Успехи биологической химии, т. 57, 2017, с. 33-70

СВОЙСТВА БАКТЕРИАЛЬНЫХ И АРХЕЙНЫХ ТРАНСАМИНАЗ РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ

[®]2017 г. Е. Ю. БЕЗСУДНОВА¹, К. М. БОЙКО^{1,2}, В. О. ПОПОВ^{1,2}

¹ Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва

> ² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

I. Введение. II. Механизм катализа трансаминазами. Особенности трансаминирования, катализируемого BCAT. III. Физико-химические свойства и субстратная специфичность бактериальных и архейных BCAT. IV. Структурный анализ BCAT. V. Характеристические мотивы последовательностей BCAT. VI. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

Среди органических кофакторов производное пиридина, пиридоксаль 5'-фосфат (PLP), отличается исключительной полифункциональностью; по разнообразию функций в клеточных процессах в роли кофактора его превосходят, возможно, ион цинка [1] и, очевидно, нуклеотиды и полинуклеотиды в своей роли переносчиков химической энергии, аллостерических эффекторов, структурных компонентов ферментов и функциональных матриц рибонуклеопротеидных комп-

Принятые сокращения: ААТ – аспартатаминотрансфераза; ВСАА – разветвленные аминокислоты; ВСАТ – трансаминаза разветвленных аминокислот; GDH – глутаматдегидрогеназа; еВСАТ – трансаминаза разветвленных аминокислот из *E. coli*; MtBCAT – BCAT из *Mycobacterium tuberculosis*; MW – молекулярный вес; PLP – пиридоксаль 5'-фосфат; PMP – пиридоксамин 5'-фосфат; TA – трансаминаза; Ts-BCAT – трансаминаза разветвленных аминокислот из археи *Thermococcus sp.* CKU-1; TUZN1299 – трансаминаза разветвленных аминокислот из *Thermoproteus uzoniensis*; VMUT0738 – трансаминаза разветвленных аминокислот из *Vulcanisaeta moutnovskia*.

Адрес для корреспонденции: eubez@inbi.ras.ru

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-24-00172).

лексов [2, 3]. PLP-зависимые ферменты в клетке связывают углеродный, липидный и азотный метаболизмы через синтез ацил-СоА, переаминирование ацил-СоА производных и синтез аминокислот и биогенных аминов с образованием α-кетоглутарата и пирувата в качестве второго продукта [2]. PLP-зависимые ферменты выполняют около 160 каталитических функций [4], в прокариотах они задействованы в 4% всех каталитических клеточных процессов, а гены, кодирующие PLP –зависимые ферменты, составляют в геноме 1.5% [5].

В структурах охарактеризованных на сегодня PLP-зависимых ферментов выделяют семь типов (I-VII) трехмерной укладки белка, которые предположительно соответствуют пяти эволюционным линиям PLP-ферментов [4, 6, 7]. Независимо от типа укладки PLP-зависимые ферменты – это альфа-/бета-глобулярные белки с функциональной группой лизина в активном центре, который в холо-ферменте ковалентно связан с PLP. Ферменты разных типов укладки различаются пространственной организацией белковой глобулы и активного центра, ориентацией кофактора в активном центре и способом его координации. Кроме этого, PLP-ферменты разных типов укладки и, что важно, ферменты разных классов с одним типом укладки отличаются составом и расположением аминокислотных остатков, формирующих субстрат-связывающий сайт, и взаимным расположением ассиметричной молекулы кофактора и субстрата, что определяет специфичность катализируемой реакции и субстратную специфичность PLP-фермента. Таким образом, с одной стороны, все разнообразие функций реализуется в ограниченном наборе третичных структур – через семь типов укладки, с другой стороны, разнообразие функциональных групп, задействованных в катализе и связывании субстрата и кофактора, обеспечивает специфичность и многообразие функций PLP-ферментов. Другими словами, PLP-зависимые ферменты являются ярким примером дивергентной эволюции на молекулярном уровне.

Из PLP-зависимых ферментов наиболее широко во всех организмах представлены ферменты метаболизма азота. Такие ферменты катализируют самые разные превращения соединений с первичной аминогруппой, как-то: перенос аминогруппы аминокислот и аминов, рацемизацию аминокислот, бета-, гамма-присоединение/элиминирование, декарбоксилирование и отщепление боковой группы аминокислот [5, 8–10]. Специфичность к аминогруппе есть результат способности PLP ковалентно присоединять первичную аминогруппу субстрата с образованием основания Шиффа и, далее, как электро-

фильному катализатору, стабилизировать карбоанионы – ключевые интермедиаты перечисленных выше каталитических процессов [9, 10]. Специфичность катализируемой реакции определяется комбинацией функциональных групп аминокислотных остатков в активном центре PLP-ферментов. Для детального понимания тонкой регуляции реакционной специфичности PLP-ферментов рекомендуем ознакомиться с обзором Toney [10].

Трансаминазы (ТА; аминотрансферазы; ЕС 2.6.1.) катализируют обратимый стереоселективный перенос аминогруппы с аминосубстрата на кетон/кетокислоту/альдегид с с образованием хирального амина/аминокислоты и нового кетосоединения [10-15]. Во всех организмах трансаминазы являются ключевыми ферментами метаболизма аминокислот. По типу трехмерной укладки трансаминазы относятся к I или IV типам PLP-ферментов. Трансаминазы I типа укладки, называемые также трансаминазами суперсемейства аспартатаминотрансфераз (aspartate aminotransferase superfamily), [7, 16] наиболее многочисленны и разнообразны по субстратной специфичности. Некоторые из них применяются в настоящее время в синтезе оптически активных аминов и неприродных аминокислот, для стереоселективного аминирования органических соединений [16, 17]. Трансаминазы IV типа укладки или суперсемейство D-аланинтрансаминаз (D-alanine transaminase superfamily) исследованы меньше и представлены тремя разными по свойствам семействами: трансаминазами D-аминокислот, трансаминазами разветвленных аминокислот и (*R*)-амин-трансаминазами. Настоящий обзор включает анализ литературы по свойствам и строению трансаминаз разветвленных аминокислот (branched-chain aminotransferases (BCATs); EC 2.6.2.42) из архей и бактерий. Предыдущий обзор по ВСАТ [18] посвящен в основном свойствам двух ВСАТ из человека – митохондриальной и цитоплазматической, сведения о бактериальных ВСАТ даются только в контексте сравнения.

Разветвленные аминокислоты (branched-chain amino acids (BCAA)) – это L-лейцин, L-изолейцин и L-валин, природные гидрофобные α-аминокислоты с алифатической разветвленной боковой группой. Гидрофобные свойства ВСАА определяют их важнейшую роль в сворачивании и формировании белковой глобулы, в поддержании нативного состояния белка, а также в образовании ряда характерных структурных мотивов, в том числе суперспиралей и лейциновых молний [19, 20]. Для биосинтеза валина и изолейцина в бактериях и археях, начиная с пирувата или пирувата и 2-оксобутирата, необходимы четыре фермента. Лейцин образуется

Е.Ю. Безсуонова и соавт	E.1	суднова и соа	вт.
-------------------------	-----	---------------	-----

из 2-кетоизовалерата – промежуточного соединения биосинтеза валина [20–22]. Финальную стадию синтеза каждой ВСАА и первую стадию катаболизма ВСАА в клетке катализирует один фермент – ВСАТ. Обратимое стереоселективное деаминирование L-лейцина, L-изолейцина, L-валина протекает с образованием соответствующей α-кетокислоты, акцептором аминогруппы, как и в большинстве реакций трансаминирования в клетке, является α-кетоглутарат (2-оксоглутарат), реже пируват:

L-лейцин + α-кетоглутарат ⇔ 4-метил-2-оксовалерат + L-глутаминовая кислота,

L-изолейцин + α-кетоглутарат ⇔ 3-метил-2-оксовалерат + L-глутаминовая кислота,

L-валин + α -кетоглутарат \Leftrightarrow 2-оксоизовалерат + L-глутаминовая кислота.

Кетопроизводные BCAA далее декарбоксилируются с последующим включением продуктов реакции в цикл трикарбоновых кислот. Образующаяся в процессе деаминирования L-глутаминовая кислота включается в другие метаболические процессы, что обеспечивает транспорт азота в клетке [2]. Биосинтез и катаболизм BCAA реализуются в бактериях, археях, дрожжах и низших эукариотах. В высших эукариотах BCAT выполняют только катаболическую функцию, поэтому бактериальные BCAT и биосинтез BCAA в целом являются потенциальной мишенью для разработки антибактериальных препаратов [9, 18, 23–25].

В настоящем обзоре будут:

- рассмотрены биохимические свойства бактериальных и архейных BCAT;
- проанализированы особенности реакции трансаминирования, катализируемой BCAT, по которым они выделены в отдельное семейство внутри суперсемейства D-аланинтрансаминаз;
- проанализированы известные на сегодня структуры бактериальных и архейных ВСАТ с целью выявления характерных особенностей, определяющих реакционную и субстратную специфичность ВСАТ;
- проанализированы характеристические мотивы последовательностей ВСАТ, которые определяют их субстратную специфичность и специфичность катализируемой реакции;
- приведены имеющиеся на сегодня сведения о роли ВСАТ в метаболизме аминокислот у бактерий и архей и разработки в области биотехнологического применения ВСАТ.

II. МЕХАНИЗМ КАТАЛИЗА ТРАНСАМИНАЗАМИ. ОСОБЕННОСТИ ТРАНСАМИНИРОВАНИЯ, КАТАЛИЗИРУЕМОГО ВСАТ

ВСАТ В КЛАССИФИКАЦИИ ТРАНСАМИНАЗ

Принятая на сегодня классификация трансаминаз составлена по множественному выравниванию последовательностей в Базе Данных Семейств Белковых Доменов РҒАМ [26], и объединяет, ориентируясь на субстратную специфичность, трансаминазы в классы и подклассы (семейства) по паре реагирующих субстратов: донору аминогруппы / акцептору аминогруппы (механизм трансаминирования см. ниже). Имеются шесть основных классов трансаминаз (табл. 1). Все трансаминазы классов I, II, III, V и VI относятся к PLP-ферментам I типа укладки и катализируют перенос только (S)-аминогруппы L-аминокислот и (S)-аминов. Характерные представители классов, образующие семейства, приведены в таблице 1. Кроме трансаминаз, по результатам структурного выравнивания в основные классы попадают некоторые PLP-зависимые лиазы, синтазы, рацемазы, мутазы и т.д., которые составляют отдельные семейства. Более детальный анализ классификации ТА и характеристика трансаминаз I типа укладки приведены в обзорах [3, 16]. Трансаминазы IV типа укладки составили один отдельный IV класс, в котором выделены четыре семейства: (1) трансаминазы D-аминокислот, (2) BCAT, (3) (R)-амин-трансаминазы, катализирующие синтез и деаминирование (R)-первичных аминов и (4) 4-амино-4-деоксихоризмат лиазы. Лиазы не участвуют в метаболизме азота в клетке, а катализируют отщепление пирувата от 4-амино-4-деоксихоризмата с образованием р-аминобензоата в биосинтезе салициловой кислоты [27, 28]. Таким образом, трансаминазы IV типа укладки могут катализировать стереоселективное превращение как (S)-аминосубстратов (разветвленных L-аминокислот), так и (R)-аминосубстратов (D-аминокислот и (R)-первичных аминов).

Хотя в большинстве реакций трансаминирования реализуется перенос α -аминогруппы аминокислоты, некоторые трансаминазы активны в отношении β -, γ -, ε -аминогрупп аминокислот и аминогрупп первичных аминов, у которых отсутствует СООН-группа, поэтому функционально значимое деление трансаминаз проведено и по удаленности аминогруппы от СООН-группы субстрата. По этому признаку трансаминазы делятся на α -, β - γ - и ω -трансаминазы. ВСАТ относятся к α -трансаминазаминазаминазаминазы, активные с (*S*)- и (*R*)-первичными аминами, рассматриваются как перспективные биокатализаторы стереоселективного аминирования кетонов и кетогрупп в органи-

Тип уклад- ки	ТА класс	Номер ЕС	ТА	Амино донор	Амино акцеп- тор	α/ώ – TA	код в PDB
		2.6.1.X	аспартат ТА	L-Asp	α-ΚΓ	αα	1TOI
I	I		ароматическая ТА	L-Phe	пируват	α	4WD2
1	1	4.4.1.14	1-аминоциклопро- пан-1-карбоксилат синтаза**				1IAX
T	п	2.3.1.29	глицинацетилтранс- фераза	ацетил-СоА	Gly	α	1FC4
1	11	2.6.1.9	гистидинолфосфат ТА	гистидинол- фосфат	α-ΚΓ		-
		2.6.1.X	ацетилорнитин ТА	L-ацетил- орнитин	α-ΚΓ	α	20RD
			ү-аминобутират ТА	γ-амино- бутират	α-ΚΓ	γ	3HMU
			β-аланин:пируват ТА	β-аланин	пируват	β	3A8U
Ι	III		(S)-амин-ТА	<i>(S)</i> -амин	пируват	ώ	3I5T
		4.1.1.64	2,2-диалкилглицин декарбоксилаза**	2,2-диалкил- глицин	пируват		1D7V
		4.2.3.2	<i>о-</i> фосфоэтаноламин фосфолиаза**	о-фосфоэта- ноламин			-
		5.1.1.21	изолейцин-2-эпиме- раза**	L-Ile			3Q8N
		2.6.1.21	ТА D-аминокислот	D-Ala	α-ΚΓ	α	1DAA
		2.6.1.42	BCAT	L-Ile, L-Leu, L-Val	α-ΚΓ	α	1I1K
IV	IV	2.6.1.X	(<i>R</i>)-амин-ТА	<i>(R)</i> -амин	пируват	ώ	4CE5
		4.1.3.38	4-амино-4-деок- сихоризмат лиаза**	4-амино- 4-деокси- хоризмат	_		1I2K
I	v	2.6.1.44	фосфосерин ТА	L-фосфо- серин	α-ΚΓ	α	3FFR
		2.6.1.52	аланин:глиоксилат ТА	L-Ser	α-КГ	α	1VJO
		2.6.1.50	сцилло-инозитол ТА	1-дегидро- сцилло- инозитол	Gln	α	_
I	VI	2.6.1.87	ТА UDP-4-ами- но-4-деокси-β-L- арабиноза	UDP-4-ами- но-4-деокси- β-L-араби- ноза	α-ΚΓ	α	1MDO
*0 **	t-КГ – с – не тг	α-кетоглу рансамин	тарат азы				

Таблица 1. Классификация трансаминаз



ческих соединениях и кинетического разделения рацематов. По применению трансаминаз советуем почитать обзоры [16, 29–31].

