

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

*На правах рукописи*

Безсуднова Екатерина Юрьевна

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

Специальность: 1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени

доктора химических наук

Научный консультант  
академик РАН, профессор,  
д.х.н. Попов Владимир Олегович

Москва - 2022

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	8
ВВЕДЕНИЕ .....	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	19
1.1. Ферменты широкоспецифичные и узкоспецифичные: эволюционная взаимосвязь и представленность в археях и бактериях .....	20
1.2. Экстремофильные организмы как источники стабильных ферментов для биотехнологии.....	23
1.2.1. Биоразнообразие архей и экстремофильных бактерий .....	23
1.2.2. Ферменты из экстремофильных организмов: молекулярные основы стабильности ферментов .....	25
1.2.2.1. Термостабильные ферменты .....	25
1.2.2.2. Галотолерантные и галофильные ферменты .....	27
1.2.2.3. Ферменты, стабильные в водно-органических средах.....	28
1.2.2.4. Холодоактивные ферменты из психрофильных и психротолерантных организмов.....	29
1.3. Ферменты с биотехнологическим потенциалом: оксидоредуктазы и трансминазы.....	30
1.3.1. Алкогольдегидрогеназы: механизм действия и структура .....	30
1.3.2. Альдегиддегидрогеназы: механизм действия и структура .....	33
1.3.3. Трансминазы: механизм действия и структура.....	38
1.3.3.1. Механизм реакции и структура PLP-зависимых трансминаз IV типа укладки.....	39
1.3.3.2. Субстратная специфичность PLP-зависимых трансминаз IV типа укладки.....	46
1.3.3.3. Широкая субстратная специфичность и дополнительная активность у трансминаз .....	55
1.4. Современные подходы к разработке биокатализаторов.....	59

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	64
2.1. Материалы, используемые в работе .....	64
2.2. Методы исследования .....	66
2.2.1. Общие подходы к выделению, очистке и хранению ферментных препаратов.....	66
2.2.2. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка алкогольдегидрогеназы из <i>Thermococcus sibiricus</i> (TsAdh319) .....	66
2.2.3. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка альдегидрогеназы из археи <i>Pyrobaculum ferrireducens</i> (AIDHPyr1147) .....	67
2.2.4. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка трансаминазы из архей <i>Thermoproteus uzoniensis</i> (TUZN1299), <i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> (VMUT0738), <i>Geoglobus acetivorans</i> (GEO1900).....	69
2.2.5. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка трансаминазы из <i>Haliangium ochraceum</i> (HO3033). Создание вариантов HO3033 .....	70
2.2.6. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка трансаминазы из бактерии <i>Thermobaculum terrenum</i> (TaTT). Создание вариантов TaTT71 .....	71
2.2.7. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка трансаминаз из <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> (Pcryo361).....	73
2.2.8. Определение олигомерного состава ферментов .....	74
2.2.8. Определение активности алкогольдегидрогеназы TsAdh319 .....	75
2.2.9. Определение активности альдегиддегидрогеназы AIDHPyr1147 .....	76
2.2.10. Методы определения активности трансаминаз.....	76
2.2.10.1. Общие положения.....	76
2.2.10.2. GDH метод.....	77
2.2.10.3. AlaDH или LDH метод .....	78
2.2.10.4. AcPh-метод (ацетофеноновый метод) .....	78
2.2.10.5. Хроматографический метод .....	79
2.2.10.6. Метод полуреакции трансаминирования .....	79

2.2.11. Флуоресцентная спектроскопия .....	80
2.2.11.1. Измерение собственной флуоресценции белка .....	80
2.2.11.2. Определение константы диссоциации комплексов A1DHPyr1147 с NADPH и NADP .....	81
2.2.12. Исследование термостабильности белков .....	82
2.2.12.1. Зависимость триптофановой флуоресценции от температуры.....	82
2.2.12.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия .....	83
2.2.12.3. Метод Thermofluor .....	84
2.2.12.4. Кинетические методы определения термостабильности ферментов .....	84
2.2.13. Исследование эффектов растворителей.....	84
2.2.14. Рентгеноструктурный анализ.....	85
2.2.14.1. Кристаллизация ферментов .....	85
2.2.14.2. Сбор и обработка дифракционных данных. Уточнение структур ферментов .....	87
2.2.14.3. Анализ полученных структур.....	95
2.2.14.4. Анализ водородных связей в кристаллических структурах TsAdh319, A1DHPyr1147, TaTT и их гомологов .....	95
2.2.15. Прочие аналитические методы .....	96
2.2.16. Прочие расчетные методы .....	97
2.2.16. Выравнивание белковых последовательностей. Поиск новых трансаминаз.....	97
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	100
3.1. Короткоцепочечная NADP-зависимая алкогольдегидрогеназа из гипертермофильной археи <i>Thermococcus sibiricus</i> (TsAdh319) .....	100
3.1.1. Распространенность (представленность) алкогольдегидрогеназ в археях .....	100

3.1.2. Функциональная характеристика алкогольдегидрогеназы TsAdh319 ...	101
3.1.3. Кинетические параметры реакций, катализируемых TsAdh319. Эффекты 1 М NaCl .....	107
3.1.4. Структура TsAdh319. Строения субъединицы.....	110
3.1.5. Структура TsAdh319. Строения тетрамера .....	116
3.1.6. Структура TsAdh319. Связывания кофермента NADP .....	117
3.1.7. Архитектура активного центра TsAdh319 .....	120
3.1.8. Структурные факторы стабильности TsAdh319 .....	122
3.1.9. Ионные пары, солевые мостики и гидратная оболочка в TsAdh319 ..	125
3.1.10. Внутримолекулярные водородные связи в TsAdh319.....	129
3.1.11. Динамика водородной связи в TsAdh319 при температурном сдвиге .....	133
3.1.12. Влияние мочевины и гуанидин гидрохлорида на стабильность TsAdh319 .....	137
3.2. Альдегиддегидрогеназа из гипертермофильной археи <i>Pyrobaculum ferrireducens</i> (AIDHPyr1147).....	139
3.2.1. Функциональная характеристика альдегиддегидрогеназы AIDHPyr1147 .....	139
3.2.2. Связывание NADP и NADPH тетрамере AIDHPyr1147 .....	141
3.2.3. Общая характеристика структуры AIDHPyr1147 .....	144
3.2.4. Структура апоформы AIDHPyr1147 и Holo-1 комплекса AIDHPyr1147 с коферментом .....	147
3.2.5. Структура активного центра в моделях Holo-2 и Holo-3 комплекса AIDHPyr1147 с коферментом NADP .....	150
3.2.6. Структура активного центра в комплексе AIDHPyr1147 с коферментом NADP и субстратом; устройство субстратного канала .....	152
3.2.7. Анализ возможных путей вывода протона.....	155
3.2.8. Взаимодействие подвижных элементов в структуре AIDHPyr1147 ...	156

3.2.9. Структурные факторы термостабильности AIDHPyr114.....	159
3.3. Трансаминазы из гипертермофильных архей <i>Thermoproteus uzoniensis</i> , <i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> и <i>Geoglobus acetivorans</i> .....	162
3.3.1. Функциональная характеристика трансаминазы из <i>T. uzoniensis</i> (TUZN1299).....	162
3.3.2. Анализ равновесия реакции трансаминирования, катализируемой трансаминазой TUZN1299 .....	168
3.3.3. Структура трансаминазы TUZN1299 .....	171
3.3.4. Свойства трансаминазы из <i>V. moutnovskia</i> (VMUT0738).....	177
3.3.5. Функциональная характеристика трансаминазы из <i>G. acetivorans</i> (GEO1900) .....	179
3.3.6. Структура трансаминазы GEO1900 .....	180
3.4. Характеристические мотивы трансаминаз. Трансаминазы со смешанным типом активности.....	184
3.5. Трансаминазы со смешанным типом активности из бактерий .....	187
<i>Haliangium ochraceum</i> и <i>Thermobaculum terrenum</i> .....	187
3.5.1. Функциональная характеристика трансаминазы из <i>H. ochraceum</i> (НО3033).....	187
3.5.2. Структура трансаминазы НО3033 .....	191
3.5.3. Функциональная характеристика трансаминазы из <i>T. terrenum</i> (TaTT) .....	196
3.5.4. Структура трансаминазы ТаТТ.....	200
3.5.5. Исследование активного центра трансаминазы ТаТТ методом направленного мутагенеза .....	206
3.5.6. Стабильность трансаминазы ТаТТ в водно-органических средах.....	219
3.6. Специфичность к первичным (S)-аминам трансаминазы I типа PLP-укладки из холодоактивной бактерии <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> .....	225

3.6.1. Общие сведения о трансаминазах 7,8-диаминопеларгоновой кислоты .....	225
3.6.2. Функциональная характеристика трансаминазы Pсгуо361 .....	227
3.6.3. рН- и Термостабильность трансаминазы Pсгуо361 .....	232
3.6.4. Стабильность трансаминазы Pсгуо361 в водно-органических средах	234
3.6.5. Кинетические параметры реакции трансминирования, катализируемой трансаминазой Pсгуо361 .....	236
3.6.6. Структура трансаминазы Pсгуо361. Сравнение структур классических ДАРА АТ и Pсгуо361 .....	239
3.6.7. Анализ структурных факторов S-АТА-активности у трансаминазы Pсгуо 361 .....	242
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	246
ВЫВОДЫ.....	248
Список литературы .....	249
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	295
Приложение 1.....	295
Приложение 2.....	297
Приложение 3.....	303

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о. – аминокислотные остатки.

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография.

ГФ – гель фильтрация.

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием.

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия.

ДДС-ПААГ электрофорез – электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

ИПТГ – изопропилтиогалактопиранозид.

ПСА – персульфат аммония.

ПЦР – полимеразная цепная реакция.

РСА – рентгеноструктурный анализ.

ТА – трансаминазы.

$\omega$ -ТА – омега-ТА (специфичны к субстратам без  $\alpha$ -карбоксильной группы).

$T_m$  – температура плавления фермента.

ТЕМЕД – N,N,N,N'-тетраметилэтилендиамин.

ТХУ – трихлоруксусная кислота.

ЯМР – метод ядерного магнитного резонанса.

ADH – алкогольдегидрогеназы.

AIDH – альдегиддегидрогеназы.

AIDH<sub>Pyr1147</sub> – альдегиддегидрогеназа из археи *Pyrobaculum ferrireducens* (*Pyrobaculum sp.1860*).

AIDH<sub>2</sub> – альдегиддегидрогеназа из человека.

ASA – (accessible surface area) доступная растворителю поверхность белковой глобулы.

BCAT – трансаминазы разветвленных L-аминокислот.

BenDH – бензальдегиддегидрогеназа из *Corynebacterium glutamicum*.

BLAST (basic local alignment search tool) – семейство компьютерных программ, служащих для поиска гомологов белков или нуклеиновых кислот, для которых известна аминокислотная или нуклеиновая последовательности.

bsDAAT – трансаминаза D-аминокислот из бактерии *Bacillus subtilis*.



CAD – дегидрогеназой клавулановой кислоты из актиномицета *Streptomyces clavuligerus*.

Ct-FDH – 10-формилтетрагидрофолат дегидрогеназы из *Rattus norvegicus*.

cSR – сепиаптерин редуктаза из термофильной бактерии *Chlorobium terpidum*.

ДААТ – трансминазы D-аминокислот.

DAPA – ((7R,8S)-diaminopelargonic acid) - (7R,8S)- диаминопеларгоновая кислота.

DAPA TA – 7,8-diaminopelargonic acid transaminase (DAPA synthase) – трансминаза (7R,8S)- диаминопеларгоновой кислоты.

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.

eBCAT – трансминаза разветвленных L-аминокислот из бактерии *Escherihia coli*.

HO3033 – трансминаза из миксобактерии *Haliangium ochraceum*.

HPLC – жидкостная хроматография высокого давления.

GABA - γ-аминомасляная кислота.

GEO1900 – трансминаза из гипертермофильной археи *Geoglobus acetivorans*.

КАРА – ((8S)-amino-7-ketopelargonic acid) - (8S)-амино-7-кетопеларгоновая кислота.

LDR – (long-chain dehydrogenase) – длинноцепочечные дегидрогеназы.

β-ME – (mercaptoethanol) меркаптоэтанол.

MDR – (middle-chain dehydrogenase) среднецепочечные дегидрогеназы.

Mtb DAPAS - (DAPA synthase from *Mycobacterium tuberculosis*) DAPA AT из *M. tuberculosis*.

NAD – никотинамидадениндинуклеотид.

NADP- никотинамидадениндинуклеотид фосфат.

PaBADH – бетаинальдегиддегидрогеназа из *Pseudomonas aeruginosa*.

Pcryo361 – трансминаза из *Psychrobacter cryohalolentis* (DAPA TA).

PDB – банк данных белковых структур.

PLP – (pyridoxal -5'-phosphate) кофактор пиридоксаль-5'-фосфат.

PMP – вторая форма кофактор пиридоксамин 5-фосфат.

PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

R-TA – (R)-амин:пируват трансминаза IV типа укладки PLP связывающего домена

R-PEA – (R)-(+)-1-фенилэтиламин.

R-PPA – (R)-(+)-1-фенилпропиламин.

RSA – рентгеноструктурный анализ.

S-АТА - (S)-амин трансминаза I типа укладки PLP связывающего домена.

SAM – S-аденозил-L-метионин.

SDR (short-chain alcohol dehydrogenases) – короткоцепочечные алкогольдегидрогеназы.

SmAldH – NADP -зависимая дегидрогеназа из *Streptococcus mutans*.

SR – короткоцепочечная дегидрогеназа (L-сорбозоредуктаза) из *Gluconobacter frateurii*.

SSAldH – сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназа из *E. coli*.

S-PEA – (S)-(-)-1-фенилэтиламин.

TUZN1299 – трансминаза из гипертермофильной археи *Thermoproteus uzoniensis*.

TaTT – трансминаза из бактерии *Thermobaculum terrenum*.

*T<sub>m</sub>* – температура плавления.

TmDH – короткоцепочечная дегидрогеназа из *Thermotoga maritima*.

TsAdh319 – алкогольдегидрогеназа из археи *Thermococcus sibiricus*.

TtDH – короткоцепочечная дегидрогеназа из *Thermus thermophilus* HB8.

VMUT738 – трансминаза из гипертермофильной археи *Vulcanisaeta moutnovskia*.

WT – (дикий тип) белок с неизменной природной аминокислотной последовательностью.

# ВВЕДЕНИЕ

## 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 ускоряет 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 свойства которого оптимизированы для эффективного 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 высокопроизводительных лабораторных методов скрининга библиотек 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 (изменение субстратной специфичности, 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 изучение функционального разнообразия ферментов. Структурно-функциональные исследования ферментов, обнаружение и исследование ферментов с новой функцией в настоящий момент значительно отстают от успехов в других областях физико-химической биологии, таких как метагеномика или структурная биология. На 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 ограничены. 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 трансминазах 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, архей, 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 архей *Thermococcus sibiricus*. Провести поиск структурных факторов, определяющих стабильность фермента.

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

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

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 PLP-связывающего 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 PLP-зависимых 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 *T. sibiricus*, был выделен из ДНК чистых культур. Остальные ферменты были получены в результате экспрессии синтетических генов. Клонирование, конструирование плазмид и сайт-направленный мутагенез проводили стандартными методами генной инженерии. Выделение и очистку целевых ферментов проводили хроматографическими методами. Для характеристики ферментов применяли электрофорез в полиакриламидном геле и различные виды хроматографии, абсорбционную и флуоресцентную спектроскопии, методы кругового дихроизма, динамического светорассеяния и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), а также рентгеноструктурный анализ.

### **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 °С 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 L-аминокислот 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 трансаминаз IV типа укладки в последовательности 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 ochraceum* отличались активностью с первичными (R)-аминами. 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 *T. 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. Все ключевые экспериментальные данные получены при непосредственном участии автора. Автор благодарит К.М. Бойко на проведение рентгеноструктурных экспериментов и получение структур ферментов, проанализированных в диссертационной работе. Автор благодарит Т.Н. Стеханову, А.Ю. Николаеву, Ю.С. Зейфман за помощь в проведении экспериментов, С.Ю. Клейменова за анализ термостабильности ферментов методом



ДСК, А.В. Марданова, Т.В. Ракитину за создание векторов и экспрессионных штаммов, за наработку биомассы штаммов-продуцентов. Диссертационная работа выполнена в лаборатории инженерной энзимологии Института биохимии им. А.Н. Баха (ФИЦ Биотехнологии РАН), часть экспериментов была проведена в Научно-исследовательском центре «Курчатовский институт». Сбор дифракционных данных с кристаллов ферментов проводили в центрах синхротронного излучения в НИЦ «Курчатовский институт», EMBL (Гамбург, Германия), ESRF (Гренобль, Франция), SPring8 (Харима, Япония).

#### **Финансовая поддержка.**

Работа была поддержана грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований (№№ 10-04-01062а, 13-04-00768а, 18-04-00748а) и Российского Научного Фонда (№ 14-24-00172 (рук. академик РАН В.О. Попов)),

#### **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 45<sup>th</sup> FEBS congress в 2021 г. (Любляна), Extremophiles-2018 (Италия), Extremophiles-2016 (Япония), Extremophiles-2014 (Россия), Европейский биотехнологический конгресс (Турция), 2011 г., на международных конференциях Protein Stabilization (Италия), 2014 г., 13<sup>th</sup> international meeting Thermophiles (Чили), 2015 г., Novel Enzymes (Германия), 2018 г., "Biocatalysis-2013: Fundamentals and applications" (Москва), "Biocatalysis-2015: Fundamentals and applications" (г. Истра), "Biocatalysis-2019: Fundamentals and applications" (Киж-Валаам), The 13th International Conference on Salt Lake Research (Улан-Удэ), 2017 г., а также российских мероприятиях: V Съезде биохимиков России, Дагомыс, 2016 г., Первом российском кристаллографическом конгрессе, Москва, 2016 г. и научных конференциях ФИЦ (ИНБИ РАН) (Москва) в 2016, 2018, 2019 и 2021 гг.

В ходе работы получены и проанализированы 16 новых 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).

**Достоверность представленных 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.

### **Структура и объем диссертационной работы.**

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

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## Предисловие. Люди и ферменты.

Ферментативные реакции люди наблюдали и использовали с незапамятных времен: это получение кисломолочных продуктов и сыров, выделка кожи, осахаривание крахмала и т.п. В середине XIX века Луи Пастер сделал историческое заключение: превращение сахара в спирт (ферментация) дрожжевыми клетками происходит под действием «ферментов». В 1897 году Эдвард Бухнер обнаружил, что ферментация возможна бесклеточным экстрактом, то есть молекулами, активными вне живой клетке. И в 1907 году ему была вручена Нобелевская премия по химии «за проведённую научно-исследовательскую работу по биологической химии и открытие внеклеточной ферментации». На исходе XIX века Вильгельм Кене, физиолог и офтальмолог, вводит термин энзим (enzyme) – так зарождается наука энзимология. В 1913 Леонор Михаэлис (Leonor Michaelis) и Мод Ментен (Miss Maud Menten) в своей исторической работе [Michaelis, L., and Menten, M. L. (1913) Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49, 333-369] выводят основное уравнение ферментативной кинетики [1], и с этого момента энзимология (наука о ферментах) становится полноправной областью биохимии – «науки, изучающей все проявления жизни на молекулярном уровне» (БСЭ).

Эволюция ферментов неотделима от эволюции живых организмов. То, как субстратная специфичность и каталитическая эффективность зародились в исходных «предковых» молекулах и в результате возникло разнообразие функций при ограниченном наборе структурообразующих элементов, а также знание механизмов изменения (оптимизации) специфичности и каталитической эффективности и знание механизмов адаптации молекул к среде функционирования дают ключ к пониманию основ биоразнообразия и закономерностей взаимосвязи *последовательность-структура-функция*.

В современной энзимологии взаимосвязь *последовательность-структура-функция* рассматривается как генеральный принцип организации белков, ферментов и биомакромолекул вообще. В этом принципе заложен механизм специализации биомакромолекул и их адаптации к среде функционирования. Понимание механизмов реализации этого принципа дает мощный инструмент к направленному изменению

свойств ферментов и имеет непосредственное применение в разработки биокатализаторов для биотехнологии и «зеленой химии».

В исследованиях взаимосвязи *последовательность–структура–функция* можно условно выделить два направления: эволюционное и структурное. Основная парадигма первого направления – это сравнительный анализ белков и ферментов в контексте эволюционных отношений организмов-хозяев (genomic enzymology) [2,3]. В рамках этого направления ставится задача проследить, как меняется специфичность и каталитическая эффективность ферментов одного семейства/подсемейства по мере усложнения организма-хозяина и изменения среды обитания. Второе направление (structural biology) – это непосредственно исследование свойств белков/ферментов разнообразными методами, включая компьютерные методы, детальный анализ изменений свойств в результате мутагенеза, сравнительный анализ свойств гомологичных по структуре ферментов, [4,5]. Здесь ставится задача выявления прямой взаимосвязи между особенностями функции и наблюдаемыми особенностями структуры фермента.

### **1.1. ФЕРМЕНТЫ ШИРОКОСПЕЦИФИЧНЫЕ И УЗКОСПЕЦИФИЧНЫЕ: ЭВОЛЮЦИОННАЯ ВЗАИМОСВЯЗЬ И ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ В АРХЕЯХ И БАКТЕРИЯХ**

В 1945 году Норман Горовитц (N.H. Horowitz) впервые сформулировал гипотезу происхождения ферментов в контексте ретроградной эволюционной модели (retrograde evolution model) [6,7]. Согласно этой модели, ферменты возникли как биокатализаторы, способные восполнить недостаток переработанных субстратов. Организмы, имеющие такие биокатализаторы получали эволюционные преимущества. Позднее М. Ичас (M. Yčas) [8] и Р. Дженсен (R. Jensen) [9] предложили модель «лоскутной» эволюции, согласно которой первые ферменты были малоэффективны и имели широкую субстратную специфичность, далее такие ферменты эволюционировали в узкоспецифичные на базе дубликации генов и последующей дивергенции. Именно модель Дженсена легла в основу современной теории возникновения узкоспецифичных ферментов и обоснования дополнительной (побочной) активности даже у узкоспецифичных ферментов [3,10].

Даже узкоспецифичные ферменты специфичны ровно настолько, чтобы «неавторизованный доступ» в его активный центр не нарушил гомеостаз в организме [11]. Другими словами, все ферменты [3,11]) имеют дополнительную (promiscuous) каталитическую активность или субстратную специфичность – латентную или охарактеризованную, это свойство фермента обеспечивает организму-хозяину возможность адаптации под давлением естественного отбора. Обобщение многолетних исследований показывает, что усиление дополнительной каталитической активности не обязательно сопровождается снижением уровня основной активности, по крайней мере на начальных стадиях формирования нового фермента [3,7]. Это противоречит распространенной точке зрения о том, что широкая субстратная специфичность достигается за счет снижения каталитической активности фермента. На сегодня принята следующая теория возникновения новых ферментов: они развиваются из дополнительной (латентной) активности, дупликация генов и последующая дивергенция приводят к накоплению вариантов фермента с более эффективной дополнительной активностью, далее через промежуточные формы с широкой субстратной специфичностью из одного узкоспецифичного фермента получается новый узкоспецифичный фермент [3,11]. Сходным путем под давлением естественного отбора и из широкоспецифичного фермента (generalist) может возникнуть новый узкоспецифичный фермент (specialist) [3]. Можно обобщить, что для успешного выживания организму целесообразно иметь в своем протеоме как узкоспецифичные ферменты-specialists, так и широкоспецифичные ферменты-generalists [7,12,13].

Компьютерный анализ метаболизма штамма *E. coli* K-12MG1655 с построением полномерной математической модели метаболической системы клетки показал, что 1081 фермент (ферментный комплекс) задействован в этой системе, из них 677 ферментов-specialists катализируют 454 уникальные реакции, а 404 фермента-generalists катализируют 859 метаболических реакций с разнообразными субстратами. Таким образом, от общего числа ферментов 37% ферментов-generalists катализируют 65% неспонтанных (конститутивных) метаболических реакций [12]. Ферменты-generalists активно используются в организмах именно в своей функции: из них 11% катализируют две и больше реакций (catalytic promiscuity) в метаболизме модельного штамма и 89% активны с разными по свойствам субстратами (substrate promiscuity) [12]. При этом ферменты-generalists – это «медленные» ферменты по сравнению с ферментами-

specialists, которые характеризуются высоким сродством к субстрату и высокими скоростями катализируемых реакций [3,12]. Здесь и возникает ряд вопросов эволюционной биохимии: Почему одни широкоспецифичные ферменты эволюционно стабильны, а другие превращаются в узкоспецифичные? Почему клетке нужны оба типа ферментов? Компьютерный анализ метаболизма *E. coli* и других одноклеточных организмов, археи *Methanosarcina barkeri* [14], эукариот *Saccharomyces cerevisiae* [15] и *Chlamydomonas reinhardtii* [16] показал, что *in vivo* изменения среды обитания влияют на специализацию ферментов. Потребность в более эффективном метаболическом потоке (metabolic flux) может создавать эволюционное давление на организм, направленное на повышение скорости ферментативной реакции и снижение необходимой концентрации фермента за счет повышения сродства к субстрату. Такие потребности приводят к усилению какой-либо одной активности и подавлению других у широкоспецифичного «медленного» предшественника. Так возникают узкоспецифичные ферменты. Исследования подтвердили, что ферменты-specialist поддерживают более высокую скорость метаболического потока, при более низких концентрациях, следовательно специализация ферментов приводит к снижению энергетических затрат на синтез белка и, в итоге, окупает энергетические затраты на дубликацию генов [13,17]. Моделирование изменений в среде обитания клетки приводит, в первую очередь, к изменению в уровне экспрессии узкоспецифичных ферментов, и доля этих ферментов среди продуктов экспрессии (essential genes) становится выше [12], т.е. набор узкоспецифичных ферментов жизненно важен для существования клетки в динамической среде обитания [18][19]. Таким образом, в эволюционной энзимологии приняты на сегодня ряд гипотез. (1) При дубликации гена с последующей специализацией продукта его экспрессии – фермента адаптация метаболизма клетки к изменениям в среде происходит эффективнее, чем при комплексной оптимизации нескольких реакций, катализируемых одним широкоспецифичным ферментом. (2) Флюкс через узкоспецифичные ферменты регулируется эффективнее, чем через широкоспецифичные ферменты. То есть, в динамической среде клетке выгодно иметь набор узкоспецифичных ферментов для контроля метаболизма и набор широкоспецифичных ферментов для эффективной адаптации [13]. (3) Узкоспецифичные ферменты-specialists обеспечивают центральный метаболизм и процессы деления клетки, ферменты-generalists с широкой субстратной

специфичностью доминируют среди транспортных белков, биосинтеза муреинов, метаболизма липидов, утилизации нуклеотидов и детоксификации [12]. (4) В каждом классе ферментов представлены как узкоспецифичные, так и широкоспецифичные ферменты.

## 1.2. ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫЕ ОРГАНИЗМЫ КАК ИСТОЧНИКИ СТАБИЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

### 1.2.1. Биоразнообразие архей и экстремофильных бактерий

40 лет назад Карлом Вёзе (K. Wöse) с сотрудниками предложили трехдоменную систему клеточных форм жизни и построили первое филогеномное древо жизни, в основании которого сосуществуют Бактерии и общие предки Эукариот и Архей [20,21].

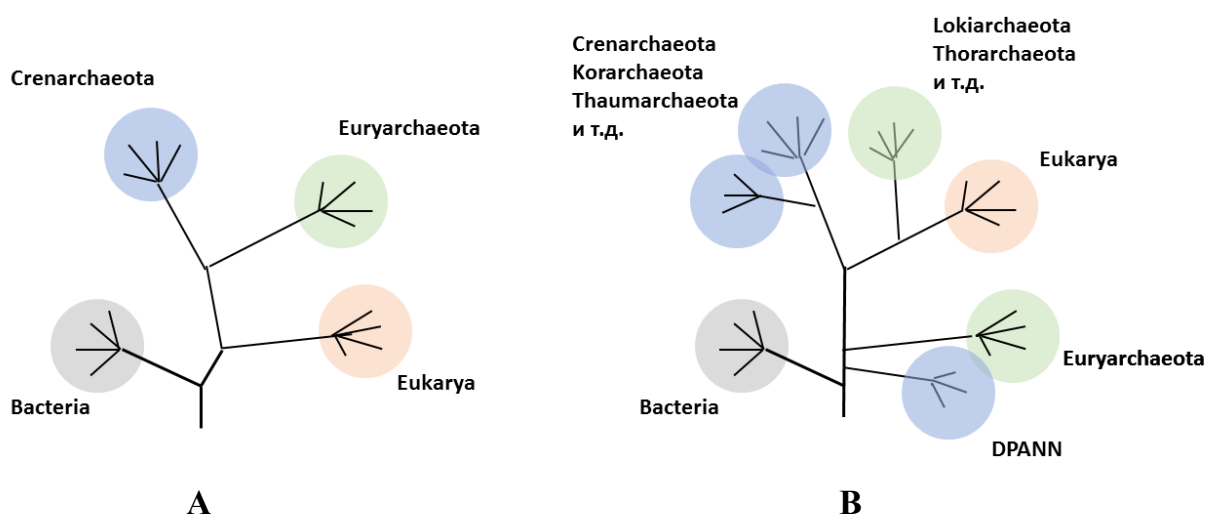


Рис. 1.1. Древо жизни. (А) Первоначальный вид, предложенный К. Вёзе: в основании дерева Бактерии, Эукариоты и Археи произошли от общего предка. (В) Современный вид: Бактерии и Археи – самые древние обитатели Земли. Археи представлены четырьмя суперфилумами: Euryarchaeota, DPANN (Diapherotrites, Parvarchaeota, Aenigmarchaeota, Nanoarchaeota and Nanohaloarchaeota), Asgard (Lokiarchaeota и т.д.), TACK (Crenarchaeota и т.д.).

Клетки Архей и Бактерий во многом различаются, среди наиболее изученных различий: строение клеточной стенки (S-слой), мембранные липиды, РНК-полимераза, использование немодифицированного остатка метионина для запуска трансляции и т.д. [22,23]. Первые сведения об археях появились в 1958 году, когда были описаны микроорганизмы, наполняющие коровий рубец [24]. Это были метаногены. А в 1967 году Томас Брок (Т. Brock) впервые опубликовал описание микроорганизмов из горячих

источников Йеллоустонского национального парка [25]. Так возникло представление об археях как о метаногенах и анаэробах, обитающих при высоких температурах. Современные исследования значительно расширили наши представления как о биоразнообразии архей, так и об их метаболических системах. Например, для Эуриархей показано, что они не только синтезируют метан, но и способны к обратному процессу – анаэробному окислению метана, и даже к анаэробному окислению других короткоцепочечных углеводов, что делает их роль в биогеохимическом цикле более сложной и разнообразной [26,27]. В 1990 гг. благодаря повышению эффективности ДНК секвенирования и возможности компьютерного анализа результатов секвенирования метагеномов были описаны новые филумы архей и двух первоначально определенных филумов Эуриархей и Кренархей стало недостаточно для описания всего разнообразия Архей (Рис. 1.1) [28].

Дальнейшие исследования зон обитания с экстремальными условиями (горячих источников вулканического происхождения на поверхности земли, гидротермальных источников на дне океана, соленых озер, зоны вечной мерзлоты и т.д.) позволили обнаружить самые разнообразные экстремофилы: микроорганизмы, существующие и размножающиеся в неблагоприятных для человека зонах обитания. Так были выделены в отдельные группы термофилы (среда обитания +60-80 °С), гипертермофилы (среда обитания +80-110 °С), и холодоактивные микроорганизмы (-20 - +10 °С). Галофилы, способные выживать в воде, насыщенной солью (выше 5М NaCl). На сегодня экстремофилы включают самые разнообразные по свойствам микроорганизмы, в том числе барофилы, пьезофилы, алкалофилы и ацидофилы и т.д. [22,29]. Эти организмы являются источником удивительных по свойствам ферментов, которые обладают стабильностью в экстремальных условиях, обеспечивая жизнедеятельность их организмов-хозяев. Такие ферменты являются интересными объектами изучения и перспективными биокатализаторами для биотехнологии. Интересно, что большинство микроорганизмов горячих источников – это археи, что в некоторой степени является также аргументом в пользу их древнего происхождения (возможно, археи древнее бактерий). Далее рассмотрим подробнее некоторые из экстремальных свойств у различных ферментов. В настоящее время представленность архей и бактерий в разных экстремофильных нишах самая разнообразная, что объясняется процессами адаптации, которые эффективно происходят в обоих доменах жизни.



## 1.2.2. Ферменты из экстремофильных организмов: молекулярные основы стабильности ферментов

### 1.2.2.1. Термостабильные ферменты

Микроорганизмы вида *Methanopyrus* (*Methanopyrus kandleri*), которые способны к росту при температуре до 122 °С и давлении до 20 МПа, установили температурный предел жизни на нашей планете [30]. Важно также отметить, что гипертермофилы являются неисчерпаемым источником ферментов для биотехнологии, не просто потому что предлагают термостабильные аналоги уже охарактеризованных ферментов, но и потому что имеют в своем составе ферменты с уникальными неизученными свойствами, гипертермофилы уникальны сами по себе [31].

Традиционно и с большой долей уверенности принято считать, что термофильные и гипертермофильные микроорганизмы – это первые и самые древние жители планеты. Кроме того, термофильность может быть приобретенной в результате адаптации к экстремальным условиям среды обитания. Термостабильные ферменты могут сформироваться в результате мутагенеза или оказаться в клетке в результате латерального переноса гена. И.Березовский и Е.Шахнович опубликовали в 2005 г. работу [32], где проанализировали структуры (плотность контактов, распределение а.о. по элементам структуры и т.д.) и последовательности репрезентативного набора гипертермостабильных ферментов и предложили два основных механизма термостабилизации на молекулярном уровне: структурный («structure-base») – это когда белковая глобула компактна, плотность контактов высокая (например, в белках из архей рода *Pyrococcus* плотность контактов достигает 139 контактов на а.о.), при этом никакие из взаимодействий (электростатические, Ван-дер-Ваальсовы (2.5-5.0 Å), гидрофобные) не преобладают. Во втором механизме стабилизации по последовательности («sequence-base») ключевая роль отведена солевым мостикам (до 4.0 Å) и ионным парам вообще (до 6.5-7.0 Å). Авторы сравнили «structure-base» стабилизированные ферменты из гипертермостабильных архей (*Thermus thermophiles*, *Pyrococcus furiosus*), ферменты из мезофильных организмов (*E. coli*, *Clostridium pasteurianum*, *Synechococcus elongates* и т.д.) и «sequence-base» стабилизированные ферменты из гипертермофильных бактерий, реколонизировавших горячие источники (*Aquifex aeolicus*, *Thermotoga maritima*). Сравнивалось количество Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий на один а.о., количество

а.о., задействованных в образовании элементов вторичной структуры, состав аминокислотной последовательности и количество водородных связей на а.о. Оказалось, что в ферментах из архей *T. thermophiles*, *P. furiosus* доля Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий и количество водородных связей больше, что при меньшем объеме белковой глобулы приводит к высокой плотности контактов (в среднем при анализе идентифицированных белков – 139 контактов на а.о.), также наблюдается увеличение количества а.о. в составе  $\alpha$ -спиралей и, например, для ферментов из архей *P. furiosus* – увеличение доли гидрофобных остатков (по-видимому, они вносят вклад в плотность упаковки белковой глобулы). Ферменты из гипертермофильных архей имеют больший процент идентичности по последовательности с мезофильными аналогами, чем ферменты из бактерии *T. maritima*. Ферменты, стабилизированные по «sequence-base» механизму, из *T. maritima* [33] и *A. aeolicus* [34] отличаются низким уровнем сходства по последовательности с мезофильными гомологами и большей долей именно заряженных а.о. в последовательности. Ферменты из *T. maritima* не отличаются по объему белковой глобулы от аналогичных мезофильных гомологов, но при этом имеют высокий процент заряженных а.о. и повышенное число а.о., формирующих  $\alpha$ -спирали. В «sequence-base» механизме стабилизации кулоновские взаимодействия (солевые мостики и ионные пары) обеспечивают целостность белковой глобулы при высоких температурах: кулоновские взаимодействия центрально симметричны и с ростом температуры снижение энергетических затрат на десольватацию зарядов больше, чем снижение энергии кулоновских взаимодействий, это приводит к росту эффективности электростатических взаимодействий при повышении температуры, что и определяет их стабилизирующий эффект [35–37]. Кроме «structure-base» и «sequence-base» механизмов, наблюдаются разнообразные комбинированные формы стабилизации, включающие описанные механизмы в разных пропорциях. В то же время отдельные ферменты из термофильных бактерий *Bacillus thermoproteolyticus*, *T. maritima* и *A. aeolicus* имеют высокий уровень сходства по последовательности с мезофильными аналогами и не отличаются избытком заряженных остатков в последовательности. То есть им свойственна стабилизация по структурному типу («structure-base»), которая, как принято считать, является характеристикой архейных ферментов. По-видимому, это – скорее особенность ферментов, возникших при высокой температуре, а не

адаптировавшихся к ней. Возможно, эти ферменты были заимствованы у архей или древних термофильных бактерий.

#### *1.2.2.2. Галотолерантные и галофильные ферменты*

Галотолерантность и галофильность – два свойства ферментов, связанных с устойчивостью и активностью в солевых растворах (от 0.2 до 5.2 М NaCl). При этом галофильные ферменты денатурируют в воде или при низких концентрациях NaCl. Галотолерантность характеризует способность ферментов из негалофильных организмов функционировать при высокой соли и иногда наблюдается как дополнительный бонус к термостабильности. Галофильность – свойство ферментов и белков из галофильных организмов, в которых цитоплазма изотонична окружающей солевой среде. Среди структурных факторов, определяющих галофильность ферментов принято выделять (1) избыток отрицательно заряженных остатков на поверхности белковой глобулы (Glu и Asp), что приводит к рI белка 4.0÷5.0 и (2) снижение гидрофобности поверхности белковой глобулы в основном за счет замены остатков Lys на Ala и другие небольшие гидрофобные и полярные остатки [38,39]. На сегодня нет однозначного понимания достоинства такой организации поверхности для стабилизации белка в солевых растворах. Одно из первых предположений состояло в том, что отрицательно заряженные боковые группы Glu и Asp наиболее гидратированы среди всех а.о. и связывают гидратированные ионы Na<sup>+</sup>, тем самым создавая прочную гидратную оболочку, необходимую ферменту для функционирования в среде с низкой активностью воды. Однако сравнительный анализ структур галофильных ферментов и их негалофильных аналогов показал, что гидратные оболочки их существенно не отличаются по размеру [38,40–42]. Другое объяснение механизма адаптации состоит в том, что мощный отрицательный заряд на поверхности фермента снижает её гидрофобность и, тем самым, препятствует агрегации. При этом стабилизация поверхности галофильного белка с избыточными отрицательно заряженными группами достигается их гидратированием и связыванием ионов Na<sup>+</sup>. Однако следует отметить, что ассоциированных ионов Na<sup>+</sup> на поверхности кристаллических структур галофильных белков не обнаружено, возможно, это связано с недостаточным разрешением при сборе рентгеноструктурных данных и, как следствие, невозможностью отделить ионы натрия от молекул воды. Объяснение галофильности еще впереди.

### *1.2.2.3. Ферменты, стабильные в водно-органических средах*

Пожалуй, наиболее важное для биотехнологического производства свойство фермента – это устойчивость его в растворах, содержащих органические растворители, как смешивающиеся с водой, так и несмешивающиеся.

Стабильность белковой глобулы и активность ферментов в водно-органических смесях явление наблюдаемое, но пока трудно объяснимое структурными особенностями и аминокислотным составом белков [43–45]. Смешивающиеся с водой органические растворители – мощный денатурирующий агент, который проникает в гидратную оболочку фермента путем замещения молекул воды и нарушает гидрофобные взаимодействия, обеспечивающие целостность гидрофобного ядра фермента [45–47]. Замещение молекул воды в гидратной оболочке также вызывает агрегацию белков, а внедрение молекул растворителя в активный центр нарушает критические для катализа водородные связи, электростатические взаимодействия и замещает каталитически важные молекулы воды [48–50]. Интересно, что стабильностью в водно-органических средах отличаются термостабильные и галофильные ферменты, то есть белки с избыточным содержанием заряженных остатков на поверхности [43,51,52]. Еще раз следует отметить, что избыток заряженных остатков в белковой последовательности вызывает образование на поверхности разветвленной сети солевых мостиков и водородных связей, увеличение числа внутренних водородных связей, общее увеличение числа нековалентных взаимодействий, в том числе водородных связей с молекулами воды и электростатических контактов с диполями молекул воды [53–56]. Таким образом, баланс цельности структуры и конформационной подвижности молекулы белка, свойства ее гидратной оболочки напрямую зависят от количества заряженных групп в составе ее аминокислотной последовательности и на поверхности глобулы. Из очевидных структурных факторов стабилизации ферментов в водно-органических средах можно назвать способность фермента поддерживать целостность своей гидратной оболочки. Очевидно, что заряженные остатки на поверхности глобулы наиболее эффективно аккумулируют молекулы воды в силу эффективности кулоновских взаимодействий заряд – диполь, что, по-видимому, и делает заряженные группы эффективными агентами против разрушительного проникновения молекул растворителя в гидратную оболочку и на поверхность глобулы [50,57].

Для липазы А из *Bacillus subtilis* была показана важность введения поверхностных зарядов для устойчивости к органическим растворителям [57]. В то же время стабильность в водно-органической среде умеренно термостабильной алкогольдегидрогеназы из *Rhodococcus ruber* была приписана компактности белковой глобулы, гидрофобной поверхности, а также усилению димерного контакта солевыми мостиками [58]. Анализ структур белков, полученных из кристаллов, выращенных в присутствии органических растворителей, показал, что структуры белков в водно-органических смесях по существу такие же, как у тех же белков, закристаллизованных в водных буферных системах [49,59–61]. Для устойчивых в водно-органических средах ферментов отмечены также дисульфидные связи и гидрофобные области на поверхности, однако, роль последних не ясна [43,62]. Стоит отметить, что для некоторых ферментов наблюдается активация при введении органических растворителей в реакционную смесь [45,51,52,63,64]. Предположительно, активация достигается в результате изменения механизма катализа или снятия избыточного напряжения в структуре, оптимизации ее конформационной подвижности в водно-органической среде.

#### *1.2.2.4. Холодоактивные ферменты из психрофильных и психротолерантных организмов*

Истинно холодоактивных ферментов известно мало, большинство холодоактивных ферментов скорее приспособились, как и их организмы-хозяева, к работе при температурах ниже 15 °С. В целом, адаптация ферментов к работе при низкой температуре обратна адаптации к работе при высоких температурах и достигается снижением общего количества взаимодействий в белковой глобуле и, в особенности, в активном центре. Денатурация холодоактивных ферментов отличается кооперативностью, что указывает на ограниченное количество взаимодействий, поддерживающих активную конформацию фермента, их разрушение приводит к единовременному разрушению всей пространственной структуры фермента [65]. Из структурных факторов стабилизации активной конформации у холодоактивных ферментов принято рассматривать следующие: (1) кластеризация остатков Gly, обеспечивающая локальную гибкость отдельной области структуры, (2) положение остатков Gly в области активного центра в функционально значимых участках, (3)

количество остатков Pro в петлях у холодоактивных ферментов ниже, чем у термостабильных гомологов, то есть стратегия адаптации направлена на обеспечение большей подвижности отдельных участков структуры. Несмотря на снижение эффективности гидрофобных взаимодействий при низких температурах, отмечен рост доли гидрофобных аминокислот (Ala, Cys, Gly, Val и Met) в последовательности холодоактивных ферментов, то есть суммарно эффективность гидрофобных взаимодействий в структуре холодоактивных ферментов поддерживается на сравнимом с мезофильными гомологами уровне, при этом они собраны в кластеры, единого гидрофобного ядра у холодоактивных ферментов не наблюдается [66]. Также снижено количество остатков Arg, то есть солевые мостики скорее единичны на поверхности ферментов и не образуют разветвленной сети ионных пар.

Сравнивая свойства термостабильных и холодоактивных ферментов Дж. Феллер (G. Feller) пришел к следующему заключению: холодоактивные ферменты имеют структуру пониженной стабильности, однако ее денатурация скорее обратима, что связано с малой эффективностью гидрофобных взаимодействий при низких температурах и, как следствие, снижению скорости агрегации [67].

### **1.3. ФЕРМЕНТЫ С БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ: ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ И ТРАНСАМИНАЗЫ**

#### **1.3.1. Алкогольдегидрогеназы: механизм действия и структура**

Алкогольдегидрогеназы (ADH; EC 1.1.1.X.) катализируют обратимое превращение спиртов в альдегиды или кетоны, используя разнообразные кофакторы (NAD(P), FAD или F420/Zn/PQQ). NAD(P)-зависимые ADH подразделяются на четыре группы: короткоцепочечные ( $\approx 250$  аминокислот на субъединицу, **SDR**), среднецепочечные Zn-зависимые ( $\approx 350$  аминокислот на субъединицу, **MDR**) и длинноцепочечные, активируемые ионами  $Fe^{3+}$  ( $\approx 350-550$  аминокислот на субъединицу, **LDR**) и имеют в структуре домен Россманна [68] для координации NAD(P) [69,70]. ADH четвертой группы – альдо-кеторедуктазы (**AKR**) связывают кофермент NAD(P), не имея в структуре домена Россманна [71]. Разнообразие оксидоредуктаз по пространственной структуре, коферменту и субстратной

специфичности указывает на их значимость в метаболизме архей, бактерий и эукариот [70,72–74]. Обобщенно функция NAD(P)-зависимых АДН сводится к окислению спиртовой группы (в метаболизме липидов, аминокислот, гормонов и т.д.), некоторые АДН проявляют высокую активность в реакциях с субстратами галогенидами, сахарами, имидами и т.д. АКР преимущественно восстанавливают альдегиды и кетоны до спиртов, то есть выполняют функцию детоксификации [70,71]. Взаимопревращение спиртов и альдегидов сопровождается переносом протона и двух электронов, то есть АДН являются компонентом системы регуляции восстановительного потенциала клетки [73]. Разнообразие субстратной специфичности и энантиоселективности делает АДН перспективными объектами для биотехнологии как биокатализаторы синтеза оптически активных спиртов [75–77], для производства биотоплива на основе разветвленных спиртов C4-C5 и в каскадных процессах [78,79], включающих окисление спиртовой группы или восстановление альдегидной, а также детоксификацию избыточных количеств альдегидов [80,81]. Регенерация кофермента, а также поддержание стабильности фермента в водно-органических смесях являются неотъемлемой частью разработки биокатализаторов в том числе и с участием АДН. Имеется ряд проектов, в которых косубстрат для регенерации кофермента (2-пропанол или ацетон – субстрат обратной реакции) является и растворителем для субстрата прямой реакции [82]. В. Кроутил (W. Kroutil) с соавторами [83,84] выделил АДН из *Rhodococcus ruber* DSM 44541, которая катализировала асимметрическое восстановление кетонов в водно-органической среде с концентрацией 2-пропанола 50% (v/v) и 20% (v/v) ацетона. Такой подход позволяет эффективно смещать равновесие в нужную сторону в результате перевода кофермента в исходную форму. Выход в реакции восстановления для ряда гидрофобных кетонов достигал 94% [84].

SDR отличаются высокой структурной гомологией при уровне сходства аминокислотных последовательностей 15÷30%. Структурный и кинетический анализ SDR наиболее детально проведен для алкогольдегидрогеназы из *Drosophila lebanonensis* (DADH [85,86]); 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -гидроксистероид дегидрогеназы из *Streptomyces hydrogenans* (3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -HSDH, [87]), и 7 $\alpha$ -гидроксистероид дегидрогеназы из *Escherichia coli* (7 $\alpha$ -HSDH, [88]). Отличительной особенностью SDR являются однодоменная структура субъединицы: домен Россмана формируется N-концевой частью последовательности, активный центр и сайт связывания субстрата формируются остатками C-концевой части

последовательности [69,72]. Активный центр представлен триадой остатков Tyr-Lys-Ser, и в дополнение к ним консервативным остатком Asp, задействованным в системе переноса протона «proton relay system». В «классических» SDR можно выделить два характеристических мотива TGxxx[AG]xG для связывания NAD(P) и каталитический YxxxK [70]. В настоящее время, кроме классических SDR упоминаются «extended», «divergent», «intermediate» и «complex» SDR [70,73,89]. Эти разновидности SDR также содержат в активном центре остаток Tyr, который выступает в роли общего основания, и координируют кофермент остатками, уложенными в домен Россмана с некоторыми структурными вариациями. Механизм действия SDR представлен на Схеме I.

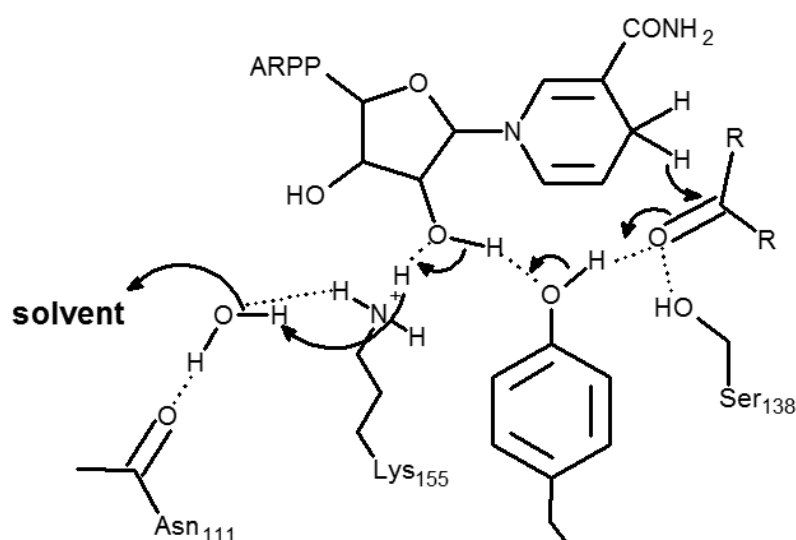


Схема I. Схема механизма реакции SDR [69]. ARPP – фрагмент аденозин-рибоза-пирофосфат.

Катализируемая SDR реакция протекает по упорядоченному Vi-Vi механизму с образованием тройного комплекса, при этом кофермент связывается первым и покидает активный центр последним. Кофермент связывается в вытянутой конформации, обеспечивая «4-proS» перенос гидрид-иона [90]. Для сравнения, в MDR кофермент связывается зеркальным образом, обеспечивая «4-proD» перенос гидрид-иона [90,91]. Основными субстратами SDR являются соединения со спиртовой и кето- группами, однако могут быть субстратами и соединения с двойными связями: C=C и C=N, а также среди SDR встречаются ферменты с сульфотрансферазной, изомеразной и декарбоксилазной активностью [69,70,92–96].



Каталитический остаток тирозина выполняет функцию общего основания/кислоты в реакции окисления/восстановления, кислотные свойства остатка Tyr усиливаются остатком Lys, присутствие которого при содействии окисленного положительно заряженного NAD(P) снижает рКа гидроксильной группы тирозина до 7.54. ε-аминогруппа Lys также включена в связывание кофермента через координацию рибозы никотинамидной части NAD(P) [69,70,88]. Остаток Ser предположительно задействован в координации и поляризации карбонильной группы субстрата. Другой консервативный остаток Asn, расположенный на αЕ-спирали, организует систему сброса протона с остатка Lys; «proton relay system» в SDR устроена так, что соединяет по системе водородных связей гидроксильную группу тирозина с окружающей водной средой [69,88,97]. Большинство SDR – димеры или тетрамеры: в большинстве структур межсубъединичный димерный интерфейс образуется в результате формирования пучка α-спиралей или протяженного через две субъединицы β-листа, в формировании одного активного центра задействованы остатки одной субъединицы. Известна только одна мономерная форма SDR, в структуре которой есть вставка из 20 а.о., образующих α-спираль, которая стабилизирует другие α-спирали, формируя пучок как, в димерном интерфейсе [70,98,99]. Можно сделать вывод, что димеризация в SDR приводит к стабилизации структуры субъединицы, обеспечивая прочность активной конформации молекулы фермента.

Семейство SDR впечатляет функциональным разнообразием, что указывает, по мнению некоторых авторов, на древнее эволюционное происхождение этого семейства ферментов. Кроме того, обращает внимание доминирующая представленность узкоспецифичных SDR, что ограничивает их биотехнологический потенциал. Для биотехнологических целей сохраняет актуальность поиск и характеристика широкоспецифичных SDR, устойчивых к воздействию высоких температур и органических растворителей. Именно такой тип ферментов является хорошей стартовой моделью для получения биокатализатора с заданными свойствами.

### **1.3.2. Альдегиддегидрогеназы: механизм действия и структура**

Альдегиддегидрогеназы (AIDH, EC 1.2.1.X) – NAD(P)-зависимые оксидоредуктазы, катализируют окисление альдегидов до карбоновых кислот. Классические

AIDH включают кроме неспецифичных альдегиддегидрогеназ, узкоспецифичные ретинальдегидрогеназу, 10-формилтетрагидрофолат-дегидрогеназу, нефосфорилирующую глицеральдегид 3-фосфат дегидрогеназу, сукцинат-полуальдегид дегидрогеназу и т.д. Для некоторых AIDH была показана эстеразная активность, которая реализуется в активном центре апоформы фермента, также эстеразная активность наблюдается и в присутствии NAD(P) [100–102]. Кроме того, есть еще AIDH-подобные ферменты (ацилирующие CoA, фосфорилирующая  $\gamma$ -глутамилфосфатредуктаза) и «псевдоферменты» как AIDH16 человека, в которой отсутствует каталитический остаток цистеина и которая предположительно имеет функцию связывания [103].

Для классических AIDH методом стационарных концентраций был установлен тип механизма: упорядоченный Vi-Vi механизм (compulsory ordered bi-bi mechanism) [104,105]. Нефосфорилирующие AIDH на стадии деацилирования переносят ацилфрагмент на воду или CoA (Схема II). Кинетический анализ и исследование структур AIDH и мутантов показали, что ферментативное окисление альдегидов происходит в три стадии: ацилирование каталитического цистеина с образованием тиогемиацетала, перенос гидрид-иона на кофермент с образованием тиоэфира и деацилирование тиоэфира с образованием карбоновой кислоты.

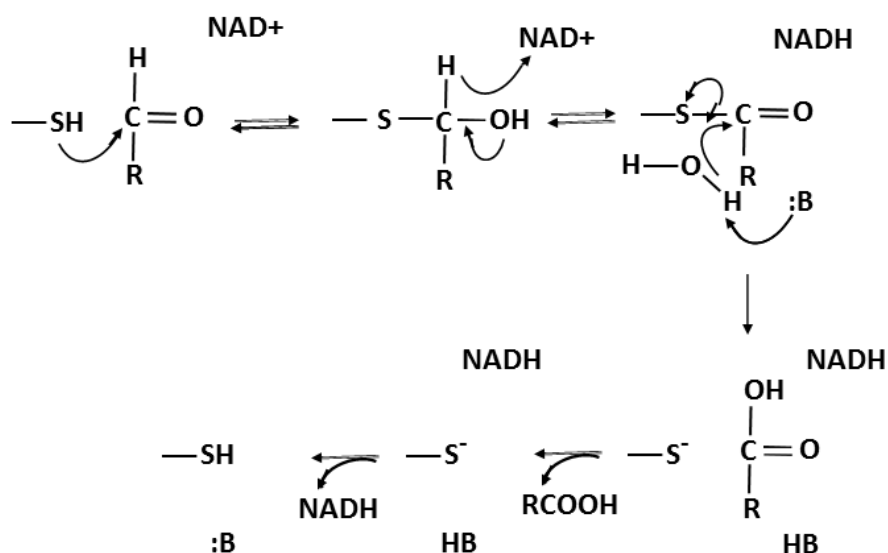


Схема II. Механизм катализа AIDH, предложенный на основе кинетического анализа реакций, катализируемых бетаин-альдегиддегидрогеназой [104].

Окисление альдегидов AIDH происходит по единому механизму независимо от субстратной специфичности и роли фермента в метаболизме организма-хозяина. Остаток Cys является консервативным для классических AIDH.

Охарактеризованные AIDH различаются локализацией в клетке, субстратной специфичностью и биологической функцией, среди которых – детоксификация (окисление альдегидов [106,107]), метаболизм (карбогидратный метаболизм, метаболизм фруктозы и фенилаланина в *E.coli* [106–109] и т.д.), биосинтез (синтез ретиноевых кислот у хордовых,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты у человека, синтез осмопротектора бетаина [107,110]). А также вспомогательные (некаталитические) функции: баланс NAD(P)H в клетке, структурные и регуляторные функции у человека [107,110]. Наиболее детально изучены AIDH человека, как составляющие причину различных патологий, AIDH из бактерий изучены меньше, но именно их исследование привело к установлению механизма действия фермента [111–114]. Архейные AIDH изучены в наименьшей степени и преимущественно в контексте карбогидратного метаболизма [101,115–117].

Для классических AIDH предложено и реализовано множество применений, например, разработаны биосенсоры для определения пестицидов [118,119], AIDH используются для получения спиртов из возобновляемого сырья в результате каскадных ферментативных процессов [120], а также для эффективной детоксификации загрязняющего природу формальдегида в составе промышленных отходов [121] и др. Перспективно использование AIDH для эффективной конверсии полученных из биологического сырья альдегидов фурана и его производных в компоненты для производства пластика, фармацевтических препаратов и фотогальванических элементов [122,123]. Разнообразное применение ставит вопрос о стабильности AIDH, деталях их механизма катализа, расширении спектра субстратной специфичности [124,125]. Для целей биотехнологии целесообразно рассматривать AIDH из прокариот и архей.

Функциональной единицей AIDH может быть димер, тетрамер или даже гексамер [126,127]. Поскольку активный центр AIDH формируется а.о. одной субъединицы и только в субстратном канале присутствуют а.о. соседней субъединицы, то считается, что олигомеризация определяет стабильность структуры фермента и влияет на субстратную специфичность AIDH [101,128,129]. Димерные AIDH отличаются удлинением C-

концевого участка, который, таким образом, препятствует димеризации димеров в тетрамер [126,127,129].

Субъединица AIDH включает три домена: кофермент связывающий домен, каталитический домен и домен олигомеризации (С-концевой фрагмент) [101,128]. Активный центр AIDH образован каталитическими остатками – Cys и Glu и несколькими инвариантными остатками, ответственными за связывание кофермента и стабилизацию промежуточных соединений [130–133]. Роль каталитического остатка Cys разными авторами трактуется однозначно: тиолат-ион атакует альдегид с образованием тиогемацетала, мутации по цистеину приводят к инактивации фермента [131,134,135]. Функция каталитического остатка Glu окончательно не установлена. Показано, что замена остатка Glu на Ala драматически снижает скорость деацилирования, увеличивает прочность комплекса фермента с NADP и уравнивает сродство фермента к окисленной и восстановленной формам кофермента [131,136]. По мнению большинства авторов Glu исполняет роль общего основания и активирует молекулу воды на стадии деацилирования [113,136,137]. Предполагается, но не доказан общесловесный катализ остатком Glu активации боковой группы каталитического Cys на стадии ацилирования [101,136,138].

Анализ пространственных структур AIDH показал конформационную подвижность каталитических остатков и никотинамидной части кофермента [130,137,139]. Различным стадиям механизма соответствуют различные комбинации Cys, Glu и кофермента в разных конформациях. Кофермент прочно фиксируется адениновой частью, пирофосфатной группой и обеими рибозами, а никотинамидная часть в доступных структурах AIDH не фиксирована [124,137,139]. Полностью упорядоченный кофермент наблюдается в холоформах неактивных мутантов. В кристаллических структурах NAD(P)-зависимых AIDH выделяют две конформации кофермента: “hydride transfer” (PDB код 1BPW [140]; PDB код 1EZ0, [133] и “hydrolysis” (PDB код 3JZ4 [141] и PDB код 1O02 [139]). Принято считать, что “hydride transfer” (extended) конформация NAD(P) соответствует стадии ацилирования и переносу гидрид-иона, а “hydrolysis” (contracted) конформация – стадии деацилирования [132–134,139]. Кроме того, в некоторых структурах кофермент находится в «out» конформации, когда никотинамидная часть располагается на поверхности белковой глобулы у входа в

полость связывания, это показано для лактальдегиддегидрогеназы из *E. coli* (PDB код 2ILU, [142]), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из *Streptococcus mutans* (SmAIDH, PDB код 2ESD, [135]) и альдегиддегидрогеназы из *Burkholderia xenovorans* (PDB код 2VRO [143]). Луиджи Констанцо (L. Costanzo) с соавторами [142] предположил, что «out» конформация является либо исходной конформацией NADP<sup>+</sup>, соответствующей его присоединению, либо финальной конформацией NADPH перед диссоциацией из активного центра. Согласно с конформациями кофермента, каталитические Cys и Glu принимают в структурах разные положения. Для Cys выделяют две конформации, когда тиольная группа направлена вовнутрь полости связывания кофермента и наружу [101,137]. Для каталитического Glu выделяют три упорядоченные конформации: “inside”, “intermediate”, “outside”. В первой карбоксильная группа направлена в активный центр и образует водородную связь с каталитическим цистеином, в двух других карбоксильная группа отвернута от активного центра и образует водородные связи с другими инвариантными остатками [101,137].

Нефосфорилирующие гидролитические AIDH необратимо окисляют альдегиды до карбоновых кислот, при этом ингибирование связывания окисленной формы NAD(P)<sup>+</sup> восстановленной формой кофермента NAD(P)H доказано только для бетаинальдегиддегидрогеназы из *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH) [144,145]. Предполагается, что существует механизм дифференцирования ферментом состояний окисления кофермента, который пока не ясен (отсюда Iso в названии механизма). Детальное исследование механизма дифференцировки было проведено Ярославом Цибовским (Y. Tsybovsky) с соавторами для 10-формилтетрагидрофолат дегидрогеназы из *Rattus norvegicus* (C<sub>1</sub>-FDH) [130,146]. В структуре фермента с NADP (PDB код 4GO2) авторы показали промежуточную ковалентную связь между атомом серы каталитического Cys и C4N атомом никотинамидного фрагмента, которая фиксирует кофермент в активной “hydride transfer” конформации (цистеин-никотинамидный аддукт) и, по их мнению, является индикатором состояния окисления кофермента [134,146]. Такой же аддукт ранее был предсказан квантово-механическими расчетами для ALDH2 [147]. В то же время для PaBADH похожий аддукт с C2N атомом никонамидного кольца зафиксирован в комплексе с NADPH и, по мнению авторов [144,145], отвечает за обратимое ингибирование фермента NADPH. В других

депонированных структурах с “hydride transfer” конформацией кофермента ковалентная связь сера-углерод не обнаружена.

### 1.3.3. Трансаминазы: механизм действия и структура

В структурах охарактеризованных на сегодня пиридоксаль-5'-фосфат (PLP)-зависимых ферментов выделяют семь типов (I-VII) трехмерной укладки белка, которые предположительно соответствуют пяти эволюционным линиям PLP-ферментов [148–150]. Независимо от типа укладки, PLP-зависимые ферменты – это  $\alpha/\beta$ -глобулярные белки с каталитическим остатком лизина в активном центре, который в холоформе фермента ковалентно связан с PLP. Ферменты разных типов укладки различаются пространственной организацией белковой глобулы и активного центра, ориентацией кофактора в активном центре и способом его координации. Кроме этого PLP-ферменты разных типов укладки и, что важно, ферменты разных классов с одним типом укладки отличаются составом и расположением а.о., формирующих активный центр и взаимным расположением ассиметричной молекулы кофактора и субстрата, что определяет регио- и стереоспецифичность катализируемой реакции и субстратную специфичность PLP-фермента. Таким образом, с одной стороны, всё разнообразие функций реализуется в ограниченном наборе (семь типов укладки) третичных структур, а с другой стороны, разнообразие ориентаций функциональных групп, задействованных в катализе и связывании субстрата и кофактора, обеспечивает специфичность и многообразие функций PLP-ферментов. PLP-зависимые ферменты являются ярким примером дивергентной эволюции на молекулярном уровне.

