим, сформированный PLP и 3-аминооксипропионовой кислотой, – ярко-голубым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера. Водородные связи показаны пунктиром, а соответствующие расстояния приведены в ангстремах (Å).

Необходимо отметить, что во всех комплексах остаток R88 с β Y-тяжа, консервативный для неканонических DAAT, не участвовал в координации лигандов и сохранял водородные связи с соседними остатками обеих субъединиц – Q26*, Y90 и E113.

Таким образом, в AmcOxTA идентифицированы две «карбоксилатные ловушки» в О- и Р-кармане, связывающие α -карбоксильную группу субстратов и γ -карбоксильную группу D-глутамата соответственно. В О-кармане «карбоксилатная ловушка» сформирована аминокислотными остатками регулярных элементов вторичной структуры: это остатки R27* с α -спирали, T34 с β X-тяжа и H175 с β -поворота1. У канонических DAAT аминокислотные остатки, образующие «карбоксилатную ловушку» в О-кармане, располагаются как на регулярных, так и на подвижных элементах вторичной структуры. В Р-кармане AmcOxTA «карбоксилатная ловушка» сформирована остатками β -поворота2 V236 и K237.

3.4. Варианты AmicoTA и их свойства

3.4.1. Выбор аминокислотных замен в последовательности AmicoTA

Для уточнения функциональной роли остатков активного центра и понимания особенностей организации активного центра у AmicoTA и вообще неканонических DAAT методом сайт-направленного метагенеза был сделан ряд вариантов AmicoTA с одиночными и двойными аминокислотными заменами в активном центре, далее получены рекомбинатные формы вариантов, которые охарактеризованы структурно и функционально. Остатки R27* и K237, которые образуют с D-глутаматом солевые мостики, заменили на лейцин (R27*L) и аланин (K237A) соответственно. Остатки β -поворота1 (¹⁷³GSHS¹⁷⁶) S174 и H175 заменили на пролин и треонин (S174P/H175T), аналогично β -повороту1 в CruTA (²⁰⁸GPTS²¹¹), которая активна не только с D-аминокислотами, но и с (R)-аминами. Данная замена влияет как на подвижность β -поворота1, так и на образование водородных связей. Остатки R88 (консервативный для неканонических DAAT) и E113, не взаимодействующие непосредственно с D-глутаматом и аналогами субстратов, заменили на лейцин (R88L) и аланин (E113A) соответственно. Также была выбрана двойная аминокислотная замена K99*A/H101*A для уточнения роли петли O-кармана.

3.4.2. Функциональная характеристика вариантов AmicoTA

Замена R27*L привела к потере активности AmicoTA в стандартной реакции трансаминирования при pH 5,0-9,0 (с 50 mM D-аланином и 5 mM α -кетоглутаратом). Вариант с заменой K237A был неактивен в полной реакции трансаминирования при pH 9,0, но демонстрировал активность на уровне WT при pH 5,0-5,5, при 40 °C (Рисунок 31). Вариант с заменами S174P/H175T был активен в диапазоне pH 6,0-10,0 при температуре 40-60 °C. Замены R88L, K99*A/H101*A и E113A не повлияли на оптимальные условия стандартной реакции трансаминирования.

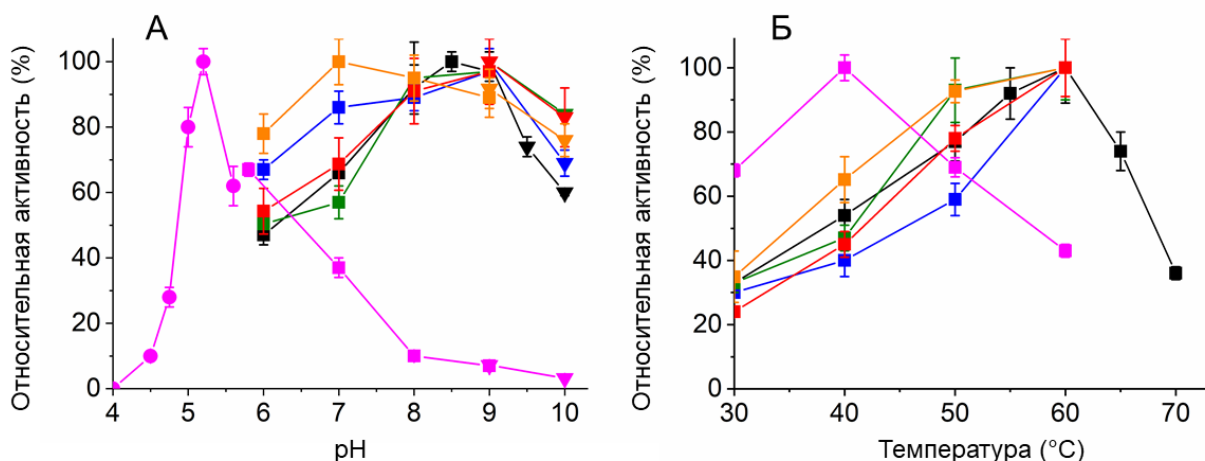


Рисунок 31. Зависимость активности AmicoTA (черные линии) и его вариантов (R88L – синий, K99*A/H101*A – зеленый, E113A – красный, S174P/H175T – оранжевый, K237A – малиновый) в полной реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом от pH и температуры. (А) Зависимость активности от pH определяли при 30 °C в 50 мМ Na-ацетатом буфере, pH 4,0-5,6 (круги), 25 мМ К-фосфат/25 мМ Трис-НСl буфере, pH 5,8-9,0 (квадраты) и 50 мМ CHES буфере, pH 9,0-10,0 (треугольники). (Б) Зависимость активности от температуры определяли в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8,0 и в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5,2 в случае варианта AmicoTA K237A. Значения удельных активностей приведены в Приложении 1. Бары соответствуют среднеквадратичному отклонению.

Кинетические параметры реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом, катализируемой вариантами AmicoTA, приведены в таблице 14. Смещение pH-оптимума реакции, катализируемой вариантом K237A, сопровождается понижением каталитической эффективности превращения α -кетоглутарата ферментом. Замены R88L и E113A снизили константу специфичности k_{cat}/K_M к обоим субстратам в одинаковой степени, однако при замене R88L это достигалось за счет снижения k_{cat} , тогда как при замене E113A – за счет роста K_M . Двойная замена K99*A/H101*A не влияла на активность фермента в полной реакции, тогда как двойная замена S174P/H175T привела к значительному снижению активности AmicoTA. Замены R27*L, K237A и двойная замена K99*A/H101*A не снизили температуру полуперехода $T_{0,5}$ фермента, тогда как варианты AmicoTA с заменами R88L, E113A и S174P/H175T оказались менее стабильными, что указывает на участие этих остатков в стабилизации функционального димера (Таблица 14). Визуальный анализ структуры AmicoTA и расчеты водородных связей показывают, что остаток K237 не участвует в образовании межсубъединичного контакта, поэтому замена K237A не влияет на стабильность функционального димера ($T_{0,5}$ для K237A и WT совпадают). Однако этот остаток в активном центре WT образует водородную связь с остатком S176 с β -поворотом 1 и замена K237A влияет таким образом на геометрию Р-кармана активного центра AmicoTA, что, по-видимому,

приводит к снижению оптимальной температуры реакции трансаминирования с 60 °С до 40 °С.

Таблица 14. Кинетические параметры полной реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом, катализируемой AmicoTA WT и вариантами, в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0, 60 °С. Температура полуперехода ($T_{0,5}$) между нативным и денатурированным состояниями ферментов определяли в 20 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8,0.

Amico	k_{cat} , с ⁻¹	D-аланин		α -кетоглутарат		$T_{0,5}$, °С
		K_M , мМ	k_{cat}/K_M , М ⁻¹ ·с ⁻¹	K_M , мМ	k_{cat}/K_M , М ⁻¹ ·с ⁻¹	
WT	10 ± 1	460 ± 60	22 ± 5	7,2 ± 0,8	1400 ± 300	68,9 ± 0,1
R27*L	Нет активности					71,5 ± 0,1
K237A	Нет активности					68,2 ± 0,1
K237A'	1,83 ± 0,08	320 ± 50	6 ± 1	70 ± 10	26 ± 5	
R88L	1,57 ± 0,05	390 ± 40	4,0 ± 0,5	8,3 ± 0,7	190 ± 20	63,1 ± 0,1
S174P/H175T	0,059 ± 0,004	38 ± 2	1,6 ± 0,2	16 ± 2	3,8 ± 0,7	64,4 ± 0,1
E113A	8,7 ± 0,6	1150 ± 150	8 ± 2	40 ± 6	220 ± 50	61,1 ± 0,1
K99*A/H101*A	11,3 ± 0,4	550 ± 60	20 ± 3	9 ± 1	1300 ± 200	69,3 ± 0,1

[']-50 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,2, 40 °С

Вклад остатков активного центра в связывание и дифференциацию субстратов AmicoTA анализировали путем сравнения кинетических параметров полуреакций вариантов с различными D-аминокислотами (Таблица 15). Выбор субстратов обусловлен свойствами заместителей при S_{α} атоме и включал отрицательно и положительно заряженные D-аминокислоты, а также алифатические и ароматические D-аминокислоты разных размеров. Вариант с заменой R27*L был неактивен со всеми субстратами, незначительная активность наблюдалась с D-глутаматом. Замена K237A при pH 9,0 вызвала снижение k_{max} для всех субстратов, однако в большей степени для специфического субстрата D-глутамата. Интересно, что эта замена привела к снижению K_D при pH 9,0 для неспецифических субстратов – D-аспартата, D-лейцина и D-фенилаланина. Перечисленные изменения в результате замены K237A привели к выравниванию k_{max}/K_D для всех субстратов при pH 9,0. Сдвиг pH в кислую область привел к повышению как k_{max} , так и K_D для всех субстратов, но в разной степени, при этом значения k_{max}/K_D для D-глутамата, D-аланина и D-аспартата повысились, тогда как для D-лейцина, D-орнитина и D-фенилаланина не изменились. Примечательно, что значение k_{max}/K_D для D-аспартата у варианта с заменой K237A при pH 5,2 оказалось на порядок выше, чем у AmicoTA WT при pH 9,0. Замена R88L привела к увеличению значений K_D для специфических субстратов D-глутамата и D-аланина и неспецифического субстрата D-фенилаланина, тогда как для неспецифических D-аспартата, D-лейцина, D-орнитина замена привела к снижению k_{max} . Изменения значений K_D и k_{max} в итоге привели к снижению констант

специфичности k_{\max}/K_D для всех субстратов в одинаковой степени. Двойная замена S174P/H175T резко снизила константы специфичности AmicoTA ко всем субстратам в полуреакциях, влияя как на значения k_{\max} и K_D в полуреакции с D-глутаматом, так и преимущественно на значения k_{\max} в полуреакциях с D-аланином, D-аспаратом и D-лейцином. Вариант с двойной заменой S174P/H175T был не активен с D-орнитином и D-фенилаланином. Замены E113A и K99*A/H101*A показали наименьшее влияние на кинетические параметры полуреакций, при этом при замене K99*A/H101*A константы специфичности k_{\max}/K_D для всех субстратов практически не изменились, тогда как замена E113A по-разному повлияла на кинетические параметры полуреакций с различными субстратами.

Таким образом, полученные кинетические параметры подтверждают важную роль R27* в связывании субстратов. Замены S174P/H175T и K237A значительно снижают активность AmicoTA в полуреакциях со всеми субстратами, причем остаток K237 отвечает за наибольшую специфичность AmicoTA к D-глутамату/ α -кетоглутарату и регулирует pH-оптимум реакции трансаминирования. Замена S174P/H175T могла повлиять как на связывание субстратов (H175 участвует в связывание α -карбоксильной группы), так и на положение кофактора (так как остатки S174 и H175 находятся в непосредственной близости к пиридиновому кольцу PLP) и через гибкость β -поворота1 на целостность активного центра AmicoTA. Влияние остатка R88 на связывание субстратов неспецифично, снижение $T_{0,5}$ свидетельствует о структурной роли этого остатка. Петля O-кармана, содержащая остатки K99* и H101*, не участвует в связывании и стабилизации функционального димера. Остаток E113, по-видимому, важен для целостности активного центра и стабилизации функционального димера.

Таблица 15. Кинетические параметры полуреакций AmicoTA WT и вариантов с D-глутаматом, D-аланином, D-аспаратом, D-лейцином, D-орнитином и D-фенилаланином в 50 mM CHES буфере, pH 9,0, 40 °C.

