На правах рукописи

Безсуднова Екатерина Юрьевна

ВЗАИМОСВЯЗЬ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ФЕРМЕНТОВ ИЗ ТЕРМОФИЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ НА ПРИМЕРЕ ДЕГИДРОГЕНАЗ И ТРАНСАМИНАЗ

1.5.4. Биохимия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

доктора химических наук

Москва - 2022

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

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

Попов Владимир Олегович, доктор химических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», научный руководитель Центра, лаборатория инженерной энзимологии, заведующий лабораторией.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

Габибов Александр Габибович, доктор химических наук, профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, директор ИБХ РАН, лаборатория биокатализа, заведующий лабораторией.

Демидкина Татьяна Викторовна, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория химических основ биокатализа, заведующий лабораторией.

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

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Санкт-Петербургский государственный университет.

Защита состоится «26» мая 2022 г. в 14 ч. на заседании Совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2. С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 1 и на сайте http://fbras.ru/

Автореферат разослан « ... » 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат биологических наук

А. Ф. Орловский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним ИЗ основных направлений развития современного биокатализа является применение ферментов и микроорганизмов в синтетической химии и использование модифицированных природных катализаторов в реакциях, не наблюдаемых в природе. Основа современного биокатализа – ферментативный катализ с уникальными свойствами ферментов многократно ускорять химические реакции в «мягких» условиях и осуществлять превращения, которые в неживой природе не происходят. Ускорение реакций достигается связыванием субстрата в активном центре фермента, геометрия и эффективного свойства которого оптимизированы для взаимодействия функциональных групп. Если 20 лет назад биотехнологическое производство основывалась на микробиологических процессах, то сегодня применение отдельных ферментов в составе биотехнологических схем, каскадных процессов с несколькими последовательными ферментативными реакциями становится обычной производственной практикой. Такой прогресс и переориентация биокатализа на отдельные ферменты и мультиферментные системы стали возможными благодаря доступности аннотированных геномов и метагеномных библиотек, баз данных белковых последовательностей, эффективным методам биоинженерии и молекулярной биологии, разработке методов направленной эволюции И компьютерного дизайна, разработке эффективных лабораторных библиотек высокопроизводительных методов скрининга вариантов ферментов.

Однако у ферментативного катализа существуют серьезные ограничения – специфичность к определенным субстратам и условия реакции: ограничения накладывают температура, концентрация протонов в среде, соленость среды, присутствие органических растворителей, концентрация субстратов и т.д. Кроме того, фермент не смещает равновесие реакции и эффективно катализирует реакцию преимущественно в условиях, которые формируются в клетке или в среде обитания организма.

Из этих ограничений следует, что такие этапы биокатализа как разработка схемы процесса (дизайн реакции), выбор биокатализатора (поиск в базах данных, отбор кандидатов, создание искусственных ферментов), оптимизация биокатализатора субстратной специфичности, (изменение повышение эффективности каталитического превращения и повышение стабильности) невозможны без детального знания природных ферментативных реакций, структурно-функциональных характеристик природных ферментов и понимания взаимосвязи последовательность-структура-функция. Изменение субстратной специфичности фермента-биокатализатора невозможно без понимания структурных основ субстратной специфичности. Повышение операционной

стабильности фермента в неприродных условиях и разработка подходов к стабилизации фермента при высоких температурах, в присутствии органических растворителей, при высоких концентрациях субстратов, в широком диапазоне pH невозможны без понимания структурных факторов адаптации ферментов. И, наконец, изменение субстратной специфичности и повышение эффективности каталитических превращений возможны пока только в лабораторных условиях, как правило, перебором большого количества вариантов фермента, библиотеки которых создаются методом направленной эволюции и рационального дизайна. К примеру, в белке, состоящем из 200 аминокислот, введение двух мутаций в произвольном месте приводит к созданию 7183900 вариантов белка. Один из путей повышения эффективности лабораторного скрининга – это эффективная система отбора, для разработки которой также требуется детальное понимание взаимосвязи структуры и функции на уровне отдельных ферментов.

Накопление знаний в области фундаментальных основ биокатализа происходит медленно, так как это задача трудоемкая, и здесь параллельно сосуществуют два процесса: детальный анализ свойств отдельных ферментов и функционального разнообразия ферментов. изучение Структурноферментов, обнаружение и исследование функциональные исследования ферментов с новой функцией в настоящий момент значительно отстают от областях физико-химической биологии. успехов В других таких как структурная биология. Ha метагеномика ИЛИ сегодня, количество депонированных нуклеотидных последовательностей превышает 1.6 млрд., депонированных структур в Банке белковых структур (RCSB PDB) – 180000, а количество известных ферментов (по базе данных BRENDA) составляет на конец 2021 г. около 8200. Очевидно, что наши знания о биокаталитическом разнообразии, включая функции и механизмы действия ферментов, возможные субстраты и продукты, еще ограниченны. Поэтому поиск новых ферментов и их функциональная характеристика сохраняют свою актуальность как для расширения наших знаний о природе, так и для разработки фундаментальных основ биокатализа и биотехнологических схем под определенную задачу.

Предметом диссертационной работы является исследование взаимосвязи структуры и функции в дегидрогеназах и трансаминазах из архей и термофильных бактерий. Ферменты из экстремофильных организмов – это все еще малоизученный раздел энзимологии: исторически лучше охарактеризованы ферменты из мезофильных микроорганизмов, которые давно культивируют в лабораторных условиях. Ферменты из архей в силу особенностей среды обитания организма-хозяина, отличаются стабильностью в экстремальных условиях. Их структурно-функциональная характеристика востребована для всесторонней оценки стабильности белков, в том числе полиэкстремофильности

 стабильности в разнообразных экстремальных средах. Кроме того, археи, как древние микроорганизмы, являются источником ферментов с неизученной функцией и широкой субстратной специфичностью.

Цель работы и основные задачи исследования. Цель работы – установить *структурные основы субстратной специфичности и стабильности* ферментов из архей и термофильных бактерий. Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

1. Составить структурно-функциональную характеристику супертермостабильной алкогольдегидрогеназы из археи *Thermococcus sibiricus*. Провести поиск структурных факторов, определяющих стабильность фермента.

2. Получить структуры холоформы и комплекса с субстратом альдегиддегидрогеназы из гипертермофильной археи *Pyrobaculum ferrireducens* (*Pyrobaculum sp.1860*). Провести анализ состояний активного центра и поиск структурных факторов, определяющих стабильность фермента.

3. Составить структурно-функциональные характеристики трансаминаз из архей, специфичных к разветвленным L-аминокислотам, и сравнить их свойства со свойствами гомологичных бактериальных трансаминаз.

4. Определить варианты характеристических мотивов в последовательностях трансаминаз IV-типа укладки PLP-связывающего домена из архей и бактерий. Отобрать трансаминазы с новыми характеристическими мотивами для дальнейшего исследования.

5. Охарактеризовать структуры и свойства трансаминаз IV-типа укладки PLPсвязывающего домена с новыми характеристическими мотивами.

Объекты и методы исследования. Отбор объектов исследования среди аминокислотных последовательностей дегидрогеназ и трансаминаз из геномов архей из коллекции микроорганизмов отдела биологии экстремофильных микроорганизмов ИНМИ им. С.Н. Виноградского (ФИЦ Биотехнологии РАН) проводился по гомологии и по выравниванию последовательностей PLPзависимых трансаминаз IV типа укладки, построенному по результатам филогеномного анализа репрезентативной выборки геномов архей и бактерий, отнесенных к COG0115 и представленных в релизе 2015 г. базы данных кластеров ортологичных групп. Исследованные в работе ферменты были получены гетерологической экспрессией в клетках *Escherichia coli*. Ген, кодирующий алькогольдегидрогеназу из *Т. sibiricus*, был выделен из ДНК чистых культур. Остальные ферменты были получены в результате экспрессии синтетических генов. Клонирование, конструирование плазмид и сайтнаправленный мутагенез проводили стандартными методами генной инженерии. Выделение и очистку целевых ферментов проводили хроматографическими

Для характеристики ферментов применяли электрофорез методами. В полиакриламидном геле и различные виды хроматографии, абсорбционную и флуоресцентную спектроскопии, методы кругового дихроизма, динамического светорассеяния и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), а рентгеноструктурный анализ. Достоверность представленных также В диссертации данных и сделанных выводов обусловлена репрезентативным объемом экспериментального материала, а также использованием адекватного комплекса современных биохимических, структурных, и статистических методов, полностью соответствующих поставленным задачам.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Увеличение доли заряженных остатков в аминокислотной последовательности термостабильных ферментов приводит к увеличению плотности водородных связей в белковой глобуле, расширению сети солевых мостиков на ее поверхности и повышению прочности межсубъединичных контактов.

2. Избыток солевых мостиков на поверхности термостабильных ферментов обеспечивает не только термостабильность, но и может повышать устойчивость к денатурантам, активность в водно-органических средах и в растворах высокой солености.

3. Строение активного центра PLP-зависимых трансаминаз IV типа укладки совпадает у архей, бактерий и эукариот.

4. Широкая субстратная специфичность и дополнительная активность с первичными (*R*)-аминами достигается у трансаминаз разветвленных L-аминокислот в результате точечных замен в активном центре фермента при сохранении единой для PLP-зависимых трансаминаз IV типа укладки организации активного центра.

Научная новизна и практическая значимость работы. Проведено структурно-функциональное исследование новых дегидрогеназ и трансаминаз из архей и термофильных бактерий. Все ферменты перспективны для разработки биокатализаторов для задач синтетической химии по получению оптически чистых соединений.

Охарактеризована структурно и функционально алкогольдегидрогеназа из археи *Thermococcus sibiricus* – уникальный фермент с рекордными параметрами термостабильности и разветвленной сетью солевых мостиков на его поверхности. В результате исследований намечены перспективные подходы к повышению активности алкогольдегидрогеназы при 60 °C в результате воздействия гуанидин гидрохлорида и хлорида натрия. Эффект повышения активности, но уже под воздействием органических растворителей, показан и

для термостабильной трансаминазы из бактерии *Thermobaculum terrenum*. Оба наблюдения позволили сделать обобщающие практические выводы о регуляции активности термостабильных ферментов при субоптимальных температурах.

Получены структуры архейных PLP-зависимых трансаминаз разветвленных L-аминокислот. На основании проведенных исследований сделан обобщающий вывод о сходном устройстве активного центра у трансаминаз разветвленных Lаминокислот у архей, бактерий и эукариот.

Охарактеризованные в работе трансаминазы со смешанным типом активности обнаружены в результате оригинального алгоритма поиска новых трансаминаз по изменениям в характеристических мотивах. У канонических PLP-зависимых IV типа укладки В последовательности трансаминаз выделяют характеристические мотивы, которые составляют активный центр и определяют субстратную специфичность трансаминаз. Поэтому поиск трансаминаз с отличными от известных, новыми характеристическими мотивами открывает возможность обнаружить трансаминазы с новыми свойствами. Такой критерий отбора объекта по отклонению от «типичности» способствовал обнаружению трансаминаз с разнообразными активными центрами. Трансаминазы из термофильных бактерий Thermobaculum terrenum и Haliangium ochraceim активностью с *(R)*-аминами. отличались первичными Впервые было продемонстрировано, что у PLP-зависимых трансаминаз IV типа укладки активность с аминокислотами и первичными (*R*)-аминами не является взаимоисключающей. На основании проведенных исследований трансаминаза ИЗ Τ. terrenum была предложена для разработки биокатализатора стереоселективного синтеза оптически чистых аминов или аминокислот.

Личный вклад соискателя заключается в выборе направления исследования, постановке задач, разработке методических подходов, анализе и обобщении экспериментальных данных, полученных как непосредственно автором, так и в соавторстве, в т.ч. при выполнении под его руководством работ по проектам РФФИ. Bce ключевые экспериментальные данные получены при непосредственном участии автора. Автор благодарит К.М. Бойко за проведение рентгеноструктурных экспериментов и получение структур ферментов. проанализированных В диссертационной работе. Автор благодарит Т.Н. Стеханову, А.Ю. Николаеву, Ю.С. Зейфман и Д.А. Суплатова за помощь в проведении экспериментов И анализе результатов, А.В. Марданова, Т.В. Ракитину за создание векторных конструкций и экспрессионных штаммов. Диссертационная работа выполнена в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха (ФИЦ Биотехнологии РАН), часть экспериментов была проведена Научно-исследовательском центре В «Курчатовский институт». Сбор дифракционных данных с кристаллов

ферментов проводили в центрах синхротронного излучения в НИЦ «Курчатовский институт», EMBL (Гамбург, Германия), ESRF (Гренобль, Франция), SPring-8 (Харима, Япония).

Публикация и апробация работы

Основные результаты диссертации изложены в 22 оригинальных статьях в международных рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК. Результаты исследования были представлены в виде стендовых и устных докладов на международных конгрессах: The 45th FEBS congress в 2021 г. (Любляна), Extremophiles-2014 (Санкт-Петербург), Extremophiles-2016 (Киото), Extremophiles-2018 (Искья), Европейский биотехнологический конгресс (Стамбул) в 2011 г., на международных конференциях Protein Stabilization (Милан) в 2014 г., 13th international meeting Thermophiles (Сантьяго) в 2015 г., Novel Enzymes (Дармштадт) в 2018 г., "Biocatalysis-2013: Fundamentals and applications" (Москва), "Biocatalysis-2015: Fundamentals and applications" (Истра), "Biocatalysis-2019: Fundamentals and applications" (Санкт-Петербург), The 13th International Conference on Salt Lake Research (Улан-Удэ) в 2017 г., а также на V Съезде биохимиков России в Дагомысе в 2016 г., на Первом Российском кристаллографическом конгрессе в Москве в 2016 г. и научных конференциях ФИЦ «Биотехнологии» РАН (Москва) в 2016, 2018, 2019 и 2021 гг.

В ходе работы получены и проанализированы 16 пространственных структур, координаты атомов депонированы в Банк данных белковых структур (PDB коды 3TN7, 5EEB, 5F2C, 5EUY, 5EXF, 5EK6, 5CE8, 6THQ, 5CM0, 5E25, 6ERK, 6H65, 6Q8E, 6GKR, 7NEA, 7NEB).

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, трех основных глав («Обзор литературы», «Материалы и методы исследования» и «Результаты и обсуждение»), заключения, выводов, приложений и списка литературы, изложена на 303 страницах и содержит 69 рисунков, 47 таблиц и 431 источник литературы.