PLP-зависимые трансаминазы (ТА; аминотрансферазы; EC 2.6.1.X) катализируют обратимый стереоселективный перенос аминогруппы с амина/аминокислоты на кетон/кетокислоту/альдегид с получением хирального амина/аминокислоты и нового кетосоединения [151–154] (Схема III).

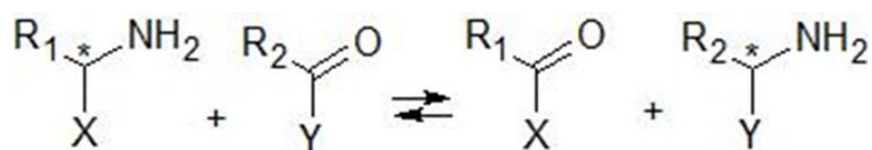


Схема III. Общая схема реакции ферментативного трансаминирования.

Ферментативное трансаминирование было открыто в конце 1930-х годов советским ученым Александром Евсеевичем Браунштейном и его сотрудниками в институте экспериментальной медицины имени А.М. Горького в Москве [154,155]. Результаты их исследований помогли решить ряд давних биохимических головоломок. Работа также впечатляет тем, что была проделана в условиях, которые, по собственному отзыву Александра Евсеевича были трудными в том числе из-за ограниченности реактивов.

Во всех организмах трансаминазы являются ключевыми ферментами метаболизма аминокислот. По типу трехмерной укладки трансаминазы относятся к I или IV типам PLP-зависимых ферментов [148,156]. Трансаминазы I типа укладки, называемые также трансаминазами суперсемейства аспартатаминотрансфераз (aspartate aminotransferase superfamily), многочисленны и разнообразны по субстратной и реакционной специфичности [153,157]. Трансаминазы IV типа укладки или суперсемейство D-аланинтрансаминаз (D-alanine transaminase superfamily) исследованы меньше и представлены тремя разными по свойствам семействами: трансаминазами D-аминокислот (ДААТ), трансаминазами разветвленных L-аминокислот (BCAT) и (R)-амин трансаминазами (R-TA) и 4-амино-4-деоксихоризмат лиазами (ADCL) [157–159].

#### *1.3.3.1. Механизм реакции и структура PLP-зависимых трансаминаз IV типа укладки*

Формально, реакция, катализируемая любой трансаминазой — это окислительное деаминирование субстрата-донора с последующим восстановительным аминированием субстрата-акцептора аминокислотной группы. Трансаминирование протекает по механизму «пинг-понг». Механизм трансаминирования был установлен в 1962 г. Сидней Велик и Джоном Вавра (S. Velick и J. Vavra) для аспартатаминотрансферазы (ААТ) из *сердца свиньи* [160] детали механизма уточнены для ААТ из *E. coli* в работах [161–165]. Обнаружения ключевых интермедиатов процесса, в реакциях, катализируемых разными трансаминазами, в том числе и BCAT, позволило сделать вывод об универсальности установленного механизма [156,163,166,167] (Рис. 1.2). Полная реакция есть сумма двух последовательных полуреакций.

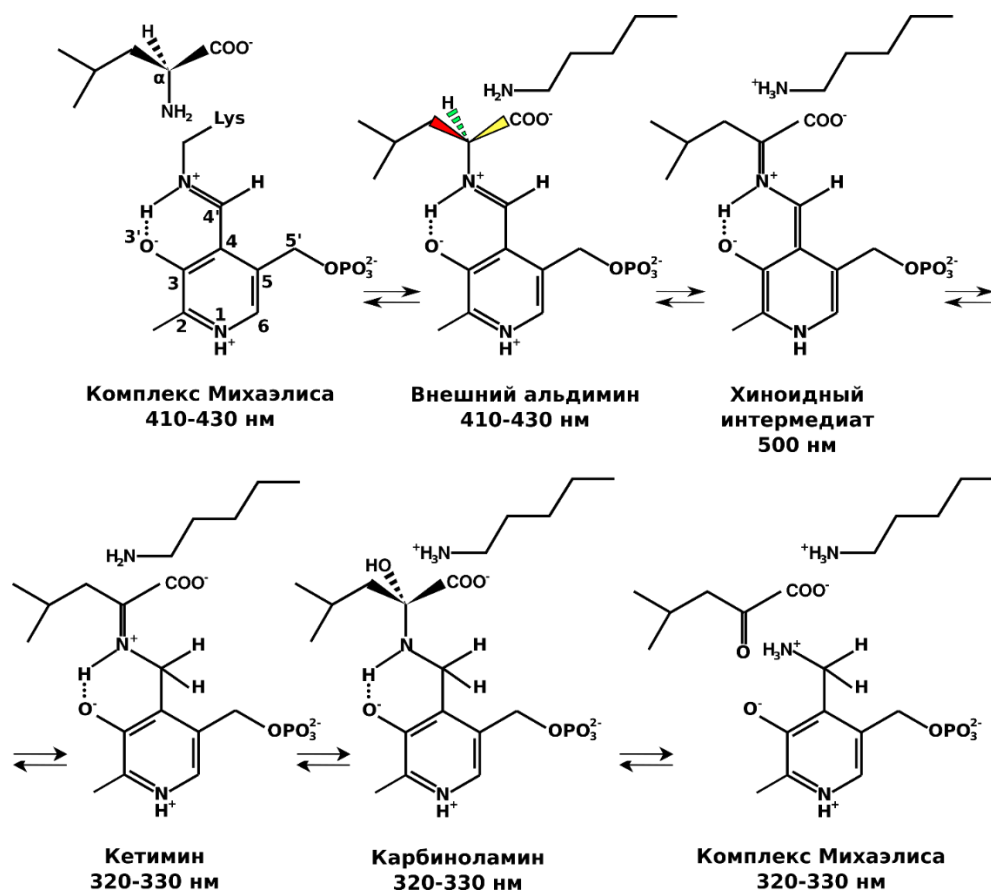


Рис. 1.2. Механизм реакции трансаминирования. Первая полуреакция сверху-вниз, вторая полуреакция – снизу-вверх.

В исходной холоформе трансаминазы молекула кофактора PLP ковалентно связана с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина, образуя основание Шиффа, так называемый внутренний альдимин (internal aldimine). Такая форма кофактора более реакционноспособна, чем исходная альдегидная форма PLP, потому что протонированный имин более электрофилен, чем альдегид ( $R_2C=NH_2^+ \gg R_2C=O$ ) в последующей реакции нуклеофильного замещения. Первым из субстратов в реакцию вступает аминокислота/амин, с образованием внешнего альдимина (external aldimine) по механизму нуклеофильного замещения  $\epsilon$ -аминогруппы лизина  $\alpha$ -аминогруппой субстрата у C4' атома кофактора. На следующей стадии происходит стереоспецифичный 1,3-перенос протона, катализируемый  $\epsilon$ -аминогруппой лизина по механизму общесосновного катализа. Кинетическими изотопными эффектами установлено, что эта стадия является скоростьлимитирующей [165]. 1,3-перенос протона происходит в две стадии, начинается с отщепления  $\alpha$ -протона внешнего альдимина, с образованием карбоаниона, одна из резонансных форм которого называется хиноидным интермедиатом [166,168], и затем протон с  $\epsilon$ -аминогруппы лизина переносится на C4'



атом кофактора с образованием кетимина. Существование хиноидного интермедиата было доказано спектрофотометрически для разных трансаминаз, накопление его происходит, например, вследствие введения направленных мутаций в активной центр фермента [166] или в реакции с «медленными» субстратами [168]. Изотопными эффектами также показано, что к С4' атому углерода кофактора необязательно присоединяется отщепленный  $\alpha$ -протон, происходит произвольное присоединение любого из четырех протонов  $\epsilon$ -аминогруппы каталитического лизина [169]. Далее молекула воды присоединяется к кетимину по двойной С=N связи при общесновном катализе  $\epsilon$ -аминогруппой лизина с образованием карбиноламина и последующим высвобождением кетокислоты и кофактора в форме пиридоксамин 5'-фосфата (PMP-форма пиридоксаль 5'-фосфата). Вторая полуреакция протекает в обратном порядке, строго через те же промежуточные соединения с образованием новой аминокислоты и регенерацией кофактора в исходную PLP-форму. Каждая стадия процесса стереоспецифична и обратима, поэтому трансаминирование сопровождается ингибированием как субстратами, так и продуктами, и для увеличения глубины превращения применяется вывод продуктов из реакции [80,170,171].

Промежуточные соединения, PLP- и PMP-формы трансаминазы имеют разные максимумы спектров поглощения, поэтому возможно наблюдать спектрофотометрически протекание полуреакции, точнее, один полуоборот фермента (Рис. 1.3).

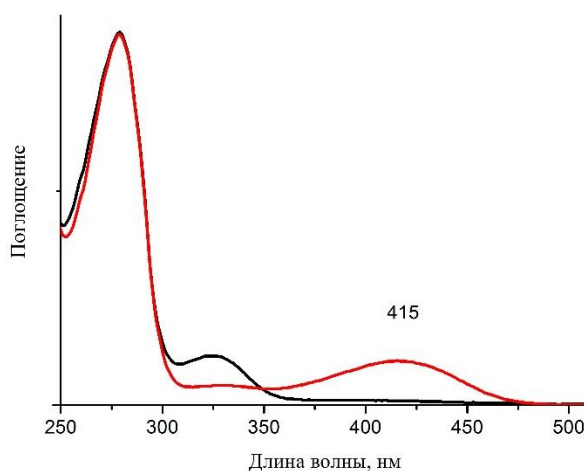


Рис. 1.3. Спектр поглощения PLP-(красный) и PMP- (черный) формы трансаминазы.

Поскольку сдвиг максимума происходит на стадии 1,3-переноса протона, то методами «быстрой кинетики» можно оценить скорость 1,3-переноса для различных субстратов. Однако 1,3-перенос протона не всегда является скоростьюлимитирующей стадией: в ряде исследований трансаминаз I типа PLP укладки есть указания на скоростьюлимитирующий гидролиз кетимина [172–174]. Также, для механизма действия BCAT из *Mycobacterium tuberculosis* было предложено, что 1,3-перенос протона происходит не последовательно в две стадии, а согласованно без образования хиноидного интермедиата. Это предположение было сделано на основе анализа изотопного эффекта растворителя на кинетический изотопный эффект в полуреакциях [175]. Катализируемое трансаминазами трансаминирование иногда сопровождается побочными процессами декарбоксилирования или рацемизации, которые также протекают через образование внешнего альдимины и карбоаниона (Рис. 1.2). Принцип, по которому в активном центре один процесс оказывается предпочтительнее другого, был впервые сформулирован Г.Дунатаном (H. Dunathan) в 1966 г. [163,176]. Согласно гипотезе Дунатана предпочтительнее разрыв той связи C $\alpha$  атома субстрата, которая перпендикулярна плоскости пиридинового кольца кофактора. Такая геометрия приводит к наиболее эффективной резонансной стабилизации p-орбитали карбоаниона, образующегося в результате разрыва любой из трех связей C $\alpha$  [176]. Кроме того, согласно структурным данным N1 атом пиридинового кольца PLP в холоформе многих трансаминаз протонирован. Это повышает электрофильность пиридинового кольца и, следовательно, усиливает стабилизацию карбоаниона [163]. У PLP-зависимых рацемаз в холоформе N1 атом PLP депротонирован, что, предположительно, приводит к снижению стабилизации карбоаниона и повышению эффективности рацемизации [177,178].

Активный центр всех PLP-зависимых трансаминаз образован аминокислотными остатками соседних субъединиц (далее первая и вторая субъединицы), поэтому наименьшей функциональной единицей трансаминаз является гомодимер [156]. Большинство трансаминаз в растворе димеры (Рис. 1.4). Однако описаны BCAT и R-TA гексамеры (тримеры димеров) в растворе [179,180] или даже тетрамер (димер димеров) [181]. До сих пор остается непонятным, являются ли гексамерные и тетрамерные формы значимыми для функциональности трансаминаз или это только фактор стабилизации белковой глобулы трансаминазы. Далее по тексту везде будут рассматриваться димеры трансаминаз.

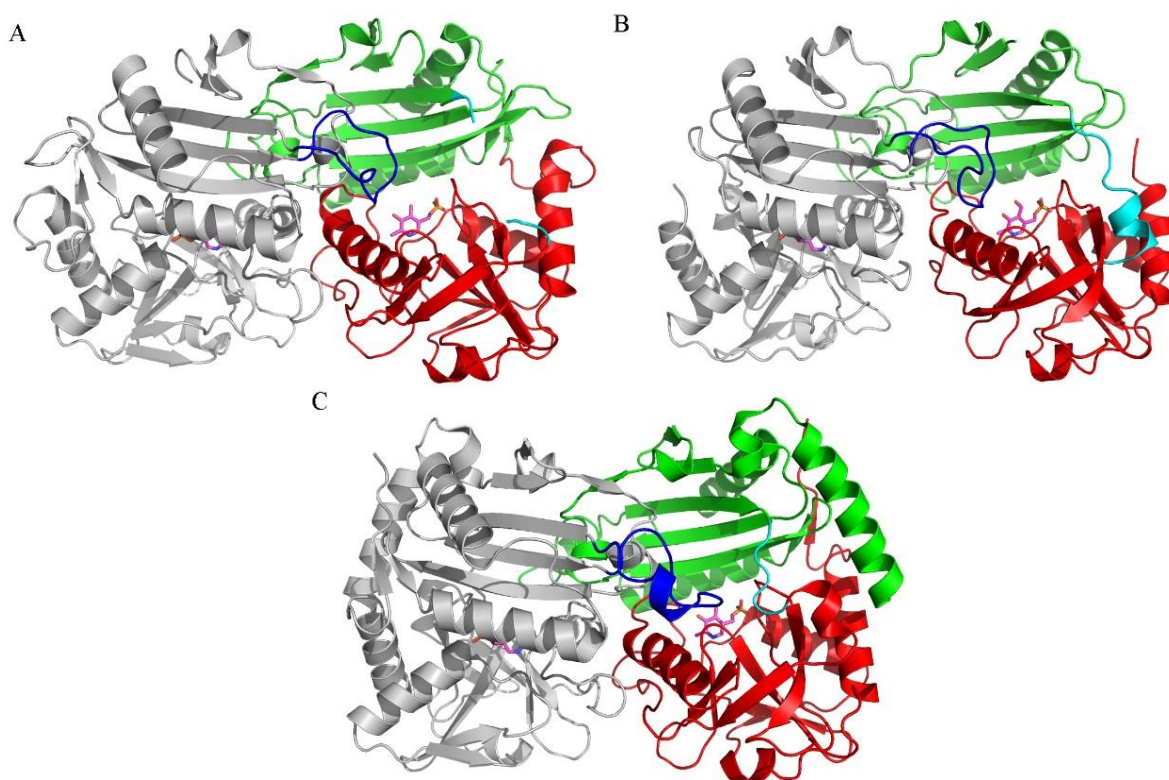


Рис. 1.4. Общий вид функциональных димеров трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена: (A) - BCAT, (B) - DAAT, (C) – R-TA.

Субъединицы известных семейств трансаминаз IV типа PLP укладки состоят из двух доменов, соединенных междоменной петлей: **малый N-терминальный домен**  $\alpha/\beta$ -структуры и **большой C-терминальный домен** со структурой псевдобарреля (Рис. 1.4). Активный центр располагается в щели, образованной остатками. обоих доменов первой субъединицы и остатками малого домена второй субъединицы димера [182–185]. Таким образом, каждый димер имеет два идентичных активных центра, молекула PLP образует основание Шиффа с  $\epsilon$ -аминогруппой каталитического остатка Lys в активном центре. Ряд высоко консервативных остатков стабилизируют и координируют молекулу PLP через систему консервативных взаимодействий: (1) водородная связь N1 атома пиридинового кольца с боковой группой консервативного остатка Glu (у некоторых R-TA с остатком Asp), (2) водородные связи фосфатной группы кофактора с остатками Arg, Thr и молекул растворителя [182,185,186] Рис. 1.5.

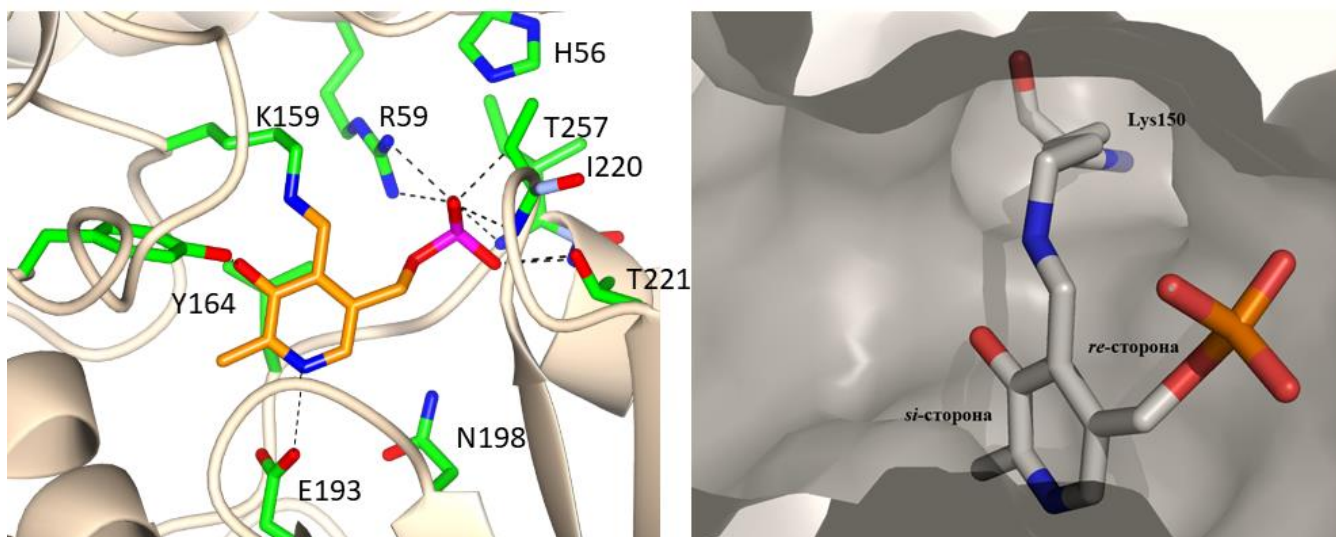


Рис. 1.5. Координация кофактора PLP в активном центре трансаминазы разветвленных L-аминокислот из *E. coli* (PDB код 1HK) (слева). Кофактор образует основание Шиффа с остатком Lys159. Две стороны кофактора: *si*-стороной кофактор обращен в субстратный канал (справа)

У всех трансаминаз IV типа PLP укладки, молекула PLP обращена к белковой глобуле *re*-стороной (*si*-сторона направлена ко входу в активный центр), то есть 1,3-перенос протона каталитическим остатком Lys происходит на *re*-стороне PLP. Консервативный остаток Glu, который образует водородную связь с N1 атомом пиридинового кольца PLP, усиливает электроноакцепторный эффект пиридинового кольца, тем самым, стабилизируя промежуточный карбоанион [163]. Интересно, что фенольная O3' группа PLP образует консервативную водородную связь с аминокислотным остатком, высококонсервативным и специфичным для BCAT, DAAT, и R-TA, который, предположительно, также контролирует электронное состояние PLP во время катализа [161,178,187]. Фенольная и фосфатная группы кофактора дали название O- и P- сторонам, соответственно [188].

Активный центр трансаминаз IV типа PLP укладки удачно описывается комбинацией двух карманов: O-кармана на O-стороне PLP и P-кармана на P-стороне PLP. Ковалентно связанная молекула PLP располагается между двумя карманами против входа в активный центр (Рис. 1.6). Остатки  $\beta$ X- и  $\beta$ Y-тяжей  $\beta$ -листа первой субъединицы (оранжевый) формируют одну сторону и дно обоих карманов. Из-за жесткости структуры  $\beta$ -листа, его остатки ограничивают размеры карманов и, как следствие, размеры субстрата.

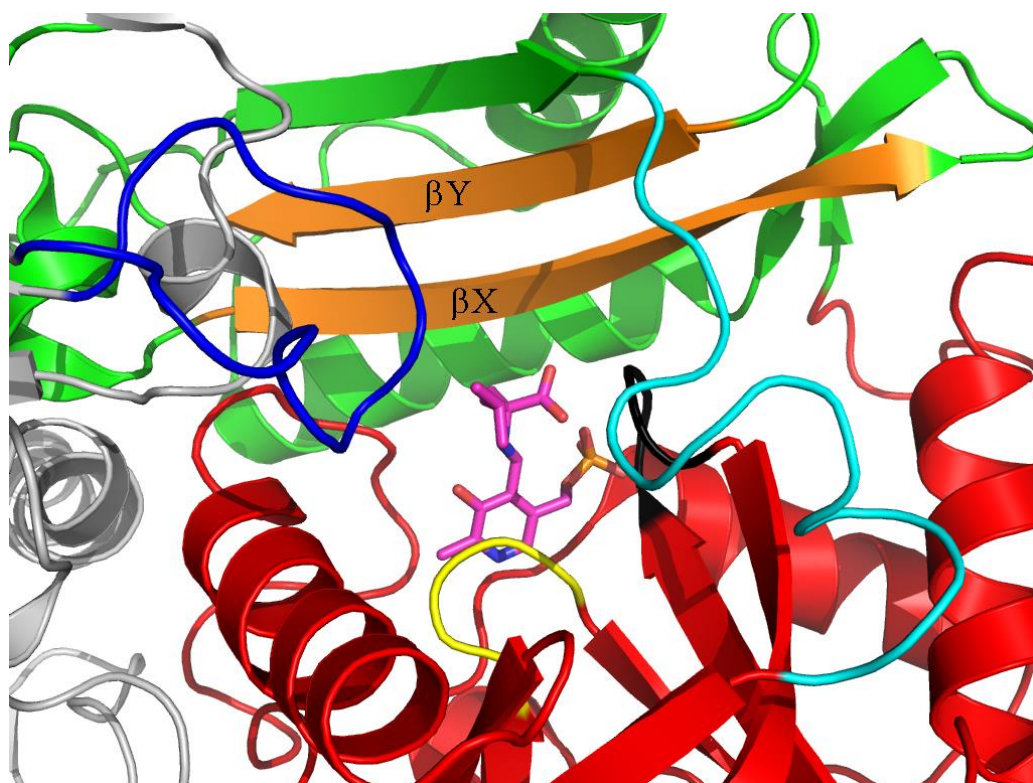


Рис. 1.6. Активный центр PLP-зависимой трансаминазы IV типа укладки на примере структуры димера комплекса ТА из *E. coli* с 2-метиллейцином (PDB код: 1H1L). Малый и большой домены первой субъединицы выделены зеленым и красным цветами, соответственно. Соседняя субъединица функционального димера выделена серым цветом. Основные формирующие вторичные элементы структуры:  $\beta$ X- и  $\beta$ Y-тяжи выделены оранжевым цветом,  $\beta$ -повороты I и II выделены черным и желтым цветами, соответственно, междоменная петля первой субъединицы выделена голубым цветом, O-петля выделена синим цветом. Внешний альдимин (ковалентное соединение PLP и 2-метиллейцина) окрашен в розовый цвет

**Междоменная петля** (светло-голубой) и  **$\beta$ -поворот** (черный) большого домена первой субъединицы ограничивают Р-карман справа и сверху. Этот  $\beta$ -поворот также участвует в формировании входа в субстратный канал. И, наконец, **O-петля** второй субъединицы (темно-синий) димера дополняет O-карман и закрывает его от растворителя. Остатки, формирующие O-петлю, рассматриваются как важные для реализации субстратной специфичности трансаминазы IV типа PLP укладки [178,182,186,189,190]. В целом у трансаминаз IV типа PLP укладки размер активного центра и входа в него регулируются длиной и аминокислотным составом как междоменной, так и O-петли. В структурах холоформ эти петли разупорядочены, однако, они видны в структурах комплексов, то есть связывание субстрата приводит к их упорядочиванию [178,183,191,192].

Строгая стереоселективность присоединения аминогруппы и энантиомерный избыток продукта ферментативной реакции является следствием однозначного связывания, которое диктуется положением молекулы PLP и аминокислотными остатками, формирующими O- и P- субстрат-связывающие карманы, которые определяют их свойства и размер. Структурные детерминанты субстратной специфичности трансаминаз будут рассмотрены ниже.

### 1.3.3.2. Субстратная специфичность PLP-зависимых трансаминаз IV типа укладки

Трансаминазы IV типа укладки PLP-связывающего домена различаются субстратной специфичностью, имея сходные по строению активные центры и высокую гомологию структур димеров. BCAT являются (*S*)-селективными трансаминазами, к (*R*)-селективным трансаминазам относятся DAAT и R-TA (Схема IV).

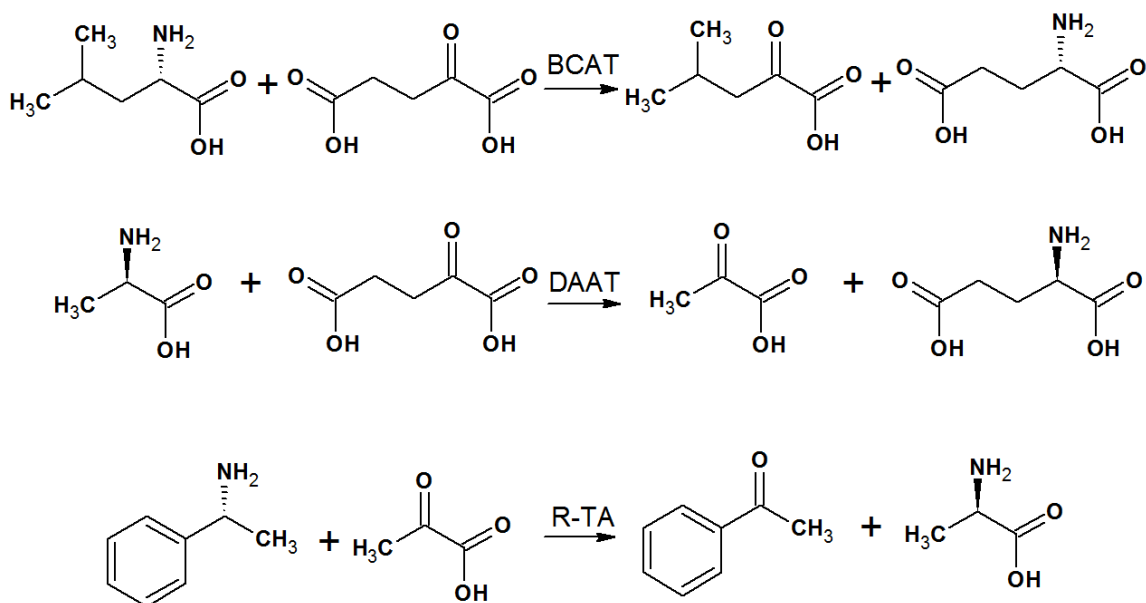


Схема IV. Типичные реакции TA IV типа укладки PLP-связывающего домена.

Строгая (*R*)- и (*S*)-селективность реализуются внутри геометрически сходных активных центров за счет различных свойств формирующих их аминокислотных остатков, обеспечивающих присоединение кетосубстрата в проR-(проD-) или проS-(проL-) положении [178,186,193–195]. 4-амино-4-деоксихоризмат лиазы (ADCL) не переносят аминогруппу, они катализируют отщепление пирувата от 4-амино-4-деоксихоризмата с образованием *p*-аминобензоата в биосинтезе салициловой кислоты [196,197].

Уникальная (*R*)-стереоселективность трансаминаз IV типа PLP укладки делает их привлекательными объектами для разработки процессов промышленного асимметрического (*R*)-аминирования. Разработка стадии ферментативного (*R*)-аминирования кетопредшественника ситаглиптина в промышленном синтезе ситаглиптина [198–200] наглядно продемонстрировала эффективность применения R-TA в биотехнологических процессах и стимулировала дальнейшие разработки в этой области [170,201–204]. Одна из главных трудностей применения трансаминаз, включая R-TA, состоит в узком диапазоне природных кетосубстратов, который в основном ограничивается  $\alpha$ -кетокислотами [205,206]. Другой трудностью является термодинамическое равновесие реакции трансаминирования (Схема IV), которое смещено в сторону образования кетонов [206–209]. Эти объективные трудности преодолеваются поиском новых трансаминаз, созданием биокатализаторов методом рационального дизайна и разработкой путей вывода продуктов из реакции [210,211]. Представители семейств ВСАТ и DAАТ не применяются до настоящего времени в биотехнологических процессах индустриального масштаба, производство D- и L-аминокислот основано на химическом и микробиологическом синтезах [212]. Однако за последнее время предложен ряд биотехнологических проектов с применением DAАТ и ВСАТ в каскадных реакциях для синтеза неприродных аминокислот, в том числе производных глутаминовой кислоты для фармакологических целей [170,202,212–215].

В 2010 г. группа проф. Уве Борншойера (U. Bornscheuer) разработала *in silico* алгоритм определения субстратной специфичности у трансаминаз IV типа PLP-укладки на базе анализа *последовательность-структура* известных ВСАТ и DAАТ и 5000 белковых последовательностей, аннотированных как трансаминазы IV типа PLP укладки [193]. Авторы выделили два характеристических мотива, идентификация которых в последовательностях предполагаемых трансаминаз позволяет предсказать тип субстратной специфичности (Таблица 1.1).

Применение подхода *in silico* позволило авторам идентифицировать новые R-TA [170,193,216].

Таблица 1.1. Два характеристических мотива в последовательностях трансаминаз IV укладки PLP-связывающего домена, определяющие тип субстратной специфичности по [193].

	Мотив 1	Мотив 2	Нумерация соответствует:
BCAT	<sup>31</sup> Y <sub>XXXX</sub> F[ED]G <sub>X</sub> [KR] <sup>40</sup>	<sup>95</sup> Y <sub>X</sub> R <sup>97</sup> ... <sup>107</sup> [LMVI]G[VL] <sup>109</sup>	BCAT из <i>Escherichia coli</i> (eBCAT)
DAAT	<sup>26</sup> F <sub>XXXX</sub> Y <sub>X</sub> V[IVA][KR] <sup>35</sup>	<sup>86</sup> H <sub>X</sub> Y <sup>88</sup> ... <sup>98</sup> [RK] <sub>X</sub> H <sup>100</sup>	DAAT из <i>Bacillus sp.</i> YM-1
R-TA	<sup>53</sup> H <sub>XXXX</sub> YD[VT] <sub>X</sub> [STANP] <sup>62</sup>	<sup>113</sup> [FY]V[EQAWNS] <sup>115</sup> ... <sup>126</sup> [RKFGP] <sub>X</sub> [STANER] <sup>128</sup>	R-TA из <i>Nectria haematococca</i>
ADCL	<sup>21</sup> FGDGCFTTAR <sup>30</sup>	<sup>78</sup> VLK <sup>80</sup> ..... <sup>90</sup> RGY <sup>92</sup>	ADCL из <i>E. coli</i>

Охарактеризованные BCAT относятся к бактериальным и эукариотическим ферментами, среди архейных есть только сведения о выделении одной BCAT из *Methanococcus aeolicus* [217]. BCAT (2.6.1.42) уникальны своей специфичностью к разветвленным L-аминокислотам, тем более что (S)-специфичность присуща трансаминазам I типа PLP-укладки [157,195,218]. Спектр аминсубстратов BCAT включает кроме разветвленных L-аминокислот (BCAA) L-метионин, L-глутамат и их кетоаналоги [180,218,219], ароматические L-аминокислоты and L-аланин/пируват менее активные субстраты (Таблица 1.2).

Структурный анализ канонической BCAT из *E. coli* (eBCAT, PDB код 1IYE) показал, что в активном центре α-COОН группа любых субстратов связывается в Р-кармане, а боковая группа в О-кармане. Среди охарактеризованных трансаминаз I и IV типа PLP укладки, только в активном центре BCAT отрицательно заряженная α-COОН группа субстрата располагается рядом с фосфатной группой кофактора. М. Гото (M. Goto) и соавторы предположили, что электростатическое отталкивание между этими группами может быть важным для первой стадии реакции – образования внешнего альдимины [178]. У охарактеризованных BCAT βX- и βY-тяжи сходны по аминокислотному составу (Таблица 1.3): в составе фрагментов аминокислотной последовательности формирующих их есть характеристический мотив 1 (Таблица 1.1) и триада <sup>95</sup>Y<sub>X</sub>R<sup>97</sup> характеристического мотива 2 (нумерация eBCAT). Поляризованная боковой группой Arg97, фенольная группа Tyr95 образует консервативную водородную связь с α-COОН группой субстрата в Р-кармане.



Примечательно, что остаток Pro98 рядом с остатком Arg97 фиксирует геометрию триады и, по-видимому, поддерживает её оптимальную конформацию для образования прочной водородной связи.

Таблица 1.2. Кинетические параметры реакции трансаминирования, катализируемой трансаминазами IV типа укладки PLP-связывающего домена [175,179,180,189,190,217,219–223]. н/о – не определяли.

ТА	Субстраты	$K_m$ , mM	$k_{cat}$ , s <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_m$ , s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup>
BCAT из <i>E. coli</i>	L-лейцин	2.2 (25 °C)	48	22000
	α-кетоглутарат	6.6 (25 °C)	48	7300
	L-фенилаланин	0.89 (25 °C)	2.9	3300
	пируват	56.8 ± 1.8 (37 °C)	4.88 ± 0.17	90
BCAT из <i>M. tuberculosis</i>	L-лейцин	6.02 ± 0.94 (37 °C)	6.72 ± 0.42	1116
	α-кетоглутарат	6.95 ± 1.44 (37 °C)	6.4 ± 0.56	920
	α-кето-γ-метил- тиобутират (L-Met)	6.07 ± 0.3 (25 °C)	8.7 ± 0.1	1433
BCAT из <i>M. aeolicus</i>	L-лейцин	1.1 ± 0.02 (37 °C)	н/о	н/о
	α-кетоглутарат	0.6 ± 0.1 (37 °C)	н/о	н/о
ДААТ из <i>Bacillus</i> sp. YM-1	D-аланин	2 (37 °C)	254	127000
	α-кетоглутарат	6.7 (37 °C)	260	38800
	D-глутаминовая кислота	1.4 ± 0.4 (37 °C)	0.5 ± 0.1	357
	пируват	2.08 ± 0.08 (37 °C)	0.58 ± 0.01	279
R-ТА из <i>F. oxysporum</i>	R-МВА	11.15 ± 0.2 (25 °C)	0.093 ± 0.003	8.4
	пируват	14.4 ± 0.6 (25 °C)	0.087 ± 0.007	5.9
R-ТА из <i>Arthrobacter</i> sp. KNK168	R-МВА	2.62 (30 °C)	н/о	н/о
	пируват	5.8 ± 0.1 (30 °C)	14 ± 0	2400 ± 100
G136F вариант R- ТА из <i>Arthrobacter</i> sp.KNK168	пируват	1300 ± 100 (30 °C)	15 ± 1	12
R-ТА из <i>C. semiimmersa</i>	R-МВА	0.3 (30 °C)	0.156	520

Второй атом кислорода α-COOH образует две водородные связи с NH-группами остатков высоко консервативного β-поворота <sup>256</sup>GТАА<sup>259</sup> (Таблица 1.3) (Рис. 1.6). Эффективная для образования водородных связей поляризация NH-групп β-поворота достигается взаимодействием с боковой группой остатка Arg40 на βX-тяже, этот контакт рассматривается как характеристический для BCAT. В комплексах BCAT с субстратами (PDB код 1III и 3UZO) остаток Arg40 не только направлен в Р-карман, взаимодействуя с остатками β-поворота, но и фиксирует междоменную петлю в “закрытой” конформации. Междоменная петля защищает субстрат от взаимодействия с молекулами

растворителя, например, от рацемизации, и ограничивает размеры как Р-кармана, так и всей полости активного центра.

В комплексах ТА с ВСАА объемные боковые группы гидрофобных остатков междоменной петли взаимодействуют с гидрофобной боковой группой ВСАА, локализованной в О-кармане и, вместе с остатками О-петли эти боковые группы словно запечатывают субстрат в полости активного центра [178,191]. Кроме того, гидрофобные взаимодействия в закрытом О-кармане могут приводить к снижению диэлектрической проницаемости и, в результате, к повышению эффективности электростатических взаимодействий, что способствует стабилизации  $\gamma$ -СООН группы  $\alpha$ -кетоглутарата в О-кармане.

О-карман в ВСАТ больше Р-кармана и отличается чередованием гидрофобных и гидрофильных боковых групп а.о. его формирующих. Например, в еВСАТ эффективное связывание как  $\gamma$ -СООН группы L-глутаминовой кислоты ( $\alpha$ -кетоглутарата), так и гидрофобной группы L-лейцина достигается тем, что в О-кармане гидрофильные сайты связывания внедрены в гидрофобные стенки О-кармана (гуанидиновая группа Arg97, гидроксильные группы Tyr31\* и Tyr129, NH-группа основной цепи остатка Val109\*). Эти гидрофильные сайты фиксируют отрицательно заряженную группу  $\alpha$ -кетоглутарата и не препятствуют связыванию боковых групп природных ВСАА [178,182,224]. Фрагмент <sup>107</sup>[LMVI]G[VL]<sup>109</sup> характеристического мотива 2 (Таблица 1.1) расположен на О-петле. Длинная О-петля и междоменная петля закрывают О-карман от растворителя (Рис. 1.6).

Таблица 1.3. Аминокислотный состав структурных элементов, образующих активные центры трансаминаз IV типа PLP-укладки. Цветом выделены трансаминазы, охарактеризованные в диссертационной работе.

	PDB коды:*	$\beta$ X-тяж	$\beta$ Y-тяж	О-петля	Междоменная петля	$\beta$ -поворот в Р-кармане
BCAT из:						
<i>Escherichia coli</i>	1IIL 1I1K	<sup>34</sup> SVFEGIRCY <sup>42</sup>	<sup>94</sup> AYIRPLIF <sup>101</sup>	<sup>103</sup> GDVGMGVNPPAGYS <sup>116</sup>	<sup>125</sup> PWGAYLGAEALE <sup>136</sup>	<sup>256</sup> GTAA <sup>259</sup>
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	5MR0	<sup>30</sup> GVFEGIRAY <sup>38</sup>	<sup>86</sup> AYIRPIVT <sup>93</sup>	<sup>95</sup> GIGDLGLDPRKCQN <sup>108</sup>	<sup>117</sup> PWGKLYGDLYE <sup>127</sup>	<sup>245</sup> GTAA <sup>248</sup>
<i>Geoglobus acetivorans</i>	5E25	<sup>32</sup> GVFEGIRAY <sup>40</sup>	<sup>88</sup> AYIRPIVT <sup>95</sup>	<sup>97</sup> GAGDLGLDPRKCPS <sup>110</sup>	<sup>119</sup> PWGKLYGDLYE <sup>129</sup>	<sup>247</sup> GTAA <sup>250</sup>
<i>Thermus thermophilus</i>	1WRV 2EJ2	<sup>34</sup> SVFEGIRAY <sup>42</sup>	<sup>94</sup> CYIRPLAW <sup>101</sup>	<sup>103</sup> GAKALGVNPLPNNP <sup>116</sup>	<sup>125</sup> EWGAYLGEEAVR <sup>136</sup>	<sup>255</sup> GTAA <sup>259</sup>
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	3U0G	<sup>36</sup> GVFEGVRAY <sup>44</sup>	<sup>97</sup> CYLRPIIW <sup>104</sup>	<sup>106</sup> GSEKLGVSACKNT <sup>118</sup>	<sup>127</sup> PWGAYLGEEGLAK <sup>139</sup>	<sup>257</sup> GTAA <sup>260</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6NST	<sup>36</sup> EVFQGVRAY <sup>44</sup>	<sup>96</sup> AYIRPMVF <sup>103</sup>	<sup>105</sup> GSEGMGLRASGLK <sup>117</sup>	<sup>126</sup> SWGAYMGEEALQ <sup>137</sup>	<sup>256</sup> GTAA <sup>259</sup>
<i>Thermoproteus** uzoniensis</i>	5CE8	<sup>29</sup> GVFEGIRAY <sup>37</sup>	<sup>90</sup> LYIRPVAY <sup>97</sup>	<sup>99</sup> SKPQISLDVRLQ <sup>111</sup>	<sup>120</sup> PFGKYLKVEG <sup>129</sup>	<sup>247</sup> GTAA <sup>250</sup>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3HT5	<sup>75</sup> EVFEGLKAY <sup>83</sup>	<sup>143</sup> LYLRPFIF <sup>150</sup>	<sup>152</sup> TEPGLGVRPATN <sup>163</sup>	<sup>172</sup> PAGAYFKGGIA <sup>182</sup>	<sup>313</sup> GTAA <sup>316</sup>
<i>Deinococcus radiodurans</i>	3UYY	<sup>74</sup> QCFEGLKAY <sup>82</sup>	<sup>142</sup> LYLRPFVI <sup>149</sup>	<sup>151</sup> VGDNIGVRTAPE <sup>162</sup>	<sup>171</sup> PVGPYFKGGIT <sup>181</sup>	<sup>303</sup> GTAA <sup>306</sup>
DAAT из:						
<i>Bacillus sp. (strain YM-1)</i>	1DAA 3DAA	<sup>29</sup> GVYEYVVKVY <sup>37</sup>	<sup>85</sup> GHIYFQVT <sup>92</sup>	<sup>94</sup> GTSPRAHQFPENTVK <sup>108</sup>	<sup>118</sup> NPRPLENLEKG <sup>128</sup>	<sup>240</sup> STTS <sup>243</sup>
<i>Burkholderia thailandensis</i>	4TM5	<sup>40</sup> GVYEYVPIY <sup>48</sup>	<sup>105</sup> AIVYINVT <sup>112</sup>	<sup>114</sup> GVAKRGHAFPAHAV <sup>127</sup>	<sup>137</sup> LALPTDANRAN <sup>147</sup>	<sup>260</sup> SATK <sup>264</sup>
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	4PBC	<sup>48</sup> GVYEYVVPVY <sup>56</sup>	<sup>112</sup> ALVYLNVT <sup>119</sup>	<sup>121</sup> GVAKRGHAFPANAV <sup>134</sup>	<sup>144</sup> LRLPSEEERAKG <sup>155</sup>	<sup>257</sup> SATK <sup>270</sup>
<i>Lactobacillus salivarius</i> ***	-	<sup>31</sup> GCYDATTFK <sup>39</sup>	<sup>87</sup> GLLYWQTS <sup>94</sup>	<sup>96</sup> GSGLRNHIFPEDSQ <sup>109</sup>	<sup>118</sup> PYGLVPFDTE <sup>127</sup>	<sup>239</sup> SSAC <sup>242</sup>

Таблица 1.3. Продолжение.

	PDB коды:*	$\beta$ X-тяж	$\beta$ Y-тяж	O-петля	Междоменная петля	$\beta$ -поворот в P-кармане
R-TA из:						
<i>Aspergillus fumigatus</i>	4CHI 4UUG	<sup>56</sup> LYDVRVSVW <sup>64</sup>	<sup>112</sup> AFVEVIVT <sup>119</sup>	<sup>121</sup> GLTGVRGSKPEDLYNN <sup>136</sup>	<sup>144</sup> PYIWVMAPENQL <sup>155</sup>	<sup>273</sup> TTAG <sup>276</sup>
<i>Arthrobacter sp.KNK168</i>	3WWH	<sup>65</sup> VTYTVFHVW <sup>73</sup>	<sup>121</sup> AFVSVSITR <sup>129</sup>	<sup>131</sup> YSSTPGERDITKH <sup>143</sup>	<sup>153</sup> PYQWIVPFDRIR <sup>164</sup>	<sup>282</sup> TTAG <sup>285</sup>
<i>ATA-117-Rd11</i>	3WWJ	<sup>65</sup> ATYTTTFHVW <sup>73</sup>	<sup>121</sup> AMVTVSITR <sup>129</sup>	<sup>131</sup> YSSTPFERDITKH <sup>143</sup>	<sup>153</sup> PYQWIVPFDRIR <sup>164</sup>	<sup>282</sup> STGG <sup>285</sup>
<i>Nectria haematococca</i>	4CMD 4CMF	<sup>56</sup> LYDVPSVW <sup>64</sup>	<sup>112</sup> AFVELIVT <sup>119</sup>	<sup>121</sup> GLTGVRGAKPEELLNN <sup>136</sup>	<sup>144</sup> PYVWVMDPDVQY <sup>155</sup>	<sup>273</sup> TTAG <sup>276</sup>
<i>Aspergillus terrus</i>	4CE5	<sup>58</sup> LYDVPSVW <sup>66</sup>	<sup>114</sup> AFVELIVT <sup>121</sup>	<sup>123</sup> GLKGVGRTRPEDIVN <sup>137</sup>	<sup>145</sup> PYVWVMEPDMQR <sup>156</sup>	<sup>274</sup> TTAG <sup>277</sup>
<i>Exophiala xenobiotica</i>	6FTE	<sup>56</sup> LYDVPSVW <sup>64</sup>	<sup>112</sup> AFVEIVT <sup>119</sup>	<sup>121</sup> GLKGVRLKAGESLTN <sup>136</sup>	<sup>144</sup> PYIWVMEMQRT <sup>156</sup>	<sup>273</sup> TTAG <sup>276</sup>
TA с широкой субстратной специфичностью и с дополнительной активностью:						
<i>Curtobacterium pusillum</i>	5K3W	<sup>54</sup> GVFETIAVI <sup>62</sup>	<sup>114</sup> LFAKLILT <sup>121</sup>	<sup>123</sup> GIEGEGR <sup>129</sup>	<sup>139</sup> GEDFSQQLG <sup>148</sup>	<sup>270</sup> SSVR <sup>273</sup>
<i>Microbacterium ginsengisoli</i> ***	-	<sup>47</sup> GIFESIGVV <sup>55</sup>	<sup>102</sup> AVIKLILS <sup>109</sup>	<sup>111</sup> GIEHGPT <sup>117</sup>	<sup>125</sup> APNYARPRAE <sup>136</sup>	<sup>259</sup> SSVR <sup>263</sup>
<i>Thermobaculum terrenum</i>	6GKR 6Q8E	<sup>37</sup> AVFEGIRGY <sup>45</sup>	<sup>100</sup> VYIMPLAYA <sup>108</sup>	<sup>110</sup> GNKAFSVVGDR <sup>120</sup>	<sup>130</sup> PAVSRLEEDFS <sup>140</sup>	<sup>259</sup> GTHA <sup>262</sup>
<i>Haliangium ochraceim</i>	6H65	<sup>42</sup> SLFEGVRAY <sup>50</sup>	<sup>105</sup> VHLYVASY <sup>112</sup>	<sup>114</sup> GINHDPDPLFPTDD <sup>127</sup>	<sup>136</sup> AVSRLPLVHTG <sup>146</sup>	<sup>265</sup> GTIA <sup>268</sup>

\*В тексте PDB коды могут быть обозначением соответствующей трансаминаз;

\*\* - с широкой субстратной специфичностью;

\*\*\* Структурные элементы указаны согласно выравниваю последовательностей в BLAST

DAAT (EC 2.6.1.21) задействованы в биосинтезе D-глутаминовой кислоты, компонента пептидогликанов, формирующих клеточные стенки в бактериях. DAAT катализируют перенос аминогруппы с D-аланина на  $\alpha$ -кетоглутарат, образуя пируват и D-Glu [220,225,226]. Показано, что *in vitro* DAAT проявляют активность в реакциях с разными D-аминокислотами с  $\alpha$ -кетоглутаратом в роли аминоакцептора, но эффективность таких реакций значительно уступает эффективности природной реакции между D-Ala и  $\alpha$ -кетоглутаратом (Таблица 1.2) [222,227–229]. Недавно были охарактеризована DAAT из *Lactobacillus salivarius*, активная с разнообразными кетокислотами, включая кетобутират, индол-3-пируват, кетовареат и т.д. [230].

Функциональные димеры DAAT и BCAT гомологичны. До настоящего времени в деталях была исследована структура DAAT из *Bacillus sp.* штамм YM-1 (bsDAAT, PDB коды: 1DAA, 3DAA) [183,186]. В субъединицах bsDAAT и eBCAT элементы вторичной структуры, включая большинство петель, хорошо совмещаются (RMSD между C $\alpha$  атомами структур bsDAAT (PDB код 3DAA) и eBCAT (PDB код 1I1L) составило 1.35-1.39 Å). Более того, ориентация кофактора в холоформах bsDAATs и eBCAT и в комплексах также сходные (например, структуры с PDB кодами 1A3G и 1DAA, 3DAA и 1I1L). Тем не менее, в активных центрах идентичны только каталитический Lys и остатки, координирующие фосфатную группу PLP. Д. Пейсач (D. Peisach) и соавторы, проанализировавшие bsDAAT сделали заключение, что остатки Tyr31 (на  $\beta$ X) и Arg98\*, His100\* на O-петле (\* отмечен а.о. соседней субъединицы) определяют специфичность bsDAAT к D-аминокислотам [183]. Эти остатки образуют «карбоксилатную ловушку» для  $\alpha$ -COOH группы субстрата в O-кармане и, таким образом, определяют проD-позицию кетокислот, которая противоположна проL-позиции кетокислот в BCAT. Остатки Tyr31, Arg98\* и His100\* входят в состав характеристических мотивов (Таблица 1.1). Различия в размерах O-кармана BCAT и DAAT неочевидны, считается, что остатки Arg98\*-His100\* препятствуют связыванию объемных гидрофобных молекул в O-кармане DAAT [183,231].

В то время как  $\alpha$ -COOH группа D-аминокислоты связывается в O-кармане, боковая группа субстрата, предположительно, локализуется в P-кармане,

взаимодействуя с остатками  $\beta$ -поворота  $^{240}\text{STTS}^{243}$  (аналог GTAA  $\beta$ -поворота в ВСАТ, Таблица 1.3) и остатками  $\beta\text{X}$ -и  $\beta\text{Y}$ -тяжей [186]. Остатки, формирующие Р-карман, не консервативны среди известных ДААТ: в bsДААТ Lys35 на  $\beta\text{X}$ -тяже (аналог Arg40 в eВСАТ), предположительно, координирует  $\gamma$ -COOH  $\alpha$ -кетоглутарата, но этот остаток не встречается в других ДААТ (Таблица 1.3). Сравнение кинетических параметров (Таблица 1.2) показывает, что скорость аминирования  $\alpha$ -кетоглутарата bsДААТ не уступает скорости аминирования  $\alpha$ -кетоглутарата ВСАТ, хотя связывание  $\alpha$ -кетоглутарата в bsДААТ, очевидно, менее прочное. Особенностью Р-кармана bsДААТ является удаленная от центра позиция междоменной петли, то есть карман в исследованных структурах bsДААТ открыт растворителю.

R-ТА катализируют перенос аминогруппы с ароматического и алифатического первичных (*R*)-аминов на пируват с образованием кетона/альдегида и D-аланина. Принятыми для характеристики субстратами являются (*R*)-(+)-1-фенилэтиламин ((*R*)-(+)-1-phenylethylamine (R-PEA)), (*R*)-гексан-2-амин ((*R*)-hexan-2-amine), (*R*)-4-фенилбутан-2-амин ((*R*)-4-phenylbutan-2-amine), (*R*)-(-)-1-аминоиндан ((*R*)-(-)-1-aminoindane), (1*R*)-1,2,3,4-тетрагидронафтален-1-амин ((1*R*)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-amine) [179,184,189,232]. Недавно была описана R-ТА из *Exophiala xenobiotica*, которая активна в реакциях деаминирования объемных биарилкетонов [233]. Деаминирование аминов термодинамически выгодно; обратная реакция – аминирование кетонов возможна только при условии смещения равновесия в результате вывода продукта-аминина из реакции. Для этого предлагаются разнообразные способы [170,199,205,206,234]. D-аланин – неспецифический субстрат R-ТА, однако, он широко применяется как аминокислота в процессах аминирования кетонов, в ходе аминирования пируват удаляется из реакционной среды [170,189,232].  $\alpha$ -Кетокислоты – плохие субстраты для R-ТА [235]. R-ТА уступают ВСАТ и ДААТ по величине кинетических параметров типовых реакций. (Таблица 1.2). Однако суперактивная R-ТА – трансаминаза АТА-117-Rd11 была создана на основе R-ТА из *Arthrobacter* sp. [198,236] в результате 27 замен, введенных как в активный центр, так и на поверхность фермента. Итогом работы стал биокатализатор аминирования проситаглиптинового кетона, со скоростью (*R*)-

аминирования в 27000 раз большей, чем у исходной R-TA. Модифицированная АТА-117-Rd11 проявляла активность при концентрации субстрата 250 г/л в 50% DMSO при 50 °C [190,198].

Основное отличие между активными центрами охарактеризованных R-TA от ВСАТ и DAАТ состоит в организации Р-кармана, в котором нет сайта координации СООН группы. Р-карман R-TA образован гидрофобными остатками и связывает небольшие метильную и этильную группы субстратов [185,190,233,237]. В охарактеризованных R-TA объем Р-кармана снижен из-за объемных боковых групп остатков βУ-тяжа и междоменной петли (Таблица 1.3), последняя смещена в сторону кофактора, как в ВСАТ, тем самым влияя на размер и свойства Р-кармана. О-карман R-TAs сходен по свойствам и строению с О-карманом ВСАТ: он формируется чередованием гидрофобных и гидрофильных остатков (например, остатки His53\*, Tyr58, Phe113, Glu115, Arg126\*, Ile146, Leu181 и Trp183 в структуре 4СН1). В О-кармане связываются как α-СООН группа пирувата, так и гидрофобная группа (R)-амин. Подобно ВСАТ, активный центр R-TA ограничен как междоменной, так и О-петлей. О-петля в R-TA считается самой длинной среди рассматриваемых ТА (Таблица 1.3). Есть предположение, что это удлинение важно для субстратной специфичности R-TA [189,190,233]. Таким образом, отличительными особенностями структурной организации R-TA являются гидрофобный Р-карман наименьшего размера среди известных ТА IV-типа PLP укладки и объемный О-карман с удлиненной подвижной О-петлей, которая считается важной как для активности, так и для специфичности.

### *1.3.3.3. Широкая субстратная специфичность и дополнительная активность у трансаминаз*

Суперсемейства трансаминаз I и IV типа укладки PLP-связывающего домена объединяют ферменты с исключительно разнообразной субстратной специфичностью. При этом механизм переноса аминокислотной группы (механизм пинг-понг), остается неизменным независимо от свойств субстрата. Кроме деления на суперсемейства по субстратной специфичности, принято деление трансаминаз на α-трансаминазы (α-TA) и ω-трансаминазы (ω-TA) по способности переносить/присоединять аминокислотные группы в α-положении к карбоксильной группе

субстрата или на удалении от нее [157,238].  $\omega$ -ТА различаются специфичностью к  $\beta$ - ,  $\gamma$ - ,  $\epsilon$ -аминокислотам и кетокислотам, а также ароматическим и алифатическим (S)- и (R)-аминам, кетонам и альдегидам [158,239]. В работах Ф. Штеффена-Мюнсберга (F. Steffen-Munsberg) и соавторов выдвинуто предположение, что активность трансаминаз I типа PLP-укладки в реакциях с первичными аминами – это дополнительная к природной функция этих трансаминаз или “substrate promiscuity” [157]. Такое заключение основано на том, что специфичность к аминам и кетонам обнаружена у трансаминаз разных подсемейств:  $\omega$ -ТА [240], трансаминазы из *Bacillus anthracis* [241], GABA:пируват трансаминазы [239], трансаминазы из *Chromobacterium violaceum* [242],  $\beta$ -фенил:пируват трансаминаз [243,244] и т.д. Природная функция, так называемых, (S)-амин трансаминаз (S-АТА), по-видимому, просто не охарактеризована или низка (например, S-АТА из *Vibrio fluvialis JS17* [157,245]).

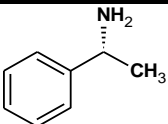
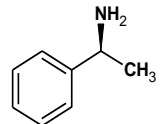
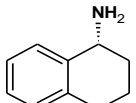
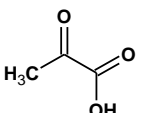
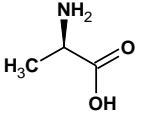
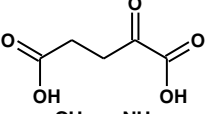
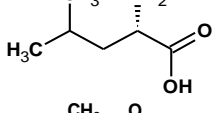
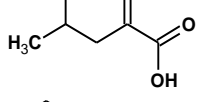
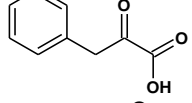
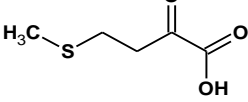
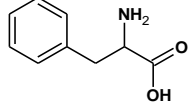
Штеффен-Мюнсберг с соавторами [157] разделили S-АТА I типа PLP укладки по активности в стандартной реакции с S-PEA и пируватом на активные трансаминазы «high activity» выше 0.5 U/mg и трансаминазы низкой активности «low active» ниже 0.5 U/mg. При этом связь между уровнем S-АТА-активности и природной функцией  $\omega$ -ТА неочевидна. Однако для «high active»/«low active» S-АТА были определены характеристические остатки, расположенные в активном центре на O-стороне субстратного кармана: Trp-Ala-Arg и Tyr-Ser(Thr)-Arg, соответственно. Последний в триаде «болтающийся» остаток аргинина «flipping arginine» является ключевым остатком в реализации механизма двойного субстратного узнавания у  $\omega$ -ТА I типа PLP укладки, его подвижность делает возможным связывание в одном активном центре пирувата,  $\omega$ -амино кислоты и гидрофобного амина [239,246]. Так, «high activity» S-АТА из *V. fluvialis JS17* со специфической активностью в стандартной реакции 48 U/mg [245] имеет характеристический мотив Trp57-Ala228-Arg415 (PDB код 4E3Q, [247]). «Low active» S-АТА, GABA:пируват трансаминаза из *Silicibacter* sp. TM1040 в стандартной реакции с S-PEA и пируватом проявляет активность 0.03 U/mg и имеет характеристический мотив Tyr59-Thr231-Arg420 (PDB код 3FCR [239]). В то же время,  $\omega$ -ТА из *Bacillus anthracis* с активностью в стандартной реакции 1 U/mg не



имеет упомянутых характеристических мотивов в О-кармане. Вместо них есть мотив Trp56-Gly224-Gly409 (PDB код 3N5M, [241]). Выявленные мотивы, по-видимому, не являются универсальными. Есть предположение, что подвижность остатков активного центра значима для проявления у трансаминаз специфичности к первичным аминам [248]. Отличительной особенностью (intrinsic property) истинных S-АТА считается способность катализировать реакцию аминирования кетонов [157,249]. Среди трансаминаз IV типа PLP-укладки недавно описаны трансаминазы, которые активны не только в реакциях с D- или L-аминокислотами, но могут дополнительно катализировать деаминирование первичных (R)-аминов. Такие трансаминазы отличаются от ВСАТ, DAАТ и природных R-ТА аминокислотным составом характеристических мотивов (Таблица 1.3). В настоящее время их известно четыре, и две из них охарактеризованы в рамках представленной работы и будут подробно рассмотрены в главе Результаты. Широкая субстратная специфичность или дополнительная активность с первичными (R)-аминами была показана для трансаминаз *CpuТА1* из *Curtobacterium pusillum* [249], *MgiТА1* из *Microbacterium ginsengisoli* [249], ТаТТ из *Thermobaculum terrenum* [250] и НО3033 из *Haliangium ochraceum* [251]. Трансаминазы *CpuТА1* и *MgiТА1* проявляют свойства DAАТ и R-ТА, трансаминазы ТаТТ и НО3033 проявляют свойства ВСАТ и R-ТА (Таблица 1.4). Примечательно, что ТаТТ и НО3033 катализируют реакцию переноса аминогруппы с первичного (R)-амина на кетокислоту с образованием L-аминокислоты. Такая формальная инверсия оптической активности может найти применение в каскадных процессах [202,213]. Однако ни для одной из перечисленных трансаминаз IV типа PLP укладки пока не удалось подобрать условия для реакции конверсии кетонов в оптически активные амины.

$\alpha$ -СООН группа субстрата связывается в О-кармане активного центра DAАТ и R-ТА в результате взаимодействия с положительно заряженными остатками, формирующими О-петлю. Но в активном центре *CpuТА1* таких остатков на О-петле нет, кроме того, О-петля в *CpuТА1* значительно короче, чем гомологичная петля в канонических DAАТ и R-ТА (Таблица 1.3). По-видимому, остаток Arg51\* (аналог остатка His\*53 в канонической R-ТА, PDB код 4СН1) на соседней петле 36\*-53\* координирует  $\alpha$ -СООН группу субстрата [249].

Таблица 1.4. Субстратная специфичность трансаминаз со смешанным типом активности. Приведены активности с референтными субстратами следующих трансаминаз: *CpuTA1* из *C. pusillum*, *MgiTA1* из *M. ginsengisoli*, *TaTT* из *T. terrenum*, HO3033 из *H. ochraceum*.

Субстраты	Структура субстратов	Активность*, U/мг (второй субстрат)			
		<i>CpuTA1</i> , в лизате	<i>MgiTA1</i> , в лизате	<i>TaTT</i> , очищенный фермент	HO3033, очищенный фермент
R-PEA		0.21±0.00 (пируват)	0.16±0.01 (пируват)	0.33±0.02 (пируват)	0.23±0.005 (2- оксвалерат)
S-PEA		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
(R)-1-аминотетралин		0.29±0.01 (пируват)	0.28±0.00 (пируват)	n.a.	n.a.
пируват		0.21±0.01 (R-PEA)	0.16±0.01 (R-PEA)	4.6±0.46 (L-глутамат)	0.007±0.001 (R-PEA)
D-аланин		0.26±0.00 (α-KG)	0.03±0.01 (α-KG)	n.d.	n.d.
α-кетоглутарат (α-KG)		0.26±0.00 (D-Ala)	0.03 ±0.01 (D-Ala)	98±4 (L-лейцин)	0.0042±0.0002 (R-PEA)
L-лейцин		n.d.	n.d.	178±23 (α-KG)	n.a.
4-метил-2-оксвалерат		n.a.	n.a.	34.5±3.6 (L-глутамат)	0.15±0.01 (R-PEA)
фенилпируват		+**	+	n.a.	n.d.
α-кето-γ-(метилтио)-бутират		+**	+	n.a.	n.a.
DL-фенилаланин		n.a.	n.a.	46±3 (α-KG)	n.d.

\*условия реакции можно найти в [249–251];

\*\*численные значения не приводятся;

n.d.-не определяется

n.a.-не измеряли

Также в координации субстрата может быть задействована боковая группа Lys117, расположенного на βУ-тяже. Примечательно, что у *CpuTA1* нет сайтов

связывания карбоксильной группы в Р-кармане, как, например, остаток Lys в Р-кармане канонической bsDAAT [183,249]. На сегодня детали механизма связывания  $\alpha$ -кетоглутарата в proD-позиции в активном центре *CpuTA1* остаются неясны, однако образование D-аминокислот в катализируемых *CpuTA1* реакциях первичных (R)-аминов с кетокислотами установлено [249]. Как и в bsDAAT, междоменная петля в *CpuTA1* удалена от кофактора, что приводит к увеличению объема Р-кармана. Возможно из-за короткой О-петли и удаленной позиции междоменной петли и О-карман имеет большой объем и менее ограниченный вход в активный центр, что благоприятствует продуктивному связыванию в активном центре *CpuTA1* таких объемных аминов как 1-аминотетралин и 1-аминоиндан [249].