Amico	k_{max} $10^3, c^{-1}$	K_D $10^3,$ M	$k_{max}/$ $K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$	k_{max} $10^3, c^{-1}$	K_D $10^3,$ M	$k_{max}/$ $K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$	k_{max} $10^3, c^{-1}$	K_D $10^3,$ M	$k_{max}/$ $K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$	k_{max} $10^3, c^{-1}$	K_D $10^3,$ M	$k_{max}/$ $K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$	k_{max} $10^3, c^{-1}$	K_D $10^3,$ M	$k_{max}/$ $K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$	k_{max} $10^3, c^{-1}$	K_D $10^3,$ M	$k_{max}/$ $K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$
	<i>D-глутамат</i>			<i>D-аланин</i>			<i>D-аспарат</i>			<i>D-лейцин</i>			<i>D-орнитин</i>			<i>D-фенилаланин</i>		
WT	1080 ± 40	2,1 ± 0,2	520 ± 70	280 ± 10	50 ± 6	5,6 ± 0,8	118 ± 6	120 ± 20	1,0 ± 0,2	33 ± 2	100 ± 10	0,33 ± 0,05	2,1 ± 0,1	10 ± 1	0,21 ± 0,02	2,9 ± 0,2	19 ± 3	0,15 ± 0,02
R27*L	-	> 100	0,064 ± 0,003	Нет активности														
R88L	1050 ± 60	19 ± 2	55 ± 9	180 ± 20	200 ± 30	0,9 ± 0,2	12,6 ± 0,6	130 ± 20	0,10 ± 0,02	9,8 ± 0,6	100 ± 10	0,10 ± 0,02	0,40 ± 0,04	10 ± 2	0,04 ± 0,01	-	> 100	0,0062 ± 0,0002
K99*A/H101*A	440 ± 20	1,0 ± 0,1	440 ± 70	138 ± 5	37 ± 6	3,7 ± 0,7	50 ± 2	43 ± 4	1,2 ± 0,1	15,5 ± 0,5	30 ± 3	0,52 ± 0,07	0,60 ± 0,02	1,4 ± 0,2	0,43 ± 0,06	1,27 ± 0,04	6,9 ± 0,7	0,18 ± 0,02
K237A pH 9,0	4,7 ± 0,1	3,7 ± 0,4	1,3 ± 0,1	26 ± 9	31 ± 4	0,84 ± 0,04	1,4 ± 0,1	15 ± 2	0,093 ± 0,001	1,1 ± 0,1	5,2 ± 0,5	0,21 ± 0,02	0,20 ± 0,01	17 ± 4	0,012 ± 0,003	0,27 ± 0,01	2,9 ± 0,3	0,09 ± 0,01
K237A pH 5,2	1100 ± 100	18 ± 3	70 ± 10	1400 ± 70	150 ± 20	9,1 ± 0,9	520 ± 20	40 ± 3	13 ± 1	-	>100	0,14 ± 0,01	1,45 ± 0,05	45 ± 5	0,032 ± 0,004	-	>100	0,16 ± 0,01
S174P/H175T	170 ± 10	25 ± 4	7 ± 1	7,8 ± 0,4	90 ± 10	0,09 ± 0,02	0,22 ± 0,01	34 ± 7	0,006 ± 0,002	0,068 ± 0,001	16 ± 1	0,0043 ± 0,0003	Нет активности					
E113A	540 ± 30	1,5 ± 0,3	360 ± 90	270 ± 10	40 ± 5	7 ± 1	54 ± 1	18 ± 1	3,0 ± 0,2	36 ± 1	29 ± 1	1,20 ± 0,04	0,31 ± 0,01	12 ± 1	0,026 ± 0,002	7,6 ± 0,2	11 ± 1	0,70 ± 0,06

Таблица 16. Константы скорости обратных полуреакций AmicoTA WT и вариантов с D-глутаматом, D-аланином, D-аспаратом, D-лейцином, D-орнитином и D-фенилаланином в 50 mM CHES буфере, pH 9,0, 40 °C.

Amico	$k_{rev} 10^3, c^{-1}$					
	<i>D-глутамат</i>	<i>D-аланин</i>	<i>D-аспарат</i>	<i>D-лейцин</i>	<i>D-орнитин</i>	<i>D-фенилаланин</i>
WT	0	0	0	0	0	0
R27*L	0	Нет активности				
R88L	0	4 ± 1	0	0	0,051 ± 0,03	0,022 ± 0,001
K99*A/H101*A	0	18 ± 3	0	0	0	0
K237A, pH 9,0	0	3,2 ± 0,4	0	0	0,038 ± 0,007	0
K237A, pH 5,2	0	0	0	0,7 ± 0,3	0	0,16 ± 0,01
S174P/H175T	0	0,9 ± 0,1	0	0	Нет активности	
E113A	32 ± 16	4,8 ± 2,5	0	0	0	0

3.4.3. Структурный анализ вариантов AmicoTA

Структура PLP-форм вариантов AmicoTA с аминокислотными заменами R88L и E113A

Для вариантов AmicoTA с заменами R88L и E113A получены структуры их PLP-форм с разрешением 1,8 Å (PDB код: 8ONJ) и 1,9 Å (PDB код: 8ONL) соответственно. Обе кристаллические ячейки содержат две субъединицы, организованные в димер, аналогично AmicoTA WT (Рисунок 32). RMSD между атомами C_α субъединиц AmicoTA WT и вариантов с заменами R88L/E113A составляют 0,18/0,27 Å.

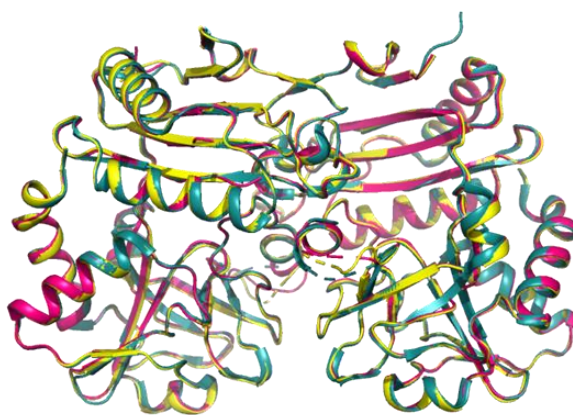


Рисунок 32. Наложение структур PLP-форм AmicoTA WT (бирюзовый), варианта с заменой R88L (желтый) и варианта с заменой E113A (малиновый).

В активном центре варианта с заменой R88L сохраняется геометрия Р-кармана и ориентация PLP как в WT, тогда как положения остатков в О-кармане изменены (Рисунок 33 А). В AmicoTA WT R88 образует несколько водородных связей с соседними атомами, а именно: NH1/R88-OE1/Q26* (2,7 Å), NH1/R88-OH/Y90 (2,7 Å), NH2/R88-OE1/Q26* (2,8 Å), NH2/R88-OE1/E113 (3,0 Å), NE/R88-O/W445 (2,9 Å). В результате замены R88L боковые цепи остатков Q26*, Y90 и E113 сместились, и сеть водородных связей разрушилась (Рисунок 33 А, Б, В, Г). Боковая цепь остатка Y90 сместилась в сторону соседней субъединицы, что привело к образованию водородной связи OH/Y90-O/Q26*. Также свое положение изменил и остаток Y146, гидроксильная группа которого сместилась на 0,5 Å (Рисунок 33 Д), однако важная для катализа водородная связь OH/Y146-O3/PLP сохранилась. Боковая цепь R27* находится в двух конформациях: первая, с заселенностью 0,6, аналогична AmicoTA WT, а во второй конформации боковая цепь смещена в сторону от активного центра на 4,2 Å (Рисунок 33 Е). В двух конформациях с одинаковой заселенностью также находится остаток H175 (Рисунок 33 А).

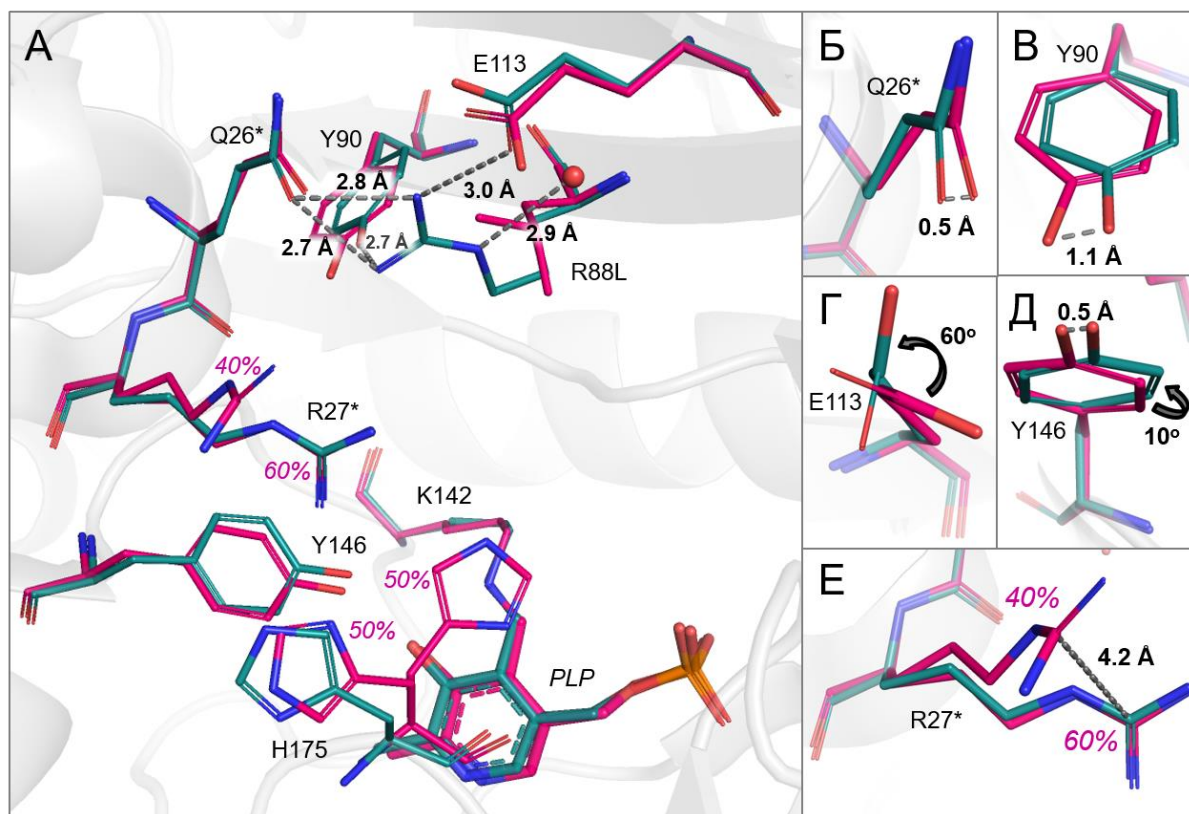


Рисунок 33. Организация активного центра варианта AmicoTA с заменой R88L. (А) Наложение остатков активных центров AmicoTA WT и варианта (субъединица В). Смещение боковых групп остатков Q26* (Б), Y90 (В), E113A (Г), Y146 (Д) и R27* (Е). Остатки AmicoTA WT изображены бирюзовым цветом, варианта – малиновым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера. Молекула воды в AmicoTA WT показана красным шариком. Заселенность различных положений боковых цепей остатков отображаются соответствующим цветом структуры. Водородные связи показаны пунктиром, а соответствующие расстояния приведены в ангстремах (Å).

Замена E113A привела к изменению конформации боковой цепи остатка R88 и образованию водородной связи NE/R88-OH/T34 (Рисунок 34 А, Б). В такой конформации гуанидиновые группы остатков R27* и R88 оказались перпендикулярно расположенными друг другу на расстоянии 3,2-3,3 Å между атомами азота. Соседние остатки Y90 и M86 также были смещены, в то время как остатки Q26* и R27* не изменили своего положения (Рисунок 34 В, Г).

