

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шилова Софья Александровна

**ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ АКТИВНОГО ЦЕНТРА
НЕКАНОНИЧЕСКОЙ ТРАНСАМИНАЗЫ D-АМИНОКИСЛОТ ИЗ
*AMINOBACTERIUM COLOMBIENSE***

1.5.4 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2024 г.

Работа выполнена в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии имени А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН) и на кафедре химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научные руководители: **Безсуднова Екатерина Юрьевна,**
доктор химических наук

Клячко Наталья Львовна,
доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Никулин Алексей Донатович,** доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института белка Российской академии наук, заместитель директора по науке, лаборатория структурных исследований аппарата трансляции, главный научный сотрудник.

Буник-Фаренвальд Виктория-Лариса Ивановна, доктор химических наук, МГУ имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, отдел биокинетики, ведущий научный сотрудник.

Сольев Павел Николаевич, кандидат химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория химических основ биокатализа, руководитель лаборатории, ведущий научный сотрудник.

Защита диссертации состоится «__» 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета МГУ.014.4 МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11Б, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.4/2822>

Автореферат разослан «15» декабря 2023 г. Повторно разослан «__»
в связи с переносом даты защиты.

Ученый секретарь диссертационного совета,
Кандидат химических наук

И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 трансминазы 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 трансминазы как биокатализаторы обладают рядом ограничений, среди которых узкая субстратная специфичность, ингибирование продуктом реакции и диссоциация холофермента на кофактор и апофермент. Поэтому исследование природного разнообразия трансминаз, особенностей организации их активного центра и механизмов связывания субстратов не только углубляет наше понимание взаимосвязи *последовательность-структура-функция* в трансминазах и, в целом, в ферментах, но и создает подходы для эффективной оптимизации ферментов-биокатализаторов для стереоселективного аминирования. Среди трансминаз IV типа PLP-укладки выделяют семейство трансминаз 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 трансминаз D-аминокислот немного и все они гомологи со сходной организацией активного центра. Очевидное из анализа метагеномных библиотек и аннотированных геномов биоразнообразии трансминаз IV типа PLP-укладки указывает на малую изученность этого суперсемейства и на перспективы результативного поиска новых трансминаз 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-циклосолина (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.

Список сокращений.

АОХ – анионообменная хроматография, **ГГДГ** – (R)-2-гидроксиглутарат-дегидрогеназа из *Acidaminococcus fermentans*, **ГДГ** – глюкозодегидрогеназа из *Pseudomonas* sp., **ДМСО** – диметилсульфоксид, **ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота, **ИПТГ** – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид, **КД** – круговой дихроизм, **Трис** – 2-амино-2-гидрокси-1,3-пропан-1,3-диол, **AmicoTA** – ДААТ из *Aminobacterium colombiense*, **bsDAAT** – трансминаза D-аминокислот из *Bacillus* sp. УМ-1, **CHES** – N-циклогексил-2-аминоэтансульфоновая кислота, **ДААТ** – трансминаза D-аминокислот (D-amino acid aminotransferase), **NAD** – никотинамид-адениндинуклеотид, **PDB** – банк данных белковых структур, **PLP** – пиридоксаль-5'-фосфат, **PMP** – пиридоксамин-5'-фосфат, **TEV-протеаза** – протеаза из *Tobacco Etch Virus*, **WT** – дикий тип.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

Множественное структурное выравнивание DAAT

Трансаминазы D-аминокислот (D-amino acid aminotransferase, DAAT) относятся к пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимым ферментам IV типа укладки PLP-связывающего домена наряду с трансаминазами разветвленных L-аминокислот и (R)-селективными аминтрансаминазами. DAAT катализируют стереоселективный перенос аминогруппы с D-аминокислоты (аминодонора) на α -кетокислоту (аминоакцептор) с образованием новых D-аминокислоты и α -кетокислоты. Охарактеризованные на сегодня DAAT активны с разнообразными природными D-аминокислотами и α -кетокислотами. Наибольшая эффективность обычно наблюдается в реакции трансаминирования между D-аланином и α -кетоглутаратом (Рис. 1).

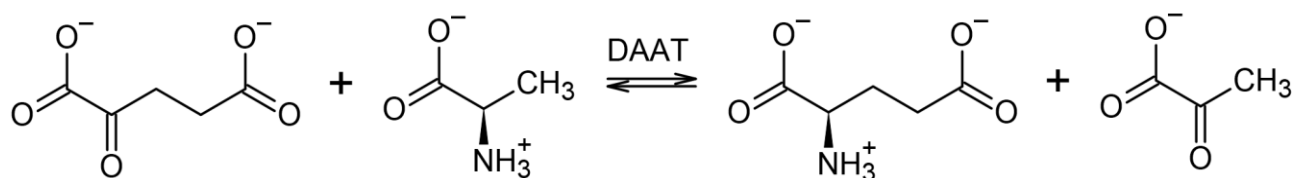


Рис. 1. Реакция трансаминирования между α -кетоглутаратом и D-аланином.

Функциональной единицей трансаминаз является димер с двумя активными центрами, образованными остатками соседних субъединиц. Активные центры трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена, и в том числе DAAT, устроены сходным образом: элементы вторичной структуры располагаются одинаково (Рис. 2). Разнообразная субстратная специфичность достигается разным аминокислотным составом элементов вторичной структуры.

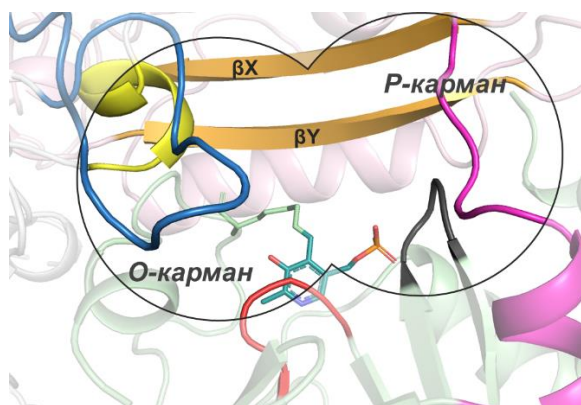


Рис. 2. Активный центр bsDAAT (PDB код: 4DAA). Малый и большой домены одной субъединицы показаны светло-розовым и светло-зеленым цветами соответственно. Соседняя субъединица показана серым. Элементы вторичной структуры, формирующие активный центр, показаны: β X- и β Y-тяжи – оранжевым цветом, α -спираль O-кармана – желтым, петля O-кармана – синим, междоменная петля – малиновым, β -поворот1 – красным и β -поворот2 – черным. Молекула PLP показана бирюзовым цветом.

До настоящего времени наиболее подробно была изучена DAAT из *Vacillus* sp. YM-1 (bsDAAT), для нее предложен механизм узнавания субстратов, разработаны биотехнологические схемы с ее участием. Однако за последние восемь лет обнаружены DAAT с другим устройством активного центра, специфичные к D-аминокислотам и первичным (R)-аминам. Множественное структурное выравнивание позволило разделить известные DAAT на две группы

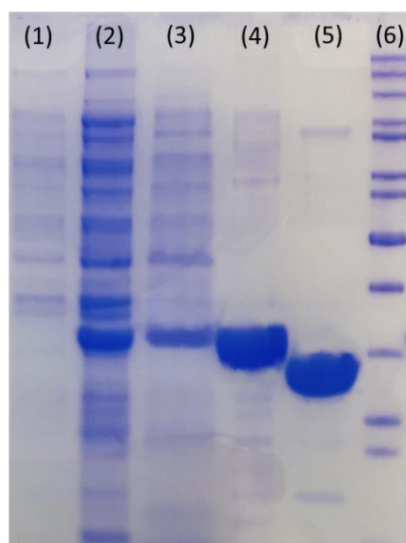
(канонические и неканонические), различающиеся составом и положением функциональных остатков в О- и Р-карманах активного центра (Рис. 2, Табл. 1). Консервативной для канонических DAAT является триада (Y-[RK]-H), для неканонических DAAT – два положительно заряженных остатка (R-[RK]). Активный центр трансаминазы из *A. colombiense* (AmicoTA) включает консервативные аминокислотные остатки обеих групп (Табл. 1): остатки R27 и R88 (мотив R-[RK] у неканонических DAAT) и триаду T34- K99- H101 (мотив Y-[RK]-H у канонических DAAT). Механизм узнавания субстратов у AmicoTA исследовался в данной работе.