Трансаминазы из *T. terrenum* и *H. ochraceum* будут подробно рассмотрены в главе Результаты.

#### 1.4. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К РАЗРАБОТКЕ БИОКАТАЛИЗАТОРОВ

Биокатализ – это применение микроорганизмов и ферментов из них в синтетической химии и использование модифицированных природных катализаторов для реакций, не наблюдаемых в природе [211,252–254].

В своих работах проф. Университета Грейфсваальд У. Борншойер (U. Bornscheuer, Germany) выделил четыре периода биокатализа или качественных этапа в области применения ферментов в промышленности [80,210,211].

Первый этап стартовал более ста лет назад, когда ученые обнаружили, что отдельные компоненты клетки могут катализировать полезные химические реакции и далее преуспели в получении относительно чистых и стабильных ферментных препаратов. Это в корне отличалось от процессов ферментации, которые человечество открыло несколько тысяч лет назад (производства сыра, вина, выделка кож и т.д.). Достижениями этой первой эпохи биокатализа были синтез (R)-манделонитрила из бензальдегида и циановой кислоты с использованием растительных экстрактов [211], гидроксилирование стероидов в присутствии микробов [255], добавление протеаз к стиральным порошкам [256], превращение

глюкозы во фруктозу ферментом глюкозизомеразой [9,257], применение пенициллин ацилазы для синтеза  $\beta$ -лактамных антибиотиков [258] и т.д. Основной технической проблемой тогда была стабильность природных биокатализаторов. Частично ее решали иммобилизацией ферментов на подложки различной природы.

Следующий этап состоялся в 1980-1990 гг., он напрямую связан с достижениями в области молекулярной биологии и геной инженерии, которые позволили нарабатывать рекомбинантные ферменты в огромных количествах; получение пространственных структур природных ферментов и первые технологии мутагенеза позволили варьировать субстратную специфичность ферментов и оптимизировать их для работы с неприродными субстратами. К задаче стабилизации ферментов добавилась задача получения биокатализатора с заданной субстратной специфичностью. Из достижений этого периода можно назвать катализируемое липазами разделение оптических изомеров прекурсора Дилтиазема (Diltiazem) [259], катализируемый липазами синтез сложных эфиров жирных кислот (wax esters – миристилмирилат и цетил рицинолеат) для косметологии [260], а также гидратация ацетонитрила до акриламида ферментом нитрилгидралазой [261] и т.д.

Третий период биокатализа начался с выдающихся работ Пима Штеммера (Pim Stemmer) и Франца Арнолда (Frances Arnold) в конце 1990-х, создавших метод направленной эволюции (в настоящее время включает DNA shuffling, error-prone ПЦР в комбинации с высокопроизводительным скринингом стабильности и активности полученных вариантов фермента). В результате случайного или сайт-направленного или сайт-насыщающего мутагенеза формируется библиотека мутантов с известными свойствами, на основе которой далее возможно теми же методами или в комбинации с методом рационального дизайна оптимизировать свойства фермента для конкретного биотехнологического процесса. Таким способом были получены биокатализаторы синтеза монтелукаста (антилейкотриеновый препарат) [262] и ситаглиптина (антидиабетического препарата) [198,200]. Накопление библиотек вариантов фермента неизбежно приводит к проблеме скрининга полученных вариантов и разработке критериев оценки эффективности мутагенеза. Исследования и разработки повышения

эффективности и роботизации этой стадии создания биокатализатора актуальны и сегодня.

Четвертый период биокатализа (настоящий) состоит в создании каскадных ферментативных процессов (или новых метаболических путей) путем введения нескольких ферментов в клетку простых микроорганизмов *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*. Яркими примерами здесь являются синтез артемизинина [263] и 1,4-бутандиола целой клеткой-фабрикой [264]. Экспериментальным исследованиям предшествовали сложный компьютерный анализ метаболическим путей организма-хозяина. Другим достижением современного этапа можно рассматривать создание неприродных ферментов на основе природных с полным изменением их функции. Такой пример – это создание искусственного металлофермента на основе Grubbs'Ru катализатора и белка стрептавидина, при этом реакция происходит в периплазме *E. coli*, где фермент и экспрессируется в активной форме [265].

Исторически на заре эры биокатализа целая клетка рассматривалась как эффективный биокатализатор, включающий регенерацию кофактора и естественную стабилизацию рабочего фермента, оптимизация (инженерия) отдельного фермента в настоящее время рассматриваются как более эффективный и экономически целесообразный подход к разработке биокатализаторов. Применение отдельных изолированных ферментов имеет ряд преимуществ: они легче выводятся из реакционной среды (их надо меньше, потому что они активнее на единицу массы), они лучше выдерживают суровые условия производства, при их использовании исчезает проблема доставки, которая имеет место при работе с целой клеткой – проникновение в клеточную мембрану и, наконец, их легче транспортировать к месту производства.

Однако и на третьем, и на четвертом этапе биокатализа необходимо детальное понимание связи *последовательность-структура-функция*, знания о которой накапливаются во многом экспериментально путем анализа природных ферментов из организмов, обитающих в самых разнообразных условиях. Из других трудностей развития биокатализа можно выделить следующие [211]:

- Трудным остается как выбор критериев отбора вариантов ферментов в процессе направленной эволюции, так и выбор методов и подходов к созданию библиотек вариантов;
- Не всегда биотехнологическую задачу можно решить применением биокатализаторов, так как ферменты не могут ускорить термодинамически невыгодные реакции;
- Инженерия ферментов основывается на анализе пространственной структуры ферментов, полученных в специальных условиях кристаллизации. Поэтому полученная структура, вероятно, одна из многих, которые фермент принимает в динамических условиях реакции в реакционной среде. Для эффективного инжиниринга ферментов необходимо применение методов анализа структуры фермента в условиях реакции.
- Предпосылка белкового инжиниринга в том, что замены в разных позициях имеют аддитивный эффект не всегда оправдана, в большинстве случаев в реальности это не так и до сих пор предсказать исчерпывающе эффект двух последовательных мутаций мало вероятно;
- Компьютерное моделирование ферментов с новыми активностями неточно: по итогам моделирования требуется проверка 10–20 моделей и результатом, к сожалению, пока оказывается фермент с низкой активностью, что требует значительных последующих оптимизаций. Так, например, первоначальный компьютерный дизайн фермента для производства ситаглиптина предложил фермент, который превращал только 0,1 молекулы субстрата в день. При этом субстрат (проситаглиптиновый кетон) хорошо вписывался в активный центр трансаминазы АТА-117 из *Arthrobacter sp.*, структура которой была получена методом RSA [198].

Для разработки новых ферментов, катализирующих реакции не встречающиеся в природе [266,267] требуется лучшее понимание механических, динамических и структурных аспектов ферментативного катализа. То есть

структурно-функциональное исследование природных ферментов по-прежнему актуально для расширения и углубления фундаментальных основ биокатализа.

В главе Результаты будут рассмотрены взаимосвязь *последовательность-структура-функция* для ряда перспективных для биотехнологии дегидрогеназ и трансаминаз из архей и термофильных бактерий.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. МАТЕРИАЛЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В РАБОТЕ

Базовые компоненты буферных растворов (HEPES, Tris,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), соли ( $\text{NaCl}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), кислоты (соляная, уксусная, фосфорная), щелочи ( $\text{KOH}$ ,  $\text{NaOH}$ ), спирты (метанол, этанол, изопропанол, глицерин) и пр. (ЭДТА, мочевины, гуанидин гидрохлорид,  $\beta$ -меркаптоэтанол), растворители ДМСО, ДМФА, ацетонитрил, использованные в работе, были наивысшей доступной категории, производства компаний Sigma (США), Panreac (Испания), Fluka (Германия), Хеликон (Россия), Химмед (Россия). Все растворы готовили на деионизованной воде, прошедшей дополнительную очистку системой Milli-Q Gradient (Millipore, США) до 18,1-18,3 МОм/см. Субстраты, включая спирты, альдегиды, кетоны, аминокислоты и кетокислоты, оптически активные амины были наивысшей степени чистоты производства компаний Sigma (США), Acros Organics (США), Fluka (Германия).

Исследования проводили с рекомбинантными формами ферментов, которые получали гетерологической экспрессией синтетических генов в штаммах-продуцентах *E. coli*. Синтетические гены ферментов (кроме алкогольдегидрогеназы TsAdh319 из археи *Thermococcus sibiricus* и трансаминазы Pcrp361 из бактерии *Psychrobacter cryohalolentis*) были синтезированы ООО Сервис-Ген (Санкт-Петербург) после оптимизации по кодонному составу исходных нуклеотидных последовательностей, взятых из аннотированных геномов. Гены, кодирующие TsAdh319 и Pcrp361, были выделены из ДНК чистой культуры (Таблица 2.1). Олигонуклеотидные последовательности, использованные в работе при клонировании и сайт-направленном мутагенезе, были синтезированы в компании Евроген (Москва). Корректность и целостность всех генов, используемых в работе здесь и далее, были подтверждены ДНК секвенированием в компании Евроген (Россия).

Работы по созданию векторов и экспрессионных конструкций для наработки целевых ферментов были проведены д.б.н. Мардановым А.В (ФИЦ Биотехно-



логии РАН) и к.б.н. Ракитиной Т.В. (Институт Биоорганической химии им. Ю.В. Овчинникова РАН). Автор глубоко признателен Марданову А.В. и Ракитиной Т.В. за проделанную работу.

Таблица 2.1. Рекомбинантные ферменты, охарактеризованные в работе.

Фермент	Описание	Организм	Ген Плазмида	Штамм- продуцент <i>E. coli</i>	MW (кДа) субъединицы, Количество а.о. в субъединице
TsAdh319	короткоцепочечная алкоголь- дегидрогеназа (His)6-таг на N-конце (неотщепляемый)	архея <i>Thermococcus sibiricus</i>	Из природной ДНК pET-15b	Rosetta- gami (DE3)	26,524 кДа 237 а.о.
AIDHPyr1147	альдегид- дегидрогеназа	архея <i>Pyrobaculum ferrireducens (Pyrobaculum sp. 1860)</i>	Синтетический pET-21d	BL21- CodonPlus (DE3)- RIPL	54,388 кДа 491 а.о.
TUZN1299	трансаминаза (His)6-таг на N-конце (неотщепляемый)	архея <i>Thermoproteu s uzoniensis</i>	Синтетический pQE30	DLT1270	32,994 кДа 297 а.о.
VMUT0738	трансаминаза (His)6-таг на N-конце (неотщепляемый)	архея <i>Vulcanisaeta moutnovskia</i>	Синтетический / pQE30	DLT1270	35,352 кДа 314 а.о.
GEO1900	трансаминаза (His)6-таг на N-конце (неотщепляемый)	архея <i>Geoglobus acetivorans</i>	Синтетический pQE30	DLT1270	32,618 кДа 292 а.о.
HO3033	трансаминаза (His)6-таг на N-конце (отщепляемый)	бактерия <i>Haliangium ochraceum</i>	Синтетический pET-21d	Rosetta (DE3) pLysS	35,614 кДа 317 а.о.
TaTT	трансаминаза (His)6-таг на N-конце (отщепляемый)	бактерия <i>Thermobaculu m terrenum</i>	Синтетический pET-21d	BL21(DE3) pLys	36,383 кДа 316 а.о.
Pcryo361	трансаминаза (His)6-таг на N-конце (отщепляемый)	бактерия <i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	Из природной ДНК pET-21d	BL21Star cells	47,53 кДа 433 а.о.

## 2.2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.2.1. Общие подходы к выделению, очистке и хранению ферментных препаратов

Рекомбинантные ферменты выделяли из биомассы штамма-продуцента в несколько последовательных хроматографических стадий. «Захват» целевых ферментов, кроме A1DHPyr1147, проводили сорбцией на Ni<sup>2+</sup>-уравновешенной колонке HisTrap HP (Ni-сефароза FF, (GE Healthcare, США)), элюцию вели градиентом раствора имидазола. Чистоту белковых фракций и долю целевого фермента оценивали методом ДДС-электрофореза в ПААГ и по уровню активности. Далее согласно полученным результатам и в зависимости от задачи ферментные препараты или переводили в буфер для хранения или проводили дальнейшие стадии очистки. Для кристаллизации ферментный препарат проходил не менее трех стадий очистки, которые включали вторую металлохелатную хроматографию с предварительным отщеплением (His)<sub>6</sub>-тага, анионообменную хроматографию и гель фильтрацию. Гомогенность белковых фракций контролировали методом ДДС-ПААГ электрофореза в 12%-ном ПААГ [268] (аппаратура для электрофореза фирмы “Bio-Rad”, США). Концентрацию ферментных препаратов определяли методом Бредфорда [269] или спектрофотометрически при 280 нм, применяя расчетный коэффициент экстинкции [270]. Электрофорез в неденатурирующих условиях проводили по методике, разработанной в лаборатории на основе [271].

Автор благодарна вед.специалисту М.В. Серебряковой, м.н.с. И.А. Каменихиной, м.н.с. Л.А. Новиковой и м.н.с. Т.Ю. Исайкиной за помощь в проведении масс-спектрометрического анализа для подтверждения аминокислотного состава целевых ферментов.

### 2.2.2. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка алкогольдегидрогеназы из *Thermococcus sibiricus* (TsAdh319)

Ген Tsib\_0319, кодирующий алкогольдегидрогеназу TsAdh319 был получен полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием праймеров (sense primer, 5'-GTTCTCGAGATGAAGGTTGCTGTGATAACAGGG-3', и antisense primer, 5'-

GCTGGATCCTCAGTATTCTGGTCTCTGGTAGACGG-3'; сайты эндонуклеазы рестрикции XhoI в sense primer и эндонуклеазы рестрикции BamHI в antisense primer подчеркнуты) и геномной ДНК археи *T. sibiricus* [272] в качестве матрицы. Полученный ПЦР-фрагмент обрабатывали рестриктазами и клонировали в экспрессионный вектор pET-15b (Qiagen, США), содержащий участок, кодирующий N-концевой (His)<sub>6</sub>-таг. Клетки *E. coli* Rosetta-gami (DE3), несущие экспрессионный вектор, культивировали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 20 мкг/мл хлорамфеникола при 37 °С до середины экспоненциальной фазы роста (OD<sub>600</sub> 0.5). Экспрессия, индуцированная добавкой 1 mM ИПТГ, продолжалась 15 ч. при 37 °С. Клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в 50 mM Tris-HCl буфере, pH 7.5, содержащем 200 mM NaCl, 10% (v/v) глицерина, 10 mM β-меркаптоэтанола, 0,1% (v/v) Тритона X-100, 1 mM PMSF и разрушали на френч-прессе (1000 psi). Гомогенат центрифугировали на 10000g 25 минут при 5 °С. Супернатант далее наносили на аффинную колонку HisTrap HP (GE Healthcare), предварительно уравновешенную буфером А (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 20 mM имидазола, 0.05% Тритона X-100). После промывки колонки буфером А, а затем буфером А без Тритона X-100, фракции рекомбинантного белка элюировали линейным градиентом концентрации имидазола 20-500 mM в буфере В (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl). Фракции, содержащие белок, проверяли по активности и на гомогенность методом электрофореза. Наиболее чистые, активные фракции концентрировали в концентраторах (Millipore) и далее дочищали гель фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенной 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, содержащем 200 mM NaCl. Гомогенный препарат белка хранили в 50% глицерине при концентрации 7-10 мг/мл при температуре -20 °С или при +4 °С с добавлением 0.02% азида натрия.

### **2.2.3. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка альдегидгеназы из археи *Pyrobaculum ferrireducens* (AIDHPyr1147)**

Ген P186\_1147, кодирующий альдегидгеназу AIDHPyr1147 был синтезирован АТГ Сервис-ген (Санкт-Петербург). Синтетический ген, фланкированный сайтами рестрикции эндонуклеаз NcoI и Hind3, клонировали в экспрессионный вектор pET-21d (Novagen, Германия). Клетки *E. coli* BL21-

CodonPlus (DE3)-RIPL (Stratagene, США), несущие экспрессионный вектор и pRARE2 плазмиду культивировали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 34 мкг/мл хлорамфеникола при 37 °С до середины экспоненциальной фазы роста (OD<sub>600</sub> 0.8). Экспрессия, индуцированная добавкой 1 мМ ИПТГ, продолжалась 18 ч. при 24 °С. Клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в буфере А (50 мМ Tris-HCl буфере, рН 8.8, содержащем 1 мМ ЭДТА, 5 мМ β-меркаптоэтанола) и разрушали на френч-прессе (1000 psi). Гомогенат центрифугировали при 40000g 40 минут при 10 °С. Целевой белок находился в нерастворимой фракции в тельцах включения, поэтому далее работали с нерастворимой фракцией, которую промывали буфером А с добавлением 0.5 М NaCl и 0.1% (v/v) Triton X-100, затем дважды буфером А, содержащим 0.5 М NaCl и наконец буфером А, содержащим 0.5 М NaCl и 0.5 М мочевины. Промытые тельца включения далее растворяли в 8 М мочевины, приготовленной в буфере А. Солюбилизацию проводили при 25 °С в течение часа. Осадок удаляли центрифугированием 40000 g 30 мин при 10 °С. Супернатант разбавляли буфером А, содержащем 8 М мочевины, до концентрации 0.4 мг/мл. Рефолдинг проводили постепенным вливанием супернатанта в буфер А до концентрации мочевины 2 М (то есть супернатант разбавляли в 4 раза). Полученный раствор центрифугировали 30 мин на 40000g при 10 °С. Далее супернатант фильтровали через 0.45 μМ фильтр (Millipore) и наносили на колонку Source 30 Q (GE Healthcare), предварительно уравновешенную буфером А. После загрузки колонку промывали десятью объемами буфера А. Элюцию проводили линейным градиентом NaCl 0-500 мМ. Фракции, содержащие A1DHPyr1147, далее концентрировали и доочищали на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенной буфером В (50 мМ HEPES, рН 7.5, 50 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанола). Очищенный фермент концентрировали и хранили при -70 °С.

Апоформу A1DHPyr1147 получали нагреванием раствора 0.5 мг/мл фермента в буфере В при 85 °С в течение 10-15 мин, далее препарат центрифугировали и отделяли от кофермента гель фильтрацией при комнатной температуре.

#### **2.2.4. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка трансаминазы из архей *Thermoproteus uzoniensis* (TUZN1299), *Vulcanisaeta moutnovskia* (VMUT0738), *Geoglobus acetivorans* (GEO1900)**

Гены TUZN\_1299, VMUT\_0738, GEO\_1900 были идентифицированы в аннотированных геномах архей *T. uzoniensis* [273], *V. moutnovskia* [274] и *G. acetivorans* [275], соответственно. Синтетические гены с оптимизированными под экспрессию в *E. coli* были клонированы в экспрессионный вектор pQE30. Рекомбинантные белки, кодированные синтетическими генами, содержали (His)<sub>6</sub>-таг на N-конце аминокислотной последовательности.

Клетки *E. coli* DLT1270, несущие экспрессионный вектор, культивировали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина при 37 °С до середины экспоненциальной фазы роста (OD<sub>600</sub> 0.5). Экспрессия, индуцированная добавкой 1 mM ИПТГ, продолжалась 19 ч. при 37 °С для TUZN1299 и GEO1900 и 3 ч. при 30 °С для VMUT0738. Клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в 50 mM Tris-HCl буфере, pH 7.5, содержащем 200 mM NaCl, 20 mM имидазола, 10% (v/v) глицерина, 2 mM β-меркаптоэтанола, 0,1% (v/v) Тритона X-100, 1 mM PMSF и разрушали на френч-прессе (1000 psi) или ультразвуком. Гомогенат центрифугировали на 10000g 25 минут при 5 °С. Супернатант далее наносили на аффинную колонку HisTrap HP (GE Healthcare), предварительно уравновешенную буфером А (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 20 mM имидазола, 0.05% Тритона X-100). После промывки колонки буфером А, а затем буфером А без Тритона X-100, фракции рекомбинантного белка элюировали линейным градиентом концентраций имидазола 20-500 mM в буфере В (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM NaCl). Фракции, содержащие белок, проверяли по активности и на гомогенность методом электрофореза. Наиболее чистые, активные фракции инкубировали с PLP (10-кратный избыток) ночь при +4 °С, концентрировали в концентраторах (Millipore) и далее очищали гель фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенной 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, содержащим 100 mM NaCl и 5 μM PLP. Гомогенный препарат белка хранили в 50% глицерине при концентрации 7-10 мг/мл при температуре -20 °С. Препараты для кристаллизации проходили

дополнительную стадию очистки анионной хроматографией на колонке MonoQ (GE HealthCare).

### **2.2.5. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка трансаминазы из *Haliangium ochraceum* (НО3033). Создание вариантов НО3033**

Ген Hoch\_3033, кодирующий трансаминазу НО3033 был синтезирован АТГ Сервис-ген (Санкт-Петербург). Синтетический ген, фланкированный сайтами рестрикции эндонуклеаз NdeI и EcoRI клонировали в экспрессионный вектор pET-21d (Novagen), вместе с олигонуклеотидом, фланкированным сайтами рестрикции NcoI и NdeI, кодирующим (His)<sub>6</sub>-таг и сайт протеолиза TEV-протеазой с N-конца последовательности [276]. Клетки *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS (Novagen), несущие экспрессионный вектор, культивировали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 34 мкг/мл хлорамфеникола при 37 °С до середины экспоненциальной фазы роста (OD<sub>600</sub> 0.5). Экспрессия, индуцированная добавкой 1 мМ ИПТГ, продолжалась 19 ч. при 24 °С. Клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 8.0, содержащем 1 М мочевины, 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 0.1 мМ PLP 1мМ β-ME, 0.02% (v/v) Triton X-100 и 1 мМ PMSF и разрушали ультразвуком. Гомогенат центрифугировали при 20000g 60 минут при 10 °С. Захват целевого фермента на колонке HisTrap HP (GE Healthcare) проводили согласно стандартному протоколу производителя. Собранные фракции рекомбинантной НО3033 с (His)<sub>6</sub>-тагом на N-конце разбавляли и инкубировали в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 8.0, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ β-меркаптоэтанол с высокоспецифичной TEV протеазой из расчета 1 мг на 10 мг белка (рекомбинантная TEV протеаза содержит (His)<sub>6</sub>-таг). Раствор инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, диализовали против 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 8.0, 500 мМ NaCl, и наносили на колонку HisTrap HP. TEV-протеаза и отщепленный (His)<sub>6</sub>-таг сорбировались на колонке, «проскок» собирали, концентрировали и наносили на колонку Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенную 20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 200 мМ NaCl. Препараты фермента хранили при -20 °С в 20 мМ Tris-HCl буфере, pH 8.0, содержащем 200 мМ NaCl.

QuikChange протокол [277,278] применяли для создания варианта НО3033 с двумя мутациями Н106Y/Y108R. Олигонуклеотид праймер Н106Y/Y108R.R

AAGAAGCCACACCGCAGATAGACATCACTACGA (мутации подчеркнуты) использовалась в восемнадцати циклах ПЦР для замены триплетов. После обработки продукта ПЦР эндонуклеазой DpnI (Thermo Fisher Scientific, USA) для разрушения исходной (родительской) метилированной ДНК-матрицы, продукт ПЦР трансформировали в *E. coli*. Клоны с целевыми мутациями были отобраны с помощью ПЦР, проведенной непосредственно на колониях с использованием Taq DNA полимеразы и пары праймеров: контрольного праймера Y108R.Check.R GAAGTAAGAAGCCACACG с универсальным T7 праймером. Выделенная из мутанта плазмидная ДНК была отсекуена для проверки случайных мутаций. Вариант HO3033 далее нарабатывали и очищали по методике, разработанной для выделения и очистки WT HO3033.

#### **2.2.6. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка трансаминазы из бактерии *Thermobaculum terrenum* (TaTT). Создание вариантов TaTT**

Ген Tter\_1720, кодирующий трансаминазу TaTT был синтезирован АТГ Сервис-ген (Санкт-Петербург). Синтетический ген, фланкированный сайтами рестрикции эндонуклеаз NcoI и Hind3 клонировали в экспрессионный вектор pET-21d (Novagen) вместе с олигонуклеотидным дуплексом, кодирующий N-концевой (His)<sub>6</sub>-таг [276]. Клетки *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene), несущие экспрессионный вектор, культивировали в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, при 37 °С до величины OD<sub>600</sub> 0.8. Экспрессия, индуцированная добавкой 1 мМ ИПТГ, продолжалась 18 ч. при 25 °С. Клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ Трис-НСl буфере, рН 8.0, содержащем 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 1 мМ PLP, 1 мМ β-МЕ, 0.1% (v/v) Triton X-100 и 1 мМ PMSF и разрушали ультразвуком. Гомогенат центрифугировали при 20000g 60 минут при 10 °С. Захват целевого фермента на колонке HisTrap HP (GE Healthcare) проводили согласно стандартному протоколу производителя. Собранные фракции рекомбинантной TaTT с (His)<sub>6</sub>-тагом на N-конце инкубировали 1 ч. с 10-кратным мольным избытком PLP при 37 °С, далее препараты разбавляли до 3-5 мг/мл и инкубировали в 50 мМ Tris-НСl буфере, рН 8.0, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ β-меркаптоэтанол с высокоспецифичной TEV протеазой из расчета 1 мг на 10 мг белка (рекомбинантная TEV протеаза содержит (His)<sub>6</sub>-таг). Раствор

инкубировали в течение 2 ч. при комнатной температуре, диализовали против 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 8.0, 500 мМ NaCl и наносили на колонку HisTrap HP. TEV-протеаза и отщепленный (His)<sub>6</sub>-таг сорбировались на колонке, «проскок» собирали, концентрировали и наносили на колонку Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенную 50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, 100 мМ NaCl и 15 μМ PLP. Активные фракции ТаТТ собирали, концентрировали до 15-20 мг/мл и хранили при -20 °С с добавлением 50% глицерина.

QuikChange протокол применяли для создания вариантов ТаТТ с одной или несколькими мутациями [277,278]. Олигонуклеотидные праймеры с заменами и праймеры для верификации мутаций (Check) приведены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2. Список праймеров с заменой(ами) (выделена жирным шрифтом) и праймеров для верификации мутаций.

Замены	праймеры	Последовательность (с 5' до 3' конца)
R43S	R43S.R	GTTCCAGTAACC <u>AGAG</u> ATACCTTCGAAG ACCGC
	CheckR43S.F	GCGGTCTTCGAAGGTATCTC
Y101F	Y101F.F	ACCGTGGCGATGTG <u>TTC</u> ATCATGCCGCTG GC
	CheckY101F.R	AAGCCAGCGGCATGATGA
Y166W	Y166W.F	GCATTGGCCAAC <u>TGG</u> CGTAATAGCCAGC TG
	CheckY166W.F	AAGGCATTGGCCAAC <u>TGG</u>
G41V +R43S	G41V&R43S.F	ACTGCGGTCTTCGAAG <u>TG</u> ATCTCTGGTTA CTGG
	CheckG41V.F	ACTGCGGTCTTCGAAG <u>TG</u>
G41V +R43S+F39Y	F39Y&41V&43S.F	ACTGCGGTCT <u>TAC</u> GAAG <u>TG</u> ATCTCTGGTTA CTGG
	CheckF39Y&G41V.F	ACTGCGGTCT <u>TAC</u> GAAG <u>TG</u>
S115R	S115R.R	TCACCAACAAC <u>AC</u> GGAATGCTTTGTTGCC CA
	Check S115R.R	GCGGTCACCAACAAC <u>ACG</u>
+A108	108+A.R	GCTTTGTTGCCAC <u>G</u> GCTGCATAAGCCAG CGGC
	Check108+A.F	GCCGCTGGCTTATGCAG
W32H	W32H.F	GACAGACTACTGG <u>CAT</u> GCGAGCGTTACT GC
	CheckW32H.F	CTGACAGACTACTGG <u>CAT</u>
	universal T7.F	TAATACGACTCACTATAGGG
	universal T7.R	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG



После восемнадцати циклов ПЦР для замены триплетов с использованием праймеров с заменами и Tersus Plus PCR набора (Евроген, Москва) продукт ПЦР обрабатывали эндонуклеазой DpnI (Thermo Fisher Scientific) для разрушения исходной (родительской) метилированной ДНК-матрица. Далее продукт ПЦР трансформировали в *E. coli Mach I*. Клоны с целевыми мутациями были отобраны с помощью ПЦР, проведенной непосредственно с колониями с использованием Taq DNA полимеразы и пары праймеров: праймера для верификации и соответствующего универсального T7 праймера.

Полученные плазмидные конструкции были трансформированы в *E. coli* BL21(DE3)pLys (Stratagene). Выделенная из мутанта плазмидная ДНК была отсекувенирована для проверки случайных мутаций. Варианты ТаТТ далее нарабатывали и очищали, как и WT ТаТТ. Комбинация нескольких мутаций проводили пошагово по приведенной методике.

### **2.2.7. Клонирование, экспрессия, выделение и очистка трансаминаз из *Psychrobacter cryohalolentis* (Pcryo361)**

Ген Pcryo\_0361 был выделен ПЦР с ДНК-полимеразой Encyclo (Евроген) и олигонуклеотидами Pcry0361.F (5'-caataacatATGacaactgtatcaac саасgat-3') и Pcry0361.R (5'-cacgctcgagaTTAatcctttcgcggtaaa таастас-3') из геномной ДНК *P. cryohalolentis* K5 (T) (ВКМ В-2378) [279]. Продукт ПЦР был лигирован в плазмиду pET-21d (Novagen) вместе с олигонуклеотидным дуплексом, кодирующий N-концевой (His)6-таг и модифицирован для получения белка, слитого на N-конце с (His)6-тагом и сайта протеазы TEV [276]. Конструкт трансформировали в клетки *E. coli* BL21Star (Stratagene) клетки выращивали в LB среде с 100 мкг/мл ампициллина при 37°C до достижения значения OD600 0,8. Экспрессия, индуцированная 1 мМ ИПТГ, продолжалась 18 ч. при 25 °C. Клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl буфере, pH 7.5, содержащем 500 мМ NaCl, 20 мМ имидазола, 10% глицерина, 2 мМ β-ME, 0.1% (v/v) Triton X-100 и 1 мМ PMSF и разрушали ультразвуком. Гомогенат центрифугировали при 20000g 60 минут при 10 °C. Захват целевого фермента на колонке HisTrap HP (GE Healthcare) проводили согласно стандартному протоколу производителя.

Активные фракции инкубировали с PLP (десятикратный молярный избыток) в течение 12 ч. при 4 °С, концентрированный в центробежных пробирках с отсечкой 30 кДа (Millipore) и разбавляли до концентрации 3-5 мг/мл в 50 мМ Tris-HCl буфер, рН 7.9, содержащем 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ β-меркаптоэтанол и протеазу TEV (1 мг на 10 мг белка). Раствор инкубировали 2 ч. при комнатной температуре, диализовали против 50 мМ Tris-HCl, 500 мМ NaCl буфера, и наносили на колонку HisTrap HP (GE Healthcare). TEV-протеаза и отщепленный (His)6-таг сорбировались на колонке, а «проскок» концентрировали и наносили на колонку Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенную 50 мМ Tris-HCl, рН 7.5, 100 мМ NaCl и 15 μМ PLP. Активные фракции ТаТТ собирали, концентрировали до 15-20 мг/мл и хранили при -20 °С с добавлением 50% глицерина.

### **2.2.8. Определение олигомерного состава ферментов**

Аналитическую гель фильтрацию препаратов ферментов проводили на колонке Superdex 10/300 GL (GE Healthcare), уравновешенной рабочими буферами ферментов при 22 °С. Скорость элюции составляла 0.5 мл/мин. Объем пробы 50-100 мкл при концентрации 0.5-1.0 мг/мл.

Электрофорез в неденатурирующих условиях в ПААГ позволяет проводить разделение белков по заряду и массе. Применение стандартов с рI, близким рI анализируемого образца, позволяет оценить молекулярный вес образца в растворе. В качестве стандарта в данной работе использовали бычий сывороточный альбумин с рI 5.6, а также фирменные стандарты Sigma. Электрофорез в неденатурирующих условиях проводился по модифицированному методу Дэвиса [271] проводили в 7.5% ПААГ. Пластины с ПААГ готовили, смешивая компоненты, перечисленные в Таблице 2.3. Полимеризацию гелей индуцировали добавлением ПСА и ТЕМЕД. Перед нанесением образцов в гель, препарат фермента смешивали 1:1 с буфером для образцов (125 мМ Tris-HCl, рН 8.6, 20% глицерин, 0,004% бромфеноловый синий, 4% МЭ). На дорожку наносили от 2 до 7 мкг белка. В качестве электродного буфера использовали 5 мМ Tris, 38 мМ Gly, рН 8.3, TritonX-100 – 0.1 %. Напряжение поддерживалось 120В - 180В. По окончании электрофореза проводили фиксацию и окрашивание с помощью раствора Coomassie blue R-250 в смеси раствора уксусной кислоты и этанола.

Таблица 2.3. Состав раствора для полимеризации 1 пластины 7.5 % ПААГ для нативного электрофореза.

Компоненты	Объем, мл
Акриламид (30% Т, 2.7% С)*	2,5
1.5 М Tris-HCl, pH 8.8	2,5
вода	5,0
20% ТритонХ-100	0,025
ТЕМЕД	0,01
10% ПСА	0,05
Итого:	10,085

Т-общая доля, С-доля N,N-метиленбисакриламида.

Для определения олигомерного состава ТаТТ применяли метод BN-электрофореза с добавлением красителя Coomassie blue G-250 в электродный буфер и фиксатор. В методе BN-электрофореза краситель является неденатурирующим анионным детергентом, поэтому разделение в его присутствии идет не по отношению заряд/масса, а по массе и размеру [280].

### 2.2.8. Определение активности алкогольдегидрогеназы TsAdh319

Активность TsAdh319 определяли спектрофотометрически по убыли/накоплению NADPH при 60°C при 340 нм на спектрофотометре Helios Alfa (Thermo electron corporation) со встроенным термостатируемым кюветным отделением. Реакцию окисления проводили в 50 mM Gly-NaOH буфере, pH 10.5, содержащем 50-250 mM спирта and 0.30 mM NADP<sup>+</sup>. Реакцию восстановления проводили в 0.1 М Na-фосфатном буфере, pH 7.5, содержащим 50-250 mM альдегида или кетона и 0.30 mM NADPH. Реакцию запускали 15-35 мкг фермента. Одна единица активности (U) TsAdh319 соответствует превращению 1 моль NADPH в мин, коэффициент экстинкции NADPH составил 6.22 мМ<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Во всех экспериментах скорость ферментативной реакции корректировали, учитывая скорость спонтанного гидролиза субстратов в реакционном буфере при температуре реакции. Каждое значение представляет собой усреднение по результатам не менее трех экспериментов. Вычисление кинетических параметров ферментативной реакции проводили в программе Origin 8.0 (OriginLab, США). Для этого зависимость удельной активности от концентрации субстрата при постоянной концентрации второго субстрата обрабатывали по уравнению Михаэлиса-Ментен.

### 2.2.9. Определение активности альдегиддегидрогеназы AIDHPyr1147

Активность определяли при 60 °С в реакции окисления альдегидов по накоплению NADPH спектрофотометрически при 340 нм на спектрофотометре Evolution 300 (Thermo Scientific, США) со встроенным термостатируемым кюветным отделением. Реакцию окисления проводили в 50 мМ Na-пирофосфатном буфере, рН 8.8, содержащем 100 мМ NaCl, 0,3 мМ NADP<sup>+</sup>, субстрат в заданной концентрации и 10–15 мкг фермента. Одна единица активности (U) AIDHPyr1147 соответствует накоплению 1 моль NADPH в мин, коэффициент экстинкции NADPH составил 6.22 мМ<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>. Во всех экспериментах скорость ферментативной реакции корректировали, учитывая скорость спонтанного гидролиза субстратов в реакционном буфере при температуре реакции. Каждое значение представляет усреднение по результатам не менее трех экспериментов. Вычисление кинетических параметров ферментативной реакции проводили в программе Origin 8.0 (OriginLab).

### 2.2.10. Методы определение активности трансаминаз

#### 2.2.10.1. Общие положения

Субстраты трансаминаз нехромогенны, поэтому для определения активности применяется вторая ферментативная реакция или хроматографические методы, которые позволяют определить концентрацию продукта(ов) трансаминирования. Представленные в работе трансаминазы, кроме НО3033 и Pcyo361, являются термостабильными ферментами с температурными оптимумами катализируемых реакций выше 80-90 °С. Ферменты второй энзиматической реакции – лактатдегидрогеназа, аланиндегидрогеназа и глутаматдегидрогеназа – активны при 25-35 °С, поэтому для определения активности из реакционной смеси ферментативной реакции трансаминирования отбирали аликваты через определенные промежутки времени и далее в них уже определяли количество образовавшегося продукта по второй реакции при 25 °С. Концентрацию продукта(ов) пересчитывали по калибровочным графикам.

Активность трансаминаз в реакциях с аминокислотами (R)-(+)-1-фенилэтиламин (R-PEA) и (S)-(-)-1-фенилэтиламин (S-PEA) регистрировали

напрямую спектрофотометрически или с применением обращенно-фазовой хроматографии.

Важнейшим методом характеристики специфичности трансаминаз является метод полуреакций, методика проведения которого приводится ниже.

#### 2.2.10.2. GDH метод

Активность трансаминаз в реакциях с аминодонорами и аминокцептором  $\alpha$ -кетоглутаратом определяли по скорости накопления продукта L-глутамата, количество которого определяли по второй реакции окисления ферментом NAD-зависимой глутаматдегидрогеназой (GDH) (Sigma, cat. № G2626) по накоплению NADH спектрофотометрически при 340 нм. Реакцию с GDH проводили при 25 °С, в то время как ферментативное трансаминирование проводили при 40-90 °С, поэтому вклад трансаминазы в накопление L-глутамата в ходе второй энзиматической реакции при комнатной температуре считали незначительным.

Реакцию трансаминирования проводили в рабочем буфере (Tris-HCl или Na-фосфатный), pH 7.5-8.0, содержащем 15-30  $\mu$ M PLP, аминодонор в заданной концентрации и  $\alpha$ -кетоглутарат обычно не больше 1 мМ. Реакцию запускали субстратом, трансаминазу (0,75-1,0  $\mu$ г) предварительно инкубировали в рабочем буфере 3 мин. В течение 5-20 мин. аликвоты реакционной смеси отбирали через 0,5-1,0 мин. и сразу замораживали. Далее 100 мкл аликвоты вносили во вторую реакционную смесь, содержащую 50 мМ Tris-HCl, pH 9.0, 1 мМ NAD и 1.0-2.0 U GDH при 25 °С. Содержание L-глутамата в аликвоте определяли из скорости накопления NADH при 340 нм, соотнося регистрируемую на спектрофотометре скорость с построенной калибровочной линейной зависимостью скорости GDH-реакции от концентрации L-глутамата. Удельную активность трансаминазы (U/мг) рассчитывали по начальному линейному участку зависимости количества образовавшегося L-глутамата от времени. Один U активности соответствует количеству трансаминазы, необходимому для образования 1  $\mu$ моль L-глутамата в минуту.

### 2.2.10.3. *AlaDH* или *LDH* метод

Активность трансаминаз в реакциях с пируватом и разнообразными аминодонорами и L-аланином и разнообразными аминокцепторами определяли по второй ферментативной реакции с лактатдегидрогеназой (*LDH*) из *Lactobacillus leichmanii* (Sigma, cat. № 3888) или с аланиндегидрогеназой (*AlaDH*) из *Bacillus subtilis* (Sigma, cat. № A7653). Реакцию трансаминирования проводили в рабочем буфере (Tris-HCl или Na-фосфатный), pH 7.5-8.0, содержащем 15-30  $\mu$ M PLP и пару субстратов, один из которых L-аланин или пируват, при температуре 40-90 °C. Реакцию запускали субстратом, трансаминазу (0.75-5.0  $\mu$ г) предварительно инкубировали в рабочем буфере 3 мин. В течение 5-20 мин. аликвоты реакционной смеси отбирали через 0,5-1,0 мин. и сразу замораживали. Далее 100 мкл аликвоты вносили во вторую реакционную смесь, содержащую 60 мМ Na-бикарбоната, pH 10.0, 1 мМ NAD и 1–2 U *AlaDH* при 25 °C или в реакционную смесь, содержащую 100 мМ Na-фосфатного буфера, pH 7.0, 0.2 мМ NADH, 1-2 U *LDH*. Содержание пирувата или L-аланина в аликвоте определяли из скорости убыли/накопления NADH при 340 нм, соотнося регистрируемую на спектрофотометре скорость с построенной калибровочной линейной зависимостью скорости *AlaDH*-реакции или *LDH*-реакции от концентрации L-аланина/пирувата. Удельную активность трансаминазы рассчитывали по начальному линейному участку зависимости накопления L-аланина/пирувата от времени. Один U активности определяли как количество фермента, необходимого для образования 1  $\mu$ моль субстрата в минуту.

### 2.2.10.4. *AcPh*-метод (ацетофеноновый метод)

Активность трансаминаз в реакции с (*R*)- $\alpha$ -фенилэтиламино/*(S)*- $\alpha$ -фенилэтиламино (*R*-PEA/*S*-PEA) измеряли спектрофотометрически по скорости изменения оптической плотности при 245 нм, соответствующей поглощению продукта деаминирования PEA – ацетофенона. Реакционная смесь содержала: 50 мМ Tris-HCl, pH 9.0, или Na-фосфатного буфера, pH 7.0-8.0, 50 мМ NaCl, 30 мкМ PLP, PEA в заданной концентрации и 1 мМ аминокцептора и 0,2-0.5 мг/мл трансаминазы. Смесь инкубировали в течение 3 мин при температуре 40-60 °C. Реакцию запускали аминокцептором. Удельную активность рассчитывали из начального линейного участка зависимости накопления ацетофенона от времени, используя молярный

коэффициент экстинкции ацетофенона,  $11600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Один U активности определяли как количество фермента, необходимого для образования 1  $\mu\text{моль}$  ацетофенона в минуту. Активность Pscru361 определяли в диапазоне 0-40 °C.

#### *2.2.10.5. Хроматографический метод*

Определение накопления ацетофенона или пропиофенона. Образование ацетофенона (пропиофенона) в образцах определяли хроматографически изократической элюцией на колонка  $\mu\text{RPC C2/C18 ST 4.6 / 100}$  (GE Healthcare) при 25 °C. Колонку уравнивали при скорости потока 0,5 мл/мин раствором А, состоящий из 20% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты в воде. Элюцию проводили также раствором А. Отобранные из реакционной смеси реакции трансаминирования аликвоты (50  $\mu\text{л}$ ) смешивали с 50  $\mu\text{л}$  раствора А и наносили на колонку. Образовавшийся ацетофенон (пропиофенон) регистрировали при 245 нм, количество рассчитывали из калибровочных зависимостей.

#### *2.2.10.6. Метод полуреакции трансаминирования*

Анализ полуреакции трансаминирования основан на регистрации изменении в спектре поглощения PLP-формы ТА при добавлении аминодонора к раствору ТА: пик поглощения при 415-420 нм, соответствующий PLP форме фермента, исчезает с некоторой скоростью, которая зависит от сродства ТА к аминодонору, и, одновременно, появляется новый пик при 330 нм, который соответствует PMP-форме ТА (Рис. 1.3) [156,187,281]. Таким образом, за протеканием полуреакции можно следить спектрофотометрически по снижению поглощения при длине волны 410-415 нм или по росту поглощения при 330 нм.

PLP-форму ТА получали инкубированием ТА с избытком PLP и кетосубстрата в течение 12 ч. при 4 °C. Далее на колонке Desalting (GE HealthCare) удаляли избыток низкомолекулярных соединений и переводили ТА в 50 мМ Tris-HCl буфер или Na-фосфатный буфер, pH 8.0. В приготовленный раствор PLP-формы ТА (0.5-1.2 мг/мл) добавляли различные аминодоноры в концентрации 0-20 мМ и на спектрофотометре Evolution 300 UV-Vis (Thermo Scientific, USA) или спектрометре Chirascan™, оснащенного SF.3 приставкой остановленного потока (Applied Photophysics Ltd., Leatherhead, UK), регистрировали скорость снижения оптической

плотности при 410-415 нм при 25-65 °С. Наблюдаемый таким образом переход *внутренний альдимин-кетимин* (Рис. 1.2) – это реакция первого порядка (полуоборот фермента в присутствии избытка одного субстрата), константу реакции определяют аппроксимацией зависимости поглощения  $A_{410-415}$  от времени уравнением (1):

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

где  $A_t$  поглощение во время  $t$ ,  $\Delta A$  изменение поглощения за период между  $t = 0$  и  $t = \infty$ ,  $A_\infty$  конечное поглощение и  $k_{obs}$  наблюдаемая константа скорости первого порядка. Начальный линейный участок временной зависимости «для медленных субстратов» аппроксимировали линейным уравнением:  $k_{obs} = \frac{1}{A_0} \frac{dA}{dt}$ , где  $A_0$  поглощение при  $t = 0$ . Параметры полуреакции:  $k_{max}^{half}$  (максимальная константа скорости),  $K_D^{half}$  (константа диссоциации фермент-субстратного комплекса) и  $\frac{k_{max}^{half}}{K_D^{half}}$  (константа специфичности) определяли из аппроксимации зависимости наблюдаемой константы скорости от концентрации субстрата уравнением:

$$k_{obs} = \frac{k_{max}^{half}[S]}{K_D^{half} + [S]}. \quad (2)$$

Каждое значение получено в результате трех измерений. Обработку данных вели в программе Origin 8.0 (Origin Lab, США).

## 2.2.11. Флуоресцентная спектроскопия

### 2.2.11.1. Измерение собственной флуоресценции белка

Собственная флуоресценция белков определяется флуоресценцией остатков триптофана ( $\lambda_{ex}$  297 нм) и, в меньшей степени, остатков тирозина и фенилаланина ( $\lambda_{ex}$  280 нм). В зависимости от их локализации в белковой глобуле и молекулярного окружения, спектр флуоресценции может иметь разную форму и положение максимума. Согласно Бушуевой [282], Пермякову [283] и Бурштейну [284], в белках можно наблюдать несколько состояний остатков триптофана: от положения в чрезвычайно гидрофобном окружении до полной экспонированности остатков в растворитель. Спектр флуоресценции остатка триптофана,



расположенного в гидрофобном молекулярном окружении и удаленного от поверхности глобулы, имеет более коротковолновый максимум по сравнению со спектром триптофана, расположенного в гидрофильном окружении и экспонированного в растворитель. Вклад каждого остатка триптофана в общую флуоресценцию молекулы белка различается, что приводит к различию в форме и положении максимума спектра флуоресценции белка [283].

Для ферментов (0.02-0.1 мг/мл), содержащих в аминокислотной последовательности остатки триптофана, спектры флуоресценции записывали в 20 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.3, содержащем 50 мМ NaCl (или в другом буфере) в диапазоне 300-450 нм на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian Inc.) или Fluoromax-4 (Horiba, Japan) при длине волны возбуждения 297 нм и ширине щелей монохроматоров 5 нм при заданной температуре. Температура поддерживалась с помощью встроенной приставки Пельтье. Перед измерением флуоресценции образцы были отфильтрованы через 0.22 мкм фильтры Millipore.

#### 2.2.11.2. Определение константы диссоциации комплексов AIDHPyr1147 с NADPH и NADP<sup>+</sup>

Образование бинарных комплексов апоформы AIDHPyr1147 (1.6-3.6 мМ) с коферментом NADP изучали при 60 °С, наблюдая изменения интенсивности флуоресценции триптофанов при титровании NADP<sup>+</sup> при  $\lambda(ex) = 297$  нм и при титровании NADPH при  $\lambda(ex) = 297$  нм и при  $\lambda(ex) = 330$  нм (возбуждение молекулы NADPH) в 50 мМ Na-пирофосфатном буфере, pH 8.8, 100 мМ NaCl. Растворы NADP<sup>+</sup> и NADPH добавляли аликвотами до финальной концентрации 15.0 и 9.0 мМ, соответственно. Раствор AIDHPyr1147 и концентрированные растворы NADP<sup>+</sup> и NADPH готовили непосредственно перед серией измерений.

Для расчета константы диссоциации ( $K_D$ ) применяли полиномиальную аппроксимацию и координаты Скетчерда, то есть допускали приближение, что связываются молекулы лиганда одного типа в идентичных независимых сайтах связывания биомолекулы. Для  $n$  эквивалентных сайтов

$$K_D = (n \times Et - EL)(Lt - EL) / EL,$$

где  $L_t$  и  $E_t$  общая концентрация лиганда и фермента, содержащего  $n$  сайтов связывания,  $E_L$  концентрация комплекса лиганд-сайт связывания.  $E_L$  вычисляли по уравнению  $E_L = \alpha \times E_t \times n$ , где  $\alpha$  заселенность сайтов связывания, рассчитанная по формуле

$$\alpha = (F_{\max} - F) / (F_{\max} - F_{\min}),$$

где  $F$  наблюдаемый сигнал флуоресценции,  $F_{\max}$  (нет связывания NADP),  $F_{\min}$  минимальный сигнал (все сайты связывания содержат NADP). Зависимость  $\alpha / (L_t - \alpha \times n \times E_t)$  от  $(1 - \alpha)$  при  $n=4$  ( $4 \times E_t$  концентрация субъединиц с одним сайтом связывания) аппроксимировали прямой линией с наклоном  $1/K_D$ . Полиномиальная аппроксимация  $L_t(\alpha)$  согласно уравнению

$$L_t = \alpha \times n \times E_t + \alpha / (1 - \alpha) \times K_D$$

позволяет рассчитать  $K_D$  и  $n$ . Количественный анализ проводили с использованием программы Origin 8.0 (OriginLab).

## 2.2.12. Исследование термостабильности белков

### 2.2.12.1. Зависимость триптофановой флуоресценции от температуры

Поскольку флуоресценция остатка триптофана зависит от его положения в белковой глобуле и от его окружения, а, значит, отличается в нативном и денатурированном состоянии белка, исследование зависимости триптофановой флуоресценции белка от температуры дает важную информацию об изменениях в пространственной структуре белка [283] и характеризует его термостабильность. В ходе эксперимента регистрировали смещение положения и изменение формы спектра флуоресценции по интенсивности флуоресценции препаратов белков при двух выбранных длинах волн (соответствующих длинам волн половины высоты максимума флуоресценции нативного фермента) при повышении температуры со скоростью  $1 \text{ }^\circ\text{C}/\text{мин}$ , для корректировки вычитали интенсивности флуоресценции буфера, прописанные в тех же условиях. Далее тепловой переход белков анализировали по методу, предложенному Бушуевой с соавторами [282,284]. Изменение отношения интенсивностей флуоресценции при двух длинах волн половины высоты максимума флуоресценции (параметр  $A$ ) характеризует изменения формы спектра флуоресценции белка при нагревании. Параметрическая

кривая – зависимость интенсивности, измеренной при одной длине волны от интенсивности при другой длине волны имеет три области: две линейных, которые соответствуют нативному и денатурированному состоянию белка и область теплового перехода. При продлении линейных участков в начало координат получают значения интенсивностей флуоресценции нативного и денатурированного состояния в исследуемом диапазоне температур (в экспериментальных данных – интенсивности флуоресценции при каждой температуре – это сумма интенсивностей флуоресценции нативного и денатурированного состояния). Далее по формуле

$$\alpha = (I_{\lambda,T} - I_{\lambda,T^N}) / (I_{\lambda,T^D} - I_{\lambda,T^N}),$$

где  $I_{\lambda,T}$  – зависимость интенсивности флуоресценции на одной длине волны от температуры,  $I_{\lambda,T^N}$  – интенсивность флуоресценции на той же длине волны для нативного состояния белка,  $I_{\lambda,T^D}$  – интенсивность флуоресценции на той же длине волны для денатурированного состояния белка. График зависимости степени завершенности перехода ( $\alpha$ ) от температуры  $T, ^\circ\text{C}$  имеет сигмоидную форму, обработка значений  $\alpha(T)$  по модели Больцмана дает значение характеристической температуры полуперехода для данного белка [285].

Автор признателен д.б.н. Д.И. Левицкому и н.с. К.В. Тугаевой за помощь в проведении исследований флуоресценции белков.

#### *2.2.12.2. Дифференциальная сканирующая калориметрия*

Дифференциальная сканирующая калориметрия позволяет охарактеризовать термодинамические параметры тепловой денатурации белка (температура плавления, энтальпия и кооперативность перехода) [286]. Образцы ферментов (0,8-1,5 мг/мл) в 50 мМ Na-фосфатном буфере анализировали в капиллярных платиновых ячейках дифференциального сканирующего калориметра ДАСМ-4М (Институт биологического приборостроения, г. Пущино) или в танталовых ячейках MicroCal VP-Capillary calorimeter (Malvern Instruments, Northampton, USA), регистрируя зависимость избыточного теплопоглощения от температуры  $C_p(t, ^\circ\text{C})$  при нагревании  $1^\circ\text{C}/\text{мин}$ . Полученные калориметрические кривые корректировали с учетом инструментального фона, как описано ранее [287] и по максимуму теплового

перехода определяли температуру перехода ( $T_m$ ). Термограммы обрабатывали с использованием программы Origin 8.0 (Origin Lab, США).

Автор признателен к.х.н. С.Ю. Клейменову за проведение этих экспериментов.

#### *2.2.12.3. Метод ThermoFluor*

Метод ThermoFluor (Дифференциальная сканирующая флуориметрия) применяли для определения наблюдаемой температуры плавления ( $T_m$ ) вариантов ТаТТ. Препарат фермента разбавляли до концентрации 0,5 мг/мл в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 200 мМ NaCl, 20 мкМ PLP и 1000-кратно разведенный краситель Sypro Orange (Sigma) и переносили в 96-луночный ПЦР планшет (Thermo Fischer Scientific) в конечном объеме 50 мкл на лунку. Буфер, смешанный с Sypro, использовали как отрицательный контроль. Планшеты помещали в амплификатор Real-Time (Bio-Rad C1000, с приставкой CFX96 (Real-Time, США), далее температуру повышали от 20 °C до 95 °C со скоростью 1,0 °C/мин. Относительная флуоресценция измерялась с использованием канала FRET. Собранные данные аппроксимировали сигмоидальной кривой и рассчитывали  $T_m$ , используя модель Больцмана. Анализы проводили в трех повторностях,  $T_m$  указано как среднее значение по трем экспериментам.

Автор признателен А.Ю. Николаевой (НИЦ Курчатовский институт) за проведение этих экспериментов.

#### *2.2.12.4. Кинетические методы определения термостабильности ферментов*

Термостабильность ферментов характеризовали также кинетическими методами по регистрации остаточной активности в стандартной реакции при прогревании препарата фермента концентрацией (1-2 мг/мл) при заданной температуре в течение длительного времени.

#### **2.2.13. Исследование эффектов растворителей**

Эффекты растворителей исследовали в двух режимах: (1) по остаточной активности после инкубации препарата фермента (1-2 мг/мл) в буфере с органическим растворителем и (2) при добавлении растворителя в реакцию. В

режиме (1) оценивали влияние растворителей на стабильность молекулы фермента, в режиме (2) оценивали влияние растворителей на каталитические свойства фермента и на ферментативную реакцию в целом. Режим (1) позволяет определить константу инактивации фермента, режим (2) оценить изменение кинетических параметров ферментативной реакции в присутствии органических растворителей. Исследование проводили как со смешивающимися с водой растворителями (метанол, этанол, ДМСО, ацетонитрил и т.д.) так и с несмешивающимися растворителями (этилацетат, хлороформ, н-гексан и т.д.). Среди смешивающихся отбирали протонные и апротонные растворителями с разной гидрофобностью ( $\log P$ ), дипольным моментом ( $\mu$ , D) и диэлектрической проницаемостью ( $\epsilon$ ).

## **2.2.14. Рентгеноструктурный анализ**

### *2.2.14.1. Кристаллизация ферментов*

Для получения кристаллов ферментов применяли несколько подходов. Для первоначального поиска условий кристаллизации использовали роботизированную систему кристаллизации Ригаку (Rigaku Automation, США), расположенную в Ресурсном центре Национального Исследовательского Центра «Курчатовский Институт». В роботизированной системе Ригаку выращивание кристаллов проводили в специализированных 96-луночных планшетах (Rigaku Automation) методом диффузии в парах раствора осадителя (вариант «сидячая капля»). Для кристаллизации использовали коммерческие наборы осадителей (Index HT, Crystal Screen HT, Crystal Screen Cryo HT, PEG/Ion HT, PEGRx HT and SaltRx HT) компании Хамптон Ресерч HT (Hampton Research, США). Полученные в ходе скрининга условия кристаллизации далее оптимизировали в ручном режиме для получения кристаллов, по размеру и качеству пригодных для рентгеноструктурного анализа. Оптимизацию проводили путем варьирования параметров кристаллизации: соотношения белка и осадителя, pH буфера противораствора и концентрации осадителя, температуры кристаллизации и т.д. [288,289]. На этапе оптимизации использовали методы диффузии в парах раствора осадителя в варианте «висячая капля» и «сидячая капля» [289].

Таблица 2.4. Условия кристаллизации ферментов, охарактеризованных в работе.

Фермент	Условия кристаллизации	Препарат белка	Метод выращивания кристаллов
TsAdh319	0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.3 M NaCl, 25% (w/v) PEG 3350.	8 мг/мл в 25 mM Tris-HCl и 300 mM NaCl, pH 7.5	«висячая капля»
AIDHPyr1147 (Holo-1)	0.01 M NiCl <sub>2</sub> , 0.1 M Tris, pH 8.5, 1.4 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 50 mM NaCl	17 мг/мл в 50 mM HEPES, pH 7.5, и 50 mM NaCl, 5 mM β-ME	техника контрдиффузии в капиллярах в условиях микрогравитации
AIDHPyr1147 апоформа (Apo)	0.1M Имидазол, pH 6.5, 1.0 M NaCH <sub>3</sub> COO 3H <sub>2</sub> O	17,7 мг/мл в 50 mM HEPES, pH 7.5, и 50 mM NaCl, 5 mM β-ME	«висячая капля»
AIDHPyr1147 (Holo-2)	0.1M Имидазол, pH 6.5, 1.0 M NaCH <sub>3</sub> COO 3H <sub>2</sub> O	17.7 мг/мл апоформы и 27 mM NADP <sup>+</sup> в 50 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM β-ME	«висячая капля» сокристаллизация
AIDHPyr1147 Комплекс с NADP <sup>+</sup> и субстратом (ternary complex)	0.1M Имидазол, pH 6.5, 1.0 M NaCH <sub>3</sub> COO 3H <sub>2</sub> O	17.7 мг/мл апоформы, 27 mM NADP <sup>+</sup> и 400 mM 2-изобутиральдегида в 50 mM HEPES, pH 7.5, и 50 mM NaCl, 5 mM β-ME	«висячая капля» сокристаллизация
TUZN1299	0.1 M NaCH <sub>3</sub> COO 3H <sub>2</sub> O, pH 5.2, 6% PEG 4000	50 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 50 μM PLP, pH 8.0	«висячая капля»
TUZN1299 + L-норвалин	0.1 M NaCH <sub>3</sub> COO 3H <sub>2</sub> O, pH 5.2, 6% PEG 4000		Наставление кристаллов холоформы в 50 mM L-норвалина
VMUT0738 GEO1900	Нет кристаллов 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 12% глицерин, 1.5 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ,	10 мг/мл в 30 mM Tris-HCl, pH 8.0, и 300 mM NaCl, 100 μM PLP	«висячая капля»
GEO1900 + α-кетоглутарат	0.1 M HEPES, pH 7.5; 0.7 M (Li) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Наставление кристаллов холоформы в 50 mM α-кетоглутарата
HO3033	0.1 M MES, pH 6.0, 0.2 M CaCl <sub>2</sub> , и 50% метил-2,4-пентандиол	10 мг/мл в 15 mM Tris, pH 8.0, 50 mM NaCl, и 20 μM PLP	«сидячая капля»
Pcryo361	0.1 M Na цитрат, pH 6.1, 0.2 M KNa тартрат, 1.8 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	11 мг/мл в 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 20 μM PLP, pH 7.9	техника контрдиффузии в капиллярах в условиях микрогравитации
TaTT	0.2 M NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO; 0.1 M MES, pH 6.0; 25% PEG 3350.	11 мг/мл в 15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 20 μM PLP	
TaTT mP3	100 mM HEPES, pH 7.5, 2.5-3.4 M NaCl	15 мг/мл в 15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 20 μM PLP	«висячая капля»
TaTT mP3O1	100 mM HEPES, pH 7.5, 2.5-3.4 M NaCl	15 мг/мл в 15 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 20 μM PLP	«висячая капля»

Кристаллизацию альдегиддегидрогеназы AldHPyr1147 и трансаминазы Pcryo361 проводили методом противодиффузии в капиллярах в условиях микрогравитации [290,291] (при поддержке Федерального космического агентства (проект КЭ (ЦР) “Кристаллизатор”)). Детали кристаллизации ферментов представлены в Таблице 2.4.

Автор глубоко признателен А.Ю. Николаевой (НИЦ «Курчатовский институт») за проведение работ по кристаллизации трансаминаз.

#### *2.2.14.2. Сбор и обработка дифракционных данных. Уточнение структур ферментов*

Сбор дифракционных данных с полученных кристаллов ферментов проводили:

1. На станции «Белок» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (Москва) (кристаллы TsAdh319);
2. На станции ID29 синхротронного источника ESRF (Франция) (кристаллы HO3033);
3. На станции BL41XU синхротронного источника SPring-8 (Япония) (кристаллы AldHPyr1147, TUZN1299, GEO1900, HO3033, TaTT, Pcryo361).

Наборы дифракционных данных обрабатывали с использованием программ XDS [292,293] and CCP4 [294,295]. Решение структуры проведено методом молекулярного замещения при помощи программы MOLREP [296]. Кристаллографическое уточнение структуры проведено с использованием программ REFMAC5 [297] и COOT [298] до достижения R-факторов, указанных в Таблицах (см. ниже).

Структура TsAdh319 решена с помощью программы MOLREP [299]. Решенную ранее структуру алкогольдегидрогеназы (PDB код 3L77) использовали как стартовую модель. Уточнение структуры вели в программе REFMAC. Кристаллографические данные и параметры уточнения полученной структуры приведены в Таблице 2.5. Независимая кристаллографическая ячейка содержит две

субъединицы (N-концевые 22 а.о., включая (His)6-таг на картах электронной плотности не были обнаружены).

Структуры AldHPr1147 решены с помощью программы MOLREP [299]. В качестве стартовой модели для уточнения структур использовалась модель комплекса AldHPr1147 с NADP<sup>+</sup>, которая была определена ранее с разрешением 2.4 (PDB код 4H73).

Таблица 2.5. Кристаллографические данные, параметры съемки, решение и уточнение структур холоформы алкогольдегидрогеназы TsAdh319.