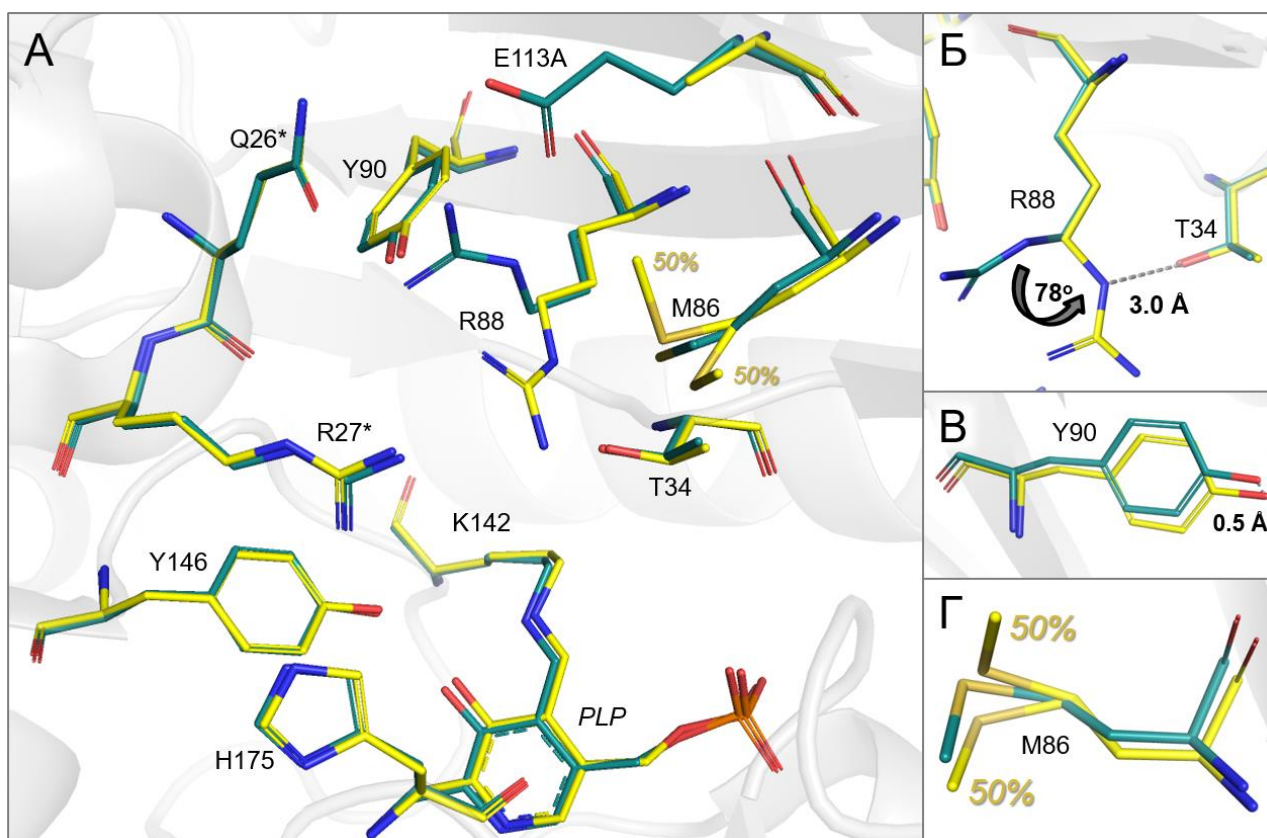


Рисунок 34. Организация активного центра варианта AmicoTA с заменой E113A. (А) Наложение остатков активных центров AmicoTA WT и варианта. Смещение боковых групп остатков R88 (Б), Y90 (В) и M86 (Г). Остатки AmicoTA WT изображены бирюзовым цветом, варианта – желтым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера. Заселенность различных положений боковых цепей остатков отображаются соответствующим цветом структуры. Водородные связи показаны пунктиром, а соответствующие расстояния приведены в ангстремах (Å).

Структура комплекса варианта AmicoTA с аминокислотной заменой E113A с 3-аминооксипропионовой кислотой

Для варианта AmicoTA с заменой E113A получена структура комплекса с 3-аминооксипропионовой кислотой (Рисунок 35). Комплекс получен путем сокристаллизации PLP-формы варианта с лигандом аналогично AmicoTA WT. Кристаллическая ячейка комплекса содержит пять субъединиц, четыре из которых организованы в два гомодимера с молекулами оксима в активных центрах, тогда как пятая субъединица находится в апоформе. Общая структура субъединицы варианта в комплексе с 3-аминооксипропионовой кислотой не отличается от таковой для варианта в PLP-форме. Остаток R88 в комплексе варианта в разных субъединицах занимает два положения: (1) развернут в сторону от O-кармана активного центра, как в AmicoTA WT (в субъединицах В, С (заселенность 0,55) и D), либо (2) развернут внутрь O-кармана активного центра, как в PLP-форме варианта AmicoTA E113A (в

субъединицах А и С (заселенность 0,45)). Карбоксильная группа оксима в активном центре всех четырех субъединиц варианта связана в Р-кармане через водородные связи с ϵ -аминогруппой K237 и атомами азота основной цепи K237 и V236 (Рисунок 35). Ни петля О-кармана, ни междоменная петля не изменили своего положения по сравнению с PLP-формой варианта AmicoTA E113A.

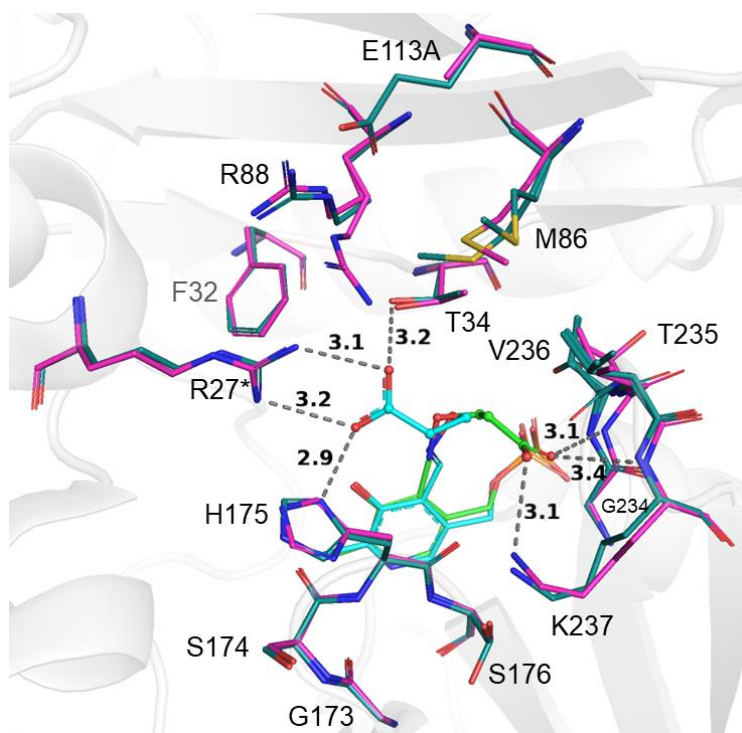


Рисунок 35. Наложение структур комплексов AmicoTA WT (субъединица А) и варианта с заменой E113A (субъединица С) с оксимом, образованным PLP и 3-аминооксипропионово́й кислотой. Остатки AmicoTA WT показаны бирюзовым цветом, варианта – розовым, оксим в комплексе с AmicoTA WT – ярко-голубым, в комплексе с вариантом – ярко-зеленым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера. Водородные связи показаны пунктиром, а соответствующие расстояния приведены в ангстремах (Å).

Наблюдаемые изменения указывают на нарушения геометрии активного центра AmicoTA в результате замен R88L и E113A. Подвижность остатков R27* и H175 в активном центре варианта с заменой R88L, по-видимому, приводит к ухудшению связывания α -карбоксильной группы субстратов и, в результате, к изменению кинетических параметров полной реакции трансаминирования и полуреакций. Кроме того, остаток R27* взаимодействует с остатком Y146 через водородную связь O/R27*-N/Y146 и через катион- π взаимодействие гуанидиновой группы R27* с бензольным кольцом Y146. Если в варианте с заменой R88L важная для катализа водородная связь OH/Y146-O3/PLP сохраняется, то подвижность R27* может влиять на катион- π взаимодействие и, в последствии, на

каталитические свойства кофактора. Изменение геометрии активного центра варианта E113A приводит к неспецифическим изменениям кинетических параметров как полуреакций, так и полной реакции, в том числе, к росту аффинности к D-лейцину, D-аспартату и D-фенилаланину, возможно, за счет улучшения координации α -карбоксильной группы субстратов из-за подвижности R88.

В структурах функциональных димеров замены R88L и E113A также привели к уменьшению количества водородных связей в межсубъединичном контакте (водородные связи NH2/R88-OE1/Q26* и NH1/R88-OE1/Q26* в вариантах отсутствуют), что согласуется с уменьшением $T_{0,5}$ для обоих вариантов.

3.5. Множественное структурное выравнивание DAAT

Анализ субстратной специфичности AmicoTA позволил отнести ее к семейству DAAT. Множественное структурное выравнивание AmicoTA и описанных в литературе DAAT выявило две группы DAAT (канонические и неканонические), различающиеся составом и положением консервативных остатков в активном центре (Таблица 17, приложение 2). Для группы канонических DAAT характерна триада Y-[RK]-H (Y31 на β X-тяже, R98* и H100* на петле O-кармана в bsDAAT) в O-кармане активного центра, для неканонических DAAT – два положительно заряженных остатка R-[RK] (R51* на α -спирали O-кармана и K117 на β Y-тяже в CruTA). P-карманы активных центров у обеих групп DAAT не содержат консервативных остатков. Однако P-карманы нескольких DAAT содержат положительно заряженный остаток R/K либо на β X-тяже (bsDAAT, bsphDAAT, SK1DAAT), либо на β -повороте2 (btDAAT, CruTA, Halhu, AmicoTA). Эти остатки, по-видимому, связывают γ -карбоксильную группу D-глутамата и α -кетоглутарата как K237 в AmicoTA. lsDAAT, mtDAAT и atDAAT не содержат аналогичных и каких-либо других положительно заряженных остатков в P-кармане и, возможно, поэтому lsDAAT и atDAAT не проявляют повышенной активности к D-глутамату/ α -кетоглутарату по сравнению с другими субстратами, а демонстрируют широкую субстратную специфичность (Таблицы 3 и 4) [70,73]. Междоменная петля не содержит консервативных последовательностей и ввиду ее отдаленного положения от активного центра, по-видимому, не вносит значительного вклада в катализ DAAT. В канонических DAAT, за исключением lsDAAT, высоко консервативны последовательности β -поворота1, который ограничивает вход в активный центр. В неканонических DAAT последовательности этого участка высоко вариативны. В третьем положении β -поворота1 у

всех DAAT расположены полярные остатки, однако у некоторых – это остатки S или T малого объема (bsDAAT, bsphDAAT, btDAAT, CpuTA), а у других – объемные остатки R, H или N (lsDAAT, Halhy, mtDAAT, atDAAT). β -Поворот² в P-кармане обеих группах DAAT содержит остатки S и T в случайных позициях.

В таблице 18 перечислены аминокислотные последовательности мотивов, характерные для двух групп DAAT, которые существенно различаются между собой. Структурный анализ AmicoTA и анализ свойств вариантов AmicoTA с аминокислотными заменами в активном центре позволяют отнести этот фермент к группе неканонических DAAT. На примере AmicoTA установлен механизм связывания субстратов и определены аминокислотные остатки активного центра, важные для катализа и стабилизации функционального димера для данной группы ферментов. В связывании α -карбоксильной группы субстратов участвуют остатки R с α -спирли O-кармана, T/Y с β X-тяжа и полярный остаток с β -поврота¹.

Таблица 17. Множественное структурное выравнивание DAAT. Аминокислотный состав структурных элементов, формирующих активный центр DAAT. Проанализированы кристаллические структуры следующих DAAT: DAAT из *Bacillus* sp. YM-1 (bsDAAT, PDB код: 1DAA), *B. thailandensis* (btDAAT, 4TM5), *C. pusillum* (CpuTA, 5K3W), *H. hydrossis* (Halhy, 7P7X) и *M. tuberculosis* (mtDAAT, 6Q1R). Проанализированы модели, полученные с помощью сервера AlphaFold, следующих DAAT: DAAT из *B. sphaericus* (bsphDAAT, UniProt код: P54693), *G. toebii* SK1 (SK1DAAT, Q4JFX0), *L. salivarius* (lsDAAT, Q1WRM6) и *A. thaliana* (atDAAT, Q8L493). Аминокислотные остатки, которые участвуют в связывании субстратов, показаны **красным жирным**. Сходные остатки в активном центре у гомологичных трансаминаз выделены **жирным**. Положительно заряженные остатки в Р-кармане показаны **жирным курсивом**. Канонические DAAT выделены розовым цветом, неканонические – зеленым. Пунктиром условно разделены элементы вторичной структуры, ограничивающие О-, Р-карманы и вход в активный центр.