Сокращения, принятые в тексте

ASA – доступная растворителю площадь поверхности молекулы фермента, ВСАА – разветвленные L-аминокислоты, ВСАТ – трансаминаза разветвленных L-аминокислот, DAAT – трансаминаза D-аминокислот, MW – молекулярная масса, SDR – короткоцепочечная дегидрогеназа, R-TA – (*R*)-амин: пируват трансаминаза, WT – фермент с неизменённой природной аминокислотной последовательностью.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

1. Короткоцепочечная NADP-зависимая алкогольдегидрогеназа из гипертермофильной археи *Thermococcus sibiricus*

Таблица 1. Субстратная специфичность TsAdh319. Относительная активность TsAdh319 в реакции окисления (50 мМ Gly-NaOH, pH 10,5) / восстановления (100 мМ Na-фосфатный буфер, pH 7,5) при 60 °C. Концентрации субстратов 250 мМ, (*) - 50 мМ, (**) – 1 мМ. 100% в реакции окисления соответствует $1,0 \pm 0,08$ U/мг и в реакции восстановления $2,2 \pm 0,2$ U/мг.

Реакция окисления RC(R')-OH + NADP ⁺		Реакция восстановления R-C(R')=O + NADPH		
Субстраты	Относительная активность (%)	Субстраты	Относительная активность (%)	
2-пропанол	100	пирувальдегид	100	
1-пропанол	34	2-оксо-2-фенилацет альдегид**	333	
1-бутанол	80	2,3-гександион*	287	
<i>(S)-(+)-2-</i> бутанол	196	2,3- бутандион	270	
<i>rac</i> -2-бутанол	86	2,3-пентандион*	100	
1-пентанол	65	глиоксиловая кислота	36	
2-пентанол	67	гексанальдегид*	21	
метанол	0	фенилацетальдегид	14	
1-фенилметанол	180	3-метил-2-пентанон*	13	
этанол	36	глицеральдегид*	8	
D-арабиноза*	200	пируват*	7	
L-арабиноза*	17	ацетонилацетон*	5	
D-ксилоза*	80	циклогексанон	4	
2(S),5(S)-гександиол	600	пропиональдегид*	0	
<i>rac</i> -2,5-гександиол	390	2,4-пентандион	0	
1,6 -гександиол	80	ацетон	0	
1,3-бутандиол	91	циклопентанон	0	
2-метил-2,4-пентандиол	24	2-пентанон*	0	

Среди ADH выделяется семейство короткоцепочечных дегидрогеназ (SDR), субъединицы которых имеют однодоменную структуру, включающую укладку

Россманна для связывания NAD(P), активный центр образован триадой аминокислотных остатков Tyr-Lys-Ser, и в дополнение к ним консервативным остатком Asn, контролирующим систему сброса протона в раствор. Алкогольдегидрогеназа из археи *T. sibiricus* (TsAdh319) относится к семейству SDR, характеризуется широкой субстратной специфичностью как в реакциях окисления, так и в реакциях восстановления (Табл. 1). TsAdh319 – гомотетрамер, MW субъединицы 26,2 кДа.



Рисунок 1. Зависимость от температуры удельной активности TsAdh319 в реакции окисления 2-пропанола (A) и 2(S),5(S)-гександиола (B) в 50 мМ Gly-NaOH, pH 10,5 буфере (черный). в буфере с 1 Μ NaCl (оранжевый И красный. соответственно). (C) Термостабильность TsAdh319. Остаточная активность в реакции окисления 2-пропанола после инкубации при разных температурах 70 °С (зеленый), 80 °С (синий), 90 °С (оранжевый) и 98 °С (лиловый). Активность исходного неинкубированного фермента взята за 100%. (**D**) Влияние NaCl на активность TsAdh319 при 60 °C, 50 мМ Gly-NaOH, pH 10,5, в реакции с 2пропанолом (○); 100% -0.86 ± 0.07 U/мг и *rac*-2.5-гександиолом (■) 100% -3.6 ± 0.4 U/мг.

TsAdh319 отличается исключительной термостабильностью, а также стабильностью и активностью в растворах с 1-4 M NaCl; термооптимум в реакции окисления 2-пропанола превысил 95 °C (Рис. 1); по данным ДСК температура плавления составила $104,2 \pm 0,3$ °C в фосфатном буфере и $102,2 \pm 0,3$ °C в буфере с 1 M NaCl. TsAdh319 сохраняла активность при инкубации 4 ч в буферах с 50% органического растворителя (ДМСО, ДМФА, метанол,

ацетонитрил, хлороформ), при инкубации в 50% этилацетата активность снижалась вдвое. Введение 50% растворителя в реакцию приводит к снижению активности, при этом смешивающиеся с водой растворители эффективнее влияют на ферментативную реакцию. Однако 600 мМ NaCl оказывает стабилизирующий эффект (Рис. 2А). Влияние мочевины гуанидин И гидрохлорида (GuHCl) оценивали по изменению активности TsAdh319 в реакции восстановления 2,3-пентандиона при 60 °С (Рис. 2В). Добавление мочевины до 8 М и GuHCl до 2 М приводило к увеличению активности TsAdh319. GuHCl в концентрации выше 2 М инактивировал фермент, однако, удаление денатуранта после 5 ч. инкубации приводило к восстановлению активности TsAdh319 до исходного уровня.



Рисунок 2. (А) Влияние растворителей на активность TsAdh319. Активность TsAdh319 определяли в реакции окисления 2-пропанола при 60 °C в 50 мМ Gly-NaOH, pH 10,5, 50% растворителя (лиловый) и при добавлении 0,6 М NaCl (серый); для несмешивающихся растворителей эксперименты проводили в растворе, насыщенном растворителем. (В) Влияние денатурантов, мочевины (зеленый) и гуанидин гидрохлорида (лиловый) на активность TsAdh319. Активность определяли в реакции восстановления 2,3-пентандиона при 60 °C в 100 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,5.

Структуру TsAdh319 получена с разрешением 1,68 Å (PDB код 3TN7). Функциональная единица TsAdh319 - тетрамер (Рис. 3А), образованный двумя осесимметричными димерами, положение субъединиц в тетрамере описывается тремя осями симметрии, то есть тетрамер TsAdh319 – высокосимметричная 32% субъединицы структура. поверхности участвуют В образовании межсубъединичного контакта. Субъединица имеет типичную для NAD(P)-SDR однодоменную структуру, которая включает зависимых укладку Россманна. Субстрат-связывающий карман В TsAdh319 образован гидрофобными остатками и остатком Asp138 рядом с консервативным Ser137, отвечающим за связывание гидроксильной(карбонильной) группы субстрата (Рис. 4). Как и в других SDR, остатки каталитической триады (Ser137, Lys154, Tyr150) расположены рядом с никотинамидным кольцом кофермента. Расстояние между ОН группой Tyr150, єNH₂-группой Lys154 и O2D атомом рибозы составляет 2,9 Å и 3,0 Å, соответственно, что указывает на возможность переноса протона и согласуется с установленным для SDR механизмом.



Рисунок 3. (**A**) **Тетрамер TsAdh319**. Субъединица А в фиолетовом цвете, В – в желтом, С – в зеленом, D – в серо-голубом. Субъединицы симметричны относительно осей P, Q, R, ось R-перпендикулярна плоскости листа. (**B**) Поверхность тетрамера TsAdh319, образованная скомпенсированными заряженными остатками (ионные пары и солевые мостики): ленточная модель субъединицы представлена зеленым цветом.



Рисунок Активный **4**. центр TsAdh319. Кофермент NADP выделен цветом, молекулы желтым воды показаны красными шариками. Отмечены каталитические остатки К154 и У150, участвующий в сбросе N110, протона а также координирующие субстрат остатки S137 и D138 на входе в активный центр.

Вместе с Asn110 четыре консервативные молекулы воды образуют сеть водородных связей для синхронного переноса протона, сопровождающего перенос гидрид-иона. В TsAdh319 эти молекулы воды изолированы от основной массы воды и расположены в гидрофильной полости, образованной атомами кислорода карбонильных групп нескольких остатков. Вход в активный центр TsAdh319 более открытый, чем в гомологах. Структурно это формируется коротким линкером между вторичными элементами βF и αG. Открытый субстрат-связывающий карман в TsAdh319 хорошо объясняет широкую субстратную специфичность фермента, а расположенный рядом с Ser137 остаток Asp138, возможно, формирует второй сайт связывания для субстратов диолов и

полиолов (caxapa), что согласуется со специфичностью TsAdh319 к субстратам с двумя спиртовыми (карбонильными) группами.

Субъединица TsAdh319 содержит максимальное абсолютное количество (73) заряженных остатков и максимальную долю их в последовательности по сравнению с гомологами (Табл. 2). Все заряженные остатки распределяются по поверхности субъединицы: внутренние солевые мостики есть только в тетрамере в межсубъединичном контакте. 70% заряженных остатков TsAdh319 участвуют в ионных взаимодействиях в субъединице с образованием изолированных солевых мостиков или сети солевых мостиков (Рис. 3В). Сравнение структур показывает, что доля солевых мостиков на поверхности TsAdh319 наибольшая

Таблица 2. Сравнение организации структур гомологичных SDR из термофильных организмов *T. sibiricus* (TsAdh319), *Thermotoga maritima* (TmDH, PDB код 1VL8) и *Chlorobium terpidum* (cSR, PDB код 2BD0) и из мезофильных организмов *Streptomyces clavuligerus* (CAD, PDB код 2JAH), *Gluconobacter frateurii* (SR, PDB код 3AI2).

Параметры сравнения	TsAdh319	CAD	TmDH	SR	cSR
Onma	имальная тел	мпература	, °C		
ферментативной реакции	95	21-26	не изм.	25	50
роста организма-хозяина	78-80	25-28	80-85	25	47-48
Стру	уктурные хар	оактерист	ики		
RMSD Cα, Å/N остатков	-	1.0/221	1.5/214	1.6/218	1.4/223
Общее число остатков в	234	245	255	263	244
последовательности					
Количество водородных	1,19	1,01	1,08	1,04	1,02
связей на один остаток					
Доля заряженных остатков в	31,2	24,3	25,8	23,2	26,2
последовательности, %					
Доля ASA тетрамера,	81,4	71,5	72,0	65,5	68,2
образованная заряженными					
остатками, %					
Удельная ASA тетрамера, Å ²	31,7	31,7	31,0	35,2	35,2

среди гомологичных ферментов: менее 38% всех заряженных остатков образуют солевые мостики в субъединицах гомологичных SDR. Сравнительный анализ водородных связей в структурах TsAdh319, CAD, TmDH, SR, cSR показал, что избыток заряженных остатков в тетрамере TsAdh319 приводит к образованию сети водородных связей разной интенсивности и создает высокую плотность водородных связей, которые словно прошивают молекулу, обеспечивая целостность ее структуры. При анализе водородных связей максимальное расстояние между донорным и акцепторным атомом было принято равным 3,5 Å, угол D-H..A 150-180°. Атомы со значениями доступной растворителю площади поверхности (ASA) равной 0,0 считались внутренними атомами, а остальные атомы считались находящимися на поверхности. Водородные связи

были разделены на три категории по типам взаимодействующих атомов: **Ch-Ch** (между атомами заряженных боковых групп остатков), **Ch-N** (между атомами заряженных боковых групп остатков и атомами полярных боковых групп, включая атомы азота и кислорода основной цепи), **N-N** (между атомами полярных боковых групп остатков и атомами азота и кислорода основной цепи) (Рис. 5). В контексте определения водородных связей, солевые мостики – это сильные водородные связи между N-H и O фрагментами боковых групп остатков Агg, Lys, His и Asp, Glu, соответственно, с более выраженными кулоновскими взаимодействиями, что проявляется в большем энергетическом выигрыше от образования таких водородных связей. Анализ показал, что плотность водородных связей в белковой глобуле TsAdh319 наибольшая (Табл. 2).



Рисунок 5. Количество и состав водородных связей в тетрамерах SDR из термофильных микроорганизмов: 1 - TsAdh319, 2 - cSR, 3 - TmDH, и из мезофильных микроорганизмов: 4 - CAD, 5 - SR. (A) Доля внутренних (темно серый) и поверхностных (светло-серый) водородных связей от общего числа водородных связей (100%). Оставшиеся до 100% составляют водородные связи между поверхностным и внутренним атомами. (B) Состав поверхностных водородных связей, включая N-N (светло-серый), и Ch-Ch (темно-серый).

Гомологичные ферменты принципиально различаются распределением водородных связей (поверхностные / внутренние (Рис. 5А)), составом поверхностных водородных связей (Рис. 5В) и водородных связей между субъединицами, для TsAdh319 вклад заряженных остатков в обоих случаях наибольший. Таким образом, имея типовую для SDR структуру, TsAdh319 отличается увеличением сети водородных связей в объеме белковой глобулы и разветвленной сетью солевых мостиков на поверхности. Белковая глобула TsAdh319 оказывается убранной в чехол электростатических взаимодействий (Рис. 3В). Солевые мостики, собранные на поверхности TsAdh319 в обширную сеть, препятствуют разрушительному воздействию мочевины. Мочевина как нейтральная молекула не разрушает солевые мостики, GuHCl, как ионное соединение, взаимодействует с заряженными остатками, что приводит к потере активности фермента (Рис. 2В). Активация TsAdh319 низкими концентрациями GuHCl объясняется, по-видимому, устранением избыточного напряжения (деформации) в тетрамере TsAdh319 при субоптимальных температурах в результате частичного разрушения водородных связей: активация наблюдается в условиях проведения стандартной реакции при 60 °C, в то время как оптимальные условия – это 95 °C. Более того, воздействие GuHCl на TsAdh319 может быть специфичным и потому более эффективным из-за значительного вклада остатков Arg в поверхностные ионные взаимодействия. Ион гуанидиния способен замещать гуанидиновый фрагмент боковой цепи Arg в солевом мостике. Такая замена приводит к разрушению сетевых контактов, тем самым вызывая структурные изменения в белковой глобуле, полезные для катализа при низких концентрациях и разрушительные при высоких. Активацию TsAdh319 в растворах с 1-4 M NaCl также можно объяснить экранированием ионами Na+ и Cl- солевых мостиков на поверхности тетрамера при субоптимальных температурах.