	TsAdh319
Источник излучения	К4, НИЦ «Курчатовский институт»
Длина волны (Å)	0,985
Температура образца (К)	100
Детектор	Rayonix SX165
Пространственная группа	C12 <sub>1</sub>
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	146.18, 55.50, 82.77
$\beta$ (°)	124.53
Разрешение (Å)	30.0-1.68 (1.68 – 1.79)
$R_{\text{mrgd}}-F^a$	0.112(0.480)
$I/\sigma I$	18.35 (3.6)
Полнота (%)	76.0 (74.1)
Wilson B factor	17,1
$R_{\text{work}}^b / R_{\text{free}}^c$	0.146 / 0.180
<b>Число неводородных атомов</b>	
Белок	3739
Вода	293
NADP <sup>+</sup>	98
Глицерин	6
<b>B факторы</b>	
Средний B фактор по белку	16.84
Средний B фактор воды	24.90
<b>Среднеквадратичное отклонение</b>	
Длины связей (Å)	0.0168
Валентных углов (°)	2.0096
<b>График Рамачандрана</b>	
Наиболее благоприятные (%)	92.4 %
Допустимые	7.6 %
<b>PDB code</b>	<b>3TN7</b>

\* В скобках приведены значения для последнего слоя

a)  $R_{\text{mrgd}}-F = \sum hkl \sqrt{1/(n-1)} \sum_{i=1}^n |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum hkl \sum_i I_i(hkl)$ , где  $I_i(hkl)$  наблюдаемая интенсивность, а  $\langle I(hkl) \rangle$  среднее значение.

b)  $R_{\text{work}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$ , где  $F_{\text{obs}}$  и  $F_{\text{calc}}$  наблюдаемый и расчетный структурные факторы, соответственно.

c)  $R_{\text{free}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$  для 5% данных.



Таблица 2.6. Кристаллографические данные, параметры съемки, решение и уточнение структур холоформ альдегиддегидрогеназы A1DHPyr1147, ее апоформы и тройного комплекса с 2-метилпропаналем.

	Апоформа	Holo-1	Holo-2	Holo-3	Тройной комплекс
Источник излучения	BL41XU, SPring8				
Длина волны (Å)	0.984	0.800	0.970	1.0	0.972
Температура образца (K)	100	100	100	100	100
Детектор	PILATUS 6M-F				
Пространственная группа	P 21 21 2	P 21 21 2	P 21 21 2	P 21 21 2	P 21 21 2
<i>a</i> ,	184.24	185.36	184.77	185.59	183.800
<i>b</i> ,	207.23	208.30	208.05	208.72	207.850
<i>c</i> (Å)	164.96	163.81	165.40	164.75	166.440
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90 90 90	90 90 90	90 90 90	90 90 90	90 90 90
Разрешение (Å)	29.77-3.04	29.15-1.90	59.06-2.06	90.97-2.19	59.14-2.66
Полнота (%)	98.9 (85.0)*	99.8 (99.0)	99.1 (99.0)	98.2 (97.9)	99.34 (1.00)
Повторяемость $\langle I/\sigma(I) \rangle$	7,4	4,0	4,1	4,9	5,4
<i>R</i> -merge	0,27 (0,76)	0,14	0,10 (0,77)	0,19 (0,73)	0,17 (0,77)
Overall <i>B</i> factor from Wilson plot (Å <sup>2</sup> )	43,5	25,0	35,3	22,0	42,0
<i>R</i> <sub>fact</sub> (%)	0,202	0,184	0,196	0,206	0,189
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	0,256	0,218	0,233	0,245	0,240
Общий средний <i>B</i> фактор	35,0	28,0	37,0	27,0	40,0
<b>Число неводородных атомов</b>					
Белок	30043	30690	30355	30382	30054
NADP+		396	408	384	384
Вода		3184	2900	3109	444
Гицерин		6		6	
Всего	30043	34276	33663	33881	30912
Средний <i>B</i> фактор по всем атомам (Å <sup>2</sup> )	35.0	28.0	37.0	27.0	40.0
<b>Среднеквадратичные отклонения</b>					
Длины связей (Å)	0,010	0,008	0,008	0,008	0,011
Валентные углы (°)	1,274	1,021	1,058	1,071	1,197
<b>График Рамачандрана</b>					
Наиболее благоприятные (%)	97,43	97,34	96,80	96,24	95,41
Допустимые (%)	2,47	2,45	2,86	3,40	3,94
Недопустимые (%)	0,1	0,21	0,34	0,37	0,65
<b>Код PDB</b>	5EEB	5F2C	5EUY	5EXF	5EK6

\* В скобках приведены значения для последнего слоя

Уточнение моделей проводилось с помощью программного комплекса Phenix.refine [300] и с помощью программы COOT [298]. Кристаллографические

данные и параметры уточнения полученной структуры приведены в Таблице 2.6. У всех моделей в независимой части элементарной ячейки содержится восемь идентичных субъединиц фермента. Структура трансаминазы TUZN1299 была решена методом молекулярного замещения с применением пакета программ MoRDa [301], стартовой моделью брали трансаминазу из *Thermus thermophilus* HB8 (PDB код 2E1Y), которая имеет 44% идентичности по последовательности с TUZN1299.

Таблица 2.7. Кристаллографические данные, параметры съемки, решение и уточнение структур холоформы трансаминазы TUZN1299 и ее комплекса с L-норвалином.

	TUZN1299 холоформа	TUZN1299 холоформа + L-норвалин
Источник излучения	BL41XU, SPring8	BL41XU, SPring8
Длина волны (Å)	1.0	0.7
Температура образца (К)	100	100
Детектор	PILATUS	PILATUS
Пространственная группа	P3212	P3112
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	93.75, 93.75, 213.0	93.46; 93.46; 213.17
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120
Мозаичность (°)	0.2	-
Разрешение (Å)	75.69-2.0 (2.1-2.0)*	80.94-2.15 (2.20-2.15)*
Общее число рефлексов	1413383 (192859)	-
Число независимых рефлексов	72105 (9728)	58111 (3766)
Полнота (%)	99.9 (99.9)	99.70 (98.20)
Повторяемость	19.6 (19.8)	8.2 (8.3)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	19.3 (4.8)	23.0 (2.3)
<i>R</i> <sub>meas</sub> (%) [302]	12.3 (69.7)	6.8 (118.3)
CC <sub>1/2</sub> [302]	99.9 (88.0)	100 (76.1)
Overall <i>B</i> factor from Wilson plot (Å <sup>2</sup> )	27.2	-
<i>R</i> <sub>fact</sub> (%)	12.0	18.7
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	16.8	23.4
Общий средний <i>B</i> фактор	26.4	48.5
Средний <i>B</i> фактор по белку	26.2	48.5
Средний <i>B</i> фактор по лигандам	-	40.6
Средний <i>B</i> фактор по воде	29.1	44.3
<b>Число неводородных атомов</b>		
Белок	6879	7011
Лиганды	7	114
Вода	333	179
Всего	7219	7304
<b>Среднеквадратичные отклонения</b>		
Длины связей (Å)	0.025	0.020
Валентные углы (°)	2.396	2.415
<b>График Рамачандрана</b>		
Наиболее благоприятные (%)	95.8	93.9
Допустимые (%)	3.6	5.1
Недопустимые (%)	0.6	1.0
<b>Код PDB</b>	5CE8	6THQ

\* В скобках приведены значения для последнего слоя

Решение структуры комплекса с L-норвалином проведено методом молекулярного замещения при помощи программы MOLREP. В качестве стартовой модели использовалась полученная ранее структура холоформы TUZN1299 (PDB код 5CE8). Кристаллографические данные и параметры уточнения полученных структур приведены в Таблице 2.7. У обеих моделей в независимой части элементарной ячейки содержится три независимых субъединицы фермента, которые образуют кристаллографический гексамер.

Таблица 2.8. Кристаллографические данные, параметры съемки, решение и уточнение структур холоформы трансаминазы GEO1900 и ее комплекса с  $\alpha$ -кетоглутаратом.

	GEO1900 холоформа	GEO1900 холоформа + $\alpha$ -кетоглутарат
Источник излучения	BL41XU, SPring8	BL41XU, SPring8
Длина волны (Å)	1.0	1.0
Детектор	PILATUS	PILATUS
Пространственная группа	P3 <sub>2</sub> 21	P3 <sub>2</sub> 21
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	117.65, 117.65, 135.98	117.31, 117.31, 135.31
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 120	90, 90, 120
Разрешение (Å)	58.83-1.90 (2.00-1.90) <sup>a</sup>	67.66 – 2.20 (2.26-2.20)
Число независимых рефлексов	85638 (11949)	55018 (4457)
Полнота (%)	99.6 (98.6)	99.9 (99.8)
Повторяемость	19.8 (19.3)	17.7 (18.4)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	31.75 (4.0)	15.1 (4.9)
R <sub>meas</sub> (%) <sup>b</sup>	6.8 (79.2)	13.3 (67.4)
CC <sub>1/2</sub> (%; [302])	100 (92.9)	99.8 (92.6)
Overall <i>B</i> factor from Wilson plot (Å <sup>2</sup> ) <sup>c</sup>	39.8	42.3
<i>R</i> <sub>fact</sub> (%)	15.3	15.0
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	18.8	20.8
<b>Число неводородных атомов</b>		
Белок	6671	6836
Вода	626	508
Лиганд	0	10
<b>Средний <i>B</i> фактор (Å<sup>2</sup>)</b>		
По белку	37.9	38.2
По растворителю	45.3	40.9
<b>Среднеквадратичное отклонение</b>		
Длина связи (Å)	0.021	0.019
Валентные углы (°)	1.99	2.11
<b>График Рамачандрана (%)<sup>d</sup></b>		
Наиболее благоприятные	90.5	89.9
Допустимые	9.5	8.8
Недопустимые	0	0.3
<b>PDB код</b>	<b>5CM0</b>	<b>5E25</b>

<sup>a</sup>В скобках приведены значения для последнего слоя.

<sup>b</sup> $R_{meas} = \sum_h [m/(m - 1)]^{1/2} \sum_i |I_{h,i} - \langle I_h \rangle| / \sum_h \sum_i I_{h,i}$  [303].

<sup>c</sup>В-фактор оценивали с применением программы SFCHECK [304].

<sup>d</sup>Анализ графика Рамачандрана проводили с использованием программы PROCHECK [305].

Структура комплекса трансаминазы GEO1900 с  $\alpha$ -кетоглутаратом решена методом молекулярного замещения с применением пакета программ BALBES MR [306], стартовой моделью брали трансаминазу из *T. thermophilus* (PDB код 2E1Y), аминокислотная последовательность которой имеет 42% идентичности с аминокислотной последовательностью GEO1900.

Структура холоформы GEO1900 решена в той же программе с использованием структуры комплекса GEO1900 в качестве стартовой модели. В независимой кристаллографической ячейке холоформы и комплекса содержится три независимых субъединицы, которые образуют кристаллографический гексамер. Кристаллографические данные и параметры уточнения полученных структур приведены в Таблице 2.8.

Таблица 2.9. Кристаллографические данные, параметры съемки, решение и уточнение структур холоформы трансаминазы Pcryo361

	Pcryo361
Источник излучения	BL41XU, SPring8
Длина волны (Å)	1.0
Температура (К)	100
Детектор	PILATUS
Пространственная группа	C121
<i>a, b, c</i> (Å)	182.07, 67.91, 118.07
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 128.8, 90.0
Мозаичность (°)	0.32
Разрешение (Å)	70.94-1.6 (1.63-1.60)*
Полнота (%)	97.0 (98.6)
Повторяемость	6.4 (6.5)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	10.6 (2.6)
R <sub>meas</sub> (%) [302]	11.5 (90.8)
CC <sub>1/2</sub> [302]	99.7 (75.2)
Overall <i>B</i> factor from Wilson plot (Å <sup>2</sup> )	11.8
<i>R</i> <sub>fact</sub> (%)	15.9
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	18.9
<b>Среднеквадратичные отклонения</b>	
Длины связей(Å)	0.02
Валентных углов (°)	2.03
<b>График Рамачандрана</b>	
Наиболее благоприятные (%)	96
Допустимые (%)	3
Недопустимые (%)	1
<b>PDB entry code</b>	<b>6ERK</b>

\* В скобках приведены значения для последнего слоя

Структура трансаминазы Pscyo361 решена с применением пакета программ MoRDa, стартовой моделью брали DAPA синтазу из *E. coli* (PDB код 1QJ5). В независимой кристаллографической ячейке находится две независимых субъединицы. Кристаллографические данные и параметры уточнения полученных структур приведены в Таблице 2.9.

Структура HO3033 решена методом молекулярного замещения с применением пакета программ BALBES, стартовой моделью брали трансаминазу из *Burkholderia pseudomallei* (PDB код 3U0G). В независимой кристаллографической ячейке холоформы содержится шесть субъединиц, которые образуют кристаллографический гексамер. Кристаллографические данные и параметры уточнения полученных структур приведены в Таблице 2.10.

Таблица 2.10. Кристаллографические данные, параметры съемки, решение и уточнение структур холоформы трансаминазы HO3033

	HO3033
Источник излучения	ID23-1, ESRF
Длина волны (Å)	0.9677
Температура образца (K)	100
Детектор	PILATUS
Пространственная группа	C222 <sub>1</sub>
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	95.08, 164.93, 254.22
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90.0, 90.0, 90.0
Разрешение (Å)	50.0-2.35 (2.41-2.35)
Полнота (%)	97.0 (98.7)
Повторяемость	4.0 (3.8)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	8.28 (1.41)
R <sub>meas</sub> (%) [302]	11.1 (90.1)
CC <sub>1/2</sub> [302]	0.997 (0.599)
<i>R</i> <sub>fact</sub> (%)	19.9
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	23.5
<b>Среднеквадратичные отклонения</b>	
Длины связей(Å)	0.01
Углы (°)	2.09
<b>График Рамачандрана</b>	
Наиболее благоприятные (%)	97.9
Допустимые (%)	2.1
<b>PDB entry code</b>	6H65

\* В скобках приведены значения для последнего слоя

Структура трансаминазы TaTT в PMP форме была решена методом молекулярного замещения с применением пакета программ MoRDa, структура трансаминазы из *T. uzoniensis* (PDB код 5CE8) брали как стартовую модель. Структура трансаминазы TaTT в PLP форме была решена методом молекулярного

замещения с применением пакета программ MOLREP, за стартовую модель брали структуру PMP-формы трансаминазы. В независимой кристаллографической ячейке PLP формы ТаТТ содержится три независимых субъединицы, которые образуют кристаллографический гексамер; в независимой кристаллографической ячейке PMP-формы ТаТТ содержится одна субъединица. Структуры вариантов ТаТТ (mP3 и mP3O1) решены методом молекулярного замещения в программе MOLREP, стартовой моделью брали структуру PLP формы ТаТТ (PDB код 6GKR).

Таблица 2.11. Кристаллографические данные, параметры съемки, решение и уточнение структур трансаминазы ТаТТ в PLP форме и PMP форме, вариантов ТаТТ mP3 mP3O1.

	<i>ТаТТ</i> (PMP form)	<i>ТаТТ</i> (PLP form)	mP3	mP3O1
Источник излучения	ID30A, ESRF		BL41XU, Spring8	
Длина волны (Å)	0.97	1.00	1.00	1.00
Температура образца (K)	100	100	100	100
Детектор	PILATUS		PILATUS	
Пространственная группа	H32	C222 <sub>1</sub>	H32	H32
<i>a</i> , (Å)	144.75,	102.51,	146.50,	146.02,
<i>b</i> ,	144.75,	146.61,	146.50,	146.02,
<i>c</i>	144.50	119.57	143.78	142.12
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Мозаичность (°)	0.15	0.58		
Разрешение (Å)	50.0-1.50 (1.60-1.50)*	84.01 - 2.19 (2.26-2.19)	95.13-1.75 (1.78-1.75)	94.47 - 1.90 (1.94-1.90)
Полнота (%)	99.9 (99.8)	98.3 (99.0)	98.6 (98.2)	98.8 (99.4)
Повторяемость $\langle I/\sigma(I) \rangle$	7.5 (7.7)	4.4 (4.2)	2.8 (2.8)	4.0 (4.0)
$\langle I/\sigma(I) \rangle$	17.04 (2.83)	7.0 (2.0)	11.3 (1.0)	10.0 (0.3)
R <sub>meas</sub> (%) [302]	6.7 (74.9)	17.2 (88.4)	5.5 (100.1)	8.3 (440.1)
CC <sub>1/2</sub> [302]	99.9 (82.9)	99.0 (66.1)	99.9 (40.1)	99.9 (12.1)
<i>R</i> <sub>fact</sub> (%)	14.0	15.9	16.1	20.6
<i>R</i> <sub>free</sub> (%)	17.6	20.6	20.1	25.5
<b>Среднеквадратичные отклонения</b>				
Bonds (Å)	0.02	0.01	0.02	0.02
Angles (°)	2.22	1.60	2.03	2.22
<b>График Рамачандрана</b>				
Наиболее благоприятные (%)	94.7	94.6	96.0	93.3
Допустимые (%)	5.0	4.3	2.6	3.9
Недопустимые	0.3	1.1	1.4	2.8
<b>PDB entry code</b>	<b>6Q8E</b>	<b>6GKR</b>	<b>7NEA</b>	<b>7NEB</b>

\* В скобках приведены значения для последнего слоя

В независимой кристаллографической ячейке обоих вариантов содержится одна субъединица. Кристаллографические данные и параметры уточнения полученных структур приведены в Таблице 2.11.

Автор глубоко признателен к.б.н. К.М. Бойко (ФИЦ Биотехнологии РАН) за проведение всего объема работ в рамках рентгеноструктурного анализа, включая съемку, решение и уточнение пространственных структур ферментов.

#### *2.2.14.3. Анализ полученных структур*

Визуальный анализ структур проводили в программах COOT и PyMOL, Молекулярная Графическая Система, Версия 1.2r3pre (Schrödinger, США). Контакты кофактора PLP в моделях трансминаз и кофермента NADP в моделях AIDHPyr1147 анализировали в программе LigPlot [307,308]. Наложение субъединиц TsAdh319 и гомологичных ферментов проводили в программе DaliLite [309], COOT и CCP4.

Сравнение структур и 3D-выравнивание проводили в программе PDBeFOLD [310]. Расчет параметров межсубъединичных контактов проводили с помощью сервера PISA [311]. Оценку В-факторов, состава вторичных элементов структуры, водородных связей и солевых мостиков (расстояние меньше 4.0 Å между атомами азота и кислорода противоположно заряженных боковых групп) были выполнены в программе WHATIF [312].

Автор глубоко признателен к.б.н. К.М. Бойко за помощь в проведении анализа полученных структур.

#### *2.2.14.4. Анализ водородных связей в кристаллических структурах TsAdh319, AIDHPyr1147, TaTT и их гомологов*

Для каждого проанализированного белка была взята модель из банка данных PDB и подготовлен файл (в формате pdb), содержащий только те субъединицы, которые образуют молекулу белка в растворе. Молекулы воды и лиганды были удалены из модели. Далее все потенциальные водородные связи в модели были определены с помощью программы HBOND (<http://cib.cf.ocha.ac.jp/bitool/HBOND>). Заложенное в программе максимальное расстояние между донорным и акцепторным атомом составило 3.5 Å и угол D-H...A 150-180 °. Данная программа сначала достраивает положения атомов водорода в структуре, затем идентифицирует возможные доноры и акцепторы и уже для каждой пары электроотрицательных атомов определяет наличие водородной связи согласно указанным геометрическим критериям. Доступная растворителю площадь поверхности (ASA) для каждого

атома в модели рассчитывалась в программе AREAIMOL пакета CCP4 [313]. Атомы со значениями ASA равными 0.0 считались внутренними атомами, а остальные атомы считались находящимися на поверхности. Для модели белка, которая содержала некоторые остатки в нескольких конформациях, оба файла (HBOND и AREAMOL) были дополнены расчетами для каждой конформации. Далее оба файла (HBOND и AREAMOL) были объединены в один файл. В зависимости от значения ASA и свойства боковой группы остатка, водородные связи были поделены на несколько групп: водородных связей между внутренними атомами (**Inside-Inside**), между атомами на поверхности (**Surface-Surface**), между атомами боковой группы нейтральных остатков и/или атомами N или O основной цепи (**Neutral-Neutral**), между атомами, один из которых либо принадлежит боковой группе нейтрального аминокислотного остатка, либо N или O атом основной цепи, а другой принадлежит боковой группе заряженного остатка (**Charged-Neutral**), и между атомами боковых групп заряженных остатков (**Charged-Charged**). Разность между общим количеством водородных связей и суммой водородных связей «**Inside-Inside**» и «**Surface-Surface**» – это количество водородных связей **Inside-Surface**, образованных между доступным для растворителя атомом и атомом, погруженным в глобулу. Важно отметить, что **Charged-Charged** водородные связи – это не что иное, как солевые мостики.

Автор признателен к.ф.-м.н. Т.Е. Петровой (Институт математических проблем биологии РАН, Пущино) за помощь в проведении анализа водородных связей.

## 2.2.15. Прочие аналитические методы

Идентификация продуктов аминирования дикетонов проведена методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии (ГХ-МС) на спектрометре GCMS-QP2010 (Shimadzu, Japan). Спектрометр оснащен диметилполисилоксановой колонкой 0.25 мм ID OPTIMA-1 (25 м × 0.25 мм) (Macherey–Nagel, Germany). Автор признателен к.х.н. А.О. Ружицкому за проведение хроматографического анализа на базе оборудования ЦКП ФИЦ Биотехнологии РАН.



## 2.2.16. Прочие расчетные методы

Анализ системы водородных связей алкогольдегидрогеназ TsAdh319, Tm и SR в динамике при двух температурах был проведен к.б.н. А.В. Попинако (ФИЦ Биотехнологии РАН) с использованием пакета программ GROMACS v4.6.5 [314,315]. В ходе эксперимента были проведены МД симуляции тетрамеров TsAdh319, TmDH и SR при 27 °C и 85 °C в воде в течение 30 нс без ограничений. Водородные связи были рассчитаны с использованием программы g\_hbond [316]. Это программа определяет водородные связи между всеми возможными донорами D и акцепторами A по следующим геометрическим критериям  $r \leq r_{HB} = 0.35$  нм,  $\alpha \leq \alpha_{HB} = 30^\circ$ , где r расстояние между донором и акцептором и  $\alpha$  - угол атом водорода-донор-акцептор. OH и NH рассматриваются как доноры, O и N атомы рассматриваются как акцепторы.

Моделирование субстратов в активном центре трансаминазы Pcruo361 было проведено к.б.н. А.В. Попинако (ФИЦ Биотехнологии РАН) с использованием пакета программ AutoDockVina [317] и программы визуализации UCSF Chimera version 1.11 [318]. Функциональный димер Pcruo361 был построен с применением программ MODELLER [319], Mustguseal [320], PropKa [321], PDB2PQR [322].

Моделирование субстратов в активном центре трансаминазы TUZN1299 было проведено к.х.н. Д.А. Суплатовым (НИИ им. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова) с использованием пакета программ Autodock v. 4.2.6 и методов молекулярной динамики [323].

## 2.2.16. Выравнивание белковых последовательностей. Поиск новых трансаминаз

Поиск по последовательности и уровень сходства определяли в программе BLAST [324]. Выравнивание аминокислотных последовательностей проводили в программах MUSCLE [325] и CLUSTAL W [326].

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.

Отбор PLP-зависимых трансаминаз IV типа укладки с новыми свойствами проводили среди последовательностей, кодирующих трансаминазы IV типа PLP-укладки в аннотированных геномах прокариот путем анализа построенных выравниваний. Стратегия отбора сводилась к поиску по последовательности новых ферментов из неохарактеризованных подсемейств (групп), которые были выделены в результате филогеномного анализа репрезентативной с точки зрения таксономии выборки последовательностей трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена, составленной на базе последовательностей из COG0115 (Branched-chain amino acid aminotransferase/4-amino-4-deoxychorismate lyase) [327] и представленных в последнем релизе базы данных кластеров ортологичных групп, составленной и аннотированной с использованием экспертного ручного анализа [328]. Также в качестве референсных были добавлены последовательности еще 23 грибных трансаминаз, активных с первичными (*R*)-аминами, для которых субстратная специфичность и новые характеристические мотивы последовательности были определены ранее [193] и последовательности детально изученных трансаминаз из известных семейств с каноническими характеристическими мотивами, определяющими субстратную специфичность данного семейства внутри суперсемейства IV типа укладки PLP-связывающего мотива: eBCAT (последовательность ILVE\_ECOLI), ADCL из *E. coli* ecADCL (последовательность PABC\_ECOLI) и bsDAA (последовательность DAAA\_BACYM). Филогенетическое дерево было построено по результатам выравнивания 298 последовательностей из 124 прокариотических геномов в программе MEGA 7 [329]. Отобранные трансаминазы имели изменения в характеристических мотивах, и этим отличались от охарактеризованных ранее представителей канонических семейств трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена: DAAT, BCAT и R-TA.

Мутации/замены в исследуемых ферментах были предложены на основе биоинформатического выравнивания родственных ферментов с известными свойствами, а также по результатам выравнивания пространственных структур

гомологичных ферментов, депонированных в банке данных PDB, в программе PDBeFOLD [330].

Автор выражает признательность к.б.н. Д.В. Дибровой за помощь в проведении биоинформатического анализа трансаминаз.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНАЯ NADP-ЗАВИСИМАЯ АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *Thermococcus sibiricus* (TsAdh319)

#### 3.1.1. Распространенность (представленность) алкогольдегидрогеназ в археях

В биотехнологии АДН рассматриваются как биокатализаторы синтеза оптически активных вторичных спиртов из прохиральных кетонов, как компоненты мультиферментных процессов для целей регенерации кофермента, окисления спиртовой группы и как компоненты катализаторов на основе целой клетки для поддержания низких концентраций альдегидов в цитоплазме [31,80]. Для повышения выхода продукта в биотехнологические процессы проводят при температурах 40-50 °С и при высоких концентрациях субстратов, кроме того в реакционные среды вводят органические растворители. В этом контексте интересны АДН из экстремофильных микроорганизмов, в том числе из архей как ферменты с повышенной (термо)стабильностью. В геномах архей обнаружены представители всех групп NAD(P)-зависимых АДН [331,332], но большинство охарактеризованных ферментов – среднецепочечные [333–337] или длинноцепочечным АДН [338–340]. К началу исследований короткоцепочечной TsAdh319 из археи *T. sibiricus* не были получены структуры архейных SDR, но были функционально охарактеризованы короткоцепочечная АДН и альдокеторедуктаза из археи *Pyrococcus furiosus* [341,342], позднее была описана структура NAD(P)-зависимой карбонилредуктазы из археи *Aeropyrum pernix* K1 (PDB ID: 5B1Y) [343]. Гипертермофильная анаэробная архея *Thermococcus sibiricus*, изолированная из высокотемпературного нефтеносного горизонта Юрского периода, способна расти при 40-88 °С и при pH в диапазоне 5.8-9.0 на сложных органических субстратах [344]. Ген АДН0319, кодирующий короткоцепочечную TsAdh319, обнаружен в геноме в сахаралитическом кластере, который содержит полный набор генов, кодирующих

ферменты для гидролиза целлюлозы и  $\beta$ -лиinkerных полисахаридов. Поэтому, возможно, TsAdh319 задействована в карбогидратном метаболизме.

### 3.1.2. Функциональная характеристика алкогольдегидрогеназы TsAdh319

TsAdh319 – гомотетрамер, субъединицы которого состоят из 234 а.о. и имеют массу 26.2 kDa. Идентичность TsAdh319 с короткоцепочечной АДН из *P. furiosus* (AdhA, PF\_0074) составляет 85%. Рекомбинантная TsAdh319 была экспрессирована в *E. coli* Rosetta-gami (DE3) с (His)<sub>6</sub>-тагом на N-конце. TsAdh319 активна только с NADP(H). Фермент отличается широкой субстратной специфичностью, термостабильностью и высоким термооптимум реакций окисления/восстановления, а также стабильностью и активностью в 4М NaCl и в водно-органических смесях. Ионы металлов как одновалентных (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>), так и двухвалентных (Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>) в концентрации 10 мМ не влияют на скорость ферментативного окисления.

На Рис. 3.1. приведены рН-зависимости ферментативной реакции окисления 2-пропанола (А) и восстановления пирувальдегида (В) и температурные зависимости реакции окисления 2-пропанола и восстановления пирувальдегида (С,Д). TsAdh319 эффективно катализирует окисление в интервале рН 7.0-8.5, реакция восстановления наиболее эффективна в щелочной области при рН>10.0. Температурный оптимум реакции окисления 2-пропанола не был достигнут, в реакции окисления 2(S),5(S)-гександиола составил 80 °С. Для исследования свойств фермента и определения кинетических параметров реакций была выбрана температура реакции 60 °С (эта температура надежно поддерживается термостатируемым кюветным отделением спектрофотометра).

TsAdh319 эффективно окисляет одноатомные, двухатомные спирты и полиолы (сахара); наибольшая активность TsAdh319 с сахарами наблюдается в реакциях окисления D-арабинозы, среди спиртов наилучшим субстратом оказался 2,5-гександиол (Таблица 3.1), при этом (S)-изомеры предпочтительнее как среди спиртов, так и среди сахаров. Наибольшая активность TsAdh319 в реакциях восстановления наблюдалась с 2-оксо-2-фенилацетальдегидом и 2,3-бутандионом. В целом, при 60 °С TsAdh319 эффективнее в реакциях восстановления.

Таблица 3.1. Относительная активность TsAdh319 в реакциях окисления при 60 °С, рН 10.5 (50 мМ Gly-NaOH буфер) и в реакции восстановления при 60 °С, рН 7.5 (100 мМ Na-фосфатный буфер). Субстраты взяты в концентрации 250 мМ. Субстраты (\*) взяты в концентрации 50 мМ. Субстрат (\*\*) взят в концентрации 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.

Окисление		Восстановление	
Субстраты	Относительная активность (%)	Субстраты	Относительная активность (%)
2-пропанол	100	пирувальдегид	100
1-пропанол	34	2-оксо-2-фенилацетальдегид **	333
1-бутанол	80	2,3-гександион*	287
(S)-(+)-2-бутанол	196	2,3- бутандион	270
rac-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
этиленгликоль	0	ацетофенон*	12
глицерин	16	глицеральдегид*	8
2-метоксиэтанол	0	пируват*	7
этанол	36	ацетонилацетон*	5
D-арабиноза*	200	циклогексанон	4
L-арабиноза*	17	пропиональдегид*	0
D-ксилоза*	80	2,4-пентандион	0
D-рибоза*	35	ацетон	0
D-глюкоза*	146	циклопентанон	0
D-манноза*	48	2-пентанон*	0
целлобиоза*	71	D-арабиноза*	0
2(S),5(S)-гександиол	600	D-ксилоза*	0
rac-2,5-гександиол	440	D-глюкоза*	0
1,6 -гександиол	80	целлобиоза*	0
1,3-бутандиол	91		
2-метил-2,4-пентандиол	24		

Кинетические эксперименты показали исключительную термостабильность TsAdh319: инкубация при 70 °С и 80 °С в течение 90 мин не вызывала снижение активности, но даже незначительную активацию. Время полуинактивации при 90 °С – 2 ч., при 100 °С - 1 ч. Анализ термостабильности методом ДСК показал, что термическая денатурация TsAdh319 полностью необратима, необратимая денатурация начинается при температуре выше 90 °С. Кривая плавления имеет максимум ( $T_m$ ) при  $104,2 \pm 0,3$  °С с плечом в низкотемпературной области

(Рис. 3.2В). В буфере с 1 М NaCl кривая теплопоглощения не изменила форму, максимум термической денатурации снизился незначительно до  $102.2 \pm 0.3$  °С, и энтальпия денатурации снизилась с 438 кДж/моль/субъединица до 348 кДж/моль/субъединица.

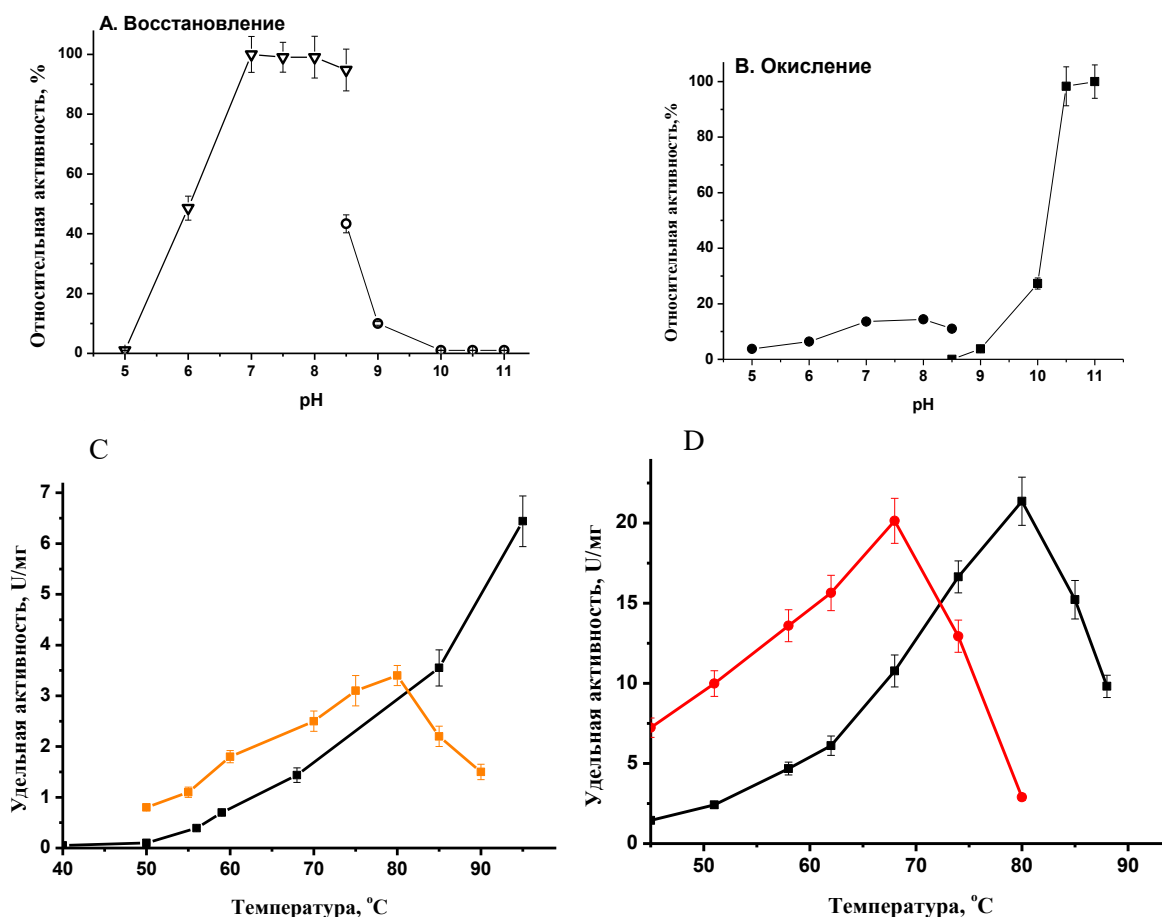


Рис. 3.1. pH зависимость активности TsAdh319 (**A**) в реакции окисления 2-пропанола (250 мМ) при 60 °С и (**B**) в реакции восстановления пирувальдегида (250 мМ) при 60 °С. Реакционную смесь прогревали и реакцию инициировали добавлением фермента. 100% соответствует  $1.00 \pm 0.08$  U/мг удельной активности TsAdh319 в реакции окисления 2-пропанола и в реакции восстановления  $2.2 \pm 0.2$  U/мг пирувальдегида при 60 °С. Температурная зависимость удельной активности TsAdh319 в реакции окисления 2-пропанола (**C**) и 2(S),5(S)-гександиола (**D**) в 50 мМ Gly-NaOH буфере, pH 10.5, (черный) в буфере с 1 М NaCl (оранжевый и красный, соответственно).

Для TsAdh319 наблюдается активация в реакции окисления при 60 °С при добавлении в реакционную смесь 0.3-4 М NaCl (Рис. 3.3). Для объяснения эффекта NaCl были построены и проанализированы температурные зависимости реакции окисления неспецифического 2-пропанола и специфического 2(S),5(S)-гександиола в присутствии 1 М NaCl (Рис. 3.1С,Д).

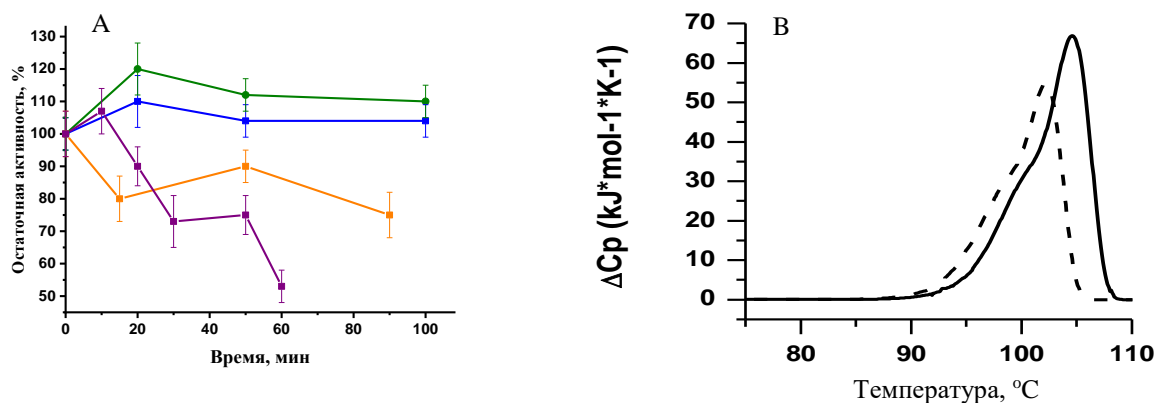


Рис. 3.2. Термостабильность TsAdh319. (А) Остаточная активность после инкубации при различных температурах 70 °С (зеленый), 80 °С (синий), 90 °С (оранжевый) и 98 °С (пурпурный). Активность определяли в реакции окисления 2-пропанола (250 мМ) при 60 °С, 50 мМ Gly-NaOH буфер, рН 10.5. Активность исходного неинкубированного фермента взята за 100%. (В) Профиль ДСК 1.0 мг/мл TsAdh319 в 100 мМ Na-фосфатном буфере, рН 7.5 (сплошная линия) и с добавлением 1 М NaCl (прерывистая линия).

Очевидно, что 1 М NaCl повышает активность TsAdh319 при температурах ниже  $T_{opt}$ , по-видимому, за счет снятия некоторых деформаций, экранирования электростатических взаимодействий, например, солевых мостиков и, как результат, усиления конформационной подвижности белковой глобулы при субоптимальной температуре.  $T_{opt}$  реакции снижается, то есть инактивация фермента начинается при более низких температурах в буфере с NaCl, чем просто в буферах.

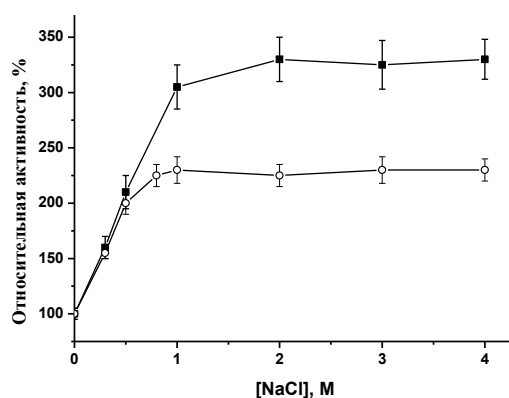


Рис. 3.3 Влияние NaCl на активность TsAdh319 при 60 °С, рН 10.5. Активность измеряли в реакции с 2-пропанолом (○); 100%  $-0.86 \pm 0.07$  U/мг и 2,5-гександиолом (■) 100%  $3.6 \pm 0.4$  U/мг.



Учитывая практически одинаковые температуры плавления белковой глобулы TsAdh319 в буфере и в буфере с 1М NaCl (Рис. 3.2В) инактивация фермента, по-видимому, связана с нарушениями в активном центре (ослабление контактов, окисление функциональных групп и т.д.). Нельзя исключить и влияние 1 М NaCl на стабильность молекул субстратов.

Скорость термоинактивации TsAdh319 также изменяется в присутствии 1М NaCl: наблюдается стабилизирующий эффект соли (Рис. 3.5). Скорость окисления 2-пропанола снижается на 34% и 58% за 24 ч (1440 мин) инкубации при 80 °С в буферах с 1 М NaCl и без него, соответственно. При инкубации при 90 °С наблюдается снижение скорости окисления 2-пропанола на 31% и 40% в буфере с 1 М NaCl и без него, то есть уже практически нет стабилизирующего эффекта. Расчетные значения периода полураспада TsAdh319 в буфере с 1 М NaCl или без него составили 37 ч. против 20 ч. при 80 °С и 8 ч. против 6 ч. при 90 °С, соответственно. Таким образом, стабилизирующий эффект NaCl выше при 80 °С. Причины стабилизирующего эффекта NaCl при термоинактивации не очевидны, учитывая, что термостабильность белка в значительной степени определяется электростатическими взаимодействиями (солевыми мостиками) на его поверхности, следовало ожидать, что добавление 1 М NaCl приведет к ускорению термоинактивации. Однако стабилизация TsAdh319 может быть результатом компактизации белковой глобулы: в результате проникновения ионов хлора на поверхность белка усиливаются гидрофобные взаимодействия и гидрофобное ядро становится компактнее. Другими словами, здесь, по-видимому, задействованы гидрофобные взаимодействия.

Учитывая активность TsAdh319 в широком диапазоне концентраций NaCl от 0 М до 4.0 М, фермент следует рассматривать как галотолерантный, а не галофильный.

TsAdh319 отличается стабильностью в водно-органических смесях, и сохраняет активность при добавлении 50% растворителя в реакцию (Таблица 3.3).

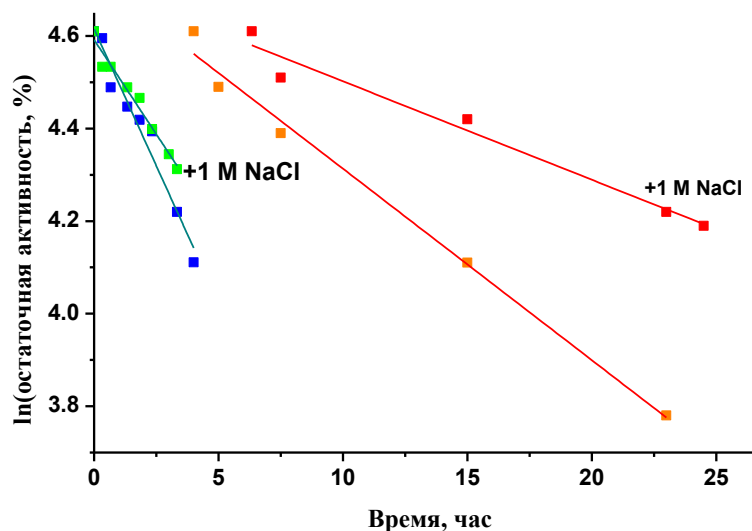


Рис. 3.5. Термостабильность TsAdh319. Зависимость остаточной активности (ln) TsAdh319 (0.4 мг/мл) в реакции окисления 2-пропанола от времени прединкубации при 80 °C (красный и оранжевый) и 90 °C (зеленый и синий) в 100 mM Na-фосфатном буфере, pH 7.5, содержащем 100 mM или 1 M NaCl. Реакцию окисления 2-пропанола проводили в стандартных условиях при 60 °C, pH 10.5.

Таблица 3.3. Влияние растворителей, смешивающихся и несмешивающихся с водой, на активность TsAdh319. Инкубацию проводили с 0.2 мг/мл фермента.

Растворитель	остаточная активность (U/мг) после инкубации 4 ч при 55 °C в присутствии 50% (v/v) растворителя	Относительная активность в реакции с добавлением 50% растворителя <sup>а)</sup> , %	
		буфер без NaCl	буфер с 600 mM NaCl
нет	1.0 (100%)	100	100
ДМСО	0.98 (98%)	0	40
ДМФА	1.0 (100%)	13	41
метанол	0.98	25	9
ацетонитрил	0.95	0	0
этилацетат	0.47	0 <sup>б)</sup>	33 <sup>б)</sup>
хлороформ	1.05	79 <sup>б)</sup>	81 <sup>б)</sup>
п-гексан	1.05	60 <sup>б)</sup>	118 <sup>б)</sup>
п-декан	0.36	91 <sup>б)</sup>	107 <sup>б)</sup>

а) активность определяли в реакции окисления 2-пропанола при 60 °C;

б) с несмешивающимися с водой растворителями реакцию проводили в буфере, насыщенном растворителем.

Поскольку добавление NaCl в реакционную среду приводит к увеличению скорости реакции окисления спиртов, то эффекты органических растворителей проанализировали как просто в буфере, так и в буфере с добавлением 600 mM NaCl. Представленные в Таблице 3.3 результаты позволяют сделать вывод о том, что после инкубации в буфере с 50% растворителя фермент сохраняет активность на исходном

уровне (кроме этилацетата и п-декана), а возможные в присутствии органического растворителя изменения в структуре, например, частичная денатурация, обратимы. Введение 50% растворителя в реакцию приводит к инаktivации фермента или ингибирует реакцию (конкурентное ингибирование растворителем). Смешивающиеся с водой растворители эффективнее влияют на ферментативную реакцию. Кроме того, 600 мМ NaCl оказывает стабилизирующий эффект (соль как лиопротектант). В присутствии соли воздействие растворителя меньше. Стоит отметить, что TsAdh319 сохраняла 57% активности в 25% (v/v) 2-пропанола (субстрата), то есть фермент можно применять в биотехнологическом процессе регенерации кофактора NADP при высоких температурах.

### **3.1.3. Кинетические параметры реакций, катализируемых TsAdh319. Эффекты 1 М NaCl**

TsAdh319 активна исключительно с фосфорилированной формой кофермента NADP(H), такое же предпочтение NADP(H) показано и для AdhA из *P. furiosus* [341], короткоцепочечной дегидрогеназы из *Lactobacillus kefir* [345] и альдокеторедуктазы из *P. furiosus* [331]. В реакциях, катализируемых TsAdh319,  $K_M$  для NADP<sup>+</sup> и NADPH составили  $(0.022 \pm 0.002)$  мМ  $(0.020 \pm 0.003)$  мМ, соответственно, эти значения сходны со значениями  $K_M$  для NADP<sup>+</sup> и NADPH в реакциях, катализируемых AdhA:  $(0.08 \pm 0.01)$  мМ и  $(0.08 \pm 0.01)$  мМ, соответственно. Наблюдаемое для обеих АДН совпадение значений  $K_M$  для NADP<sup>+</sup> и NADPH отражает независимость степени насыщения сайтов связывания кофермента в ферменте от окисленного состояния кофермента, то есть предпочтение прямой или обратной реакции определяются эффективностью связывания субстрата (спирта или альдегида). С другой стороны, это совпадение могло быть случайным и определяться экспериментальными условиями, так как в экспериментах использовались разные буферы: для определения  $K_M$  NADP<sup>+</sup> использовали буфер 50 мМ глицин/NaOH, pH 10.5, для  $K_M$  NADPH - 100 мМ фосфатный буфер, pH 7.5. Стоит отметить, что эффективность связывания субстрата ниже эффективности связывания кофермента (Таблица 3.4). По уровню активности и величине  $k_{cat}$  при 60 °C TsAdh319 относится к медленным дегидрогеназам.

Таблица 3.4. Кинетические параметры реакции окисления и восстановления, катализируемой TsAdh319, при 60 °С, в буферах и в буферах с добавлением 1 М NaCl (*курсив*).

Кофермент или субстрат	Наблюдаемые			
	$K_M$ , (мМ)	$V_{max}$ , (U мг <sup>-1</sup> )	$k_{cat}$ , (с <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_M$ (с <sup>-1</sup> мМ <sup>-1</sup> )
NADP <sup>+</sup> <sup>a</sup>	0.020 ± 0.0037	4.23 ± 0.16	2.02 ± 0.08	101 ± 21
	<i>0.080 ± 0.012</i>	<i>14.39 ± 0.71</i>	<i>6.88 ± 0.34</i>	<i>86 ± 13</i>
NADPH <sup>b</sup>	0.020 ± 0.003	3.16 ± 0.11	1.51 ± 0.05	76 ± 12
	<i>0.146 ± 0.025</i>	<i>15.61 ± 0.25</i>	<i>7.46 ± 0.20</i>	<i>51 ± 9</i>
2-пропанол	168 ± 29	1.10 ± 0.09	0.53 ± 0.04	0.0032 ± 0.0005
	<i>591 ± 57</i>	<i>3.42 ± 0.17</i>	<i>1.64 ± 0.08</i>	<i>0.0028 ± 0.0003</i>
2(S),5(S)- гексанол	13.10 ± 2.46	4.59 ± 0.22	2.20 ± 0.10	0.17 ± 0.03
	<i>17.00 ± 0.04</i>	<i>14.40 ± 0.50</i>	<i>6.9 ± 0.31</i>	<i>0.41 ± 0.06</i>
2,3-пентандион	1.05 ± 0.19	2.96 ± 0.11	1.4 ± 0.04	1.33 ± 0.24
	<i>2.20 ± 0.39</i>	<i>9.86 ± 0.48</i>	<i>4.74 ± 0.23</i>	<i>2.15 ± 0.40</i>
пирувальдегид	17.75 ± 3.38	4.26 ± 0.40	2.04 ± 0.19	0.11 ± 0.02
	<i>14.43 ± 2.92</i>	<i>8.43 ± 0.58</i>	<i>4.03 ± 0.28</i>	<i>0.28 ± 0.06</i>

а) параметры определяли для реакции с 2,5-гександиолом

б) параметры определяли для реакции с пирувальдегидом

Значения  $K_M$  обеих форм кофермента увеличиваются при введении 1 М NaCl в реакционную смесь при 60 °С, тогда как  $K_M$  субстратов увеличиваются незначительно (Таблица 3.4). Добавление 1 М NaCl приводит к 2.5-кратному увеличению каталитической константы ( $k_{cat}$ ) для всех субстратов. Между тем, при 1 М NaCl значение  $k_{cat}/K_M$  как меры специфичности, снижалась для кофермента и увеличивалась для субстратов. Таким образом, добавление 1 М NaCl улучшает конверсию субстратов, но снижает эффективность связывания кофермента. Возможно, такие противоположные тенденции отражают различия в механизмах связывания субстрата и кофермента. Кристаллографические данные показывают, что электростатические взаимодействия доминируют в связывании кофермента, в то время как гидрофобные взаимодействия могут быть основными при связывании субстрата, учитывая гидрофобность субстрат-связывающей полости.

Методом спектрофлуоресценции было проанализировано связывание обеих форм кофермента NADPH и NADP<sup>+</sup> в буфере с 1 М NaCl и без соли. (Рис. 3.6).

Спектр апоформы не меняется в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.5, при 60 °С после добавления 1 М NaCl, что указывает на сохранение пространственной структуры белковой глобулы и устойчивость TsAdh319 к воздействию соли. Связывание NADPH приводит к смещению спектра в синюю область на 5 нм в буфере с 1М NaCl и на 13 нм в буфере без соли. Связывание NADP<sup>+</sup> в рабочем буфере 0.1 М Gly-NaOH, pH 10.0, приводит к смещению спектра в синюю область на 5 нм в буфере с 1М NaCl и на 11 нм в буфере без соли. Изменения в спектрах при титровании указывает на более прочное связывание обеих форм кофермента в буфере без соли, то есть на значительный вклад электростатических взаимодействий в связывание кофермента. Рассчитанные константы связывания  $K_D$  для NADPH составили  $0.58 \pm 0.09 \mu\text{M}$  и  $0.35 \pm 0.03 \mu\text{M}$  в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.5, в присутствии и без 1 М NaCl;  $K_D$  для NADP<sup>+</sup> составили  $2.74 \pm 0.12 \mu\text{M}$  и  $0.63 \pm 0.05$  в рабочем буфере 0.1 М Gly-NaOH, pH 10.0, с 1М NaCl и без соли, соответственно.

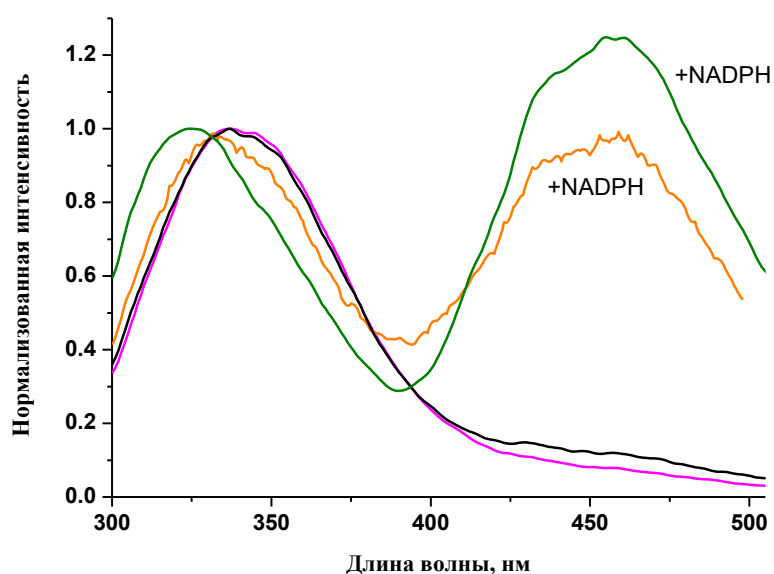


Рис. 3.6. Эффекты 1 М NaCl на спектры флуоресценции TsAdh319. Спектры апоформы TsAdh319 (черный) и комплекса с NADPH (зеленый) в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.5, при 60 °С. Спектры апоформы TsAdh319 (лиловый) и комплекса с NADPH (оранжевый) в 1 М NaCl в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7.5, при 60 °С. Длина волны возбуждения 280 нм.

Стоит отметить также смещение спектра апоформы в щелочном буфере в красную область, что указывает на изменение окружения ароматических остатков на более гидрофильное, возможно, это указывает на некоторую «рыхлость» структуры в щелочном буфере.

Также наблюдаемые смещения спектров флуоресценции холоформы и апоформы в 1 М NaCl показывают изменение окружения остатков Trp и Tyr на более гидрофильное, что может быть связано с экспонированием этих остатков в растворитель или сорбцией ионов соли на поверхности белковой глобулы. Нужно отметить, что константа специфичности ( $k_{cat}/K_M$ ) как для NADP<sup>+</sup>, так и для NADPH практически не меняется при введении 1 М NaCl в ферментативную реакцию (Таблица 3.4), то есть соль не влияет на эффективность переноса гидрид иона.

### 3.1.4. Структура TsAdh319. Строения субъединицы

Дифракционный набор с кристаллов TsAdh319 был собран с разрешением 1.68 Å. Анализ контактов показал, что функциональная единица TsAdh319 – тетрамер (Рис. 3.7). Две субъединицы (А и В) связаны дисульфидной связью. RMSD между атомами C $\alpha$  субъединиц А и В составляет 0,1 Å (с 234 выровненными остатками). Строение субъединицы TsAdh319 приведено на Рис. 3.8.

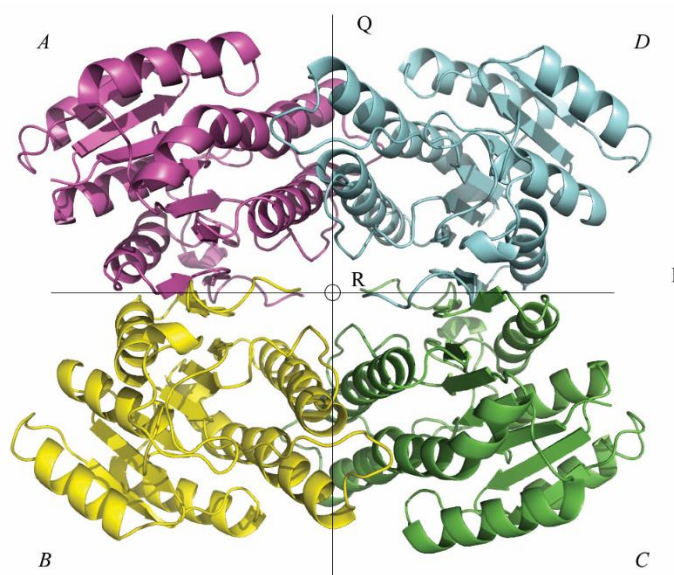


Рис. 3.7. Общий вид тетрамера TsAdh319. Субъединица А в фиолетовом цвете, В – в желтом, С – в зеленом, D – в сером. Субъединицы симметричны относительно осей P, Q, R, ось R-перпендикулярна плоскости листа.

Субъединица имеет однодоменную структуру, типичную для NAD(P)-зависимых SDR, которая включает классическую укладку Россманна [68,346].

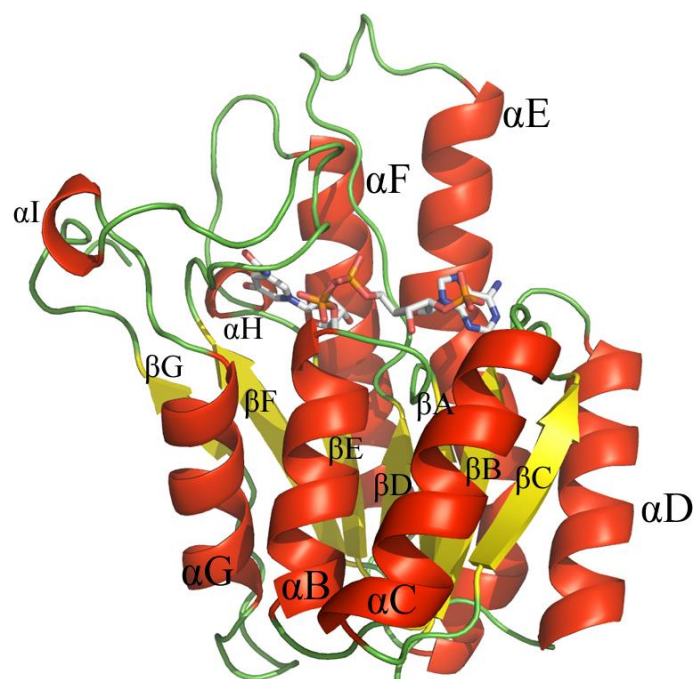


Рис. 3.8. Ленточная модель холоформы субъединицы TsAdh319 с коферментом NADP. Вторичные элементы структуры представлены разными цветами: красным –  $\alpha$ -спирали; желтым –  $\beta$ -листы; зеленым – разупорядоченные фрагменты и петли. Молекула NADP представлена палочковой моделью. Вторичные элементы структуры образованы аминокислотными остатками (а.о.):  $\beta$ A: а.о. 3-7;  $\alpha$ B: а.о. 12-23;  $\beta$ B: а.о. 27-32;  $\alpha$ C: а.о. 35-49;  $\beta$ C: а.о. 53-57;  $\alpha$ D: а.о. 63-77;  $\beta$ D: а.о. 82-85;  $\alpha$ E: а.о. 100-128;  $\beta$ E: а.о. 131-135;  $\alpha$ H: а.о. 138-140;  $\alpha$ F: а.о. 148-167;  $\beta$ F: а.о. 172-178;  $\alpha$ I: а.о. 194-196;  $\alpha$ G: а.о. 201-212;  $\beta$ G: а.о. 222-225. Вторичные элементы структуры указаны по результатам анализа структуры на сервере WHAT IF.

Укладка Россманна – это наиболее консервативный сдвоенный мотив пространственной структуры многих белков, связывающих коферменты FAD, NAD, и NADP. Сдвоенная укладка представляет собой сэндвич, в середине которого  $\beta$ -лист, а сверху и снизу по несколько  $\alpha$ -спиралей, в типовой укладке Россманна центральный  $\beta$ -лист образован шестью  $\beta$ -тяжами. Кофермент координируется остатками на боковой грани этого трехслойного сэндвича. В аминокислотной последовательности белка, кодирующей укладку Россманна, мотивы, образующие  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -листы, чередуются. В последовательности TsAdh319 на N-конце субъединицы наблюдается регулярное чередование мотивов  $\beta$ -тяж/ $\alpha$ -спираль ( $\beta$ A- $\alpha$ B- $\beta$ B- $\alpha$ C- $\beta$ C- $\alpha$ D- $\beta$ D). С-концевой участок менее упорядочен, здесь строгое чередование  $\beta$ -тяжей и  $\alpha$ -спиралей прерывается короткими 3/10 спиральями и нерегулярными петлями:  $\alpha$ H (между  $\beta$ -листом E и  $\alpha$ -спиралью F) и  $\alpha$ I (между  $\beta$ -листом F и  $\alpha$ -спиралью G). Самая длинная петля (остатки 178-200) способна

накрывать активный центр. Два других длинных нерегулярных фрагмента (остатки 86–99 и 141–147) участвуют в образовании субстрат-связывающего кармана и вторичной координационной сферы активного центра. Средние B-факторы для субъединиц A и B – 16.5 Å<sup>2</sup> и 15.6 Å<sup>2</sup>, соответственно. Структура субъединицы B будет использована в последующем анализе.

Детальный анализ активного центра и строения белковой глобулы был проведен в сравнении с гомологичными SDR. Стоит отметить высокую гомологию структур SDR (Z индекс 12.1–15.3, RMSD между атомами C $\alpha$  1.02–1.63) при уровне сходства аминокислотных последовательностей 26%–35% (Таблица 3.5).

Для сравнительного анализа из мезофильных организмов были отобраны дегидрогеназа клавулановой кислоты из актиномицета *Streptomyces clavuligerus* (CAD, PDB код 2JAH), L-сорбозоредуктаза из *Gluconobacter frateurii* (SR, PDB код 3AI2) и из термофильных организмов – неохарактеризованные дегидрогеназы из *Thermus thermophilus* HB8 (TtDH, PDB код 2EHD) и *Thermotoga maritima* (TmDH, PDB код 1VL8), а также сепиаптерин редуктаза из умеренно термофильной бактерии *Chlorobium terpidum* (cSR, PDB код 2BD0) (Рис. 3.9). Наложение структур (структурное выравнивание Рис. 3.9–3.10) показывает, что в структуре TsAdh319 имеются все консервативные мотивы, типичные для SDR: богатый глицином мотив (G8XXXG12XG14), который участвует в связывании кофермента NADP и обеспечивает характерный бета-поворот между  $\beta$ A и  $\alpha$ B элементами [85,97,347] и консервативный фрагмент Asn86-Ala87-Gly88 на острое стрелки (arrowhead) бета-поворота  $\beta$ D, этот фрагмент важен для стабилизации центрального  $\beta$ -листа и обеспечивает каркас, необходимый для позиционирования кофермента [69]. Каталитическая триада (Ser137, Tyr150, Lys154) вместе с остатком Asn110 [69,72,88] образуют активный центр TsAdh319, расположенный на элементах  $\alpha$ H и  $\alpha$ F. Структурно консервативные остатки Asp59, Thr7 и Gly179, необходимые для правильного связывания кофермента, также находятся в соответствующих позициях в субъединице TsAdh319. Консервативная молекула воды B374 связывает мотив G8XXXG12XG14, остаток Asn86 и пиррофосфатную группу NADP.