DAAT	Идентичность, %	О-карман		Р-карман		О-карман		Р-карман		Вход	Р-карман
		α-спираль О-кармана	βХ-тяж	βУ-тяж	Петля О-кармана	Междоменная петля	β-поворот1	β-поворот2			
bsDAAT	100	²¹ DRGYGFG ²⁷	²⁹ GV Y EVV K VY ³⁷	⁸⁵ GHIYFQVT ⁹²	⁹³ RGTS PRAH QFPENTVKP ¹⁰⁹	¹¹⁷ NPRPLENLEKG ¹²⁸	¹⁷⁸ GSSS ¹⁸¹	²⁴⁰ STTS ²⁴³			
bsphDAAT	68.0	²² DRGYQFG ²⁸	³⁰ GIYEVIKVY ³⁸	⁸⁶ GHVYFQIT ⁹³	⁹⁴ RGTTSRNHIFPDASVPA ¹¹⁰	¹¹⁹ GERSIEQFEKG ¹²⁹	¹⁷⁹ CSSA ¹⁸²	²⁴¹ SVSS ²⁴⁴			
btDAAT	37.5	³² DRGFIFG ³⁸	⁴⁰ GVYEVVPIY ⁴⁸	⁰⁵ AIVYIQVT ¹¹²	¹¹³ RGVAKRGHAFPANAVP ¹²⁸	¹³⁷ LALPTDAQRAQG ¹⁴⁷	¹⁹⁸ GSSS ²⁰¹	²⁶⁰ SATK ²⁶³			
SK1DAAT	48.0	²⁵ ERGLQFG ³¹	³³ GVYEVARIY ⁴¹	⁹⁰ AIFYLQVT ⁹⁷	⁹⁸ RGSFPRNHAFPAENRP ¹¹³	¹²² MPRKIREIEQG ¹³²	¹⁸² GSSS ¹⁸⁵	²⁴⁴ STTS ²⁴⁷			
lsDAAT	35.9	²³ DRALYFG ²⁹	³¹ GCYDATTFK ³⁹	⁸⁷ GILYWQTS ⁹⁴	⁹⁵ RGSGLRNHIFPEDSQP ¹¹⁰	¹¹⁸ PYGLVPPFDTE ¹²⁷	¹⁷⁷ CAHS ¹⁸⁰	²⁴⁰ SSAC ²⁴²			
CpuTA	23.1	⁴⁶ DLGITRG ⁵²	⁵⁴ GVFETIAVI ⁶²	¹¹⁴ LFAKLILT ¹²¹	¹²² RGIEGEGRP ¹³⁰	¹³⁹ GEDFSQQRLG ¹⁴⁸	²⁰⁸ GPTS ²¹¹	²⁷⁰ SSVR ²⁷³			
Halhy	25.9	²³ DLSILRG ²⁹	³¹ GIFDYFLAR ³⁹	⁸⁷ AGIRLVLT ⁹⁴	⁹⁵ GGYSPDGYTVNP ¹⁰⁷	¹¹⁵ DLPASAWEFSAQG ¹²⁷	¹⁷⁷ SARS ¹⁸⁰	²³⁸ STIK ²⁴¹			
mtDAAT	23.6	²¹ DLAAVRG ²⁷	²⁹ GVFETLLVR ³⁷	⁷ GALRLIYS ⁹⁴	⁹⁵ RGREGGSAP ¹⁰³	¹¹² VPARVIGARRDG ¹²³	¹⁸³ GPRS ¹⁸⁶	²⁵² SSMT ²⁵⁵			
atDAAT	23.8	⁹⁹ DHMHVHRG ¹⁰⁵	¹⁰⁷ GVFDTALII ¹¹⁵	¹⁶³ GSLRYWLS ¹⁷⁰	¹⁷¹ AGPGDFLLSPSQCLLP ¹⁸⁶	¹⁹⁵ TNFAINPIG ²⁰³	²⁵⁶ GPNM ²⁵⁹	³²⁴ GSGI ³²⁷			
AmicoTA	28.7	²² DLII QRG ²⁸	³⁰ GVFET ISTH ³⁸	⁸⁵ TMVRPYIT ⁹²	⁹³ GDSFGKDHLFSSSRYPV ¹¹⁰	¹¹⁵ IRKPPILYEKG ¹²⁶	¹⁷³ GS HS ¹⁷⁶	²³⁴ GTV K ²³⁷			

Таблица 18. Аминокислотные последовательности мотивов, определяющих специфичность двух групп DAAT. Нумерация как в bsDAAT (PDB код: 1DAA).

Группа	Последовательность мотива 1				Последовательность мотива 2	
	26	31	33	35	x88xx	98xx
Канонические DAAT	F	Y	[VA]	[KRPT]	xYxQ	RxH
Неканонические DAAT	R	F	[TY]	[LA]	X[RK]x[IVW]	неконсервативный

3.6. Синтез D-аминокислот, катализируемый AmicoTA

Для оценки возможности применения AmicoTA в синтезе оптически чистых D-аминокислот применяли трехферментную систему (Рисунок 36), которая включала AmicoTA, ГГДГ и глюкозодегидрогеназу (ГДГ) из *Pseudomonas* sp. для смещения равновесия реакции трансаминирования в сторону продуктов реакции. D-Глутамат выбран как наиболее специфичный аминодонор (Таблица 11).

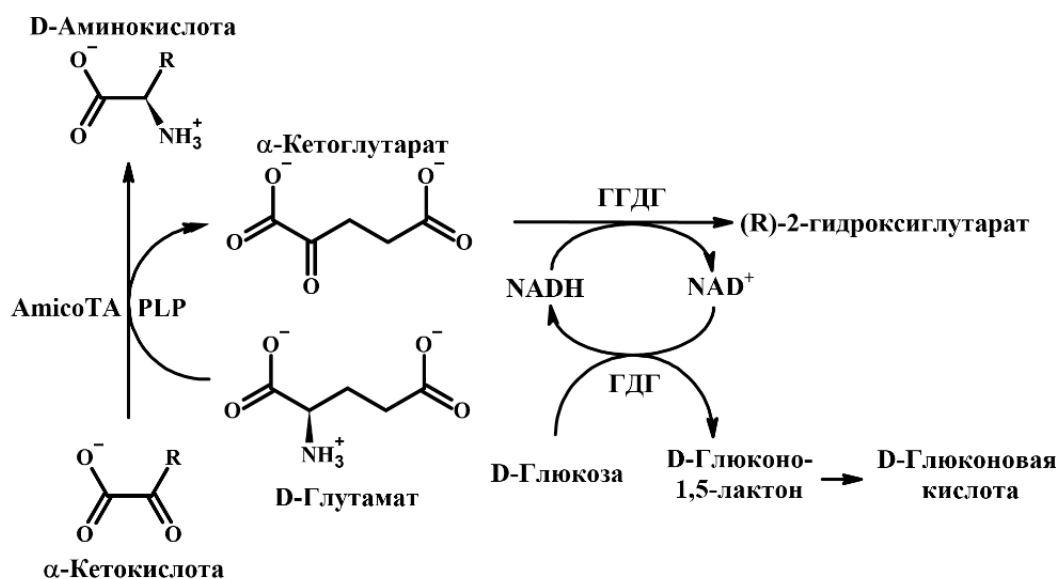


Рисунок 36. Трехферментная система для (R)-селективного аминирования α-кетокислот.

Значения активности AmicoTA в реакциях трансаминирования между D-глутаматом и различными α-кетокислотами представлены в таблице 19. Трехферментная система была опробована на субстратах – 2-оксобутират, 2-оксовалерат, 4-метил-2-оксовалерат, фенилпируват и 2-оксо-4-фенилбутират, для целей стереоселективного синтеза D-гомоаланина, D-норвалина, D-лейцина, D-фенилаланина и D-гомофенилаланина.

Таблица 19. Удельная активность AmicoTA в реакциях трансаминирования между 10 мМ D-глутаматом и 5 мМ α -кетокислотой. Условия определения активности: 100 мМ К-фосфатный буфер, pH 7,5, 50 °С.

α -Кетокислота	Формула α -кетокислоты	Соответствующая D-аминокислота	Активность, мU/мг
Пируват		Аланин	226 ± 4
2-Оксобутират		Гомоаланин	118 ± 5
2-Оксо-4-фенилбутират		Гомофенилаланин	45 ± 1
2-Оксовалерат		Норвалин	14 ± 1
Фенилпируват		Фенилаланин	7,7 ± 0,2
4-Метил-2-оксовалерат		Лейцин	4,7 ± 0,6
3-Метил-2-оксобутират		Валин	3,1 ± 0,3
2-Оксогексаноат		Норлейцин	2,61 ± 0,02
3-Метил-2-оксовалерат		Изолейцин	1,9 ± 0,05
4-Гидроксифенилпируват		Тирозин	1,6 ± 0,1

Синтез D-аминокислот проводили при 30 °С и фиксированных концентрациях ферментов (4 мг/мл AmicoTA (не больше 1 U/мл), 180 U/мл ГГДГ, 30 U/мл ГДФ) и NADH (1 мМ), но при различных концентрациях субстратов и кофактора PLP, при pH 7,5 (100 мМ К-фосфат) и pH 9,0 (100 мМ CHES). Условия проведения синтеза и выходы продуктов приведены в таблице 20. Выход продукта реакции *D*-глутамат + 2-оксобутират через 24 ч составил 100% как при pH 7,5, так и при pH 9,0, тогда как выход продукта реакции *D*-глутамат + 2-оксовалерат при pH 7,5 через 24 ч составил 100%, а при pH 9,0 – 86%. При pH 9,0 трехферментная система работает менее эффективно, однако через следующие 24 часа выход продукта реакции *D*-глутамат + 2-оксовалерат все же достиг 100%. Реакции *D*-глутамат + 4-метил-2-оксовалерат, *D*-глутамат + фенилпируват и *D*-глутамат +

2-оксо-4-фенилбутират проводили только при pH 7,5, и выходы продуктов составили 98% D-лейцина через 24 ч, 32% D-фенилаланина через 40 ч и 95% D-гомофенилаланина через 66 ч (Таблица 20).

При увеличении концентрации исходных субстратов D-глутамата и соответствующей α -кетокислоты до 500 мМ, а D-глюкозы до 1 М эффективность трехферментной системы снизилась. Через 24 часа выход продукта D-гомофенилаланина составил 5% и более не увеличился (Таблица 20). Также в реакционной смеси наблюдалась агрегация ферментов. Реакцию *D-глутамат + 2-оксо-4-фенилбутират* проводили в присутствии 20% ДМСО ввиду низкой растворимости кетосубстрата. По-видимому, высокие концентрации субстратов или ДМСО привели к денатурации ферментов в системе. Для реакций *D-глутамат + 2-оксобутират/2-оксовалерат* через 24 часа выходы продуктов достигли больших значений: выход D-гомоаланина составил 65% и 60% при pH 7,5 и 9,0 соответственно, а выход D-норвалина – 40% и 33% соответственно (Таблица 20). Для повышения выхода продукта при pH 7,5 повысили концентрацию PLP в реакционной смеси от 100 до 500 мкМ. Некоторое увеличение выхода D-гомоаланина и D-норвалина было достигнуто, однако 100% выход продуктов достигнут не был. Одной из причин менее эффективного синтеза могло быть закисление реакционной среды в результате накопления D-глюконовой кислоты (продукта окисления D-глюкозы, Рисунок 36). Возможно также ингибирование субстратами и продуктами реакции.

Для каждой системы определен энантиомерный избыток продукта D аминокислоты. Энантиомерные избытки D-гомоаланина, D-норвалина, D-лейцина, D-фенилаланина и D-гомофенилаланина составили 99,9, 99,5, 99,1, 99,3 и 99,5% соответственно.

Дополнительно мы проанализировали активность и стабильность ферментов системы в присутствии высоких концентраций субстратов и продуктов в условиях (*R*)-селективного аминирования. В ходе инкубирования AmicoTA, ГГДГ и ГДГ в 100 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,5 в присутствии 500 мМ D-глутамата, 500 мМ 2-оксовалерата, 100 мкМ PLP и 1 М D-глюкозы при 30 °С в течение 24 часов активность AmicoTA не изменилась, ГГДГ уменьшилась на 40%, а ГДГ – на 20%. Таким образом, инактивация трехферментной системы в присутствии высоких концентраций субстратов в течение 24 часов не связана с полной инактивацией какого-либо из ферментов в условиях (*R*)-селективного аминирования. Далее мы проанализировали влияние высоких концентраций субстратов и продуктов на активность

AmicoTA в реакциях *D*-глутамат + 2-оксобутират и *D*-глутамат + 2-оксовалерат. Высокие концентрации субстратов (до 500 мМ) не ингибировали AmicoTA, тогда как высокие концентрации продуктов реакции *D*-глутамат + 2-оксовалерат ингибировали AmicoTA. D-норвалин ингибировал AmicoTA при концентрациях от 200 мМ, тогда как глутаровая кислота (аналог продукта трехферментной системы (*R*)-2-гидроксиглутарата) ингибировала AmicoTA уже при концентрации 50 мМ, а при 500 мМ ингибировала AmicoTA на 90%. Таким образом, ингибирование AmicoTA высокими концентрациями продуктов реакции могло быть одной из причин снижения выходов продуктов при высоких концентрациях субстратов.

Таблица 20. (*R*)-селективное аминирование α -кетокислот: условия проведения синтеза и выходы продуктов реакций.