2. NADP-зависимая альдегиддегидрогеназа из гипертермофильной археи *Pyrobaculum ferrireducens (Pyrobaculum sp.1860)*

$$R \xrightarrow{O} H \xrightarrow{NADP+} \xrightarrow{NADPH} R \xrightarrow{O} \xrightarrow{O}$$

NAD(P)-зависимые альдегиддегидрогеназы (AlDH, EC 1.2.1.х), катализируют окисление альдегидов до карбоновых кислот. Архейные AlDH исследовались ранее в контексте

карбогидратного метаболизма архей, поэтому детально для разных архей охарактеризованы NAD(P)-зависимые глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа (GAPDH), нефосфорилирующая GAP дегидрогеназа (GAPN) и ферредоксинзависимая GAP оксидоредуктаза (GAPOR). В рамках представленной работы термостабильной функциональная проведены характеристика альдегиддегидрогеназы из археи P. ferrireducens (AlDHPyr1147) и анализ структуры фермента в апо- и холоформах. Кроме AlDHPyr1147, в геноме *P*. ferrireducens идентифицированы GAPDH, GAPN и GAPOR. AlDHPyr1147 гомотетрамер, МW субъединицы 54.4 кДа. Фермент активен при 45-80 °С (Табл. 3, Рис. 6), активность снижается на 50% после 14 ч инкубации при 60 °С. Фермент строго специфичен к NADP; константа Михаэлиса для NADP⁺ в стандартной реакции окисления изобуральдегида при 60 °C составила $20,9 \pm 0,1$ µM. Для сравнения $K_{\rm M}$ для гомологичных NADP-зависимых AlDH из мезофильных организмов *Rattus norvegicus* и *Streptococcus mutans* (SmAlDH) по литературным данным составляют 2,0 µМ и 24,5 µМ при 20 °C, соответственно. По данным спектрофлуориметрического титрования апоформы AlDHPyr1147 константа диссоциации бинарного комплекса AlDHPyr1147 с NADP⁺ составляет

 $0,60 \pm 0,08$ µM при 60 °C. Константа диссоциации бинарного комплекса гомологичной дегидрогеназы SmAlDH с NADP⁺ – $2,3 \pm 0,2$ µM при 25 °C. Величины констант диссоциации комплексов обеих AlDH сходны, то есть при высоких температурах бинарный комплекс термостабильной AlDHPyr1147 по прочности не уступает бинарному комплексу гомолога из мезофильного организма.

Таблица 3. Кинетические параметры реакций окисления альдегидов, катализируемых AlDHPyr1147. Условия: 50 мМ Na-пирофосфатный буфер, pH 8,8, 100 мМ NaCl, 0,3 мМ NADP⁺, 15 µг/мл AlDHPyr1147, 60 °C.

Субстраты	$k_{\rm cat},{\rm c}^{-1}$	<i>K</i> _M , M	$k_{\rm cat}/K_{\rm M},{\rm c}^{-1}{\rm M}^{-1}$		
Пропилальдегид	$4,1 \pm 0,4$	$0,020 \pm 0,003$	200 ± 50		
D,L-Глицеральдегид	$2,9 \pm 0,16$	$0,021 \pm 0,0025$	140 ± 30		
Изобутиральдегид	$1,2 \pm 0,2$	$0,015 \pm 0,006$	80 ± 40		
Бетаинальдегид		Нет активности			
Сукцинил семиальдегид		Нет активности			



Рисунок 6. Зависимость от температуры удельной активности AlDHPyr1147 в реакции окисления изобутиральдегида. Условия: 50 мМ Naпирофосфатный буфер, pH 8,8, 100 мМ NaCl, 0,3 мМ NADP⁺, 9 мМ субстрата, 15 µг/мл AlDHPyr1147, 60 °C

В исследований ходе получены И проанализированы пять структур AlDHPyr1147 (с разрешением 1,90 - 3,04 Å), включая три структуры холоформы с разными положениями кофермента. Структуры апоформы и тройного комплекса с субстратом изобутиральдегидом (PDB коды: 5EEB, 5F2C, 5EUY, 5EXF, 5EK6). AlDHPyr1147 в кристалле и в растворе по данным гель фильтрации – тетрамер (Рис. 7А), субъединица состоит из трех доменов (Рис. 7В), домен олигомеризации удлинен по сравнению с аналогичными доменами в структурах мезофильных гомологов (Рис. 7В,С). Активные центры в структурах AlDHPyr1147 различаются конформациями никотинамидной части кофермента и каталитических остатков Cys287 и Glu253 (Рис. 8). Разные комбинации этих трех главных участников каталитического промежуточным превращения соответствуют соединениям реакции ферментативного окисления альдегидов. AIDH окисляют альдегиды в три ацилирование каталитического цистеина с образованием стадии: тиогемиацеталя, перенос гидрид-иона на кофермент с образование тиоэфира и деацилирование тиоэфира с образование карбоновой кислоты (механизм

известен из литературы и установлен ранее кинетическими методами и сайтнаправленным мутагенезом).



Рисунок 7. Молекула AlDHPyr1147. (A) Строение тетрамера. Субъединицы и кофермент NADP выделены цветом. (B) Строение субъединицы. Каталитический, коферментсвязывающий домены и домен олигомеризации показаны синим, зеленым и лиловым цветами, соответственно. (C) Наложение субъединицы SmAlDH из *S. mutans*, PDB код 2EUH (лиловый) и субъединицы AlDHPyr1147 (синий). Вторая субъединица AlDHPyr1147, которая образует димер с первой субъединицей, показана зелеными сферами. (D) Потенциальный субстратный канал. Субъединицы в тетрамере показаны разными цветами, кофермент показан лиловым. Молекулы воды в субстратном канале показаны красными шариками.

Кофермент-связывающий домен AlDHPyr1147 имеет укладку Россманна аналогично субъединице SDR и представляет собой трехслойную сэндвичструктуру с β -листом посередине, и с α -спиралями сверху и снизу. В SDR, в том числе и в TsAdh319, кофермент связывается водородными связями с остатками на петлях боковой грани этого трехслойного сэндвича. Однако в AlDHPyr1147 только адениновая часть NADP и пирофосфатная группа связаны водородными связями с остатками α -спиралей и петель укладки Россманна, а никотинамидная часть кофермента свободно размещается в активном центре. Адениновая часть кофермента закреплена в узкой щели между спиралью, образованной остатками 211-230 и спиралью, образованной остатками 230-244 (Рис. 9), то есть связывание принципиально иное, чем в SDR.



Рисунок 8. Положение остатков в активном центре AlDHPyr1147. Когда NADP находится в активном центре, остатки Glu253, Cys287, и Gly255 в конформации, выделенной малиновым. Когда кофермента нет в активном центре, остатки Glu253, Cys287 и Gly255 в конформации, покрашенной в голубой. (A) молекула NADP⁺ в структуре PDB код 5EUY; (B) молекула NADP⁺ в структуре PDB код 5EXF.



Рисунок 9. Связывание молекулы NADP в кофермент-связывающем домене термостабильной AlDHPyr1147 (слева) и SmAlDH из мезофильного организма (PDB код 2EUH).

В термостабильной AlDHPyr1147 NADP фиксируется большим количеством водородных связей, чем в SmAlDH (Рис. 9). Кроме того, очень жесткий фрагмент Pro210-Gly211-Pro212, по-видимому, укрепляет щель. Еще одной отличительной особенностью молекулы AlDHPyr1147 является отсутствие канала сброса протона (синхронный сброс протона сопутствует переносу гидрид-иона в дегидрогеназах). В известных структурах AlDH остаток Glu, принимающий протон от каталитического остатка Cys, непосредственно контактирует с непрерывной цепочкой молекул воды в узком канале в структуре (PDB код 202R, 2EUH). В молекуле AlDHPyr1147 такого канала не обнаружено и сброс протона предположительно осуществляется через субстратный канал, с которым контактирует остаток Glu253 (Рис. 7D). Сокращение числа сквозных каналов в тетрамере – еще один фактор стабилизации молекулы AlDHPyr1147.

Дальнейший анализ структурных факторов термостабильности состоял в сравнительной оценке распределения заряженных аминокислотных остатков в субъединице и тетрамере, и анализе распределения водородных связей по категориям в тетрамерах AlDHPyr1147 и SmAlDH (Табл. 4).

Таблица 4. Количество водородных связей, распределенных по категориям, в тетрамерах AlDH1147, SmAlDH и TsADH319.

Параметры сравнения	AlDH1147	SmAlDH	TsAdh319
Структурные хара	ктеристики		
RMSD Са, Å/N остатков	-	1.29/464	2.89/120
Количество остатков в субъединице	491	475	234
Доля заряженных остатков в	27,1	25,0	31,2
последовательности, %			
Доля ASA тетрамера, образованная	57,5	54,7	81,4
заряженными остатками, %			
Удельная ASA тетрамера, Å ²	30,6	30,9	31,7
Водородные связи в	з тетрамере		
Удельное количество водородных связей	1,02	1,04	1,19
Доля внутренних водородных связей, %	56,4	51,9	54,3
Доля водородных связей на поверхности, %	20,8	24,4	22,7
Отношение количества внутренних водо-	2,7	2,13	2,4
родных связей к количеству водородных			
связей на поверхности тетрамера			
Доля водородных связей Ch-N , %	22,3	19,9	18,8
Доля водородных связей Ch-Ch, %	8,5	8,2	14,0
Доля водородных связей N-N , %	69,2	71,9	67,2

Анализ водородных связей по разработанному для TsAdh319 алгоритму показал увеличение доли внутренних водородных связей (56,4% против в 51,9% в SmAlDH) и связей **Ch-N** – 22,3% против 19,9% в SmAlDH. Количество солевых мостиков у сравниваемых AlDH совпадает. По-видимому, доминирующим фактором температурной адаптации AlDHPyr1147 являются внутренние водородные связи и водородные связи между «заряженным» и «нейтральным» атомами (**Ch-N**), причем доля последних возрастает в общем количестве внутренних водородных связей (по сравнению с SmAlDH и TsAdh319). Водородные связи категории **Ch-N** внутри белковый глобулы имеют ряд преимуществ перед водородными связями категории **Ch-Ch** и **N-N**. Мацуи и Харата [FEBS J. 2007;274: 4012] пояснили эти преимущества следующим образом: (1) из-за наличия только одного заряженного остатка энергетическая компенсация за десольватацию при погружении в гидрофобную среду белковой глобулы у **Ch-N** будет меньше, чем у **Ch-Ch** водородных связей **Ch-N** больше, чем

при образовании водородных связей N-N из-за взаимодействия заряд-диполь. Интересно сравнить распределение водородных связей по категориям у термостабильных дегидрогеназ AlDHPyr1147 и TsAdh319 (Табл. 4). Доля остатков Arg в аминокислотной последовательности TsAdh319 составляет 7,7% против 6,7% у AlDHPyr1147. Вклад заряженных остатков в образование поверхности тетрамеров TsAdh319 и AlDHPyr1147 составляет 81,4% и 57,5%, соответственно. Таким образом, сеть солевых мостиков на поверхности молекулы TsAdh319 интенсивнее. На поверхности AlDH1147 преимущественно изолированные солевые мостики. Часть заряженных остатков у AlDHPyr1147 погружено в белковую глобулу, что способствует повышению доли внутренних водородных связей в тетрамере. Стоит отметить, что у всех рассмотренных в работе термостабильных ферментов соотношение внутренние / поверхностные водородные связи смещено в сторону внутренних ПО сравнению С мезофильными гомологами.

следующие Таким образом, выделить структурные факторы можно термостабильности AlDHPyr1147: (1) более длинный домен олигомеризации в субъединице и, как следствие, увеличение площади димерного контакта в тетрамере (такая роль С-концевого фрагмента в стабилизации тетрамерной структуры показана впервые); (2) дополнительные водородные связи для кофермента; (3) один координации канал протона субстрата; для И (4) увеличение количества внутренних водородных связей и водородных связей между атомами заряженных групп и атомами полярных остатков, включая атомы азота и кислорода основной цепи.

3. PLP-зависимые трансаминазы IV типа укладки из гипертермофильных архей Thermoproteus uzoniensis, Vulcanisaeta moutnovskia и Geoglobus acetivorans и термофильных бактерий Thermobaculum terrenum и Haliangium ochraceim

3.1. Общие сведения о трансаминазах

Трансаминазы (ТА, ЕС 2.6.1.Х) – это пиридоксаль 5'-фосфат (PLP)-зависимые ферменты, катализирующие стереоселективный перенос аминогруппы с аминокислоты или амина на кетокислоту или кетон с образованием новых аминокислоты или амина и нового кетосоединения (Рис. 10). Ферментативное трансаминирование – это реакция последовательного двойного замещения с промежуточным переносом аминогруппы на кофактор PLP, который переходит в другую форму – пиридоксамин-5'-фосфат (PMP); два субстрата последовательно связываются в одной области активного центра, все стадии реакции обратимы.



Рисунок 10. Реакция трансаминаз разветвленных L-аминокислот: в реакцию вступают Lлейцин и α-кетоглутарат - образуются 4-метил-2-оксовалерат и L-глутаминовая кислота.

В природе обнаружено семь типов укладки полипептидной цепи для связывания кофактора PLP. В трансаминазах встречается I и IV тип укладки PLPсвязывающего домена, что и определило деление трансаминаз на два суперсемейства. Трансаминазы обоих типов укладки отличаются консервативностью структур белковой глобулы, функциональной единицей является димер, в котором находятся два симметричных активных центра, образованных остатками обеих субъединиц (Рис. 11).





Рисунок 11. Строение трансаминаз IV типа PLPукладки. Функциональные димеры (А) - ВСАТ, (В) -DAAT, (С) – R-TA. (D) Активный центр трансаминазы IV типа укладки PLP-связывающего домена на примере структуры димера трансаминазы из *E. coli* с 2метиллейцином (PDB код: 111L). Малый и большой домены первой субъединицы выделены зеленым и красным цветами, соответственно. Соседняя субъединица функционального димера выделена серым цветом. Область слева от кофактора называется Окарман, область справа – Р-карман. Основные

формирующие вторичные элементы структуры: βХ- и βΥ-тяжи выделены оранжевым цветом, β-повороты I и II выделены черным и желтым цветами, соответственно, междоменная петля первой субъединицы выделена голубым цветом, О-петля выделена синим цветом. Внешний альдимин (ковалентное соединение PLP и 2-метиллейцина) окрашен в розовый цвет. Объектами исследования были выбраны трансаминазы IV типа PLP укладки, это суперсемейство представлено четырьмя основными семействами: трансаминазами D-аминокислот (DAAT), трансаминазами разветвленных Lаминокислот (BCAT), (R)-амин-трансаминазами (R-TA) И 4-амино-4деоксихоризмат лиазами (ADCL). Внутри суперсемейства разнообразная субстратная специфичность трансаминаз достигается разным составом аминокислотных остатков, формирующих активный центр, при этом геометрия активного центра консервативна (Рис. 11D). В 2010 г. группа проф. Борншойера опубликовала работу [Nat Chem Biol. 2010; 6: 807], в которой выделила два характеристических мотива в аминокислотной последовательности трансаминаз IV типа PLP-укладки, которые определяют субстратную специфичность внутри суперсемейства (Табл. 5).