МЕХАНИЗМ КАТАЛИЗА ТРАНСАМИНАЗАМИ

Формально реакция, катализируемая любой трансаминазой, – это окислительное деаминирование субстрата-донора с последующим восстановительным аминированием субстрата-акцептора аминогруппы. Трансаминирование протекает по механизму «пинг–понг». Механизм трансаминирования был установлен для аспартатаминотрансферазы (AAT) из *E.coli* [32–36]. Обнаружение ключевых интермедиатов процесса в реакциях, катализируемых разными трансаминазами, в том числе и BCAT, позволило сделать вывод об универсальности установленного механизма [9, 10, 37] (рис. 1). Полная реакция есть сумма двух последовательных полуреакций. В исходной холо-форме трансаминазы PLP ковалентно связан с ε-аминогруппой лизина, образуя основание Шиффа, так называемый



Рис. 1. Схема механизма трансаминирования с указанием максимумов поглощения промежуточных соединений.

внутренний альдимин (internal aldimine). Такая форма кофактора более реакционноспособна, чем исходный несвязанный PLP, потому что протонированный имин более электрофилен, чем альдегид $(R_2C = NH_2^+ >> R_2C = O)$ в последующей реакции нуклеофильного замещения. Первым из субстратов в реакцию вступает аминокислота (амин), с образованием внешнего альдимина (external aldimine) по механизму нуклеофильного замещения є-аминогруппы лизина α-аминогруппой субстрата у С4' атома кофактора. На следующей стадии происходит стереоспецифичный 1,3-перенос протона, катализируемый є-аминогруппой лизина по механизму общеосновного катализа. Кинетическими изотопными эффектами установлено, что эта стадия является лимитирующей скорость [35]. 1,3-перенос протона происходит в два этапа: начинается с отщепления α-протона внешнего альдимина с образованием карбоаниона, одна из резонансных форм которого называется «хиноидный интермедиат» [10, 37], и, затем, протон с є-аминогруппы лизина переносится на С4' атом кофактора с образованием кетимина. Существование хиноидного интермедиада показано спектрофотометрически для разных трансаминаз, накопление его происходит, например, вследствие введения направленных мутаций в активной центр фермента [37] или в реакции с «медленными» субстратами [38]. Изотопными эффектами также показано, что к С4' атому углерода кофактора необязательно присоединяется отщепленный α-протон; наблюдается произвольное присоединение любого из четырех протонов є-аминогруппы каталитического лизина [39]. Далее молекула воды присоединяется к кетимину по двойной C=N связи при общеосновном катализе є-аминогруппой лизина с образованием карбиноламина и последующим высвобождением кетокислоты и кофактора в форме пиридоксамин 5'-фосфата (РМР-форма пиридоксаль 5'-фосфата). Вторая полуреакция протекает в обратном порядке строго через те же промежуточные соединения с образованием новой аминокислоты и регенерацией кофактора в исходную PLP-форму. Каждая стадия процесса стереоспецифична и обратима, поэтому трансаминирование сопровождается ингибированием как субстратами, так и продуктами, и для увеличения глубины превращения применяется вывод продуктов из реакции.

Промежуточные соединения, PLP- и PMP-формы кофактора имеют разные максимумы спектров поглощения, поэтому возможно наблюдать протекание полуреакции, точнее один полуоборот фермента спектрофотометрически (рис. 2). Поскольку смена максимумов





Рис. 2. Спектр PLP- формы (красный) и PMP-формы (черный) ВСАТ из *Т. игоniensis*. Воспроизведен с модификациями по [79].

происходит на стадии 1,3-переноса протона, то методами «быстрой кинетики» можно оценить скорость 1,3-переноса для разных субстратов. Однако 1,3-перенос протона не всегда является стадией, лимитирующей скорость: в ряде исследований трансаминаз I класса из разных организмов есть указания на лимитирующий гидролиз кетимина или лимитирование всего процесса частично несколькими стадиями [32, 40, 41].

ОСОБЕННОСТИ ТРАНСАМИНИРОВАНИЯ, КАТАЛИЗИРУЕМОГО ВСАТ

Механизм катализа ВСАТ детально не изучался. Кинетическим анализом был подтвержден механизм «пинг–понг» [22, 42, 43]. Считается, что трансаминирование ВСАТ протекает через те же промежуточные стадии, что и трансаминирование детально изученной ААТ из *E.coli* [44]. Однако недавно появилось предположение, что в полуреакции ВСАТ из *Mycobacterium tuberculosis* 1,3-перенос протона происходит

не последовательно в две стадии, а согласованно без образования хиноидного интермедиата. Это предположение было сделано на основе анализа влияния изотопного эффекта растворителя на кинетический изотопный эффект в полуреакциях [22].

Отметим ключевые особенности механизма катализа ВСАТ:

(1) Трансаминирование – двухсубстратный процесс, оба субстрата связываются последовательно в одном субстрат-связывающем сайте. Для большинства трансаминаз субстраты различаются по гидрофобности и заряду (табл. 1). Поэтому в активном центре реализуется принцип двойного субстратного узнавания, механизм которого разный для разных классов и даже подклассов трансаминаз. Двойное субстратное узнавание у ВСАТ реализуется по механизму «ключ–замок», детали которого будут рассмотрены в главе IV.

(2) Трансаминирование – стереоселективный процесс: L-аминокислота деаминируется, новая L-аминокислота образуется [10]. В (S)-селективных трансаминазах I типа укладки перенос протона происходит на *si*-стороне кофактора, в трансаминазах IV класса (IV тип укладки), в том числе в ВСАТ, кофактор повернут другой стороной к функциональной группе лизина и перенос протона происходит на *re*-стороне кофактора [45] (рис. 3). Таким образом, ВСАТ – единственные из трансаминаз, отличаются специфичностью к L-аминокислотам при *re*-специфичности переноса протона. Кроме того, среди трансаминаз IV типа укладки ВСАТ – единственные, которые характеризуется (S)-селективностью.

Катализируемое ВСАТ трансаминирование не сопровождается побочными процессами декарбоксилирования или рацемизации, которые также протекают через образование карбоанионов (рис. 1). Принцип, по которому в активном центре один процесс оказывается предпочтительнее другого, был впервые сформулирован Дунатаном [46]. Согласно гипотезе Дунатана предпочтительнее разрыв той связи Са субстрата, которая перпендикулярна плоскости пиридинового кольца кофактора. Такая геометрия приводит к наиболее эффективной резонансной стабилизации р-орбитали карбоаниона, образующегося в результате разрыва любой из трех связей Сα [46]. Кроме того, согласно структурным данным N1 атом пиридинового кольца PLP в холо-форме ВСАТ протонирован. Это повышает электрофильность пиридинового кольца и, следовательно, усиливает стабилизацию карбоаниона [10]. У PLP-зависимых рацемаз в холо-форме N1 атом PLP депротонирован, что предположительно приводит к снижению стабилизации карбоаниона и повышению эффективности рацемизации [44, 47]. Структур-

Трансаминазы разветвленных аминокислот



Рис. 3. Положение PLP в BCAT. Модель внутреннего альдимина BCAT из *T. игоniensis* (PDB ID: 5CE8); *si*-сторона кофактора обращена ко входу в субстратный канал.

ные данные также показали у BCAT наличие водородной связи между атомами N4 иминогруппы альдимина и O3' кофактора. Эта водородная связь стабилизирует плоскую геометрию внешнего альдимина, что усиливает резонансную стабилизацию карбоаниона и способствует поляризации связи Сα–Н во внешнем альдимине [9, 10, 44, 45].

III. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И СУБСТРАТНАЯ СПЕЦИФИЧНОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНЫХ И АРХЕЙНЫХ ВСАТ

ВСАТ ИЗ БАКТЕРИЙ

У бактерий трансаминирование ВСАА было открыто в 1953 г [48, 49]. Общая ВСАТ активность сначала была описана в клеточном экстракте *E. coli* и приписана трем трансаминазам А, В и С [48, 50, 51]. Позже трансаминаза А оказалась смесью двух трансаминаз: ААТ и ароматической аминотрансферазы. Трансаминаза С оказалась уникальным ферментом аланин-валинтрансаминазой, продуктом экспрессии *avt*A гена [52], которая не относится к PLP-зависимому IV классу трансаминаз. Трансаминаза В, первая бактериальная ВСАТ, продукт экспрессии *ilv*E гена, катализировала деаминирование ВСАА и L-глутаминовой кислоты. Позднее, гены, кодирующие ВСАТ у бактерий, получили универсальное название *ilv*-генов [53, 54]. Анализ доступных на сегодня бактериальных геномов подтверждает предположение о присутствии ВСАТ во всех организмах. Однако, с тех пор количество структурно-функционально охарактеризованных ВСАТ едва превысило десять.

Прежде чем приступить к детальному анализу ВСАТ, стоит отметить, что методы определения активности ВСАТ весьма сложны и преимущественно являются непрямыми. Большинство методов состоит в определении концентрации продукта или реже субстрата с использованием второй сопряженной ферментативной реакции, протекание которой сопровождается ростом/снижением оптической плотности в УФ/видимом диапазоне. Методы определения активности ВСАТ, разработанные до 2000 г., приведены в [55]. К ним относятся: измерение накопления L-глутаминовой кислоты или α-кетоглутарата по второй реакции с глутаматдегидрогеназой (GluDH) или в сопряженной системе GluDH с диафоразой [56]; определение накопления пирувата или L-аланина по сопряженной реакции с лактатдегидрогеназой или L-аланиндегидрогеназой, соответственно. Известны и неэнзиматические методы определения активности, например, по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [57, 58]. Исходя из этого, сравнивать ферменты по активности нужно с осторожностью.

Трансаминаза из *Escherichia coli* (eBCAT), продукт экспрессии *ilv*-гена, в растворе по данным гель-фильтрации гексамер [59, 60]. Спектры поглощения РМР и PLP форм фермента имеют максимумы 330 и 410 нм, соответственно; при изменении pH нет сдвига максимума PLP в спектре холо-формы, как это наблюдается для трансаминаз I

класса [61]. Оптимальные условия работы eBCAT составили 25-37 °C при рН 8.0. Ряды специфичности к аминодонорам и кетосубстратам приведены в таблице 2. Наименьшее значение константы Михаэлиса *К*, 0.42 мМ, получено для L-лейцина, наибольшие, 19 и 72 мМ, – для L-метионина и L-триптофана, соответственно, для α-кетоглутарата K_m составила 2.6 мМ, каталитическая константа k_{cat} для наилучших субстратов L-лейцина и L-изолейцина составила 48 с⁻¹. Активность еВСАТ определяли прямым измерением концентрации образующихся кетокислот спектрофотометрически на длинах волн 310 и 315 нм, при этом коэффициент экстинкции определяли отдельно для каждой кетокислоты. В работе [62] были определены кинетические параметры катализируемой еВСАТ реакции аминирования кетоаналогов ВСАА и их неприродных изомеров, L-норлейцина, L-норвалина, L-неопентилглицина и L-tert-лейцина. Активность eBCAT определяли по накоплению продукта α-кетоглутарата по разработанной уникальной методике сопряженного ферментативного восстановления α-кетоглутарата до 2-оксиглутарата катализируемого (R)-оксиглутаратдегидрогеназой. Значение К_т для реакции аминирования кетокислот с L-глутаминовой кислотой в качестве донора аминогруппы составили 0.07 мМ для 3-метил-2-оксовалерата (кетоаналог L-Ile), 0.08 мМ для 4-метил-2-оксовалерата (кетоаналог L-Leu), 0.08 мМ для 4,4-диметил-2-оксовалерата (кетоаналог L-неопентилглицина), 0.22 мМ для 2-оксогексаноата (кетоаналог L-norLeu), 0.2 мМ для 2-оксоизовалерата (кетоаналог L-Val), 0.6 мМ для 2-оксовалерата (кетоаналог L-norVal), 0.15 мМ для триметилпирувата (кетоаналог L-tert-Leu), 56 мМ для пирувата и 3.37 мМ для 2-оксобутирата. k_{cat} для наилучших субстратов – кетоаналогов L-лейцина и его изомеров составила 23-25 с⁻¹. Таким образом, исходя из значений кинетических параметров прямой и обратной реакции для разных субстратов, можно сделать вывод, что in vitro eBCAT с равной эффективностью катализирует как аминирование кетоаналогов ВСАА, так и деаминирование ВСАА. Уи с соавторами [62] показали ингибирование трансаминирования кетосубстратами 4-метил-2-оксовалератом, 4,4-диметил-2-оксовалератом и 2-оксогексаноатом, наблюдаемое при концентрациях ниже 10 мМ, ингибирование аминосубстратом L-глутаминовой кислотой наблюдалось выше 200 мМ.