[D-Глутамат], мМ	[α -Кетокислота], мМ	[PLP], мкМ	pH	Время, ч	Выход продукта, %	[Полученная D-аминокислота], мМ
2-Оксобутират						D-Гомоаланин
100	50	100	7,5	24	100	50
			9,0		100	50
500	500		7,5		65	325
			9,0		60	300
		200	75	375		
		500	7,5		87	435
2-Оксовалерат						D-Норвалин
100	50	100	7,5	24	100	50
			9,0		68	34
500	500		7,5		40	200
			9,0		33	165
		200	58	290		
		500	7,5		64	320
4-Метил-2-оксовалерат						D-Лейцин
100	50	100	7,5	24	98	49
Фенилпируват						D-Фенилаланин
100	50	100	7,5	40	32	16
2-Оксо-4-фенилбутират						D-Гомофенилаланин
100	50	100	7,5	60	95	47,5
500*	500*			24	5	25

*-в систему добавляли 20% ДМСО

Таким образом, мы показали, принципиальную возможность использования AmicoTA для препаративного получения оптически чистых D-аминокислот. Однако проведенные эксперименты являются предварительными и эффективность трехферментной системы возможно улучшить:

1. Использованием D-аланина в качестве аминоконатора с предварительным подбором высокоспецифичной лактатдегидрогеназы для вывода продукта пирувата из системы в целях смещения равновесия реакции трансаминирования. D-аланин является более дешевым субстратом, чем D-глутамат, а образовавшийся копродукт пируват может проявлять меньший эффект ингибирования AmioTA , чем α -кетоглутарат.
2. Использованием системы регенерации кофактора NAD^+ – формиатдегидрогеназа/формиат. Данная система требует субстрата (соли формиата) по массе в 2-3 раза меньше, чем система глюкозодегидрогеназа/глюкоза (молярная масса формиата в 3 раза меньше, чем глюкозы). Данная система не приводит к закислению среды и предполагает более легкий способ удаления избытка субстрата (формиата) и продукта (карбоната) с помощью лиофилизации.
3. Добавлением в систему более дешевого NAD^+ вместо NADH и снижением его концентрации в 20-50 раз, что увеличит количество циклов регенерации кофактора.
4. Проведением синтеза при более высоких температурах, что снизит вероятность микробного заражения и время синтеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ориентируясь на потребности производства и фармацевтики в оптически активных соединениях, DAAT стоит рассматривать как высокостереоселективные биокатализаторы синтеза разнообразных D-аминокислот и стереоселективного аминирования сложных органических молекул. Однако до сих пор применение DAAT ограничивается только теоретическими и лабораторными разработками. Одна из причин – это малая изученность этого семейства трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена. До недавнего времени знания об устройстве функционального димера DAAT ограничивались характеристикой DAAT из *Bacillus* sp. YM-1. Однако за последние восемь лет было описано несколько новых DAAT, организация активного центра которых отличается от таковой у DAAT из *Bacillus* sp. YM-1. Это позволило расширить представления как о вариативности свойств DAAT, так и о возможности их применения для целей биотехнологии.

В данной работе представлена структурно-функциональная характеристика новой неканонической DAAT из *Aminobacterium colombiense* (AmicoTA). Исследования проводились с рекомбинантной формой фермента. В ходе функциональных исследований применялись спектральные методы (спектрофотометрия, спектрофлуоресценция, спектроскопия кругового дихроизма), кинетические методы, хроматография, электрофорез и т.д. Показано, что AmicoTA активна с разнообразными D-аминокислотами в диапазоне значений pH 6,0 - 10,0 при 30-60 °C, наибольшую специфичность фермент проявляет к D-глутамату и α -кетоглутарату. Несмотря на невысокую активность AmicoTA по сравнению с другими трансаминазами, фермент оказался эффективным в синтезе ряда D-аминокислот (D-гомоаланин, D-норвалин, D-лейцин, D-фенилаланин и D-гомофенилаланин) с энантиомерным избытком хирального продукта более 99%.

Методом рентгеноструктурного анализа были получены пространственные структуры холоформы AmicoTA, комплексы холофермента (с субстратом D-глутаматом, ингибиторами D-цикloserином и 3-аминооксипропионовой кислотой), а также холоформы вариантов с аминокислотными заменами E113A и R88L и комплекса холофермента варианта E113A (с 3-аминооксипропионовой кислотой). Дальнейший анализ структур позволил идентифицировать аминокислотные остатки, формирующие активный центр фермента. Был идентифицирован альтернативный канонической «карбоксилатной ловушке» сайт связывания α -карбоксильной группы субстратов, сформированный триадой аминокислот R27, T34 и H175. В связывании γ -карбоксильной группы наилучшего субстрата D-глутамата оказались

задействованы остатки V236 и K237 в Р-кармане активного центра. Все остатки, участвующие в связывании субстратов и ингибиторов AmicoTA расположены на регулярных элементах вторичной структуры (α -спираль, β -тяж и β -повороты) в отличие от канонической DAAT из *Bacillus* sp. YM-1. Отличным оказалось и удаленное от активного центра положение петли О-кармана как в холоферменте AmicoTA, так и в комплексах. Такое положение петли делает активный центр AmicoTA постоянно открытым. У канонической DAAT из *Bacillus* sp. YM-1 на этой петле расположены остатки, вовлеченные в связывание субстратов, поэтому в комплексах с субстратами активный центр закрыт от растворителя.

Для уточнения функциональной роли остатков активного центра AmicoTA получен ряд вариантов с одиночными и двойными аминокислотными заменами в активном центре и изучены их структурно-функциональные свойства. По результатам анализа остаток R27, образующий солевой мостик с α -карбоксыльной группой субстратов, оказался наиболее критичным для активности AmicoTA. Также важным для функционирования является β -поворот ¹⁷³GS¹⁷⁶SHS¹⁷⁶, дополнительно стабилизирующий α -карбоксыльную группу субстратов и структуру функционального димера. Остаток K237 обеспечивает наибольшую специфичность AmicoTA к D-глутамату и α -кетоглутарату, а также определяет pH-оптимум реакции трансаминирования. Замена K237A приводит к смещению pH-оптимума катализируемых реакций в кислую область, что является полезным наблюдением для разработки биокатализаторов. Остатки активного центра AmicoTA R88 и E113 преимущественно вносят вклад в поддержание активной конформации функционального димера. Остатки K99* и H101*, важные для связывания субстратов у канонических DAAT, не участвуют ни в связывании субстратов, ни в стабилизации функционального димера AmicoTA. Таким образом, для AmicoTA определен механизм узнавания субстратов, уточнена роль аминокислотных остатков активного центра в катализе, стабилизации структуры, и регуляции pH-оптимум реакций трансаминирования.

Полученные результаты можно обобщить для известных на сегодня неканонических DAAT. Все остатки, формирующие сайт связывания субстратов у неканонических DAAT, расположены на регулярных элементах вторичной структуры (α -спираль, β -тяж и β -поворот). Гибкая петля О-кармана в данной группе ферментов не участвует в катализе, но может быть важна для правильного сворачивания белковой глобулы. Положительно заряженный остаток K/R в Р-кармане активного центра DAAT обеспечивает специфичность неканонических DAAT к D-глутамату и α -кетоглутарату за счет связывания γ -карбоксыльной группы субстратов. Также этот остаток может определять pH-оптимум катализируемых реакций.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что неканоническая трансминаза D-аминокислот из бактерии *A. colombiense* (AmicoTA) активна с разнообразными D-аминокислотами и α -кетокислотами при pH 6,0-10,0 и 30-60 °C. AmicoTA неактивна с L-аминокислотами и первичными (R)-аминами.
2. Определены «субстрат-связывающие» остатки в AmicoTA. α -Карбоксильная группа субстратов связывается боковыми группами остатков R27, T34 и N175. Высокая специфичность AmicoTA к D-глутамату/ α -кетоглутарату достигается взаимодействием γ -карбоксильной группы субстрата с боковой группой остатка K237. Показано, что остаток K237 также определяет pH-оптимум катализируемых реакций, а замена K237A приводит к получению варианта AmicoTA с pH-оптимумом 5,2.
3. Определены остатки активного центра, стабилизирующие рабочую конформацию активного центра и структуру функционального димера AmicoTA: R88, E113 и остатки β -поворота1 S174 и N175.
4. В результате биоинформатического и структурного анализа предлагается среди охарактеризованных трансминаз D-аминокислот выделить группу неканонических трансминаз с организацией активного центра, как у трансминазы из *A. colombiense*.
5. Показано, что AmicoTA эффективно катализирует синтез D-гомоаланина, D-норвалина, D-лейцина, D-фенилаланина и D-гомофенилаланина из кетокислот, энантиомерный избыток продукта D-аминокислоты составляет 99,9, 99,5, 99,1, 99,3 и 99,5% соответственно.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus

1. **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 transaminase: a case of the enzyme from *Aminobacterium colombiense* // *Molecules*. – 2023. Vol. 28. – P. 2109. doi: 10.3390/molecules28052109. (Импакт-фактор Web of Science 4,6; 1,3 печатных листа; 50% вклад автора работы)
2. **Шилова С.А.**, Ракитина Т.В., Попов В.О., Безсуднова Е.Ю. Перспективы применения трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense* для (R)-селективного аминирования α -кетокислот // *Вестник Московского университета. Серия 2. Химия*. – 2023. Т. 64. №2. С. 85-98. doi: 10.55959/MSU0579-9384-2-2023-64-2-85-98. (Импакт-фактор Web of Science 0,7; 0,875 печатных листа; 80% вклад автора работы)
3. **Шилова С.А.**, Матюта И.О., Безсуднова Е.Ю., Миняев М.Е., Николаева А.Ю., Попов В.О., Бойко К.М. Кристаллическая структура комплекса трансаминазы D-аминокислот из *Aminobacterium colombiense* с D-циклосерином // *Кристаллография*. – 2023. Т. 68. №6. С. 934-940. doi: 10.31857/S0023476123600775. (Импакт-фактор Web of Science 0,7; 0,44 печатных листа; 50% вклад автора работы)
4. **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 // *Biochemical Journal*. – 2023. Vol. 480. – P. 1267-1284. doi: 10.1042/BCJ20230233. (Импакт-фактор Web of Science 4,1; 1,1 печатных листа; 70% вклад автора работы).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение 1

Удельные активности вариантов AmicoTA в pH- и температурных зависимостях

Удельная активность вариантов AmicoTA при 30 °С в различных буферах

AmicoTA	pH					
	25 мМ К-фосфат/25 мМ Трис-НСl буфер				50 мМ CHES буфер	
	6,0	7,0	8,0	9,0	9,0	10,0
R88L	0,0643 ± 0,002	0,083 ± 0,004	0,085 ± 0,003	0,09 ± 0,01	0,096 ± 0,007	0,066 ± 0,001
K99*A/H101*A	0,24 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,46 ± 0,05	0,47 ± 0,01	0,49 ± 0,05	0,41 ± 0,03
E113A	0,101 ± 0,007	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,01
S174P/H175T	0,0068 ± 0,0004	0,0087 ± 0,0006	0,0082 ± 0,0006	0,0077 ± 0,0006	0,0079 ± 0,0005	0,0066 ± 0,0003