Табл. 1. Множественное структурное выравнивание DAAT. Аминокислотный состав элементов вторичной структуры, формирующих О- и Р-карманы активного центра. Проанализированные структуры: DAAT из *Bacillus* sp. YM-1 (PDB код: 1DAA), *B. thailandensis* (4TM5), *C. pusillum* (5K3W), *H. hydrossis* (7P7X), *M. tuberculosis* (6Q1R) и AmicoTA (8AHR). Проанализированные модели (получены с помощью сервера AlphaFold): DAAT из *B. sphaericus* (UniProt код: P54693), *G. toebii* SK1 (Q4JFX0), *L. salivarius* (Q1WRM6) и *A. thaliana* (Q8L493). Аминокислотные остатки, для которых показано участие в связывании субстратов, выделены **красным жирным**. Сходные остатки у гомологичных трансаминаз показаны **красным курсивом**. Канонические DAAT выделены розовым цветом, неканонические – зеленым.

DAAT из	Идентичность, %	α -спираль О-кармана	β X-тяж	β Y-тяж	Петля О-кармана	Междоменная петля	β -поворот1	β -поворот2
<i>Bacillus</i> sp. YM-1	100	²¹ DRGYGFG ²⁷	²⁹ GVYEVVKVY ³⁷	⁸⁵ GHIYFQVT ⁹²	⁹³ RGTS PRAN HQFPENTVKP ¹⁰⁹	¹¹⁷ NPRPLENLEKG ¹²⁸	¹⁷⁸ GSSS ¹⁸¹	²⁴⁰ STTS ²⁴³
<i>B. sphaericus</i>	68.0	²² DRGYQFG ²⁸	³⁰ GIYEVIKVY ³⁸	⁸⁶ GHVYFQIT ⁹³	⁹⁴ RGTT SRNH IFPDASVPA ¹¹⁰	¹¹⁹ GERSIEQFEKG ¹²⁹	¹⁷⁹ CSSA ¹⁸²	²⁴¹ SVSS ²⁴⁴
<i>B. thailandensis</i>	37.5	³² DRGFIFG ³⁸	⁴⁰ GVYEVVPIY ⁴⁸	⁰⁵ AIVIQVT ¹¹²	¹¹³ RGVAKRGHAFANAVP ¹²⁸	¹³⁷ LALPTDAQRAQG ¹⁴⁷	¹⁹⁸ GSSS ²⁰¹	²⁶⁰ SA TK ²⁶³
<i>G. toebii</i> SK1	48.0	²⁵ ERGLQFG ³¹	³³ GVYEVARIV ⁴¹	⁹⁰ AILYLQVT ⁹⁷	⁹⁸ RGSF PRNH AFPAENRP ¹¹³	¹²² MPRKIREIEQG ¹³²	¹⁸² GSSS ¹⁸⁵	²⁴⁴ STTS ²⁴⁷
<i>L. salivarius</i>	35.9	²³ DRALYFG ²⁹	³¹ GCYDATTFK ³⁹	⁸⁷ GILYQWTS ⁹⁴	⁹⁵ RGSG LRNH IFPEDSQP ¹¹⁰	¹¹⁸ PYGLVPFDTE ¹²⁷	¹⁷⁷ CAHS ¹⁸⁰	²⁴⁰ SSAC ²⁴²
<i>C. pusillum</i>	23.1	⁴⁶ DLGITRG ⁵²	⁵⁴ GVFETIAVI ⁶²	¹¹⁴ LFACKLIL ¹²¹	¹²² RGIEGEGRP ¹³⁰	¹³⁹ GEDFSQQLRG ¹⁴⁸	²⁰⁸ GPTS ²¹¹	²⁷⁰ SSVR ²⁷³
<i>H. hydrossis</i>	25.9	²³ DLSILRG ²⁹	³¹ GIFDYFLAR ³⁹	⁸⁷ AGIRLVLT ⁹⁴	⁹⁵ GGYSPDGYTVNP ¹⁰⁷	¹¹⁵ DLPASAWFEFAQG ¹²⁷	¹⁷⁷ SARS ¹⁸⁰	²³⁸ STLK ²⁴¹
<i>M. tuberculosis</i>	23.6	²¹ DLAAVRG ²⁷	²⁹ GVFETLLVR ³⁷	⁷ GALRLIYS ⁹⁴	⁹⁵ RGREGGSAP ¹⁰³	¹¹² VPARVIGARRDG ¹²³	¹⁸³ GPRS ¹⁸⁶	²⁵² SSMT ²⁵⁵
<i>A. thaliana</i>	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 DLIQRG ²⁸	³⁰ GVFETISTH ³⁸	⁸⁵ TMVRRPYT ⁹²	⁹³ GDSFG KDHL FSSSRVYFV ¹¹⁰	¹¹⁵ IRKRPDILYEKG ¹²⁶	¹⁷³ GSHS ¹⁷⁶	²³⁴ GT VK ²³⁷

Получение рекомбинантной формы фермента

Рекомбинантная форма AmicoTA получена гетерологичной экспрессией в клетках штамма-продуцента *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, трансформированных модифицированной экспрессионной плазмидой pET-21d-HisTEV. Фермент экспрессировали с 6-His-фрагментом и сайтом узнавания TEV-протеазы на



Н-конце. AmicoTA выделяли из растворимой фракции лизата клеток методом металл-хелатной аффинной хроматографии. Чистота белковых препаратов составила более 90% (Рис. 3).

Рис. 3. Электрофореграмма образцов AmicoTA на этапах наращивания клеток и очистки фермента. Клеточный лизат перед (1) и после (2) индукции ИПТГ; (3) растворимая фракция после УЗ обработки и центрифугирования; (4) AmicoTA с 6-His-фрагментом после металл-хелатной хроматографии; (5) AmicoTA после отщепления 6-His-фрагмента, гель-проникающей хроматографии и АОХ; (6) белковые стандарты.

Для кристаллизации AmicoTA удаляли 6-His-фрагмент и проводили дополнительные стадии очистки: гель-проникающую и анионообменную хроматографии. Значения активности AmicoTA с 6-His-фрагментом и без него не различались в пределах 10%. По результатам гель-проникающей хроматографии AmicoTA в растворе является димером.

Функциональная характеристика AmicoTA

Кинетические свойства AmicoTA

Ферментативное трансаминирование – это реакция последовательного двойного замещения с промежуточным переносом аминогруппы на кофактор PLP, который переходит в другую форму – пиридоксамин-5'-фосфат (PMP). Полная реакция трансаминирования есть сумма двух полуреакций: деаминирование аминсубстрата и аминирование кетосубстрата. Спектр субстратов-аминодоноров AmicoTA определяли по первой полуреакции (Рис. 4).

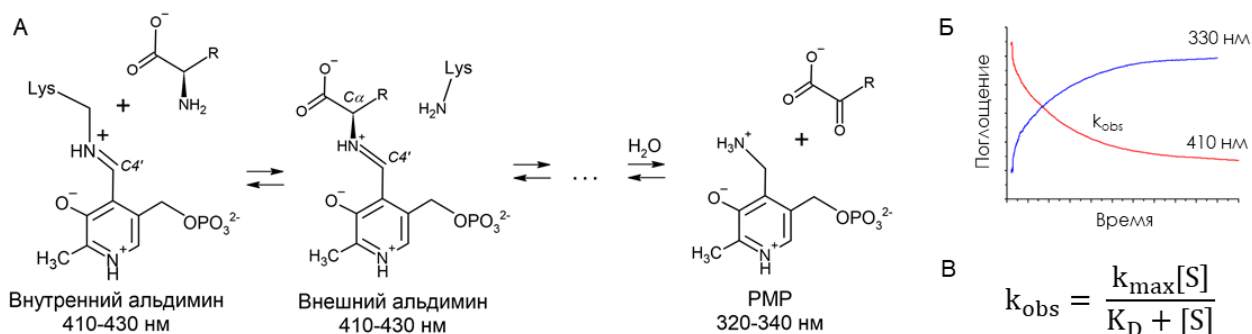


Рис. 4. Анализ полуреакций трансаминирования. (А) Схема полуреакции PLP-формы трансаминазы с аминокислотой с указанием максимумов поглощения. (Б) Кинетические кривые полуреакции трансаминирования. (В) Уравнение аппроксимации зависимости наблюдаемой константы скорости полуреакции (k_{obs}) от концентрации субстрата ($[S]$).