Таблица 5. Два характеристических мотива в последовательностях трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена, определяющие субстратную специфичность канонических BCAT, DAAT, R-TA. Те же характеристические мотивы у охарактеризованных в работе трансаминаз.

	Мотив 1	Мотив 2	Нумерация		
			соответствует:		
	канониче	еские трансаминазы			
BCAT	³¹ YxxxxF[ED]Gx[KR] ⁴⁰	⁹⁵ YxR ⁹⁷ ¹⁰⁷ [LMVI]G[VL] ¹⁰⁹	ВСАТ из		
DAAT	²⁶ FxxxxYxV[IVA][KR] ³⁵	⁸⁶ HxY ⁸⁸ ⁹⁸ [RK]xH ¹⁰⁰	Escherichia coli DAAT из Bacillus sp. YM-1		
R-TA	⁵³ HxxxxYD[VT]x[STAHP] ⁶²	¹¹³ [FY]V[EQAWNS] ¹¹⁵	R-TA из Nectria		
		¹²⁶ [RKFGP]x[STANER] ¹²⁸	haematococca		
охарактеризованные в работе трансаминазы					
TUZN1299	²⁶ YxxxxFEGIR ³⁵	91 YxR 93 103 ISL 105	трансаминаза из		
VMUT0738	⁴⁰ YxxxxFEGIR ⁴⁹	107 YxR 109 119 VNL 121	Thermoproteus uzoniensis трансаминаза из Vulcanisaeta		
GEO1900	²⁸ YxxxxFEGIR ³⁷	88 YxR 90 100 LGL 102	moutnovskia трансаминаза из Geoglobus		
HO3033	³⁹ FxxxxFEGVR ⁴⁸	¹⁰⁶ HLY ¹⁰⁸ ¹¹⁸ DPD ¹²⁰	acetivorans трансаминаза из Haliangium		
TaTT	³⁴ SxxxxFEGIR ⁴³	¹⁰¹ YIM ¹⁰³ ¹¹⁴ FSV ¹¹⁶	ochraceum трансаминаза из Thermobaculum terrenum		

Обнаружение канонических характеристических мотивов в последовательности позволяло уверенно предсказать субстратную специфичность трансаминазы (BCAT, DAAT, R-TA). Однако в это исследование не вошли трансаминазы из архей (к 2010 г. была охарактеризована только одна и не была известна ее структура), также оставалось неясным, какая субстратная специфичность у трансаминаз, характеристические мотивы которых отличаются от канонических. В контексте вышеизложенного были проанализированы характеристические мотивы, структуры и свойства трех трансаминаз из архей (TUZN1299, VMUT0738, GEO1900) и двух трансаминаз из бактерий (HO3033 и TaTT), при чем последние две активны как в реакциях с разветвленными L-аминокислотами по типу BCAT, так и с первичными (R)-аминами по типу R-TA. Субстраты трансаминаз нехромогенны, поэтому для определения активности применяли количественную оценку продукта по второй ферментативной реакции или хроматографические методы. Представленные в работе трансаминазы являются термостабильными: ферменты сохраняют активность несколько суток при 60-80 °C, температурные оптимумы реакций выше 80 °C (кроме трансаминазы из H. ochraceim). Ферменты второй для энзиматической реакции лактатдегидрогеназа, аланиндегидронезана и глутаматдегидрогеназа – активны при 25-35 °C, поэтому для определения активности из реакционной смеси ферментативной реакции трансаминирования отбирали аликвоты через определенные промежутки времени и далее в них уже определяли количество второй реакции при 25 °С. образовавшегося продукта по Активность трансаминаз в реакциях с аминодонорами (R)-(+)-1-фенилэтиламином ((R)-PEA) ((*S*)-PEA) И *(S)*-*(*-*)*-*1*-фенилэтиламином регистрировали напрямую спектрофотометрически при 245 нм или обращенно-фазовой хроматографией.

3.2. Биохимическая характеристика трансаминазы из архей *T. uzoniensis* (TUZN1299), *V. moutnovskia* (VMUT0738) и *G. acetivorans* (GEO1900)

MW TUZN1299 – гомодимер, субъединицы 32,99 кДа, VMUT0738 -MW 35.352 гомотетрамер, субъединицы кДа. Идентичность последовательностей VMUT0738 и TUZN1299 составляет 54%. TUZN1299 и VMUT0738 – это BCAT с широкой субстратной специфичностью (Табл. 6, 7, 8). Кроме гидрофобных разветвленных L-аминокислот (BCAA) и ароматических Lаминокислот, TUZN1299 и VMUT0738 активны с серусодержащими Lметионином и L-цистеином, и, что интересно, с положительно заряженными Lаргинином, L-орнитином и L-гистидином, это необычно и ранее для канонических BCAT не наблюдалось. Важно отметить, что TUZN1299 и VMUT0738 не активны с α-кетоглутаратом, который считается каноническим вторым субстратом – аминоакцептором – в реакциях, катализируемых BCAT и DAAT, но не R-TA.

Аминодоноры	TUZN1299 ^{a)}	VMUT0738 ^{a)}	GEO1900 ^{b)}	TaTT ^{c)}
		Удельная актив	ность, U/мг	
L-лейцин	$1,7 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	$13,6 \pm 0,4$	40 ± 5
L-norлейцин	$1,5 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,9$	33 ± 4
L-ү-метиллейцин	$1,3 \pm 0,1$	-	-	-
L-tert-лейцин	$1,2 \pm 0,1$	-	$2,0 \pm 0,2$	-
L-изолейцин	$1,2 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	14.2 ± 1.7	-
L-валин	$3,6 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$17,3 \pm 1,7$	$13,9 \pm 1,5$
L-norвалин	$2,8 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,3$	$1,6 \pm 0,2$	17 ± 2
2-аминобутановая	$3,5 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,4$	$1,8 \pm 0,2$	$12,0 \pm 1,2$
кислота	, ,	, ,	-	, ,
L-метионин	$4,4 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,5$	-	11 ± 1
L-цистеин	$4,5 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$
L-гомосерин	$4,0 \pm 0,4$	-	-	-
L-треонин	$3,9 \pm 0,4$	$3,6 \pm 0,4$	-	$1,3 \pm 0,1$
L-серин	0	0	-	0
L-орнитин	$4,4 \pm 0,5$	$3,9 \pm 0,4$	0	$0,4\pm 0,1$
L-аргинин	$3,5 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,3$	-	0
L-гистидин	$2,3 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,2$	$0,7\pm 0,1$	$2,3\pm 0,2$
DL-лизин	$0,6 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,2$	0	$1,8 \pm 0,2$
L-фенилаланин	$1,0 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,2$	$2,3\pm 0,2$	$15,0 \pm 1,6$
L-тирозин	$1,0 \pm 0,1$	-	0	-
DL-триптофан	0	$1,1 \pm 0,1$	-	18 ± 2
L-аланин	$0,77 \pm 0,1^{d}$	1.7 ± 0.2^{d}	0	0
D-аланин	0	0	0	0
D-валин	-	0	-	0
D-фенилаланин	-	-	-	0
β-аланин	0	0	0	0
(<i>R</i>)-PEA	0,004 ^{e)}	0,008 ^{e)}	$0,002^{e}$	0,2 ^{f)}
(S)-PEA	0	0	0	<0,004 ^{f)}
L-глутамат	$0,2 \pm 0,1$	0	0	$27,6\pm 2,7^{d}$
L-аспартат	0	0	0	-
L-глутамин	$9,7 \pm 1,0$	-	0	-
L-аспарагин	$0,4 \pm 0,1$	-	-	-
L-глицин	0	-	-	-
L-пролин	0	-	-	-

Таблица 6. Удельная активность охарактеризованных в работе трансаминаз в реакциях трансаминирования с различными аминодонорами.

а)в реакции с пируватом в 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 8,0, при 65 °C;

b)в реакции с α -кетоглутаратом в 50 мМ Na-фосфатном буфере, 100 мМ NaCl, pH 8,0, при 65 °C;

с) в реакции с α-кетоглутаратом в 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 8,0, при 50 °C;

d) в реакции с 4-метил-2-оксовалератом;

е) в реакции с оксобутиратом (рН 7,5);

f) в реакции с α-кетоглутаратом (pH 9,0).

Аминоакцепторы	TUZN1299 ^{a)}	VMUT0738 ^{a)}	GEO1900 ^{b)}	TaTT ^{c)}
		Удельная акти	івность, U/мг	
2-оксобутират	$7,6 \pm 0,7$	$3,1 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$
4-метил-2-оксовалерат	$0,8 \pm 0,1$	$1,65 \pm 0,2$	$7,7\pm0,8$	$27,6 \pm 2,7$
3-метил-2-оксовалерат	$0,50 \pm 0,05$	$0,83 \pm 0,08$	$7,1 \pm 0,7$	$26,5 \pm 2,7$
пируват	$0,52 \pm 0,05^{d)}$	$0,23 \pm 0,05^{d}$	$0,56 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,2$
индол-3-пируват	-	$1,9 \pm 0,2$	-	38 ± 4
α-кетоглутарат	0	0	$13,6 \pm 1,2^{d}$	40 ± 4^{d}

Таблица 7. Удельная активность охарактеризованных в работе трансаминаз в реакциях трансаминирования с различными аминоакцепторами.

а) в реакции с L-аланином в 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 8,0, при 65 °C;

b) в реакции с L-глутаматом в 50 мМ Na-фосфатном буфере, 100 мМ, pH 8,0, при 65 °C;

с) в реакции с L-глутаматом в 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 8,0, при 50 °C;

d) в реакции с L-лейцином;

Наилучшим аминоакцептором для TUZN1299 и VMUT0738 оказался 2оксобутират, однако, основные характеристики были получены в реакции *Lлейцин* + *пируват*, поскольку за накоплением продукта реакции удобно следить по второй ферментативной реакции с аланиндегидрогеназой. Для TUZN1299 и VMUT0738 достоверно показана небольшая активность с (*R*)-PEA, при этом даже с таким неспецифическим субстратом фермент сохраняет стереоселективность: активности с энантиомером (*S*)-PEA в аналогичных условиях не зарегистрирована. Оптимальные условия реакции *L-лейцин* + *пируват* для обеих трансаминаз составили pH 7,5-8,0 и 95 °C (Рис. 12).



Рисунок 12. Характеристика TUZN1299 и VMUT0738. (А) Зависимость от температуры активности TUZN1299 в реакции между L-аланином и 4-метил-2-оксовалератом в 50 мМ Naфосфатном буфере, pH 8,0 (желтый, 100% - 1,1 ± 0,1 U/мг) и VMUT0738 в реакции между Lаланином и 4-метил-2-оксовалератом, pH 8,0 (черный, 100% - 2,5 ± 0,3 U/мг) (В) Ингибирование кетосубстратами активности TUZN1299 (1) 3-метил-2-оксовалерат; (2) 4метил-2-оксовалерат; (3) пируват; (4) 2-оксобутират.

Трансаминаза	<i>V</i> _m , U/мг	k_{cat}, c^{-1}	<i>К</i> _{<i>m</i>} , мМ	k_{cat}/K_m , c ⁻¹ M ⁻¹
TUZN1299	L-лейцин + п	ируват ↔ 4-мети	ил-2-оксовалерат	+ L-аланин
	L-аланин + 2-	оксобутират ↔ 1	пируват + 2-амин	юбутановая кислота
	(65 °C, pH 8,0)		-
L-лейцин	2.38 ± 0.09	1.31 ± 0.054	0.21 ± 0.08	6200 ± 2600
пируват	3.2 ± 0.2	1.78 ± 0.12	16.0 ± 3.0	111 ± 28
4-метил-2-	5.5 ± 0.5	3.0 ± 0.3	0.15 ± 0.06	20000 ± 10000
оксовалерат				
L-аланин	4.9 ± 0.7	2.7 ± 0.4	62 ± 18	43 ± 19
2-оксобутират	18.6 ± 1.5	10.2 ± 0.8	1.0 ± 0.3	10000 ± 3500
2-аминобутановая	$13. \pm 1.3$	7.2 ± 0.7	0.48 ± 0.11	15000 ± 4900
кислота				
VMUT0738	AD + пируват	$\rightarrow AA + L-Ala$		
T	(65 °C, pH 8,0)	1 17 + 0.06	1700 + 100
L-валин L ностроятии	3.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	$1.1 / \pm 0.06$	1790 ± 180
L-норвалин т	3.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	0.84 ± 0.12	2460 ± 480
L-орнитин*	4.0 ± 0.1	2.50 ± 0.15	(8.0 ± 0.6)	310 ± 42
GEO1900	L-Leu + AA \leftarrow (65 °C pH 8 0	→ 4-метил-2-оксо	овалерат + AD	
пируват	$(05^{\circ} \text{ C}, \text{pm}, 0, 0)$	$\frac{1}{103+0.05}$	18 2 + 1 2	100 + 7
пируват	1.9 ± 0.1	1.03 ± 0.03	10.2 ± 1.2	100 ± 7
α-кетоглутарат	10.6 ± 1.9	5.8 ± 0.1	1.9 ± 0.6	9800 ± 1020
HO3033	(R)-PEA + 3-M	етил-2-оксовале	ерат ↔ ацетофено	он + L-изолейцин
	(40 °C, pH 10,	$\frac{0}{0}$		26+5
(R) - PEA	0.37 ± 0.02	0.22 ± 0.01	6.0 ± 0.6	36 ± 5
(<i>R</i>)-PEA (pH 9,0)	0.32 ± 0.02	0.19 ± 0.01	12.0 ± 0.6	16 ± 3
З-метил-2-	0.25 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.55 ± 0.0^{7}	270 ± 50
оксовалерат			× (=0.0	
	AD + α -кетог.	лутарат ↔ АА +	L-глутамат (50 °	C, pH 8,0)
T V	(R) -PEA + α -R	сетоглутарат ↔ а	ацетофенон + L-г	лутамат (50 °С, рН 9,0)
L-лейцин	178 ± 23	108 ± 14	7.8 ± 2.3	13700 ± 4400
L-валин	150 ± 17	91 ± 10	30 ± 7	3000 ± 800
L-фенилаланин*	46 ± 3	28 ± 2	4.1 ± 0.7	6800 ± 1300
(R)-PEA	0.33 ± 0.02	0.20 ± 0.01	10.3 ± 1.2	19 ± 2
L-норвалин*	259 ± 13	157 ± 8	16.7 ± 1.2	9400 ± 800
L-триптофан*	25 ± 2	15.0 ± 1.2	3.1 ± 0.3	4800 ± 600
α-кетоглутарат*	98 ± 4	59 ± 3	0.32 ± 0.02	184000 ± 15000
TaTT	L-глутамат +	4-метил-2-оксов	валерат ↔ α-кето	глутарат + L-лейцин
	(50 °C, pH 8,0))		
4-метил-2-	34.5 ± 3.6	21 ± 2	15.1 ± 4.4	1400 ± 400
оксовалерат				

Таблица 8. Кинетические параметры реакций трансаминирования, катализируемых охарактеризованными трансаминазами. АА – аминоакцептор, AD – аминодонор.