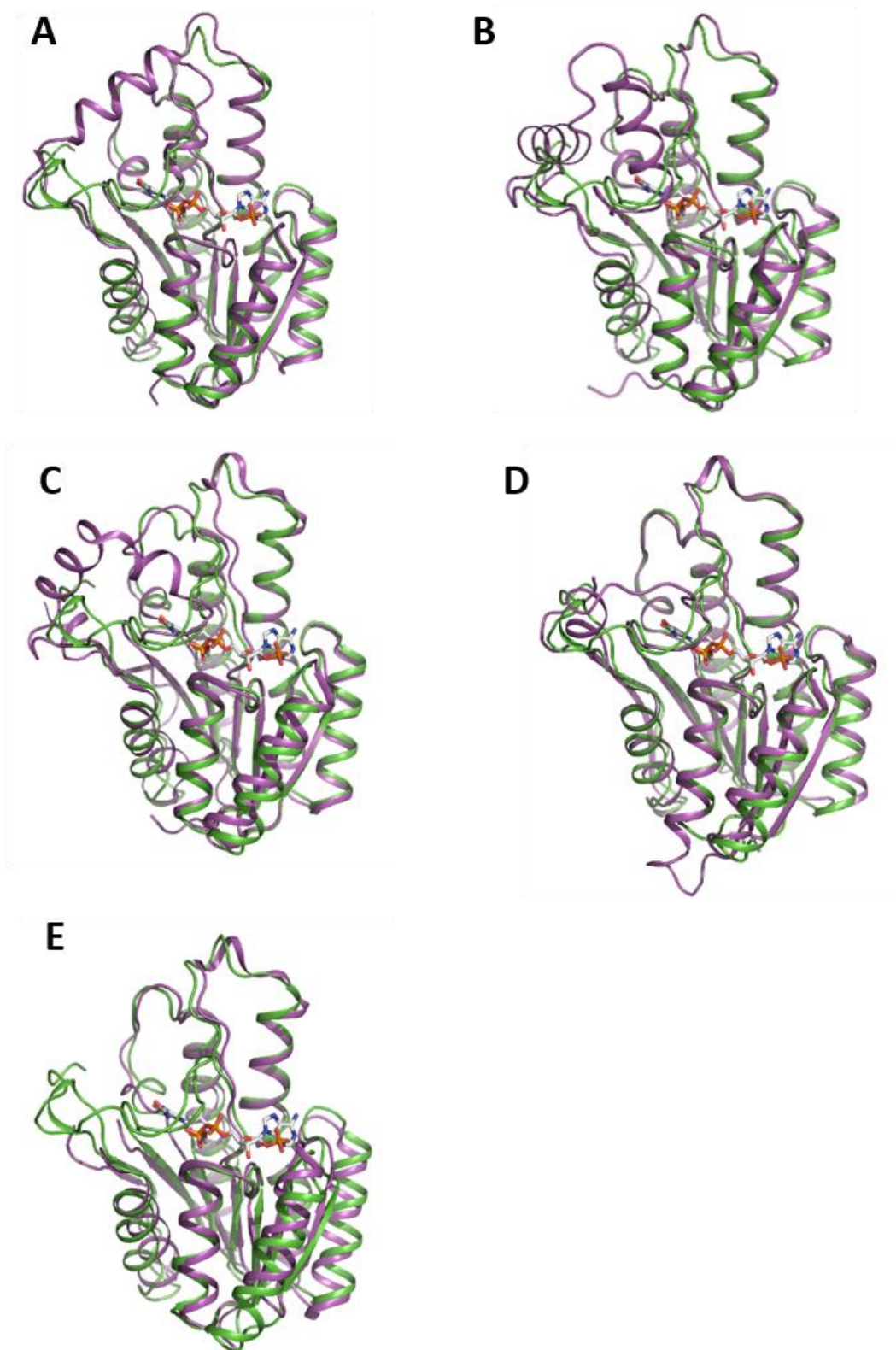


Рис. 3.9. Гомология пространственной структуры TsAdh319 (зеленый) и отобранных для сравнительного анализа SDR (пурпурный): (A) TsAdh319 и CAD, (B) TsAdh319 и SR, (C) TsAdh319 и TmDH, (D) TsAdh319 и cSR, (E) TsAdh319 и TtDH.

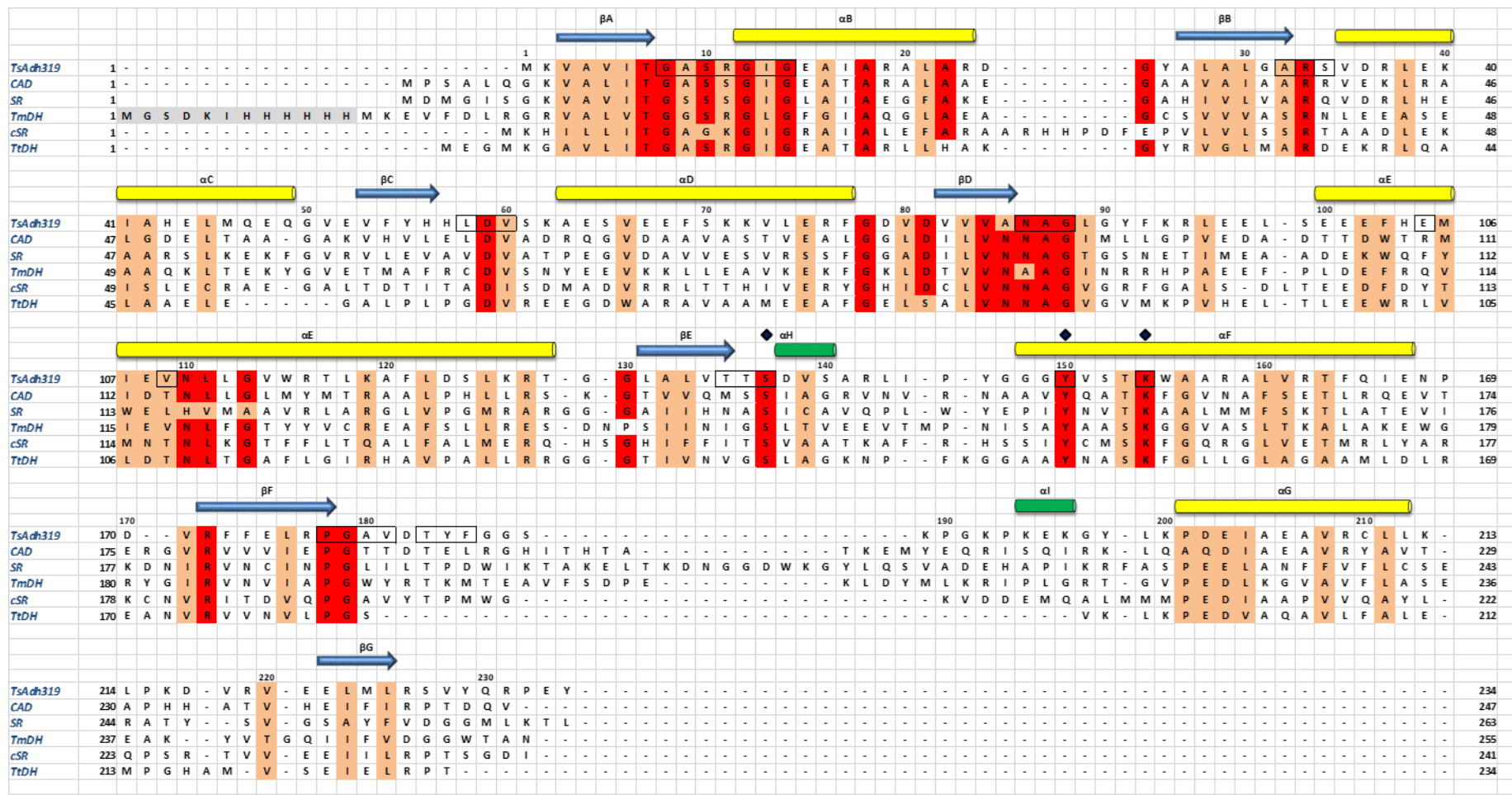


Рис. 3.10. Структурное выравнивание SDR из *T. sibiricus* (TsAdh319), *S. clavuligerus* (CAD), *T. thermophilus* HB8 (TtDH), *T. maritima* (TmDH), *G. frateurii* (SR) и *C. terpidum* (cSR). Выравнивание провели на сервере PDBeFold (<http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm>). Идентичные остатки выделены красным цветом; гомологичные остатки выделены бежевым цветом; NADP-связывающие остатки TsAdh319 помещены в черные рамки. Элементы вторичной структуры указаны схематично: спирали указаны желтыми элементами, 3/10 $\alpha$ -спирали указаны зелеными элементами,  $\beta$ -тяжи – синими стрелками. Остатки каталитической триады отмечены (♦).

Таблица 3.5. Сравнение структур SDR из *T. sibiricus* (TsAdh319), *S. clavuligerus* (CAD), *T. termophilus* HB8 (TtDH), *T. maritima* (TmDH), *G. frateurii* (SR) и *C. tepidum* (cSR). Для расчета приведенных параметров были использованы серверы EMBL PDBeFOLD и PISA.

SDR	Организм, (оптимальная температура роста (°C))	T <sub>optm</sub> реакции, (°C)	Гомология , %	Разрешение Å	Z оценка	<b>RMSD,</b> (Å)/ N <sub>a.o.</sub>	Общее число остатков (Σ)	ASA тетрамера/ Σ, (Å <sup>2</sup> )	Доля заряженных остатков в ASA субъединицы, %	Доля заряженных остатков в последователь- ности
TsAdh319	<i>Thermococcus sibiricus</i> , 78-80 °C	100	100	1.68	-	-	234	33.5	81.4	31.2
CAD	<i>Streptomyces clavuligerus</i> , 25-28 °C	21-26	35	1.8	15.3	<b>1.02</b> / 221	245	31.7	71.5	24.3
TmDH	<i>Thermotoga maritima</i> , 80-85 °C	NA	26	2.07	15.0	<b>1.50</b> / 214	255	30.95	72.0	25.8
SR	<i>Gluconobacter frateurii</i> , 25 °C	25	29	1.9	15.0	<b>1.63</b> / 218	263	35.2	65.5	23.2
cSR	<i>Chlorobium tepidum</i> , 47-48 °C	50	32	1.7	13.1	<b>1.42</b> / 223	244	35.23	68.2	26.2
TtDH	<i>Thermus termophilus</i> , 65 °C	NA	34	2.4	12.1	<b>1.54</b> / 193	234	ND	ND	23.1

ASA – доступная растворителю площадь поверхности

NA- не определяли

### 3.1.5. Структура TsAdh319. Строения тетрамера

Анализ межсубъединичных контактов показал, что TsAdh319 в кристаллах – тетрамер. Преобладающая форма фермента в растворе, по оценке аналитическим градиентным центрифугированием, также тетрамер с молекулярной массой 112 кДа. Наблюдаемые димерные контакты типичны для известных SDR: положение субъединиц в тетрамере описывается тремя осями симметрии, P, Q и R, то есть тетрамер TsAdh319 – высокосимметричная структура. (Рис. 3.7). Доступные растворителю площади поверхности субъединицы и тетрамера TsAdh319 составляют 10965 и 29720 Å<sup>2</sup>, соответственно. Таким образом, 32% поверхности субъединицы участвует в образовании тетрамера. Симметричный P контакт вокруг некристаллографической оси P (между субъединицами A и B, C и D) образуется в результате взаимодействий αG спирали, короткой 3<sub>10</sub> спирали αI и продолжением βG тяжа – остатками на C-конце. Площадь поверхности димерного контакта P составляет около 1471 Å<sup>2</sup> на субъединицу, контакт образован 28 водородными связями, 14 солевыми мостиками и гидрофобными взаимодействиями. Симметрия P-контакта приводит к группированию 14 β-тяжей от обеих субъединиц в единый β-слой. Межсубъединичный димерный контакт Q (между субъединицами A и D, B и C) образуется в основном в результате взаимодействий остатков, формирующих спирали αE и αF обеих субъединиц: образуется пучок из четырех спиралей. Площадь Q контакта на субъединицу составляет 1553 Å<sup>2</sup>; контакт сформирован 18 межсубъединичными водородными связями, 12 солевыми мостиками и гидрофобными взаимодействиями.

Взаимодействия вдоль оси R (субъединицы A и C, B и D) вносят небольшой вклад в образование тетрамера: средняя площадь контакта на субъединицу составляет около 91 Å<sup>2</sup>, в R-контакте нет водородных связей или солевых мостиков. Особенностью TsAdh319 является дисульфидная связь в P-контакте: эта дисульфидная связь (Cys210-Cys\*210) обнаружена в 75% тетрамеров. Однако инкубация TsAdh319 в 0.1 М β-меркаптоэтаноле, 60 °С, 20 мин не привела к инактивации фермента и снижению термостабильности при 90 °С. Предположительно, этих условий оказалось недостаточно, чтобы восстановить дисульфидную связь, потому что в термостабильном ферменте ее присутствие с

большой вероятностью связано с дополнительной стабилизацией белковой глобулы. Возможно, есть и другие причины для дисульфидной связи в Р-контакте. Ранее похожая дисульфидная связь была обнаружена в 11 $\beta$ -HSD1 из протеома человека [348]. В гомологичных SDR остатков Cys в димерном Р-контакте в сходных позициях не обнаружено.

Охарактеризованные представители семейства SDR функционируют в виде димеров и тетрамеров. Обычно, димеры образуются через более обширный и плотный Q-контакт. Однако, в 3 $\alpha$ -гидроксистероид дегидрогеназе/карбонилредуктазе из *Commamonas testosteroni* (PDB код 1FK8) димере образуется через Р-контакт, что связано с стерическими препятствиями в области Q-контакта [349,350]. Известны только две мономерные SDR: карбонилредуктаза свиньи (PDB код 1N5D) и карбонилредуктаза человека (PDB код 1WMA). Интересно, что в структуре мономера карбонилредуктазы свиньи наблюдается некоторое подобие Q-контакта: вставка из сорока одного остатка непосредственно перед каталитическим остатком тирозина образует спиральный субдомен, который размещается против спиралей  $\alpha$ E и  $\alpha$ F мономера и, таким образом, имитирует Q-контакт как пучок из четырех спиралей. Сходство в устройстве димерных контактов в пространственных структурах ферментов семейства SDR свидетельствуют о важности димерных контактов для поддержания активной конформации SDR.

### 3.1.6. Структура TsAdh319. Связывания кофермента NADP

В кристаллической структуре TsAdh319 кофермент NADP присутствует с заселенностью 100%. Это было подтверждено осаждением ТХУ белка из раствора TsAdh319 известной концентрации с последующей количественным определением NADP в супернатанте. Стоит отметить, что в кристаллической структуре NADP обнаружен в модифицированной форме – 5-гидрокси-NADP (Рис. 3.11). Скорее всего, модификация произошла под воздействием рентгеновского излучения во время рентгеноструктурного эксперимента, например, в результате нуклеофильной атаки гидроксид-радикала или активированной молекулы воды.

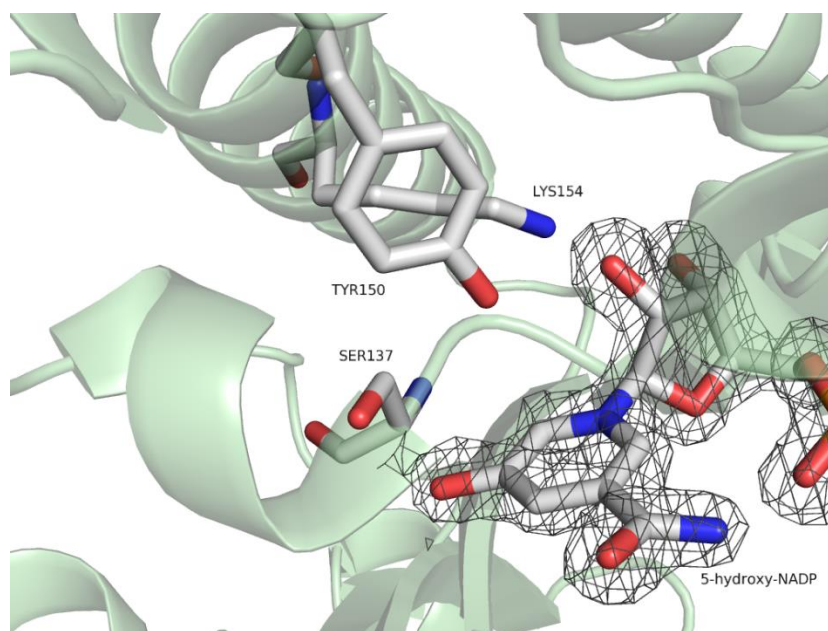


Рис. 3.11. Электронная плотность 5-гидрокси NADP в активном центре TsAdh319. Показаны каталитические остатки. Разностная карта электронной плотности Fo-Fc для NADP показана с уровнем срезки  $3\sigma$  темно-серым цветом.

Кофермент в TsAdh319 координирован сходным с известными SDR образом. Обогащенный остатками глицина мотив GASRGIG на повороте  $\beta$ A- $\alpha$ B координирует пирофосфатную группу NADP. Остатки Arg33 и Arg11 взаимодействуют с 2'-фосфатной группой адениновой рибозы и, таким образом, обеспечивают предпочтение связывания NADP против NAD. Кроме того, в активном центре отсутствуют остатки, важные для стабилизации NAD [351]. Обнаружена консервативная молекула воды B374, которая взаимодействует с атомом O2N(NADP) и остатком Asp86 и которую принято считать консервативным структурным элементом укладки Россмана [352]. Также обнаружена водородная связь CH...O между карбонильным кислородом Gly179 и атомом C4N NADP; эта связь считается консервативной у SDR и, предположительно, эта водородная связь облегчает перенос протона в реакции [351]. По результатам построения в программе LigPlot кофермент NADP связан 34 водородными связями с апоформой фермента (Рис. 3.12). По данным сервера PISA в холоформах гомологов NADP координирован сходным количеством водородных связей: 26 – в TsAdh319, 24 – в CAD, 24 – в SR, 22 – в TmDH и 19 – в cSR. Небольшой выигрыш в энергии сольватации  $\Delta^iG$  при образовании интерфейса между коферментом и апоформой TsAdh319 -3,0 ккал/моль (у гомологов CAD, SR and TmDH (-4,1, -2,1 и -3,9 ккал/моль, соответственно))

указывает на незначительный вклад гидрофобных взаимодействий в связывание NADP(H).

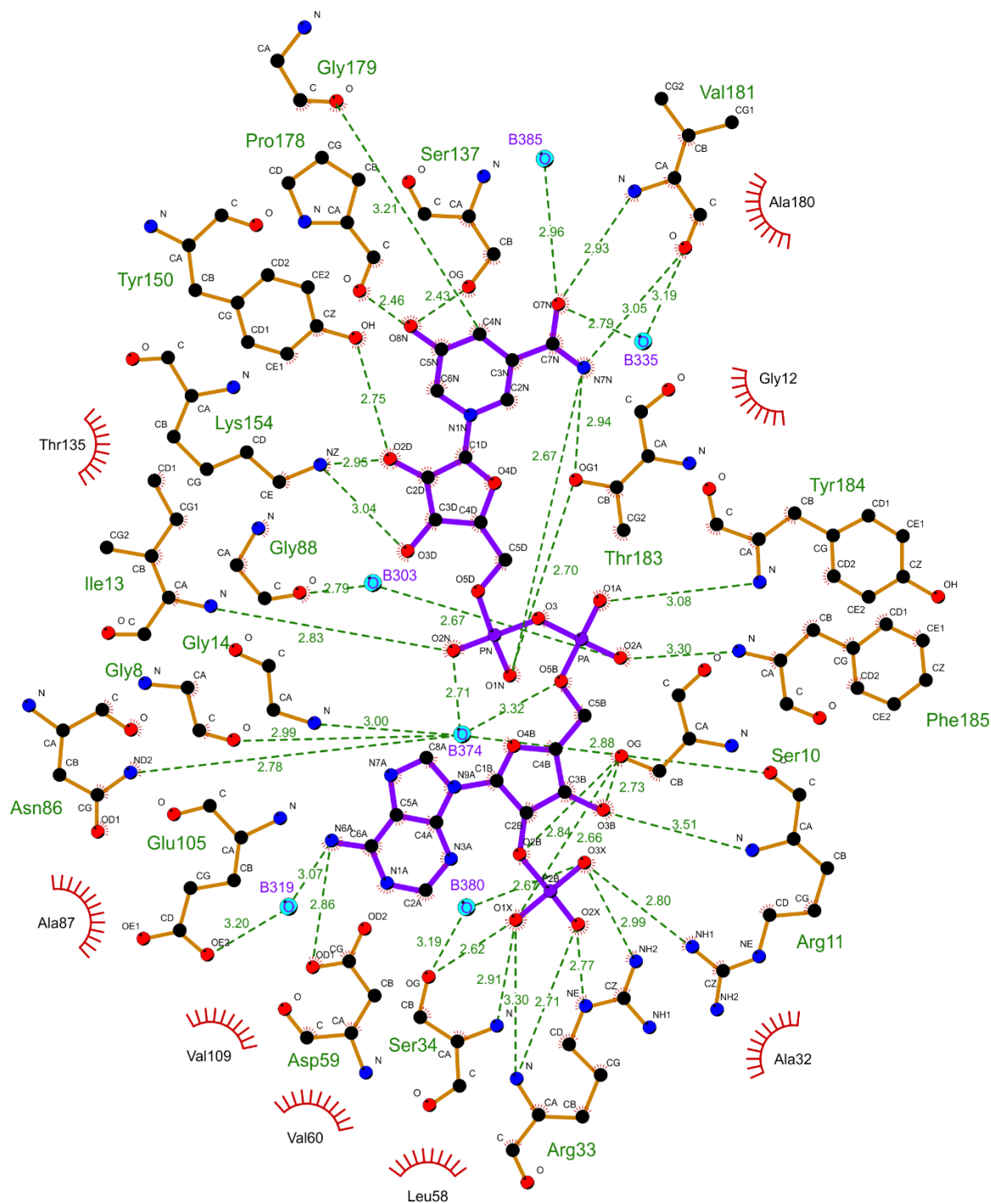


Рис. 3.12. Координации кофермента NADP в молекуле TsAdh319. Схема составлена в программе LigPlot.

В кристаллической структуре 5-гидрокси-NADP прикрыт гибкой петлей (остатки 181-192), что, по-видимому, делает связывание прочнее (Рис. 3.8). По-

видимому, наблюдаемая закрытая конформация фермента достигается изменением положения гибкой петли (остатки 181-192) в результате образования водородных связей между пирофосфатной группой и никотинамидным фрагментом NADP и остатками Val181(NH), Val181(O), Thr183(OG1), Tyr184(NH) и стэкинг-взаимодействиями между никотинамидным кольцом и Phe185. Кроме того, 16 внутренних водородных связей способствуют жесткости петли. По-видимому, в совокупности эти взаимодействия настолько энергетически благоприятны, что апоформу нельзя получить в результате очистки или разбавлением. Только изнуряющий диализ против буфера с 1 М NaCl в течение примерно одной недели позволил получить апоформу TsAdh319, активность которой при добавлении кофермента восстанавливалась до начального уровня.

### 3.1.7. Архитектура активного центра TsAdh319

Субстрат-связывающий карман образован C-концевыми фрагментами  $\beta F$ ,  $\beta E$ , спиралью  $\alpha F$ ,  $\alpha G$  и  $\alpha H$ , а также тремя неструктурированными фрагментами: 142-147, 88-93 и 178-186. Карман в TsAdh319 гидрофобен (Рис. 3.13). В структуре холоформы этот карман заполнен молекулами воды. Расстояние по каналу от поверхности до никотинамидного фрагмента составляет около 10 Å. Как и в других SDR, остатки каталитической триады (Ser137, Lys154, Tyr150) расположены рядом с никотинамидным кольцом кофактора. Расстояние между группой OH группой Tyr150,  $\epsilon NH_2$ -группой Lys154 и O2D атомом рибозы составляет 2,9 Å и 3,0 Å, соответственно, что указывает на возможность переноса протона и согласуется с принятым механизмом [69] (Схема II). Две молекулы воды (B335 и B385) рядом с никотинамидным кольцом на входе в субстрат-связывающий карман могут быть вовлечены в катализ. Вместе с Asn110 четыре консервативные молекулы воды (B255, B317, B373 и B371) образуют сеть водородных связей – proton-relay system для переноса гидрид-иона [69]. В TsAdh319 эти молекулы воды изолированы от основной массы воды и расположены в гидрофильной полости, образованной атомами кислорода карбонильных групп остатков Val109, Thr135, Ala85, Thr117, Ala87 и Asn86, а также с (OG1) Thr7.



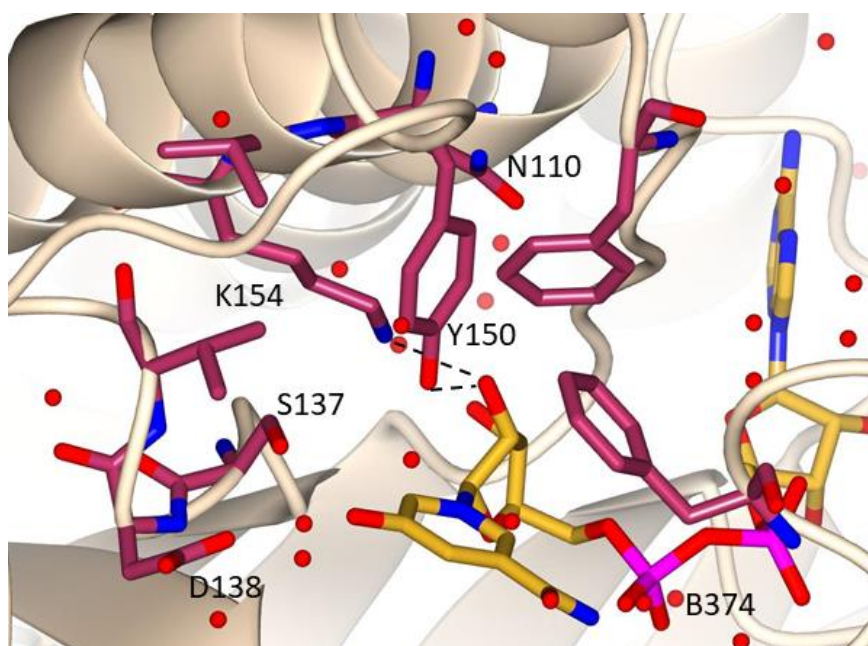


Рис. 3.13. Активный центр TsAdh319. Никотинамидный фрагмент NADP (желтый) виден в глубине кармана. Ассоциированные с ним молекулы воды показаны красными шариками. Отмечены каталитические остатки K154, Y150, S137. Отмечен остаток D138 на входе в субстратный канал.

Вход в активный центр TsAdh319 более открыт, чем в гомологах. Структурно, это по-видимому, определяется коротким линкером между элементами  $\beta F$  и  $\alpha G$ . Похожие короткие линкеры были обнаружены в TtDH и cSR. Ничего не известно о субстратной специфичности TtDH, однако cSR (1.1.1.153) может восстанавливать / окислять не только производные тетрагидроптерина, но и короткоцепочечные дионы и диолы. Следует отметить, что TsAdh319 специфична к диолам, дионам и полиолам (сахара). Возможно, такая специфичность к субстратам со второй спиртовой (карбонильной) группой возникает как следствие необходимости дополнительной координации в свободном субстрат-связывающем кармане для правильной ориентации субстрата. У некоторых гомологов этот линкер на входе в субстрат-связывающий карман длиннее на 9-15 остатков. В структурах CAD и SR (1.1.1.289) спирали  $\alpha FG2$  и ( $\alpha 7 + \alpha 8$ ), соответственно, блокируют вход в субстрат-связывающий карман. В структуре TmDH, карман для связывания субстрата ограничен спиралями  $\alpha FG1$  и  $\alpha FG2$ . Открытость субстрат-связывающего кармана в TsAdh319 согласуется с его широкой субстратной специфичностью.

### 3.1.8. Структурные факторы стабильности TsAdh319

TsAdh319 – полиэкстремофильный фермент, который характеризуется супертермостабильностью, устойчивостью к воздействию органических растворителей и галотолерантностью. Однако принципиальных различий в пространственных структурах TsAdh319 и его гомологов из мезофильных организмов не обнаружено. В настоящее время нет единой теории, объясняющей повышенную стабильность белков из термофильных и гипертермофильных организмов. Большинство исследователей объясняют термостабильность белков двумя стратегиями, первую наблюдают чаще в ферментах из архей, вторую – чаще в ферментах из термостабильных бактерий, которые возникли в мягких (мезофильных) условиях и далее адаптировались к экстремальным условиям среды обитания. Структурный механизм адаптации, наблюдаемый у ферментов из архей, достигается совокупностью структурных факторов (Ван-дер-Ваальсовы взаимодействиями, водородные связи, количество остатков, организованных в элементы вторичной структуры и т.д.). Независимо от природы эти контакты равно вносят вклад в термостабильность и каких-то преимущественных взаимодействий в таких белках не наблюдается. В целом все эти факторы приводят к повышению компактности структуры и высокой плотности контактов. Второй механизм основан на оптимизации аминокислотной последовательности белка под нужды организма-хозяина, и является результатом замен в последовательности [32,353]. Такие замены приводят к увеличению плотности структуры за счет повышения содержания остатков триптофана, изолейцина и фенилаланина, снижению доступной растворителю площади поверхности вследствие устранения заглубленных полостей и укорочения петель [65,354,355], снижению содержания цистеина, метионина, аспарагина и глутамина, которые более подвержены окислению и дезамидированию при повышенных температурах или увеличению содержания пролина для придания дополнительной стабильности нерегулярным петлям [355,356]. И, самое важное, в последовательностях адаптированных ферментов наблюдается значительный рост заряженных остатков. Считается, что гидрофобные взаимодействия – это движущие силы сворачивания белка, в то время, как электростатические взаимодействия отвечают за стабильность белка. По своей природе электростатические взаимодействия упруги, то есть остаточное притяжение между двумя

противоположными зарядами сохраняется даже после относительно большого удаления из-за интенсивных колебательных движений молекулы при высоких температурах [53,54,354].

Устойчивость ферментов к воздействию органических растворителей коррелирует с термостабильностью [43]. Считается, что активность ферментов в неводных средах поддерживается за счет связанной с поверхностью белка воды (или гидратной оболочкой), которая обеспечивает конформационную подвижность молекулы и препятствует проникновению растворителя к поверхности белка и, таким образом, защищает белковую глобулу от контакта с растворителем с последующей денатурацией [39]. По-видимому, в термостабильных ферментах повышение общего числа электростатических взаимодействий и, в частности, заряженных остатков на поверхности белковой глобулы, приводит к усилению прочности гидратной оболочки и увеличению количества молекул воды, связанных водородными связями с поверхностными остатками [43,46,59]. В галофильных ферментах, в условиях, когда вся вода ассоциирована с ионами соли, гидратная оболочка удерживается разными путями: общим повышением гидрофильности поверхности за счет избытка остатков Glu и Asp на поверхности белка, путем удаления с поверхности неупорядоченных боковых групп лизины и др. Интересно, что на поверхности некоторых галофильных ферментов [41,357] была обнаружена сеть солевых мостиков. Это особенно удивительно, поскольку заряженные группы, которые участвуют в образовании солевых мостиков, связывают меньше молекул воды, чем одиночные некомпенсированные заряды. Тем не менее, была выдвинута гипотеза о том, что ионы растворителя ассоциируются с сетью солевых мостиков и отрицательная свободная энергия связывания этих ионов уравнивает экранирование заряженных групп [39,357].

Анализ структурных факторов стабильности TsAdh319 указал на значительный избыток заряженных остатков на поверхности ее белковой глобулы, которые образуют солевые мостики (водородные связи высокой прочности с расстоянием между центроидами противоположных зарядов  $<4 \text{ \AA}$ ) и ионные пары (электростатические взаимодействия с расстоянием между противоположными зарядами  $<7 \text{ \AA}$ ). Принципиального различия в компактности у TsAdh319 и ее

гомологов отмечено не было. Для оценки компактности белковой глобулы использовали величину площади доступной растворителю поверхности (ASA) в пересчете на один остаток (или удельную ASA) [35]. Как видно из Таблицы 3.5, плотность упаковки существенно не различаются между мезофильными и термостабильными SDR. Фермент TsAdh319 – не самый плотный тетрамер: удельная ASA минимальна для TmDH. Из Рис. 3.9 видно, что ни одна из термостабильных SDR не имеет длинных поверхностных петель, как это можно увидеть в структурах CAD и SR. Однако петли мезофильных гомологов не разупорядочены, а свернуты в дополнительные альфа-спирали. Таким образом, хотя общее количество остатков минимально для SDR из термофильных организмов, белковая глобула компактна у всех SDR.

Сравнение аминокислотного состава последовательностей архейной TsAdh319 с таковыми из гомологичных мезофильных SDR и SDR из термофильных организмов не показало различий в содержании остатков пролина, триптофана и фенилаланина (Таблица 3.6).

Таблица 3.6. Сравнение аминокислотного состава (С%) субъединиц SDR из мезофильных (9 вариантов), термофильных организмов (6 вариантов) и TsAdh319. Согласно стандартному t-тесту (t) количество остатков Arg, Glu, Ile, Leu и Thr в термостабильных SDRs статистически значимо и превышает среднюю величину для SDR из мезофильных организмов.

residue	$C_{pop}(SD)$ mesophilic	$C_{pop}(SD)$ thermophilic	$t$	$C$ TsAdh319
Ala(A)	11.9(2.6)	11.0(1.8)	0.30	9.4
Arg(R)	4.0(1.9)	6.9(0.7)	0.01	7.7
Asn(N)	4.1(1.6)	2.8(1.3)	0.11	1.3
Asp(D)	5.3(0.6)	4.6(1.4)	0.21	4.7
Cys(C)	0.9(0.7)	0.9(0.8)	0.48	0.4
Gln(Q)	3.3(0.8)	2.6(2.3)	0.29	1.7
Glu(E)	5.6(1.1)	8.3(2.1)	0.02	10.3
Gly(G)	9.4(3.0)	9.9(1.9)	0.36	8.5
His(H)	1.8(1.0)	1.9(1.0)	0.16	1.7
Ile(I)	7.0(1.9)	4.3(1.7)	0.02	3.4
Leu(L)	7.8(1.1)	10.1(1.7)	0.01	11.1
Lys(K)	4.7(2.6)	5.1(2.1)	0.38	6.8
Met(M)	1.9(1.6)	2.2(0.8)	0.28	1.7
Phe(F)	2.6(0.9)	3.6(1.2)	0.09	4.3
Pro(P)	3.5(1.2)	3.8(0.8)	0.22	3.4
Ser(S)	5.5(1.5)	5.0(1.3)	0.24	5.1
Thr(T)	7.0(1.6)	4.7(1.6)	0.02	3.4
Trp(W)	1.0(0.8)	1.1(0.2)	0.44	0.9
Tyr(Y)	2.4(1.0)	2.8(1.7)	0.32	3.8
Val(V)	9.0(1.5)	9.2(1.5)	0.37	10.3

Среди гидрофобных аминокислот только различия в содержании лейцина и изолейцина статистически значимо. Однако, общее количество лейцин + изолейцин одинаково для обеих групп ферментов. Существенные различия наблюдаются в содержании заряженных аминокислот. Среднее содержание аргинина в SDR из термофильных организмов значительно превышает среднее содержание аргинина в мезофильных SDR. TsAdh319 имеет наибольшую долю остатков аргинина в последовательности. Кроме того, в последовательностях термостабильных гомологов и в TsAdh319 наблюдается увеличение общего содержания остатков аспартата и глутамат с одновременным увеличением доли остатков глутамата.

### **3.1.9. Ионные пары, солевые мостики и гидратная оболочка в TsAdh319**

При анализе стабильности белковых структур используются понятия «солевые мостики» и «водородные связи». В современной биохимии и структурной биологии принято рассматривать солевые мостики и как ионные пары, и как водородные связи между атомами заряженных групп. Для ясности дадим определение обоим вариантам. Рут Нуссинов (R. Nussinov) с соавторами определяют солевой мостик как электростатическое взаимодействие, которое возникает между противоположно заряженными аминокислотными остатками (Asp, Glu против Arg, Lys, His), если выполняются следующие условия: (1) центры противоположно заряженных боковых группы располагаются на расстоянии меньше 4 Å; (2) как минимум одна пара атомов кислорода и азота из Asp или Glu и Arg, Lys или His, соответственно, находится в пределах 4 Å [36,53,358]. В контексте этого определения, образование возможной водородной связи между атомами азота и кислорода не учитывается, но ее присутствие говорит об оптимизированной геометрии солевого мостика и о значительном энергетическом выигрыше от образования такого солевого мостика.

Образование сети солевых мостиков также повышает энергетический вклад солевых мостиков в стабилизацию белковой структуры в сравнении с эквивалентной суммой изолированных солевых мостиков. Ионные пары – это электростатические взаимодействия, которые возникают между заряженными группами в белке на

расстоянии до 7 Å [358]. Водородные связи наблюдаются всегда, когда водород химически связан с одним электроотрицательным атомом и при этом приближается к другому электроотрицательному атому [359]. Лайнус Полинг (L. Pauling) еще в 1931 г. указал на ковалентный характер водородных связей [360]. Водородные связи характеризуются геометрическими критериями: расстояние между атомами донора водорода и акцептора не превышает 3.5 Å, а угол D-H...A 150-180° и значительно различаются по силе или энергетическому эффекту от образования связи. Водородные связи делятся на слабые (0.1-1.0 ккал/моль), средние (5-15 ккал/моль) и сильные (до 40 ккал/моль) [359]. В контексте определения водородных связей, солевые мостики – это сильные водородные связи между N-H и O фрагментами боковых групп остатков Arg, Lys, His и Asp, Glu, соответственно, с более выраженными кулоновскими взаимодействиями, что проявляется в большем энергетическом выигрыше от образования таких водородных связей. При анализе термостабильности в данной работе используются оба определения «солевых мостиков».

Субъединица TsAdh319 содержит максимальное абсолютное количество (73 остатка) и процент заряженных остатков (Arg, His, Lys, Glu и Asp) по сравнению с гомологами (Таблица 3.5). Все заряженные остатки сравниваемых SDR распределяются по поверхности, внутренних ионных пар нет ни в одной SDR. Процент ASA, образованной заряженными остатками, был использован для оценки гидрофильности поверхности [35]. Как видно из Таблицы 3.5, субъединица TsAdh319 имеет наиболее гидрофильную поверхность. Анализ распределения заряженных остатков на поверхности показывает, что почти 70% заряженных остатков TsAdh319 участвуют в ион-парных взаимодействиях в субъединице (ионные пары в межсубъединичном контакте здесь не учитывались) с образованием изолированных ионных пар или сети солевых мостиков (Рис. 3.14). Доля солевых мостиков на поверхности TsAdh319 наибольшая среди гомологичных ферментов (Таблице 3.5). Для сравнения, менее 38% всех заряженных остатков образуют солевые мостики в субъединицах гомологичных SDR.

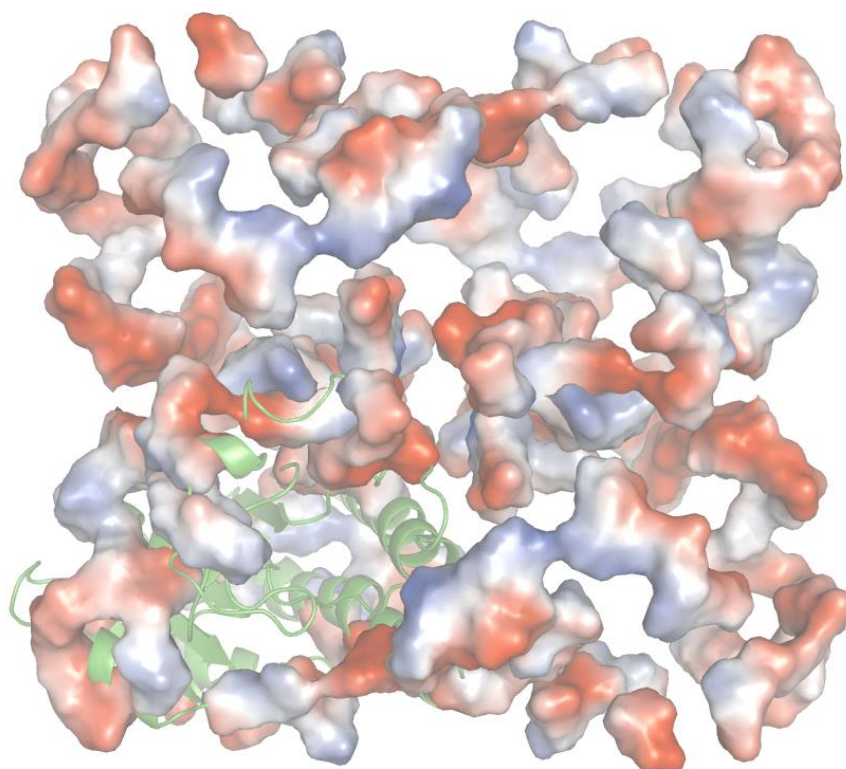


Рис. 3.14 Поверхность тетрамера TsAdh319, образованная скомпенсированными заряженными остатками (ионные пары и солевые мостики): ленточная модель субъединицы представлена зеленым цветом.

Ионные пары неравномерно распределены по поверхности TsAdh319. В более неупорядоченном С-концевом участке белковой глобулы взаимодействие заряженных остатков на поверхности глобулы носит «разветвленный» многоточечный характер, но изолированные ионные пары преобладают в регулярной N-концевой области субъединицы (укладка Россманна). Ионные пары в TsAdh319 и в гомологах, как правило, образуются в местах, где несмежные фрагменты структуры находятся в непосредственной близости от поверхности белковой глобулы, тем самым они действуют как электростатические перекрестные линкеры (мостики) между этими областями. Еще одна отличительная особенность TsAdh319 – наибольшее количество солевых мостиков в межсубъединичных контактах в тетрамере. Сравнение тетрамеров гомологичных SDR показывает, что нет солевых мостиков в гидрофобных димерных Q-контактах TmDH и SR, тогда как в cSR и CAD их шесть и восемь, соответственно. В TsAdh319, гидрофобный Q-контакт усилен 12 солевыми мостиками. Аналогичная ситуация наблюдается в димерном P-контакте: 14 солевых мостиков в TsAdh319 и 10, 10 и 12 солевых

мостиков в cSR, CAD и SR, соответственно. Удивительно, но нет солевых мостиков в димерном P-контакте TmDH.

Довольно трудно сравнить гидратные оболочки молекул гомологичных SDR из-за различных стратегий уточнения структуры разными исследователями. Тем не менее, значительного количества связанной воды на поверхности молекулы TsAdh319 не обнаружено. Из 293 идентифицированных молекул воды в димере TsAdh319 большинство молекул образуют внешнюю гидратную оболочку в то время, как другие молекулы воды занимают полость связывания субстрата. Субъединица TsAdh319, как и субъединицы гомологичных SDR, имеет одну внутреннюю полость заполненную четырьмя молекулами воды, которые, по-видимому, являются системой переноса протона (proton relay system); эти молекулы не связаны с внешним растворителем у TsAdh319.

Таким образом, уникальная термостабильность TsAdh319 основана на жесткости и одновременной упругости конструкции, обеспечиваемой компактным гидрофобным ядром и большим количеством поверхностных ионных пар. По-видимому, в случае TsAdh319 «упругие» электростатические взаимодействия защищают «хрупкое» гидрофобное внутреннее пространство от колебаний большой амплитуды, а также защищают гидрофобное ядро от прямого столкновения с молекулами «горячей» воды. Что касается способности TsAdh319 конкурировать за воду в условиях низкой активности воды, в водно-органических средах или в средах с высокой соленостью, то стоит отметить увеличение содержания глутамата, высокое содержание заряженных остатков на поверхности и, как результат, гидрофильность поверхности молекулы TsAdh319. Считается, что остаток Glu способен связывать больше молекул воды по сравнению с другими остатками [361,362] и может вносить значительный вклад в стабилизацию гидратной оболочки. В то же время обширная сеть солевых мостиков в TsAdh319 может стабилизировать поверхность молекулы через ассоциацию гидратированных ионов; в результате такой ассоциации высвобождается энергия и присоединяются дополнительные молекулы воды в составе гидратной оболочки иона на поверхность фермента. Снижение подвижности большинства поверхностных остатков из-за объединения в солевые мостики и ионные пары и наблюдаемое снижение средней ASA лизинов,



которые имеют наибольшую ASA гидрофобной части из всех остатков [363], также может способствовать упорядочиванию гидратной оболочки на поверхности TsAdh319. Еще одно преимущество сети солевых мостиков и ионных пар – это небольшое число единичных заряженных остатков, что при высокой гидрофильности поверхности TsAdh319 снижает потерю энергии при десольватации (desolvation penalty) в неводных средах и стабилизирует белок в среде с высоким содержанием растворителя [364]. Кроме того, межсубъединичные контакты TsAdh319 дополнительно усилены солевыми мостиками.

Избыток кислых остатков над основными (как на поверхности молекул галофильных ферментов) у молекулы TsAdh319 не наблюдается. Однако на доступной для растворителя зоне поверхности TsAdh319 можно наблюдать две Glu-богатых области (мотивы 64-68 и 96-105). Такой избыточный отрицательный заряд должен быть скомпенсирован гидратированными противоионами. Вероятно, эти обогащенные Glu области, способствуют эффекту солевой лиопротекции, которая наблюдается для TsAdh319 в водно-органических средах (Таблица 3.3), по-видимому, за счет связывания гидратированных катионов. Тем не менее, все вышесказанное не может объяснить рост активности фермента при высоких концентрациях соли. Возможно, причина роста состоит в благоприятном для катализа изменении конформационной подвижности фермента при высокой соли.

Таким образом, избыток заряженных остатков на поверхности TsAdh319 являются структурным фактором полиэкстремофильности фермента: множество заряженных остатков обеспечивает стабилизирующие от тепловых колебаний электростатические взаимодействия, взаимодействие с молекулами воды и гидратированными ионами на поверхности фермента. Кроме того, избыток заряженных остатков создает сеть водородных связей разной интенсивности в тетрамере TsAdh319 и высокую плотность водородных связей (см. далее), которые словно прошивают структуру молекулы, обеспечивая целостность ее структуры.

### **3.1.10. Внутримолекулярные водородные связи в TsAdh319**

Стабилизирующие водородные связи образуются в белках при сворачивании и заменяют водородные связи между атомами молекулы белка и растворителя.

Энергетический эффект от образования внутримолекулярных водородных рассматривается как энтропийный, поэтому образование такой связи сопровождается высвобождением двух молекул воды, и составляет в среднем около  $1.5 \pm 1.0$  ккал/моль на одну внутреннюю водородную связь [365]. Если водородные связи формируются между заряженными боковыми группами, то появляется дополнительный вклад энтальпии и общий выигрыш в энергии достигает  $4.6 \pm 3.2$  ккал/моль [36]. Важно отметить, что выигрыш от образования водородной связи между заряженными остатками зависит от потери энергии при дегидратации остатков, геометрии образовавшейся связи, эффектов среды (например, диэлектрической проницаемости и свойств атомов (intrinsic propensity) [36,358,366]. Оценка водородных связей в TsAdh319 и ее гомологах TmDH, cSR, CAD и SR была проведена по алгоритму, описанному в разделе 2.2.14.4. (стр. 95). Все сравниваемые структуры получены с разрешением выше  $2,0 \text{ \AA}$ , в полипептидной цепи нет разрывов. Все гомологи в растворе – тетрамеры и межсубъединичные контакты образованы сходным образом. Результаты расчетов представлены в Таблице 3.7, водородные связи между атомами разных типов разделены на следующие категории: **Charged-Charged** (между атомами заряженных боковых групп аминокислотных остатков), **Charged-Neutral** (между атомами заряженных и полярных боковых групп аминокислотных остатков и атомами азота и кислорода основной цепи), **Neutral-Neutral** (между атомами полярных боковых групп аминокислотных остатков и атомами азота и кислорода основной цепи).

Также была проведена оценка доли внутренних (**Inside-Inside**) и поверхностных (**Surface-Surface**) водородных связей и их распределение по категориям (Рис. 3.15). Как видно из Таблицы 3.7, общее количество водородных связей не коррелирует с термостабильностью фермента и зависит только от количества аминокислотных остатков в тетрамерах. Удельное количество водородных связей на один аминокислотный остаток отличается не более, чем на 7% между любыми гомологами, кроме TsAdh319, имеющего наибольшее удельное количество водородных связей и самый большой процент водородных связей **Charged-Charged** и **Charged-Neutral**. При чем для TsAdh319 также выявлено наибольшее количество **Charged-Charged** водородных связей между

субъединицами (37,5% по сравнению с 21,3% и 25,5% для SR и CAD, и 4,4% и 28,5% для cSR и TmDH, соответственно).

Таблица 3.7. Количество водородных связей, распределенных по категориям, в тетрамере TsAdh319 и в тетрамерах гомологов TmDH, cSR, CAD и SR.

	SDR из термофильных организмов			SDR из мезофильных организмов	
	TsAdh319	cSR	TmDH	CAD	SR
Номера первых-последних остатков. в А, В, С, D субъединицах PDB моделей	1-234	2-241	5-255	3-247	1-263
<b>Общее количество водородных связей:</b>	1116	970	1036	1028	1142
Включая связи между остатками в нескольких конформациях, включая связи между субъединицами	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
	20	0	16	3	0
	96	70	68	101	75
<b>Количество водородных связей на один а.о.</b>	1.19	1.01	1.08	1.04	1.02
Количество водородных связей <b>Charged – Neutral</b> , включая водородные связи между субъединицами	210 (18.8%)	135 (13.9%)	180 (17.4%)	168 (16.4%)	192 (16.8%)
	34	4	41	30	26
Количество водородных связей <b>Charged – Charged</b> , включая водородные связи между субъединицами	156 (14.0%)	84 (8.7%)	57 (5.5%)	94 (9.1%)	67 (5.9%)
	36	20	3	26	16
Количество водородных связей <b>Neutral – Neutral</b> , включая водородные связи между субъединицами	750 (67.2%)	751 (77.4%)	799 (77.1%)	766 (74.5%)	883 (77.3%)
	26	46	24	45	33

Следует отметить, что термостабильные гомологи имеют больший процент внутренних водородных связей (**Inside-Inside**) (Рис. 3.15А). Среди внутренних водородных связей **Neutral-Neutral** водородные связи доминируют для всех гомологов (Рис. 3.15В). Кроме того, количество **Charged-Charged** водородных связей среди внутренних водородных связей максимальна для TsAdh319 тетрамера (30 против 7 в CAD, 4 в SR, 9 в aSR и 4 в TmDH). Эти водородные связи образуются в межсубъединичных контактах тетрамера. Наибольшее абсолютное число

**Surface - Surface** водородных связей (327 против 253 в TsAdh319) наблюдается на поверхности мезофильной SR из *G. frateurii*, тетрамер которой имеет самую большую ASA среди гомологов (35680 Å<sup>2</sup> против 29720 Å<sup>2</sup> в TsAdh319). Термостабильные и мезофильные гомологи существенно различаются составом и количеством поверхностных водородных связей (**Surface – Surface**).

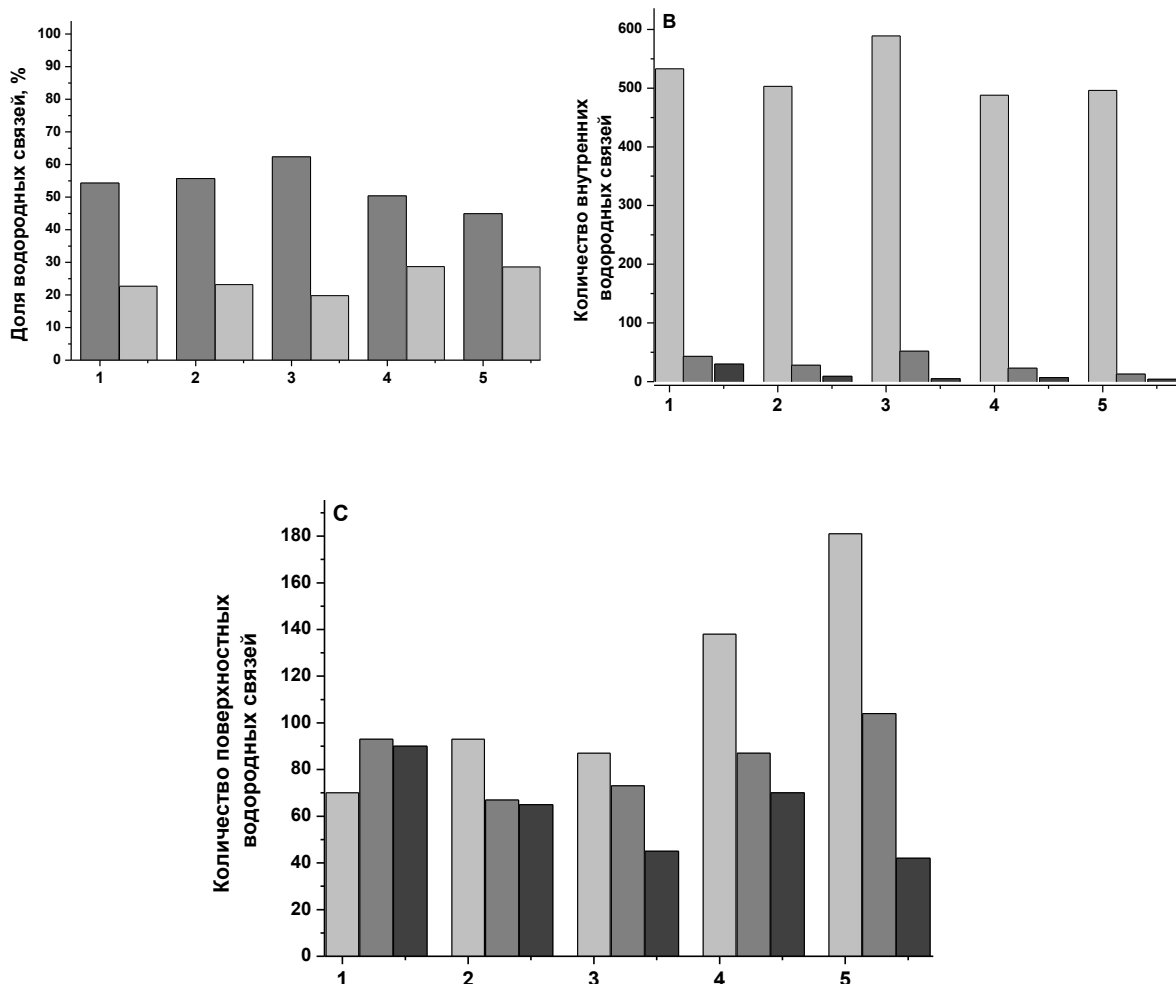


Рис. 3.15. Диаграмма количества и состава водородных связей в SDRs из термофильных организмов: 1 - TsAdh319, 2 - cSR, 3 - TmDH и мезофильных организмов: 4 - CAD, 5 - SR. (А) Доля внутренних **Inside-Inside** (темно серый) и поверхностных **Surface-Surface** (светло-серый) водородных связей от общего числа водородных связей (100%); (В) Состав внутренних водородных связей, включая **Neutral-Neutral** (светло серый), **Charged-Neutral** (серый), и **Charged-Charged** (темно-серый). (С) Состав поверхностных водородных связей, включая **Neutral-Neutral** (светло-серый), **Charged-Neutral** (серый), и **Charged-Charged** (темно-серый).

В термостабильных SDR большая часть поверхностных водородных связей образована атомами заряженных а.о., а для TsAdh19 вклад этих атомов в

поверхностные водородные связи наибольший (Рис. 3.15С). Интересно, что **Inside-Surface** (то есть на границе) водородные связи у всех аналогов образуются преимущественно атомами из нейтральных а.о. и/или атомами азота или кислорода основной цепи.

Проведенный анализ показал, что гомологи из термофильных и мезофильных организмов принципиально различаются количеством внутренних водородных связей и вкладом заряженных остатков в поверхностные водородные связи, при этом у TsAdh319 этот вклад наибольший. Более того, TsAdh319 отличается наибольшим удельным количеством водородных связей и наибольшим количеством **Charged-Charged** водородных связей в межсубъединичных контактах. Таким образом, оптимизированная аминокислотная последовательность TsAdh319, упакованная в типовую для SDR структуру, приводит к увеличению плотности водородных связей и ее усилению за счет электростатические взаимодействия.

### 3.1.11. Динамика водородной связи в TsAdh319 при температурном сдвиге

Задачу этих исследований следует сформулировать как оценка влияния доли заряженных остатков (несущей заряд структурной единицы) на распределение и прочность системы водородных связей в белковой глобуле TsAdh319 при изменении температуры. Анализ системы водородных связей TsAdh319, Tm и SR в динамике при двух температурах был проведен с использованием пакета программ GROMACS v4.6.5 [314,315]. В ходе эксперимента были проведены МД симуляции тетрамеров TsAdh319, TmDH и SR при 27 °C и 85 °C в воде в течение 30 нс без ограничений. После первых 4 нс симуляций, графики значений RMSD для TsAdh319 и TmDH при 85 °C продемонстрировали нерасходящуюся тенденцию (non-diverging trend) со средним RMSD, составляющем  $0.177 \pm 0.003$  нм и  $0.195 \pm 0.006$  нм, соответственно, что подтвердило, квазистабильное состояние систем TsAdh319 и TmDH при 85 °C достигнуто. Значения RMSD для TsAdh319 и TmDH при 27 °C также перестали расти после первых 4 нс, показывая, что системы достигли квазистабильного состояния. Среднее RMSD составило  $0.236 \pm 0.006$  нм для TsAdh319 и  $0.116 \pm 0.005$  нм для TmDH. Среднее значение RMSD для каждой системы характеризует масштаб структурных изменений, вызванных адаптацией системы к разным температурам. Среднее RMSD для TsAdh319 при 85 °C ниже, чем для

TmDH; то есть структура TsAdh319 лучше адаптирована к высоким температурам. Напротив, аккомодация TsAdh319 при 27 °C приводит к более существенным перестройкам в глобуле.

RMSD для системы тетрамера SR при 85 °C не достигло равновесия: после 30 нс МД симуляций, RMSD достигло значения  $0.297 \pm 0.012$  нм. RMSD для тетрамера SR при 27 °C перестало увеличиваться через 10 нс и достигло значения  $0.162 \pm 0.003$  нм. Небольшое значение RMSD также указывает на адаптацию пространственной структуры SR к средним температурам. Для тетрамеров SR и TsAdh319, среднее значение RMSD оказалось наименьшим при оптимальной температуре реакции. Далее оценивалось количество водородных связей разных категорий в тетрамерах на последних 10 нс траектории при 27 °C и 85 °C и изменения в количестве водородных связей при температурном сдвиге. Результаты представлены в Таблице 3.8. Согласно t-критерию Кохрана-Кокса [W.G. Cochran, C.M. Cox, Experimental Design, John Wiley & Sons, New York, 1957], пары значений в каждой строке статистически различаются.

Обнаружено, что среднее количество водородных связей во всех тетрамерах имеет тенденцию к снижению с ростом температуры. При этом для каждого тетрамера количество водородных связей между заряженными остатками увеличивается (Рис. 3.16), а количество водородных связей между нейтральными остатками уменьшается. По-видимому, наблюдаемая тенденция отражает прежде всего свойства водородных связей разных категорий, а не свойство тетрамера. Интересно, что у TsAdh319 снижается количество водородных связей **Charged-Neutral**, они же увеличиваются у гомологов. Также следует отметить, что изменение количества водородных связей всех видов при температурном сдвиге наиболее значительны для тетрамера SR. Это связано с запуском процесса денатурации молекулы SR (при моделировании наблюдалось разворачивание альфа-спиралей). Таким образом, проанализированные тетрамеры выявили сходную тенденцию в изменении количества водородных связей разных категорий. Однако для TsAdh319 изменения по количеству водородных связей наименьшие.

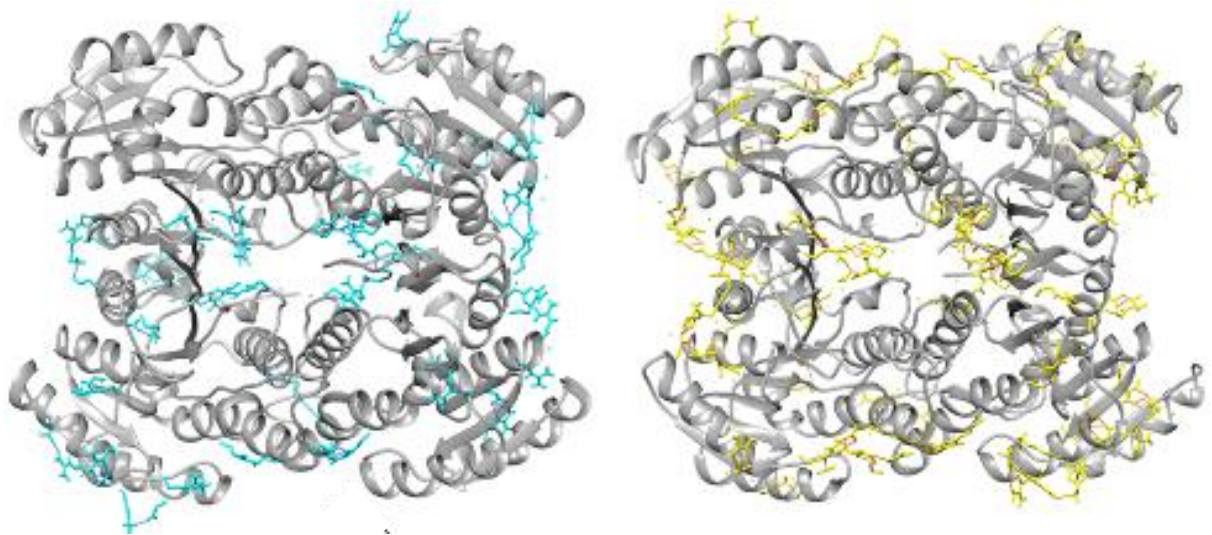


Рис. 3.16. Две конформации тетрамера TsAdh319: с минимальным количеством водородных связей категории **Charged-Charged** при 27 °С (левая) и с максимальным количеством водородных связей категории **Charged-Charged** при 85 °С (правая). Выделенные а.о. образуют **Charged-Charged** водородные связи только в модели при 85 °С (желтые) и только в модели при 27 °С (голубые). Общие для обеих моделей остатки, образующие водородные связи, не показаны.

Проведенные исследования водородных связей в TsAdh319 были дополнены анализом влияния мочевины и  $\text{GuHCl}$ , как деструкторов водородных связей, на активность дегидрогеназы.

Таблица 3.8. Среднее число водородных связей разных категорий и стандартное отклонение величины для тетрамеров TsAdh319, TmDH и SR, полученные из анализа данных МД при температурах 27 °С и 85 °С. Δ - изменение в количестве водородных связей при температурном сдвиге.

	TsAdh319			TmDH			SR		
	27°C	85°C	Δ, %	27°C	85°C	Δ, %	27°C	85°C	Δ, %
<b>Общее количество водородных связей:</b>	792.6 ± 12.1 (100%)	780.5 ± 12.6 (100%)	- 1.5	819.9 ± 12.1 (100%)	819.4 ± 15.3 (100%)	-0.06	817.2 ± 11.7 (100%)	808.5 ± 14.1 (100%)	-1.1
<b>На а.о.</b>	0.85	0.83	N/A	0.81	0.81	N/A	0.78	0.77	N/A
Количество водородных связей категории <b>Charged – Charged:</b>	159.0 ± 3.8 (20%)	175.1 ± 5.8 (22.4%)	+ 10.1	108.2 ± 3.4 (13.2%)	129.3 ± 4.8 (15.8%)	+19.5	84.3 ± 3.1 (10.3%)	105.2 ± 5.1 (13%)	+24.8
<b>На а.о.</b>	0.17	0.19	N/A	0.11	0.13	N/A	0.08	0.1	N/A
Количество водородных связей категории <b>Charged–Neutral:</b>	86.2 ± 4.5 (10.9%)	84.8 ± 5.2 (10.9%)	- 1.7	128.3 ± 4.9 (15.6%)	135.3 ± 6.8 (16.5%)	+5.5	99.4 ± 4.2 (12.2%)	106.0 ± 6.8 (13.1%)	+6.6
<b>На а.о.</b>	0.09	0.09	N/A	0.13	0.14	N/A	0.09	0.1	N/A
Количество водородных связей категории <b>Neutral –Neutral:</b>	547.4 ± 10.5 (69.1%)	520.6 ± 10.7 (67.0%)	- 5.1	583.4 ± 10.4 (71.2%)	554.8 ± 12.5 (67.7%)	-5.2	641.5 ± 10.9 (78.5%)	597.3 ± 12.5 (73.9%)	-7.4
<b>На а.о.</b>	0.58	0.56	N/A	0.58	0.55	N/A	0.61	0.57	N/A



### 3.1.12. Влияние мочевины и гуанидин гидрохлорида на стабильность TsAdh319

Известно, что эффект гуанидин гидрохлорида (GuHCl) как денатуранта сильнее, чем действие мочевины, потому что ион гуанидиния эффективнее нарушает структуру раствора и электростатические взаимодействия в белках [367]. Кроме того, показано, что GuHCl способен имитировать специфические взаимодействия, создаваемые гуанидиновой группой аргинина [368]. Учитывая значительный вклад заряженных остатков в систему водородных связей TsAdh319, было сделано предположение, что мочевина и GuHCl нарушают водородные связи с разной эффективностью и, таким образом, вызывают разные по интенсивности и качеству изменения активности и стабильности TsAdh319. Эффекты мочевины и GuHCl оценивали по изменению активности TsAdh319 в реакции восстановления 2,3-пентандиона при 60 °С. Как видно из Рис. 3.17, добавление мочевины до 8 М ведет только к увеличению активности.