AmicoTA активна исключительно с D-аминокислотами (Табл. 2). Наилучшим аминокислотным донором AmicoTA является D-глутамат. Наименьшую специфичность фермент проявляет к положительно заряженным, а также объемным ароматическим и алифатическим субстратам.

Табл. 2. Кинетические параметры полуреакций PLP-формы AmicoTA (30 мкМ) с аминокислотами в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0, 40 °С.

Аминокислота	$10^3 \times k_{max}, c^{-1}$	K_D, mM	$k_{max}/K_D, M^{-1} c^{-1}$
D-глутамат	1080 ± 40	$2,1 \pm 0,2$	520 ± 70
D-аланин	280 ± 10	50 ± 6	$5,6 \pm 0,8$
D-аспартат	118 ± 6	120 ± 20	$1,0 \pm 0,2$
D-лейцин	33 ± 2	100 ± 10	$0,33 \pm 0,05$
D-орнитин	$2,1 \pm 0,1$	10 ± 1	$0,21 \pm 0,02$
D-фенилаланин	$2,9 \pm 0,2$	19 ± 3	$0,15 \pm 0,03$
L-аланин		Нет активности	
L-лейцин		Нет активности	
(R)-(+)-1-фенилэтиламин		Нет активности	
(S)-(+)-1-фенилэтиламин		Нет активности	

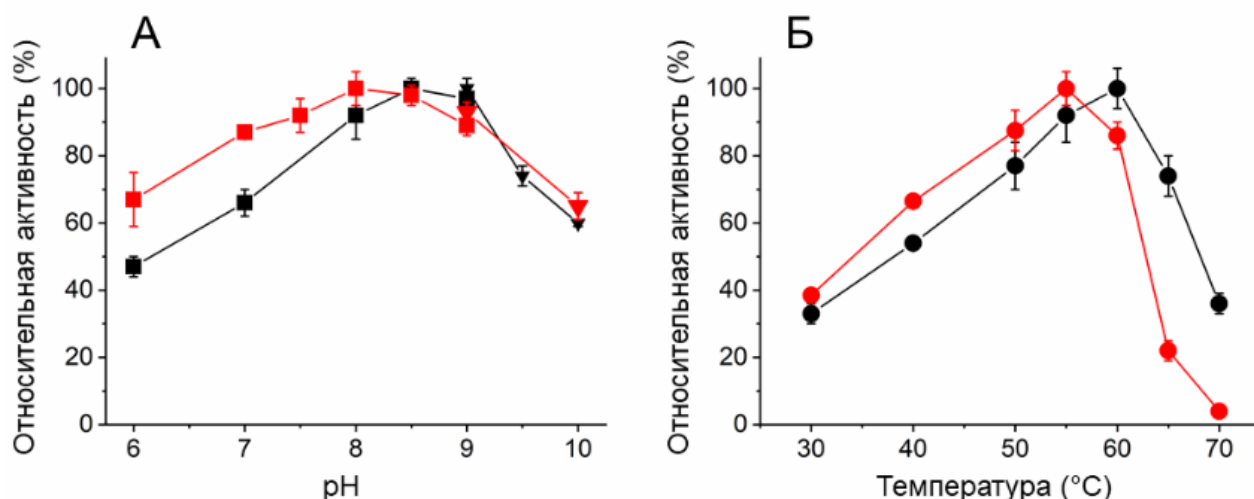


Рис. 5. Зависимости активности AmisoTA от pH и температуры в реакциях трансаминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат (черные линии) и *D*-глутамат + пируват (красные линии). 100% соответствует $0,62 \pm 0,05$ U/мг ((А), черные линии), $0,26 \pm 0,01$ U/мг ((А), красные линии), $1,55 \pm 0,05$ U/мг ((Б), 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 AmisoTA 0,001-0,03 мг/мл.

Наибольшая активность AmisoTA в полной реакции трансаминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат наблюдается при pH 8,0-9,0 и 60 °C, в реакции *D*-глутамат + пируват – pH 7,0-9,0 и 55 °C (Рис. 5). Кинетические параметры этих реакций приведены в Табл. 3.

Табл. 3. Кинетические параметры реакций трансаминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат (в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0) и *D*-глутамат + пируват (в 50 мМ К-фосфатном буфере, pH 8,0), катализируемых AmisoTA, 60 °C.

Субстрат	Косубстрат	k_{cat} , с ⁻¹	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , М ⁻¹ с ⁻¹
D-аланин	5 мМ α -кетоглутарат	10 ± 1	460 ± 60	22 ± 6
α -кетоглутарат	500 мМ D-аланин	10 ± 1	$7,2 \pm 0,8$	1400 ± 300
D-глутамат	500 мМ пируват	$1,40 \pm 0,06$	$5,2 \pm 0,6$	270 ± 40
пируват	30 мМ D-глутамат	$1,40 \pm 0,06$	160 ± 20	9 ± 1

Спектры поглощения PLP-формы AmisoTA при разных pH

Спектры поглощения PLP-формы AmisoTA при разных pH: пик при 280 нм соответствует поглощению ароматических остатков белка, пик при 410 нм соответствует внутреннему альдиминому – основанию Шиффа PLP с ϵ -аминогруппой каталитического остатка лизина, плечо в области 340 нм соответствует енолиминной форме внутреннего альдимины (Рис. 6). Отсутствие смещения пика при 410 нм указывает на протонированную форму внутреннего альдимины в диапазоне pH 7,0-10,0 (Рис. 6А) в активной конформации AmisoTA.

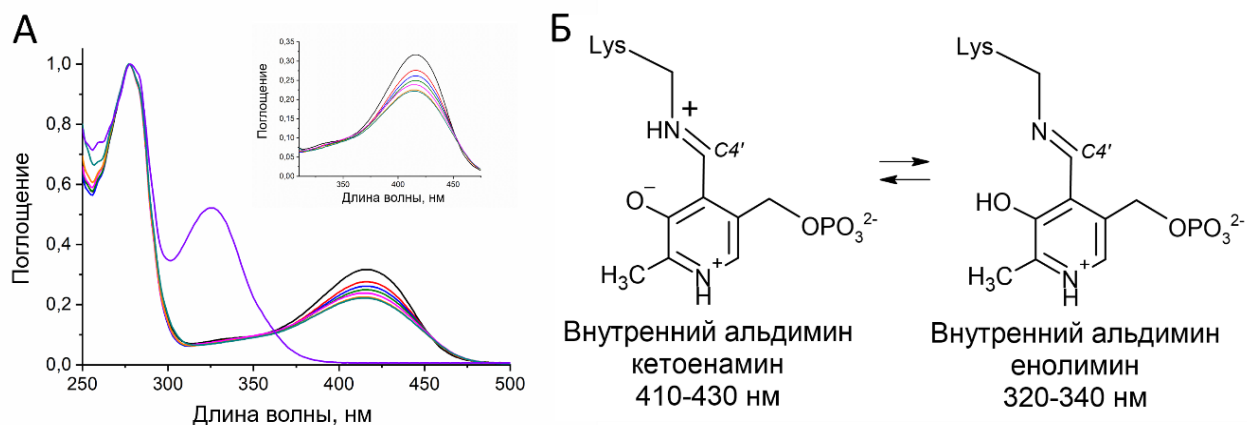


Рис. 6. Состояния PLP-формы AmisoTA при разных pH. (А) Спектры поглощения PLP-формы AmisoTA (30 мкМ) буферах: 25 мМ Трис-НСl / 25 мМ К-фосфат pH 7,0 (черный), pH 8,0 (красный), pH 8,5 (синий), pH 9,0 (зеленый), 50 мМ CHES pH 9,0 (розовый), pH 9,5 (оранжевый), pH 10,0 (бирюзовый), и RMP-формы в 50 мМ CHES pH 9,0 (фиолетовый). (Б) Кетоенамин и енолимин внутреннего альдими́на с указанием максимумов поглощения.