*- концентрационные зависимости обработаны уравнением Хилла;

Кетоаналоги разветвленных аминокислот, то есть продукты типовой реакции между ВСАА и пируватом (Рис. 10) эффективно ингибируют активность TUZN1299 и VMUT0738 (Рис. 12В). Ингибирование продуктами является общей проблемой трансаминаз и ограничивает их применение в синтезе аминокислот и кетокислот. Полученные значения кинетических параметров реакций трансаминирования, катализируемых TUZN1299 и VMUT0738 (Табл. 8), подтверждают широкую специфичность обеих трансаминаз. Однако более точный метод оценки специфичности трансаминаз по полуреакции, указывает на очевидное предпочтение к разветвленным L-аминокислотам и их кетоаналогам (Табл. 9). Метод полуреакций основан на различиях в спектрах поглощения кофактора в PLP- и PMP-формах трансаминаз и состоит в регистрации изменений в спектре поглощения при добавлении аминодонора к раствору PLPформы трансаминазы: поглощения PLP формы трансаминазы в максимуме при 415-420 нм уменьшается с некоторой скоростью, которая зависит от концентрации аминодонора, и, одновременно, увеличивается оптическая плотность при 330 нм, которая соответствует поглощению РМР-формы трансаминазы. Таким образом, за протеканием полуреакции можно следить спектрофотометрически по снижению поглощения при длине волны 410-415 нм или по накоплению при 330 нм. С точки зрения механизма трансаминирования полуреакция – это один полуоборот фермента, который соответствует превращению одного субстрата в отсутствии второго субстрата (нет ингибирования вторым субстратом).

субстрат	k^{half}_{max}	K _D ^{half,}	$k^{half}_{max}/K_D^{half}$,
	(c ⁻¹)	(мМ)	$(c^{-1} M^{-1})$
L-лейцин	$21,1 \pm 2,4$	$0,12 \pm 0,05$	176000 ± 93000
2-аминобутират	$3,3 \pm 0,7$	$2,4 \pm 1,0$	1400 ± 800
L-аланин	$0,36 \pm 0,03$	85 ± 18	4 ± 1
L-орнитин	$0,061 \pm 0,003$	29 ± 2	$0,002 \pm 0,00025$
L-орнитин (65 °С)	$0,077 \pm 0,005$	$0,35 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,05$
4-метил-2-оксовалерат	256 ± 7	$0,23 \pm 0,01$	1113000 ± 80000
2-оксобутират	$1,9 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,2$	2600 ± 1000
пируват	$0,13 \pm 0,01$	$6,3 \pm 1,4$	20 ± 6
α-кетоглутарат*	-	-	$0,51 \pm 0,04$

Таблица 9. Кинетические параметры полуреакции Р	LP-формы TUZN1299 в 50 мМ
фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 100 мМ NaCl,	при 25 °С.

*Зависимость константы скорости полуреакции от концентрации субстрата не достигла насыщения.

При сравнении констант специфичности TUZN1299 в полной реакции и полуреакции для субстратов L-лейцина, его кетоаналога 4-метил-2-оксовалерата

наблюдается снижение специфичности к этим субстратам в полной реакции, что объясняется конкурентным ингибированием вторым субстратом И ингибированием продуктом. Для неспецифических субстратов (L-аланин и пируват, 2-оксобутират и 2-аминобутират) наблюдается увеличение константы специфичности в полной реакции. Это может быть связано как с более высокой температурой проведения полной реакции, как ЭТО наблюдается для неспецифического субстрата L-орнитина (Табл. 9) (65 °С против 25 °С), так и с активацией фермента вторым субстратов. Механизм активации пока не ясен.

Для TUZN1299 получена структура с разрешением 2,0 Å (PDB код 5CE8). Это первая структура архейной ВСАТ, до этого известны были только структуры бактериальных и эукариотических ВСАТ. Как и в структурах известных ВСАТ, в субъединице TUZN1299 можно выделить большой и малый домены; два активных центра в димере симметричны и образованы остатками обеих субъединиц. О-петля и междоменная петли хорошо видны на картах электронной плотности и формируют вход в активный центр TUZN1299 (Рис. 13А). Значения RMSD по Сα атомам с ближайшими гомологами (1,11 – 1,17 Å) свойственно PLP-зависимым указывают на сходство структур, что трансаминазам внутри одного типа укладки PLP-связывающего домена.



Рисунок 13. Пространственная структура TUZN1299. (А). Наложены субъединицы TUZN1299 (синий), BCAT из *Burkholderia pseudomallei* (оранжевый, PDB код 3U0G) и BCAT из *E. coli* (желтый, PDB код 1I1K). (В) Строение активного центра комплекса TUNZ1299 с L-норвалином (PDB код 6THQ). Ковалентно связанный с остатком Lys кофактор PLP окрашен зеленым. Молекула L-норвалина, ковалентно связанная с кофактором, показана зеленым. Остатки второй субъединицы димера, участвующие в образовании активного центра, отмечены (*). Остатки активного центра окрашены по типу атомов и соединены водородными связями.

Активный центр TUZN1299 (Рис. 13В) сходен с активными центрами канонических BCAT, состоит из двух карманов, при этом, как и в канонических ВСАТ, боковая и α-карбоксильная группы субстрата размещаются в О-кармане и Р-кармане, соответственно. Подвижные элементы активного центра – О-петля и междоменная петля – хорошо видны в структуре фермента (Рис. 13А), что косвенно указывает на жесткость структуры в целом, что свойственно термостабильным ферментам. В структуре TUZN1299, кроме фиксированного положения обычно подвижных фрагментов активного центра трансаминаз, есть еще следующие отличия: в О-кармане в аминокислотном составе О-петли есть изменения - нарушение канонического мотива (⁹⁹SKPQISLDVRGLQ¹¹¹). В результате замены остатка Gly108 (BCAT из E. coli) на Ser104 (TUZN1299) (Табл. 5) возникает структурированный изгиб петли (Ser104 образует водородные связи с Asp106 и Gln102 (Рис.14)), изменяется ориентация соседних остатков Ile103 и Leu105, которые теперь обращены в полость О-кармана своей гидрофобной боковой группой. Эти изменения и приводят к смещению положения боковой группы Туг26, изменениям положений гидрофильных групп в О-кармане и в итоге к понижению сродства к γ-карбоксильной группе αкетоглутарата. В целом О-петля не является консервативной по аминокислотной композиции у ВСАТ. Однако в семействе трансаминаз IV типа PLP укладки Орассматривается как определяющая субстратную специфичность петля детерминанта и ее фрагмент 107 [LMVI]G[VL]¹⁰⁹ (нумерация BCAT из *E. coli*) входит в характеристический мотив трансаминаз (Табл. 5).



Рисунок 14. Наложение областей активного центра ВСАТ из E. coli PDB код (синий, 1IYE) И TUZN1299, нумерация TUZN1299. Остатки, помеченные (*), относятся к соседней субъединице димера, субстрат L-глутамат, ковалентно связанный с кофактором PLP в структуре 1ІҮЕ показан голубым. Водородные связи между глутаматом И аминокислотными остатками 1IYE В показаны голубыми линиями, черным пунктиром отмечены водородные связи в TUZN1299; расстояния приведены в ангстремах (Å).

Другая особенность TUZN1299 - мотив β-поворота II ¹⁸⁵GSGE¹⁸⁸ (¹⁹⁴GAGE¹⁹⁷ в BCAT из *E. coli*, Рис. 15). β-Поворота II расположен между О- и Р-карманами и

регулирует вход в активный центр. В TUZN1299 в этом мотиве остаток аланина (Ala195 в BCAT из *E. coli*) заменен на остаток Ser186. Такая замена, повидимому, приводит к формированию центра связывания положительно заряженных боковых групп L-орнитина и L-аргинина по следующему механизму: в канонической BCAT из *E. coli*, имеющей мотив ¹⁹⁴GAGE¹⁹⁷, карбоксильная группа Glu197 в структуре расположена на расстоянии 2.5-2.9 Å от карбоксильной группы Glu181, и, таким образом, остатки Glu197 и Glu181 образуют карбоксилат-карбоксилатную пару, что приводит к росту pKa и протонированному состоянию одной из карбоксильных групп при нейтральных pH. В TUZN1299 положение остатка Ser186 рядом с Glu188 препятствует образованию карбоксилат-карбоксилатной пары Glu188-Glu172 и в О-кармане появляется нескомпенсированный отрицательный заряд. Появление в О-кармане отрицательного заряда обеспечивает продуктивное связывание аминокислот с положительно заряженной боковой группой (Рис. 15).



Рисунок 15. (А) Активный центр BCAT из E. coli (PDB код 1IYE). Субстрат L-глутамат, ковалентно связанный с кофактором PLP в структуре, показан голубым. Остатки Glu181 и Glu197 (один из них В протонированном coстоянии) образуют карбоксилаткарбоксилатную пару. (В) Активный центр TUZN1299 кофактор PLP ковалентно связан с боковой группой каталитического остатка Lys150 и показан желтым. Остатки Glu188 и Glu172 не образуют карбоксилат-карбоксилатную па-Положение субстрата py. Lорнитина показано голубым. Остатки, помеченные (*), относятся к соседней субъединице функционального димера.

Таким образом, строение функционального димера и активного центра TUZN1299 гомологичны каноническим ВСАТ из бактерий и эукариот. Другим словами, такая организация активного центра является универсальной для

ВСАТ. При этом архейная супертермостабильная трансаминаза TUZN1299 отличается широкой субстратной специфичностью, в том числе активностью с положительно заряженными L-аминокислотами, и наиболее эффективна в аминировании кетоаналогов ВСАА. Гомологичная ей термостабильная ВСАТ VMUT0738 также проявляет широкую субстратную специфичность. Сравнение последовательностей обеих архейных ВСАТ дает основания предположить, что активность с положительно заряженными L-аминокислотами и отсутствие активности в реакции с отрицательно заряженным α-кетоглутаратом у VMUT0738 возможна также благодаря двум заменам в активном центре в О-кармане.

VMUT0738 из V. mutnovskia	¹¹⁶ AST VNL DIRNL ¹²⁶	²⁰¹ G S GE ²⁰⁴
TUZN1299 из T. uzoniensis	¹⁰⁰ KPQ ISL DVRGL ¹¹⁰	¹⁸⁵ G S GE ¹⁸⁸
Geo1900 из <i>G. acetivorans</i>	⁹⁷ GAGD LGL DPRKCPS ¹¹⁰	¹⁸⁵ G S GD ¹⁸⁸
BCAT из <i>E. coli</i>	¹⁰³ GDVG MGV NPPAGYS ¹¹⁶	¹⁹⁴ G A GE ¹⁹⁷

Третья архейная трансаминаза GEO1900 из G. acetivorans – гомодимер, MW субъединицы 32.62 кДа. Для катализируемой GEO1900 реакции трансаминирования между L-лейцином и α-кетоглутаратом температурный оптимум и pH оптимум составили 80 °C и 7,5 – 8,0, соответственно. В отличие от TUZN1299 и VMUT0738 трансаминаза GEO1900 активна преимущественно с ВСАА и их линейными аналогами, из ароматических аминокислот GEO1900 активна только с L-фенилаланином. Субстратная специфичность представлена в Таблицах 6-8. GEO1900 активна с α-кетоглутаратом, но неактивна с положительно заряженными L-аминокислотами в условиях стандартного эксперимента. Очевидно, что y охарактеризованных архейных BCAT взаимоисключающая специфичность наблюдается к положительно И заряженным L-аминокислотам. В структуре GEO1900 отрицательно В последовательности О-петли присутствует канонический мотив [MLIV]G[VL] (¹⁰¹LGL¹⁰³), который, как показано ранее, нарушен у TUZN1299 и VMUT0738. Как и в активном центре BCAT из *E. coli*, мотив ¹⁰¹LGL¹⁰³ в О-петле GEO1900 обеспечивает правильную продуктивную координацию α-кетоглутарата в активном центре. За продуктивное связывание положительно заряженных Lаминокислот отвечает особая аминокислотная композиция β-поворота II (как в О-кармане TUZN1299 и VMUT0738 (Рис. 15)). И хотя в последовательности GEO1900 фрагмент β-поворота II ¹⁸⁵GSGD¹⁸⁸ также содержит остаток Ser186, GEO1900 не активен с положительно заряженными субстратами, по-видимому, из-за отсутствия коррелирующей замены в мотиве О-петли или из-за короткого остатка Asp в позиции 188.

С кристаллов холоформы GEO1900 и кристаллов холоформы, настоянной с субстратом α-кетоглутаратом, были собраны наборы дифракционных данных и получены структуры холоформы (PDB код 5CM0) и комплекса PLP-формы фермента с α-кетоглутаратом (PDB код 5E25). Функциональный димер GEO1900 устроен сходным с каноническими ВСАТ образом. Субъединица состоит из двух α/β (малый И большой), О-петли И междоменной доменов петли ¹¹⁹PWGKLYGDLYE¹²⁹, которая имеет разные положения в структуре холоформы и в комплексе (Рис. 16А). RMSD по Са атомам субъединиц комплекса и холоформы составляет 0.5 Å Организация активного центра **GEO1900** соответствует представленной на Рис. 11D. Полученный комплекс с акетоглутаратом позволил проанализировать связывание кетосубстрата в активном центре архейной ВСАТ (Рис. 16В, 17). С точки зрения катализа такой комплекс – это ингибирование кетокислотой (вторым субстратом) PLP-формы трансаминазы, которая активна с аминосубстратом, а кетокислота – это второй субстрат, активный с РМР-формой фермента. В димере GEO1900 Р-карман образован остатками Gly36, Arg38 (βХ-тяж), Туг89 (βҮ-тяж) и остатками βповорота І ²⁴⁷GTAA²⁵⁰. Перечисленные остатки образуют два сайта связывания α-карбоксильной группы по каждому атому кислорода типичным для ВСАТ образом (Рис. 16В, 17).