Удельная активность варианта AmicoTA K237A при 30 °С в различных буферах

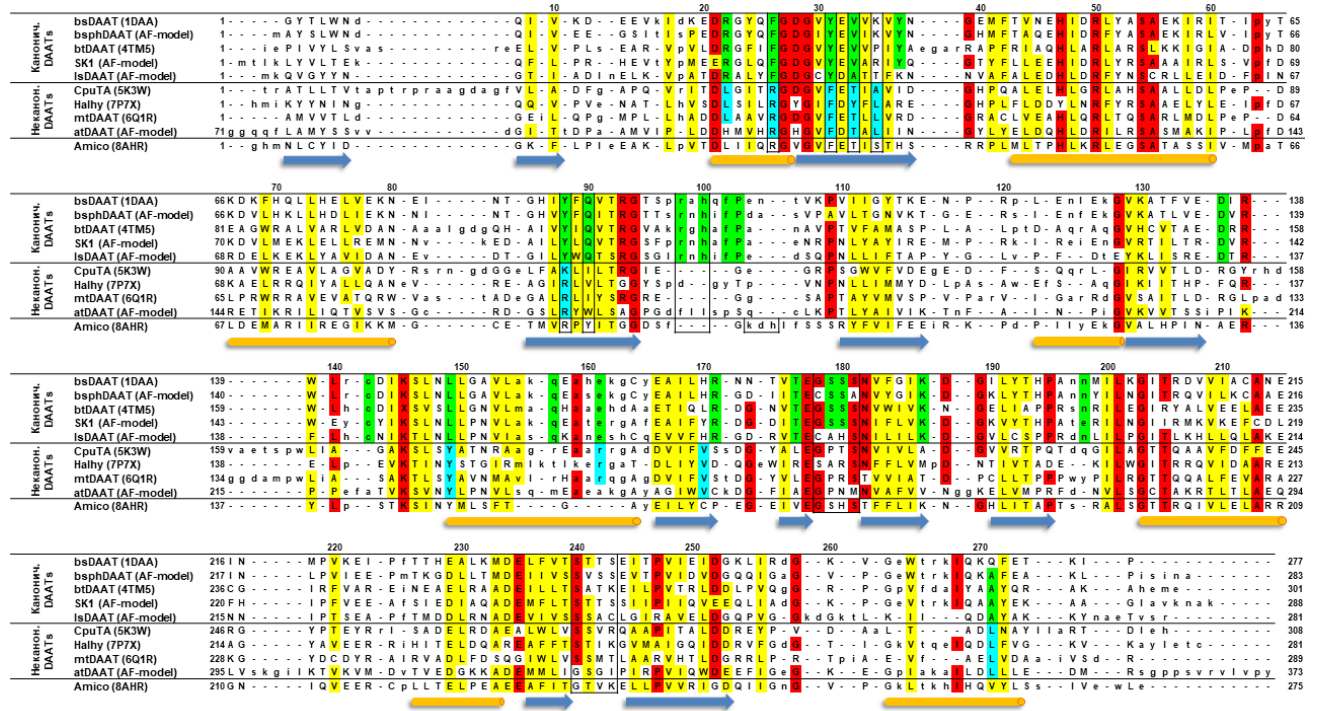
pH											
50 мМ Na-ацетатный буфер						25 мМ К-фосфат/25 мМ Трис-НСl буфер				50 мМ CHES буфер	
4,0	4,5	4,75	5,0	5,2	5,6	5,8	7,0	8,0	9,0	9,0	10,0
0	0,0099 ± 0,0001	0,0277 ± 0,0008	0,079 ± 0,005	0,099 ± 0,003	0,061 ± 0,004	0,066 ± 0,001	0,037 ± 0,001	0,0099 ± 0,0001	0,0070 ± 0,0001	0,0071 ± 0,0001	0,00317 ± 0,00001

Удельная активность вариантов AmicoTA в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8,0 при различных температурах

AmicoTA	T (°C)			
	30	40	50	60
R88L	0,093 ± 0,001	0,12 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,31 ± 0,02
K99*A/H101*A	0,47 ± 0,01	0,67 ± 0,03	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,1
E113A	0,18 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,78 ± 0,07
S174P/H175T	0,0077 ± 0,0006	0,014 ± 0,001	0,0205 ± 0,0007	0,022 ± 0,002
K237A (50 мМ Na-ацетат, pH 5,2)	0,099 ± 0,003	0,145 ± 0,006	0,100 ± 0,005	0,061 ± 0,002

Приложение 2

Множественное структурное выравнивание DAAT. Проанализированы кристаллические структуры следующих DAAT: DAAT из *Bacillus* sp. YM-1 (bsDAAT, PDB код: 1DAA), *B. thailandensis* (btDAAT, 4TM5), *C. pusillum* (CpuTA, 5K3W), *H. hydrossis* (Halhy, 7P7X) и *M. tuberculosis* (mtDAAT, 6Q1R), *A. colombiense* (Amico, 8AHR). Проанализированы модели, полученные с помощью сервера AlphaFold, следующих DAAT: DAAT из *B. sphaericus* (bsphDAAT, UniProt код: P54693), *G. Toebii* SK1 (SK1DAAT, Q4JFX0), *L. salivarius* (lsDAAT, Q1WRM6) и *A. thaliana* (atDAAT, Q8L493). Одинаковые остатки для всех DAAT выделены красным цветом, похожие остатки – желтым, одинаковые остатки только у канонических и неканонических DAAT – зеленым и голубым соответственно. β -Тяжи обозначены синими стрелками, α -спирали – оранжевыми цилиндрами. Остатки, формирующие активный центр, выделены в рамки.



СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Braunstein A.E. Amino Group Transfer // *The Enzymes*. 3d ed. / ed. P.D. B. London: Acad. Press, 1973. - С. 379–481.
2. Eliot A.C., Kirsch J.F. Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations // *Annu. Rev. Biochem.* 2004. - Т. 73. - С. 383–415.
3. Steffen-Munsberg F. et al. Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications // *Biotechnol. Adv.* 2015. - Т. 33. - С. 566–604.
4. 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. - Т. 364. - С. 1564–1572.
5. 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. - Т. 353. - С. 3227–3233.
6. Gavin D.P., Reen F.J., Woods D.F. Genome mining and characterisation of a novel transaminase with remote stereoselectivity // *Sci. Rep.* 2019. - Т. 9. - С. 20285.
7. Yu H. Biochemical and Structural Characterization of an (*R*)-Selective Transaminase in the Asymmetric Synthesis of Chiral Hydroxy Amines // *Adv. Synth. Catal.* 2021. - Т. 363. - С. 4582–4589.
8. 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.* Nature Publishing Group, 2010. - Т. 6. - С. 807–813.
9. Grishin N. V., Phillips M.A., Goldsmith E.J. Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases // *Protein Sci.* 1995. - Т. 4. - С. 1291–1304.
10. Braunstein A.E. The enzyme system of transamination, its mode of action and biological significance // *Nature*. 1939. - Т. 143. - С. 609–610.
11. Браунштейн М.М., Шемякин А.Е. Теория процессов аминокислотного обмена, катализируемых пиридоксальными ферментами // *Биохимия*. 1953. - Т. 18. - С. 393–411.
12. Ovchinnikov Y.A. et al. The complete amino acid sequence of cytoplasmic aspartate aminotransferase from pig heart // *FEBS Lett.* 1973. - Т. 29. - С. 31–34.
13. Ayling J.E., Snell E.E. Mechanism of Action of Pyridoxamine Pyruvate Transaminase // *Biochemistry*. 1968. - Т. 7. - С. 1616–1625.
14. Snell E.E., Di Mari S.J. Schiff Base Intermediates in Enzyme Catalysis // *Enzymes*. 1970. - Т. 2. - С. 335–370.
15. Hayashi H., Tanase S., Yagi T. Esmond E. Snell - The pathfinder of B vitamins and

cofactors // J. Biochem. 2010. - T. 147. - C. 451–457.

16. Kirsch J.F., Toney A.N.D.M.D., Hall B. Bronsted analysis of enzymatic proton transfer reactions through site-directed mutagenesis // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1990. - T. 585. - C. 48–57.

17. Toney M.D., Kirsch J.F. Tyrosine 70 Fine-Tunes the Catalytic Efficiency of Aspartate Aminotransferase // Biochemistry. 1991. - T. 30. - C. 7456–7461.

18. 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. - T. 32. - C. 1471–1479.

19. 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. - T. 45. - C. 529–536.

20. Fasella P. Pyridoxal phosphate. // Annu. Rev. Biochem. 1967. - T. 36. - C. 185–210.

21. Fasella P., Giartosio A., Hammes G.G. The Interaction of Aspartate Aminotransferase with α -Methylaspartic Acid // Biochemistry. 1966. - T. 5. - C. 197–202.

22. 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. - T. 29. - C. 5469–5476.

23. 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. - T. 31. - C. 5878–5887.

24. 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. - T. 37. - C. 15076–15085.

25. 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 process // Biochemistry. 1997. - T. 36. - C. 13558–13569.

26. 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. Elsevier B.V., 2011. - T. 1814. - C. 1426–1437.

27. 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. - T. 134. - C. 8436–8438.

28. Griswold W.R., Toney M.D. Role of the Pyridine Nitrogen in Pyridoxal Phosphate

Catalysis // J. Am. Chem. Soc. 2011. - T. 133. - C. 14823–14830.

29. Chan-Huot M. et al. 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. - T. 135. - C. 18160–18175.

30. Zhou X., Toney M.D. pH Studies on the mechanism of the pyridoxal phosphate-dependent dialkylglycine decarboxylase // Biochemistry. 1999. - T. 38. - C. 311–320.

31. Borisov V. V., Borisova S.N., Sosfenov N.I., Vainshtein B.K. Electron density map of chicken heart cytosol aspartate transaminase at 3.5 Å resolution // Nature. 1980. - T. 284. - C. 189–190.

32. 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. - T. 104. - C. 2343–2357.

33. Jensen R.A., Gu W. Evolutionary recruitment of biochemically specialized subdivisions of family I within the protein superfamily of aminotransferases // J. Bacteriol. 1996. - T. 178. - C. 2161–2171.

34. 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. - T. 133. - C. 14823–14830.

35. Thorne C.B., Gmez C.G., Housewright R.D. Transamination of D-amino acids by *Bacillus subtilis* // J. Bacteriol. 1955. - T. 69. - C. 357–362.

36. Taylor R.T., Shakespeare V., Jenkins W.T. Branched Chain Amino Acid Aminotransferase // J. Biol. Chem. 1970. - T. 245. - C. 4880–4885.

37. Pan P., Jaussi R., Gehring H., Giannattasio S., Christen P. Shift in pH-Rate Profile and Enhanced Discrimination between Dicarboxylic and Aromatic Substrates in Mitochondrial Aspartate Aminotransferase Y70H // Biochemistry. 1994. - T. 33. - C. 2757–2760.

38. 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. - T. 93. - C. 1563–1573.

39. Slabu I., Galman J.L., Lloyd R.C., Turner N.J. Discovery, Engineering, and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts // ACS Catal. 2017. - T. 7. - C. 8263–8284.

40. Guo F., Berglund P. Transaminase biocatalysis: Optimization and application // Green Chem. Royal Society of Chemistry, 2017. - T. 19. - C. 333–360.

41. Tanizawa K., Masu Y., Asano S., Tanaka H., Soda K. Thermostable D-amino acid aminotransferase from a thermophilic *Bacillus* species // J. Biol. Chem. 1989. - T. 264. - C. 2445–2449.

42. 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. - T. 26. - C. 5053–5072.

43. 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. - T. 398. - C. 141–145.

44. 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. - T. 104. - C. 777–784.

45. 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. - T. 42. - C. 3725–3733.

46. Peisach D., Chipman D.M., Van Ophem P.W., Manning J.M., Ringe D. Crystallographic study of steps along the reaction pathway of D-amino acid aminotransferase // *Biochemistry*. 1998. - T. 37. - C. 4958–4967.

47. Xiang C., Ao Y.-F., Höhne M., Bornscheuer U.T. Shifting the pH Optima of (*R*)-Selective Transaminases by Protein Engineering. // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. - T. 23. - C. 15347.

48. 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. - T. 40. - C. 7453–7463.

49. 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. - T. 34. - C. 9661–9669.

50. 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. - T. 70. - C. 1086–1093.

51. Norton J.E., Sokatch J.R. Purification and partial characterization of the branched chain amino acid transaminase of *Pseudomonas aeruginosa* // *BBA - Enzymol*. 1970. - T. 206. - C. 261–269.

52. 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. - T. 96. - C. 127–134.

53. 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. - T. 158. - C. 130–138.

54. Lipscomb E.L., Horton H.R., Frank B., Armstrong. Molecular Weight, Subunit

Structure, and Amino Acid Composition of the Branched Chain Amino Acid Aminotransferase of *Salmonella Typhimurium* // Biochemistry. 1974. - T. 13. - C. 2070–2077.

55. 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. - T. 70. - C. 1086–1093.

56. Chen C. De et al. Crystal structures of complexes of the branched-chain aminotransferase from deinococcus radiodurans with α -Ketoisocaproate and L-glutamate suggest the radiation resistance of this enzyme for catalysis // J. Bacteriol. 2012. - T. 194. - C. 6206–6216.

57. Telzerow A. et al. Amine Transaminase from *Exophiala Xenobiotica* - Crystal Structure and Engineering of a Fold IV Transaminase that Naturally Converts Biaryl Ketones // ACS Catal. 2019. - T. 9. - C. 1140–1148.

58. Isupov M.N. et al. Thermostable Branched-Chain Amino Acid Transaminases From the Archaea *Geoglobus acetivorans* and *Archaeoglobus fulgidus*: Biochemical and Structural Characterization // Front. Bioeng. Biotechnol. 2019. - T. 7. - C. 1–16.

59. 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. - T. 32. - C. 1810–1815.

60. Kishimoto K., Yoshimura T., Esaki N., Sugio S., Manning J.M., Soda K. Role of Leucine 201 of Thermostable D-Amino Acid Aminotransferase from a Thermophile, *Bacillus* sp. YM-1 // J. Biochem. 1995. - T. 117. - C. 691–696.

61. Van Ophem P.W., 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. - T. 4. - C. 2578–2586.

62. Guan L.J. et al. A new target region for changing the substrate specificity of amine transaminases // Sci. Rep. 2015. - T. 5. - C. 1–8.