Стабильность AmisoTA

Термостабильность PLP-формы AmisoTA проанализирована двумя способами: (1) кинетическим методом определен период полуинактивации фермента в процессе инкубирования при разных температурах; (2) методом КД определена температура полуперехода ($T_{0.5}$) из нативного состояния в денатурированное при нагревании. Время полуинактивации PLP-формы в концентрации 1,5 мг/мл составило 10 ч (60 °С), 40 ч (50 °С) и 100 ч (40 °С). В присутствии субстратов (100 мМ D-лейцина и 20 мМ α -кетоглутарата) время полуинактивации PLP-формы AmisoTA уменьшилось до 10 мин (60 °С), 10 ч (50 °С) и 35 ч (40 °С). Температура полуперехода AmisoTA составила $68,9 \pm 0,1$ °С.

Для холоформы трансаминаз наблюдается «утечка» (выход) кофактора из активного центра как в условиях реакции, так и в буфере при хранении. Анализ стабильности холоформ (PLP-формы и RMP-формы) AmisoTA показал стабильность PLP-формы в условиях хранения в 50 мМ К-фосфатном буфере при pH 7,0-8,0 и диссоциацию RMP-формы фермента. В условиях реакции наблюдается «утечка» кофактора до полного перехода AmisoTA в апоформу. Обнаружено, что при увеличении концентрации субстрата-кетокислоты в реакционной смеси скорость диссоциации холофермента снижается. В то же время показано, что встраивание PLP в апоформу AmisoTA 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 субстрата-кетокислоты и добавление свободного PLP стабилизирует холофермент в условиях реакции.

Взаимодействие AmisoTA с аналогами субстратов – обратимыми ингибиторами

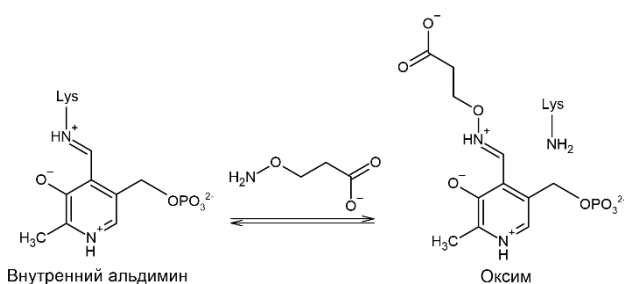


Рис. 7. Взаимодействие 3-аминооксипропионовой кислоты с PLP в активном центре трансаминаз.

3-аминооксипропионовая кислота и D-циклосерин используются при изучении трансаминаз для уточнения связывания субстратов, так как 3-аминооксипропионовая кислота имитирует боковую группу D-глутамата (Рис. 7), а D-циклосерин является аналогом D-серина/D-аланина (Рис. 8). Оба соединения обратимо ингибируют трансаминазы, так как продукты взаимодействия выходят из активного центра, а образовавшаяся апоформа восстанавливается до холофермента при добавлении PLP. Оксим, образованный PLP и 3-аминооксипропионовой кислотой, имитирует внешний альдимин с субстратом D-глутаматом. D-циклосерин образует несколько аддуктов с PLP в активном центре трансаминаз.

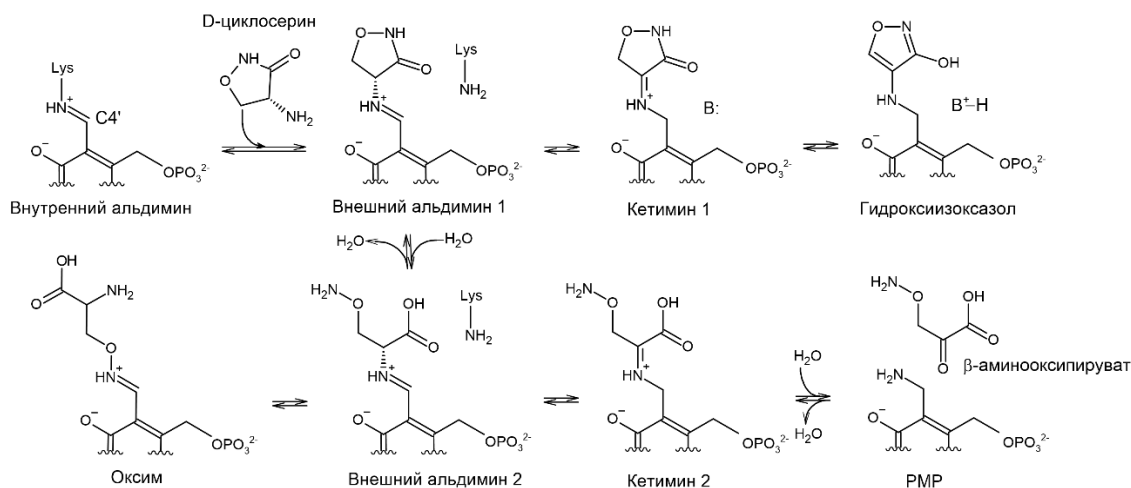


Рис. 8. Взаимодействие D-циклосерина с PLP в активном центре трансаминаз.

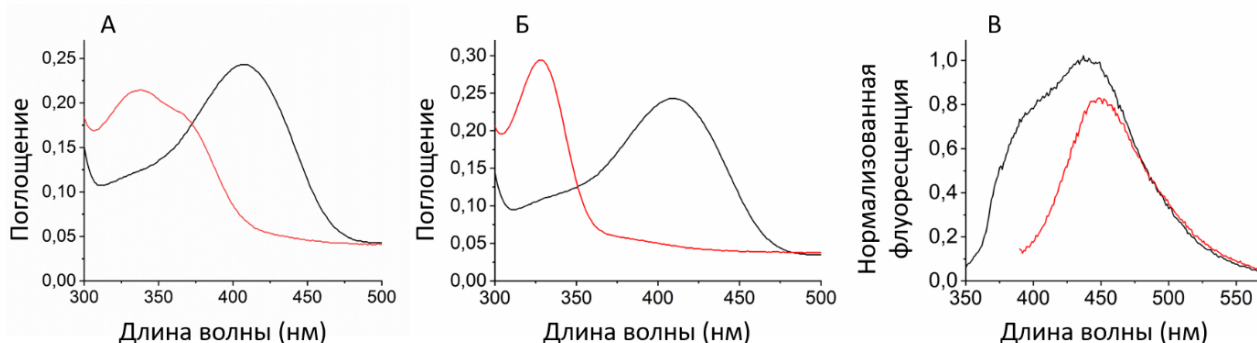


Рис. 9. Взаимодействие AmisoTA с аналогами субстратов. (А) Спектры поглощения PLP-формы AmisoTA (30 мкМ) до (черный) и после добавления 10 мМ 3-аминооксипропионовой кислоты (красный). (Б) Спектры поглощения PLP-формы AmisoTA (30 мкМ) до (черный) и после добавления 30 мМ D-циклосерина (красный). (В) Спектры флуоресценции продуктов взаимодействия AmisoTA с D-циклосерином при длине волны возбуждения 328 нм (черный) и 380 нм (красный).

При добавлении 3-аминооксипропионовой кислоты к раствору PLP-формы AmicoTA наблюдалось снижение поглощения при 410 нм и появление максимума в области 340 нм с плечом при 370-380 нм (Рис. 9А), что соответствует образованию оксима PLP и 3-аминооксипропионовой кислоты. При добавлении D-циклосерина к раствору PLP-формы AmicoTA наблюдалось снижение поглощения при 410 нм и появление максимума при 328 нм с небольшим плечом в области 380 нм (Рис. 9Б). В спектрах флуоресценции смеси AmicoTA с D-циклосерином наблюдалось два максимума испускания при 390 и 450 нм при длине волны возбуждения 328 нм, и один максимум испускания при 450 нм при длине волны возбуждения 380 нм (Рис. 9В). Максимумы в спектре поглощения при 328 нм и в спектре флуоресценции при 390 нм (при возбуждении при 328 нм) соответствуют аддуктам с sp^3 -гибридизацией C4'-атома кофактора (Рис. 8). Плечо в области 380 нм в спектре поглощения и максимум в спектре флуоресценции при 450 нм соответствуют поглощению/эмиссии оксима, образованного PLP и β -аминоокси-D-аланином (продукт перегруппировки внешнего альдимида 2) (Рис. 8). Таким образом, оба соединения взаимодействуют с PLP-формой AmicoTA: 3-аминооксипропионовая кислота образует с PLP оксим, тогда как D-циклосерин образует оксим и несколько аддуктов с sp^3 -гибридизацией C4'-атома кофактора.