Рисунок 16. Пространственная структура Geo1900. (А) Субъединица GEO1900 с нековалентно связанной молекулой α-кетоглутарата. Малый домен показан синим цветом, большой домен – серым цветом, междоменная петля – желтым цветом. Ковалентно связанный с каталитическим лизином кофактор PLP показан желтым цветом, как и координированный α-кетоглутарат. (В) Активный центр Geo1900. Молекула α-кетоглутарата окрашена в красный цвет, молекула кофактора PLP – в желтый цвет, остатки активного центра – в синий цвет. Остатки соседней субъединицы отмечены (*). Молекула воды Hoh923 показана красным шариком.



Рисунок 17. Координация молекулы α-кетоглутарата в активном центре GEO1900. Остатки, участвующие в координации и водородные связи с указанием их длины обозначены зелеными цветом. Остатки соседней субъединицы отмечены ('). Остальные остатки, которые образуют активный центр, отмечены черным цветом. выполнен Рисунок в программе LigPlot.

О-карман сформирован остатками Arg91, Туг29*, Phe34, Trp120 и остатками Leu101*, Gly102*, Leu103* из О-петли (знаком * помечены остатки, относящиеся к соседней субъединице). Боковая группа α -кетоглутарата размещается в О-кармане: как и в канонических BCAT окружение γ -карбоксильной группы α -кетоглутарата гидрофобное, а остатки Arg91, Tyr29* и Leu103* через молекулу воды образуют водородные связи с атомами кислорода γ -карбоксильной группы. При связывании α -кетоглутарата три изменения в молекуле GEO1900 очевидны и заслуживают упоминания: (1) разворачивание боковых групп Leu101* и Leu103* (расстояние между соответствующими С α атомами 0,6 Å); (2) остатки 120-124 междоменной петли в структуре комплекса подвинулись к активному центру; (3) β -поворот I ²⁴⁷GTAA²⁵⁰ из P-кармана смещается к центру – смещение по С α составило 0,6 Å. В результате смещения междоменная петля и β -поворот I закрывают субстрат от растворителя, другими словами, в комплексе активный центр переходит в закрытую конформацию.

Структуры активных центров архейных TUZN1299 и GEO1900 гомологичны структурам активных центров канонических BCAT из мезофильных бактерий. Характеристические мотивы участвуют в связывании субстратов, как и установлено ранее при анализе структур бактериальных BCAT. Однако изученные архейные BCAT активны при температурах от 65 °C и выше. Термостабильность заложена в структуре белковой глобулы и на организации активного центра не отражается. Архейные BCAT – «медленные» трансаминазы, но могут превращать широкий спектр аминокислот и не ограничиваются только

BCAA, это особенность архейных BCAT скорее всего позволяет организмухозяину расти на разных субстратах.

3.3. Биохимическая характеристика трансаминаз из бактерий *T. terrenum* (TaTT) и *H. ochraceim* (HO3033), активных в реакциях с L-аминокислотами и с первичными (*R*)-аминами

Трансаминазы ТаТТ и HO3033 отличаются характеристическими мотивами от канонических трансаминаз (Табл. 5). Анализ свойств этих трансаминаз позволил установить, как изменения в характеристических мотивах влияют на организацию активного центра трансаминаз и на свойства трансаминаз. Трансаминаза HO3033 – гомодимер, MW субъединицы 35,61 кДа. Трансаминаза ТаТТ – это гомогексамер (тример димеров), MW субъединицы 36,38 кДа.

Трансаминаза HO3033 не катализирует ни типичные реакции BCAT (BCAA + α-кетоглутарат), ни типичные реакции R-TA ((*R*)-PEA + пируват). Реакция трансаминирования, которую катализирует HO3033, представляет перенос аминогруппы от (*R*)-PEA на кетоаналоги BCAA (Рис. 18, Табл. 10).



 $R = -CH(CH_3)C_2H_5$, $CH_2CH(CH_3)CH_3$ и т.д.

Рисунок 18. Реакция трансаминирования, катализируемая НО3033.

Таблица	10.	Активность	HO3033	с	кетосубстратами	В	полной	реакции	c
аминодон	ором	(R)-РЕА. Усло	вия реакци	и:	50 мМ Na-бикарбо	нат	ного буф	epa, pH 10	,0,
400 мМ Na	aCl, 2	2 мМ кетосубст	грата и 10 г	мΜ	(<i>R</i>)-РЕА при 40 °С	· ·			

Кетосоединение	Соответствующая аминокислота	Удельная активность, U/мг
2-оксовалерат	L-норвалин	$0,23 \pm 0,02$
3-метил-2-оксовалерат	L-изолейцин	$0,19 \pm 0,02$
4-метил-2-оксовалерат	L-лейцин	$0,15 \pm 0,01$
2-оксогексаноат	L-норлейцин	$0,14 \pm 0,01$
3-метил-2-оксобутират	L-валин	$0,12 \pm 0,01$
2-оксобутират	L-α -аминобутират	$0,025 \pm 0,002$
пируват	L-аланин	$0,007 \pm 0,001$
α-кетоглутарат	L-глутамат	$0,0042 \pm 0,0002$

Метод полуреакций показал, что HO3033 может катализировать деаминирование не только (R)-PEA, но и BCAA, и (R)-(+)-1-фенилпропиламина ((R)-PPA), который отличается от (R)-PEA этильной группой вместо метильной при хиральном атоме углерода. D-аланин, β -аланин, L- β -лейцин, *rac*-2-амино-5-метилгексан, *rac*-1-метил-3-фенилпропиламин и (R)-2-аминогексан и (S)-PEA не являются субстратами для HO3033, то есть фермент стерео- и региоспецифичен.

Особенными оказались и оптимальные условия полной реакции, катализируемой HO3033: 50 мМ Na-бикарбонатный буфер, pH 10,0, 400 mM NaCl, при 40 °C. При pH 11,0 фермент сохранял около 70% активности от максимальной. Фермент проявлял активность в присутствии 2 M NaCl в бикарбонатном буфере, pH 10,0.

В оптимальных условиях наблюдается незначительная активность НО3033 в типичной реакции ВСАТ (Рис. 10) между L-лейцином и α-кетоглутаратом. Таким образом, pH-оптимум HO3033 значительно выше, чем у известных BCAT (pH 7,0-8,0) и R-TA (pH 8,0-9,0). По литературным данным pH зависимость удельной активности охарактеризованных трансаминаз имеет колоколообразную форму, которая определяется рКа остатков активного центра вблизи кофактора или ионогенными группами субстрата. Доказано, что рКа атомов азота N4' альдимина или N1 пиридинового кольца PLP не определяют колоколообразную форму рН-зависимости полной реакции, хотя, согласно принятому механизму, эффективное трансаминирование возможно только при протонировании атома азота N1 и депротонировании атома N4' азота альдимина PLP. Предполагается, что боковые группы остатков активного центра формируют в нем электростатическое поле и, таким образом, регулируют степень ионизации каталитически важных групп кофактора. Показано ранее, что атом N1 PLP остается протонированным до pH 10,8 и даже имеет pKa 13,0 в аспартатаминотрансферазе (эта трансаминаза принадлежит к I типу укладки PLP-связывающего домена). По-видимому, наблюдаемый щелочной сдвиг pHпрофиля НО3033 связан с особым распределения зарядов в активном центре, что вызывает увеличение pKa атома азота N4' альдимина, и, как результат, эффективное трансаминирование начинается при pH>9,0. Снижение активности НО3033 при рН 11,0 и выше определяется как диссоциацией кофактора из активного центра, так и депротонированием (R)-РЕА (рКа=9,8). Данные предположения согласуются с принятым механизмом трансаминирования, когда реакционной форме фермента соответствует депротонированная форма основания Шиффа при протонированной форме субстрата. Депротонированная субстрата-аминодонора форма В таких условиях является нереакционноспособной.

Таким образом, в оптимальных условиях реакции трансаминирования субстратная специфичность HO3033 значительно отличается от специфичности известных BCAT и R-TA и ее активность можно определить как «активность по смешанному типу». Кинетические параметры реакции указывают на способность активного центра HO3033 к дифференцировке субстратов, однако в меньшей степени, чем это наблюдается у другой трансаминазы со смешанным типом активности – TaTT.

Функциональный димер HO3033 (PDB код 6H65) устроен сходным образом с димерами канонических трансаминаз; субъединица состоит из двух α/β доменов (малый и большой), О-петли и междоменной петли. Структурная гомология субъединицы НО3033 с субъединицами каноническими ВСАТ выше, чем с субъединицами каноническими R-TA: RMSD по Сα составляет 1,14-1,19 Å против 1.44-1.45 Å, соответственно. Геометрия активного центра HO3033, состоящего из О-кармана и Р-кармана, соответствует геометрии активных центров канонических трансаминаз IV типа PLP укладки: принципиальные различия состоят в свойствах остатков их формирующих. Расположение гидрофобных остатков Phe44 (Phe36 в BCAT из E. coli), Leu122* (Val109*), Tyr172 (Tyr164) Phe39* (Tyr31*) и Gly204 (Gly196) в О-кармане HO3033 сходно с положением аналогичных остатков в О-кармане канонической BCAT из E. coli. (* обозначает остатки из соседней субъединицы активного димера) (Рис. 19). Однако в О-кармане НО3033 отсутствуют остатки, важные для координации укарбоксильной группы α-кетоглутарата: Arg97 и Tyr31* (в нумерации BCAT из E. coli) заменены в HO3033 на Tyr108 и Phe39*, соответственно (Рис. 19). Эти замены вместе с Phe38* (His30* в BCAT из E.coli) делают О-карман в HO3033 гидрофобным. Наложение активных центров HO3033 и R-TA из Arthrobacter sp. (PDB код 3WWH) показывает отсутствие идентичных остатков. Стоит отметить, что в HO3033 на О-петле нет остатка аргинина (Arg138* в R-TA из Arthrobacter sp.), который консервативен среди R-TA и отвечает за координацию αкарбоксильную группу кетосубстрата пирувата в О-кармане. В НО3033 αкарбоксильная группа субстратов связывается в Р-кармане по типу ВСАТ. Как и в Р-кармане ВСАТ, в Р-кармане НО3033 Arg48 (на βХ-тяже) образует вместе с атомами азота основной цепи Thr266 и Ile267 один сайт связывания αкарбоксильной группы (Рис.19) Однако вместо характеристических остатков тирозина и аргинина (Tyr95 и Arg97 в BCAT из E. coli), формирующих второй координационный сайт в ВСАТ, в НО3033 в этих позициях находятся His106 и Tyr108, которые сайт связывания не образуют (Рис.19). Эти изменения, очевидно, делают связывание α-карбоксильной группы в Р-кармане менее (низкие значения констант связывания в полуреакциях), прочным но способствуют продуктивному связыванию гидрофобного субстрата (*R*)-РЕА. Значимость остатков His106 и Tyr108 для связывания (*R*)-РЕА была подтверждена анализом свойств двойного мутанта (H106Y+Y108R) (здесь и далее мутации указываются однобуквенным кодом).



Рисунок 19. Наложение остатков активного центра HO3033 (остатки выделены зеленым цветом) и BCAT из *E. coli* (PDB код 111K, пурпурный).

Таким образом, смешанный тип активности HO3033 реализуется в BCATподобном активном центре. Характеристические мотивы HO3033 (Табл. 5) уникальны при сохранении важного для связывания по BCAT типу остатка Arg48 в P-кармане на β X-тяже (Рис. 19). Изменения в O-кармане и P-кармане приводят к потере продуктивного связывания α -кетоглутарата и увеличению сродства к (*R*)-PEA. Для HO3033 субстратная специфичность не есть комбинация свойств BCAT и R-TA. Это новый тип активности среди трансаминаз IV типа PLP-укладки: реакция трансаминирования между ароматическим (*R*)-амином и кетоаналогом BCAA. Кроме того, HO3033 отличается от известных BCAT и R-TA галотолерантностью и оптимумом активности в полной реакции при pH 10,0.

ТаТТ – термостабильная «быстрая» трансаминаза IV типа PLP укладки, катализирует реакции трансаминирования как с типичными субстратами BCAT и с типичными субстратами R-TA, так и собственную уникальную реакцию (Puc. 20). Другими словами, ТаТТ проявляет активность по смешанному типу, принципиально отличную от активности HO3033. Спектр субстратов и кинетические параметры реакций ТаТТ приведены в Табл. 6-8. Наилучшими субстратами аминодонорами ТаТТ являются BCAA и ароматические Lаминокислоты. Константа специфичности ТаТТ к ароматическим субстратам соизмерима с константой специфичности к L-норвалину и L-валину, специфичность к L-лейцину выше в 10 раз, чем специфичность к его кетоаналогу 4-метил-2-оксовалерату; наибольшую специфичность ТаТТ проявляет к αкетоглутарату. По значениям максимальных скоростей ТаТТ является одной из самых активных среди известных на сегодня трансаминаз IV типа PLP укладки.



Рисунок 20. Реакции трансаминирования, катализируемые ТаТТ.

Для большинства охарактеризованных бактериальных ВСАТ кетоаналоги BCAA субстратами, являются наилучшими то есть in vitro BCAT оптимизированы под аминирование кетоаналогов ВСАА. В этом ТаТТ отличается от известных BCAT: *in vitro* TaTT наиболее эффективно катализирует деаминирование ВСАА с переносом аминогруппы на α-кетоглутарат. При концентрации выше 1 мМ α-кетоглутарат ингибирует реакцию. Пируват и 4метил-2-оксовалерат в концентрациях до 50 мМ не ингибируют ТаТТ. Специфичность TaTT к первичным (*R*)-аминам исследовали в режиме полуреакции, в режиме полной реакции активность наблюдалась только с (R)-РЕА и (R)-РРА. Активность TaTT в полной реакции между (R)-1-метил-3фенилпропиламином, (R)-2-амино-5-метилгексаном, (R)-2-аминогексаном и кетосубстратами α-кетоглутаратом и пируватом не зафиксирована. Наилучшим субстратом среди аминов является (R)-РЕА. В полной реакции константа специфичности TaTT к (*R*)-РЕА меньше константы специфичности к ароматическим аминокислотам (Табл. 8).

ТаТТ термостабильна: снижение активности ТаТТ на 50% наблюдается после 40 ч инкубации при 70 °C и 150 ч. инкубации при 50 °C. Температурный оптимум реакций трансаминирования между L-лейцином и α -кетоглутаратом и (R)-PEA и пируватом составили 75 °C и 55 °C, соответственно, (Рис. 21) рН-оптимум составил 8,0 и 9,0, соответственно. Таким образом, pH-оптимум реакций с ВСАА по типу BCAT) совпадает с рН-оптимумом (активности реакций. катализируемых каноническими BCAT. А pH-оптимум реакции с (R)-PEA (активности по типу R-TA) совпадает с рН-оптимумом реакций с аминами, катализируемых R-TA.