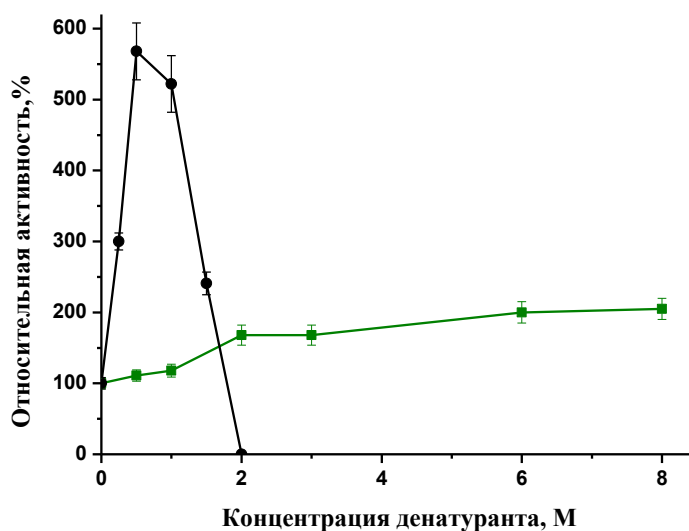


Рис. 3.17. Относительная активность TsAdh319 при добавлении в реакцию смесь мочевины (■) и GuHCl (●) в различных концентрациях.

Добавление 0,5 М и 1 М GuHCl привело к резкому повышению активности с последующей ее потерей в 2 М GuHCl. Анализ термодинамической стабильности TsAdh319 показал, что при инкубации 0,25 мг/мл фермента в течение 5 ч. в 50 мМ фосфатном буфере с 2 М GuHCl или 6 М мочевины при 60 °С, активность фермента

после разбавления денатуранта соответствует исходному уровню. Другими словами, удаление 6 М мочевины и 2 М GuHCl приводит к полному восстановлению исходной активности. Таким образом, наблюдается резистентность системы поверхностных водородных связей к воздействию нейтральной мочевины 0-8 М и GuHCl в концентрации 0-2 М

Анализ как кристаллической структуры TsAdh319, так и ее динамических моделей показал, что высокое содержание заряженных остатков в структуре TsAdh319 приводит к организации сети солевых мостиков на поверхности и высокой плотности водородных связей в молекуле фермента (Таблицы 3.7,3.8). Можно сделать вывод, что стратегия термостабилизации TsAdh319 состоит в укреплении сети поверхностных водородных связей путем электростатических взаимодействий и в укреплении каркаса белковой глобулы водородными связями всех категорий. Солевые мостики, собранные на поверхности TsAdh319 в обширную сеть, препятствуют денатурации мочевиной. Мочевина как нейтральная молекула не разрушает ионную сеть, в то время как эффект GuHCl как ионного соединения более выраженный и приводит к потере активности фермента при 2 М GuHCl. По-видимому, активация TsAdh319 мочевиной и GuHCl в низких концентрациях объясняется устранением избыточного напряжения (деформаций) в тетрамере TsAdh319 при субоптимальных температурных условиях (60 °С в стандартном эксперименте против 95 °С оптимальных) в результате частичного разрушения водородных связей. Известно, что низкие концентрации GuHCl могут стабилизировать белки, устраняя структурные деформации, вызванные электростатическим взаимодействием заряженных групп на его поверхности [369,370]. Так же воздействие GuHCl на TsAdh319 может быть специфичнее из-за значительного вклада остатков Arg в поверхностные взаимодействия. Предыдущие расчеты с использованием сервера WHATIF показали, что все остатки Arg на поверхности TsAdh319 не только образуют солевые мостики, но и организованы в сеть. Замена боковой цепи Arg на молекулу GuHCl может нарушать сетевые контакты, тем самым вызывая структурные изменения, полезные для катализа при низких концентрациях и разрушительные при более высоких концентрациях.

## 3.2. АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗА ИЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНОЙ АРХЕИ *Pyrobaculum ferrireducens* (AIDHPyr1147)

### 3.2.1. Функциональная характеристика альдегиддегидрогеназы AIDHPyr1147

Механизм действия NAD(P)-зависимых альдегиддегидрогеназ (AIDH EC 1.2.1.4) был установлен для бактериальных и человеческих ферментов. Архейные AIDH исследовались в контексте углеводного метаболизма архей, поэтому детально для различных архей охарактеризованы NAD(P)-зависимые GAP дегидрогеназа (GAPDH) [115], нефосфорилирующая GAP дегидрогеназа (GAPN) и ферредоксин-зависимая GAP оксидоредуктаза GAPOR [101,116,117,371]. Настоящая работа содержит детальный анализ структур комплексов и функциональную характеристику термостабильной альдегиддегидрогеназы AIDHPyr1147 из археи *P. ferrireducens* (*Pyrobaculum sp.1860*). Успешное получение нескольких структур комплексов с NADP<sup>+</sup>, NADPH и тройного комплекса с субстратом позволило сделать выводы о механизме катализа AIDHPyr1147. Гипертермофильная кренархаота *P. ferrireducens* относится к древнему порядку Thermoproteales, оптимальная температура жизнедеятельности +84 °C [372]. Кроме AIDHPyr1147 в геноме *P. ferrireducens* идентифицированы GAPDH, GAPN и GAPOR. Рекомбинантная AIDHPyr1147 получена гетерологической экспрессией синтетического гена в *E. coli*. Ген был синтезирован без оптимизации кодонов и, видимо, поэтому целевой фермент продуцировался в нерастворимой форме. Разработанная методика солюбилизации позволила получить гомогенный активный препарат AIDHPyr1147 в количествах достаточных для кристаллизации и функциональной характеристики. Кинетический анализ показал, что AIDHPyr1147 строго специфична к NADP и активна с алифатическими альдегидами (Таблица 3.9). Оптимальный pH реакции окисления изобутиральдегида составил 8.5 - 9.5. Максимальная скорость реакции окисления наблюдалась при 75 - 80 °C (Рис. 3.18). Однако при высоких температурах становится значимым вклад неферментативной реакции между NADP<sup>+</sup> и изобутиральдегидом, поэтому далее характеристику фермента (стандартную реакцию) проводили при 60 °C. Параметры ферментативной реакции окисления алифатических аминов приведены в Таблице 3.9, с

ароматическими фенилацетальдегидом и хлорбензальдегидом ферментативную реакцию определить не удалось из-за высокой фоновой неферментативной реакции при 60 °С. Активности с бетаин альдегидом и сукцинил семиальдегидом не наблюдалось. Активность AIDHPyr1147 снижалась на 50% после 14 ч. инкубации при 60 °С. Температура полуперехода нативный–денатурированный белок, определенная методом кругового дихроизма, составила 75 °С.

Таблица 3.9. Кинетические параметры реакции окисления альдегидов, катализируемой AIDHPyr1147. Условия: 50 мМ Na-пирофосфатный буфер, pH 8.8, 100 мМ NaCl, 0.3 мМ NADP+, 15 мкг/мл AIDHPyr1147, 60 °С.

Субстраты	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$K_m$ , М	$k_{cat}/K_m$ , с <sup>-1</sup> М <sup>-1</sup>
Пропилальдегид	4.1 ± 0.4	0.020 ± 0.003	200 ± 50
D,L-Глицеральдегид	2.9 ± 0.16	0.021 ± 0.0025	140 ± 30
Изобутиральдегид	1.2 ± 0.2	0.015 ± 0.006	80 ± 40
Бетаин альдегид		Нет активности	
Сукцинил семиальдегид		Нет активности	

Константа Михаэлиса для NADP+ в стандартной реакции окисления изобуриальдегида составила (20.9 ± 0.1) мМ. Для сравнения  $K_m$  для NADP+-зависимых альдегиддегидрогеназ из мезофильных организмов *R. norvegicus* и *S. mutans* составляют 2.0 мМ и 24.5 мМ, соответственно, при 20 °С. Значение  $K_m$  AIDHPyr1147 для NADP+ укладывается в интервал значений  $K_m$  от 1.4 мМ до 210 мМ для NADP-зависимых AIDH [373,374].

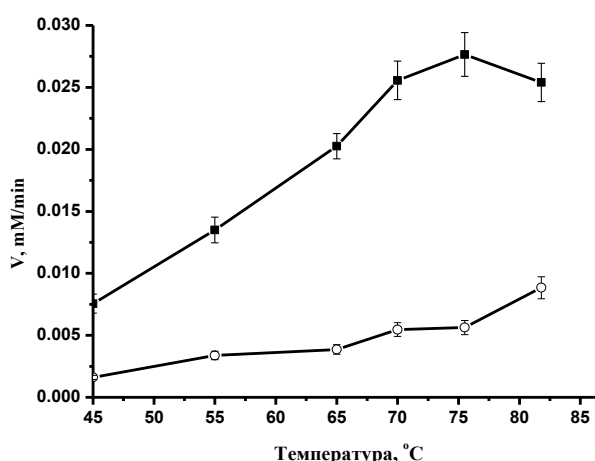


Рис. 3.18. Температурная зависимость удельной активности AIDHPyr1147 в реакции окисления изобутиральдегида с учетом вклада неферментативного гидролиза (■). Реакцию запускали добавлением 15 мкг фермента в реакционную смесь. (□) Скорость неферментативного гидролиза при соответствующих температурах.

Ни NADPH, ни NAD<sup>+</sup> не являются эффективными конкурентными ингибиторами NADP<sup>+</sup>: добавление 0.08 mM NADPH в стандартную реакционную смесь (0,084 μM фермента и 0.3 mM NADP<sup>+</sup>) приводит только к 20% снижению активности, а добавление 0.3 mM NAD<sup>+</sup> в тех же условиях не изменяет скорость стандартной реакции. В присутствии 1M NaCl или 1M KCl активность фермента снижается на 30%, то есть наблюдается эффект ионной силы, а влияние однозарядных ионов неспецифическое.

### 3.2.2. Связывание NADP<sup>+</sup> и NADPH тетрамере AIDHPyr1147

На Рис. 3.19 приведен спектр триптофановой флуоресценции AIDHPyr1147. При возбуждении на 297 нм в спектре эмиссии видны два пика с максимумами при 332 нм (флуоресценция остатков триптофанов) и 430 нм (флуоресценция NADPH в результате переноса энергии (FRET), при возбуждении на 330 нм – один пик с максимумом на 430 нм (врезка), который соответствует флуоресценции связанного с ферментом NADPH [375]. Нагревание фермента до 85 °C с последующим охлаждением приводит к исчезновению пика при 430 нм при возбуждении как на 297 нм, так и 330 нм, то есть кофермент диссоциирует из фермента. При этом AIDHPyr1147 переходит в апоформу, которая стабильна и не денатурирует при высоких температурах. Спектрофотометрический анализ низкомолекулярных компонент после отделения прогретого белка с помощью центрифугирования в концентраторах (Millipore) показал наличие как NADP<sup>+</sup>, так и NADPH в фильтрате. Концентрации обеих форм кофермента были оценены с использованием коэффициентов экстинкции  $1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (NADP<sup>+</sup> при 260 нм),  $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (NADPH при 260 нм) и  $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (NADPH при 340 нм) [134]. При этом доля NADPH в фильтрате составила 30%. Стоит отметить, что диализ против 1 M NaCl в течение четырех суток приводит лишь к частичному удалению кофермента (оценка по спектрам флуоресценции). Таким образом, в дальнейшем для получения апоформы применяли прогревание препарата фермента концентрацией не выше 0.5 мг/мл при 85 °C в течение 10-15 мин с последующей гель фильтрацией (при более высокой концентрации фермента наблюдается образование агрегатов). По данным гель фильтрации – апоформа AIDHPyr1147 также является тетрамером.

Полученная апоформа AIDHPyr1147 по уровню активности в стандартной реакции сходна с холоформой фермента.

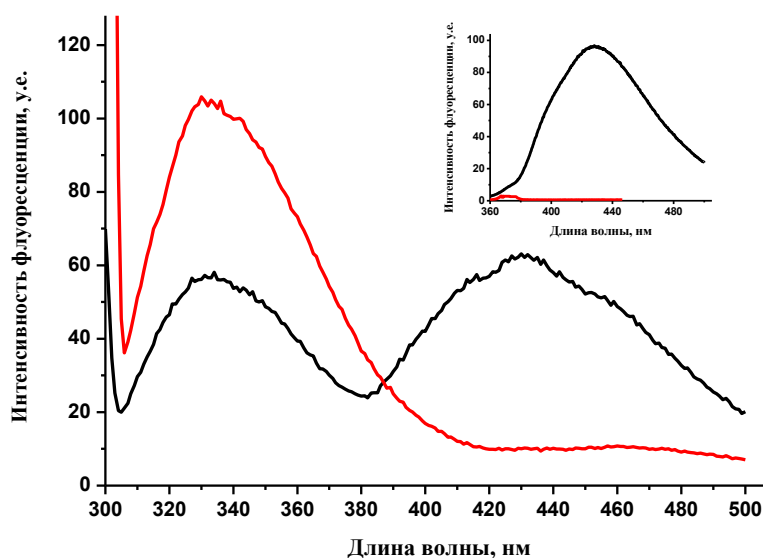


Рис. 3.19. Спектр флуоресценции 0.10 мг/мл AIDHPyr1147 при комнатной температуре,  $\lambda(\text{ex}) = 297$  нм. Врезка  $\lambda(\text{ex}) = 330$  нм. Черная линия – AIDHPyr1147 после выделения (холоформа), красная линия – тот же фермент после нагревания до 85 °C со скоростью 1 °C/мин и последующим охлаждением до комнатной температуры.

По данным спектрофлуориметрического титрования апоформы AIDHPyr1147 NADP<sup>+</sup> (Рис. 3.20) константа диссоциации бинарного комплекса составляет  $(0.60 \pm 0.08)$   $\mu\text{M}$  при 60 °C при заданном количестве сайтов связывания в тетрамере  $n = 4$ . Для сравнения константа диссоциации бинарных комплексов гомологичной дегидрогеназы из *S.mutans* составили 2.3  $\mu\text{M}$  для NADP<sup>+</sup> и 0.3  $\mu\text{M}$  для NADPH при 25 °C [374]. Величины констант диссоциации комплексов обоих ферментов с NADP<sup>+</sup> сходны, то есть при высоких температурах для термостабильной AIDHPyr1147 бинарный комплекс с NADP<sup>+</sup> по прочности не уступает бинарному комплексу мезофильного гомолога. Стоит отметить, что при титровании апоформы AIDHPyr1147 NADP<sup>+</sup> нет смещения максимума флуоресценции белкового спектра, то есть связывание кофермента не приводит к изменениям в структуре, по крайней мере, в области локализации триптофанов.

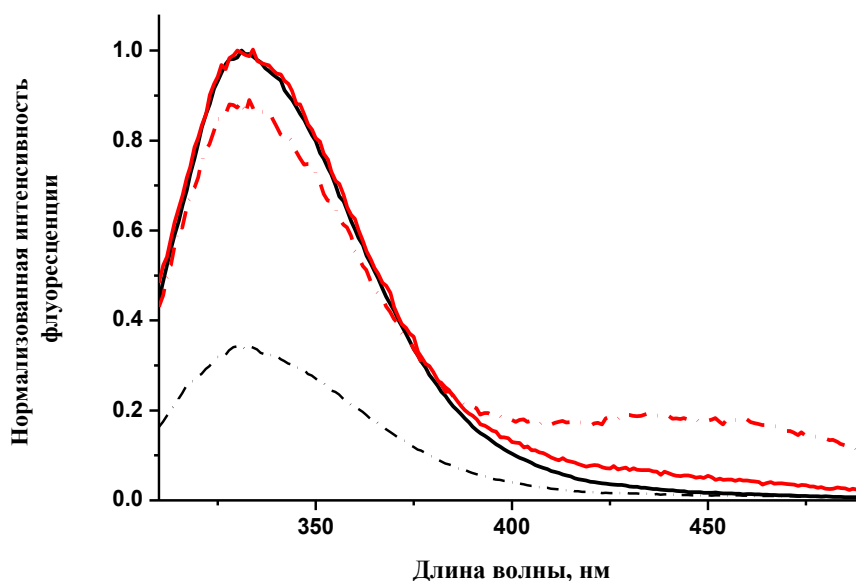


Рис. 3.20. Изменение спектра триптофановой флуоресценции апоформы AIDHPyr1147 при титровании NADP<sup>+</sup> (черные линии) и NADPH (красные линии) при 60 °С.  $\lambda(\text{ex}) = 297$  нм. Сплошная линия – нормализованный спектр 3.6  $\mu\text{M}$  апоформы AIDHPyr1147, пунктирная линия – нормализованный спектр после добавления 15  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup> или 15  $\mu\text{M}$  NADPH, соответственно.

Титрование апоформы фермента NADPH привело к неоднозначным результатам: при возбуждении на 297 нм конечный спектр белковой флуоресценции при максимальной концентрации NADPH отличается от спектра исходного AIDHPyr1147 – холоформы со связанным NADPH (Рис. 3.20) отсутствием выраженного максимума на 430 нм; есть незначительное повышение интенсивности на 455 нм, что соответствует свободному коферменту. Изменение собственной флуоресценции NADPH при добавлении к раствору фермента также незначительно относительно флуоресценцией свободного NADPH, и, главное, нет смещения максимума флуоресценции с 455 нм на 430 нм. Более того, связывание NADPH с AIDHPyr1147 не приводит к увеличению интенсивности флуоресценции NADPH или снятию тушения, что наблюдается при образовании комплекса [375,376]. По-видимому, титрование апоформы фермента NADPH в условиях эксперимента или не приводит к образованию бинарного комплекса, или приводит к получению комплекса с NADPH в конформации отличной от конформации NADPH в исходном

холоферменте. Из полученных данных рассчитать константу диссоциации бинарного комплекса AldHPyr1147 с NADPH оказалось невозможным.

Таким образом, AldHPyr1147 является активной термостабильной альдегиддегидрогеназой, строго специфичной к NADP. Кинетические и термодинамические характеристики архейной AldHPyr1147 в области температур функционирования организма-хозяина (60 °C и выше) соизмеримы с характеристиками гомологичных ферментов из мезофильных организмов. Рекомбинантная форма фермента соочищается с коферментом, удалить который для получения активной апоформа AldHPyr1147 возможно прогреванием.

### 3.2.3. Общая характеристика структуры AldHPyr1147

Для анализа свойств архейной AldHPyr1147 были получены кристаллы апоформы, нескольких состояний холоформы и тройного комплекса с NADP и субстратом изобутиральдегидом Таблица 3.10. Нам удалось получить, кроме апоформы и бинарного комплекса с неупорядоченным коферментом (Holo-1 и Holo-2), комплекс с коферментом в упорядоченной “hydride transfer” конформации (Holo-3). Анализ этих структур позволяет предложить механизм активации тиольной группы без общесосновного катализа каталитическим глутаматом и механизм дифференцировки состояния кофермента без образования ковалентной связи с атомом серы. Кроме того, была обнаружена блокировка двух потенциальных систем переноса заряда («proton relay systems»), описанных ранее для бактериальных AldH.

В независимой части элементарной ячейки кристаллов всех структур AldHPyr1147 находятся два тетрамера (Рис. 3.21А). Каждый тетрамер образован четырьмя идентичными субъединицами (А, В, С, D и Е, F, G, H). Полученные структуры тетрамеров сходны: при совмещении, например, тетрамеров структур Holo-1 и Holo-3 RMSD по Ca атомам составляет 0.17 Å. Субъединица AldHPyr1147 (Рис. 3.21В) имеет канонический фолд AldH и ее структура подобна структурам субъединиц ранее решенных бактериальных AldH, а также человеческой ALDH2. Ближайшими структурными гомологами AldHPyr1147 являются бензальдегиддегидрогеназа из *Corynebacterium glutamicum* (PDB код 3R64, идентичность по последовательности 37%, далее BenDH), NADP-зависимая



дегидрогеназа из *Streptococcus mutans* (PDB код 2EUN, идентичность по последовательности 35 %, далее SmAIDH) и сукцинат-полуальдегид-дегидрогеназа из *E. coli* (PDB код 3JZ4, идентичность по последовательности 35 %, далее SSAIDH).

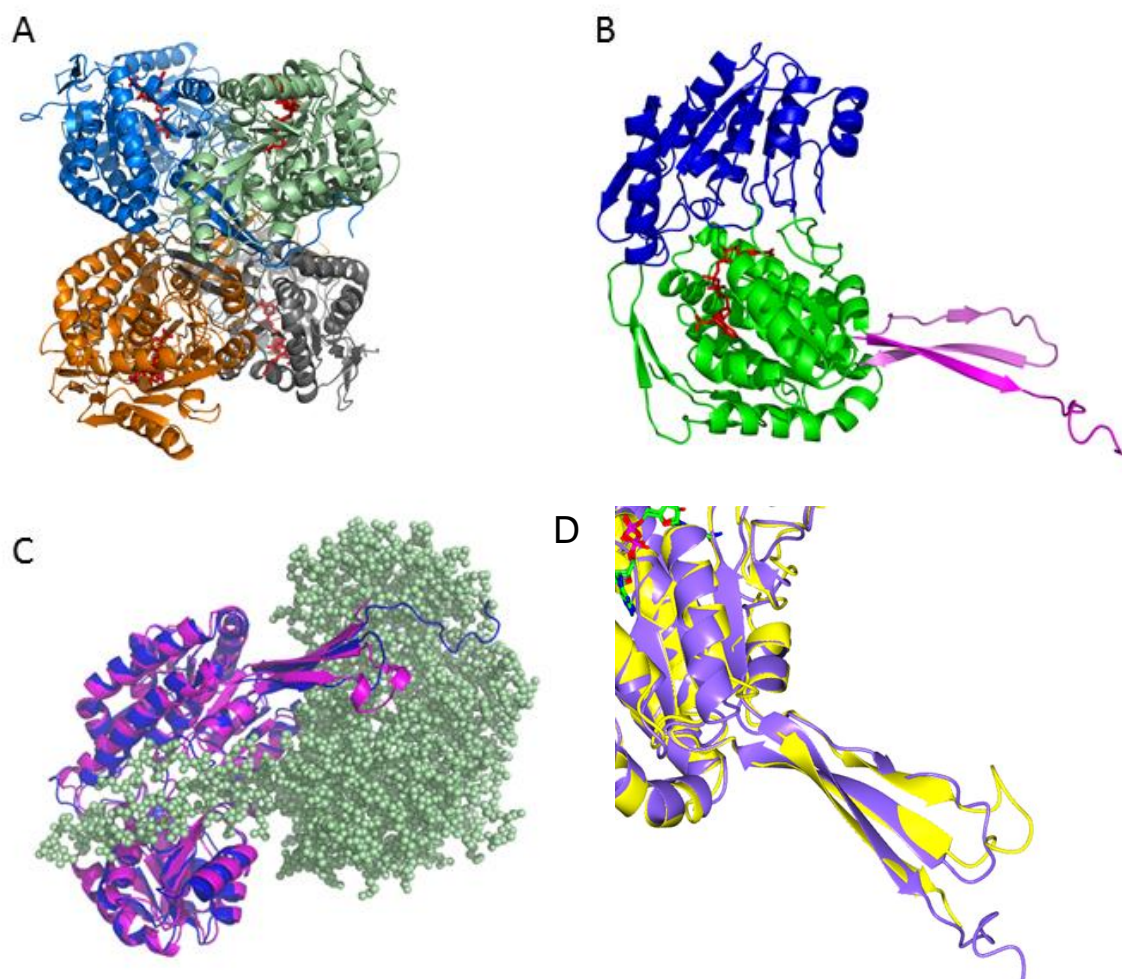


Рис. 3.21. Структура AIDHPyr1147. Кофермент NADP выделен красным. (A) Строение тетрамера. Субъединицы выделены цветом. (B) Строение субъединицы. Каталитический, кофермент-связывающий домены и домен олигомеризации показаны синим, зеленым и лиловым цветами, соответственно. (C) Наложение субъединицы SmAIDH из *S. mutans*, PDB ID 2EUN (лиловый) и субъединицы AIDHPyr1147 (синий). Вторая субъединица AIDHPyr1147, которая образует димер с первой субъединицей, показана зеленоватыми сферами. (D) Наложение доменов олигомеризации SmAIDH и AIDHPyr1147

Субъединица AIDHPyr1147 состоит из трех доменов: кофермент-связывающего (остатки 1-256, 443-470), каталитического (остатки 257-442), и домена олигомеризации (остатки 122-144, 470-491) (Рис. 3.21B). Кофермент-связывающий домен представляет собой укладку Россманна, однако NADP

связывается принципиально отличным образом от канонического связывания (наблюдаемого в TsAdh319): адениновая часть кофермента утоплена в щель между  $\beta$ -слоем и слоем  $\alpha$ -спиралей, пирофосфатная группа и никотинамидная часть кофермента в разных конформациях фиксированы по-разному, то есть подвижны.

Таблица 3.10. Структуры AIDHPyr1147 и конформации каталитических остатков в них.

Структуры AIDHPyr1147	Условия кристаллизации	Конформации отдельных элементов кофермента	Каталитические остатки
Аро (апоформа)	Кристаллизовали апоформу AIDHPyr1147	нет	Cys287: боковая группа направлена в кофермент-связывающий карман. Glu253: боковая группа направлена в кофермент-связывающий карман (“ <b>inside</b> ” конформация).
Ноло-1 (холоформа)	Кристаллизовали выделенную AIDHPyr1147	NADP(H) в конформации “out” и “hydride transfer” во всех субъединицах кроме В; в В, NADP(H) в “hydride transfer” конформации; никотинамидное кольцо разупорядочено во всех субъединицах	Cys287 в двух конформациях: 1) боковая группа направлена в кофермент-связывающий карман; 2) боковая группа направлена от кофермент-связывающего кармана. Glu253: боковая группа направлена в кофермент-связывающий карман (“ <b>inside</b> ” конформация); частично разупорядочена.
Ноло-2 (холоформа)	Сокристаллизация апоформы AIDHPyr1147 с NADP+	NADP+ в конформациях “out” и “hydride transfer” во всех субъединицах, никотинамидное кольцо разупорядочено во всех субъединицах	Cys287 в двух конформациях: 1) боковая группа направлена в кофермент-связывающий карман; 2) боковая группа направлена из кофермент-связывающего кармана. Glu253: в двух конформациях: 1) боковая группа направлена в кофермент-связывающий карман (“ <b>inside</b> ” конформация); 2) боковая группа направлена из кофермент-связывающего кармана (“ <b>intermediate</b> ” конформация).
Ноло-3 (холоформа)	Кристаллы апоформы настаивали с NADP+ и изобутиральдегидом	NADP+ в конформации “hydride transfer”; заселенность никотинамидного кольца 70 - 80 %	Cys287 в двух конформациях: 1) боковая группа направлена в кофермент-связывающий карман в 30 % субъединиц; 2) боковая группа направлена из кофермент-связывающего кармана в 70% субъединиц. Glu253: боковая группа направлена из кофермент-связывающего домена (“ <b>intermediate</b> ” конформация); частично разупорядочен.
Тройной комплекс	Сокристаллизация апоформы с NADP+ и субстратом изобутиральдегидом	NADP+ в “hydride transfer” конформации, заселенность никотинамидного кольца 100%.	Cys287: боковая группа направлена из кофермент-связывающего кармана. Glu253: боковая группа направлена из кофермент-связывающего кармана (“ <b>intermediate</b> ” конформация).

По сравнению с известными структурами бактериальных AIDH, С-концевой фрагмент AIDHPyr1147 в домене олигомеризации удлиннен на 11 остатков (Рис. 3.21В). С-концевые остатки образуют водородные связи и участвуют в гидрофобных взаимодействиях между двумя субъединицами в димере, тем самым, усиливая контакт. Площадь димерного контакта для AIDHPyr1147, рассчитанная с помощью сервера PISA (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/>), составляет 3438,6 Å<sup>2</sup>, в то время как для ближайших гомологов BenDH, SmAIDH и SSAIDH 1758,7, 2385,7 и 2468,5 Å<sup>2</sup>, соответственно. В структуре AIDHPyr1147 С-конец не содержит спиралей, как в структурах димерных AIDH (PDB код 3SZA, 4QGK), где С-концевой фрагмент частично образует спирали и препятствует соединению димеров в тетрамер [126,129]. С-конец в AIDHPyr1147 не закрывает вход в потенциальный субстратный канал, а скорее несколько его сужает. Поэтому можно предположить, что С-концевой фрагмент не только стабилизирует структуру AIDHPyr1147, усиливая связи между субъединицами в димере, но и работает «привратником», ограничивая размеры субстратного канала. Позднее была получена структура термостабильной AIDH из *Thermus thermophilus* с С-фрагментом длиннее еще на 17 остатков [377]; этот фрагмент взаимодействовал с двумя субъединицами в тетрамере (соседней и по диагонали напротив). На примере AIDHPyr1147 и AIDH из *T. thermophilus* показана новая функция удлиненного С-концевого фрагмента – укрепление контактов в тетрамере.

#### **3.2.4. Структура апоформы AIDHPyr1147 и Holo-1 комплекса AIDHPyr1147 с коферментом**

В полученных нами структурах AIDHPyr1147 адениновая часть кофермента упорядочена, а никотинамидная часть кофермента частично разупорядочена, кофермент наблюдается в конформациях “hydrid transfer” и “out”. Конформация “hydrolysis” кофермента в структурах AIDHPyr1147 не обнаружена (Таблица 3.10).

Согласно проведенным экспериментам выделенная рекомбинантная AIDHPyr1147 представляет собой комплекс с коферментом Holo-1 (Таблица 3.10). Наложение субъединиц Holo-1 и апоформы фермента (Аро) показывает, что удаление молекулы кофермента не вызывает смещений или конформационных изменений кофермент-связывающего домена. При совмещении субъединиц моделей

Holo-1 и Apo RMSD по Ca атомам составляет 0.30 Å. Сравнение апоформы и комплексов с коферментом у других структур AIDH показывает, что в большинстве случаев структура апоформы близка структуре фермента в комплексе с коферментом. Это было показано, например, для бетаинальдегиддегидрогеназы из печени трески [140], митохондриальной альдегиддегидрогеназы [378] и для 10-формилтетрагидрофолат дегидрогеназы из *Rattus norvegicus* (Ct-FDH) [130].

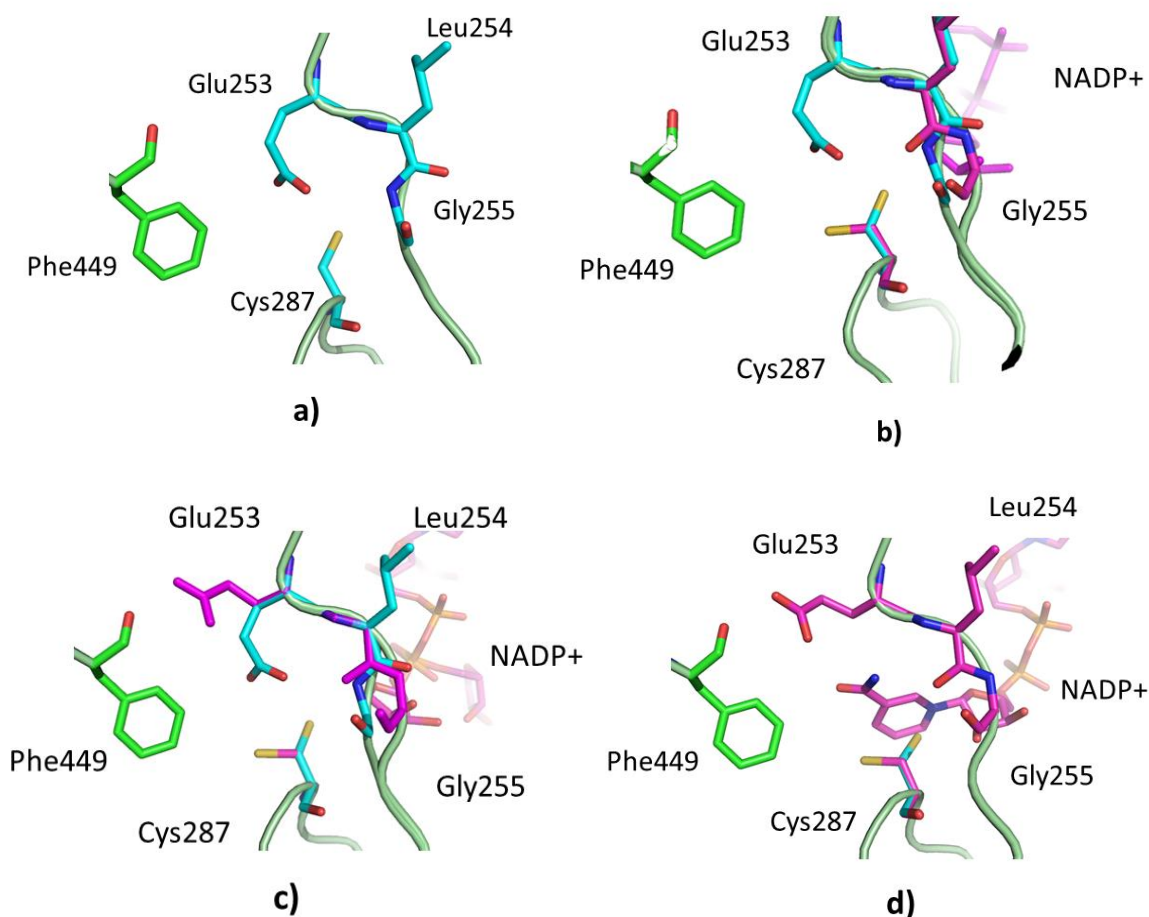


Рис. 3.22. Положение остатков в активном центре AIDH<sub>Pyg1147</sub> (a) в модели Apo, (b) в модели Holo-1, (c) в модели Holo-2, (d) в модели Holo-3. Кофермент NADP показан лиловым. Когда NADP находится в активном центре, остатки Glu253, Cys287 и Gly255 находятся в конформации, выделенной малиновым цветом. Когда кофермента нет в активном центре, остатки Glu253, Cys287 и Gly255 находятся в конформации, выделенной голубым цветом.

Незначительное различие в структурах апоформы и комплекса с коферментом наблюдалась для лактатдегидрогеназы из *E. coli* [142], причем только для одной петли каталитического домена, а кофермент-связывающий домен оставался идентичным в структурах апоформы и комплекса с коферментом. Единственная

структура, для которой наблюдалось изменение структуры кофермент-связывающего домена при связывании кофермента (при этом изменилась только одна петля) – это структура SmAIDH [379].

В структуре Aro, по сравнению со структурой Holo-1, меняются только конформации остатков активного центра. Боковые группы каталитических остатков Cys287 и Glu253 в Aro направлены в полость связывания кофермента (Рис. 3.22а). Расстояние между SG Cys287 и ближайшего к нему атома остатка Glu253 (OE1 или OE2 для разных мономеров) составляет 3.12-3.32 Å. Атом OE2\_Glu253 образует водородную связь с атомом азота Gly255.

В модели Holo-1 кофермент присутствует в двух конформациях “out” и “hydride transfer” (Рис. 3.23А). Во всех субъединицах никотинамидное кольцо кофермента разупорядочено, а никотинамидная часть кофермента фиксируется в “hydrid transfer” конформации водородной связью атома O2D рибозы с Glu382 и через стэкинг-взаимодействие (stacking) никотинамидной рибозы с остатком Phe384, а в “out” конформации никотинамидная рибоза образует водородные связи с остатками Trp154, Asn332, Gln335.

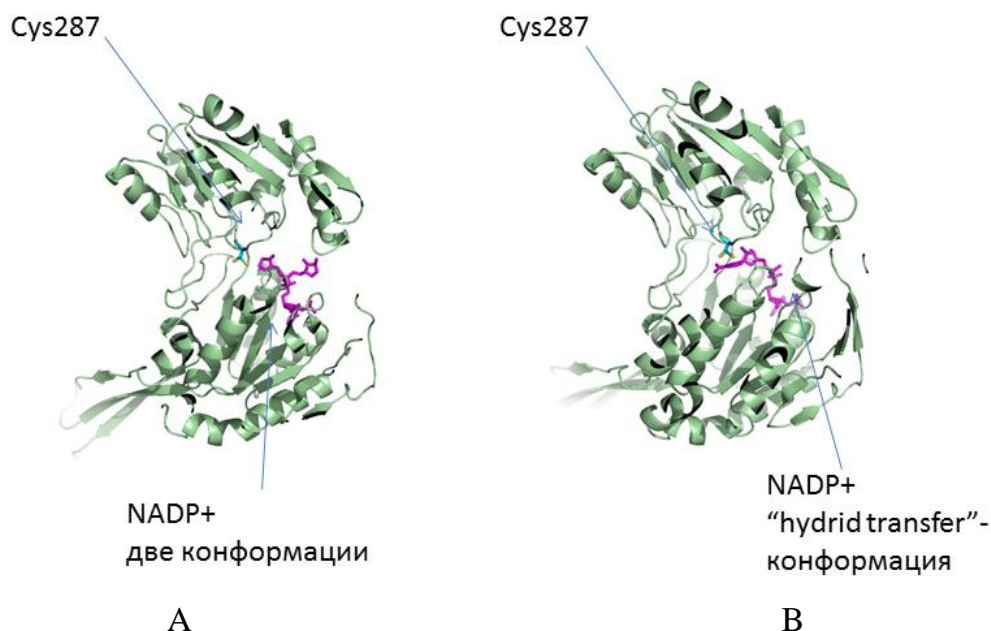


Рис. 3.23. Различные конформации кофермента NADP в комплексах с AIDHpyr1147. NADP показан лиловым, AIDHpyr1147 показан зеленым. (А) Молекула NADP+ в конформациях “out” и “hydride transfer” в моделях Holo-1 and Holo-2. (В) Молекула NADP+ в “hydrid transfer” конформации в модели Holo-3.

В структуре Holo-1, в отличие от структуры Apo, остатки активного центра присутствуют во множественных конформациях (Рис. 3.22b). Когда кофермент принимает “hydride transfer” конформацию, боковая группа Cys287 направлена из кофермент-связывающего кармана и образует водородную связь с молекулой воды (НОН 3230 в субъединице А), которая в свою очередь образует водородную связь с атомом ND2 Asn155. Когда кофермент находится в “out” конформации, то оба каталитических остатка обращены в центр кофермент связывающего кармана, как в модели Apo, в которой для разных субъединиц расстояние между атомами SG Cys287 и OE1 Glu253 составляет от 3.1 до 3.8 Å, что позволяет предположить наличие между ними водородной связи. Остаток Glu253, как в модели Apo, образует водородную связь с атомом азота остатка Gly255.

### **3.2.5. Структура активного центра в моделях Holo-2 и Holo-3 комплекса AIDHPyr1147 с коферментом NADP+**

Кристаллы бинарных комплексов Holo-2 и Holo-3 (Таблица 3.10) были получены в разных условиях. Кристалл Holo-2 был получен методом сокристаллизации апоформы с NADP+, а Holo-3 был получен настаиванием кристаллов апоформы в растворе NADP+ и изобутиральдегида. В модели Holo-2 конформации кофермента и остатков активного центра во многом совпадают со структурой Holo-1 (Рис. 3.22B,C). Основное отличие состоит в конформациях Glu253: в модели Holo-2 Glu253, кроме «inside», наблюдается еще в «intermediate» конформации (Рис. 3.22c), при этом  $\gamma$ -карбоксильная группа Glu253 направлена из активного центра и находится на расстоянии 2.7 Å от атома O\_Phe449. В такой конформации Glu253 не образует водородной связи с атомом N\_Gly255, атом O\_Leu254 развернулся на 180°. В модели Holo-3 никотинамидная часть хорошо видна на картах электронной плотности (Рис. 3.23B). Упорядоченному состоянию никотинамидной группы NADP в активном центре соответствуют конформации Cys287 и Glu253, когда их боковые группы направлены от никотинамидной группы и не образуют водородные связи между собой (Рис. 3.22d); Glu253 наблюдается только в “intermediate” конформации; пептидная связь между Leu254 и Gly255 ориентирована так, что образуется водородная связь между атомами O\_Leu254 – N7N NADP+. Таким образом, мы наблюдаем то, что упорядоченное никотинамидное

кольцо в активном центре фиксируется только одной водородной связью. По-видимому, основной вклад в стабилизацию вносят Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. В отсутствие фиксированной никотинамидной части кофермента тиольная группа Cys287 направлена в активный центр.

Ранее обсуждалось [142], что “out” конформация может соответствовать, как присоединению NADP к AIDH, так и диссоциации NADPH из активного центра. Из условий кристаллизации Holo-2 следует, что “out” конформация кофермента соответствует его окисленной форме в структурах AIDHPyr1147. Может ли «out» конформация соответствовать NADPH – неизвестно.

В то время как никотинамидная часть кофермента подвижна и принимает различные конформации, его адениновая часть хорошо упорядочена во всех комплексах AIDHPyr1147. Адениновая часть кофермента закреплена в узкой щели между спиралью 211-230 и спиралью 230-244 (Рис. 3.24), 5'-фосфат аденозин-рибозы образует водородные связи с остатками Lys178, Ser181 и Gly211. Наложение модели Holo-2 и комплексов SmAIDH и SSAIDH с NADP показало сходство положения адениновой части в гомологах. Большинство остатков в кофермент-связывающем кармане не консервативны и наблюдается значительное различие в сети водородных связей, формирующей щель, и организацией водородных связей между адениновой частью кофермента и этой частью белковой глобулы.

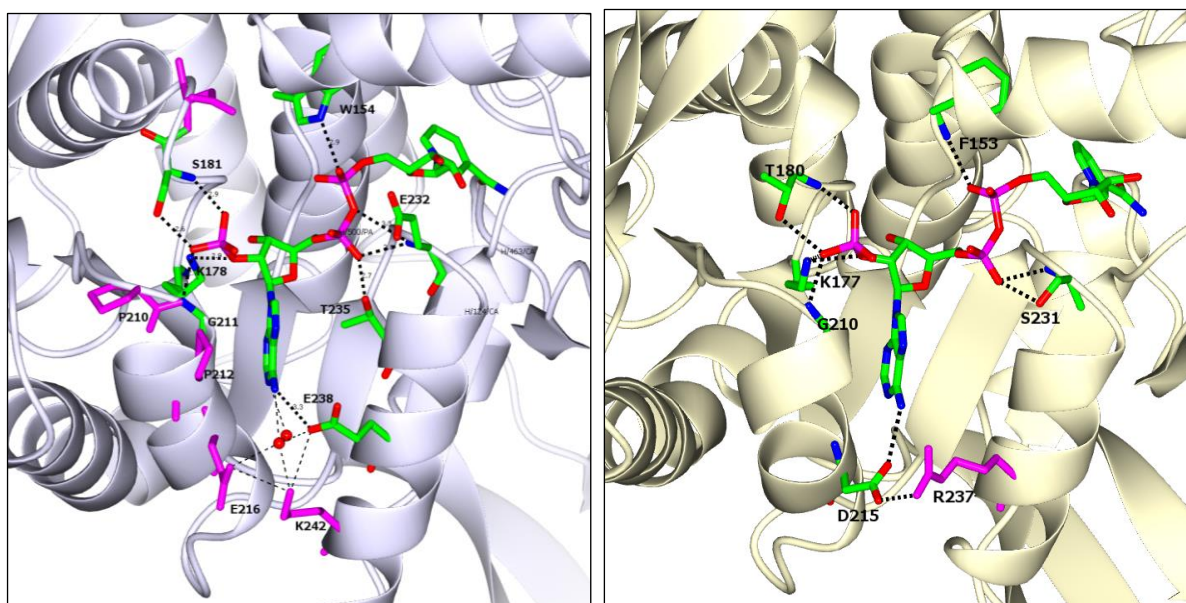


Рис. 3.24. Связывание молекулы NADP в кофермент-связывающем домене AIDHPyr1147 (PDB код 5EXF) (слева) и SmAIDH (PDB код 2EUH) (справа).

Так, Ser231 в SmAIDH и Ser233 в SSAIDH образуют водородную связь с атомом O2A кофермента. В AIDHPyr1147 остаток Ser заменен на Glu232, и этой водородной связи не существует, однако существует новая водородная связь между Thr235 и атомом O2A, которая отсутствует в гомологичных структурах. Однако в AIDHPyr1147 структура щели дополнительно усилена водородными связями между Glu216, молекулами воды и Glu238. Более того, Glu238 и Glu216 образуют дополнительную стабилизирующую водородную связь с атомом N6A кофермента. И, наконец, в AIDHPyr1147 очень жесткий фрагмент Pro210-Gly211-Pro212, по-видимому, стабилизирует (укрепляет) вход в щель и фиксирует положение консервативного Gly211. Укрепление кофермент-связывающего кармана способствует термостабильности AIDHPyr1147.

### **3.2.6. Структура активного центра в комплексе AIDHPyr1147 с коферментом NADP и субстратом; устройство субстратного канала**

В кристаллической модели тройного комплекса, в активных центрах шести субъединиц (A, B, C, D, G, H) присутствует электронная плотность, которая была нами интерпретирована как молекула субстрата изобутиральдегида (Рис. 3.25А). В структурах холоформ на этом месте располагаются молекулы воды. Атом кислорода субстрата образует водородную связь с атомом O7N кофермента и атомом OG1\_Thr230 (Рис. 3.25А). Молекула субстрата окружена остатками Ile160, Lys163, Lys164, Phe449, Glu443 и Glu460, при этом боковые группы остатков Lys и Glu обращены к субстрату своими гидрофобными частями.

Наложение модели тройного комплекса AIDHPyr1147 на другие известные модели комплексов AIDH с коферментом и субстратом показывает, что молекула изобутиральдегида смещена на расстояние около 3 Å от положения, где находится субстрат в моделях других AIDH. Молекула изобутиральдегида как бы находится на самом дне субстратного канала, на расстоянии водородной связи от кофермента, но вместе с тем достаточно далеко от каталитического Cys287 (расстояние от субстрата до SG\_Cys287 5,74 Å). Тем не менее, субстрат находится в активном центре и образует водородные связи с ферментом и NADP<sup>+</sup>. Аналогичная ситуация наблюдается, например, для моделей комплексов с субстратами дегидрогеназы из *Pseudomonas fluorescens* (PDB коды 2I2R и 2I25 [380]).



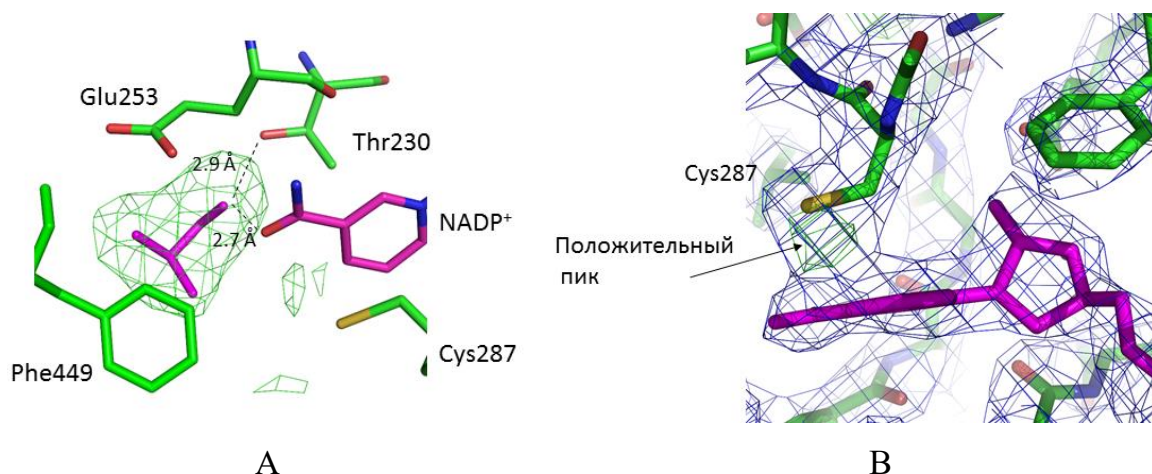


Рис. 3.25. Активный центр AIDHPyr1147 с субстратом изобутиральдегидом и NADP<sup>+</sup>. Остатки, формирующие активный центр, показаны зеленым. NADP<sup>+</sup> и изобутиральдегид - лиловым. Разностная карта электронной плотности Fo-Fc для изобутиральдегида показана с уровнем срезки 3σ. (А) О атом изобутиральдегида на расстоянии водородной связи от атома кислорода кофермента и остатка Thr230. Молекула изобутиральдегида вписана в разностную карту электронной плотности. (В) Положительный пик на разностной карте электронной плотности Fo-Fc для модели AIDHPyr114, который указывает на возможную вторую конформацию остатка Cys 287. Разностная карта плотности Fo-Fc показана с уровнем срезки 3σ и окрашена в зеленый цвет.

Строение активного центра в модели тройного комплекса близко к строению активного центра в модели Holo-3 (Рис. 3.22d), NADP<sup>+</sup> полностью упорядочен в “hydride transfer” конформации. Это единственная кристаллическая структура AIDHPyr1147, в которой никотинамидная часть имеет заселенность 1.0. Cys287 имеет не две, а только одну конформацию, отвернутую от кофермента. Остальные остатки активного центра находятся в тех же конформациях, что и в структуре Holo-3. Наблюдаемая плотность положительных значений на разностной карте Fobs-Fcalc между никотинамидным кольцом и атомом SG (Рис. 3.25B) свидетельствует о том, что возможно присутствует еще одна конформация Cys287, близко расположенная к основной конформации, которая может участвовать в образовании “ковалентной” связи между Cys287 и атомом C4N кофермента (как в модели C<sub>1</sub>-FDH [130]). При этом расстояние между атомом серы Cys287 и C4N атомом NADP<sup>+</sup> приблизительно равно 1.5 Å. Однако недостаточно высокое разрешение данных не позволяет нам ее построить. То же расстояние в цистеин-никотинамидном аддукте (cysteine-nicotinamide adduct) в модели C<sub>1</sub>-FDH с остатком Cys в конформации отличной от направленной в и из кофермент-связывающего кармана составляет около 1.6 Å.

Другими словами, присутствие в структуре AldHPyr1147 цистеин-никотинамидного аддукта по нашим данным следует предполагать с осторожностью.

В работах ряда авторов на основании анализа структур было выдвинуто предположение [130,137,141], что субстрат в структурах AldH достигает активного центра по отдельному “субстратному каналу”, который выходит на противоположную от входа NADP поверхность субъединицы. В нашей структуре тоже имеется такой канал, по которому субстрат может поступать в активный центр. Субстратный канал в AldHPyr1147 сформирован преимущественно остатками одной субъединицы и, на выходе из этого канала, небольшим количеством остатков от другой субъединицы, образующей димер с первой. Этот канал по форме напоминает воронку, сужающуюся к активному центру.

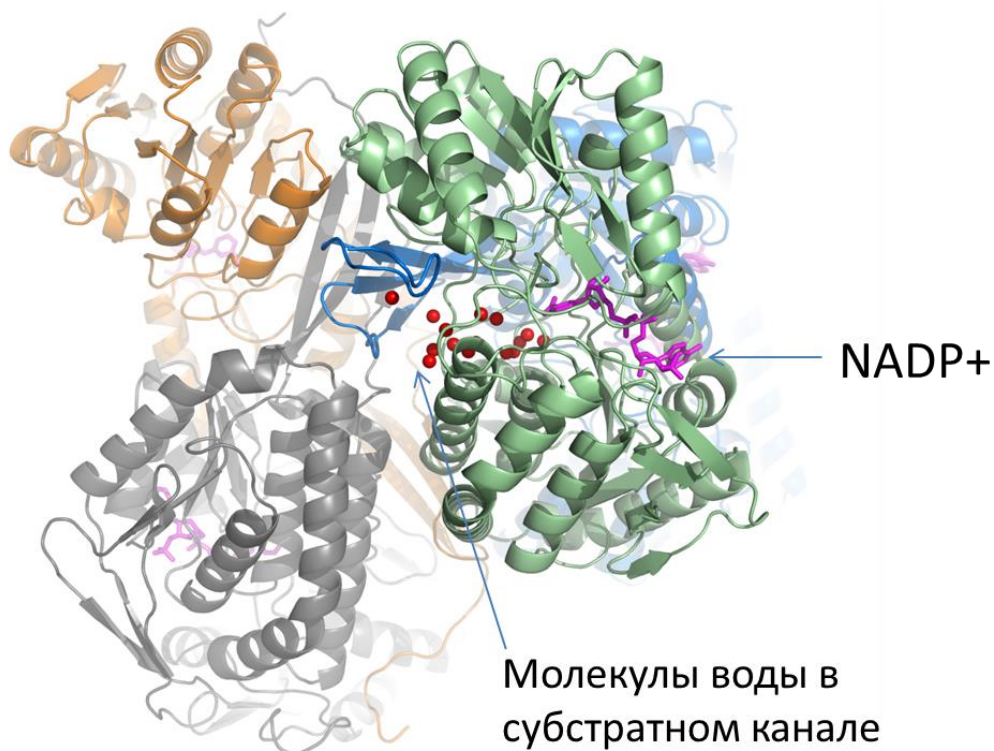


Рис. 3.26. Предполагаемый субстратный канал. Субъединицы, образующие тетрамер, показаны разными цветами. Кофермент показан лиловым цветом. Молекулы воды в субстратном канале показаны красными шариками.

Субстратный канал выстилают как полярные, так и гидрофобные остатки: Arg101, Lys102, Trp104, Gly105, Val108, Phe109, Arg112, Tyr156, Ser159, Ile160, Lys163, Phe277, Phe281, Ile286, Phe441, Leu442, Glu443, а также на выходе, остатки другого мономера: Asp132, Ser133, Glu134, Ser135, Thr481, Arg482, Arg483, Phe484,

Pro485. Во всех моделях холоформы субстратный канал заполнен молекулами воды (Рис. 3.26).

### 3.2.7. Анализ возможных путей вывода протона

Принятый на сегодня механизм окисления альдегидов AIDH предполагает сброс протона. На сегодня в структурах AIDH предложены два возможных канала вывода протона [130,132,137]. Так, в структуре C<sub>t</sub>-FDH (PDB код 2O2R) каталитический остаток Glu непосредственно контактирует с непрерывной цепочкой молекул воды, которая выходит в узкий канал между двумя субъединицами [130]. Однако другие структуры, например, PaBADH (PDB код 2WME), не содержат такой непрерывной цепочки воды от каталитического остатка Glu. Гонзалес-Сегура (L. Gonzales-Segura) с сотрудниками предположил, что в структуре PaBADH перенос протона осуществляется сначала от каталитического остатка Glu к остатку Glu464 (нумерация 2WME, в нашей нумерации Glu460) [132], а затем по непрерывной цепочке воды от Glu464 в узкий канал между двумя субъединицами.

Сравнение структур AIDHPyr1147, C<sub>t</sub>-FDH, PaBADH показывает, что в кристаллической структуре AIDHPyr1147 нет непрерывной цепочки воды (кроме воды в субстратном канале), связывающей либо Glu253, либо Glu460 с каналом между субъединицами. Цепочка воды непосредственно от Glu253 прерывается остатком Arg459, который прочно фиксирован тремя водородными связями с соседними остатками (таким же образом этот канал перекрыт в PaBADH). А на пути цепочки воды от Glu460 к каналу между субъединицами в AIDHPyr1147 находится остаток Glu468. В отличие от Arg459, Glu468 потенциально может участвовать в переносе протона через водородную связь с Thr251. Однако эта цепочка не может реализоваться, поскольку Glu253 и молекулы воды в этой системе образуют водородные связи с разными кислородами  $\gamma$ -карбоксильной группы Glu460, то есть протон приходит на один кислород, а уйти может только с другого (такое же положение остатков наблюдается и в структуре дегидрогеназы из *B. xenovorans*, PDB код 2VRO). В отличие от AIDHPyr1147, в структуре PaBADH на расстоянии

водородной связи от Glu253 и молекулы воды в канале находится один и тот же атом кислорода Glu464. Таким образом, сброс протона в молекуле AIDHPyr1147 через остаток Glu460 невозможен. Мы предполагаем, что в структуре AIDHPyr1147 сброс протона с Glu253 может осуществляться через субстратный канал, с которым контактируют как Glu253, так и Glu460.

### 3.2.8. Взаимодействие подвижных элементов в структуре AIDHPyr1147

В структурах AIDHPyr1147 каталитический Cys встречается в двух упорядоченных конформациях, когда боковая группа направлена к никотинамидной части связанного кофермента и от нее. При этом только во второй конформации тиольная группа направлена в сторону субстратного канала, а в тройном комплексе – в сторону субстрата. Тиольная группа Cys образует водородные связи с каталитическим Glu в конформации “inside” и не образует с тем же Glu в конформации “intermediate”. Образование такой водородной связи указывает на сходство значений  $pK_a$  боковых групп остатков и иногда интерпретируется как активация остатка Cys остатком Glu по механизму общесосновного катализа. Активация каталитического остатка Cys, связанная с локальной структурной перестройкой, ассоциированной со связыванием NADP<sup>+</sup> обсуждалась ранее в [131]. По мнению авторов статьи, присоединение кофермента приводит к ротации боковой группы остатка Cys и его активации – снижению  $pK_a$  с последующим образованием тиолат-иона в результате взаимодействия с атомом азота основной цепи остатка Cys и соседним остатком Thr. В тройном комплексе AIDHPyr1147 атом SG\_Cys287 в активной конформации находится на расстоянии водородной связи от N\_Thr288, возможно, эта водородная связь может привести к снижению  $pK_a$  Cys. При этом полученные в работе данные не противоречат снижению  $pK_a$  тиольной группы Cys в результате взаимодействия с никотинамидным кольцом NADP<sup>+</sup>. Кроме того, тот факт, что pH-оптимум фермента находится в щелочной области, возможно, объясняется именно диссоциацией протона тиольной группы без общесосновного катализа Glu253.

В “inside” конформации Glu253, кроме слабой водородной связи с Cys287, образует прочную водородную связь с атомом N\_Gly255, что указывает на депротонированное состояние его карбоксильной группы. В “intermediate” конформации Glu253 образует водородную связь с атомом O\_Phe449, это указывает уже на протонированную форму его боковой группы и повышение pKa. На основании анализа полученных моделей можно предположить, что Glu253 при переходе из “inside” в “intermediate” конформацию может захватывать протон, который образуется при поляризации связи S-H тиольной группы Cys. Остаются неясными факторы, обеспечивающие повышение pKa Glu в “intermediate” конформации в молекуле AldHPyr1147. Неочевидно, что это результат окружения, так как в “inside” и “intermediate” конформациях окружение Glu253 сходно.

Опираясь на полученные структурные данные, можно сделать некоторые предположения относительно того, как проходит стадия ацилирования реакции окисления альдегидов, катализируемая AldHPyr1147. Субстрат и кофермент попадают в активный центр с противоположных сторон, при этом субстрат движется по специальному каналу, который открыт независимо от присутствия кофермента. В начале реакции NADP<sup>+</sup> находится в “hydride transfer” или “out” конформации с неупорядоченной никотинамидной частью, боковые группы каталитических Cys287 и Glu253 направлены в кофермент-связывающий карман и образуют водородную связь. Переход в активную конформацию Cys287 (ротация его тиольной группы) реализуется одновременно с упорядочиванием никотинамидной части кофермента в активном центре и ротацией боковой группы Glu253. В активной конформации тиольная группа Cys287 ориентирована в субстратный канал. Высвободившийся протон может захватить боковая группа Glu253 и перейти в “intermediate” конформацию, которая фиксируется водородной связью с атомом O\_Phe449. Это позволяет вывести протон из активного центра. Сброс протона с Glu253 осуществляется через субстратный канал, не исключено, что сброс протона с Cys287 в субстратный канал реализуется без посредничества Glu253, геометрия активного центра это позволяет.

Остается неясным, почему спектрофлуориметрическим титрованием не удалось зафиксировать образование комплекса с NADPH. Указывает ли этот

результат на низкое средства восстановленной формы кофермента или это результат неудачно подобранных условий эксперимента (титрование проводилось в условиях, оптимальных для связывания окисленной формы кофермента). Возможно, низким средством также объясняются и неудачи с получением настаиванием комплексов ALDHPyr1147 с восстановленной формой кофермента NADPH.

Основные выводы из проделанной работы следующие:

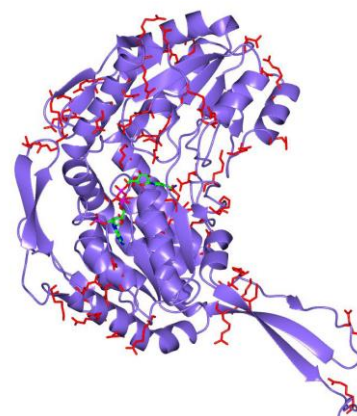
1. Общая структура термостабильной ALDHPyr1147 отличается от структур гомологичных мезофильных ALDH более длинным доменом олигомеризации в субъединице и увеличением площади димерного контакта в тетрамере, такая роль С-концевого фрагмента в стабилизации тетрамерной структуры показана впервые;
2. Удаление кофермента из ALDHPyr1147 не вызывает изменения хода основной цепи и разупорядочивания отдельных элементов вторичной структуры;
3. В молекуле ALDHPyr1147 NADP<sup>+</sup> может принимать «out» и «hydride transfer» конформации;
4. Упорядоченная никотинамидная часть в комплексе фиксируется одной водородной связью с атомом O\_Leu254 и, возможно, электростатическим взаимодействием с тиолат-анионом остатка Cys287,
5. Упорядочение кофермента в холоформе происходит, когда в кристаллизационных условиях есть субстрат;
6. Предложенные ранее для альдегиддегидрогеназ каналы вывода протона в структуре ALDHPyr1147 заблокированы.
7. Активация каталитического Cys287 на стадии ацилирования возможна как в результате взаимодействия с атомом азота основной цепи остатка Cys и соседним остатком Thr288, так и в результате взаимодействия с никотинамидным кольцом NADP<sup>+</sup>.
8. Биохимические эксперименты указывают на существование механизма дифференцирования окисленной и восстановленной формы кофермента при его связывании с апоформой, однако, обнаружить этот механизм путем анализа структур ALDHPyr1147 не удалось.

### 3.2.9. Структурные факторы термостабильности AldhPyr114

Анализ структурных факторов термостабильности AldhPyr1147 включал сравнение аминокислотного состава гомологов, распределения по категориям водородных связей и сравнение организации тетрамеров у ближайших структурных гомологов SmAldH и SSAldH. Доля заряженных остатков, в том числе остатка Arg, у AldhPyr1147 наибольшая среди гомологов и составляет 27.1%, причем наибольшее увеличение доли заряженных остатков наблюдается в каталитическом домене (Таблица 3.11).