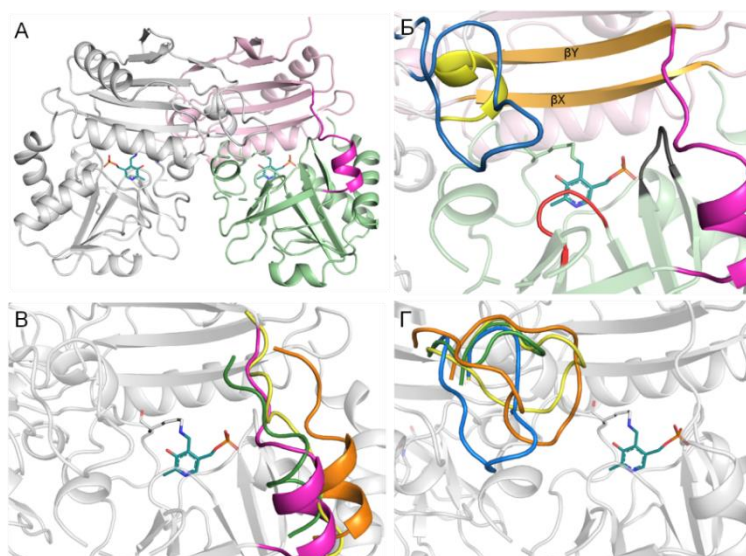


Рис. 10. Общая структура AmicoTA. (А) Димер AmicoTA. В правой субъединице малый домен показан светло-розовым, большой домен – светло-зеленым, междоменная петля – малиновым, соседняя субъединица – серым. Молекула PLP показана бирюзовым. (Б) Активный центр AmicoTA с указанием вторичных элементов структуры: β X- и β Y-тяжи (оранжевые), петля O-кармана (синяя), α -спираль O-кармана (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 Halhy (желтые).

Структура AmicoTA

Пространственная структура PLP-формы AmicoTA определена с разрешением 1,9 Å (PDB код: 8AHR). Кристаллическая ячейка содержит две субъединицы, организованные в димер (Рис. 10А). Каждая субъединица состоит из двух α/β доменов: малый домен (остатки 1-114) и большой домен (остатки 127-275), соединенных междоменной петлей (остатки 115-126) (Рис. 10А). Димер AmicoTA содержит два идентичных активных центра, сформированных остатками двух субъединиц (Рис. 10Б). Междоменная петля AmicoTA (115-126) удалена от активного центра (Рис. 10Б, В). Петля O-кармана (95-109)

также удалена от активного центра в димере AmicoTA (Рис. 10Б, Г), что делает активный центр открытым по сравнению с другими DAAT. Расположение остальных элементов вторичной структуры в активном центре AmicoTA: β X-тяж (30-37), β Y-тяж (85-92), β -поворот1 (173-176) и β -поворот2 (234-237) такое же как в активных центрах других трансаминаз IV типа PLP-укладки.

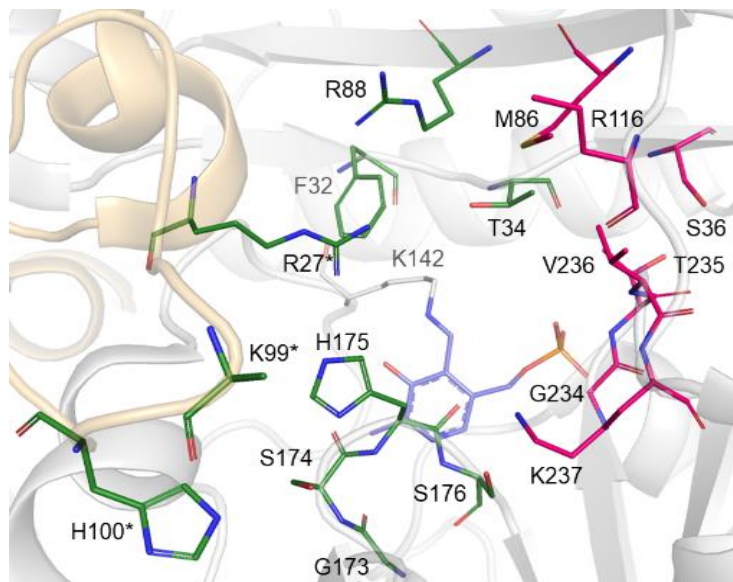


Рис. 11. Активный центр AmicoTA. Соседние субъединицы показаны серым и светло-оранжевым цветами. Остатки О-кармана показаны зеленым, Р-кармана – малиновым, молекула PLP – сиреневым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера.

Р-карман (со стороны фосфатной группы PLP) активного центра AmicoTA образован остатками S36, M86 и остатками β -поворота2 ²³⁴GTVK²³⁷ (Рис. 11). Остаток K237 несет положительный заряд в Р-кармане.

В целях установления механизма узнавания субстратов в AmicoTA, были получены структуры комплексов с субстратом D-глутаматом (разрешение 1,9 Å, PDB код: 8AYK), и ингибиторами D-циклосерином (разрешение 1,9 Å, PDB код: 8AIE) и 3-аминооксипропионовой кислотой (разрешение 1,75 Å, PDB код: 8AYJ). Элементы вторичной структуры, в том числе петля О-кармана и междоменная петля, формирующие активный центр AmicoTA, не меняют своего положения в димерах комплексов, полученных как сокристаллизацией, так и настаиванием. Соответственно, остатки канонической «карбоксилатной ловушки» K99* и H101* удалены из активного центра и не участвуют в связывании лигандов. В комплексе с D-глутаматом в активном центре находится кетимин PLP и D-глутамата с заселенностью 0,7 (Рис. 12А), остальная часть кофактора находится в форме РМР. В комплексе с 3-аминооксипропионовой кислотой в активном центре находится оксим (Рис. 12Б). В комплексе с D-циклосерином в активном центре одной

Молекула PLP связана ковалентно с ϵ -аминогруппой остатка K142 (основание Шиффа) в обоих активных центрах. Координация PLP в структуре AmicoTA типична для трансаминаз IV типа PLP-укладки. О-карман (со стороны гидроксильной группы PLP) AmicoTA является открытым и содержит положительно заряженные остатки и остатки гистидина, которые потенциально могут связывать α -карбоксильную группу субстратов: R27* (* здесь и далее обозначает остаток соседней субъединицы функционального димера), R88, K99*, H101* и H175 (Рис.

субъединицы находится кетимин PLP и циклического D-циclosерина (кетимин 1, Рис. 8, Рис. 12В) с заселенностью 0,65, в другой субъединице – кетимин 2: аддукт PLP и разомкнутого D-циclosерина (Рис. 8, Рис. 12Г) с заселенностью 0,75. Второе состояние кофактора в обеих субъединицах одинаковое и соответствует РМР. Стоит отметить, что структура комплекса PLP-зависимого фермента с аддуктом PLP с D-циclosерином в разомкнутой форме получена впервые. До этого такая форма аддукта только предполагалась по результатам идентификации продукта превращения этой формы – РМР.