ВСАТ из *Pseudomonas aeruginosa* [63] по данным гель-фильтрации в рабочем буфере является тетрамером. Ряд специфичности к аминодонорам приведен в таблице 2. Активность фермента рассчитывали по изменению концентрации продукта – L-глутаминовой кислоты, которую отделяли от остальных амино- и

Источник	МW субьели-	Форма		Активность	Специ- фическая актив-	Km, MM L-Leu/	Km,	минь
BCAT	ницы, кДа	B pacr- Bope	с аминосубстратами*	с кетосубстратами**	HOCTL C BCAA, U/MF	а-кетоглу- тарат	MM L-Glu	отэИ
1	2	3	4	5	9	7	8	6
Escheri- chia coli	34	гекса- мер	L-Ile > L-Leu > L-Val> L-Phe > L-Met > L-Tyr > L-Tp	3-метил 2-оксовалерат (Ile)> 4-метил-2- оксовалерат (Leu) > 4,4-диметил-2-оксо- валерат (L-neopenty(Giy)> 2-оксотексаноат (IncLeu)> 2-оксонзовалерата (Val) > 2-оксовалерата(погVal) > триметилшируват L-tert-Leu)>2-оксобутират> пируват	23.9 (c Leu, pH 8.0 25 °C)	0.42/2.6	I	[59, 60, 62]
Pseudo- monas aeruginosa	34	тетра- мер	L-Leu > L-Ile > L-Val > L-norVal > L-Met > L-Phe	α-кетоглутарат (Glu)	90 (c Leu, pH 8.0 37 °C)	1.0/0.4	18	[63]
Pseudomo- nas sp.	1	1	$\begin{array}{l} L\text{-Leu} \approx L\text{-Met} > L\text{-Val} > \\ L\text{-}\alpha\text{-amino}59\text{-rapar} > L\text{-Thr} \\ > L\text{-}\alpha\text{-amino}59\text{-rapar} > L\text{-Thr} \\ > L\text{-Phe} \approx L\text{- IIe} \approx L\text{-Ala} > \\ L\text{-Arg} > L\text{-Trp} > L\text{-Asp} > \\ L\text{-Ser} > L\text{-His} > L\text{-Lys}. \end{array}$	α-кетоглутарат > 2-оксоизовалерата > 2-ок- собутират > пируват	2.5 (c Leu, pH 8.0, 30 °C)	0.3/0.3	3.2	[43]
Glucono- bacter oxydans	39	димер	L-Leu > L-Ile > L-Val > L-norLeu > L-norVal > L-Met > L-Phe > L-Asp > L-Tp	α-кетоглутарат	42.8 (Leu, pH 9.0 37 °C)	1.82/4.57	16.7	[64, 65]
Lactococ- cus lactis	37.4	димер	L-Ille > L-Leu > L-Vàl > L-Met> L-Cys > L-Phe	α-кетоглутарат > 4-метил-2-оксовалерат > 2-оксоизовалерата > 4-метилтио-2-оксо- бутират (Met) > β-фениллируват (Phe) >> пируват	94 (Ile, pH 7.5 37 °C)	I	I	[66]
Lactoba- cillus paracasei	37.8	I	L-lle > L- Leu ≈ L-Val >> L-Met	2-оксогексаноаг > 2-оксоизовалерата > α-кетоглутарат > 4-метилтио-2-оксобу- тират > 2-оксобутират ≈ 3-метил-2-оксо- валерат ≈ β-фенилпируват >> пируват	11.1 (Ile, pH 7.4 37 °C)	I	I	[67]
					Окон	чание табл. 2	см. сл.	.mp.

Таблица 2. Субстратная специфичность ВСАТ

Е.Ю.Безсуднова и соавт.

табл. 2	6	[68]	[42]	[22, 69]	[77, 78]	79, 80]	[81]	[82]	
анне	8	0.56	I	1.3	I	Ι	I	I	
Оконч	7	0.25/0.77	0.34(Ile)/0.085	6.02/6.95	1.1/0.6	0.21/16.0 (пируват)	I	1	
	9	41.8 (Leu, pH 8.0 37 °C)	27.3 (Ile, pH 8.0 37 °C)	12.8 (Leu, pH 7.4 37 °C)	1.5 (Leu, pH 7.5 37 °C)	1.7 (Leu, pH 8.0 65 °C)	1.7 (Leu, pH 8.0 65°C)	390 (Leu, pH 7.3 90 °C)	
	5	α-кетоглутарат	α-кетоглутарат	3-метил 2-оксовалерат > 4-метил-2-оксо- валерат >2-оксоизовалерата >> β-фенил- пируват > 4-метилтио-2-оксобутират	α-кетоглутарат	2-оксобутират > 4-метил-2-оксовалерат ≈ 3-метил-2-оксовалерат ≈ пируват****	2-оксобутират > 4-метил-2-оксовалерат ≈ индол-3-пируват (L-Tтр) > 3-метил-2-оксо- валерат > пируват****	β-фенилпируват > 2-оксобутират > 2-оксо- гексаноат > 2-оксоизовалерат > 4-метил- 2-оксовалерат > 2-оксоглутарат > 2-оксо- валерат	
	4	$ \begin{array}{l} L-Leu \approx L\text{-norVal} \approx L\text{-norLeu} \approx \\ L-Val > L-Phe > L-Tp > L-Ile > \\ L-Met >> L-Tyr >>L-Ala \end{array} $	$ \begin{array}{l} L-Ile > L-Leu > L-Val > L-Met \approx \\ L-Asp \approx L-Phe > L-Gly \end{array} $	$L\text{-Ile}\approx L\text{-Leu}\approx L\text{-Val}>L\text{-Phe}$	$\begin{array}{l} L\text{-Leu} \approx L\text{-Val} > L\text{-Ile} > L\text{-Tyr} \\ L\text{-Trp} > L\text{-Phe} \end{array}$	$\begin{array}{l} L-Met > L-unithine > L-Thr > \\ L-Val > L-norVal > L-His > L-Hie > \\ \approx L-Leu \approx L-norLeu > L-Phe > \\ L-Ala > L-Lys^{**} \end{array}$	L-Met>L-ornithine>L-Lys> L-Thr>L-Val>L-norVal>L-Ile> L-Leu > L-norLeu> L-Ala > L-Phe>L-Trp***	$\begin{array}{ll} L-Leu \approx L-Phe > L-Met > \\ L-norLeu > L-Val > L-norVal > \\ L-lle > L-2-amuno5yrupar >> \\ L-ALa \approx L-Tp > L-Cys > L-Tyr > L-Thr \end{array}$	гтоглутарат; глутаминовая кислота; ируват, L-аланин.
	б	димер	димер	димер	гекса- мер	димер	тетра- мер	дэмир	трат α-ке страт L-1 бстрат п убстрат]
	7	40.1	37.5	34.0	31.8	32.8	35.3	47.5	косубс - косуб - косу * - косу
	1	Bacillus brevis	Helicobac- ter pylori	Mycobacte- rium tuber- culosis	Methano- coccus aeolicus	Thermo- proteus uzoniensis	Vulcani- saeta mout- novskia	Thermo- coccus sp. CKU-1	* * * * *

Трансаминазы разветвленных аминокислот

кетокислот методом ТСХ реакционной смеси с предварительным осаждением белка и далее количественно экстрагировали в смесь метанола и уксусной кислоты. К кетосубстратов 2-оксовалерата и α-кетоглутарата составили 0.2⁶ и 0.4 мМ, соответственно. К аминосубстратов в реакции с 2-оксовалератом составили 1.0 и 1.2 мМ для L-лейцина и L-изолейцина, соответственно, и 18 мМ для L-глутаминовой кислоты. Фермент не проявлял активность с L-аланином, L-аспартатом, L-глицином, L-серином, L-треонином, L-триптофаном и L-тирозином. Еще одна ВСАТ дикого типа из бактерии рода Pseudomonas была охарактеризована Koide с соавторами [43]. Активность фермента рассчитывали по изменению концентрации субстратов и продуктов также с применением метода TCX с последующей количественной экстракцией и определением концентрации компонентов в растворе спектрофотометрически. Специфичность фермента к аминодонорам и к кетосубстратам представлена в таблице 2. Для реакции трансаминирования с 4-метил-2-оксовалератом и L-глутаминовой кислотой обнаружено ингибирование кетосубстратом при концентрации больше 2 мМ.

В это же время была охарактеризована ВСАТ дикого типа из Gluconobacter oxydans (Acetobacter suboxydans) [64, 65] (табл. 2). По результатам гель-фильтрации и седиментационного анализа фермент существует в растворе в виде димера. рН оптимум фермента смещен в щелочную область и составил 8.8-9.0. Значение К_т для реакции трансаминирования кетокислот с L-глутаминовой кислотой составили 2.5 мМ для 3-метил 2-оксовалерата (Ile), 0.91 мМ для 4-метил-2-оксовалерата (Leu), 0.33 мМ для 2-оксоизовалерата (Val). Величина К_щ для α-кетоглутарата в обратной реакции составила от 4.57 до 6.67 мМ в зависимости от аминодонора. Активность с субстратами L-аспарагиновая кислота, L-аргинин, L-цитруллин, L-лизин, L-орнитин, L-аланин, β-аланин и γ-аминобутират не выявлена, активность с пируватом составила 1% от активности с α-кетоглутаратом. Для фермента определено сродство к кофактору, константа связывания для PLP и PMP составили 0.53 и 0.62 мкМ, соответственно.

Свойства ВСАТ из бактерий *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus paracasei* оказались под пристальным вниманием исследователей, так как при созревании сыров этими микроорганизмами из кетоаналогов ВСАА синтезируются ароматические вещества, такие как изобутират, изовалерат, 3-метилбутаналь, 3-метилбутановая кислота, 2-метилбутаналь и 3-метилпропаналь [66, 67]. По результатам гель-фильтрации активной формой ВСАТ из *L. lactis* является димер, а ВСАТ из *L. paracasei* – мономер. Ряды специфичности обеих ВСАТ приведены

в таблице 2. Активности с другими природными аминокислотами не обнаружено. Выявлено полное ингибирование BCAT ионами Hg²⁺, карбоксиметоксиамином, гидроксиламином и фенилгидразином. В присутствии 4% NaCl активность ферментов снижалась не более чем на 20%.

Капda с соавторами [68] выделили и охарактеризовали ВСАТ дикого типа из грамположительной бактерии **Bacillus brevis**. По данным гель-фильтрации фермент в растворе существует в форме димера. Оптимум pH для реакции с L-лейцином и α -кетоглутаратом составил 8.3. Обнаружена активность с ароматическими аминокислотами – L-фенилаланином и L-триптофаном (табл. 2). Фермент не активен с кетоаналогами глицина и аспартата, с пируватом. Показано ингибирование ферментативной активности семикарбазидом, гидроксиламином, фенилгидразином и гидразином. Значения K_m для аминодоноров в реакции трансаминирования с α -кетоглутаратом составили 0.22 мМ для L-валина, 0.25 мМ для L-лейцина, 0.43 мМ для L-изолейцина, 2.0 мМ для L-фенилаланина и 2.9 мМ для L-триптофана. K_m для α -кетоглутарата и L-глутаминовой кислоты в реакции с лейцином и его кетоаналогом составили 0.77 мМ и 0.56 мМ, соответственно. Константа связывания PLP составила 6.5 мкМ.

Еще одна BCAT дикого типа из бактерии *Helicobacter pylori* выделена и охарактеризована Saito с соавторами [42]. Активность фермента рассчитывали по изменению концентрации L-глутаминовой кислоты, которую определяли методами TCX и ВЭЖХ. По данным гель-фильтрации фермент – димер, оптимум pH реакции трансаминирования с L-изолейцином и α-кетоглутаратом составил 8.0. Ряд специфичности фермента к аминодонорам в реакции с α-кетоглутаратом приведен в таблице 2.

В рамках исследования метаболического пути регенерации L-метионина, потребляемого в биосинтезе полиаминов в бактерии *Mycobacterium tuberculosis*, была охарактеризована рекомбинантная форма BCAT из *M. tuberculosis* (MtBCAT), которая не только катализировала финальную стадию биосинтеза BCAA и первую стадию катаболизма BCAA, но и катализировала присоединение аминогруппы к 4-метилтио-2-оксобутирату, кетопредшественнику L-метионина, то есть финальную стадию биосинтеза L-метионина [69]. Установлено, что донором аминогруппы в этом процессе, кроме BCAA, может быть и L-фенилаланин. Значения K_m для L-изолейцина, L-лейцина, L-валина, и L-фенилаланина в реакции аминирования 4-метилтио-2-оксобутирата укладываются в диапазон 1.77–7.44 мМ, значения k_{cat} изменяются в диапазоне 1.22–3.23 с⁻¹. K_m для L-изолейцина, L-лейцина и L-валина, в реакции деаминирования с аминоакцеп-

тором α -кетоглутаратом варьируются в диапазоне 5.79–6.95 мМ, значения k_{cat} варьируются в диапазоне 6.7 – 8.1 с⁻¹. Таким образом, каталитическая эффективность аминирования 4-метилтио-2-оксобутирата лейцином в два раза ниже каталитической эффективности аминирования α -кетоглутарата лейцином, а самый эффективный процесс – это синтез ВСАА из кетопредшественников [22]. Также показано ингибирование MtBCAT оксиаминами по смешанному типу: константы ингибирования для о-бензилгидроксиламина, о-третбутилгидроксиламина и о-аллилгидроксиламина составили 8.20, 11.0, и 21.61 мкМ, соответственно. MtBCAT предложена как потенциальная мишень в разработке противотуберкулезных препаратов.