Рисунок 21. Зависимость от температуры скорости реакции трансаминирования между L-лейцином и α-кетоглутаратом (**•**) и между (R)-РЕА и пируватом (\circ). Удельную активность ТаТТ измеряли в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8,0, содержащем 50 мМ NaCl, 60 мкМ PLP, 5 мМ L-лейцина and 1 мМ α-кетоглутарата или 10 мМ (*R*)-РЕА и 1 мМ пирувата. 100% соответствует 96 ± 7 U/мг для Lлейшина α-кетоглутарата, И И $0,12 \pm 0,01$ U/мг для (*R*)-РЕА и пирувата.

При введении 15% метанола и 15% ДМСО в катализируемую ТаТТ реакцию трансаминирования между L-лейцином и α-кетоглутаратом наблюдается смещение оптимальной температуры реакции в область низких температури, как следствие, повышение активности ТаТТ при 50 °С в стандартном эксперименте (Рис. 22А). Наблюдаемое снижение оптимальной температуры реакции есть TaTT. структурных изменений В молекуле ингибирования результат растворителем не обнаружено. Структурные изменения в молекуле ТаТТ в присутствии ЛМСО И метанола были проанализированы методом триптофановой флуоресценции (Рис. 22В). Тепловую денатурацию TaTT наблюдали в присутствии 15% растворителя по изменению флуоресцентного сигнала на 313 нм и 370 нм (соответствуют полувысоте пика флуоресценции ТаТТ в буфере). Температура полуперехода $T_{0.5}$ снизилась с 74,9 °C в буфере до 68,3 °С и 64,5 °С в буфере с 15% ДМСО и с 15% метанола, соответственно. Далее в 15% ДМСО и 15% метанола температурный диапазон тепловой денатурации ТаТТ расширился с ~ 10 °C в буфере до 20 °C и 22 °C, соответственно, что указывают на значительное снижение кооперативности теплового перехода. Таким образом, наблюдаемый рост активности при субоптимальной температуре

объясняется увеличением конформационной подвижности молекулы фермента в водно-органической среде. Введение растворителей в небольшой концентрации, по-видимому, приводит к структурным перестройкам в молекуле и снимает некоторые структурные ограничения (жесткость), типичные для термостабильных ферментов при субоптимальных температурах.



Рисунок 22. (А) Зависимость от удельной активтемпературы TaTT ности В реакции трансаминирования между Lлейцином и α-кетоглутаратом в **Na-фосфатном** 50 мМ буфере, рН 8,0, содержащем 50 мМ NaCl (фиолетовый), и при добавлении 15% ДМСО (красный), или 15% метанола (зеленый). (В) Кривые тепловой денатурации ТаТТ в тех же условиях. Вкладка: зависимость отношения Із13/Із70 для 0.1 мг/мл ТаТТ от доли (v/v) метанола (зеленый) И ДМСО (красный) в Na-фосфатном буфере при 50 °С.

В ходе исследований получены пространственные структуры ТаТТ в E-PLP форме (PDB код 6GKR) и E-PMP форме (PDB код 6Q8E). Сходство последовательностей ТаТТ и охарактеризованных ранее BCAT и R-TA составляет 36-40% и 23-27%, соответственно. При этом структура ТаТТ отличается как от структур BCAT, так и от структур R-TA: RMSD по Cα для структур BCAT и R-TA составляет 1.33-1.46 Å и 1.64-1.65 Å, соответственно. И в растворе, и в кристалле ТаТТ является гексамером (тримером димеров). Исследования олигомеризация молекулы ТаТТ как фактора термостабилизации и влияния олигомеризация на каталитические свойства ТаТТ не вошли в данную работу. За функциональную единицу ТаТТ в этой работе принят димер (Puc. 23).



Рисунок 23. Функциональдимер TaTT. Лве ный субъединицы, формирующие димер, отмечены зеленым/желтым И серым пветами. В левой субъединице, малый домен выделен желтым, большой домен – зеленым, междоменная петля выделена красным цветом. Две конформации Опетли, формирующие центр соседней (серой) субъединипоказаны желтым ЦЫ, И цианом. Правая субъединица

(серая) наложена на субъединицу ВСАТ из *E. coli* (синий). Кофактор РМР показана «палочковой» моделью в лиловом цвете. Разностная карта плотности Fo-Fc для молекулы PLP показана с уровнем срезки 3*o*.

Функциональный димер TaTT устроен сходным с каноническими трансаминазами образом. Субъединица состоит из двух α/β доменов (малый и большой), О-петли и междоменной петли. Два активных центра симметричны и образованы остатками соседних субъединиц (Рис. 23).

По организации активные центры у ТаТТ и канонических ВСАТ сходны, однако, замены в характеристических мотивах последовательности (Табл. 5) определили, следующие изменения в Р- и О-карманах, которые привели к смешанного типу активности у TaTT. Во-первых, это остаток Met103 в мотиве $Y^{101}xM^{103}$ (на месте аргинина в мотиве ${}^{95}YxR^{97}$ в нумерации BCAT из *E. coli*), который не образует водородной связи с Туг101. Такая водородная связь наблюдается во всех канонических ВСАТ (Табл. 5), и формирует второй сайт связывания α-карбоксильной группы в Р-кармане в результате поляризации остатка тирозина Tyr101/Tyr95 (в нумерации TaTT/BCAT из E. coli). Отсутствие поляризации Tyr101 в TaTT изменяет электростатическое поле в Р-кармане и способствует связыванию метильной группы (R)-PEA (Рис. 24). Во-вторых, Окарман ТаТТ обогащен гидрофобными остатками Phe39, Leu105, Phe114*, Trp31*, Trp32* и Leu163, в то время как в О-кармане канонических BCAT гидрофобные остатки чередуются с гидрофильными (Arg97, Tyr31*, Tyr129 и N Vall109* в ВСАТ из E. coli). В ТаТТ гидрофобная область, сформированная остатками, F114*, W31*, W32* может фиксировать О-петлю (остатки 109*-121*) в позиции рядом с активным центром, что приводит к повышению эффективности продуктивного связывания субстратов. Остаток Ser34*, который замещает консервативный у канонических BCAT остаток тирозина (Tyr31* в ВСАТ из *E. coli*), вместе с Trp31* и Trp32* изменяют в значительной степени гидрофобный профиль дна О-кармана, что, по-видимому, благоприятствует связыванию L-ароматических аминокислот и ароматической группы (*R*)-PEA.



Рисунок 24. Положение остатков в активном центре ТаТТ (**A**) и BCAT из *E. coli* (PDB код 1IYE) (**B**). Остатки характеристических мотивов выделены голубым. Другие остатки активного центра показаны коричневым. В активном центре BCAT из *E. coli* кофактор PLP присутствует в форме внешнего альдимина с субстратом L-глутаматом. В активном центре ТаТТ молекула PLP из BCAT из *E. coli* в форме внешнего альдимина с L-глутаматом (мятный) совмещена с кофактором PLP (золотистый).

Для уточнения роли остатков в активном центре в реализации смешанного типа активности TaTT (по BCAT - типу и по R-TA - типу) было проведено



исследование с применением сайтнаправленного мутагенеза. Также была поставлена параллельная задача специфичность изменить TaTT путем замены остатков В активном сохранении при центре пространственной струкспециализировать туры: активный центр ТаТТ по R-TA типу. Заданное

направление исследований позволяло ответить на несколько вопросов: (1) является ли ТаТТ переходной формой между каноническими BCAT и R-TA, (2) возможно ли специализировать активность TaTT, (3) какова роль ключевых

остатков активного центра TaTT в реализации смешанного типа активности. Общий план эксперимента представлен на схеме выше. Стратегию мутагенеза в P-кармане можно характеризовать как последовательное замещение в позициях, где располагаются остатки, значимые для активности по BCAT-типу, на остатки, которые наиболее часто встречаются в этих позициях у R-TA. В О-кармане стратегия замен включала как добавление остатков, значимых для R-TA-типа активности, так и замещение остатков, характерных для BCAT на остатки, характерные для R-TA. Эффекты замен были проанализированы кинетическими методами в полной реакции и полуреакции (Табл. 11).

Таблица 11. Удельная активность некоторых вариантов *TaTT*. Замены в О-кармане выделены коричневым. Замены в Р-кармане выделены синим. Полуреакции проведены в 50 мМ Ches-буфере, pH 9,0, при 40 °C. Полную реакцию проводили в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 8,0, с L-лейцином и pH 9,0 с (*R*)-PEA при 50 °C.

Замены в ТаТТ	Удельная активность в полная реакции, U/мг			Полуреакция с (<i>R</i>)-РЕА
	(<i>R</i>)-РЕА + пируват	(<i>R</i>)-РЕА + α-кетоглутарат	L-лейцин + α- кетоглутарат	c (n)-1 EA k _{max} /Kd, c ⁻¹ M ⁻¹
нет	0,124 ±0,005	$0,147 \pm 0,003$	40 ± 4	$0,9 \pm 0,1$
R438	$0,095 \pm 0,004$	$0,14 \pm 0,01$	$0,\!79\pm0,\!02$	-
G41V + Y101F	$0,004\pm0,001$	$0,16\pm0,01$	0	20 ± 3
R43S+ G41V + Y101F	$0,004 \pm 0,001$	$0,018 \pm 0,006$	0	60 ± 10
S115R	$0,112 \pm 0,005$	$0,064 \pm 0,003$	$1,8 \pm 0,4$	$3,3 \pm 1,2$
R43S + G41V + Y101F + S115R	0,003 ± 0,001	0,024 ± 0,002	0	90 ± 30

Замены привели к снижению обоих типов активности TaTT в полной реакции, при этом активность по BCAT типу оказалась чувствительнее к изменениям. Очевидно, что замены нарушили продуктивное связывание аминоакцептора (кетосубстрата), так как анализ полуреакций показал, что специфичность вариантов к (R)-PEA выше, чем у WT TaTT.

Для наиболее специфичных к (R)-РЕА вариантов **V3** (R43S+ G41V + Y101F, PDB код 7NEA) и **V4** (R43S + G41V + Y101F + S115R, PDB код 7NEB) получены пространственные структуры: основные различия в активном центре обнаружены в положении О-петли и взаимодействиях между остатками этой петли и остатками, образующими Р-карман и междоменную петлю (Рис. 25).



Рисунок 25. Сравнение структур WT ТаТТ и вариантов V3 (R43S+ G41V + Y101F, PDB код 7NEA) и V4 (R43S + G41V + Y101F + S115R, PDB код 7NEB). (A) Наложение димеров WT ТаТТ (зеленый), V3 (пурпурный) и V4 (синий). Вставка - увеличенное изображение области О-петли в О-кармане для демонстрации изменений в положении О-петли. (B) Наложение активных центров WT ТаТТ (зеленый, прозрачный) и V3 (розовый). Водородные связи показаны пунктирными линиями. Замены в V3 указаны красным. (C) Наложение активных центров WT ТаТТ (зеленый, прозрачный) и V4 (синий). Замены в V4 указаны красным. (D) Сравнение положения О-петли в WT ТаТТ (зеленый) и V3 (розовый). О-петля в V3 окрашена в коралловый цвет. Остатки О-петли у WT ТаТТ подписаны зеленым. Остатки V3 подписаны черным. Остатки соседней субъединицы отмечены (*). (E) Сравнение связывания γ -карбоксильной группы α кетоглутарата в BCAT *E.coli* (белый, PDB код 1IYE) и WT ТаТТ (зеленый). α -Кетоглутарат, ковалентно связанный с молекулой PLP, показан голубым цветом. Водородные связи показаны пунктирными линиями.

Остаток Arg43 формирует как сайт связывания α-карбоксильной группы в Ркармане, так и вход в активный центр, фиксируя междоменную петлю. Мутация R43S привела к смещению положений β-поворота I и междоменной петли и к разворачиванию боковых групп остатков, их образующих (Рис. 25В,С). Более того, в обоих вариантах боковая группа фенилаланина (замена Y101F) оказалось развернутым почти на 180° из Р-кармана и приняла конформацию, индуцированную заменами R43S и G41V: замена R43S создала полость для боковой группы фенилаланина, а боковая группа валина (замена G41V) вытеснила боковую группу фенилаланина в эту полость (Рис. 25В,С). Кроме того, наблюдаются значительные изменения конформации О-петли (Рис. 25А): в V4 О-петля разупорядочена, в V3 отсутствуют некоторые стабилизирующие водородные связи - между атомом О Ser115* и боковыми группами Thr197 и Ser173, а также между атомом О Phe114* и боковой группой Gln170. Эти изменения приводят к сдвигу О-петли, и, как результат, боковая группа Phe114* смещается в сторону кофактора и частично блокирует вход в активный центр (Рис. 25D).

Эффективное связывание α-кетоглутарата – отличительная особенность катализа ТаТТ. α-Кетоглутарат является лучшим субстратом ТаТТ, и его аминирование не лимитирует скорость полной реакции. Связывание αкарбоксильной группы α-кетоглутарата в Р-кармане в активном центре ТаТТ несколько иное, чем в канонических ВСАТ: один сайт связывания, образованный атомами азота основной цепи β-поворота I (²⁵⁹GTHA²⁶²) и их поляризующим остатком Arg43, идентичен каноническим BCAT, другой – неполяризованный Tyr101 – менее прочный, так как Tyr101 не фиксирован и не поляризован водородной связью. Связывание γ-карбоксильной группы α-кетоглутарата в ТаТТ также свободнее: в канонических ВСАТ у-карбоксильная группа координируется остатком тирозина из ВХ-тяжа, остатком аргинина из ВУ-тяжа и NH-группой основной цепи остатка Leu (Val) из О-петли (PDB коды 5E25, 1IYE). В ТаТТ у-карбоксильная группа взаимодействует исключительно с NH-группами основной цепи Phe114* и Ser115* О-петли (Рис. 25Е). Замена R43S не снижает активность TaTT в полной реакции (R)- $PEA + \alpha$ -кетоглутарат, но значительно снижает активность в реакции *L*-лейцин + α -кетоглутарат. То есть L-лейцин, который связывается через α-карбоксильную группу уже не может связываться продуктивно, а α-кетоглутарат сохраняет продуктивное связывание, для которого оставшейся координации по карбоксильным группам достаточно. Но уже тройная мутация в Р-кармане в V3 приводит к сдвигу О-петли, поэтому сайты связывания и γ-карбоксильной, и α-карбоксильной групп нарушены в V3. Более того, боковая группа Phe114* в V3 занимает потенциальное месте укарбоксильной группы (Рис. 25D,Е). Смещение О-петли, по-видимому, делает аминирование α -кетоглутарата скорость лимитирующим процессом даже с таким «медленным» субстратом как (*R*)-РЕА. Полученные результаты указали на многоточечный характер связывания α -кетоглутарата в TaTT. В качестве имитации сайта связывания пирувата в R-TA замена S115R в V4 оказалась неудачной: продуктивного связывания пирувата в proD-положении через координацию α -карбоксильной группы с боковой группой R115* из О-петли не было достигнуто.