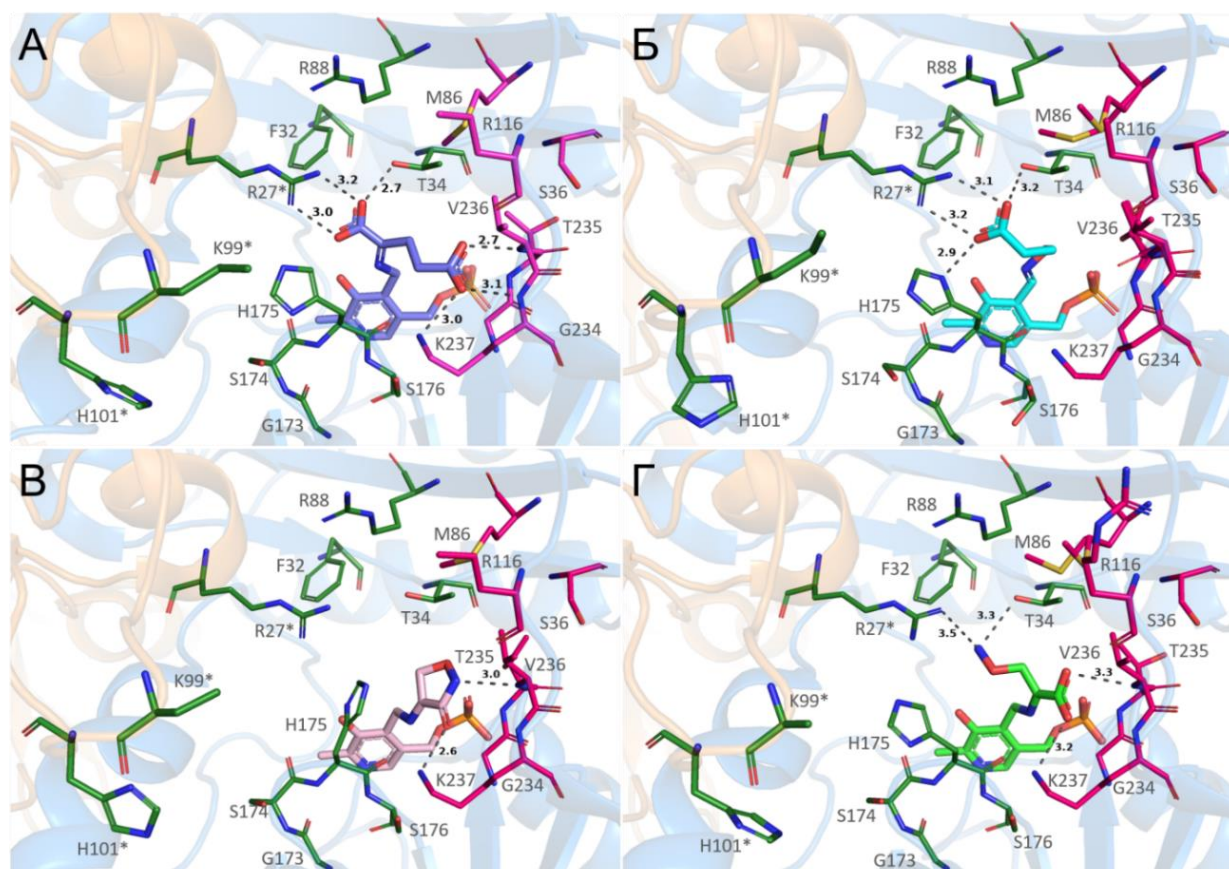


Рис. 12. Структуры комплексов AmisoTA. Активный центр AmisoTA в комплексах с D-глутаматом (А), 3-аминооксипропионой кислотой (Б) и D-циclosерином (В и Г). Первая субъединица показана синим цветом, вторая – оранжевым. Остатки О-кармана показаны зеленым, Р-кармана – малиновым, кетимин, сформированный PLP и D-глутаматом, – фиолетовым, оксим, сформированный PLP и 3-аминооксипропионой кислотой, – ярко-голубым, кетимин, сформированный PLP и D-циclosерином в циклической форме (кетимин 1), – светло-розовым, в разомкнутой форме (кетимин 2), – ярко-зеленым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера. Расстояния приведены в ангстремах Å и показаны пунктиром.

α -Карбоксильная группа D-глутамата образует солевой мостик с гуанидиновой группой остатка R27* и водородную связь с гидроксильной группой остатка T34. Атомы азота основной цепи остатков V236 и K237, а также ϵ -аминогруппа остатка K237 связывают γ -карбоксильную группу D-глутамата (Рис. 12А). Карбоксильная группа оксима, образованного PLP и 3-аминооксипропионой кислотой, образует солевой мостик с остатком R27* и водородные

связи с гидроксильной группой остатка T34 и атомом азота боковой цепи остатка H175 в O-кармане активного центра фермента (Рис. 12Б). Иминный азот кетиминов PLP и D-цикloserина в обеих субъединицах образует водородную связь с карбонильной группой основной цепи остатка H175. В случае кетимина 1 карбонильный кислород лактамной формы D-цикloserина образует водородную связь с ϵ -аминогруппой остатка K237, аминогруппа оксазолидинового кольца образует водородную связь с атомом азота основной цепи остатка V236 (Рис. 12В). В субъединице В остатки V236 и K237 также связывают карбоксильную группу кетимина 2, а остатки R27* и T34 образуют водородные связи с аминогруппой разомкнутого кетимина 2 (Рис. 12Г). Во всех комплексах остаток R88 с β Y-тяжа, консервативный для неканонических DAAT (Табл.1), не участвует в связывании лиганда, однако образует три водородные связи с соседними остатками Q26*, Y90 и E113, то есть задействован в поддержании правильной геометрии активного центра и сети водородных связей.

Таким образом, в AmicoTA идентифицированы два сайта связывания субстратов в O- и P-карманах соответственно. В O-кармане сайт связывания α -карбоксильной группы D-глутамата образован аминокислотными остатками регулярных элементов вторичной структуры: R27* на α -спирали, T34 на β X-тяже и H175 на β -повороте1. У канонических DAAT аминокислотные остатки, образующие «карбоксилатную ловушку» в O-кармане, располагаются на β X-тяже и подвижной O-петле (Табл.1). Тем не менее, спектр субстратов AmicoTA не ограничивается α -кетоглутаратом/D-глутаматом, размер и форма которых наилучшим образом подходят для активного центра трансаминазы.

Варианты AmicoTA и их свойства

Для уточнения функциональной роли остатков активного центра и понимания особенностей организации активного центра у AmicoTA и неканонических DAAT были получены и проанализированы варианты фермента R27*L, R88L, K99*A/H101*A, E113A, S174P/H175T и K237A. Большинство замен привели к удалению в активном центре функциональных групп, способных к электростатическим взаимодействиям и образованию водородных связей. Остатки β -поворота1 ($^{173}\text{GSHS}^{176}$) S174 и H175 заменили на пролин и треонин, аналогично β -повороту1 в гомологичной трансаминазе CruTA ($^{208}\text{GPTS}^{211}$), которая активна как с D-аминокислотами, так и с (R)-аминами. Данная замена повлияла на подвижность β -поворота и образование водородных связей в активном центре.

Замена R27*L привела к потере активности AmicoTA при pH 5,0-9,0. Вариант с заменой K237A был неактивен в реакции трансаминирования при pH 9,0, но проявлял активность на уровне WT при pH 5,0-6,0, при 40 °C (Рис. 13). Вариант с заменами S174P/H175T был активен в диапазоне pH 6,0-10,0 при температуре

40-60 °С. Замены R88L, K99*А/Н101*А и Е113А не повлияли на оптимальные условия реакции трансаминирования. Кинетические параметры реакции *D*-аланин + α -кетоглутарат, катализируемой вариантами AmicoTA, приведены в Таблице 4.

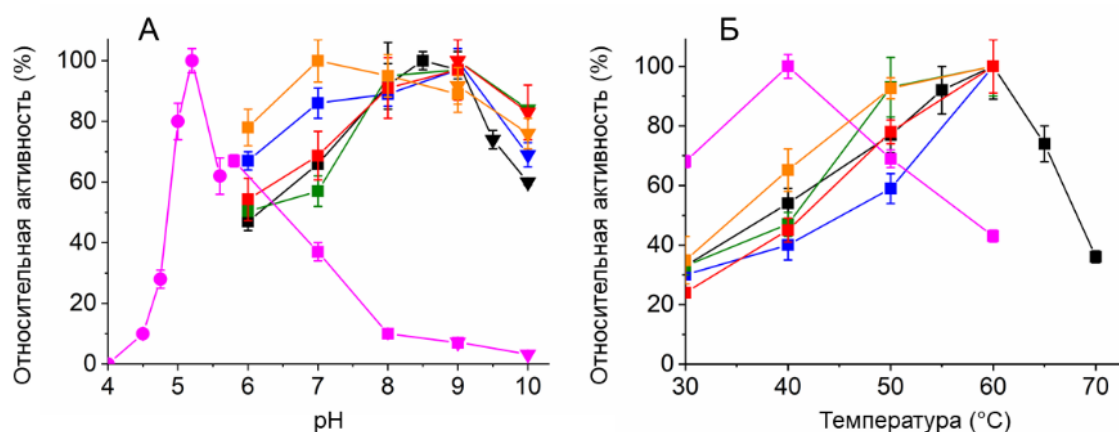


Рис. 13. Зависимость активности вариантов AmicoTA в полной реакции трансаминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат от pH и температуры: R88L – синяя, K99*А/Н101*А – зеленая, Е113А – красная, S174P/Н175Т – оранжевая, K237А – малиновая, WT – черная. Условия сходны с рис. 5.