Упоминаются в контексте изучения метаболизма BCAA, но детально биохимически не охарактеризованы BCAT из бактерий Staphylococcus carnosus [70], Bacillus subtilis [71], Pseudomonas cepacia [72], Pseudomonas putida [73], Deinococcus radiodurans [74], Salmonella typhimurium [75,76].

ВСАТ ИЗ АРХЕЙ

Первая BCAT из умеренно термофильной археи Methanococcus aeolicus была охарактеризована в 1992 году [77, 78]. Фермент дикого типа по результатам гель-фильтрации существует в растворе в форме гексамера, рН оптимум фермента в реакции с ВСАА составил 7.5. Активность фермента определяли при 37 °С по изменению концентрации кетокислот, которое определяли неэнзиматически по реакции с 2,4-динитрофенилгидразином [57]. Наибольшую активность фермент проявлял с L-лейцином и L-валином, активность с L-изолейцин была уже в два раза ниже, активность с ароматическими кислотами -L-тирозином, L-триптофаном и L-фенилаланином не превысила 5-10% от активности с ВСАА (табл. 2). Акцептором аминогруппы был α-кетоглутарат. Фермент не работал с L-аспартатом и L-аланином. *К* для аминодоноров составила 1.4 мМ для L-изолейцина, 1.1 мМ для L-лейцина, 2.8 мМ для L-валина, 0.1 мМ для L-фенилаланина и 2.8 мМ для L-триптофана. Значения *Кт* для α-кетоглутарата в реакциях с BCAA составили 0.3-0.6 мМ. Специфическая активность в реакции деаминирования ВСАА составила 0.7-1.5 мкмоль/мин на 1 мг фермента, ароматических аминокислот – 0.1–0.23 мкмоль/мин на 1 мг фермента. Анализ ингибирования субстратами показал, что 5 мМ α-кетоглутарата снижают активность фермента с валином и изолейцином более чем на 50%, при этом активность с лейцином снижается на 10%, а активность с неспецифическим субстратом L-тирозином не изменяется.

В 2016 году были детально охарактеризованы две рекомбинантные BCAT из гипертермофильных архей Thermoproteus uzoniensis (TUZN1299) и Vulcanisaeta moutnovskia (VMUT0738) [79, 80, 81]. Уровень сходства первичных последовательностей TUZN1299 и VMUT0738 составил 54%. По результатам гель-фильтрации TUZN1299 в растворе – димер, VMUT0738 – тетрамер. Уникальной особенностью обоих ферментов оказалось отсутствие активности с α-кетоглутаратом и L-глутаминовой кислотой и высокий уровень активности с пируватом. Температурный оптимум реакции трансаминирования лейцина с пируватом для обеих ВСАТ превысил 90 °С, оптимум рН реакции составил 8.0. Активность ферментов определяли несопряженным энзиматическим методом: реакцию трансаминирования проводили при 65 °С, концентрации продуктов пирувата или L-аланина в отобранных аликвотах определяли далее энзиматически при 25 °C. Ряды специфичности TUZN1299 и VMUT0738 к кетосубстратам и аминодонорам приведены в таблице 2. Оба фермента отличаются высоким уровнем активности с L-метионином, L-треонином, L-2-аминомасляной кислотой. Активность с L-аланином и L-фенилаланином соизмерима с активностью с лейцином для VMUT0738 и в 2 раза ниже для TUZN1299. Еще одной уникальной особенностью обоих ферментов оказался высокий уровень активности с положительно заряженными L-аминокислотами. Так, для TUZN1299, при специфической активности с лейцином 1.70 мкмоль/мин на 1 мг фермента, специфическая активность с L-орнитином, с L-аргинином, с L-гистидином и с (D,L)-лизином составила 4.4, 3.5, 2.3 и 0.65 мкмоль/мин на 1 мг фермента, соответственно. Для VMUT0738 при специфической активности с L-лейцином 1.72 мкмоль/мин на 1 мг фермента специфическая активность с L-орнитином, с L-аргинином, с L-гистидином и с (D,L)-лизином составила 3.9, 2.64, 1.76 и 3.93 мкмоль/мин на 1 мг фермента, соответственно. При этом оба фермента не активны с L-аспарагиновой кислотой, с L-серином, D-аланином и β-L-аланином. Значения K_m для L-валина и L-норвалина в реакции трансаминирования с пируватом, катализируемой VMUT0738, составили 1.17 и 0.84 мМ, соответственно. Значения K_m для L-лейцина и пирувата в катализируемой TUZN1299 реакции трансаминирования составили 0.21 и 16.0 мМ, соответственно, значение $k_{cat} - 1.31$ с⁻¹. Определение кинетических параметров полуреакций *E-PLP* + аминосубстрат и Е-РМР + кетосубстрат показало, что наиболее ээффективным процессом, катализируемым TUZN1299, является аминирование кетоаналогов ВСАА, константа специфичности полуреакции *E-PMP* + 4-метил-2-оксовалерат достигала 1113000 с⁻¹М⁻¹ при 25 °C. Для сравнения константы специфичности полуреакций

E-PLP + L-лейцин и E-PLP + L-метионин составили 176000 и 9600 с⁻¹М⁻¹, соответственно. То есть для TUZN1299 синтез ВСАА предпочтительнее деаминирования ВСАА. Для TUZN1299 было показано ингибирование кетосубстратами, 4-метил-2-оксовалератом и 3-метил-2-оксовалератом, в концентрации выше 1 мМ в реакции трансаминирования со вторым субстратом L-аланином. Очевидно, что архейные ВСАТ проявляют более широкую субстратную специфичность по сравнению с бактериальными гомологами, однако в значениях специфических активностей архейные ВСАТ уступают бактериальным BCAT.

В 2014 году была опубликовано статья, содержащая детальную характеристику BCAT I типа укладки из археи Thermococcus sp. СКU-1, Ts-BcAT [82], гомологичной как гипотетическим ААТ I типа (уровень сходства последовательностей 91-95% при степени перекрывания 100%), так и охарактеризованной ААТ из Sulfolobus solfataricus МТ4 (уровень сходства последовательностей 26% при степени перекрывания 91%), при этом идентичность с еВСАТ составила 29% при степени перекрывания последовательностей только 15%. По данным гель-фильтрации рекомбинантная форма *Ts*-BcAT в растворе является димером. Фермент показал исключительную термостабильность: уровень активности не снижался после инкубации в течение 5 часов при 90 °С. Как и описанные выше архейные ВСАТ, *Ts*-BcAT проявлял широкую субстратную специфичность (табл. 2), был активен с а-кетоглутаратом. но не активен с положительно заряженными аминокислотами. Анализ кинетических параметров полуреакции показал, что максимальная каталитическая эффективность Ts-BcAT достигается в процессах аминирования кетокислот: константа специфичности полуреакции Е-РМР + 4-ме*тил-2-оксовалерат* составила 11 000 000 с⁻¹ М⁻¹ при 25 °С. Оксоамины, семикарбазид и гидроксиламин ингибировали активность фермента незначительно. При изменении рН наблюдался сдвиг максимума PLP в спектре холо-формы, как у известных трансаминаз I класса, что позволило рассчитать рКа є-аминогруппы каталитического лизина во внутреннем альдимине, значение которого составило 5.5. Фермент, по-видимому, является ароматической аминотрансферазой, специфичной к гидрофобным аминокислотам, включая ВСАА. Небольшая активность с валином, изолейцином, 2-аминооктаноатом и 2-аминобутиратом была ранее показана для ароматических аминотрансфераз из E.coli K-12 [83] и Paracoccus denitrificans IFO 12442 [84]. Имеется ли у Thermococcus sp. СКU-1 истинная BCAT IV типа укладки остается невыясненным, при этом известно, что организм

растет только в присутствии L-лейцина, L-метионина и L-фенилаланина и некоторых других аминокислот.

Обобщая приведенные характеристики, можно сделать следующие выводы о свойствах ВСАТ из бактерий и архей. (1) ВСАТ существуют в растворе в различных олигомерных состояниях. (2) рН оптимум ВСАТ составляет 7.5-8.0, у некоторых ферментов достигает 9.0. (3) In vitro у бактериальных и архейных BCAT не наблюдается предпочтительности аминирования или деаминирования, в то же время из кинетических параметров полуреакций следует, что аминирование кетопредшественников ВСАА - наиболее эффективный процесс. (4) Специфичность бактериальных ВСАТ не ограничивается ВСАА и их кетоаналогами, как это наблюдается у ВСАТ млекопитающих [18, 85], бактериальные ВСАТ активны с метионином, ароматическими аминокислотами и треонином. ВСАТ из архей отличаются еще более широкой субстратной специфичностью. (5) Сродство к кетосубстратам выше, чем к аминосубстратам. (6) Предпочтительный аминоакцептор – α-кетоглутарат, активность с пируватом значительно ниже, кроме TUZN1299 и VMUT0738, которые не активны с α-кетоглутаратом. (7) Активность ВСАТ ингибируется кетосубстратами, что, возможно, является механизмом регуляции их активности в клетке. (8) Активность ВСАТ ингибируется оксимами, гидразином и его производными, семикарбазидом. Ингибирование оксимами, предположительно, реализуется через реакцию с PLP [86, 87]. (9) PLP связывается в активном центре BCAT прочнее субстрата в 100-1000 раз. (10) В спектрах поглощения BCAT, кроме белкового, наблюдаются два дополнительных максимума в области 320-330 нм и 410-420 нм, которые соответствуют РМР и PLP формам связанного кофактора, соответственно. При изменении рН не наблюдается сдвига максимума в спектре PLP форм, как у ААТ, у которых этот сдвиг соответствует депротонированию иминного азота внутреннего альдимина [9, 61].

ПОТЕНЦИАЛ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ВСАТ

В отличие от разработок технологических процессов с применением ω-трансаминаз, активных с аминами и кетонами/альдегидами, то есть способных к стереоспецифичному синтезу первичных аминов, разработки биотехнологических процессов с применением BCAT пока малочисленны [31, 88]. Так в работе [89] рассматривается возможность применения BCAT для синтеза L-гомофенилаланина, L-2-аминобутирата и L-tert-лейцина из соответствующих кетокислот и 2-кетоглутарата в паре с орнитин-δ-аминотрансферазой, которая

Е.Ю.Безсуонова и соавт	езсуднова и сс	эавт.
------------------------	----------------	-------

применяется для выведения продукта, L-глутаминовой кислоты, из первой реакции. Такая комбинация приводит к увеличению выхода продукта в первой реакции до 80-90%. В работе [66] предложено применение eBCAT для ассиметрического синтеза некоторых неприродных аминокислот – L-норлейцина, L-норвалина, L-неопентилглицина и L-tert-лейцина, потенциальных синтонов для ряда фармацевтических препаратов, включая противоопухолевые, а также препараты для терапии ВИЧ инфекций [90, 91]. Применение eBCAT для синтеза производных L-глутаминовой кислоты с заместителями в положении 3 и/или 4 (для применения в исследовании специфичности глутаматных рецепторов) показано в работе [92]. Четыре стереоизомера L-2-(2-карбоксициклобутил)глицина, как циклические аналоги L-глутамата для изучения транспортной системы L-глутамата в ЦНС, были синтезированы из cis- и trans-2-оксалилциклобутанкарбоксильных кислот при участии ААТ и еВСАТ [93]. Таким образом, потенциальное применение ВСАТ возможно на основе специфичности ферментов как к гидрофобным алифатическим аминокислотам, так и к производным L-глутаминовой кислоты.

ІV.СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ВСАТ

СТРОЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ДИМЕРА

Первая структура BCAT из E. coli, холо-форма с PLP, была получена в 1997 (PDB code 1A3G) [94]. Позднее были также получены структуры eBCAT с неактивными аналогами субстратов: 4-метилвалератом (PDB code 111M) и глутаровой кислотой (PDB code 11YD), а также с субстратами: 2-метиллейцином (PDB code 111L) и L-глутаминовой кислотой (PDB code 1IYE) [44, 95]. Помимо структуры eBCAT решены структуры ряда других бактериальных ВСАТ: холо-форма и структура с ингибитором о-бензилгидроксиламином BCAT из M. smegmatis (PDB code 3DTF, 3JZ6) [96]; холо-форма BCAT из M. tuberculosus (PDB code 3HT5) [97], холо-формы BCAT из Burkholderia pseudomallei (PDB code 3U0G, 4WHX), а также из Streprococcus mutans (PDB code 4DQN). Известны несколько структур ВСАТ из экстремофильных бактерий и архей: холо-форма и комплексы с 4-метил-2-оксовалератом и L-глутаматом из D.radiodurans (PDB code 3UYY, 3UZB, 3UZO) [74]; холо-форма из Thermotoga maritima (PDB code 3CSW), холо-форма и комплекс с ингибитором габапентином из Thermus thermophiles Hb8 (PDB code 1WRV, 2EIY, 2EJ0, 2EJ2 и 2EJ3); холо-форма из археи *T. uzoniensis* (PDB code 5CE8); холо-форма и комплекс а α-кетоглутаратом из археи Geoglobus acetivorans (PDB code 5E25, 5CM0).