63. 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. - T. 282. - C. 407–415.

64. 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. - T. 6. - C. 1–12.

65. 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. Elsevier, 2019. - T. 1867. - C. 575–585.

66. 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. - T. 15. - C. 416–424.

67. Radkov A.D., Moe L.A. Bacterial synthesis of D-amino acids // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. - T. 98. - C. 5363–5374.
68. Pucci M.J., Thanassi J.A., Ho H.-T., Falk P.J., Dougherty T.J., Messer W. *Staphylococcus haemolyticus* Contains Two D-Glutamic Acid Biosynthetic Activities, a Glutamate Racemase and a D-Amino Acid Transaminase // *J. Bacteriol.* 1995. - T. 177. - C. 336–342.
69. Bugg T.D.H., Walsh C.T. Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: Enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance // *Nat. Prod. Rep.* 1992. - T. 9. - C. 199–215.
70. 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. - T. 275. - C. 1188–1200.
71. Yonaha K., Misono H., Yamamoto T., Soda K. D-Amino Acid Aminotransferase of *Bacillus sphaericus*. Enzymologic and spectrometric properties // *J. Biol. Chem.* 1975. - T. 250. - C. 6983–6989.
72. 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. - T. 72. - C. 1588–1594.
73. 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. - T. 94. - C. 15–22.
74. Bakunova A.K., Isaikina T.Y., Popov V.O., Bezsudnova E.Y. Asymmetric Synthesis of Enantiomerically Pure Aliphatic and Aromatic D-Amino Acids Catalyzed by Transaminase from *Haliscomenobacter hydrossis* // *Catalysts.* 2022. - T. 12. - C. 1551–1568.
75. Peisach D., Chipman D.M., Van Ophem P.W., 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. - C. 2268–2274.
76. 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 Residue1 // *J. Biochem.* 1997. - T. 122. - C. 1182–1189.
77. Lehninger A.L. Principles of Biochemistry. 8th ed. / ed. Neslon D.L., Cox M.M., Hoskins A.A. New York: Macmillan Learning, 2021. C. 1–4380.
78. McDonald A.G., Tipton K.F. Enzyme nomenclature and classification: the state of the art // *FEBS J.* 2023. - T. 290. - C. 2214–2231.
79. Copeland R.A. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. 3th ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2023. C. 1–576.
80. Bell E.L. et al. Biocatalysis // *Nat. Rev. Methods Prim.* 2021. - T. 1. - C. 46.

81. 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. - T. 15. - C. e202102709.
82. Gobbetti M., Gänzle M. Handbook on sourdough biotechnology. London: Springer, 2013. C. 1–298.
83. Lahue C., Madden A.A., Dunn R.R., Smukowski Heil C. History and Domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in Bread Baking. // *Front. Genet.* 2020. - T. 11. - C. 584718.
84. Zhang Y.H.P., Sun J., Ma Y. Biomanufacturing: history and perspective // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* Springer Berlin Heidelberg, 2017. - T. 44. - C. 773–784.
85. Khambhaty Y. Applications of enzymes in leather processing // *Environ. Chem. Lett.* Springer International Publishing, 2020. - T. 18. - C. 747–769.
86. Bornscheuer U.T., Bucholz K. Highlights in biocatalysis - Historical landmarks and current trends // *Eng. Life Sci.* 2005. - T. 5. - C. 309–323.
87. Heckmann C.M., Paradisi F. Looking Back: A Short History of the Discovery of Enzymes and How They Became Powerful Chemical Tools // *ChemCatChem*. 2020. - T. 12. - C. 6082–6102.
88. Rodriguez-Herrera R., Puc L.E.C., Sobrevilla J.M.V., Luque D., Cardona-Felix C.S., Aguilar-González C.N., Flores-Gallegos A.C. Enzymes in the pharmaceutical industry for β -lactam antibiotic production // *Enzymes in Food Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Inc., 2019. - C. 627–643.
89. Chapman J., Ismail A.E., Dinu C.Z. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks // *Catalysts*. 2018. - T. 8. - C. 238.
90. D'Este M., Alvarado-Morales M., Angelidaki I. Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review // *Biotechnol. Adv.* Elsevier, 2018. - T. 36. - C. 14–25.
91. Ahmad A., Banat F., Taher H. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges // *Environ. Technol. Innov.* Elsevier B.V., 2020. - T. 20. - C. 101138.
92. Jiao S., Li F., Yu H., Shen Z. Advances in acrylamide bioproduction catalyzed with *Rhodococcus* cells harboring nitrile hydratase // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2020. - T. 104. - C. 1001–1012.
93. Anastas P., Eghbali N. Green Chemistry: Principles and Practice // *Chem. Soc. Rev.* 2010. - T. 39. - C. 301–312.
94. Middleton N. The Global Casino: An Introduction to Environmental Issues. 2nd ed. New York: Routledge, 2013. C. 1–435.
95. Rastegari A.A., Yadav A. nath, Gupta A. Prospects of Renewable Bioprocessing in Future Energy Systems // *Biofuels and Biorefineries*. Cham: Springer, 2019. - T. 10. C. 1–518.

96. Raud M., Kikas T., Sippula O., Shurpali N.J. Potentials and challenges in lignocellulosic biofuel production technology // *Renew. Sustain. Energy Rev.* Elsevier Ltd, 2019. - T. 111. - C. 44–56.
97. Winkler C.K., Schrittwieser J.H., Kroutil W. Power of Biocatalysis for Organic Synthesis // *ACS Cent. Sci.* 2021. - T. 7. - C. 55–71.
98. de Souza R.O.M.A., Miranda L.S.M., Bornscheuer U.T. A Retrosynthesis Approach for Biocatalysis in Organic Synthesis // *Chem. - A Eur. J.* 2017. - T. 23. - C. 12040–12063.
99. Wu S., Snajdrova R., Moore J.C., Baldenius K., Bornscheuer U.T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications // *Angew. Chemie - Int. Ed.* Wiley-VCH Verlag, 2021. - T. 60. - C. 88–119.
100. Sabe V.T., Ntombela T., Jhamba L.A., Maguire G.E.M., Govender T., Naicker T., Kruger H.G. Current trends in computer aided drug design and a highlight of drugs discovered via computational techniques: A review // *Eur. J. Med. Chem.* Elsevier Masson SAS, 2021. - T. 224. - C. 113705.
101. Pantelev J., Gao H., Jia L. Recent applications of machine learning in medicinal chemistry // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* Elsevier, 2018. - T. 28. - C. 2807–2815.
102. Sheldon R.A., Brady D. Broadening the Scope of Biocatalysis in Sustainable Organic Synthesis // *ChemSusChem.* 2019. - T. 12. - C. 2859–2881.
103. Adams J.P., Brown M.J.B., Diaz-Rodriguez A., Lloyd R.C., Roiban G.D. Biocatalysis: A Pharma Perspective // *Adv. Synth. Catal.* Wiley-VCH Verlag, 2019. - T. 361. - C. 2421–2432.
104. Sheldon R.A., Brady D. Streamlining design, engineering, and applications of enzymes for sustainable biocatalysis // *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2021. - T. 9. - C. 8032–8052.
105. Bonch-Osmolovskaya E., Atomi H. Editorial overview: Extremophiles: From extreme environments to highly stable biocatalysts. // *Curr. Opin. Microbiol.* Elsevier Ltd, 2015. - T. 25. - C. vii–viii.
106. Krüger A., Schäfers C., Schröder C., Antranikian G. Towards a sustainable biobased industry – Highlighting the impact of extremophiles // *N. Biotechnol.* Elsevier B.V., 2018. - T. 40. - C. 144–153.
107. Milosavić N.B., Prodanović R.M., Veličković D., Dimitrijević A. Macroporous Poly(GMA-co-EGDMA) for Enzyme Stabilization. // *Methods Mol. Biol.* 2017. - T. 1504. - C. 139–147.
108. Silva C., Martins M., Jing S., Fu J., Cavaco-Paulo A. Practical insights on enzyme stabilization // *Crit. Rev. Biotechnol.* Informa Healthcare USA, Inc, 2018. - T. 38. - C. 335–350.
109. Wang Y., Xue P., Cao M., Yu T., Lane S.T., Zhao H. Directed Evolution: Methodologies and Applications // *Chem. Rev.* 2021. - T. 121. - C. 12384–12444.
110. Chowdhury R., Maranas C.D. From directed evolution to computational enzyme

engineering — A review // *AIChE J.* 2020. - T. 66. - C. 1–17.

111. Yi D., Bayer T., Badenhorst C.P.S., Wu S., Doerr M., Höhne M., Bornscheuer U.T. Recent trends in biocatalysis // *Chem. Soc. Rev. Royal Society of Chemistry*, 2021. - T. 50. - C. 8003–8049.

112. Chin J.W. Expanding and reprogramming the genetic code // *Nature*. Nature Publishing Group, 2017. - T. 550. - C. 53–60.

113. Won Y., Pagar A.D., Patil M.D., Dawson P.E., Yun H. Recent Advances in Enzyme Engineering through Incorporation of Unnatural Amino Acids // *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2019. - T. 24. - C. 592–604.

114. Pyser J.B., Chakrabarty S., Romero E.O., Narayan A.R.H. State-of-the-Art Biocatalysis // *ACS Cent. Sci.* 2021. - T. 7. - C. 1105–1116.

115. Sheldon R.A., Woodley J.M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry // *Chem. Rev.* 2018. - T. 118. - C. 801–838.

116. Huffman M.A. et al. Design of an *in vitro* biocatalytic cascade for the manufacture of islatravir. // *Science*. 2019. - T. 366. - C. 1255–1259.

117. Obot I.B., Solomon M.M., Umoren S.A., Suleiman R., Elanany M., Alanazi N.M., Sorour A.A. Progress in the development of sour corrosion inhibitors: Past, present, and future perspectives // *J. Ind. Eng. Chem. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry*, 2019. - T. 79. - C. 1–18.

118. Barel A.O., Paye M., Maibach H.I. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. New York: Informa Healthcare USA, Inc, 2009. C. 1–887.

119. Landim Neves M.I., Silva E.K., Meireles M.A.A. Natural blue food colorants: Consumer acceptance, current alternatives, trends, challenges, and future strategies // *Trends Food Sci. Technol.* Elsevier Ltd, 2021. - T. 112. - C. 163–173.

120. Blick S.K.A., Keating G.M. Lisdexamfetamine // *Pediatr-Drugs*. 2007. - T. 9. - C. 129–135.

121. Abdullah A., Yusof M.K.M. Lebetalol: a brief current review // *Pharmacophore*. 2019. - T. 10. - C. 50–56.

122. Scott L.J. Repaglinide A Review of Its Use in Type 2 Diabetes Mellitus // *Drugs*. 2012. - T. 72. - C. 249–272.

123. Nguyen K., Hoffman H., Chakkampambil B. Evaluation of rivastigmine in Alzheimer's disease // *Neurodegener. Dis. Manag.* 2021. - T. 11. - C. 35–48.

124. Paton N.I. et al. Dolutegravir or Darunavir in Combination with Zidovudine or Tenofovir to Treat HIV // *N. Engl. J. Med.* 2021. - T. 385. - C. 330–341.

125. Yan Z. et al. Design, synthesis and fungicidal activity evaluation of novel

pyrimidinamine derivatives containing phenyl-thiazole/oxazole moiety // *Bioorganic Med. Chem.* Elsevier, 2019. - T. 27. - C. 3218–3228.

126. Fermanian T.W., E. H.J. Fall Application of Procladoline for Spring Crabgrass // *Weed Technol.* 1994. - T. 8. - C. 612–616.

127. Thompson C.J., Seto H. Bialaphos // *Genetics and Biochemistry of Antibiotic Production.* New York: Elsevier Inc., 1995. - C. 197–222.

128. 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. - T. 868. - C. 161630.

129. Gomm A., O'Reilly E. Transaminases for chiral amine synthesis // *Curr. Opin. Chem. Biol.* Elsevier Ltd, 2018. - T. 43. - C. 106–112.

130. Kelly S.A., Pohle S., Wharry S., Mix S., Allen C.C.R., Moody T.S., Gilmore B.F. Application of ω -Transaminases in the Pharmaceutical Industry // *Chem. Rev.* 2018. - T. 118. - C. 349–367.

131. Patil M.D., Grogan G., Bommarius A., Yun H. Recent advances in ω -transaminase-mediated biocatalysis for the enantioselective synthesis of chiral amines // *Catalysts.* 2018. - T. 8. - C. 254.

132. 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. - T. 18. - C. 1482–1486.

133. Chen S., Land H., Berglund P., Humble M.S. Stabilization of an amine transaminase for biocatalysis // *J. Mol. Catal. B Enzym.* Elsevier B.V., 2016. - T. 124. - C. 20–28.