Таблица 3.11. Распределение заряженных остатков по доменам в субъединицах AldhPyr1147 и ближайших гомологах SmAldH (PDB код 2EUN, идентичность по последовательности 35%) и SSAldH (PDB код 3JZ4, идентичность по последовательности 35%).

Категории сравнения:	AldH1147	SmAldH	SSAldH
Количество а.о. в субъединице	491	475	481
Доля заряженных остатков, %	27.1	25.0	24.3
Доля заряженных остатков в NADP-связывающем домене, %	24.0	21.3	21.3
Доля заряженных остатков в каталитическом домене, %	30.5	27.3	27.1
Доля заряженных остатков в домене олигомеризации, %	27.1	0	0
Доля остатков Arg, %	6.7	3.8	4.8
Доля заряженных остатков ASA в тетрамере, %	57.5	54.7	50.1



Субъединица Aldh1147. Заряженные остатки выделены красным

Анализ водородных связей по категориям с помощью разработанного алгоритма показал увеличение доли внутренних водородных связей в AldhPyr1147 (56.4% против в 51.9% в мезофильной SmAldH и 54.3% в TsAdh319) и связей **Charged-Neutral** (22.3% против 19.9% в мезофильной SmAldH и 18.8% в TsAdh319) (Таблица 3.12). Количество солевых мостиков (**Charged-Charged**) и водородных связей **Neutral-Neutral** у сравниваемых AldH совпадает. Очевидно, что важным структурным фактором температурной адаптации AldhPyr1147 являются внутренние водородные связи и водородные связи между «заряженным» и

«нейтральным» атомами. Несложными расчетами можно показать, что часть водородных связей категории **Charged-Neutral** являются или внутренними или соединяют атомы на поверхности и внутри белковой глобулы. Из других структурных факторов температурной адаптации AldhPyr1147 стоит отметить увеличение площади димерных контактов в тетрамере (Рис. 3.21) и повышение прочности связывания кофермента (Рис. 3.24). Таким образом, структурные факторы стабилизации в AldhPyr1147 и TsAdh319 различаются.

Таблица 3.12. Количество водородных связей, распределенных по категориям, в тетрамерах AIDH1147 и SmAIDH и TsADH319.

Водородные связи	AIDH1147	SmAIDH	TsAdh319
Общее количество водородных связей в тетрамере:	2009	1980	1116
На один а.о.	1.02	1.04	1.19
Доля внутренних водородных связей (Inside-Inside), %	56.4	51.9	54.3
Доля поверхностных водородных связей (Surface-Surface), %	20.8	24.4	22.7
Доля водородных связей Charged-Neutral, %	22.3	19.9	18.8
Доля водородных связей Charged-Charged, %	8.5	8.2	14.0
Доля водородных связей Neutral-Neutral, %	69.2	71.9	67.2
Соотношение Inside-Inside/Surface-Surface	2.7	2.13	2.4

Корреляция между термостабильностью белка, количеством и положением солевых мостиков хорошо известны. При этом некоторые авторы подчеркивают вклад всех водородных связей (то есть каркаса (системы) водородных связей) и, в частности, «водородных связей между заряженными боковыми группами и атомами нейтральных боковых групп и основной цепи» в термостабилизацию белка [35,381,382]. Мацуи и Харата (I. Matsui and V. Harata) [35] сформулировали две причины, почему водородные связи категории **Charged-Neutral** могут быть предпочтительнее для стабилизация белка, чем солевые мостики или водородные



связи категории **Neutral-Neutral**: (1) энергетические потери из-за десольватации внутренних водородных связей **Charged-Neutral** меньше, чем для внутренних солевых мостиков; (2) энтальпийный выигрыш при образовании водородной связи **Charged-Neutral** выше, чем при образовании водородной связи **Neutral-Neutral** из-за более эффективного взаимодействия заряд-диполь.

### 3.3. ТРАНСАМИНАЗЫ ИЗ ГИПЕРТЕРМОФИЛЬНЫХ А\*РХЕЙ

*Thermoproteus uzoniensis*, *Vulcanisaeta moutnovskia* и *Geoglobus acetivorans*

#### 3.3.1. Функциональная характеристика трансаминазы из *T. uzoniensis* (TUZN1299)

Трансаминаза из гипертермофильной археи *T. uzoniensis* (TUZN1299) относится к PLP-зависимым ферментам IV типа укладки. По результатам множественного выравнивания и составу характеристических мотивов в последовательности TUZN1299 – это ВСАТ. Спектр субстратов TUZN1299, аминокетоноров и аминокетоноров, представлен в Таблицах 3.13 и 3.14: очевидна активность с разными по свойствам L-аминокислотам.

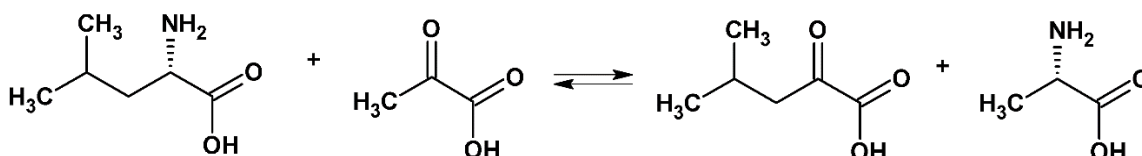


Схема V. Реакция по типу ВСАТ, катализируемая TUZN1299. В реакцию вступают L-лейцин и пируват – образуются 4-метил-2-оксовалерат и L-аланин.

Кроме гидрофобных разветвленных и ароматических L-аминокислот, TUZN1299 активен с серусодержащими L-метионином, L-цистеином и, что особенно важно, с положительно заряженными L-аргинином, L-орнитином и L-гистидином. Ранее для канонических ВСАТ такой тип активности не наблюдался. Важно отметить, что TUZN1299 не активен с  $\alpha$ -кетоглутаратом, который до настоящего времени рассматривается как канонический второй субстрат-аминокетонор в реакциях, катализируемых ВСАТ и DAAT, но не R-TA. Фермент относится к «медленным» ТА: каталитическая константа в реакции деаминации L-лейцина с аминокетонором пируватом составляет  $1.78 \text{ с}^{-1}$  при  $65 \text{ }^\circ\text{C}$  (Таблица 3.15).

Таблица 3.13. Удельная активность охарактеризованных ВСАТ из *T. uzoniensis* (TUZN1299), *V. moutnovskia* (VMUT0738), *G. acetivorans* (GEO1900) и *Thermobaculum terrenum* (TaTT) в реакциях трансаминирования с различными аминодонорами.

Аминодоноры	TUZN1299 <sup>a)</sup>	VMUT0738 <sup>a)</sup>	GEO1900 <sup>b)</sup>	TaTT <sup>c)</sup>
	Удельная активность, U/мг			
L-лейцин	1,7 ± 0,2	1,7 ± 0,2	13,6 ± 0,4	40 ± 5
L-ноглейцин	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2	9,2 ± 0,9	33 ± 4
L-γ-метиллейцин	1,3 ± 0,1	-	-	-
L-tert-лейцин	1,2 ± 0,1	-	2,0 ± 0,2	-
L-изолейцин	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,2	14,2 ± 1,7	-
L-валин	3,6 ± 0,3	3,0 ± 0,3	17,3 ± 1,7	13,9 ± 1,5
L-погвалин	2,8 ± 0,3	3,0 ± 0,3	1,6 ± 0,2	17 ± 2
2-аминобутановая кислота	3,5 ± 0,4	3,0 ± 0,4	1,8 ± 0,2	12,0 ± 1,2
L-метионин	4,4 ± 0,5	4,4 ± 0,5	-	11 ± 1
L-цистеин	4,5 ± 0,5	1,6 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,9 ± 0,2
L-гомосерин	4,0 ± 0,4	-	-	-
L-треонин	3,9 ± 0,4	3,6 ± 0,4	-	1,3 ± 0,1
L-серин	0	0	-	0
L-орнитин	4,4 ± 0,5	3,9 ± 0,4	0	0,4 ± 0,1
L-аргинин	3,5 ± 0,4	2,6 ± 0,3	-	0
L-гистидин	2,3 ± 0,3	1,8 ± 0,2	0,7 ± 0,1	2,3 ± 0,2
DL-лизин	0,6 ± 0,1	3,9 ± 0,2	0	1,8 ± 0,2
L-фенилаланин	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2	2,3 ± 0,2	15,0 ± 1,6
L-тирозин	1,0 ± 0,1	-	0	-
DL-триптофан	0	1,1 ± 0,1	-	18 ± 2
L-аланин	0,77 ± 0,1 <sup>d)</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>d)</sup>	0	0
D-аланин	0	0	0	0
D-валин	-	0	-	0
D-фенилаланин	-	-	-	0
β-аланин	0	0	0	0
(R)-PEA	0,004 <sup>e)</sup>	0,008 <sup>e)</sup>	0,002 <sup>e)</sup>	0,2 <sup>f)</sup>
(S)-PEA	0	0	0	<0,004 <sup>f)</sup>
L-глутамат	0,2 ± 0,1	0	0	27,6 ± 2,7 <sup>d)</sup>
L-аспартат	0	0	0	-
L-глутамин	9,7 ± 1,0	-	0	-
L-аспарагин	0,4 ± 0,1	-	-	-
L-глицин	0	-	-	-
L-пролин	0	-	-	-

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

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

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

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

e) в реакции с оксобутиратом (pH 7,5);

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

Таблица 3.14. Удельная активность охарактеризованных в работе ВСАТ из *T. uzoniensis* (TUZN1299), *V. moutnovskia* (VMUT0738), *G. acetivorans* (GEO1900) и *T. terrenum* (TaTT) в реакциях трансаминирования с различными аминокцепторами.

Аминокцепторы	TUZN1299 <sup>a)</sup>	VMUT0738 <sup>a)</sup>	GEO1900 <sup>b)</sup>	TaTT <sup>c)</sup>
	Удельная активность, U/мг			
2-оксобутират	7.6	3.1	1.3	1.4
4-метил-2-оксвалерат	0.77	1.65	7.7	27.8
3-метил-2-оксвалерат	0.53	0.83	7.1	26.5
пируват	0.52 <sup>d)</sup>	0.23 <sup>d)</sup>	0.56	1.85
индол-3-пируват		1.88		38.1
$\alpha$ -кетоглутарат	0	0	13.6 <sup>d)</sup>	40.3 <sup>d)</sup>

- a) в реакции с L-аланином в 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 8.0, при 65 °С;  
 b) в реакции с L-глутаматом в 50 мМ Na-фосфатном буфере, 100 мМ, pH 8.0, при 65 °С;  
 c) в реакции с L-глутаматом в 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 8.0, при 50 °С;  
 d) в реакции с L-лейцином;

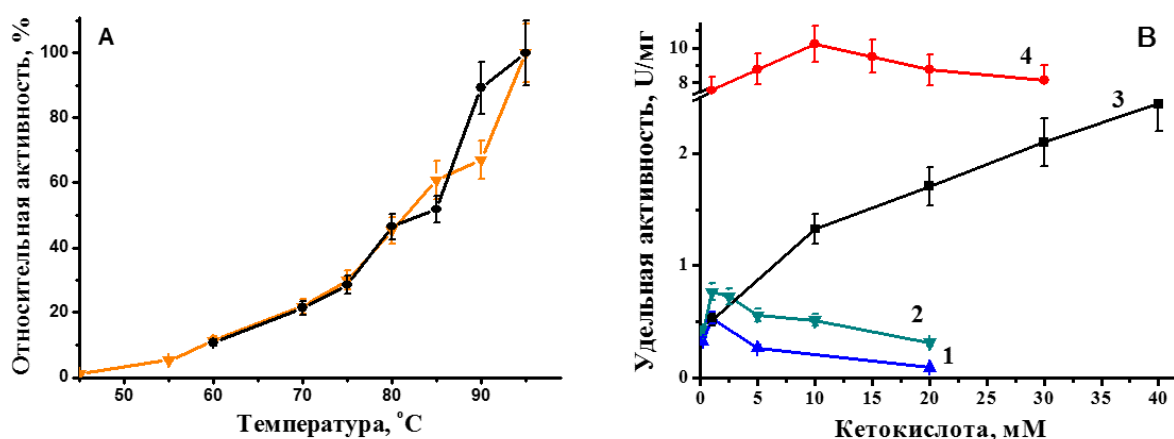


Рис. 3.27. Характеристика TUZN1299 и VMUT0738. А. Температурная зависимость активности TUZN1299 в реакции между L-аланином и 4-метил-2-оксвалератом в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8.0 (100% -  $1.1 \pm 0.1$  U/мг) и VMUT0738 в реакции между L-аланином и 4-метил-2-оксвалератом, pH 8.0 (100% -  $2.5 \pm 0.3$  U/мг) В. Ингибирование кетосубстратами активности TUZN1299 (1) 3-метил-2-оксвалерат; (2) 4-метил-2-оксвалерат; (3) пируват; (4) 2-оксобутират.

Кетоаналоги разветвленных аминокислот, то есть продукты реакции между ВСАА и пируватом (Схема V) эффективно ингибируют активность TUZN1299 (Рис. 3.27). Ингибирование продуктами реакции является общей проблемой трансаминаз и сдерживает их применение в синтезе аминокислот и кетокислот. Для TUZN1299 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. На примере TUZN1299 впервые показана активность ВСАТ с первичными аминами.

Таблица 3.15. Кинетические параметры реакции трансминирования, катализируемой охарактеризованными трансаминазами из *T. uzoniensis* (TUZN1299), *V. moutnovskia* (VMUT0738), *G. acetivorans* (GEO1900) и *T. terrenum* (TaTT) и *Haliangium ochraceum* (HO3033).

Трансаминазы	$V_m$ , У/мг	$k_{cat}$ , с <sup>-1</sup>	$K_m$ , мМ	$k_{cat}/K_m$ , с <sup>-1</sup> М <sup>-1</sup>
<b>TUZN1299</b>	L-Leu + пируват ↔ 4-метил-2-оксвалерат + L-Ala (65 °С, рН 8.0) L-Ala + 2-оксобутират ↔ пируват + 2-аминобутират			
L-лейцин	2.38 ± 0.07	1.31 ± 0.04	0.21 ± 0.08	6200 ± 2600
пируват	3.2 ± 0.2	1.78 ± 0.12	16.0 ± 3.0	111 ± 28
4-метил-2-оксвалерат	5.5 ± 0.5	3.0 ± 0.3	0.15 ± 0.06	20000 ± 10000
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-аминобутират	13.1 ± 1.3	7.2 ± 0.7	0.48 ± 0.11	15000 ± 4900
<b>VMUT0738</b>	AD + пируват ↔ AA + L-Ala (65 °С, рН 8.0)			
L-валин	3.4 ± 0.1	2.1 ± 0.1	1.17 ± 0.06	1790 ± 180
L-норвалин	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
<b>GEO1900</b>	L-Leu + AA ↔ 4-метил-2-оксвалерат + AD (65 °С, рН 8.0)			
пируват	1.9 ± 0.1	1.01 ± 0.05	18.2 ± 1.2	100 ± 7
α-кетоглутарат	10.6 ± 1.9	5.76 ± 0.11	1.9 ± 0.6	9800 ± 1020
<b>HO3033</b>	R-PEA + 3-метил-2-оксвалерат ↔ ацетофенон + L-Ile (40°С, рН 10.0)			
R-PEA	0.37 ± 0.02	0.22 ± 0.01	6.0 ± 0.6	36 ± 5
R-PEA (рН 9.0)	0.32 ± 0.02	0.19 ± 0.01	12.0 ± 0.6	16 ± 3
3-метил-2-оксвалерат	0.25 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.55 ± 0.07	270 ± 50
<b>TaTT</b>	AD + α-кетоглутарат ↔ AA + L-Glu (50°С, рН 8.0)			
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
	L-Glu + 4-метил-2-оксвалерат ↔ α-кетоглутарат + L-Leu (50°С, рН 8.0)			
4-метил-2-оксвалерат	34.5 ± 3.6	21 ± 2	15.1 ± 4.4	1400 ± 400

\* концентрационные зависимости обработаны уравнением Хилла

\*\* Условия: 50 °С, рН 9.0

Как и большинство ферментов из архей, TUZN1299 термостабильна и способна катализировать реакцию при температурах выше 90 °С, так, оптимальная температура реакции между L-аланином и 4-метил-2-оксвалератом в водных растворах не достигнута и превышает 95 °С. Термостабильность TUZN1299 оценивали по остаточной активности при инкубации при 70 °С, снижение активности на 35-40%% было зафиксировано только после 24 ч. инкубации.

По результатам гель-фильтрации фермент в растворе представляет собой димер с молекулярным весом 60 кДа, то есть наименьшая функциональная форма в растворе соответствует димеру (расчетный MW субъединицы 32.8 кДа). PLP прочно удерживается в активном центре, спектр фермента в 25 мМ фосфатном буфере, рН 8.0, имеет максимум абсорбции при 420 нм, что соответствует ковалентной связи с ε-аминогруппой каталитического лизина.

Отдельного внимания заслуживает анализ кинетических параметров полуреакции трансаминирования. Анализ полуреакций дает возможность охарактеризовать сродства (специфичность взаимодействия) трансаминазы к субстрату в отсутствии ингибирования вторым субстратом и вторым продуктом. Полуреакции еще называют предстационарной фазой реакции трансаминирования, однако, по-видимому, это не совсем корректно хотя бы потому, что фермент за один оборот проходит две таких полуреакции [281,383] (Схема VI).

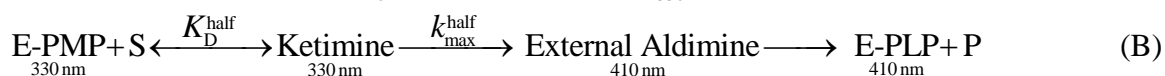
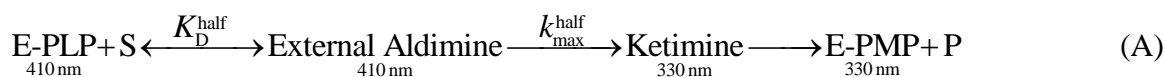


Схема VI. Схема первой и второй полуреакций трансаминирования

Полуреакция обратима, поэтому глубина превращения редко достигает 100%. Полный полуоборот фермента реализуется в условиях диссоциации РМР молекулы кофактора из холоформы трансаминазы, когда обратная полуреакция невозможна. Формально полуреакция представляет собой реакцию первого порядка, а зависимость наблюдаемой константы скорости первого порядка от концентрации – кривую с насыщением, которая описывается уравнением 1 (см. М&М 2.2.10.6) и характеризуется параметрами  $k_{\text{max}}^{\text{half}}$  и  $K_D^{\text{half}}$  (уравнение 2, см. М&М 2.2.10.6). Максимальная константа скорости ( $k_{\text{max}}^{\text{half}}$ ) характеризует лимитирующую стадию

полуреакции, к которой ряд исследователей относит стадию 1,3-переноса протона [161,163,165]. Однако, есть данные, что лимитировать скорость полуреакции может и гидролиз кетимина и диссоциация продукта- кетокислоты (Рис. 1.2) [172–175]. Однако спектральные изменения – переход 410 нм → 330 нм происходит именно на стадии переноса протона, последующие стадии происходят без спектральных переходов, поэтому сделать вывод о характере лимитирующей стадии без дополнительных исследований не представляется возможным. В рамках представленной работы отдельного исследования по этому вопросу не проводилось.

Таблица 3.16. Кинетические параметры полуреакции PLP-формы TUZN1299 в 50 мМ фосфатном буфере, рН 8.0, содержащем 100 мМ NaCl, при 25 °С.

Субстрат	$k_{\max}^{\text{half}}$ (с <sup>-1</sup> )	$K_D^{\text{half}}$ (мМ)	$k_{\max}^{\text{half}}/K_D^{\text{half}}$ , (с <sup>-1</sup> мМ <sup>-1</sup> )
L-лейцин	21.1 ± 2.4	0.12 ± 0.05	176 ± 93
L-валин	5.9 ± 0.3	0.17 ± 0.03	34.7 ± 9.6
L-метионин	5.3 ± 0.4	0.55 ± 0.1	9.6 ± 2.5
2-аминобутановая кислота	3.3 ± 0.7	2.4 ± 1.0	1.4 ± 0.8
L-аланин	0.36 ± 0.03	85 ± 18	0.004 ± 0.001
L-орнитин	0.061 ± 0.003	29 ± 2	0.002 ± 0.00025
L-орнитин (65 °С)	0.077 ± 0.005	0.35 ± 0.06	0.22 ± 0.05
L-треонин	0.055 ± 0.002	5.3 ± 0.5	0.010 ± 0.001
L-глутамин	0.076 ± 0.003	9.0 ± 0.7	0.008 ± 0.001
L-глутамат (*)	-	-	0.00013 ± 0.00001
4-метил-2-оксовалерат	256 ± 7	0.23 ± 0.01	1113 ± 80
2-оксобутират	1.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	2.6 ± 1.0
пируват	0.13 ± 0.01	6.3 ± 1.4	0.020 ± 0.006
α-кетоглутарат (*)	-	-	0.00051 ± 0.00004
α-кетоглутарат (65 °С)(*)	-	-	0.004 ± 0.0005

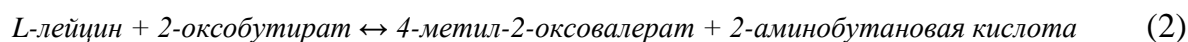
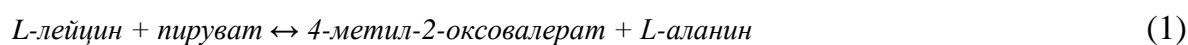
\*Зависимость константы скорости полуреакции от концентрации субстрата не достигла насыщения.

В Таблице 3.16 приведены параметры полуреакций с некоторыми аминокислотами и кетосубстратами для охарактеризованных ТА. Можно увидеть, что для TUZN1299 перенос аминокислотной группы от E-PMР формы на 4-метил-2-оксовалерат является наиболее эффективным процессом. Другими специфическими субстратами TUZN1299 оказались ВСАА L-лейцин и L-валин. Стоит отметить наблюдаемые температурные эффекты: рост температуры полуреакции с 25 °С до 65 °С приводит к улучшению связывания L-орнитина в 100 раз. При этом значение  $k_{\max}^{\text{half}}$  не меняется. Если рассматривать 1,3-перенос протона как лимитирующую стадию полуреакции, то инвариантность  $k_{\max}^{\text{half}}$  при разных температурах объясняется зависимостью эффективности 1,3-переноса протона от кислотности Cα-атома

аминокислоты. Ранее было показано, что C $\alpha$ -кислоты остаются слабыми даже в ковалентном соединении с кофактором PLP и рост температуры приводит лишь к незначительному усилению их кислотности, поэтому рост температуры незначительно влияет на 1,3-перенос протона. Увеличение в 100 раз константы  $\frac{k_{\max}^{\text{half}}}{K_D^{\text{half}}}$  для L-орнитина и  $\alpha$ -кетоглутарата отражает повышение специфичности TUZN1299 к обоим субстратам с ростом температуры. Этот эффект хорошо объясняется структурной оптимизацией TUZN1299 для работы при высоких температурах (Топт > 90°C), то есть оптимальную активную конформацию фермент принимает при высоких температурах. Как и следовало ожидать, L-глутаминовая кислота и  $\alpha$ -кетоглутарат не являются специфическими субстратами для TUZN1299: концентрационные зависимости не описываются кривыми с насыщением, то есть, по-видимому, комплексообразование является лимитирующей стадией процесса или комплекс Михаэлиса не образуется совсем.

### 3.3.2. Анализ равновесия реакции трансаминирования, катализируемой трансаминазой TUZN1299

Как равновесный процесс, трансаминирование характеризуется константой равновесия. Диапазон наблюдаемых констант равновесия для реакций трансаминирования составляет 0.016-100 [384,385], а для некоторых реакций, например, для катализируемого аланинглиоксилат трансаминазой человека переноса аминогруппы между глиоксилатом и L-аланином константа равновесия достигает 9700 [281]. В ходе исследования свойств TUZN1299 был проведен сравнительный анализ глубины превращения субстратов в реакциях трансаминирования между L-лейцином и пируватом (1) и между L-лейцином и 2-оксобутиратом (2) при 65 °C и проведена оценка влияния свойств кетосубстрата и специфичности TUZN1299 к кетосубстратам на равновесие реакции трансаминирования.



Глубину превращения и константы равновесия обеих реакций рассчитывали по значениям концентраций кетосоединений, определенных хроматографически на



колонке Source 30S (Cytiva), уравновешенной 5 мМ  $\text{H}_2\text{SO}_4$  с добавлением 5% ацетонитрила. Как следует из Таблицы 3.15, при 65 °С TUZN1299 наиболее специфична к 4-метил-2-оксовалерату. При этом 4-метил-2-оксовалерат значительно ингибирует активность TUZN1299 (Рис. 3.27). По-видимому, по этой причине  $k_{cat}$  реакций деаминарования L-лейцина и аминирования 4-метил-2-оксовалерата ниже  $k_{cat}$  реакций деаминарования 2-аминобутановой кислоты и аминирования 2-оксобутирата, который не ингибирует активность TUZN1299 (Рис. 3.27). Очевидно также, что L-аланин и пируват не являются специфическими субстратами для TUZN1299.

Чтобы наиболее адекватно оценить константу равновесия реакции, целесообразно анализировать систему, которая достигает равновесного состояния с противоположных направлений, то есть систему, которая изначально содержит как субстраты, так и продукты. Однако, поскольку 4-метил-2-оксовалерат ингибирует фермент при концентрациях выше 1 мМ, был применен другой подход: реакцию инициировали в системах, которые содержали только субстраты (L-лейцин и 2-оксобутират и L-лейцин и пируват) в концентрациях 10 мМ, установление равновесия контролировали по уменьшению концентрации 2-оксобутирата или пирувата и по накоплению 4-метил-2-оксовалерата (Рис. 3.28). Начальные скорости реакций (1) и (2) составили 1.2 У/мг и 4.5 У/мг, соответственно. Равновесие в реакциях было достигнуто через 4 ч. и 2 ч., соответственно. Добавление свежей аликвоты фермента в равновесную смесь через 5 ч. не привело к изменению достигнутых концентраций компонентов. Концентрации пирувата, 2-оксобутирата и 4-метил-2-оксовалерата были скорректированы с учетом термического разрушения, которое не превысило 5% по истечении 5 ч. L-лейцин, L-аланин и 2-аминобутановая кислота были стабильны при 65 °С. Значения константы равновесия реакций (1) и (2) составили 0,08 и 1,66, соответственно. Степень превращения L-лейцина в реакции с пируватом составила около 20%, а в реакции с 2-оксобутиратом превысила 50%. Равновесная концентрация 4-метил-2-оксовалерата достигла 2,1 мМ и 5,63 мМ, соответственно. Важно отметить, что в обеих реакциях равновесная концентрация 4-метил-2-оксовалерата превысила порог ингибирования (Рис. 3.28).

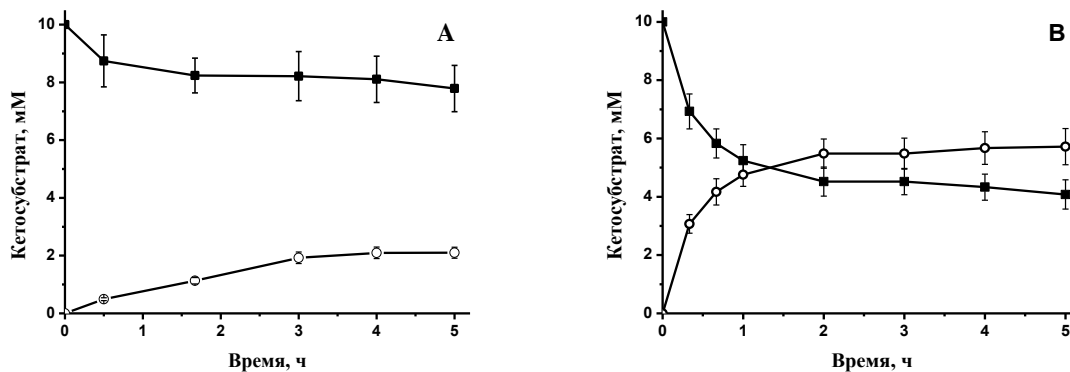


Рис. 3.28. Установление равновесия в реакции трансаминирования, катализируемой TUZN1299 в 50 мМ Na-фосфатном буфере, рН 8.0, при 65 °С. (А) 1.2 мкМ TUZN1299, 10 мМ L-лейцина, 10 мМ пирувата; (■) - убыль пирувата, (○) - накоплению 4-метил-2-оксовалерата. (В) 1.2 мкМ TUZN1299, 10 мМ L-лейцина, 10 мМ 2-оксобутирата; (■) - убыль 2-оксобутирата, (○) - накопление 4-метил-2-оксовалерата.

Очевидно, что глубина превращения L-лейцина выше в реакции со специфическим субстратом 2-оксобутиратом, чем в реакции с неспецифическим пируватом. При этом в обеих системах накопление 4-метил-2-оксовалерата неизбежно приводит к снижению скорости прямой реакции. В то же время, реакция (2) останавливается при более высокой концентрации 4-метил-2-оксовалерата. Другими словами, в реакции со специфическим 2-оксобутиратом ингибирующий эффект продукта 4-метил-2-оксовалерата ниже и глубина аминирования 2-оксобутирата выше, чем аналогичные характеристики в реакции с пируватом. Учитывая имеющиеся кинетические параметры (Таблица 3.15), можно утверждать, что отношение  $[S]/K_m > 1$  является исходным условием для 2-оксобутирата и быстро достигается для 4-метил-2-оксовалерата в реакции (2). Тогда  $k_{cat}$  становится параметром, который характеризует специфичность TUZN1299 к субстрату в этой системе [10]. Тогда 2-оксобутират в насыщающей концентрации оказывается “специфичнее” 4-метил-2-оксовалерата. Достигнутое преимущество 2-оксобутирата, по-видимому, приводит к сдвигу равновесия в сторону продуктов в реакции (2). Специфичности TUZN1299 к пирувату оказывается недостаточно для достижения сходной глубины превращения в реакции (1).

Таким образом, эффективность аминирования кетосубстрата в реакциях (1) и (2) и степень ингибирования TUZN1299 продуктом – 4-метил-2-оксовалератом – зависят от природы второго субстрата – кетокислоты. Специфичный кетосубстрат,

который не ингибирует TUZN1299, сдвигает равновесие в сторону продуктов реакции. Для эффективного аминирования кетосоединений с применением TUZN1299, рекомендуется учитывать свойства образующегося кетопродукта и подбирать аминсубстрат так, чтобы *k<sub>cat</sub>* аминирования кетосубстрата в прямой реакции оказывался выше *k<sub>cat</sub>* аминирования кетопродукта в обратной реакции при насыщающих концентрациях обоих кетосоединений.

### 3.3.3. Структура трансаминазы TUZN1299

Структура TUZN1299 (PDB код 5CE8) получена с разрешением 2.0 Å и представлена на Рис. 3.29-3.30. Это первая структура архейной BCAT, до этого известны были только бактериальные и эукариотические BCAT. Как и в известных канонических бактериальных BCAT (PDB коды 1IYD, 3DTF, 3HT5, 3U0G, 4DQN, 3UYY, 1WRV и т.д.), в субъединице TUZN1299 можно выделить большой и малый домены; два активных центра в димере симметричны и образованы остатками обеих субъединиц.

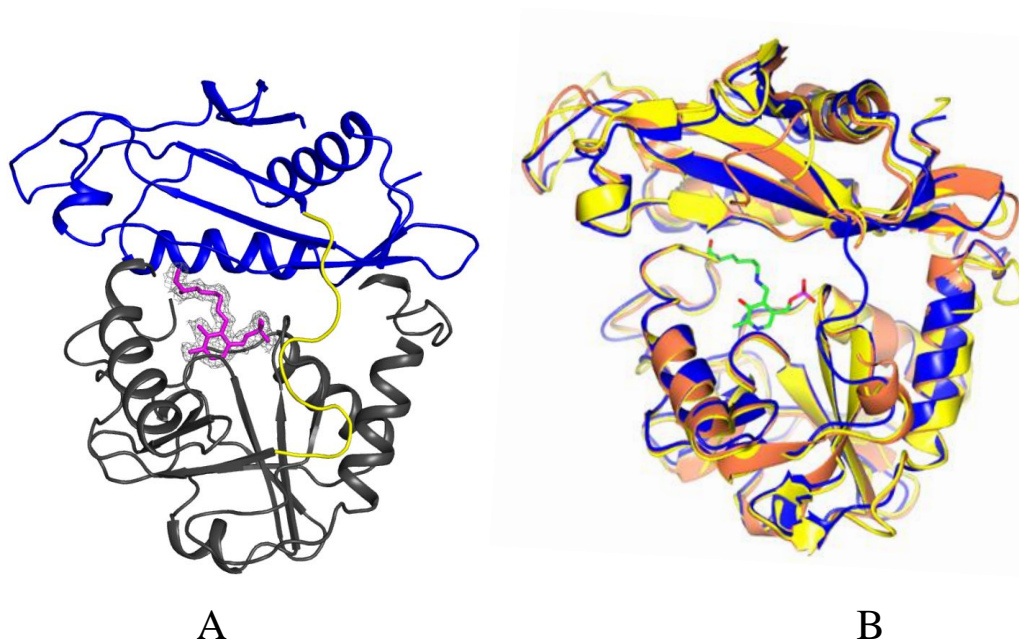


Рис. 3.29. (А) Структура субъединицы TUZN1299. Малый домен окрашен в синий цвет, большой домен в тёмно-серый, междоменная петля – в желтый. Ковалентно связанная молекула PLP окрашена в лиловый цвет. Разностная карта электронной плотности для PLP показана с уровнем срезки 1σ. (В) Наложение субъединиц TUZN1299 (синий), BCAT из *Burkholderia pseudomallei* (оранжевый, PDB код 3U0G) и BCAT из *E. coli* (желтый, PDB код 1HK).

О-петля и междоменная петли хорошо видны на картах электронной плотности и формируют вход в активный центр TUZN1299. Значение RMSD с некоторыми трансаминазами IV типа PLP укладки (Таблица 3.17) указывает на гомологию структур, что вообще свойственно трансаминазам внутри одного типа PLP укладки.

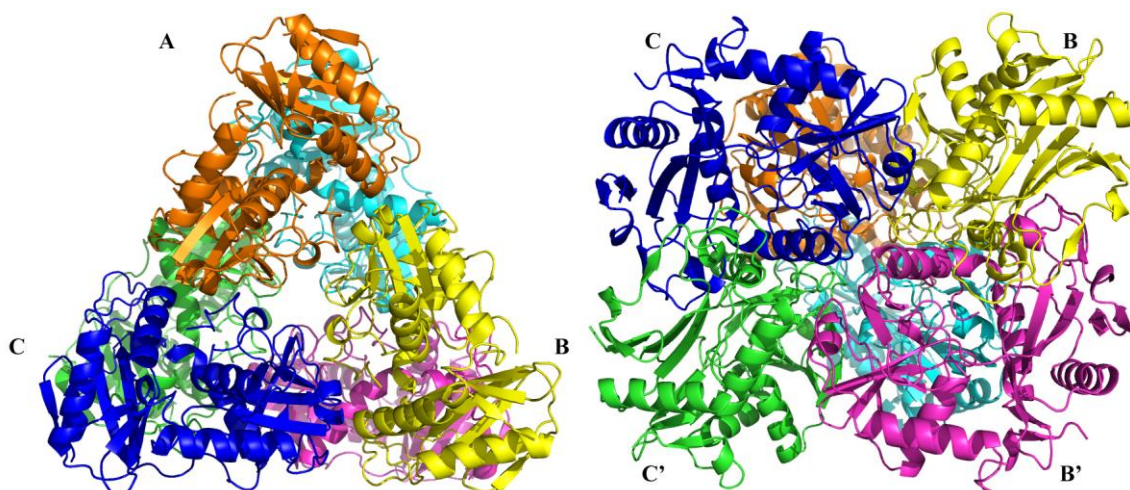


Рис. 3.30. Гексамер TUZN1299 в кристалле в двух проекциях. Гексамер окрашен по субъединицам. Субъединицы отмечены буквами.

Таблица 3.17. Структурная гомология TUZN1299 и трансаминаз IV типа PLP укладки.

ТА (PDB код)	Доля выровненных остатков, %	RMSD, Å	Идентичность по последовательности, %
1 BCAT из <i>Thermus thermophiles</i> (2EJ3)	97	1.11	44
2 BCAT из <i>E. coli</i> (111K)	96	1.11	43
3 BCAT из <i>Geoglobus acetivorans</i> (5E25)	96	1.17	43
4 BCAT из <i>Burkholderia pseudomallei</i> (3U0G)	96	1.07	49
5 R-TA из <i>Aspergillus fumigatus</i> (4CHI)	84	1.55	26
6 DAAT из <i>Bacillus</i> sp. YM-1 (1DAA)	94	1.36	29
7 R-TA из <i>Arthrobacter</i> sp. KNK168 (3WWH)	85	1.58	29

В активном центре TUZN1299 кофактор PLP ковалентно связан с каталитическим остатком лизина (Lys150), то есть в процессе кристаллизации не происходит полуреакции и перехода кофактора из PLP в PMP форму, что указывает на отсутствие восстанавливающих групп рядом с лизином. Связывание кофактора в

TUZN1299 консервативно и повторяет координацию кофактора в известных ТА IV типа PLP укладки: связывание фосфатной группы, координация фенильной группы PLP и водородная связь N1 атома пиридинового кольца кофактора с остатком Glu (Рис. 3.31).

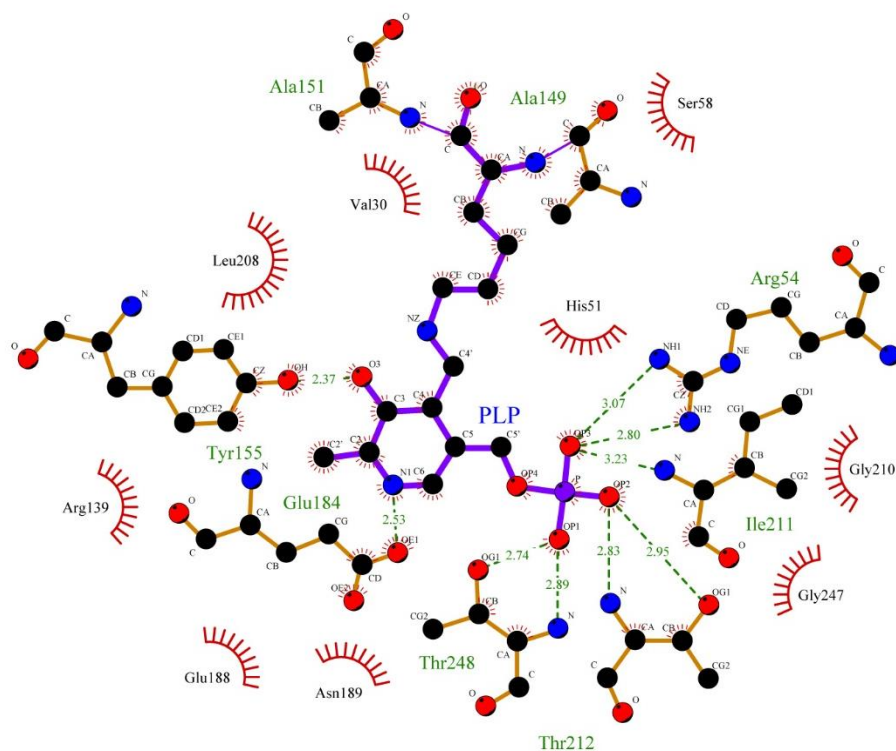


Рис. 3.31. Координация кофактора PLP в активном центре TUZN1299. Рисунок составлен в программе LigPlot.

В активном центре TUZN1299 хорошо просматриваются два кармана: со стороны фосфатной группы PLP – Р-карман, и со стороны фенильной группы PLP – О-карман (Рис. 3.29, Рис. 3.31). Такое условное деление на карманы традиционно для ТА как I типа, так и IV типа PLP-укладки. Это деление также хорошо просматривается для ВСАТ из архей. Аминокислотный состав вторичных элементов активного центра и карманов TUZN1299 представлена в Таблице 1.1. В комплексе с субстратом L-норвалином (Рис. 3.32) боковая гидрофобная группа занимает О-карман, а  $\alpha$ -карбоксильная группа занимает Р-карман, оба атома кислорода  $\alpha$ -COOH группы располагаются на расстоянии водородной связи от первого и второго сайтов связывания. Из Рис. 3.32 следует, что положение остатков активного центра незначительно меняется в присутствии субстрата. Например, остаток Arg35 в

TUZN1299 уже на своем месте и образует водородные связи с  $\beta$ -поворотом  $^{247}\text{GTA}^{250}$  и в холоформе TUZN1299. Традиционно принято считать, что подвижными среди каталитически значимых в ВСАТ являются два остатка: боковая группа тирозина (Tyr155), образующая в холоформе короткую водородную связь с фенильной группой кофактора и остаток аргинина (Arg35), формирующий сайт связывания  $\alpha$ -COOH группы субстрата в Р-кармане. Как и однозначное положение междоменной петли, однозначное положение остатка Arg35 в Р-кармане есть, по-видимому, показатель жесткости структуры архейной трансминазы, что в целом наблюдается для термостабильных ферментов из архей. Стоит отметить, что междоменная петля расположена одинаково в холоформе и в комплексе, то есть нет смещения петли при связывании субстрата. Это несколько не соответствует устоявшемуся механизму катализа, когда, как предполагается, междоменная петля закрывает субстрат от растворителя в комплексе, тогда как в холоформе активный центр находится в открытой конформации, при которой междоменная петля разупорядочена или локализована в стороне от активного центра. Очевидно, что структура архейной TUZN1299 «жесткая» и движение петли скорее всего будет происходить только при высоких температурах.

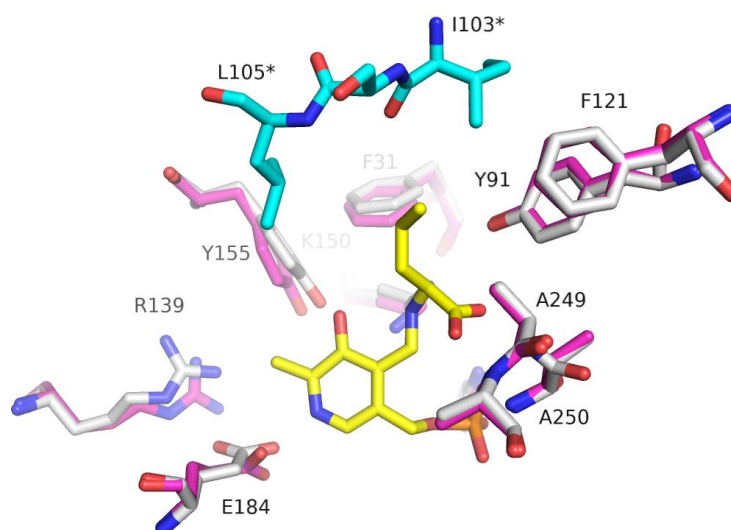


Рис. 3.32. Совмещение активного центра комплекса TUNZ1299 с L-норвалином (серый, PDB код 6THQ) и активного центра холоформы фермента (розовый, PDB код 5CE8). Молекула L-норвалина, ковалентно связанная с кофактором, показана желтым. Остатки второй субъединицы димера, участвующие в образовании активного центра, показаны голубым. Остатки активного центра окрашены по типу атомов. \* обозначает остатки из соседней субъединицы активного димера.

В структуре TUZN1299 кроме фиксированного положения обычно подвижных фрагментов активного центра трансаминаз имеются следующие отличия: (1) в O-кармане в аминокислотном составе O-петли есть изменения – нарушение канонического мотива (<sup>99</sup>SKPQISLDVRGLQ<sup>111</sup>). В результате замены канонического Gly108 (*e*BCAT) на Ser104 (TUZN1299) (Таблица 1.1) образуются несколько водородных связей атомов Ser104\* с атомами остатков Gln102\* и Asp106\*, новые водородные связи фиксируют изгиб петли и отличные от канонических положения остатков Ile103\*, Ser104\* и Leu105\* (\* обозначает остатки из соседней субъединицы активного димера) (Рис. 3.33).

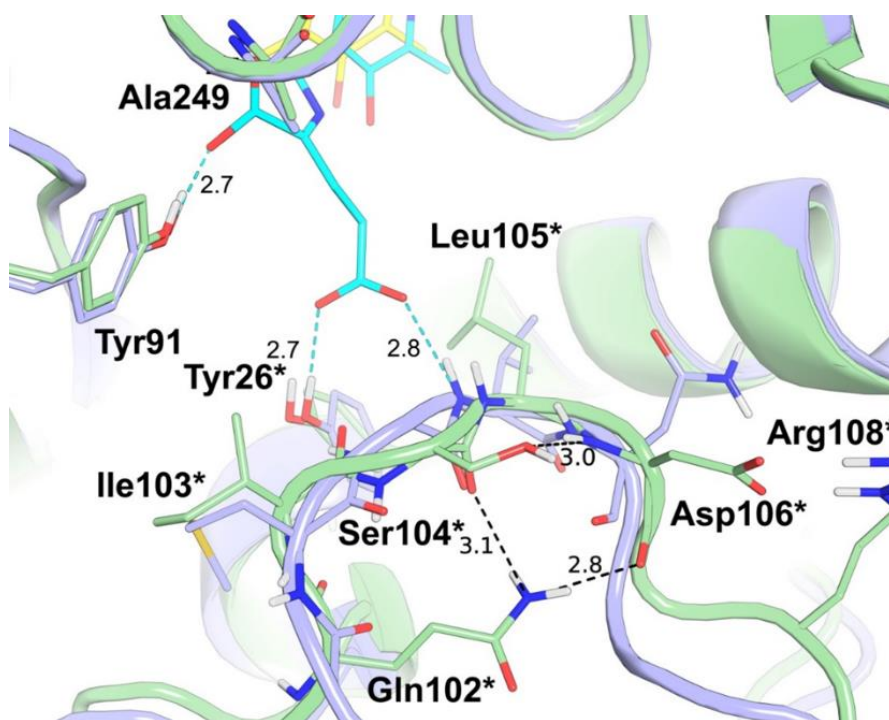


Рис. 3.33. Наложение областей активного центра BCAT из *E. coli* (синий, PDB код 1IYE) и TUZN1299 (PDB код 5CE8), нумерация TUZN1299. Остатки, помеченные (\*), относятся к соседней субъединице функционального димера, субстрат L-глутамат, ковалентно связанный с кофактором PLP в структуре 1IYE показан голубым. Пунктирные линии голубого цвета соответствуют взаимодействиям L-глутамата с остатками в 1IYE, черным пунктиром отмечены водородные связи в TUZN1299; расстояния между взаимодействующими атомами приведены в ангстремах (Å).

Например, остаток Leu105\* вместо канонической ориентации amino группой в полость активного центр, обращен в полость своей гидрофобной группой. Карбонильная группа Ile103\* в смещенном положении взаимодействует с гидроксильной группой Tyr26\* и образует водородную связь. В результате перераспределения водородных связей разрушается сайт связывания  $\gamma$ -

карбоксильной группы в О-кармане TUZN1299 и, как результат, нарушается продуктивное связывание  $\alpha$ -кетоглутарата в активном центре TUZN1299. В целом О-петля не является консервативной по аминокислотной композиции у ВСАТ, хотя в семействе трансаминаз IV типа PLP укладки О-петля рассматривается как элемент структуры, определяющий специфичность трансаминаз и ее фрагмент  $^{107}[LMVI]G[VL]^{109}$  (нумерация eBCAT) входит в характеристический мотив ВСАТ (Таблица 1.1).

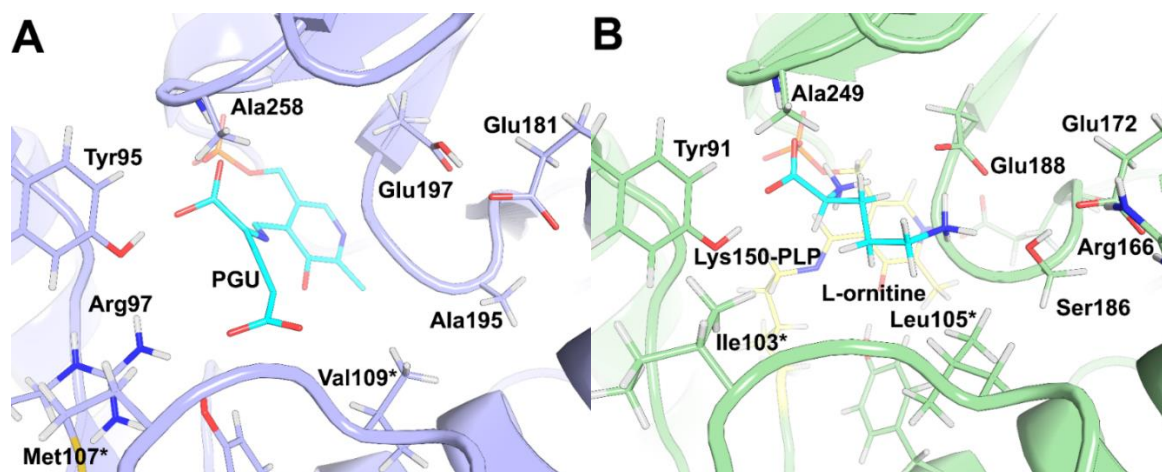


Рис. 3.34. (А) Активный центр ВСАТ из *E. coli* (PDB код 1IYE). Субстрат L-глутамат, ковалентно связанный с кофактором PLP в структуре, показан голубым (PGU). Остатки Glu181 и Glu197 (один из них в протонированном состоянии) и образуют карбоксилат-карбоксилатную пару. (В) Активный центр TUZN1299 кофактор PLP ковалентно связан с боковой группой каталитического остатка Lys150, показан желтым. Остатки Glu188 и Glu172 не образуют карбоксилат-карбоксилатную пару. Положение субстрата L-орнитина, предсказанное методами ММ, показано голубым. Остатки, помеченные (\*), относятся к соседней субъединице функционального димера.

Другая особенность TUZN1299 – мотив  $\beta$ -поворота II  $^{185}GSGE^{188}$  (GAGE в eBCAT, Таблица 1.1, Рис. 1.5) (Рис. 3.34). Этот мотив расположен между О- и Р-карманами и, по-видимому, регулирует вход в активный центр. В TUZN1299 в этом мотиве остаток Ala заменен на остаток Ser186. Наличие Ser186 приводит к формированию центра связывания положительно заряженных боковых групп (L-орнитина и L-аргинина) по следующим образом: в канонической eBCAT, имеющей мотив  $^{194}GAGE^{197}$ , карбоксильная группа Glu197 в структуре расположена на расстоянии 2.5-2.9 Å от карбоксильной группы Glu181 и остатки глутамата образуют карбоксилат-карбоксилатную пару, что приводит к росту рKa и протонированному состоянию одной из карбоксильных групп при нейтральных pH. В TUZN1299



наличие остатка серина рядом с Glu188 препятствует образованию карбоксилат-карбоксилатной пары Glu188-Glu172 вследствие чего в О-кармане появляется нескомпенсированный отрицательный заряд. Появление в О-кармане отрицательного заряда, по-видимому, обеспечивает продуктивное связывание аминокислот с положительно заряженной боковой группой.

В итоге следует отметить, что архейная супертермостабильная трансаминаза TUZN1299 отличается от гомологичных канонических бактериальных ВСАТ широкой субстратной специфичностью и наиболее эффективна в аминировании кетоаналогов ВСАА. Активность с положительно заряженными L-аминокислотами и небольшая активность с R-PEA впервые показаны для ВСАТ на примере TUZN1299. Возможно, ранее сформулированное для PLP-зависимых трансаминаз I типа укладки обобщение, что специфичность к S-аминам есть дополнительная активность к основной активности [157], актуально и для трансаминаз IV типа PLP укладки, но уже в отношении специфичности к R-первичным аминам.

#### **3.3.4. Свойства трансаминазы из *V. moutnovskia* (VMUT0738)**

Термостабильная трансаминаза из археи *V. moutnovskia* (VMUT0738) по характеристическим мотивам (Таблица 1.1), множественному выравниванию и спектру субстратов (Таблицы 3.13-3.15) – ВСАТ с широкой субстратной специфичностью. Препараты VMUT0738 не кристаллизовались, поэтому структура фермента не была получена. Идентичность последовательностей VMUT0738 и TUZN1299 составляет 54%. По результатам гель фильтрации VMUT0738 в растворе тетрамер с молекулярным весом 145 кДа, то есть функциональная форма в буфере соответствует тетрамеру (MW субъединицы 36.8 кДа). VMUT0738 как и TUZN1299 – «медленная» трансаминаза, оптимальные условия реакции составляют pH 8.0 и температура реакции *L-лейцин* + *пируват* достигает 95 °C и выше. По термостабильности VMUT0738 не уступает TUZN1299: после 24 ч. инкубации при 70 °C активность фермента снизилась только на 30%. VMUT0738 не активна с  $\alpha$ -кетоглутаратом и L-глутаминовой кислотой и характеризуется активностью с положительно заряженными аминокислотами L-орнитином, L-лизином и L-аргинином (Таблица 3.13). Кетосубстраты ингибируют активность VMUT0738:

10 мМ 4-метил-2-оксвалерата, 3-метил-2-оксвалерата и индол-3-пирувата снижают активность на 20-25%%, при этом 10 мМ 2-оксобутирата и пирувата не ингибируют активность. Анализ кинетических параметров полной реакции трансаминирования показал, что специфичность VMUT0738 к L-орнитину значительно ниже, чем к гидрофобным L-валину и L-норвалину (Таблица 3.15). VMUT0738 как и TUZN1299 при широкой специфичности характеризуется стереоселективностью: трансаминаза не активна с D-аминокислотами, продуктами аминирования кетокислот являются L-аминокислоты (Приложение 1).

Общие черты TUZN1299 и VMUT0738: широкая субстратная специфичность и неактивность с  $\alpha$ -кетоглутаратом, их можно объяснить близкородственностью организмов-хозяинов: виды *Vulcanisaeta*, *Pyrobaculum* и *Thermoproteus* объединяются в семейство *Thermoproteaceae*. Выравнивание фрагментов последовательностей, кодирующих О-петлю, междоменную петлю и  $\beta$ -поворот II показывает общие мотивы и отличия в этих структурных элементах у близкородственных архейных BCAT.

1. VMUT0738 from <i>V. mutnovskia</i>	<sup>116</sup> ASTVNLDIRNL <sup>126</sup>	<sup>136</sup> PFGHYLEPK <sup>144</sup>	<sup>201</sup> GSGE <sup>204</sup>
2. TA from <i>Vulcanisaeta distributa</i>	<sup>128</sup> ASTVNLDIRDL <sup>138</sup>	<sup>148</sup> PFGHYLEPK <sup>156</sup>	<sup>213</sup> GSGE <sup>216</sup>
3. TA from <i>Vulcanisaeta souniana</i>	<sup>103</sup> ASTVNLDIRNL <sup>113</sup>	<sup>123</sup> PFGHYLEPK <sup>131</sup>	<sup>188</sup> GSGE <sup>191</sup>
4. TA from <i>Vulcanisaeta sp. AZ3</i>	<sup>103</sup> ANTINLDIRDL <sup>113</sup>	<sup>123</sup> PFGHYLEPR <sup>131</sup>	<sup>188</sup> GSGE <sup>191</sup>
5. TA from <i>Pyrobaculum ferrireducens</i>	<sup>102</sup> TETVTLDIRSL <sup>112</sup>	<sup>125</sup> PFGKYLSPK <sup>133</sup>	<sup>190</sup> GSGE <sup>193</sup>
6. TA from <i>Pyrobaculum arsenaticum</i>	<sup>102</sup> TPTVTLDIRDL <sup>112</sup>	<sup>125</sup> PFGKYLPPG <sup>133</sup>	<sup>190</sup> GSGE <sup>193</sup>
7. TA from <i>Pyrobaculum sp. JCHS_4</i>	<sup>105</sup> TPTVTLDVRTL <sup>115</sup>	<sup>124</sup> PFGKYLPP <sup>132</sup>	<sup>190</sup> GSGE <sup>193</sup>
8. TUZN1299 from <i>T. uzoniensis</i>	<sup>100</sup> KPQISLDVRGL <sup>110</sup>	<sup>120</sup> PFGKYLKVE <sup>128</sup>	<sup>185</sup> GSGE <sup>188</sup>
10. AT from <i>Thermoproteus tenax</i>	<sup>100</sup> KPQIGLDVRGV <sup>110</sup>	<sup>120</sup> PFGKYLKAE <sup>128</sup>	<sup>185</sup> GSGE <sup>188</sup>
11. AT from <i>Thermoproteus sp. AZ2</i>	<sup>100</sup> KPQIGLDVRGI <sup>110</sup>	<sup>120</sup> PFGKYLKPG <sup>128</sup>	<sup>185</sup> GSGE <sup>188</sup>
12. AT from <i>Thermoproteus sp. JCHS_4</i>	<sup>100</sup> RPQISLDVRGL <sup>110</sup>	<sup>120</sup> PFGKYLKVE <sup>128</sup>	<sup>185</sup> GSGE <sup>188</sup>

У перечисленных архейных BCAT в О-петле есть замена в мотиве [MLVI]G[LV] остатка Gly (Таблица 1.1), имеющегося у канонических бактериальных BCAT (Gly108 в eBCAT), на остаток Asn120 (VMUT0738) у BCAT из рода *Vulcanisaeta*, на остаток Thr у BCAT из рода *Pyrobaculum*, на остаток Ser104 (TUZN1299) у BCAT из рода *Thermoproteus*. Эти замены, по-видимому, определяют нарушение активности с  $\alpha$ -кетоглутаратом, а замены в мотиве  $\beta$ -поворота II <sup>194</sup>GAGE<sup>197</sup> (eBCAT) остатка Ala на остаток Ser определяют, по-видимому, активность с положительно заряженными аминокислотами у всех перечисленных близкородственных архейных BCAT.

### 3.3.5. Функциональная характеристика трансаминазы из *G. acetivorans* (GEO1900)

По результатам множественного выравнивания и составу характеристических мотивов в последовательности трансаминаза из *G. acetivorans* (GEO1900) – это BCAT. В отличие от архейных TUZN1299 и VMUT0738, GEO1900 активна преимущественно с ВСАА и их линейными аналогами, из ароматических аминокислот GEO1900 активна только с L-фенилаланином. Субстратная специфичность представлена в Таблицах 3.13-3.15. Подобно TUZN1299 и VMUT0738 GEO1900 проявляет незначительную, но достоверно детектируемую активность с R-PEA. В отличие от VMUT0738 и TUZN1299 трансаминаза GEO1900 активна с  $\alpha$ -кетоглутаратом (Рис. 3.35В), но неактивна с положительно заряженными L-аминокислотами в условиях стандартного эксперимента.

Очевидно, что у охарактеризованных архейных BCAT наблюдается взаимоисключающая специфичность к положительно и отрицательно заряженным L-аминокислотам. В структуре GEO1900 в последовательности O-петли воспроизводится мотив [MLIV]G[VL] ( $^{101}$ LGL $^{103}$ ), который нарушен у TUZN1299 и VMUT0738. Мотив  $^{101}$ LGL $^{103}$  в O-петле обеспечивает правильную координацию  $\alpha$ -кетоглутарата в активном центре GEO1900 как в eBCAT (Рис. 3.33).

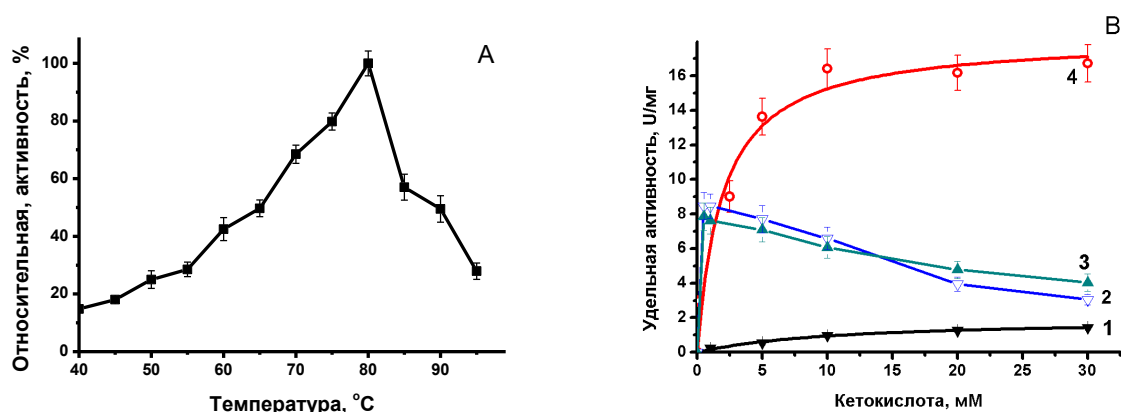


Рис. 3.35. Характеристика GEO1900. (А) Зависимость активности GEO1900 от температуры в полной реакции между L-лейцином и  $\alpha$ -кетоглутаратом. (В) Зависимость удельной активности GEO1900 от концентрации кетосубстратов (1) пирувата, (2) 3-метил-2-оксвалерата, (3) 4-метил-2-оксвалерата (4) и  $\alpha$ -кетоглутарата.

За продуктивное связывание положительно заряженных L-аминокислот, предположительно, отвечает особая аминокислотная композиция  $\beta$ -поворота II в О-кармане TUZN1299 и VMUT0738 (Рис. 3.34). И, хотя в последовательности GEO1900 фрагмент  $\beta$ -поворота II  $^{185}\text{GSGD}^{188}$  также содержит остаток Ser186, GEO1900 не активен с положительно заряженными субстратами, по-видимому, из-за отсутствия коррелирующей замены в мотиве О-петли.

Температурный оптимум и pH оптимум были определены для реакции трансаминирования между L-лейцином и  $\alpha$ -кетоглутаратом и составили 80 °C в 50 mM Na-фосфатном буфере и pH-оптимум 7.0 – 8.0 (при 65 °C) (Рис. 3.35А). Анализ термостабильности GEO1900 показал, что после двух часов инкубации при 70 °C активность снижается на 25%, после 8 часов инкубации – на 90%. При 50 °C GEO1900 сохранял исходный уровень активности после двух часов инкубации, после 8 ч. наблюдалось 70% активности от начального уровня. Таким образом, при температурах, близких к оптимальным фермент не стабилен, что согласуется с балансом стабильности и активности у ферментов из термофильных организмов.

### 3.3.6. Структура трансаминазы GEO1900

С кристаллов GEO1900 были собраны наборы дифракционных данных и получены структуры холоформы (PDB код 5CM0) и комплекса PLP-формы фермента с  $\alpha$ -кетоглутаратом (PDB код 5E25). В кристаллографической ячейке GEO1900 – гексамер, по данным гель фильтрации в растворе GEO1900 димер (70 кДа) с примесью тетрамера, то есть, по-видимому, как и остальные архейные BCAT GEO1900 склонна к олигомеризации.

Функциональный димер GEO1900 устроен сходным образом с другими BCAT. Субъединица состоит из двух  $\alpha/\beta$  доменов (малый и большой) и междоменной петли, междоменная петля  $^{119}\text{PWGKLYGDLYE}^{129}$  имеет разные положения в структуре холоформы и в комплексе. В гексамере GEO1900 дополнительно 14% поверхности субъединицы интегрированы в межсубъединичный контакт по сравнению с димером. Нужно отметить, что объединение димеров в гексамер у известных на сегодня TA IV типа укладки PLP-связывающего домена достигается сходным образом (RMSD C $\alpha$  сравнимы при

парном выравнивании), то есть структуры гексамеров ТА гомологичны. В растворе и TUZN1299 и GEO1900 димеры, что согласуется с утверждением, что функциональной единицей трансаминаз независимо от PLP укладки является димер [156,159,218].