Рис. 4. Наложение димеров ВСАТ из *E. coli* (в сером цвете) и ВСАТ из *T. uzoniensis* (синим и зеленым показаны субъединицы димера). Межсубъединичная петля у ВСАТ из *T. uzoniensis* выделена красным цветом, PLP выделен розовым цветом.

Большинство структурно охарактеризованных ВСАТ кристаллизуются в виде димеров, исключения на сегодня составляют eBCAT и BCAT из *T. thermophiles*, которые кристаллизуются в виде гексамеров, и BCAT из *D. radiodurans*, которая в комплексе с субстратом упакована в кристалле в виде тетрамера. И хотя для некоторых ферментов гексамерная и тетрамерная формы показаны гель-фильтрацией (табл. 2), функциональной единицей BCAT является димер (рис. 4). Этот вывод следует из анализа строения активного центра BCAT [44, 74, 94–97]. Все димеры BCAT, включая BCAT млекопитающих [18], отличаются высоким сходством структур, которое обнаруживается при структурном выравнивании, анализе расположения функционально значимых остатков и наложении элементов вторичной структуры [18, 47, 79, 96].

У всех BCAT субъединица димера состоит из двух α/β доменов (малого и большого), а также важной для функционирования фер-

Е.Ю.Безсуднова и соавт.



Рис. 5. Наложение субъединиц ВСАТ из *E.coli* (в сером цвете) и ВСАТ из *T. игоniensis*. Зеленым и синим выделены домены, красным С-концевая α-спираль, желтым – междоменная петля у ВСАТ из *T.uzoniensis*. PLP выделен розовым цветом.

мента междоменной петли (рис. 5). Сравнительный анализ моделей холо-форм ВСАТ и комплексов с субстратами указывает на отсутствие взаимного движения доменов при связывании субстрата. Относительное положение доменов фиксируется С-концевой спиралью (спираль 279–293 у eBCAT, спираль 267–280 у TUZN1299). Междоменная петля изолирует активный центр от растворителя после связывания субстрата [105], подвижность петли отражается в ее отсутствии на картах электронной плотности в холо-формах BCAT [74, 95] и ее идентификацией в комплексах ферментов с субстратами и их аналогами [44, 74]. Видимая междоменная петля в холо-форме TUZN1299 (PDB code 5CE8) отличается увеличением значения теплового фактора (В-фактор) составляющих ее остатков [79], что подтверждает ее относительную подвижность в отсутствии связанного субстрата. Интересно, что хорошо проявляется междоменная петля в моделях холо-форм архейных BCAT и BCAT из *D. radiodurans*, что,

по-видимому, соответствует большей жесткости структур термостабильных ферментов.

Функциональный димер содержит два активных центра. Активный центр формируется большим и малым доменами одной субъединицы и малым доменом другой субъединицы. В моделях холо-форм ВСАТ в активном центре находятся молекулы PLP, ковалентно связанные с каталитическим лизином (внутренний альдимин). PLP обращен к белковой глобуле re-стороной (рис. 3), именно на этой стороне кофактора изолированно от растворителя происходит 1,3-перенос протона у ВСАТ и трансаминаз двух других семейств IV типа укладки. PLP в активном центре BCAT (рис. 6а) образует двойную связь C4' = N с лизином и фиксируется в трех точках: (1) фосфатной группой через водородные связи и солевые мостики с остатками R59, I220, T221, T257, A258 (у eBCAT); R54, I211, T212, T248 (у TUZN1299); (2) кислородом фенольной группы PLP через водородную связь с Y164 (у eBCAT) или Y155 (у TUZN1299); (3) азотом пиридинового кольца через водородную связь с Е193 (у eBCAT) и E184 (у TUZN1299). Идентичные остатки задействованы в координации PLP у всех охарактеризованных структурно BCAT, включая эукариотические [18, 44, 95, 98]. Дополнительные водородные связи PLP с неконсервативными остатками описаны для BCAT из D. radiodurans [74]. Сравнительный анализ структур холо-форм и комплексов с субстратами у всех ВСАТ указывает на вращение молекулы PLP по N-C6 или N-C4 осям при переходе из внутреннего альдимина во внешний альдимин. Торсионный угол (C3-C4-C4'-N) составляет величину от 30° в моделях холоформ до 0° в моделях комплексов с субстратами, что указывает на водородную связь между фенольной группой PLP и иминным азотом. Протонированная форма иминного азота при нейтральных и слабощелочных pH, повидимому, является отличительной чертой именно ВСАТ [9, 10, 95]. У трансаминаз I класса значение pКа иминного азота составляет 5-7.5 единиц, это значение рКа проявляется при рН-титровании холо-формы фермента. Холо-форма ВСАТ, как обсуждалось выше, не титруется [60, 80].

СВЯЗЫВАНИЕ СУБСТРАТА; ДВОЙНОЕ СУБСТРАТНОЕ УЗНАВАНИЕ

В структурах комплексов ВСАТ субстрат или аналог субстрата размещаются с *si*-стороны кофактора и могут быть ковалентно связаны с PLP (внешний альдимин) (рис. 6б). При этом α-СООН группы аминодонора и аминоакцептора размещаются в малом кармане на стороне фосфатной группы PLP (P-сторона), гидрофобный остаток

Е.Ю.Безсуднова и соавт.



Рис. 6 (а). Связывание PLP в BCAT из *T. uzoniensis*. Рисунок создан в программе LigPlot.

ВСАА размещается в большом кармане со стороны фенольной группы PLP (О-сторона). В присутствии субстрата в eBCAT и BCAT из *T. thermophilus* структурируется междоменная петля (остатки 126–137 у eBCAT), у BCAT из *D. radiodurans* петля (173–179) переходит в другую конформацию относительно холо-формы. Во всех комплексах междоменная петля в наблюдаемой конформации блокирует доступ молекул растворителя в активный центр, тем самым препятствуя протеканию побочного процесса рацемизации, который реализуется в PLP-зависимой аланинрацемазе с активным центром, доступным растворителю. [45, 99, 100]. Конформация молекулы BCAT с таким состоянием активного центра называется закрытой, в противоположность открытой конформации в холо-форме. Анализ последовательности аминокислот в междоменной петле eBCAT, проведенный Окадо с соавторами [95], показал ее консервативность среди BCAT, идентичность после-





Рис. 6 (б) Связывание внешнего альдимина L-глутамата в ВСАТ из *E. coli* (PDB ID: 1IYE). Большой карман выделен розовым цветом, малый карман – синим цветом.

Рисунок создан в программе LigPlot.

довательностей которых составляет не менее 30%. По мнению авторов, это показывает, что петля подвергается структурированию и взаимодействует с субстратом во всех гомологичных BCAT сходным образом. Подвижность петли в открытой конформации обеспечивает доступ субстрату в активный центр. Как отмечалось выше, междоменная петля структурирована в моделях холо-форм ферментов из термофильных организмов – TUZN1299, BCAT из *G. acetivorans и D. radiodurans*. Можно предположить, что петля деструктурируется при оптимальных высоких температурах реакции и фермент в рабочем состоянии переходит в открытую конформацию. При связывании субстрата наблюдаются также изменения в положении остатков в малом кармане. Так, у eBCAT наблюдается разво-

рачивание R40 в сторону консервативного для ВСАТ β-поворота G256-T257-A258-A259, при этом R40 образует водородные связи с карбонильными кислородами остатков Т257 и А258. Атомы азота этих остатков фиксируют водородными связями α-СООН группу субстрата, которая дополнительно координирована консервативной водородной связью с гидроксильной группой тирозина (Ү95 у eBCAT и Y91 у TUZN1299) из консервативной для BCAT триады Y(I,L,V)R. Установлено, что аргинин в этой триаде активирует тирозин через образование консервативной водородной связи с его гидроксильной группой [101]. Идентичный R40 eBCAT остаток R35 у TUZN1299 находится в развернутой конформации уже в холоформе. Консервативные остатки G122 и G127 в структурированных междоменных петлях в холо-форме TUZN1299 и в комплексе eBCAT с субстратом образуют водородную связь с остатками R35 и R40, соответственно. Так завершается формирование оптимальной конформации малого кармана. Сравнительный анализ связывания субстрата в активных центрах родственных трансаминаз IV типа укладки – BCAT, DAAT и (R)-амин-трансаминаз, показывает, что организация именно малого кармана определяет специфичность этих ферментов [102-104].

Исключительной особенностью ВСАТ является связывание α-СООН группы субстрата на Р-стороне активного центра (рис. 6(б)). У прочих трансаминаз I и IV типов укладки отрицательно заряженная фосфатная группа PLP и α-СООН субстрата разнесены в пространстве. Goto [44] высказал предположение, что, поскольку сближение двух отрицательно заряженных групп приводит к повышению общей энергии системы, то для ее стабилизации целесообразно появление положительно заряженной частицы между ними. Возможно, соседство двух отрицательно заряженных групп служит ловушкой-акцептором протона α-аминогруппы субстрата на стадии образования комплекса Михаэлиса. Как отмечалось выше, иминный азот внутреннего альдимина ВСАТ, по-видимому, протонирован и не может принять протон, как это предполагается в трансаминазах I типа укладки, поэтому необходим дополнительный сайт-акцептор протона α-аминогруппы субстрата. Возможно также, что этот отрицательно заряженный сайт необходим для активации именно ВСАА, которые на стадии перехода внутренний альдимин – внешний альдимин как нуклеофилы недостаточно активны, и поэтому требуются дополнительные меры для отщепления протона α-аминогруппы субстрата.

Боковая группа аминодонора и аминоакцептора последовательно связываются в большом кармане на О-стороне активного центра. При

связывании таких разных по свойствам фрагментов как гидрофобные боковые группы ВСАА и γ-СООН группа α-кетоглутарата в ВСАТ, как и во всех трансаминазах, реализуется принцип двойного субстратного узнавания, который у BCAT достигается по механизму «ключ-замок» и детально описан для eBCAT [44, 105]. Большой карман eBCAT образуется аминокислотными остатками обеих субъединиц димера: боковыми группами F36, R97, W126, Y129, Y164 одной субъединицы и Y31*, V109* другой субъединицы, которые формируют гидрофобную поверхность кармана с вкраплением четырех гидрофильных сайтов, как бы погруженных в эту гидрофобную поверхность – это гуанидиновая группа R97, гидроксильные группы Y31* и Y129 и азот основной цепи V109* (рис. 6б). Гидрофобная группа ВСАА взаимодействует с гидрофобной поверхностью кармана, а α-кетоглутарат, который на одно –СН₂-звено длиннее ВСАА, дотягивается у-СООН группой до «утопленных» гидрофильных сайтов, образуя с ними солевой мостик и три водородных связи [44]. Двойное субстратное узнавание реализуется по механизму «ключ-замок» и в остальных трансаминазах IV типа укладки и у некоторых трансаминаз I типа укладки, например, в глутамин-фенилпируваттрансаминазе из T. thermophilus НВ8 [106]. Индуцированное соответствие – другой механизм двойного субстратного узнавания, реализуется в ароматических аминотрансферазах I типа укладки и принципиально отличается вращением консервативного остатка аргинина в большом кармане [105, 107, 108], что позволяет формировать положительно заряженный сайт для связывания γ-СООН группы α-кетоглутарата и убирать его при связывании ароматического субстрата.

V. ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИЕ МОТИВЫ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ВСАТ

Как сказано выше, ВСАТ относятся к PLP-ферментам IV типа трехмерной укладки вместе с DAAT, изохоризматлиазами и (*R*)-амин-трансаминазами. Детальный анализ аминокислотных последовательностей этих похожих структурно, но различающихся по реакционной специфичности и субстратной специфичности трансаминаз [101] показал, что два характеристических мотива определяют специфичность трансаминаз IV типа укладки, (рис. 7а). Выравнивание последовательностей ВСАТ, обсуждаемых в данном обзоре, наглядно демонстрирует наличие двух характеристических мотивов у ВСАТ (рис. 76):

	31						4	0	9	5												1	09
BCAT	Y	GТ	s v	F	E	G 1	R	••	۰Y	I	R	Ρ	L	I	F٦	7 G	D	v	G	м	G	v	
DAAT	F	G D	GΫ	Y	E	v٦	7 K	•••	·н	I	Y	F	Q.	v	ΤI	ς G	т	S	Ρ	R	A	н	
R-amine-TA	н	S D	LТ	Y	D	VE	s S	• •	۰F	v	Е	L	I	v	ΤI	R G	L	ĸ	G	v	R	G	
ADCL*	F	G D	G C	F	т	ΤÆ	A R	•••	۰v	L	ĸ	v	v	I	SI	R G	S	G	G	R	G	Y	
		_																					

* ADCL – изохоризматлиаза.

Рис. 7 (а) Характеристические мотивы представителей четырех семейств трансаминаз IV класса IV типа трехмерной укладки PLP-ферментов.

мотив_1 31-Y(G,A)XXXF(E,D)GX(K,R)-40 и

мотив_2 95-Y(I,L,V)Rxx...xx(M,I)G(V,L)-109 (здесь нумерация eBCAT).