134. Deepankumar K., Nadarajan S.P., Mathew S., Lee S.G., Yoo T.H., Hong E.Y., Kim B.G., Yun H. Engineering transaminase for stability enhancement and site-specific immobilization through multiple noncanonical amino acids incorporation // *ChemCatChem.* 2015. - T. 7. - C. 417–421.

135. 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. - T. 37. - C. 246–255.

136. 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. - T. 18. - C. 1022–1026.

137. 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. - T. 10. - C. 1–11.

138. 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. - T. 7. - C. 757–760.

139. Rios-Solis L., Morris P., Grant C., Odeleye A.O.O., Hailes H.C., Ward J.M., Dalby P.A., Baganz F., Lye G.J. Modelling and optimisation of the one-pot, multi-enzymatic synthesis of chiral amino-alcohols based on microscale kinetic parameter determination // Chem. Eng. Sci. Elsevier, 2015. - T. 122. - C. 360–372.

140. Shin J.S., Kim B.G. Transaminase-catalyzed asymmetric synthesis of L-2-aminobutyric acid from achiral reactants // Biotechnol. Lett. 2009. - T. 31. - C. 1595–1599.

141. Yun H., Cho B.K., Kim B.G. Kinetic resolution of (*R,S*)-sec-butylamine using omega-transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17 under reduced pressure // Biotechnol. Bioeng. 2004. - T. 87. - C. 772–778.

142. Shin J.S., Kim B.G., Shin D.H. Kinetic resolution of chiral amines using packed-bed reactor // Enzyme Microb. Technol. 2001. - T. 29. - C. 232–239.

143. Yun H., Hwang B.Y., Lee J.H., Kim B.G. Use of enrichment culture for directed evolution of the *Vibrio fluvialis* JS17 ω -transaminase, which is resistant to product inhibition by aliphatic ketones // Appl. Environ. Microbiol. 2005. - T. 71. - C. 4220–4224.

144. Dawood A.W.H., Weiß M.S., Schulz C., Pavlidis I. V., Iding H., de Souza R.O.M.A., Bornscheuer U.T. Isopropylamine as Amine Donor in Transaminase-Catalyzed Reactions: Better Acceptance through Reaction and Enzyme Engineering // ChemCatChem. 2018. - T. 10. - C. 3943–3949.

145. Truppo M.D., Rozzell J.D., Moore J.C., Turner N.J. Rapid screening and scale-up of transaminase catalysed reactions // Org. Biomol. Chem. 2009. - T. 7. - C. 395–398.

146. Weiß M.S., Pavlidis I. V., Spurr P., Hanlon S.P., Wirz B., Iding H., Bornscheuer U.T. Protein-engineering of an amine transaminase for the stereoselective synthesis of a pharmaceutically relevant bicyclic amine // Org. Biomol. Chem. Royal Society of Chemistry, 2016. - T. 14. - C. 10249–10254.

147. Cuetos A., García-Ramos M., Fischereeder E., Díaz-Rodríguez A., Grogan G., Gotor V., Kroutil W., Lavandera I. Catalytic Promiscuity of Transaminases: Preparation of Enantioenriched β -Fluoroamines by Formal Tandem Hydrodefluorination/Deamination // Angew. Chemie. 2016. - T. 128. - C. 3196–3199.

148. Park E.S., Shin J.S. Biocatalytic cascade reactions for asymmetric synthesis of aliphatic amino acids in a biphasic reaction system // J. Mol. Catal. B Enzym. Elsevier B.V., 2015. - T. 121. - C. 9–14.

149. 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. - T. 23. - C. e202200428.

150. 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. - T. 11. - C. 520.

151. 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. - T. 353. - C. 2439–2445.

152. 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. - T. 2019. - C. 6470–6477.

153. Gao X., Chen X., Liu W., Feng J., Wu Q., Hua L., Zhu D. A Novel meso-diaminopimelate dehydrogenase from *Symbiobacterium thermophilum*: Overexpression, characterization, and potential for D-amino acid synthesis // *Appl. Environ. Microbiol.* 2012. - T. 78. - C. 8595–8600.

154. Martínez-Rodríguez S., Martínez-Gómez A.I., Rodríguez-Vico F., Clemente-Jiménez J.M., Las Heras-Vázquez F.J. Natural occurrence and industrial applications of D-amino acids: An overview // *Chem. Biodivers.* 2010. - T. 7. - C. 1531–1548.

155. Payer S.E., Schrittwieser J.H., Kroutil W. Vicinal Diamines as Smart Cosubstrates in the Transaminase-Catalyzed Asymmetric Amination of Ketones // *European J. Org. Chem.* 2017. - T. 2017. - C. 2553–2559.

156. Gomm A., Lewis W., Green A.P., O'Reilly E. A New Generation of Smart Amine Donors for Transaminase-Mediated Biotransformations // *Chem. - A Eur. J.* 2016. - T. 22. - C. 12692–12695.

157. Green A.P., Turner N.J., O'Reilly E. Chiral amine synthesis using ω -transaminases: An amine donor that displaces equilibria and enables high-throughput screening // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2014. - T. 53. - C. 10714–10717.

158. Rodrigues C.J.C., Ferrer M., de Carvalho C.C.C.R. ω -Transaminase-Mediated Asymmetric Synthesis of (*S*)-1-(4-Trifluoromethylphenyl)Ethylamine // *Catalysts*. 2021. - T. 11. - C. 1–13.

159. Molnár Z., Farkas E., Lakó Á., Erdélyi B., Kroutil W., Vértessy B.G., Paizs C., Poppe L. Immobilized whole-cell transaminase biocatalysts for continuous-flow kinetic resolution of amines // *Catalysts*. 2019. - T. 9. - C. 1–11.

160. Mourelle-Insua Á., Méndez-Sánchez D., Galman J.L., Slabu I., Turner N.J., Gotor-Fernández V., Lavandera I. Efficient synthesis of α -alkyl- β -amino amides by transaminase-mediated dynamic kinetic resolutions // *Catal. Sci. Technol. Royal Society of Chemistry*, 2019. - T. 9. - C. 4083–4090.

161. Meng Q. et al. Computational Redesign of an ω -Transaminase from *Pseudomonas jessenii* for Asymmetric Synthesis of Enantiopure Bulky Amines // *ACS Catal.* 2021. - T. 11. - C. 10733–10747.

162. Yoon S., Patil M.D., Sarak S., Jeon H., Kim G.H., Khobragade T.P., Sung S., Yun H. Deracemization of Racemic Amines to Enantiopure (*R*)- and (*S*)-amines by Biocatalytic Cascade

Employing ω -Transaminase and Amine Dehydrogenase // ChemCatChem. 2019. - T. 11. - C. 1898–1902.

163. Park E.S., Shin J.S. Deracemization of amino acids by coupling transaminases of opposite stereoselectivity // IUBMB Life. 2014. - T. 356. - C. 3505–3509.

164. González-Granda S., Tzouras N. V., Nolan S.P., Lavandera I., Gotor-Fernández V. Merging Gold(I) Catalysis with Amine Transaminases in Cascade Catalysis: Chemoenzymatic Transformation of Propargylic Alcohols into Enantioenriched Allylic Amines // Adv. Synth. Catal. 2022. - T. 364. - C. 3856–3866.

165. Han S.W., Jang Y., Shin J.S. *In Vitro* and *in Vivo* One-Pot Deracemization of Chiral Amines by Reaction Pathway Control of Enantiocomplementary ω -Transaminases // ACS Catal. 2019. - T. 9. - C. 6945–6954.

166. Savile C.K. et al. Biocatalytic asymmetric synthesis of chiral amines from ketones applied to sitagliptin manufacture. // Science. 2010. - T. 329. - C. 305–309.

167. Mangion I.K., Sherry B.D., Yin J., Fleitz F.J. Enantioselective synthesis of a dual orexin receptor antagonist // Org. Lett. 2012. - T. 14. - C. 3458–3461.

168. Peng Z., Wong J.W., Hansen E.C., Puchlopek-Dermenci A.L.A., Clarke H.J. Development of a concise, asymmetric synthesis of a smoothed receptor (smo) inhibitor: Enzymatic transamination of a 4-piperidinone with dynamic kinetic resolution // Org. Lett. 2014. - T. 16. - C. 860–863.

169. 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. - T. 77. - C. 2299–2309.

170. Limanto J. et al. A highly efficient asymmetric synthesis of vernakalant // Org. Lett. 2014. - T. 16. - C. 2716–2719.

171. Novick S.J. et al. Engineering an amine transaminase for the efficient production of a chiral sacubitril precursor // ACS Catal. 2021. - T. 11. - C. 3762–3770.

172. Kiriya Y., Nochi H. D-Amino Acids in the Nervous and Endocrine Systems // Scientifica (Cairo). 2016. - T. 2016. - C. 1–9.

173. Bastings J.J.A.J., van Eijk H.M., Damink S.W.O., Rensen S.S. D-amino acids in health and disease: A focus on cancer // Nutrients. 2019. - T. 11. - C. 1–18.

174. Kapil S., Sharma V. D-amino acids in antimicrobial peptides: A potential approach to treat and combat antimicrobial resistance // Can. J. Microbiol. 2021. - T. 67. - C. 119–137.

175. Eppinger E., Gröning J.A.D., Stolz A. Chemoenzymatic enantioselective synthesis of phenylglycine and phenylglycine amide by direct coupling of the Strecker synthesis with a nitrilase reaction // Front. Catal. 2022. - T. 2. - C. 1–16.

176. Nájera C., Sansano J.M. Catalytic asymmetric synthesis of α -amino acids // Chem.

Rev. 2007. - T. 107. - C. 4584–4671.

177. Pollegioni L., Rosini E., Molla G. Advances in enzymatic synthesis of D-amino acids // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. - T. 21. - C. 3206–3222.

178. 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. - T. 83. - C. 299–300.

179. Nakajima N., Tanizawa K., Tanaka H., Soda K. Enantioselective synthesis of various D-amino acids by a multi-enzyme system // *J. Biotechnol.* 1988. - T. 8. - C. 243–248.

180. 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. - T. 1. - C. 397–410.

181. 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. - T. 71. - C. 24–27.

182. Makarova, Kamberov M. Generation of Deletion and Point Mutations with One Primer in a Single Cloning Step // *Biotechniques.* 2000. - T. 29. - C. 970–972.

183. Mikhailova A.G. et al. Activity modulation of the oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans* by site-directed mutagenesis of amino acid residues surrounding catalytic triad histidine // *Biochimie.* 2017. - T. 139. - C. 125–136.

184. Chertkov O. et al. Complete genome sequence of *Aminobacterium colombiense* type strain (ALA-1 T) // *Stand. Genomic Sci.* 2010. - T. 2. - C. 280–289.

185. Chang Y.J. et al. Complete genome sequence of *Acidaminococcus fermentans* type strain (VR4 T) // *Stand. Genomic Sci.* 2010. - T. 3. - C. 1–14.

186. Kabsch W. XDS. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2010. - T. 66. - C. 125–132.

187. Oxford Diffraction /Agilent Technologies UK. CrysAlisPRO. Yarnton, England, 2013.

188. 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. - T. 57. - C. 1451–1456.

189. Winn M.D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2011. - T. 67. - C. 235–242.

190. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. Features and development of Coot // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2010. - T. 66. - C. 486–501.

191. 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. - T. 60. - C. 2256–2268.
192. Krissinel E., Henrick K. Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State // *J. Mol. Biol.* 2007. - T. 372. - C. 774–797.
193. Kirsch J.F., Eichele G., Ford G.C., Vincent M.G., Jansonius J.N., Gehring H., Christen P. Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure // *J. Mol. Biol.* 1984. - T. 174. - C. 497–525.
194. 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. - T. 7. - C. 1259–1269.
195. Roura Padrosa D., 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. - T. 7. - C. 1–13.
196. Dindo M. et al. Cycloserine enantiomers are reversible inhibitors of human alanine:glyoxylate aminotransferase: implications for Primary Hyperoxaluria type 1 // *Biochem. J.* 2019. - T. 476. - C. 3751–3768.
197. de Chiara C., Homšak M., Prosser G.A., Douglas H.L., Garza-Garcia A., Kelly G., Purkiss A.G., Tate E.W., de Carvalho L.P.S. D-Cycloserine destruction by alanine racemase and the limit of irreversible inhibition // *Nat. Chem. Biol.* 2020. - T. 16. - C. 686–694.
198. 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. - T. 71. - C. 449–459.
199. Khomutov A.R., Vepsäläinen J.J., Shvetsov A.S., Hyvönen T., Keinänen T.A., Pustobaev V.N., Eloranta T.O., Khomutov R.M. Synthesis of hydroxylamine analogues of polyamides // *Tetrahedron.* 1996. - T. 52. - C. 13751–13766.