Замены R27*L и K237A инактивировали фермент при pH 9,0. Однако вариант K237A проявлял активность при pH 5,2. Замены R88L и E113A снижали константу специфичности k_{cat}/K_M к обоим субстратам в равной 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*А/Н101*А не влияла на активность фермента в реакции, тогда как двойная замена S174P/Н175Т привела к значительному снижению активности AmicoTA. Замены R27*L, K237A и двойная замена K99*А/Н101*А не снизили температуру полуперехода $T_{0,5}$ фермента (Табл. 4), тогда как замены R88L, E113A и S174P/Н175Т привели к снижению $T_{0,5}$, что указывает на участие этих остатков в стабилизации функционального димера и поддержании правильной геометрии активного центра (Табл. 4).

Табл. 4. Кинетические параметры реакции трансаминирования *D*-аланин + α -кетоглутарат, 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 вариантов (20 мМ Na-фосфатный буфер, 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/Н175Т	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	1200 ± 200	8 ± 2	40 ± 6	220 ± 50	61,1 ± 0,1
K99*А/Н101*А	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

Табл. 5. Кинетические параметры полуреакций AmicoTA WT и вариантов с D-глутаматом, D-аланином, D-аспаратом, D-лейцином, D-орнитином и D-фенилаланином в 50 мМ CHES буфере, pH 9,0, 40 °С.

Amico	k_{max} $10^3, c^{-1}$	$K_D 10^3,$ М	$k_{max}/K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$	k_{max} $10^3, c^{-1}$	$K_D 10^3,$ М	$k_{max}/K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$	k_{max} $10^3, c^{-1}$	$K_D 10^3,$ М	$k_{max}/K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$
	<i>D-глутамат</i>			<i>D-аланин</i>			<i>D-аспарат</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
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
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
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
K237A pH 5.2	1100 ± 100	18 ± 3	70 ± 10	1400 ± 70	150 ± 20	9,1 ± 0,9	520 ± 20	40 ± 3	13 ± 1
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
E113A	540 ± 30	1,5 ± 0,3	360 ± 90	270 ± 10	40 ± 5	7 ± 1	54 ± 1	18 ± 1	3,0 ± 0,2
Amico	k_{max} $10^3, c^{-1}$	$K_D 10^3,$ М	$k_{max}/K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$	k_{max} $10^3, c^{-1}$	$K_D 10^3,$ М	$k_{max}/K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$	k_{max} $10^3, c^{-1}$	$K_D 10^3,$ М	$k_{max}/K_D,$ $M^{-1}c^{-1}$
	<i>D-лейцин</i>			<i>D-орнитин</i>			<i>D-фенилаланин</i>		
WT	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	Нет активности								
R88L	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	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	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	-	>100	0,14 ± 0,01	1,45 ± 0,05	45 ± 5	0,032 ± 0,004	-	>100	0,16 ± 0,01
S174P/ H175T	0,068 ± 0,001	16 ± 1	0,0043 ± 0,0003	Нет активности					
E113A	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

Вклад остатков активного центра в связывание и дифференциацию субстратов AmicoTA анализировали путем сравнения кинетических параметров полуреакций вариантов с различными D-аминокислотами. Выбор субстратов был обусловлен свойствами заместителей при C α атоме и включал отрицательно и положительно заряженные D-аминокислоты, а также алифатические и ароматические D-аминокислоты (Табл. 5). Вариант с заменой R27*L был неактивен со всеми субстратами, незначительная активность наблюдалась с D-глутаматом. Замена K237A вызвала значительное снижение константы специфичности k_{\max}/K_D к D-глутамату и уравнивание значений k_{\max}/K_D для всех субстратов за счет снижения как k_{\max} , так и K_D при pH 9,0. Сдвиг pH в кислую область позволил восстановить активность варианта в полуреакции с D-глутаматом до уровня WT при pH 9,0 или даже выше для субстратов D-аланина и D-аспартата. Замена R88L и двойная замена S174P/H175T привели к снижению констант специфичности k_{\max}/K_D для всех субстратов при сохранении дифференциации субстратов. Эффект замен S174P/H175T оказался в несколько раз сильнее. Замены E113A и K99*A/H101*A повлияли на кинетические параметры полуреакций в наименьшей степени, при этом при замене K99*A/H101*A константы специфичности k_{\max}/K_D для всех субстратов практически не изменились, тогда как замена E113A случайным образом повлияла на кинетические параметры полуреакций с разными субстратами.

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. В активных центрах вариантов основные изменения наблюдаются в O-кармане (Рис. 14). В варианте R88L разрушен узел водородных связей, остатки Q26*, Y90 и E113 смещены, остатки R27* и H175 имеют две конформации (Рис. 14А, Е). Замена E113A приводит к повороту боковой группы R88 и образованию водородной связи NE/R88-OH/T34 (Рис. 15А, Б). В такой конформации гуанидиновые группы R27* и R88 оказываются перпендикулярно расположенными друг другу. Соседние остатки Y90 и M86 также смещаются (Рис. 15В, Г). Для варианта с заменой E113A также получена структура комплекса с 3-аминооксипропионовой кислотой (PDB код: 8ONN) (Рис. 16). Остаток R88 в комплексе варианта занимает два положения. Карбоксильная группа оксима связана в Р-кармане с ϵ -аминогруппой K237 и атомами азота основной цепи K237 и V236. Ни петля O-кармана, ни междоменная петля не изменили своего положения по сравнению с PLP-формой варианта и AmicoTA WT. Различия в связывании оксима в AmicoTA WT и в варианте с заменой E113A также подтверждают изменение геометрии активного центра фермента и, как следствие, изменение механизма связывания субстратов. Наблюдаемые изменения отражают нарушение геометрии активного центра AmicoTA.

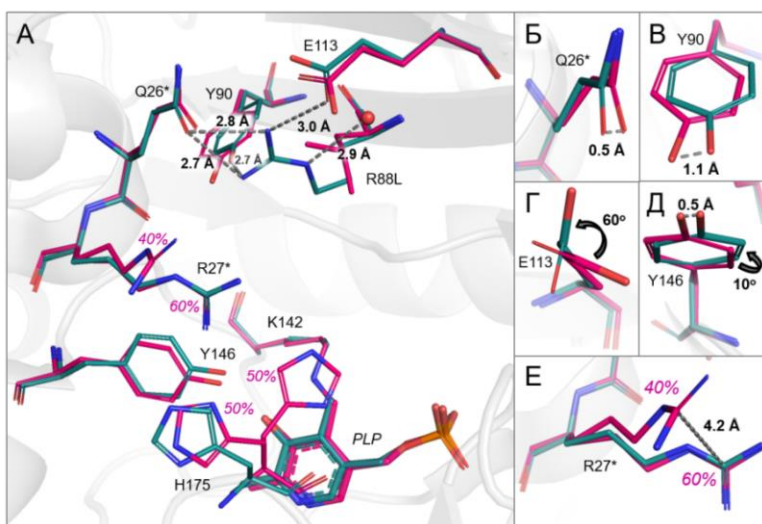


Рис. 14. Организация активного центра варианта AmicoTA с заменой R88L. (А) Наложение остатков активных центров AmicoTA WT и варианта (субъединица В). Смещение боковых групп остатков Q26* (Б), Y90 (В), E113A (Г), Y146 (Д) и R27* (Е). Остатки AmicoTA WT изображены бирюзовым цветом, варианта – малиновым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера. Молекула воды в AmicoTA WT показана красным шариком. Заселенность различных положений боковых групп остатков отображается соответствующим цветом структуры. Расстояние приведено в ангстремах Å и показано пунктиром.

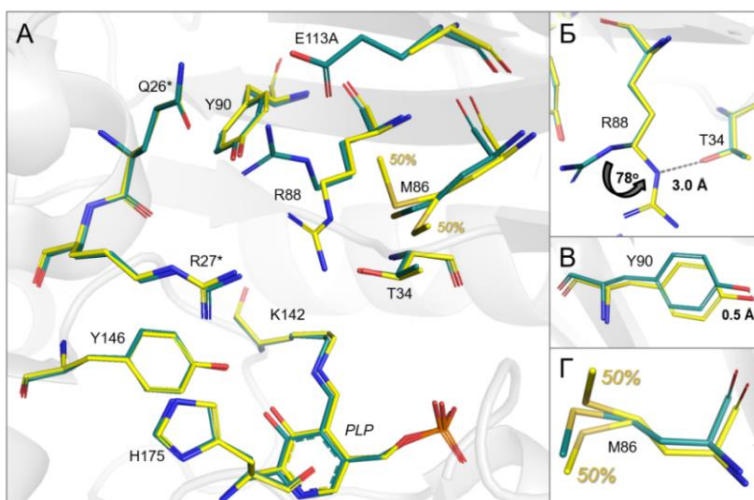


Рис. 15. Организация активного центра варианта AmicoTA с заменой E113A. (А) Наложение остатков активных центров AmicoTA WT и варианта. Смещение боковых групп остатков R88 (Б), Y90 (В) и M86 (Г). Остатки AmicoTA WT изображены бирюзовым цветом, варианта – желтым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера. Заселенность различных положений боковых цепей остатков отображается соответствующим цветом структуры. Расстояние приведено в ангстремах Å и показано пунктиром.