Структурное выравнивание последовательностей и наложение структур ВСАТ с субстратами [44, 74, 95] показали, что характеристические мотивы формируют сайт связывания субстрата. Функции консервативных остатков сводятся к следующему: УЗ1 обеспечивает связывание γ-СООН группы α-кетоглутарата и L-глутаминовой кислоты, R38/K40 формируют пространство для связывания α-COOH группы субстрата в малом кармане, они взаимодействуют с азотами основной цепи также консервативной у ВСАТ триады 257-ТАА-259, также формирующей малый карман. Роль консервативной триады 95-Y(I,L,V)R-97 в координации α-СООН обсуждалась выше. Как следует из имеющихся на сегодня биохимических данных, остатки Y95, R97 и R40 являются ключевыми в последовательности, замены этих остатков приводят к ухудшению специфичного для ВСАТ связывания α-СООН группы субстрата в малом кармане [101, 109]. Остаток F36 и мотив 107-XGX-109, где X – одна из гидрофобных аминокислот (I, L, V, M), участвуют в формировании гидрофобной поверхности большого субстратного кармана. Мотив 107-XGX-109 расположен в межсубъединичной петле, которая, тем самым, не только формирует большой карман, но и определяет субстратную специфичность трансаминаз IV типа укладки (рис. 4). Гибкость межсубъединичной петли, по-видимому, позволяет бактериальным и архейным ВСАТ связывать разные по форме боковые группы аминосубстратов [97], другими словами, определяет широкую субстратную специфичность этих ферментов. Интересно отметить, что в характеристическом мотиве 2 нескольких архейных ВСАТ обнаружена замена, которая драматически повлияла на субстратную специфичность ферментов, -

	* 20 * 40 * 60 *	80	*	100	*	120	*	
TLVE RCOLT		VETSVERGIEC	TVDSHKGp	VVFRHRFHMOBT,F	UNSARTYRFPU	ZSOSTDEL/MEA	CEDVIERNNI. :	92
ou initiate E	ער אין			T - LIND VOI LAAL V.	TOMMMING	VANJAUASHUJ	TIMINGOVERGE	6
						Contractions -		
L.paracase	:WSANTOMNNTCROINOTEIKIAAHMKOCA-MDECKRERIDEDTIMUECEETTH	XE QGA RHEMB A	TY-SSATAX	- ОТЕКРООИАНАЦА	-AWTTYDESN	-регениктоя	VKQVVAANHE :	211
L.lactis	:	NC QQG BEER P	AYRTKDG-SI	QLFRPDQNAARI (KTARRLCMA-	-EVSTEMFIDA	VKQVVKANKD :	2112
S.tvphimur	::	YGTSVEEGIEC	TADSHKGP	VVFRHREHMOELF	DSAKIYRFPV	/SOSIDELMEA	CRDVIRKNNL :	92
H nulori	HINGSOUS TO TRINGS A TAOUS M - SOUNAAU TA BAUWAI AS A SO TUANU TUA TU EW	COD CERTICAL	APSORG-RA	T.T.FPDT.FNARET.C	-dwillagoput	-RUCEPT.FT.RA	· ACNERWITED	114
STADIG G			VUSSINNE	THIS I AND TAY AT Y.	- ADGUNDIGU	WINDZIINT-	- JULVAVLOUT	C7T
G.oxydans	:MTPFIIEKTETPTDPVKRTELLANPAFGRVFTDHMALISYSADKGWHDAKITPRRPLSIDPASTVLH	YCOLINEONRA YCOLINEONRA	AYREKDG-HV	ATTRPEANASEF	ASARRMGMA-	-ELPEDLFVQA	VDELVRVDQD :	128
M tubarcul	HINT SEED TO THE AVAILABLE TO SEED AND A SECTION AND A SECTION AND A SECTION A SECTION A SECTION A SECTION A SECTION AND A SECTION A	ANOPAGE VECKA	VPWDDC-CT	WCFPADANAART.	CCAPPT.ATD-	PT.DDAVETPC	 ANDET TOB.T 	132
		1 L						
M.Smegmatl	TATATESTATATASALLASALLASALESTTANASIGRIIINASIDIIAADESTATATASALASALASALASALASALASALASALASALAS	XGQE LEEGINA	AXKWADG-ST	VSERFEANAR	-ATHINALP-	SALAVARALES	: VENTRADER :	P 2 P
D.radiodur	 MRLTILGMTAHDSRPEOAKKIADIDWSTLGESYIRTDLRYLAHWKDGE-WDAGTLTEDNOIHLAEGSTALHM 	VEOCODERERA	AYRCADG-SI	NLFRPDONABEM	MSCRRILMP-	-FLSDFOFIDA	CLOVVRANEH :	131
			in ourman	The survey of To	an 1 too such	CTT NOMONO	THE REAL PROPERTY OF A	
s.mutans			ALKINDG-SV	ALEANNING ALEAN	-AUTTYDUTYD	WALLAND-	- JANANYA VANA	OTT
TUZN1299	:MKVWLDGRLVDEEEAKVTVLSPSLNX	XGFGVIDECIER	AYWNGENL	YVFRLRDHMEELL	RSAKIIGLDV	/PYTAEELSKA	VVETVRAN :	84
2 C 0 mHMVV	TERMITOTMENDED TROUMANY AN TROUTED AND INTERNET.	VET OF DECTOR	VISNIC DNIMIT.	VUEDADDVVDEEL	TNCARTMCTR	ACVEVIDET.TDA	· WONGULTAW	100
	A PROVIDE TATION AND A PROVIDE TATION AND A PROVIDED AND A			1 TAA THOUGHTA TA			· ADVISATION A	
M.aeolicus	:MKIXINGEFVEREQAKISVYDHGLL	NG DGVINDG INV	DGX/	-VIFKLKEHIDEL1	IDMOISTESU	IQTSKDEISKI	VIDTIRINEL :	82
source t			24 24	VIEW VENTUELS	To TOTIONOR	CONTRACTOR INC.	TIMNOG THE TT	0
G. ACELIVOL				-NVFNDIEHILUN	TUTITARATITAT	LELONGERACA	TNNNNTTETT	0
	п	со 0						
		0000	4	0.00		0.0		
	40 × 160 × 200 ×	220	×	240	K	200	ĸ	
TIVE ECOLT	:rsavrabritrvGDVG260NDPAGYSTDVITAFPWGAVIGARALFOGIDAMVSSWNRAADNTIPTAARA	AGGN T SST T	VGSFARRHGY	VOFGTALDVNG	VTSBGAGENT.	FEVEDGN	: SSTRUCTSS:	216
					-			
eruginoe	OMWATWOINAHHAIJAAAIJAAGIJAAGIJAAGIGAGAANAWATIAHAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	TWONT HONO	AUVEALSOCA	NLEAMMULFLG	TANGGGGENTI	VSULAT 2	I TEFEVIENC :	017
L.paracase	YVPPYGTGATIZTATIZTIGVGPN GVAPAKEYIFDVFAMPVGPYFKGGMVPTKFIVADQFDRAAHYGTGQSKV	VGGNEAASLO	AGKFAHEHGY	YGDAIYLDPIEHK	Y I E UGSANF!	FGISKDGF	KTLKTPKSPS :	243
T. lactic	 A suppression of the second sec	VICCN A A ST.O.	NDS KASUAK	THURSDALIVIALAN	TENCANE	NRettDa	· SOSTULAT	242
s.cypnimur	:SATEPLVEVGUVGDVGDVNPPPGTTPUTLAFEVGATLGAEALDQGLDAMVSSWNRAAPVELPTXXXX	CXXXXXXXXXXXXXX	SGREES			FLLAGG		ZRT
H.pvlori	WIADYKSGASTATEDFVIGVGDN GWEDANFYLFIVFCADVGAYFKGGTFKGGARF-ITTTFDBADFKGTGVEV	VCGN AAST.	AHKMATEOGY	VDDCTYT,DPATHT,	TEDUCANE	FGTTHDI	: STAPTTARC	245
B.Drevis	* WIFT-ESGQS-MIRFEVLATEFOC GVKASHTIKUVIVLSPVGAIIAGGMEFVKLIVENNIVKAVKGGTGNARV	VAGNOAGGLA	AQVEAKEKG	XEQVLWLUGVENK	TRUMESON BETT	FSYANA'	CVWTPALNGS :	502
G.oxvdans	 WUDS-GEGOSTATEDEMISNEVE 60 KPATEVIETVIACPUGAVESSGCUSVWUSEHYTEAAIGGTGERARC 	T LUBUR NUULI	AOAFAKDKGC	CDOVT, FT. DARFER	FURBMGGMNV7	MFVRKDGR	TVTPPIGGT :	256
M. CUDBICUL	ANNOTODADWANISTRANNAAAWTODWANWAAAWTUUNIČIKANNOTOASTRATAANITTAAN		PUARARNUL	CUQVWILLAVERS	TREMCCUNT	THODOCOT A T	TUVTELEDSGS :	0.07
M.smedmati	: WVPPAGGEESIMMEDEVIATEPG	FGGNEARSLL	AOAOAAEMGC	CDOVVWLDAIERR	VVEBMGGMNL	FEVEGSGGSAF	SIVTPELSGS :	270
						Decent se	- Dabbaanaa	
D. FAGIOGUE	ANNY DEPENDENT OF A CONTRACT TO A CONTRACT AND A CO	VICEN PASTLE	FULLANARUL	THINGTIING	TTTTTTWWWW		: SASALARY	107
S.mutans	: YVPPYGTGATI MAR PLLIGVGDVIGVHPADEYIFTIFAMPVGNYFKGGLAPTNFLIODDYDRAAPHGTGAA R V	VGGNMAASLL	PGKVAHERQI	FSDVIYLDPATHT.	KIEBVGSANFI	FGITKDN	NEFITPLSPS :	246
00010210		WINT NT NUT NUT		Co en ini cada	TREDUCING	- Junita	· Sourcements	200
SSTN70.L		WTONT TOTA	ABVERKARG.	JUEA IMUNAEG	V VPGSGENTI	יד עאמיםי	: 903TAAJWT/	200
VMUT0738	:BEDV MAR PITEVSASTAN B DIRNLDVTTAIITV-PFGHYLEPKGIKAKVVSWLRVHNSMEPMKA K V	VSGINVNSVI	AIIDAKVSGI	FDEAILLNRDG	YVABGSGENI	FIRDGI	: SUYVETYLS :	222
M seel i and	ישווגמון וממדיישדעדי מסיידמואמס בייסבשמעמיישמים די בחיווי משדו דביאנאא	TTOW TO MID	CONTRACT 14	De De Lasade	TRUDUDUST	a Divation	· DESUGARATA	100
T. ABULLUAS		TTONT NTO	NUTNERTUR		TNICTOTOTAT	J DAVITA J	·	107
G.acerivor	:RDANARPIVTRGAGDUGADPRKCPSPNVIIITKPWGKLY-GDLYEKGLKAITVAIRRNAIDSLPPNIES	SLN-ELNNIL	AKIEANAKGC	GDEAIFLDHNG	Y I Segson I	FIVKNGT	LITTPPTLNN :	207
	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	1 00			I			
	1 2 1	9						
	* 080 * 000 * 070 *	360	*	380	*			
		000		000				
ILVE ECOLI	: ALPGHIRDAIIKLAKE-LGIEVREQVLSRESLYLADEVFMSGHEAEITPVRSVDGIQVGEGR-CGPV	VTKRIQOAFFO	JLFTGETEDK	WGWLDQVNQ		: 309		
Calizinate E	Wande of shirts of a standard standar	THAN KAO LABORA	D COUNTRY OF TH	AUTHORICAL AV		-0c ·		
ourbnjap_4		LIEVICIATI'	HWELVOONTO	AMEND'L'LVN		100 :		
L. Daracase	. TLPS KYSTLALAHDRFGMTTPETKIAITDIDDFGEAGACG AVITPIASITYEDHEHVEYSETKVGPY	VTORLYDELTC	TOFGDVPAP	PEGWUVNUPFN		: 343		
L.Lactis	: ILPS KYSLLYLAEHRLGLKAIEGEVYAKDLGKFVEAGACG AIISPIGRIDDGEDSYIFHSETEVGPT	TVKRLYDELVO	SIQFGDVEAP	SEGWIVKVD		: 340		
S.tvphimur								
				CINCLE STORES				
IJOTAG.H	TIPPS INVERTINAL TRANSPORTED TO THE TRANSPORT OF THE TRAN	TTRKETTOTT	ARADADADIS	SKUWLEVG		: 340		
B.brevis	IIEG WRDSTIOLLKD-WGIPVVERRISMEDLHTAYVNGELEEAFGTGWAAVISPVGDLNWNGHOMIINGER-TGEL	LTTRLYDVMTG	SIQYGEREDK	FGWSVKVTE		: 357		
G. Oxvdans	 TIRC RNSTITUTAAD-OGTEVVEEPVDIDELESGAASGKVEEAEACG AANT.SDIGKEVEPTGFAVEGGKEDGEV 	VSOOLKKALT	NUCGGRUNN	"HGWTHRIS		: 359		
[upacity]	יויפשר – איז און איז	THUR LYND	mu vamodor.	D TO KING ON		090 .		
	·	ATT TO ATT ATT A		DEVICEMON				
M.smegmatı	: LLPG RDSLLQLATD-AGFAVEERKIDVDEWQKKAGAGEITEVFACG AAVITPVSHVKHHDGEFTLADGQ-PGEI	LIMALRULLIC	STORGTEADT	CHGWMARLN		: 3/2		
D.radiodur	: ILPS MUXYSLLWLAEHRLGLEVEEGDIRIDELGKFSEAGACG MUAVITPIGGIOHGDDFHVFYSESEPGPV	VTRRLYDELVC	SIQYGDKEAP	DEGWIVKV		: 358		
S mitane	· II DS WIT S VILLA I S	WTHRT.VDFT.PC	TOFCDVKAD			345		
		ATTENDED AND A	2011 0 0 1 1 1 0	DO ANT THOSE				
TUZN1299	: ILEGUMEETVISIAGD-LGIPLLEKSITREELYAADEAFFVGUMAEITPIIEIDGRVLQRGPI	ITQKIAETYRF	RIVLGREEKY	LPWLTPVY		: 295		
95 C 0 m11W/1	· • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	TAT PUD OVVNT	VNOVOUNDAVA	ALGE LENA.		114		
DO LO TORIA		THE FOUNDED						
M.aeolicus	: VIKG "RDAVVDLAKE-QGYEITEEKLTTHDLYVADELFITG "AELAHVVEIDGRVINNRE-MGVI'	ITKKLSEFKF	XIRKIMGTKV	Ā/		: 286		
G.acerivor	: -LKG ROVVIELINE-LEIPFREANIGLFDLYSADEIFVTG REIAPVTYIDGRTVGNGK-PGKV	VTKMLMEKERE	ERTENEGVEL			: 292		
	2222							
Due 7 (6) Dri		TOTIO TO	TONT TITOT	UTPORTUD	TTO OCT	HOV INTO	TORIGOTATO	TTOOLL
LAC. / 101. Bbi	равнивание охарактеризованных БСАТ. Черными квадратами	11 Bb / C	CHP KO	HCCDB31 MB	HPIC OCT	атки хар	DAKTEDNCT	N46CKN.
	publications ovarbant spinobation and the spinobation of the spinobati			au madaau		dmy mum	Tour oburn	
			U 10			0		
MOTHBOB. CED	ыми квалратами вылелены остатки, залеиствованные в свя	язывани	N P L P	CUMBOILAN	$\mathbf{N} \ll \mathbf{S} \gg \mathbf{N}$	4 «S» Bb	плелены	CTATKV
тионицииноф	ае большой и малый карманы соответственно							
Works were a second	N CONDITION IN MANDIN NUMBER, 200 120 100 100 100 100 100 100 100 100							