Проведенная работа показала, что структурные основы субстратной специфичности ТаТТ сложнее, чем просто комбинация в одном активном центре остатков, специфичных для BCAT и R-TA. ТаТТ – это не «переходная форма» между BCAT и R-TA, а уникальный фермент. Активность ТаТТ в реакции с (R)-РЕА и высокая каталитическая эффективность в реакциях между αкетоглутаратом BCAA достигаются несколькими И структурными особенностями, а именно: уникальной комбинацией гидрофобных остатков в активном центре, отсутствием отдельных водородных связей, наблюдаемых у канонических ВСАТ, и особым положением О-петли, ее аминокислотным составом и взаимодействием с соседними остатками.

выводы

1. Стабилизация структуры через увеличение доли заряженных остатков в аминокислотной последовательности наблюдается в дегидрогеназах из архей *T. sibiricus, P. ferrireducens*; такая стабилизация проявляется в повышении плотности водородных связей в белковой глобуле, перераспределении внутренних и поверхностных водородных связей и усилении межсубъединичных контактов.

2. Поверхность супертермостабильной алкогольдегидрогеназы из археи *T. sibiricus* покрыта сетью солевых мостиков, которая обеспечивает не только термостабильность фермента, но и устойчивость к денатурантам и галотолерантность при субоптимальных температурах.

3. У термостабильных ферментов, дегидрогеназы из *T. sibiricus* и трансаминазы из *T. terrenum*, наблюдается повышение активности при субоптимальных температурах в результате нарушения контактов в белковой глобуле под действием органических растворителей или высокой соли.

4. У трансаминаз разветвленных L-аминокислот IV типа укладки PLPсвязывающего домена из архей *T. uzoniensis* и *G. acetivorans* активный центр устроен сходным образом с активными центрами гомологичных ферментов из бактерий и эукариот.

5. Изменения в характеристических мотивах, формирующих активный центр расширению субстратной специфичности трансаминаз, приводят К V разветвленных L-аминокислот архей T. uzoniensis трансаминаз ИЗ И V. moutnovskia и к появлению дополнительной активности с первичными (R)аминами у трансаминаз из бактерий *T. terrenum* и *H. ochraceum*.

6. Дополнительная активность трансаминазы из *T. terrenum* с первичными (*R*)аминами не приводит к снижению активности фермента в реакциях со специфическими субстратами – L-аминокислотами и их кетоаналогами. Активности с первичными (*R*)-аминами и с L-аминокислотами не являются взаимоисключающими.

7. Адаптация ферментов к высоким температурам реализуется на уровне структуры белковой глобулы, при этом активный центр изменяется в минимальной степени; изменения в активном центре приводят к изменению субстратной специфичности фермента.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Stekhanova T.N., Mardanov A.V., **Bezsudnova E.Y.**, Gumerov V.M., Ravin N.V., Skryabin K.G., Popov V.O. Characterization of a thermostable short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus* // Appl Environ Microbiol.-2010.-V.76.-P.4096-4098.

2. Lyashenko A.V., **Bezsudnova E.Y.**, Gumerov V.M., Lashkov A.A., Mardanov A.V., Mikhailov A.M., Polyakov K.M., Popov V.O., Ravin N.V., Skryabin K.G., Zabolotniy V.K., Stekhanova T.N., Kovalchuk M.V. Expression, purification and crystallization of a thermostable short-chain alcohol dehydrogenase from the archaeon *Thermococcus sibiricus* // Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.-2010.-V.66.-P.655-657.

3. **Bezsudnova E.Y.**, Boyko K.M., Polyakov K.M., Dorovatovskiy P.V., Stekhanova T.N., Gumerov V.M., Ravin N.V., Skryabin K.G., Kovalchuk M.V., Popov V.O. Structural insight into the molecular basis of polyextremophilicity of short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus* // Biochimie.-2012.-V.94.№12.-P.2628-2638.

4. Stekhanova T.N., **Bezsudnova E.Y.**, Mardanov A., Gumerov V.M., Artemova N., Kleymenov S.Y., Popov V.O. Sodium chloride-induced modulation of the activity and thermal stability of short-chain oxidoreductase from the archaeon *Thermococcus sibiricus* // Appl Biochem Biotechnol.-2013.-V.171.№7.-P.1877-1889.

5. **Bezsudnova E.Y.**, Petrova T.E., Popinako A.V., Antonov M.Y., Stekhanova T.N., Popov V.O. Intramolecular hydrogen bonding in the polyextremophilic short-chain dehydrogenase from the archaeon *Thermococcus sibiricus* and its close structural homologs // Biochimie.-2015.-V.118.-P.82-89.

6. Boyko K.M., Stekhanova T.N., Nikolaeva A.Y., Mardanov A.V., Rakitin A.L., Ravin N.V., **Bezsudnova E.Y.**, Popov V.O. First structure of archaeal branched-chain

amino acid aminotransferase from *Thermoproteus uzoniensis* specific for L-amino acids and R-amines // Extremophiles.-2016.-V.20.No2.-P.215-225.

7. **Bezsudnova E.Y.**, Petrova T.E., Artemova N.V., Boyko K.M., Shabalin I.G., Rakitina T.V., Polyakov K.M., Popov V.O. NADP-Dependent Aldehyde Dehydrogenase from Archaeon *Pyrobaculum sp.1860*: Structural and Functional Features // Archaea.-2016.-V.10.-ID9127857.-P.1-14.

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

9. Безсуднова Е.Ю., Бойко К.М., Попов В.О. Свойства бактериальных и архейных трансаминаз разветвленных аминокислот // Усп. биол. химии.-2017. Т.82.№13.-С.1572-1591. Обзор.

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

11. **Bezsudnova E.Y.**, Stekhanova T.N., Popinako A.V., Rakitina T.V., Nikolaeva A.Y., Boyko K.M., Popov V.O. Diaminopelargonic acid transaminase from *Psychrobacter cryohalolentis* is active towards (S)-(-)-1-phenylethylamine, aldehydes and α -diketones // Appl Microbiol Biotechnol.-2018.-V.102.No22.-P. 9621-9633.

12. **Bezsudnova E.Y.**, Dibrova D.V., Nikolaeva A.Y., Rakitina T.V., Popov V.O. Identification of branched-chain amino acid aminotransferases active towards (R)-(+)-1-phenylethylamine among PLP fold type IV transaminases // J Biotechnol.-2018.-V. 10.№271.-P.26-28.

13. Попинако А.В., Антонов М.Ю., **Безсуднова Е.Ю.**, Попов В.О. Роль заряженных остатков в структурной адаптации к повышенным температурам у короткоцепочечных алкогольдегидрогеназ (SDR) из термофильных организмов. Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.-2018.-Т. 59.№ 5.-С.354-360.

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

15. Isupov M.N., Boyko K.M., Sutter J.M., James P., Sayer C., Schmidt M., Schönheit P., Nikolaeva A.Y., Stekhanova T.N., Mardanov A.V., Ravin N.V., **Bezsudnova E.Y.**, Popov V.O., Littlechild J.A. Thermostable Branched-Chain Amino Acid Transaminases From the Archaea *Geoglobus acetivorans* and *Archaeoglobus fulgidus*: Biochemical and Structural Characterization // Front Bioeng Biotechnol.-2019.-V.7.№7.-P.1-16.

16. **Bezsudnova E.Y.**, Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., Zeifman Y.S., Rakitina T.V., Suplatov D.A., Popov V.O. Biochemical and structural insights into PLP fold type IV transaminase from *Thermobaculum terrenum* // Biochimie.-2019.-V.158.-P.130-138.

17. Бойко К.М., Николаева А.Ю., Тимофеев В.И., Попов В.О., **Безсуднова Е.Ю.** Пространственная структура трансаминазы разветвленных аминокислот из *Thermoproteus uzoniensis* в комплексе с L-норвалином // Кристаллография.-2020.-T.65.№5.-C.740-743.

18. **Bezsudnova E.Y.**, Nikolaeva A.Y., Kleymenov S.Y., Petrova T.E., Zavialova S.A., Tugaeva K.V., Sluchanko N.N., Popov V.O. Counterbalance of stability and activity observed for thermostable transaminase from *Thermobaculum terrenum* in the presence of organic solvents // Catalysts.-2020.-V.10.№1024.-P.1-12.

19. **Bezsudnova E.Y.**, Stekhanova T.N., Ruzhitskiy A.O., Popov V.O. Effects of pH and temperature on (S)-amine activity of transaminase from the cold-adapted bacterium *Psychrobacter cryohalolentis* // Extremophiles.-2020.-V.24.№4.-P.537-549.

20. Безсуднова Е.Ю., Стеханова Т.Н., Бойко К.М., Попов В.О. Влияние кетосубстрата на выход продукта в реакции трансаминирования, катализируемой трансаминазой из *Thermoproteus uzoniensis* // Доклады Академии Наук. -2020.-Т.490.№1.-С.5-8.

21. **Bezsudnova E.Y.**, Popov V.O., Boyko K.M. Structural insight into the substrate specificity of PLP fold type IV transaminases // Appl Microbiol Biotechnol.-2020.-V.104.№6.-P.2343-2357. Обзор

22. **Bezsudnova E.Y.**, Nikolaeva A.Y., Bakunova A.K., Rakitina T.V., Suplatov D.A., Popov V.O., Boyko K.M. Probing the role of the residues in the active site of the transaminase from *Thermobaculum terrenum* // PLoS One.-2021.-V.16.N^o7. – C.e0255098.

Патенты:

Патент РФ на изобретение № RU2413766 от 10.03.2011. Безсуднова Е.Ю., Бонч-Осмоловская Е.А., Гумеров В.М., Марданов А.В., Попов В.О., Равин Н.В., Скрябин К.Г., Стеханова Т.Н.// Термостабильная алкогольдегидрогеназа из археи *Thermococcus sibiricus*. Патент № 2413766 от 10.03.2011

Материалы конференций (избранные):

1. **Bezsudnova E.**, Stekhanova T., Boyko K., Polyakov K., Ravin N., Popov V. //. Structural features of thermostable short-chain alcohol dehydrogenase from hyperthermophilic archaeon *Thermococcus sibiricus*. (Istanbul) 2011. Curr Opin Biotech (Suppl 1) V. 22. P. S85.

2. **Bezsudnova E.**, Petrova T., Boyko K.M., Rakitina T.V., Popov V.O. // Crystal structure of NADP+-dependent thermostable aldehyde dehydrogenase from *Pyrobacullum* sp.1860: implications for the cofactor binding at high temperatures. 10th International Congress on Extremophiles. 2014 (St.Petersburg). Book of abstracts: P. 252.

3. **E. Bezsudnova**, T. Petrova, K. Boyko, T. Stekhanova, N. Ravin, V. Popov // Two thermostable archaeal Rossmann-fold dehydrogenases: two NADP binding modes –

two different stabilities of binary complexes. Biocatalysis-2013: Fundamentals and Applications (Moscow) 2013: Book of abstracts: P. 69.

4. **E. Bezsudnova**, T. Stekhanova, A. Mardanov, A. Rakitin, A. Nikolaeva, K. Boyko, V. Popov // Why typical branch-chain transaminases have untypical substrate specificity? Biocatalysis-2015: Fundamentals & Applications (Γ. Истра) 2015: Book of abstracts: P. 112.

5. **E. Bezsudnova**, T. Stekhanova, A. Mardanov, A. Rakitin, A. Nikolaeva, K. Boyko, V. Popov // New archaeal branch-chain transaminases: high thermostability, typical structure and untypical substrate specificity. XIIIth congress Thermophiles (Santiago) 2015: Book of abstracts: P. 99.

6. **Bezsudnova E.**, Dibrova D., Nikolaeva A., Stekhanova T., Boyko K., Rakitiva T., Popov V. // Can thermostable branched-chain amino acid aminotransferases from archaea and thermophilic bacteria be R-selective with primary amines. 11th International Congress on Extremophiles. (Kyoto) 2016. Book of abstracts: P. 301.

7. Безсуднова Е., Бойко К., Суплатов Д., Марданов А., Николаева А., Стеханова Т., Равин Н., Попов В.О. Необычная субстратная специфичность трансаминазы разветвленных аминокислот из археи *Thermoproteus uzoniensis*. Первый Российский кристаллографический конгресс. (Москва) 2016: Материалы конференции. С. 199

8. Е. Безсуднова, К. Бойко, А. Марданов, А. Николаева, Т. Стеханова, Д. Суплатов, Н. Равин, В. Попов // Трансаминазы разветвленных аминокислот из архей *Thermoproteus uzoniensis* и *Vulcanisaeta moutnovskia*: типичная структура и нетипичная субстратная специфичность. V Съезде биохимиков России (Дагомыс) 2016. Асta Naturae. Спецвыпуск Т.2. С. 32.

9. **Bezsudnova E**., Nikolaeva A., Popinako A., Stekhanova T., Boyko K., Popov V. // Polyextremophilic enzymes from archaea and bacteria: structural and functional features. 13th International Conference Salt Lake Research. (Ulan-Ude) 2017. Book of abstracts: P. 65.

10. **Bezsudnova E.**, Nikolaeva A., Rakitina T, Golovachov Y., Boyko K., Popov V. // Polyextremophilic transaminase of PLP fold type IV from *Thermobaculum terrenum*: substrate specificity, 3D-structure and stability in water-organic media. 12th International Congress on Extremophiles. 2018 (Ischia) Book of abstracts: P. 16.

11. **Bezsudnova E.**, Boyko K., Rakitina T., Zeifman Y., Nikolaeva A., Dibrova D., Suplatov D., Popov V. // Effects of amino acid substitutions in the characteristic sequence motifs on the profile of substrate specificity of PLP fold type IV transaminases. Biocatalysis-2019: Fundamentals & Applications. (St.Petersburg) 2019. Book of abstracts: P. 50.

12. **E. Bezsudnova,** A. Nikolaeva, , A. Bakunova, T. Rakitina, K. Boyko, V. Popov // Regulation of the activity of pyridoxal-5'-phosphate-dependent transaminases by water-miscible organic solvents. 45th FEBS Congress. (Lubljana) 2021. FEBS Open Bio (Suppl. 1) V. 11. P. 255.