Подвижность R27* в активном центре варианта R88L, по-видимому, приводит к ухудшению связывания и α-кетоглутарата, и D-аланина (следует из увеличения K_D в полуреакциях к D-глутамату и D-аланину) и, как результат, к снижению k_{cat} в полной реакции трансаминирования. Изменение геометрии активного центра варианта E113A приводит к некоторым случайным изменениям в связывании субстратов (наблюдаются случайные изменения кинетических параметров полуреакций). Из значений кинетических параметров полуреакций и полных реакций для D-аланина и α-кетоглутарата следует, что аффинность AmicoTA к этим субстратам не меняется (K_D не меняется) в результате замены E113A. В то же время наблюдается увеличение аффинности к D-лейцину, D-аспартату и D-фенилаланину (K_D снижается).

В структуре функционального димера, кроме изменений в геометрии активного центра, замены R88L и E113A привели к уменьшению количества водородных связей в межсубъединичном контакте

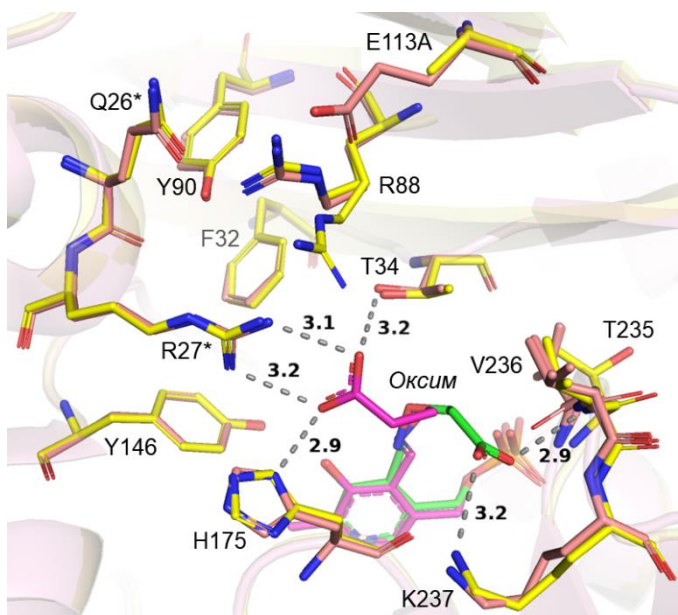


Рис. 16. Наложение структур комплексов AmicoTA WT и варианта E113A с оксимом, образованным PLP и 3-аминооксипропионой кислотой. Остатки AmicoTA WT показаны розовым, варианта E113A – желтым, оксим в комплексе с AmicoTA WT – малиновым, в комплексе с вариантом E113A – ярко-зеленым. (*) обозначает остатки соседней субъединицы функционального димера. Расстояния приведены в ангстремах Å и изображены пунктиром.

ностью. Разделение остатков в активном центре неканонических DAAT на «структурные» и «субстрат-связывающие», также дает преимущества на старте работ по оптимизации фермента под конкретную задачу.

Синтез D-аминокислот

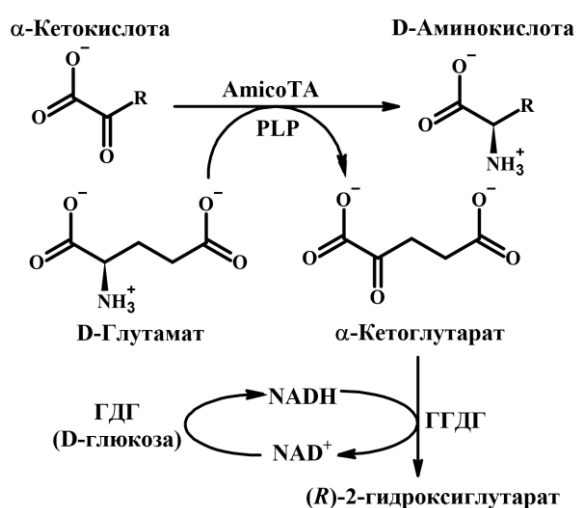


Рис. 17. Трехферментная система (*R*-селективного аминирования α -кетокислот.

аланина и D-гомофенилаланина из кетопредшественников 2-оксобутирата,

(водородные связи NH2/R88-OE1/Q26* и NH1/R88-OE1/Q26* в вариантах отсутствуют), что согласуется с уменьшением $T_{0,5}$ (Табл. 4).

Таким образом, у AmicoTA и, по-видимому, у гомологичных неканонических DAAT остатки, вовлеченные в связывание субстрата, находятся на регулярных элементах вторичной структуры и сближены в пространстве. Петля O-кармана у неканонических DAAT не участвует в катализе, то есть активный центр открыт растворителю и потенциально может связывать объемные субстраты, что дает преимущества при модификации активного центра для целей создания биокатализатора с заданной субстратной специфичностью.

Для оценки возможности применения AmicoTA в синтезе оптически чистых D-аминокислот применяли трехферментную систему (Рис. 17), которая включала AmicoTA, (*R*)-2-гидроксиглутаратдегидрогеназу (ГДГ) из *Acidaminococcus fermentans* и глюкозодегидрогеназу (ГДГ) из *Pseudomonas* sp. для смещения равновесия реакции трансаминирования в сторону продуктов реакции. Эффективность AmicoTA проанализирована в стереоселективном синтезе D-гомоаланина, D-норвалина, D-лейцина, D-фенилаланина и D-гомофенилаланина из кетопредшественников 2-оксобутирата,

2-оксвалерата, 4-метил-2-оксвалерата, фенилпирувата и 2-оксо-4-фенилбутирата соответственно. Синтез проводили при 30 °С и фиксированных концентрациях ферментов и NADH, но при различных концентрациях субстратов и кофактора PLP, а также при двух pH 7,5 и 9,0. Условия проведения синтеза и выходы продуктов приведены в таблице 6.

Табл. 6. (*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-Оксвалерат						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-оксвалерат						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

При pH 7,5 система работала более эффективно, при повышении концентрации субстратов система становилась менее эффективной, увеличение концентрации PLP приводило к незначительному увеличению выходов продуктов. Для каждой реакции определен энантиомерный избыток продукта D-аминокислоты, который составил 99,9, 99,5, 99,1, 99,3 и 99,5% для D-гомоаланина, D-норвалина, D-лейцина, D-фенилаланина и D-гомофенилаланина соответственно.

Дополнительно проанализированы стабильность и активность ферментов системы в присутствии высоких концентраций субстратов и продуктов в условиях (*R*)-селективного аминирования. Установлено, что в условиях синтеза через 24 часа активность AmicoTA не изменилась, ГГДГ уменьшилась на 40%, а ГДГ – на 20%. Высокие концентрации субстратов (до 500 мМ) не ингибируют AmicoTA, тогда как высокие концентрации продуктов реакции ингибируют AmicoTA, начиная от 50 мМ. Ингибирование AmicoTA высокими

концентрациями продуктов реакции, таким образом, могло быть одной из причин снижения выходов продуктов при высоких концентрациях субстратов.

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 более дешевого аминодонора D-аланина с предварительным подбором высокоспецифичной лактатдегидрогеназы для вывода продукта пирувата из системы; (2) использованием более эффективной и выгодной системы регенерации кофактора NAD – формиатдегидрогеназа/формиат и, следовательно, снижением рабочей концентрации NAD; (3) проведением синтеза при более высоких температурах.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что неканоническая трансаминаза 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 трансаминаз D-аминокислот выделить группу неканонических трансаминаз с организацией активного центра, как у трансаминазы 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 ПУБЛИКАЦИЙ 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., Bezudnova 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-цикloserином // 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., Bezudnova 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)