<i>Е.Ю.</i> Deзсуонова и соавт	Ĕ.1	Ю.Ь	езсудн	юва и	соавт
--------------------------------	-----	-----	--------	-------	-------

это замена в консервативной триаде 107-XGX-109 глицина на серин у TUZN1299 и на аспарагин у VMUT0738. Моделированием было показано, что именно эта замена определила отсутствие продуктивного связывания α-кетоглутарата обеими BCAT [80, 81]. Замены консервативного для бактериальных ферментов G108 на аспарагин или серин обнаружены и в других последовательностях потенциальных BCAT из архей родов *Vulcanisaeta, Pyrobaculum* and *Thermoproteus* [81].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении стоит отметить, что настройку субстратной специфичности у ВСАТ принято считать наиболее тонкой (сложной) среди PLP-ферментов IV типа трехмерной укладки. Перечисленные функциональные группы и организация активного центра однозначно фиксируют субстрат относительно кофактора и каталитического лизина, определяя тем самым специфичность именно отщепления протона от α-атома углерода ВСАА. ВСАТ по совокупности структурно-функциональных свойств уникальны среди трансаминаз разных типов и семейств. Однако пока еще не ясно, почему именно за трансаминазами IV типа укладки закрепилось трансаминирование ВСАА. Как видно на примере трансаминазы из *Thermococcus sp.* СКU-1, ароматические аминотрансферазы I класса I типа укладки могут эффективно превращать ВСАА, однако эта форма ВСАТ, по-видимому, не получила широкого распространения.

Авторы выражают благодарность Е.М. Осипову за помощь в создании рисунков.

ЛИТЕРАТУРА

- 1. Vallee, B.L., Falchuk, K.H. (1993) The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.*, **73**, 79–118.
- Chubukov, V., Gerosa, L., Kochanowski, K., Sauer, U. (2014) Coordination of microbial metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.*, **12**, 327–340.
- Schiroli, D., Peracchi, A. (2015) A subfamily of PLP-dependent enzymes specialized in handling terminal amines. *Biochim. Biophys. Acta*, 1854, 1200–1211.
- 4. Percudani, R., Peracchi, A. (2009) The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics*, **10:273**, 1–8.
- Percudani, R., Peracchi. A. (2003) A genomic overview of pyridoxalphosphate-dependent enzymes. *EMBO Rep.*, 4, 850–854.
- 6. Grishin, N.V., Phillips, M.A., Goldsmith, E.J. (1995) Modeling of the

spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. *Protein Sci.*, **4**, 1291–1304.

- Schneider, G., Käck, H., Lindqvist, Y. (2000) The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. *Structure*, 8, 1–6.
- Rudat, J., Brucher, B.R., Syldatk, C. (2012) Transaminases for the synthesis of enantiopure beta-amino acids. *AMB Express.*, 2:11, 1–10.
- Eliot, A.C., Kirsch, J.F. (2004) Pyridoxal phosphate enzymes: Mechanistic, structural, and evolutionary considerations. *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 383–415.
- Toney, M.D. (2011) Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1814, 1407–1418.
- John, R.A. (1995) Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1248**, 81–96.
- Hayashi, H. (1995) Pyridoxal enzymes mechanistic diversity and uniformity. J. Biochem., 118, 463–473.
- Jansonius, J.N. (1998) Structure evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 8, 759–769.
- Braunstein, A.E., Kritzmann, M.G. (1937) Formation and breakdown of amino-acids by inter-molecular transfer of amino group. *Nature*, 140, 503–504.
- Cooper, A.J., Meister, A. (1989) An appreciation of Professor Alexander E. Braunstein. The discovery and scope of enzymatic transamination. *Biochimie*, 71, 387–404.
- Steffen-Munsberg, F., Vickers, C., Kohls, H., Land, H., Mallin, H., Nobili, A., Skalden, L., van den Bergh, T., Joosten, H.-J., Berglund, P., Höhne, M., Bornscheuer U.T. (2015) Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. *Biotechol. Adv.*, 33, 566–604.
- Fuchs, M., Farnberger, J.E., Kroutil, W. (2015) The industrial age of biocatalytic transamination. *Eur. J. Org. Chem.*, **32**, 6965–6982.

- Hutson, S. (2001) Structure and function of branched-chain aminotransferases. *Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* 70, 175–206.
- Deng, Y., Liu, J., Zheng, Q., Li, Q., Kallenbach, N. R., Lu, M. (2008) A heterospecific leucine zipper tetramer. *Chem. Biol.*, **15**, 908–919.
- Duan, Y., Li, F., Li, Y., Tang, Y., Kong, X., Feng, Z., Anthony, T.G., Watford, M., Hou, Y., Wu, G., Yin, Y. (2016) The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino Acids*, 48,41–51.
- Danson, M.J., Lamble, H.J., Hough, D.W. (2007) Archaea: Molecular and Cellular Biology. Washington DC: ASM Press, 260–287.
- Amorim Franco, T.M., Hegde, S., Blanchard, J.S. (2016) Chemical Mechanism of the Branched-Chain Aminotransferase IlvE from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 55, 6295–6303.
- 23. Žhang, S., Zeng, X., Ren, M., Mao, X., Qiao, S. (2017) Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. J. Anim. Sci. Biotechnol., 8, 10.
- Murima, P., McKinney, J.D., Pethe, K. (2014) Targeting bacterial central metabolism for drug development. *Chem. Biol.*, **21**, 1423–1432.
- Amadasi, A., Bertoldi, M., Contestabile, R., Bettati, S., Cellini, B., di Salvo, M.L., Borri-Voltattorni, C., Bossa, F., Mozzarelli, A. (2007) Pyridoxal 5'-phosphate enzymes as targets for therapeutic agents. *Curr. Med. Chem.*, 14, 1291–1324.
- Finn, R.D., Coggill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R., Mistry, J., Mitchell, A.L., Potter, S.C., Punta, M., Qureshi, M., Sangrador-Vegas, A., Salazar, G.A., Tate, J., Bateman, A. (2016) The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucl. Ac. Res.*, 44, D279–D285.
- Zaitseva, J., Lu, J., Olechoski, K. L., Lamb, A. L. (2006) Two crystal structures of the isochorismate pyruvate lyase from *Pseudomonas*

aeruginosa. J. Biol. Chem., **281**, 33441–33449.

- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414, 562–565.
- fence. *Nature*, 414, 562–565.
 29. Hwang, B.-Y., Cho, B.-K., Yun, H., Koteshwar, K., Kim, B.-G. (2005) Revisit of aminotransferase in the genomic era and its application to biocatalysis. *J. Mol. Catal. B: Enz.*, 37, 47–55.
- Koszelewski, D., Lavandera, I., Clay, D., Rozzell, D., Kroutil, W. (2008) Asymmetric synthesis of optically pure pharmalogically amines employing ω-transaminases. *Adv. Synth. Catal.*, **350**, 2761–2766.
- Littlechild, J.A. (2015) Enzymes from extreme environments and their industrial applications. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **161**, 1-9.
 Goldberg, J.M., Kirsch, J.F. (1996)
- 32. Goldberg, J.M., Kirsch, J.F. (1996) The reaction catalyzed by *Escherichia coli* aspartate aminotransferase has multiple partially rate-determining steps, while that catalyzed by the Y225F mutant is dominated by ketimine hydrolysis. *Biochemistry*, **35**, 5280–5291.
- 33. Kirsch, J.F., Eichele, G., Ford, G.C., Vincent, M.G., Jansonius, J.N., Gehring, H., Christen, P. (1984). Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. J. Mol. Biol., 174, 497–525.
- 34. Toney, M.D., Kirsch, J.F. (1989) Direct Brensted analysis of the restoration of activity to a mutant enzyme by exogenous amines. *Science*, 243, 1485–1488.
- 35. Toney, M.D., Kirsch, J.F. (1992) Brønsted analysis of aspartate aminotransferase via exogenous catalysis of reactions of an inactive mutant. *Protein Sci.* **1**, 107–119.
- 36. Liao, R.Z., Ding, W.J., Yu JG, Fang WH, Liu, R.Z. (2008) Theoretical studies on pyridoxal 5'-phosphatedependent transamination of alpha-

amino acids. J. Comput. Chem., 29, 1919–1929.

- 37. Toney, M.D., Kirsch, J.F. (1991) The K258R mutant of aspartate aminotransferase stabilizes the quinonoid intermediate. *J. Biol. Chem.*, 266, 23900–23903.
- Karsten, W.E., Cook, P.F. (2009) Detection of a gem-diamine and a stable quinonoid intermediate in the reaction catalyzed by serine-glyoxylate aminotransferase from *Hyphomicrobium methylovorum. Biochim. Biophys. Acta.*, **1790**, 575–580.
 Gehring, H. (1984) Transfer of C
- Gehring, H. (1984) Transfer of C alpha-hydrogen of glutamate to coenzyme of aspartate aminotransferase during transamination reaction. *Biochemistry*, 23, 6335–6340.
- 40. Rishavy, M.A., Cleland W.W. (2000) ¹³C and ¹⁵N kinetic isotope effects on the reaction of aspartate aminotransferase and the Tyrosine-225 to Phenylalanine Mutant. *Biochemistry*, **39**, 7546–7551.
- 41. Spies, M.A., Toney, M.D. (2003) Multiple hydrogen kinetic isotope effects for enzymes catalyzing exchange with solvent: application to alanine racemase. *Biochemistry*, **42**, 5099–5107.
- Saito, M., Nishimura, K., Wakabayashi, S., Kurihara, T., Nagata, Y. (2007) Purification of branched-chain amino acid aminotransferase from *Helicobacter pylori* NCTC 11637. *Amino Acids*, 33, 445–449.
 Koide, Y., Honma, M., Shimomura,
- Koide, Y., Honma, M., Shimomura, T. (1977) Branched chain amino acid aminotransferase of *Pseudomonas sp. Agricul. Biol. Chem.*, 41, 1171–1177.
- 44. Goto, M., Miyahara, I., Hayashi, H., Kagamiyama, H., Hirotsu, K. (2003) Crystal structures of branched-chain amino acid aminotransferase complexed with glutamate and glutarate: true reaction intermediate and double substrate recognition of the enzyme. *Biochemistry*, **42**, 3725–3733.
- 45. Soda. K., Yoshimura, T., Esaki, N. (2001) Stereospecificity for the hyd-

rogen transfer of pyridoxal enzyme reactions. *Chem. Rec.*, **1**, 373–384.

- 46. Dunathan, H.C. (1966) Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 712–716.
- 47. Ruan, J., Hu, J., Yin, A., Wu, W., Cong, X., Feng, X., Li, S. (2012) Structure of the branched-chain aminotransferase from *Streptococcus mutans*. *Acta Crystallogr: Sect. D*, 68, 996–1002.
- Rudman, D., Meister, A. (1953) Transamination in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 200, 591–604.
- Feldman, L.I., Gunsalus, I.C. (1950) The occurrence of a wide variety of transaminases in bacteria. J. Biol. Chem., 187, 821–830.
- Gelfand, D.H., Steinberg, R.A. (1977) *Escherichia coli* mutants deficient in the aspartate and aromatic amino acid aminotransferases. *J. Bacteriol.*, 130, 429–440.
- Jensen, R.A., Calhoun, D.H. (1981) Intracellular roles of microbial aminotransferases: overlap enzymes across different biochemical pathways. *Crit. Rev. Microbiol.*, 8, 229–266.
- 52. Wang, M.D., Liu, L., Wang, B.M., Berg, C.M. (1987) Cloning and characterization of *Escherichia coli* K-12 alanine-valine transaminase (avtA) gene. *J.Bacteriol.*, **169**, 4228–4234.
- 53. Kline, E.L., Brown, C.S., Coleman, W.G., Jr, Umbarger, H.E. (1974) Regulation of isoleucine-valine biosynthesis in an ilvDAC deletion strain of *Escherichia coli* K-12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57, 1144–1151.
- Kline, E.L., Manross, D.N., Jr, Warwick, M.L. (1977) Multivalent regulation of isoleucine-valine transaminase in an *Escherichia coli* K-12 *ilv*A deletion strain. *J. Bacteriol.*, 130, 951–953.
- 55. Methods in Enzymology. Branchedchain amino acids (Part B) N324. Edited by RA Harris and JR Sokatch. Academic press. 2000 London UK. 535 p.

- Se, Rej, R. (1982) A convenient continuous-rate spectrophotometric method for determination of amino acid substrate specificity of aminotransferases: application to isoenzymes of aspartate aminotransferase. *Anal. Biochem.*, **119**, 205–210.
 Duggan, D.E., Wechsler, J.A. (1973)
- Duggan, D.E., Wechsler, J.A. (1973) An assay for transaminase B enzyme activity in *Escherichia coli* K-12. *Anal. Biochem.*, 51, 67–79.
- Taylor, R. T., Jenkins, W. T. (1966): Leucine aminotransferase I. Colorimetric assays. J. Biol Chem., 241, 4391–4395.
- 59. Lee-Peng, F.-C., Hermodson, M.A., Kohlhaw, G.B. (1979) Transaminase B from *Escherichia coli*: quaternary structure, amino-terminal sequence, substrate specificity, and absence of a separate valine-α-ketoglutarate activity. J. Bacteriol., **139**, 339–345.
- 60. Inoue K., Kuramitsu S, Aki K, Watanabe Y, Takagi T, Nishigai M, Ikai A, Kagamiyama H. (1988) Branchedchain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: overproduction and properties. J. Biochem. 104, 777–784.
- Toney, M.D. (2014) Aspartate aminotransferase: an old dog teaches new tricks. Arch. Biochem. Biophys., 544, 119–127.
- 62. Yu, X., Wang, X., Engel, P.C. (2014) The specificity and kinetic mechanism of branched-chain amino acid aminotransferase from *Escherichia coli* studied with a new improved coupled assay procedure and the enzyme's potential for biocatalysis. *FEBS J*, 281, 391–400.
- Norton, J.E., Sokatch, J.R. (1970) Purification and partial characterization of the branched chain amino acid transaminase of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **206**, 261–269.
- 64. Tachiki, T., Tochikura, T. (1973) Separation of L-leucine-pyruvate and L-leucine-alpha-ketoglutarate transaminases in *Acetobacter sub*oxydans and identification of their

reaction products. *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 1439–1448.

- 65. Tachiki, T., Tochikura, T. (1976) Purification and characterization of L-leucine-alpha-ketoglutarate transaminase from *Acetobacter suboxydans. Agric. Biol. Chem.* **40**, 2187–2192.
- 66. Yvon, M., Chambellon, E., Bolotin, A., Roudot-Algaron, F. (2000) Characterization and role of the branched-chain aminotransferase (BcaT) isolated from *Lactococcus lactis* subsp. cremoris NCDO 763. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 571–577.
- 67. Thage, B.V., Rattray, F.P., Laustsen, M.W., Ardo, Y., Barkholt, V., Hourberg, U. (2004) Purification and characterization of a branched-chain amino acid aminotransferase from *Lactobacillus paracasei* subsp. Paracasei CHCC 2115. J. Appl. Microbiol., **96**, 593–602.
- Kanda, M., Hori, K., Kurotsu, T., Ohgishi, K., Hanawa, T., Saito, Y. (1995) Purification and properties of branched chain amino acid aminotransferase from gramicidin S-producing *Bacillus brevis. J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 41, 51–60.
 Venos, E.S., Knodel, M.H., Radford,
- 69. Venos, E.S., Knodel, M.H., Radford, C.L., Berger, B.J. (2004) Branchedchain amino acid aminotransferase and methionine formation in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Microbiol.*, **4:39**, 1–14.
- Madsen, S.M., Beck, H.C., Rawn, P., Vrang, A., Hansen, A.M., Israelsen, H (2002) Cloning and inactivation of a branched-chain-aminoacid aminotransferase gene from *Staphylococcus carnosus* and characterization of the enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 4007–4014.
- Berger, B.J., English, S., Chan, G., Cnodel, M.H. (2003) Methionine regeneration and aminotransferases in *Bacillus subtilis, Bacillus cereus,* and *Bacillus anthracis. J. Bacteriol.*, 185, 2418–2431.
- 72. Wong, H. C., Lessie, T.G. (1979) Branched chain amino acid amino-

transferase isoenzymes of *Pseudomonas cepacia*. Arch. Microbiol., **120**, 223–229.

- Massey, L.K., Conrad, R.S., Sokatch, J.R. (1974) Regulation of leucine catabolism in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.*, **118**, 112–120.
 Chen, C.D., Lin, C.H., Chuankhayan,
- 74. Chen, C.D., Lin, C.H., Chuankhayan, P., Huang, Y.C., Hsieh, Y.C., Huang, T.F., Guan, H.H., Liu, M.Y., Chang, W.C., Chen, C.J. (2012) 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., 194, 6206–6216.
- Lipscomb E.L., Horton H.R., Armstrong F.B. (1974) Molecular weight, subunit structure, and amino acid composition of the branched chain amino acid aminotransferase of Salmonella typhimurium. Biochemistry, 13, 2070–2077.
- Feild, M.J., Nguyen, D.C., Armstrong, F.B. (1989) Amino acid sequence of *Salmonella typhimurium* branchedchain amino acid aminotransferase. *Biochemistry*, 28, 5306–5310.
- 77. Xing, R.Y., Whitman, W.B. (1991) Characterization of enzymes of the branched-chain amino acid biosynthetic pathway in *Methanococcus spp. J. Bacteriol.*, **173**, 2086–2092.
- Xing, R.Y., Whitman, W.B. (1992) Characterization of amino acid aminotransferases of *Methanococcus* aeolicus. J. Bacteriol., **174**, 541–548.
- Boyko, K.M., Stekhanova, T.N., Nikolaeva, A.Y., Mardanov, A.V., Rakitin, A.L., Ravin, N.V., Bezsudnova, E.Yu., Popov, V.O. (2016) First structure of archaeal branched-chain amino acid aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* specific for L-amino acids and R-amines. *Extremophiles*, 20, 215–225.
- Bezsudnova, E.Yu., Stekhanova, T.N., Suplatov, D.A., Mardanov, A.V., Ravin, N.V., Popov V.O. (2016) Experimental and computational stu-

dies on the unusual substrate specificity of branched-chain amino acid aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis*. Arch. Biochem. Biophys. **607**, 27–36.

- Stekhanova, T.N., Rakitin, A.L., Mardanov, A.V., Bezsudnova, E.Yu., Popov, V.O. (2017) A Novel highly thermostable branched-chain amino acid aminotransferase from the crenarchaeon *Vulcanisaeta moutnovskia. Enzyme Microb. Technol.*, 96, 127–134.
- 82. Uchida, Y., Hayashi, H., Washio, T., Yamasaki, R., Kato, S., Oikawa, T. (2014) Cloning and characterization of a novel fold-type I branchedchain amino acid aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sp.* CKU-1. *Extremophiles*, 18, 589–602.
- Hayashi, H., Inoue, K., Nagata, T., Kuramitsu, S., Kagamiyama, H. (1993) *Escherichia coli* aromatic amino acid aminotransferase: characterization and comparison with aspartate aminotransferase. *Biochemistry*, 32, 12229–12239.
- Oue, S., Okamoto, A., Nakai, Y., Nakahira, M., Shibatani, T., Hayashi, H., Kagamiyama, H. (1997) *Paracoccus denitrificans* aromatic amino acid aminotransferase: a model enzyme for the study of dual substrate recognition mechanism. *J. Biochem.*, **121**, 161–171.
 Conway, M.E., Hutson, S.M. (2000)
- Conway, M.E., Hutson, S.M. (2000) Mammalian branched-chain aminotransferases. *Methods Enzymol.*, 324, 355–365.
- 86. Braunstein, A.E. (1973) *The Enzymes, 3rd ed.*/ Ed. by P. D. Boyer, New York: Academic Press, IX, 379–471.
- Beeler, T., Churchich, J.E. (1976) Reactivity of the phosphopyridoxal groups of cystathionase. J. Biol. Chem., 251, 5267–5271.
- Ward, J., Wohlgemuth, R. (2010) High-yield biocatalytic amination reactions in organic synthesis. *Curr. Org. Chem.*, 14, 1–12.

- 89. Li, T., Kootstra, A.B., Fotheringham, I.G. (2002) Nonproteinogenic α-Amino Acid Preparation Using Equilibrium Shifted Transamination. *Org. Proc. Res. Dev.*, **6**, 533–538.
- 90. Bommarius, A.S., Schwarm, M., Drauz, K. (1998) Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals – examples and perspectives. *J. Mol. Catal. B:Enz.*, 5, 1–11.
- 91. Krix, G., Bommarius, A.S., Drauz, K., Kottenhahn, M., Schwarm, M., Kula M.R. (1997) Enzymatic reduction of alpha-keto acids leading to L-amino acids, D- or L-hydroxy acids. J. Biotech., 53, 29–39.
- 92. Xian, M., Alaux, S., Sagot, E., Gefflaut, T. (2007) Chemoenzymatic Synthesis of Glutamic Acid Analogues: Substrate Specificity and Synthetic Applications of Branched Chain Aminotransferase from *Escherichia coli. J.Org.Chem.*, **72**, 7560–7566.
- 93. Faure, S., Jensen, A.A., Maurat, V., Gu, X., Sagot, E., Aitken, D.J., Bolte, J., Gefflaut, T., Bunch, L. (2006) Stereoselective Chemoenzymatic Synthesis of the Four Stereoisomers of L-2-(2-Carboxy-cyclobutyl)glycine and Pharmacological Characterization at Human Excitatory Amino Acid Transporter Subtypes 1, 2, and 3. J. Med. Chem., 49, 6532–6538.
- 94. Okada, K., Hirotsu, K., Sato, M., Hayashi, H., Kagamiyama, H. (1997) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase at 2.5 A resolution. J. Biochem., **121**, 637–641.
- 95. Okada, K., Hirotsu, K., Hayashi, H., Kagamiyama, H. (2001) 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*, 40, 7453–7463.
- 96. Castell, A., Mille, C., Unge, T. (2010) Structural analysis of my-

cobacterial branched-chain aminotransferase: implications for inhibitor design. *Acta Crystallogr*. *Sect. D* **66**, 549–557.

- Sect. D 66, 549–557.
 97. Tremblay, L.W., Blanchard, J.S. (2009) The 1.9 A structure of the branched-chain amino-acid transaminase (IlvE) from *Mycobacterium tuberculosis. Acta Crystallogr. Sect. F*, 65, 1071–1077.
- 98. Yennawar, N., Dunbar, J., Conway, M., Hutson, S., Farber, G. (2001) The structure of human mitochondrial branched-chain aminotransferase. *Acta Crystallogr. Sect. D*, 57, 506–515.
- 99. Kochhar, S., Christen, P. (1992) Mechanism of racemization of amino acids by aspartate aminotransferase. *Eur. J. Biochem.*, **203**, 563–569.
- 100. Shaw, J.P., Petsko, G.A., Ringe, D. (1997) Determination of the structure of alanine racemase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.9-A resolution. *Biochemistry*, 36, 1329–1342.
- 101. Hohne, M., Schatzle, S., Jochen, H., Robins, K., Bornscheuer, U.T. (2010) Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 807–813.
- 102. Skalden. L., Thomsen, M., Höhne, M., Bornscheuer, U.T., Hinrichs, W. (2015) Structural and biochemical characterization of the dual substrate recognition of the (R)selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus. FEBS J*, 282, 407–415.
- 103. Peisach, D., Chipman, D.M., Van Ophem, P.W., Manning, J.M., Rin-

ge, D. (1998) Crystallographic study of steps along the reaction pathway of D-amino acid aminotransferase. *Biochemistry*, **37**, 4958–4967.

- 104. Iwasaki, A., Matsumoto, K., Hasegawa, J., Yasohara, Y. (2012) A novel transaminase, (R)-amine:pyruvate aminotransferase, from Arthrobacter sp. KNK168 (FERM BP-5228): purification, characterization, and gene cloning. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 1563–1573.
- Hirotsu, K., Goto, M., Okamoto, A., Miyahara, I. (2005) Dual substrate recognition of aminotransferases. *Chem. Rec.*, 5, 160–172.
- Goto, M., Omi, R., Miyahara, I., Hosono, A., Mizuguchi, H., Hayashi, H., Kagamiyama, H., Hirotsu, K. (2004) Crystal structures of glutamine:phenylpyruvate aminotransferase from *Thermus thermophilus* HB8: induced fit and substrate recognition. *J. Biol. Chem.*, 279, 16518–16525.
- 107. Koshland, D.E. (1995) The key– lock theory and the induced fit theory. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 2375–2378.
- 108. Karsten, W.E., Reyes, Z.L., Bobyk, K.D., Cook, P.F., Chooback, L. (2011) Mechanism of the aromatic aminotransferase encoded by the Aro8 gene from *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Biochem. Biophys. **516**, 67–74.
- 109. Jiang, J., Chen, X., Zhang, D., Wu, Q., Zhu, D. (2015) Characterization of (R)-selective amine transaminases identified by silico motif sequence blast. *Appl. Microbial. Biotechnol.*, **99**, 2613–2621.