Несомненной удачей оказалось получение структуры комплекса PLP-формы GEO1900 с  $\alpha$ -кетоглутаратом (только одна из субъединиц включает молекулу  $\alpha$ -кетоглутарата): этот комплекс – наглядная иллюстрация ингибирования кетосубстратом PLP-формы BCAT, хотя для GEO1900 не наблюдалось ингибирования  $\alpha$ -кетоглутаратом (Рис. 3.35В). Возможно, в условиях кристаллизации сродства GEO1900 к  $\alpha$ -кетоглутарату сильнее, чем в условиях стандартного эксперимента. Организация активного центра GEO1900 соответствует представленной на Рис. 1.5. В димере GEO1900 Р-карман образован остатками Gly36, Arg38 ( $\beta$ X-тяж), Tyr89 ( $\beta$ Y-тяж) и  $\beta$ -поворота I <sup>247</sup>GТАА<sup>250</sup>. Перечисленные остатки участвуют в связывании  $\alpha$ -COOH группы, это очевидно из анализа структуры комплекса с  $\alpha$ -кетоглутаратом (Рис. 3.36):  $\alpha$ -COOH группа  $\alpha$ -кетоглутарата связывается в Р-кармане GEO1900 типовым для BCAT образом. О-карман сформирован консервативными для BCAT остатками Arg91, Tyr29\*, Phe34, Trp120, and Tyr124 и неконсервативными Leu101\* and Leu103\* из О-петли. То есть окружение  $\gamma$ -карбоксильной группы в О-кармане гидрофобное, но остатки Arg91, Tyr29\* и Leu103\* (через молекулу воды H<sub>о</sub>h923), образуют водородные связи с  $\gamma$ -COOH группой субстрата (Рис. 3.36). Стоит отметить, что у GEO1900 есть нарушение консенсусного мотива междоменной петли BCAT [WFAV]G[AK]Y[LMF] (Таблица 1.1), и мотив этот представлен как WGKLY, то есть остатки Tyr и Leu поменялись местами (permutation), что приводит к расширению О-кармана, однако, принципиально не сказывается на улучшении связывании субстратов с большими заместителями (типа L-триптофана, L-фенилаланина и L-тирозина, см Таблица 3.13, 3.14).

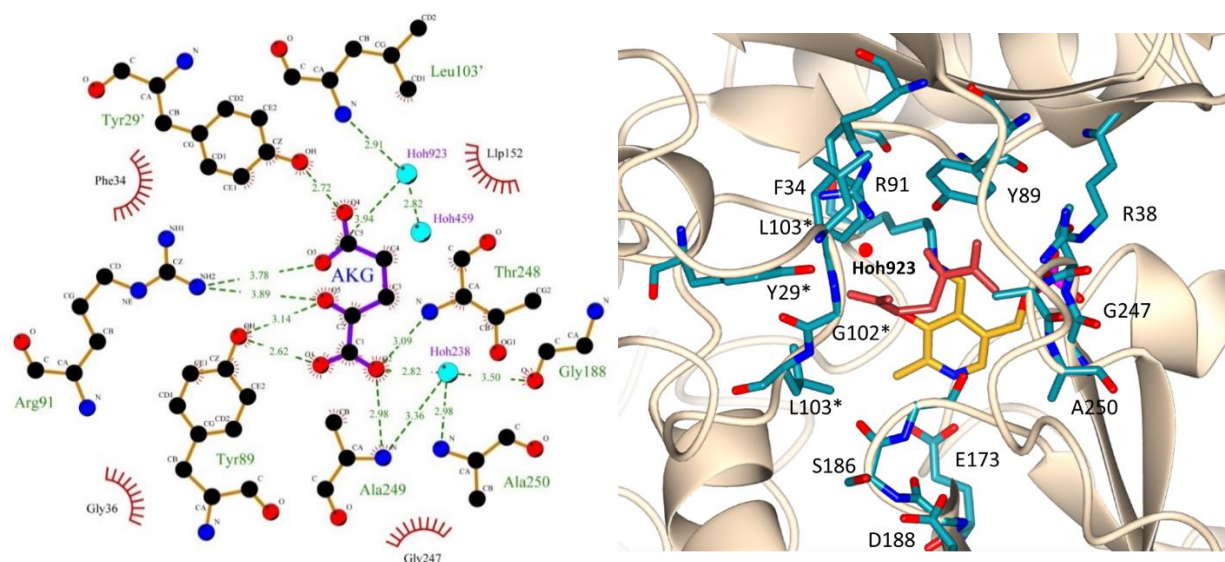


Рис. 3.36. Координация молекулы  $\alpha$ -кетоглутарата в активном центре димера GEO1900 (слева). Остатки, участвующие в координации, и водородные связи обозначены зелеными пунктирными линиями с указанием их длины. Остатки соседней субъединицы помечены (\*). Остальные остатки, которые образуют активный центр, но не образуют водородные связи с субстратом, отмечены черным цветом. Рисунок выполнен в программе LigPlot. (B) Активный центр Geo1900 (справа). Молекула  $\alpha$ -кетоглутарата окрашена в красный цвет, молекула кофактора PLP – в желтый цвет, остатки активного центра – в синий цвет. \* остатки соседней субъединицы. Молекула воды H923 показана красным шариком.

При связывании  $\alpha$ -кетоглутарата не происходит значительных конформационных изменений в белковой глобуле GEO1900: RMSD по  $C\alpha$  атомам субъединиц комплекса и холоформы составляет 0.5 Å. Однако три изменения очевидны и заслуживают упоминания: (1) разворачивание боковых групп Leu101\* и Leu103\* (расстояние между соответствующими  $C\alpha$  атомами 0.6 Å); (2) остатки 120-124 междоменной петли в структуре комплекса подвинулись к активному центру (Рис. 3.37); (3)  $\beta$ -поворот I<sup>247</sup>GTAA<sup>250</sup> из Р-кармана, смещен к центру – смещение по  $C\alpha$  составило 0.6 Å. Смещение остатков  $\beta$ -поворота и междоменной петли соответствует переходу фермента в закрытую конформацию, однако наблюдаемых смещений вторичных элементов в структуре GEO1900 недостаточно, чтобы закрыть субстрат от доступа растворителя. В комплексах eVCAT с субстратами (PDB код 1UYE, 1UYD, 111K) и R-TA из *Nectria haematococca* с ингибитором (PDB код 4CMD) смещение междоменной петли более выраженное. По-видимому, как и в комплексе TUZN1299 с субстратом L-норвалином, «жесткость» структуры холоформы архейной трансминазы ограничивает мобильность подвижных элементов

структуры в условиях кристаллизации. Также стоит отметить, что встраивание  $\alpha$ -кетоглутарата наблюдается только в одну субъединицу димера GEO1900, возможно, что это результат негативной кооперативности при образовании ингибиторных комплексов. Подобная негативная кооперативность наблюдается при связывании ингибитора габакулина с BCAT из *Archaeoglobus fulgidus* (PDB код 5MR0) и среди других PLP-зависимых ферментов [386,387].

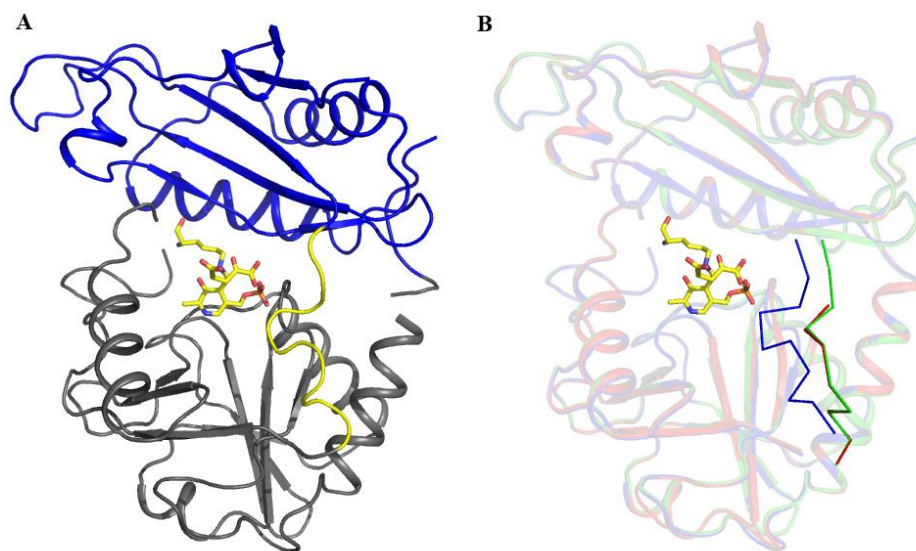


Рис. 3.37. Субъединица GEO1900 со связанной молекулой  $\alpha$ -кетоглутарата. (А) Малый домен показан синим цветом, большой домен – серым цветом, междоменная петля – желтым цветом. Ковалентно связанная с каталитическим лизином молекула PLP показана желтым, как и координированный  $\alpha$ -кетоглутарат. (В) Наложение структур субъединицы А GEO1900\_АКГ с координированным  $\alpha$ -кетоглутаратом (синий), субъединицы В GEO1900\_АКГ (зеленый) и субъединицы В GEO1900\_холо (красный). Заметно смещение междоменной петли.

Наблюдается незначительная активность GEO1900 с R-PEA, которую, как и для других охарактеризованных архейных BCAT, можно оценивать как дополнительную. Если в R-TA из *N. haematococca* (PDB код 4CMD) остатки Ser62 ( $\beta$ X-тяж) и Glu115 ( $\beta$ Y-тяж) препятствуют координации ВСАА, то в GEO1900 остатки Arg38 ( $\beta$ X-тяж) и Arg91 ( $\beta$ Y-тяж) благоприятствуют связыванию субстратов с  $\alpha$ -карбоксильной группой, но препятствуют связыванию гидрофобного R-PEA.

Подводя итог исследованию архейных BCAT, нужно отметить, что детальная структурно-функциональная характеристика архейных BCAT проведена впервые. Сравнительный анализ структур трех BCAT позволил оценить связывание  $\alpha$ -

кетоглутарата и связывание положительно заряженных L-аминокислот в архейных ВСАТ. Связывание положительно и отрицательно заряженных субстратов следует рассматривать как взаимоисключающее. По-видимому, связывание заряженных субстратов регулируется составом мотивов, формирующих O-петлю и  $\beta$ -поворот II. Структура активного центра архейных ВСАТ гомологична структурам активных центров канонических ВСАТ из бактерий. Остатки характеристических мотивов участвуют в связывании субстратов, как и установлено ранее при анализе структур бактериальных ВСАТ. При высокой гомологии структур, которая характеризует трансминазы IV-типа PLP-укладки у новых трансминаз обнаружены отличия в организации активных центров и во взаимодействии формирующих их элементов вторичной структуры. Эти отличия, по-видимому, приводят к расширению (изменению) субстратной специфичности архейных ВСАТ. Изученные архейные ВСАТ активны при температурах от 65 °C и выше. Термостабильность архейных ВСАТ заложена в структуре белковой глобулы и на организации активного центра не отражается. Архейные ВСАТ – «медленные» ТА, но могут превращать широкий спектр аминокислот и не ограничиваются только ВСАА, это особенность архейных ВСАТ скорее всего позволяет организму-хозяину расти на самых разных субстратах.

### **3.4. ХАРАКТЕРИСТИЧЕСКИЕ МОТИВЫ ТРАНСАМИНАЗ. ТРАНСАМИНАЗЫ СО СМЕШАННЫМ ТИПОМ АКТИВНОСТИ**

Разработанный в 2010 году Хоне (M. Hohnе) и соавторами [193] подход к определению субстратной специфичности PLP-зависимых трансминаз IV типа укладки по характеристическим мотивам, позволяет достаточно точно предсказать, будет ли трансминаза с известной последовательностью ВСАТ, DAAT, R-TA или даже ADCL. Однако в этом контексте возникает вопрос, а если характеристический мотив не соответствует ни одному из канонических мотивов (Таблица 1.1), то какая субстратная специфичность, какой тип активности будет у такой трансминазы? Как много трансминаз не имеют канонических мотивов? Представленные ниже исследования составляют ответы на эти вопросы. Для начала был проведен поиск трансминаз с нарушениями в характеристических мотивах. Для этого было построено филогенетическое дерево по результатам филогеномного анализа



последовательностей трансаминаз из репрезентативной с точки зрения таксономии выборки из 124 прокариотических геномов, отнесенных к кластеру ортологичных групп COG0115 (Branched-chain amino acid aminotransferase/4-amino-4-deoxychorismate lyase) [327] (Приложение 2). На филогенетическом дереве была выделена клада последовательностей трансаминаз с нарушениями в характеристических мотивах (Рис. 3.38) [388]. Две из них, трансаминаза из термофильной бактерии *Thermobaculum terrenum* и трансаминаза из галотолерантной миксобактерии *Haliangium ochraceum* были исследованы детально, подробный анализ их свойств будет представлен ниже.

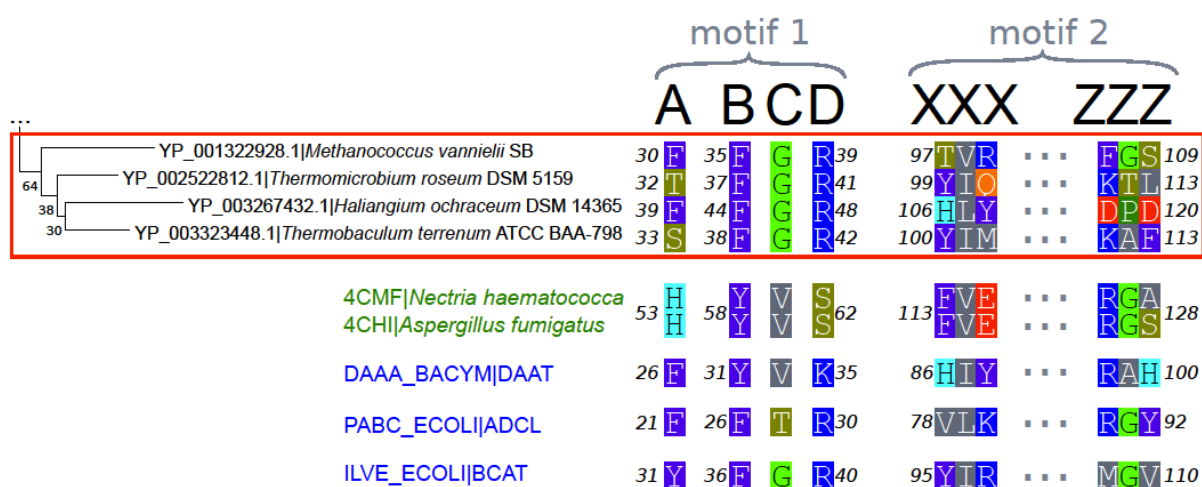


Рис. 3.38. Четыре последовательности PLP-зависимых трансаминаз IV типа укладки, содержащие характеристические мотивы, отличные от канонических.

Характеристические мотивы пяти охарактеризованных трансаминаз IV типа укладки PLP-связывающего домена приведены в Таблице 3.18. Среди них две архейные BCAT с широкой субстратной специфичностью из *T. uzoniensis*, *V. moutnovskia*, одна классическая BCAT из *G. acetivorans*, трансаминаза из термофильной бактерии *T. terrenum* и трансаминаза из галотолерантной миксобактерии *H. ochraceum*. Мотивы архейных трансаминаз соответствуют мотивам канонических BCAT, кроме одной точечной замены у TUZN1299 и VMUT0738; расширение их субстратной специфичности хорошо объясняется как этой точечной заменой, так и изменениями в мотивах других петель ( $\beta$ -поворот II), формирующих активный центр. Характеристические мотивы бактериальных трансаминаз из *T. terrenum* (TaТТ) и *H. ochraceum* (HO3033) из обнаруженной клады

существенно отличаются от мотивов канонических трансаминаз IV типа PLP укладки, что, как будет показано ниже, определило смешанный тип активности этих ферментов: по BCAT и по R-TA типу (Таблица 1.3). Ниже представлена детальная структурно-функциональная характеристика трансаминаз ТаТТ и НО3033, которая была направлена не только на исследование эффектов замен в характеристических мотивах, но и на определение роли остатков характеристических мотивов в организации активного центра, в поддержании его стабильности и в связывании отдельных субстратов. Кроме того, был проанализирован вклад других «нехарактеристических» остатков активного центра и остатков, удаленных от активного центра, в реализацию смешанного типа активности у этих ферментов.

Таблица 3.18. Характеристические мотивы в последовательностях новых трансаминаз в сравнении с мотивами канонических трансаминаз IV типа PLP-укладки (BCAT, DAAT, R-TA). CpuTA1 – охарактеризованная ранее трансаминаза со смешанным типом активности [249].

	Мотив 1	Мотив 2	Нумерация соответствует:
BCAT	<sup>31</sup> YxxxxF[ED]Gx[KR] <sup>40</sup>	<sup>95</sup> YxR <sup>97</sup> ... <sup>107</sup> [LMVI]G[VL] <sup>109</sup>	BCAT из <i>Escherichia coli</i> (eBCAT)
DAAT	<sup>26</sup> FxxxxYxV[IVA][KR] <sup>35</sup>	<sup>86</sup> HxY <sup>88</sup> ... <sup>98</sup> [RK]xH <sup>100</sup>	DAAT из <i>Bacillus sp.</i> YM-1
R-TA	<sup>53</sup> HxxxxYD[VT]x[STAHF] <sup>62</sup>	<sup>113</sup> [FY]V[EQAWNS] <sup>115</sup> ... <sup>126</sup> [RKFGP]x[STANER] <sup>128</sup>	R-TA из <i>Nectria haematococca</i>
CpuTA1	<sup>51</sup> Rxxxx <sup>56</sup> FETIA <sup>62</sup>	<sup>115</sup> FAK <sup>117</sup> ..... <sup>123</sup> GIEGEGR <sup>129</sup>	TA из <i>Curtobacterium pusillum</i>
TUZN1299	<sup>26</sup> YxxxxFEGIR <sup>35</sup>	<sup>91</sup> YxR <sup>93</sup> ..... <sup>103</sup> ISL <sup>105</sup>	TA из <i>Thermoproteus uzoniensis</i>
VMUT0738	<sup>40</sup> YxxxxFEGIR <sup>49</sup>	<sup>107</sup> YxR <sup>109</sup> ... <sup>119</sup> VNL <sup>121</sup>	TA из <i>Vulcanisaeta moutnovskia</i>
GEO1900	<sup>28</sup> YxxxxFEGIR <sup>37</sup>	<sup>88</sup> YxR <sup>90</sup> ... <sup>100</sup> LGL <sup>102</sup>	TA из <i>Geoglobus acetivorans</i>
HO3033	<sup>39</sup> FxxxxFEGVR <sup>48</sup>	<sup>106</sup> HLY <sup>108</sup> ..... <sup>118</sup> DPD <sup>120</sup>	TA из <i>Haliangium ochraceum</i>
TaTT	<sup>34</sup> SxxxxFEGIR <sup>43</sup>	<sup>101</sup> YIM <sup>103</sup> ..... <sup>114</sup> FSV <sup>116</sup>	BCAT из <i>Thermobaculum terrenum</i>

### 3.5. ТРАНСАМИНАЗЫ СО СМЕШАННЫМ ТИПОМ АКТИВНОСТИ ИЗ БАКТЕРИЙ

#### *Haliangium ochraceum* и *Thermobaculum terrenum*

##### 3.5.1. Функциональная характеристика трансаминазы из *H. ochraceum* (НО3033)

Трансаминаза НО3033 не катализирует как референтные реакции ВСАТ (ВСАА +  $\alpha$ -кетоглутарат), так и референтные реакции R-ТА (R-РЕА + пируват). При этом анализ полуреакций показал, что и ВСАА и первичные амины R-РЕА и R-РРА являются аминодонорами в реакциях, катализируемых НО3033 (Таблица 3.19). Полная реакция трансаминирования, которую катализирует НО3033, представляет собой перенос аминогруппы от R-РЕА на кетоаналоги ВСАА разной длины (Схема VII, Таблица 3.18). Реакция идет в одну сторону, обратное аминирование ацетофенона не наблюдалось.

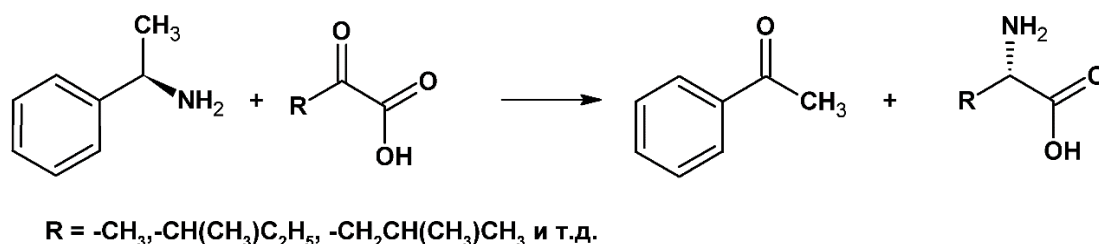


Схема VII. Полная реакция трансаминирования, катализируемая НО3033

Таблица 3.19. Кинетические параметры полуреакции НО3033. Условия полуреакции 50 мМ Na-бикарбонатный буфер, 400 мМ NaCl, pH 10.0, при 25 °С. n.d. - не определяется

Субстрат	$K_D^{half}$ , мМ	$k_{max}^{half}$ , с <sup>-1</sup>	$k_{max}^{half}/K_D^{half}$ , М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
L-лейцин	0.65 ± 0.53	0.95 ± 0.78	1470 ± 80
L-изолейцин	0.58 ± 0.06	0.24 ± 0.01	410 ± 60
L-валин	6.5 ± 1.6	0.29 ± 0.07	44 ± 15
L-норвалин	0.32 ± 0.07	0.19 ± 0.02	590 ± 140
R-РЕА	23 ± 7	0.23 ± 0.03	10 ± 3
S-РЕА	n.d.	n.d.	n.d.
R-РРА	10.4 ± 1.8	0.0113 ± 0.0007	1.1 ± 0.2
<i>rac</i> -2-амино-5-метилгексан	n.d.	n.d.	n.d.
<i>rac</i> -1-метил-3-фенилпропиламин	n.d.	n.d.	n.d.
( <i>R</i> )-2-аминогексан	n.d.	n.d.	n.d.
D-аланин	n.d.	n.d.	n.d.
L-β-лейцин	n.d.	n.d.	n.d.
β-аланин	n.d.	n.d.	n.d.

Особенными оказались и оптимальные условия полной реакции катализируемой НО3033: 50 мМ Na-бикарбонатный буфер, рН 10.0, 400 мМ NaCl, при 40 °С. В оптимальных условиях удалось зарегистрировать незначительную активность НО3033 в референтной реакции ВСАТ между L-лейцином и  $\alpha$ -кетоглутаратом/пируватом. НО3033 не активна с ВСАА в условиях, оптимальных для канонических ВСАТ – 50 мМ Трис-HCl, рН 7.5-8.0.

Таблица 3.20. Активность НО3033 с кетосубстратами в полной реакции с аминокислотой R-РЕА. Условия реакции: 50 мМ Na-бикарбонатного буфера, рН 10.0, содержащего 400 мМ NaCl и 20  $\mu$ М PLP при 40 °С 2 мМ кетосубстрата и 10 мМ R-РЕА.

Кетосоединение	Соответствующая аминокислота	Удельная активность, У/мг
2-оксвалерат	L-норвалин	0.23 $\pm$ 0.02
3-метил-2-оксвалерат	L-изолейцин	0.19 $\pm$ 0.02
4-метил-2-оксвалерат	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- $\alpha$ -аминобутановая кислота	0.025 $\pm$ 0.002
пируват	L-аланин	0.007 $\pm$ 0.001
$\alpha$ -кетоглутарат	L-глутамат	0.0042 $\pm$ 0.0002

Анализ полуреакций НО3033 показал, что при рН 10.0 в присутствии 400 мМ NaCl ВСАА являются субстратами (Таблица 3.19). D-аминокислоты, а также  $\beta$ -L-аминокислоты не являются субстратами. Из первичных аминов только R-РЕА и R-РРА эффективно реагировали с НО3033. В оптимальных условиях активность в реакции с S-РЕА составила 0.32% от активности в реакции с R-РЕА. Для полной реакции между R-РЕА и 3-метил-2-оксвалератом определены кинетические параметры (Таблица 3.15). Каталитическая эффективность НО3033 значительно уступает каталитической эффективности канонических ВСАТ (Таблица 1.2) и охарактеризованных архейных трансаминаз (Таблица 3.15). При этом значение *K<sub>m</sub>* для R-РЕА укладывается в диапазон значений, полученных для канонических R-ТА 0.3-11.5 мМ [179,189,220]. Специфичность НО3033 к кетосубстратам повышается с ростом длины C-цепи кетокислоты от пирувата к 2-оксвалерату и максимальна для C5-C6 субстратов. В этом НО3033 похожа на канонические ВСАТ, в этом проявляется высокая структурная гомология трансаминаз IV типа PLP укладки и сходство организации их активных центров. Различия в специфичности отдельных

трансаминаз – это уже следствие состава аминокислот, формирующих активный центр при единообразии укладки полипептидной цепи.

Сравнение кинетических параметров полной реакции с аминодонором R-PEA при разных значения рН (Таблица 3.15) показывает более эффективное связывание ароматического амина R-PEA при щелочных рН. Это еще одно отличие активного центра НО3033 от канонических ВСАТ и R-ТА, для которых оптимальный рН реакций составляет 7.0 – 8.0 и 8.0 - 8.5, соответственно [179,192,218,232,233]. Анализ стабильности и оптимальных условий катализа НО3033 показал, что при оптимальной температуре реакции между R-PEA и 3-метил-2-оксовалератом 45 °С, рН профиль этой реакции смещен в область щелочных рН, рН-оптимум 10.0 (Рис. 3.39). При рН 11.00 сохранялось около 70% активности. Таким образом, рН оптимум НО3033 значительно выше, чем у известных ВСАТ и R-ТА.

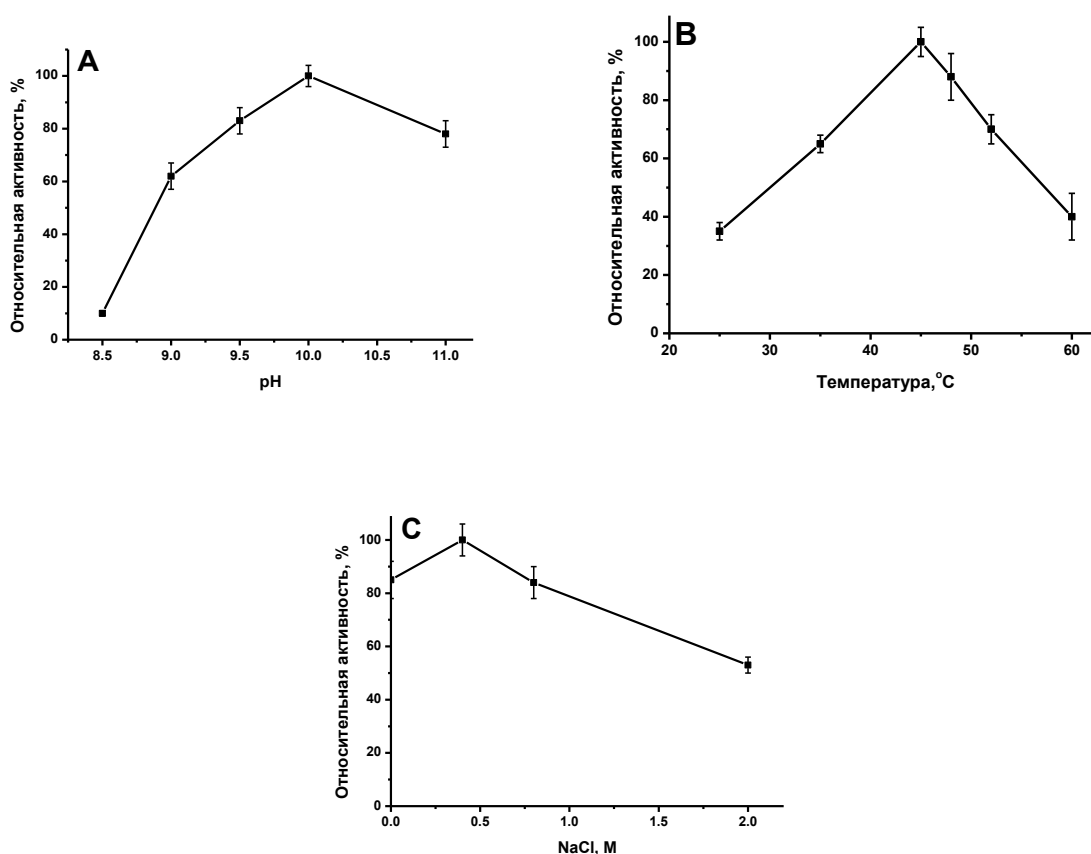


Рис. 3.39. Влияние рН (А), температуры (В) и концентрации NaCl (С) на активность НО3033 в полной реакции трансаминирования между R-PEA и 3-метил-2-оксовалератом. Данные представлены как средние значения трех измерений. 100% активности соответствует в (А)  $0.16 \pm 0.01$  U/мг, в (В) и (С)  $0.19 \pm 0.01$  U/мг.

Обычно рН зависимость удельной активности ВСАТ, R-ТА и других охарактеризованных ТА имеет колоколообразную форму, которая, как предполагают, определяется рКа остатков активного центра вблизи кофактора или ионизирующимися группами субстрата. Доказано, что рКа атома азота альдимины или N1 пиридинового кольца PLP не определяют колоколообразную форму рН-зависимости полной реакции, хотя, согласно принятому механизму, эффективное трансаминирование возможно только при протонировании N1 и депротонировании атома азота альдимины [160,175,389,390]. Предполагается, что боковые группы остатков активного центра формируют электростатическую среду активного центра и, таким образом, регулируют степень ионизации каталитически важных групп кофактора. Показано ранее, что N1 PLP остается протонированным до рН 10.8 и даже имеет рКа 13.0 в аспартаминотрансферазе (но ААТ принадлежит к первому I типу укладки PLP-связывающего домена) [391,392]. Таким образом, наблюдаемый щелочной сдвиг рН-профиля НО3033, по-видимому, связан с особым распределением зарядов в активном центре. Возможно, эти изменения вызывают увеличение рКа атома азота альдимины, и, как результат, эффективное трансаминирование начинается при рН>9. Снижение активности НО3033 при рН 11.0 и выше определяется как диссоциацией кофактора из активного центра, так и депротонированием R-PEA (рКа=9.8). Данные предположения согласуются с принятым механизмом трансаминирования, когда реакционной форме фермента соответствует депротонированная форма основания Шиффа при протонированной форме субстрата [163,178,183,224]. Депротонированная форма субстрата-аминодонора в таких условиях является нереакционноспособной.

Другой особенностью НО3033 является галотолерантность. Добавление в реакционный буфер 400 мМ NaCl приводит к увеличению активности НО3033, фермент сохраняет активность до 2 М NaCl. Известны лишь две ТА, активные в растворах с высокой концентрацией соли: это (S)-специфичные ТА из *Haloferax mediterranei* и *Halomonas sp.*[393,394]. По-видимому, НО3033 – первая Та IV типа укладки, которая активна в щелочных буферах с концентрацией соли до 2 М. Для сравнения активность ТаТТ в полных реакциях в 100 мМ NaCl снижается в 2-4 раза, активность ДААТ из *B. subtilis* так же снижается в 2-4 раза в 100 мМ соли.

Таким образом, в оптимальных условиях реакции трансаминирования субстратная специфичность НО3033 значительно отличается от специфичности известных ВСАТ и R-ТА и определяется как «по смешанному типу». Активность НО3033 в реакциях с референтными для ТА кетоакцепторами  $\alpha$ -кетоглутаратом и пируватом незначительна. В одинаковых условиях активность НО3033 в реакциях с S-PEA and R-PEA различается, то есть НО3033 – стереоспецифичная трансаминаза. Далее *K<sub>m</sub>* для 3-метил-2-оксвалерата на порядок меньше *K<sub>m</sub>* для R-PEA. Оба наблюдения указывают на способность активного центра к дифференцировке субстратов, однако в меньшей степени, чем это будет наблюдаться у другой трансаминазы со смешанным типом активности – у ТаТТ.

### 3.5.2. Структура трансаминазы НО3033

Функциональной единицей НО3033 является димер (Рис. 3.40), субъединица состоит из большого (остатки 147-308) и малого доменов (остатки 1-135 и 309-316). Малый домен имеет  $\alpha/\beta$  структуру, большой домен – псевдобаррел, что типично для ТА IV типа укладки (Рис. 1.4). Наибольшая гомология отмечена с каноническими ВСАТ (Таблица 3.21). НО3033 в кристалле гексамер, однако, в растворе методом гель фильтрации установлено, что НО3033 – димер.

Таблица 3.21. Структурная гомология НО3033 и трансаминаз IV типа PLP укладки.

ТА (PDB код)	Идентичность, %	RMSD (Å)	Z оценка	Доля выровненных остатков (%)
ВСАТ из <i>Thermoproteus uzoniensis</i> (5CE8)	35	1.14	18.2	86
ВСАТ из <i>Thermus thermophilus</i> HB8 (1WRV)	34	1.19	17.4	91
ВСАТ из <i>E. coli</i> (1HK)	36	1.15	16.7	86
ВСАТ из <i>Burkholderia pseudoallei</i> (4WHX)	31	1.22	17.9	82
ДААТ из <i>Bacillus subtilis</i> (4DAA)	25	1.33	15.2	82
R-ТА из <i>Arthrobacter</i> sp. KNK168 (3WWH)	25	1.45	15.9	91
R-ТА из <i>Nectria haematococca</i> (4CMD)	21	1.44	15.2	86

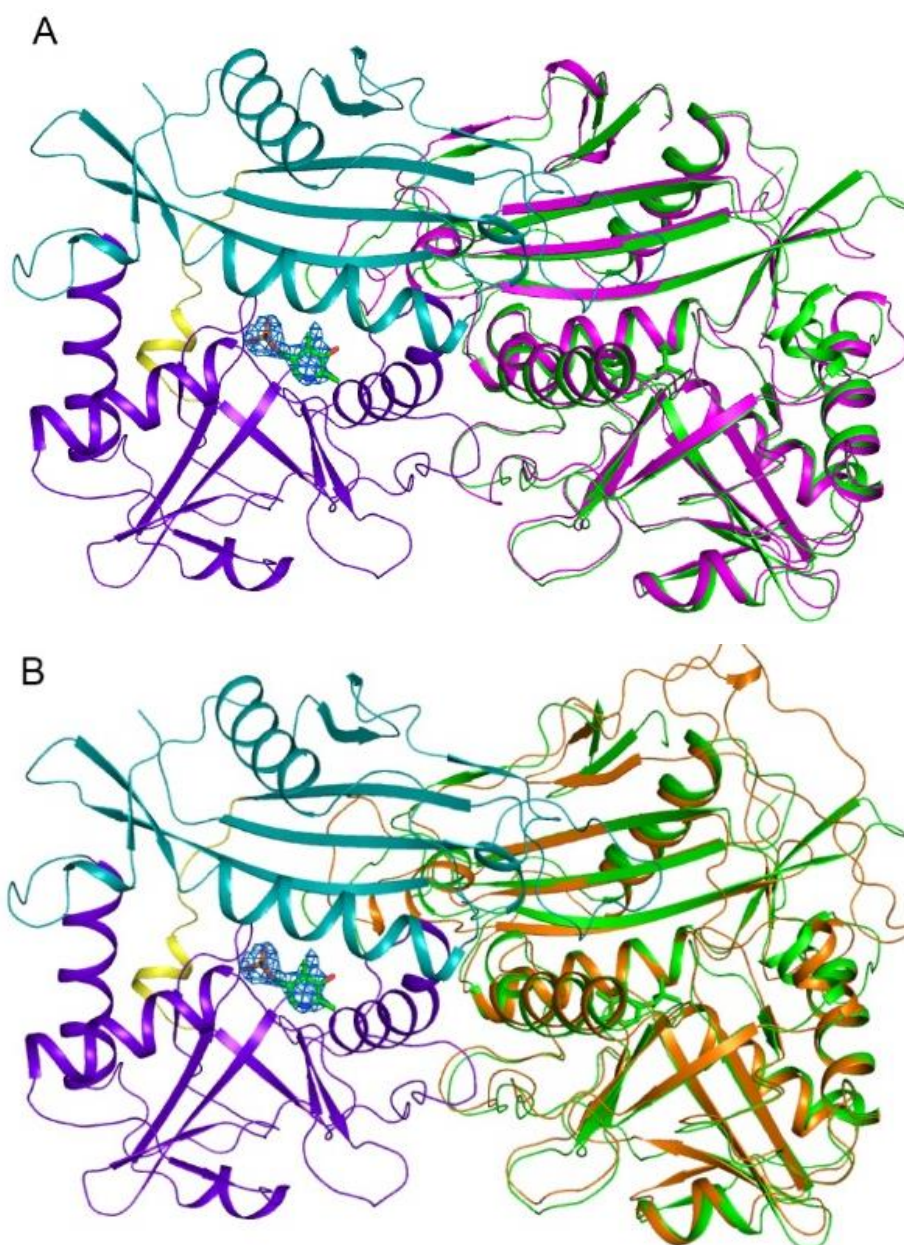


Рис. 3.40. Функциональный димер HO3033. В левой субъединице малый домен показан голубым цветом, большой домен выделен фиолетовым цветом, междоменная петля окрашена в желтый цвет. Правая субъединица HO3033 (зеленый) наложена (А) на субъединицу eBCAT (PDB ID: 1H1K, пурпурный) и (В) на субъединицу R-TA из *Arthrobacter* sp. (PDB ID: 3WWH, оранжевый). Молекула PLP в структуре HO3033 представлена палочковой моделью, Разностная карта плотности  $F_o - F_c$  для молекулы PLP показана с уровнем срезки  $3\sigma$ .

Структура активного центра HO3033 гомологична структурам известных трансаминаз IV типа PLP укладки (Рис. 1.5), различия как всегда оказываются в свойствах формирующих его остатков. Активный центр HO3033 представлен O-карманом и P-карманом. Расположение гидрофобных остатков Phe44 (Phe36 в eBCAT), Leu122\* (V109\*), Tyr172 (Tyr164) Phe39\* (Tyr31\*) и Gly204 (Gly196) в O-



кармане НО3033 сходно с положением аналогичных остатков в О-кармане канонических ВСАТ. (Рис. 3.41, 3.42А).

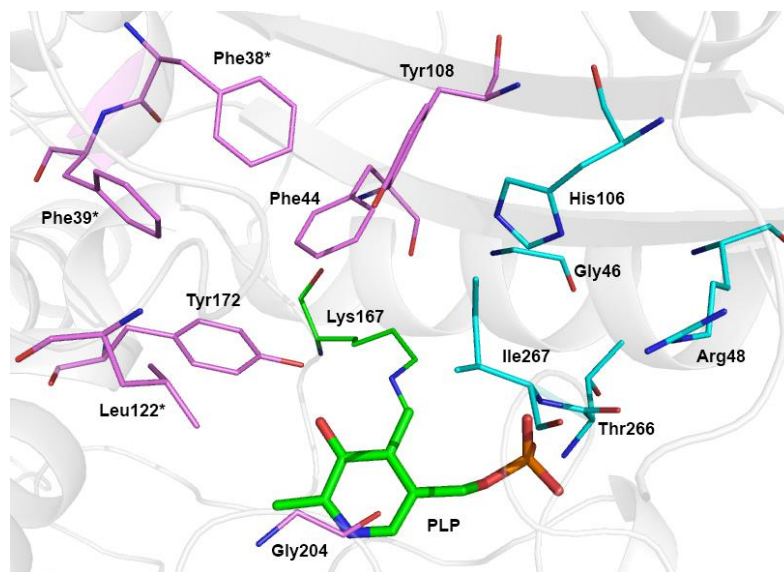


Рис. 3.41. Активный центр НО3033. Остатки, формирующие Р-карман показаны голубым, остатки, формирующие О-карман, показаны пурпурным цветом. Остаток каталитического Lys167 с ковалентно присоединенной молекулой PLP показан зеленым цветом.

Однако в О-кармане НО3033 отсутствуют остатки, которые важны для связывания  $\gamma$ -карбоксильной группы  $\alpha$ -кетоглутарата: Arg97 и Tyr31\* в нумерации eBCAT заменены в НО3033 на Tyr108 и Phe39\*, соответственно (Рис. 3.41). Эти замены вместе с Phe38\* (His30\* в eBCAT) делают О-карман в НО3033 более гидрофобным. Суперпозиция структуры активного центра НО3033 и структуры R-TA из *Arthrobacter* sp. (PDB код 3WWH) показывает отсутствие идентичных остатков (Рис. 3.41В). Кроме того, в НО3033 отсутствует остаток аргинина (Arg138\* в R-TA из *Arthrobacter* sp.), который важен для связывания в proR положении карбоксильной группы пирувата в О-кармане R-TA.

В Р-кармане НО3033 имеется только один из двух канонических координационных сайтов  $\alpha$ -карбоксильной группы по типу ВСАТ. Как и в Р-кармане канонических ВСАТ [178,182,224,395], в Р-кармане НО3033 Arg48 (на  $\beta$ X-тяже) расположен в том же положении и образует вместе с атомами азота основной цепи Thr266 и Ile267 один из двух канонических сайтов связывания карбоксильной группы (Рис. 3.41, Рис. 3.42).

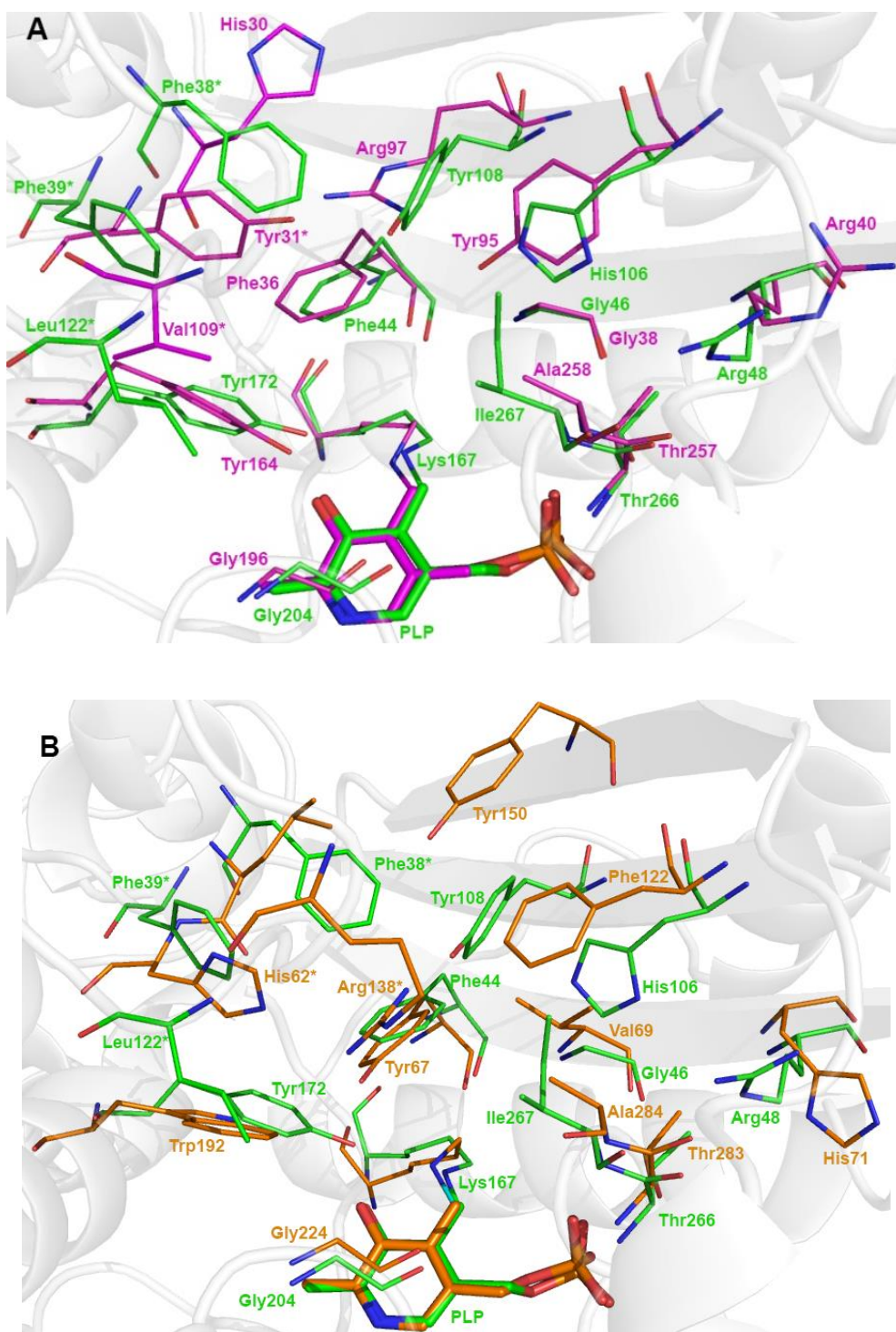


Рис. 3.42. Наложение активного центра HO3033 (остатки выделены зеленым цветом) на активный центр других ТА IV типа PLP укладки: (A) eBCAT (PDB код 111K, пурпурный). (B) *Arthrobacter* sp. KNK168 (PDB код 3WWH, оранжевый).

Однако вместо характеристических остатков тирозина и аргинина (Tyr95 и Arg97 из eBCAT), образующих второй координационный сайт в канонических BCAT, в HO3033 в этих позициях находятся His106 и Tyr108, соответственно. Эти изменения, очевидно, делают связывание  $\alpha$ -COOH группы менее прочным, что и

наблюдается по константам аффинности из полуреакций, но они способствуют связыванию метильной группы R-PEA в Р-кармане. Важность остатков His106 и Tyr108 в последовательности HO3033 для связывания R-PEA была проверена анализом свойств двойного мутанта HO3033 (H106Y/Y108R). В полуреакции этого варианта HO3033, константа специфичности для R-PEA оказалось примерно в 3 раза меньше, определенной для WT HO3033. В то же время, константа специфичности к L-валину в полуреакции увеличилась в 2 раза по сравнению с WT, демонстрируя, таким образом, более эффективное связывание типичных субстратов BCAT как результат введения канонического для BCAT второго сайта связывания  $\alpha$ -COOH группы в Р-кармане. Tyr172, который образует водородную связь с атомом кислорода фенильной группы PLP, в структуре HO3033 имеет два положения с расстояниями 2.0 Å и 2.3 Å. Как следует из анализа депонированных структур, характерное свойство BCAT – короткое расстояние между гидроксильной группой консервативного остатка Tyr и фенильным кислородом PLP (детальнее эта особенность TA будет проанализирована для TaTT). Этим взаимодействием HO3033 похожа на канонические BCAT.

Необычны свойства O-петли ( $^{114}$ GINHDPDPLFPTDD $^{127}$ ) в O-кармане HO3033. Она длиннее, чем у BCAT и по размеру сходна с O-петлями канонических R-TA. Вместо специфического для BCAT мотива [LMVI]G[VL] или значимого для активности R-TA остатка аргинина (Arg138\* в R-TA из *Arthrobacter* sp.: PDB код 3WWH или Arg126\* в *A. fumigatus*, PDB код 4CHI) в O-петле имеются два остатка аспартата Asp118\* и Asp120\* и O-петля в кристаллической структуре удалена от активного центра, то есть наблюдается выраженная открытая конформация фермента, другими словами, активный центр открыт растворителю. А всего на длинной O-петле HO3033 располагаются четыре остатка Asp. Для чего ферменту такая «кислая петля», остается открытым вопросом, поскольку специфичности к положительно заряженным L-аминокислотам не наблюдается, ни L-аргинин, ни L-лизин не являются субстратами HO3033.

Таким образом, смешанный тип активности HO3033 реализуется в BCAT-подобном активном центре (Таблица 1.1). Характеристические мотивы HO3033 (Таблица 3.18) отличаются уникальностью при сохранении ключевого для

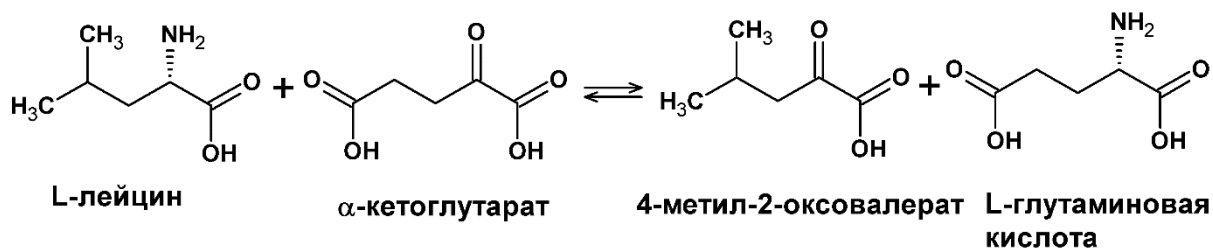
связывания по ВСАТ типу остатка Arg48 в Р-кармане (на  $\beta$ X-тяже) (Рис. 3.41, Рис. 3.42А). Нарушения в характеристических мотивах в О-кармане приводят к потере продуктивного связывания  $\alpha$ -кетоглутарата, нарушения в характеристических мотивах в Р-кармане – к увеличению сродства к R-PEA. Для НО3033 субстратная специфичность не является комбинацией свойств ВСАТ и R-ТА. Это новый тип активности среди трансаминаз IV типа PLP-укладки: реакция трансаминирования между (R)-ароматическим амином и кетоаналогом ВСАА. Кроме того, НО3033 отличается от ранее известных ВСАТ и R-ТА галотолерантностью и оптимумом активности в полной реакции в области щелочных рН.

### 3.5.3. Функциональная характеристика трансаминазы из *T. terrenum* (ТаТТ)

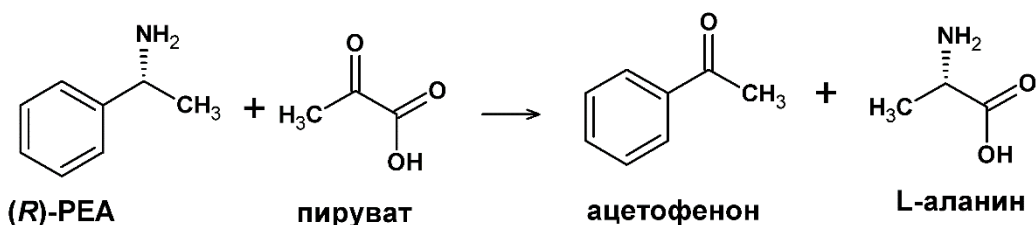
ТаТТ – термостабильная «быстрая» ТА IV типа PLP укладки катализирует реакции трансаминирования как с референтными субстратами ВСАТ и с референтными субстратами R-ТА, так и собственную уникальную реакцию (Схема VIII). Другими словами, ТаТТ проявляет активность по смешанному типу, принципиально отличную от активности НО3033. Спектр субстратов ТаТТ приведен в Таблицах 3.13-3.14.

Фермент термостабилен и имеет термооптимум в реакциях трансаминирования между L-лейцином и  $\alpha$ -кетоглутаратом и R-PEA и пируватом 75 °С и 55 °С, соответственно (Рис. 3.43), рН-оптимум составляет 8.0 и 9.0, соответственно. Стоит отметить, что рН оптимум реакций с ВСАА, то есть активность по типу ВСАТ, совпадает с рН-оптимумом реакций, катализируемых каноническими ВСАТ. А рН-оптимум реакции с R-PEA совпадает с рН оптимумом реакций с первичными аминами, катализируемых R-ТА. Анализ термостабильности ТаТТ показал, что при 50 °С и 70 °С в 50 мМ Tris-HCl буфере, рН 8.0, ТаТТ сохраняет 91% и 72% после 24 ч. инкубации и 75% и 40% активности после 78 ч. инкубации. Наилучшими субстратами аминодонорами ТаТТ являются ВСАА и ароматические L-аминокислоты (Таблица 3.13, 3.15).

### Реакция по типу BCAT



### Реакция по типу R-TA



### Уникальная реакция, катализируемая ТаТТ

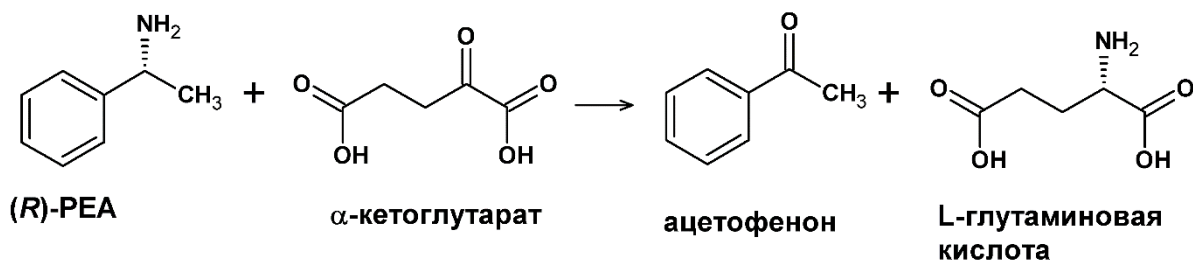


Схема VIII. Реакции трансминирования, катализируемые ТаТТ.

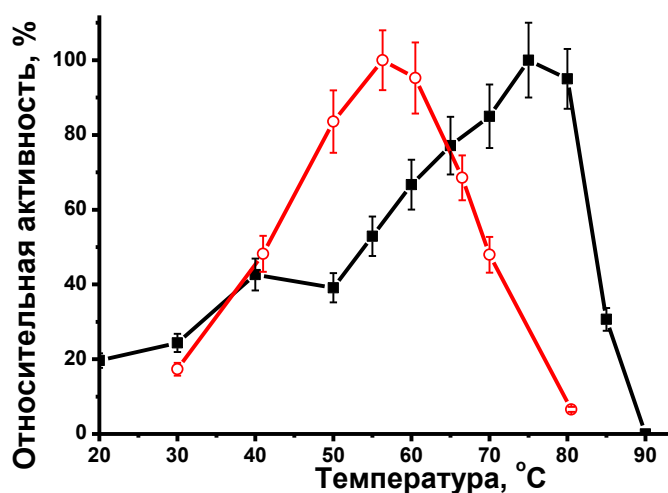


Рис. 3.43. Зависимость от температуры скорости реакции трансминирования с L-Leu и α-кетоглутаратом (■) и с (R)-PEA и пируватом (○). Удельную активность ТаТТ измеряли в 50 mM Na-фосфатном буфере (pH 8.0), содержащем 50 mM NaCl, 60 мкМ PLP, 5 mM L-лейцина and 1 mM α-кетоглутарата или 10 mM (R)-PEA и 1 mM пирувата. 100% соответствует  $96 \pm 7$  U/мг для L-лейцина и α-кетоглутарата, и  $0.12 \pm 0.01$  U/мг для (R)-PEA и пирувата.

Активность ТаТТ к R-PEA сравнима с активностями охарактеризованных трансаминаз из *M. ginsengisoli* и *C. pusillum*, R-TA из *Arthrobacter* sp. KNK168 (Таблица 1.3, 1.2). Сравнительный анализ кинетических параметров полной реакции трансаминирования (Таблица 3.15) показывает, что специфичность ТаТТ к ВСАА и их линейным гомологам снижается с укорочением углеродной цепи. Константа специфичности ТаТТ к ароматическим субстратам соизмерима с константой специфичности к ВСАА, специфичность к L-лейцину выше в 10 раз, чем специфичность к его кетоаналогу 4-метил-2-оксовалерату; наибольшую специфичность ТаТТ проявляет к  $\alpha$ -кетоглутарату. В целом, по значениям максимальных скоростей ТаТТ является одной из самых активных среди известных на сегодня трансаминаз IV типа PLP укладки (Таблица 1.2, 3.15). Для большинства охарактеризованных прокариотических ВСАТ кетоаналоги ВСАА являются наилучшими субстратами, то есть ВСАТ оптимизированы под аминирование кетоаналогов ВСАА. В этом ТаТТ отличается от ВСАТ: *in vitro* ТаТТ наиболее эффективно катализирует деаминирование ВСАА с переносом аминогруппы на  $\alpha$ -кетоглутарат. При концентрации выше 1 мМ  $\alpha$ -кетоглутарат ингибирует реакцию:  $IC_{50}$  составляет 7 мМ для реакции трансаминирования между L-лейцином и  $\alpha$ -кетоглутаратом. Пируват и 4-метил-2-оксовалерат до 50 мМ не ингибируют ТаТТ. Стоит отметить, что зависимость наблюдаемой скорости реакций трансаминирования от концентрации L-ногвалина, L-триптофана и  $\alpha$ -кетоглутарата описывается уравнением Хилла, то есть с указанными субстратами наблюдается положительная кооперативность Рис. 3.44.

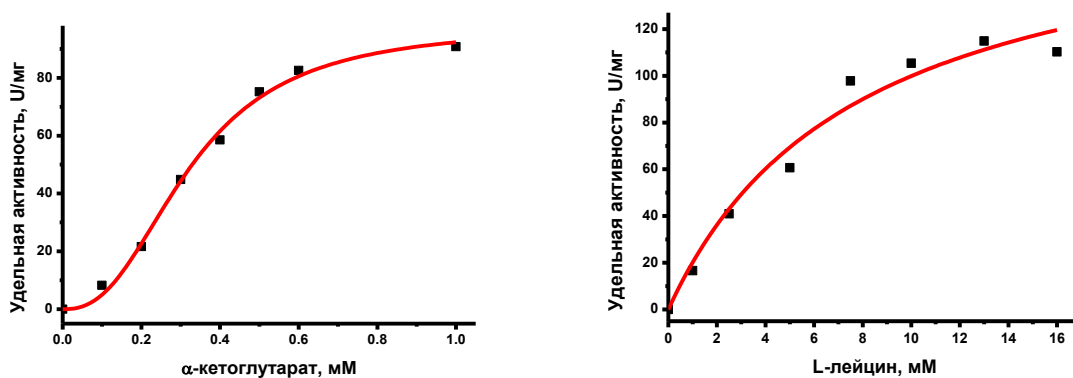


Рис. 3.44. Зависимость удельной активности ТаТТ от концентрации  $\alpha$ -кетоглутарата и L-лейцина в полной реакции трансаминирования при 50 °С.

Зависимость скорости реакции от концентрации с остальными специфическими субстратами хорошо описывается уравнением Михаэлиса-Ментен. Кооперативность здесь неочевидна.

Отдельного внимания заслуживает специфичность ТаТТ к ароматическим и алифатическим аминам. Для характеристики активности по типу R-ТА были отобраны первичные амины, наиболее часто встречающиеся в анализе субстратной специфичности канонических R-ТА (Таблица 3.22). Анализ специфичности ТаТТ к разным первичным аминам исследовали в режиме полуреакции, в режиме полной реакции активность наблюдалась только с R-PEA и R-PPA. Активность ТаТТ в полной реакции с (*R*)-4-фенилбутан-2-амином, (*R*)-5-метилгексан-2-амином и с (*R*)-гексан-2-амином с кетосубстратами  $\alpha$ -кетоглутаратом и пируватом не наблюдалась. Наилучшим субстратом среди аминов является R-PEA. Специфичность ТаТТ к R-PEA в полной реакции уступает специфичности к ароматическим аминокислотам (Таблица 3.15).

Таблица 3.22. Кинетические параметры полуреакции ТаТТ с (*R*)-первичными аминами.

Аминодонор	$10^3 \times k_{\max}^{\text{half}}$ , с <sup>-1</sup>	$K_D^{\text{half}}$ , мМ	$k_{\max}^{\text{half}}/K_D^{\text{half}}$ , с <sup>-1</sup> М <sup>-1</sup>
( <i>R</i> )-PEA	120 ± 7	36 ± 5	3,3 ± 0,5
( <i>R</i> )-4-фенилбутан-2-амин	0,37 ± 0,01	30 ± 2	0,012 ± 0,001
( <i>R</i> )-5-метилгексан-2-амин	0,75 ± 0,07	104 ± 19	<0,01
( <i>R</i> )-гексан-2-амин	1,0 ± 0,1	116 ± 28	<0,01

Проведенный анализ показал принципиальное отличие ТаТТ и R-ТА: ТаТТ способна деаминировать только R-PEA, ТаТТ не катализирует аминирование кетонов. В реакции трансаминирования между R-PEA и кетокислотой образуются ацетофенон и L-аминокислота. Природные же R-ТА активны с разными (*R*)-первичными аминами и могут аминировать кетоны в условиях вывода второго продукта из реакции.

### 3.5.4. Структура трансаминазы ТаТТ

В ходе исследований получены две структуры ТаТТ в E-PLP форме (PDB код 6GKR) и E-PMP форме (PDB код 6Q8E). Сходство последовательности ТаТТ с известными из литературы ВСАТ и R-ТА составляет 36-40%% и 23-27%%, соответственно. При этом структура ТаТТ отличается как от структур ВСАТ, так и структур R-ТА и DAAT (Таблица 3.23). Для сравнения, гомология структуры архейной TUZN1299 со структурами известных ВСАТ значительно выше (Таблица 3.17). При этом сходство последовательностей TUZN1299 и ТаТТ с последовательностями известных ВСАТ и R-ТА подчиняется одинаковой закономерности: с ВСАТ выше, с R-ТА ниже. Степень сходства последовательностей TUZN1299 и ТаТТ составляет 43%, структур - RMSD по  $C\alpha$  1.33 Å. Также ТаТТ отличается от TUZN1299 в 100 раз большей удельной активностью в реакциях с ВСАА, с  $\alpha$ -кетоглутаратом и с первичным амином R-PEA.

Таблица 3.23. Структурная гомология ТаТТ и трансаминаз IV типа PLP укладки.

	Трансаминаза (PDB код)	Идентичность по последовательности, %	RMSD, Å	Доля выровненных остатков, %
1	ВСАТ из <i>Burkholderia pseudomallei</i> (4WHX)	37	1.46	96
2	ВСАТ из <i>Thermus thermophilus</i> (2EJ3)	40	1.39	96
3	ВСАТ из <i>Thermoproteus uzoniensis</i> (5CE8)	43	1.33	95
4	ВСАТ из <i>E.coli</i> (111K)	37	1.33	94
5	ВСАТ из <i>Geoglobus acetivorans</i> (5E25)	31	1.43	98
6	R-ТА из <i>Aspergillus fumigatus</i> (4CHI)	24	1.64	98
7	DAAT из <i>Bacillus</i> sp. YM-1 (1DAA)	30	1.69	93
8	R-ТА из <i>Arthrobacter</i> SP. KNK168 (3WWH)	26	1.65	82

Анализ контактов показал, что обе формы ТаТТ существуют в кристалле в форме гексамера. Методом гель фильтрации установлено, что в растворе в рабочем буфере ТаТТ в концентрации 0.11 мг/мл также гексамер. Хотя функциональной единицей трансаминаз является димер, гексамерная форма в растворе встречается у трансаминаз IV типа PLP укладки, например, методом гель фильтрации эта форма показана для ВСАТ из *E. coli* и *Methanococcus aeolicus* [180,217]. Анализ контактов



в гексамере ТаТТ показал, что димерный контакт прочнее других и гексамер можно рассматривать как тример димеров. Если аминокислотные остатки, формирующие димерный контакт, также формируют активный центр, то остатки, задействованные в формировании других контактов в гексамере удалены от активного центра. Поэтому далее рассматривали димер как наименьшую функциональную единицу ТаТТ (Рис. 3.45). Однако утверждать, что гексамерная форма является структурным фактором термостабильности фермента и не влияет на каталитические свойства ТаТТ на данном этапе преждевременно и возможно только после дополнительных исследований. Наложение субъединиц E-PMP и E-PLP форм ТаТТ показала их высокую гомологию: RMSD по C $\alpha$  около 0.5 Å.

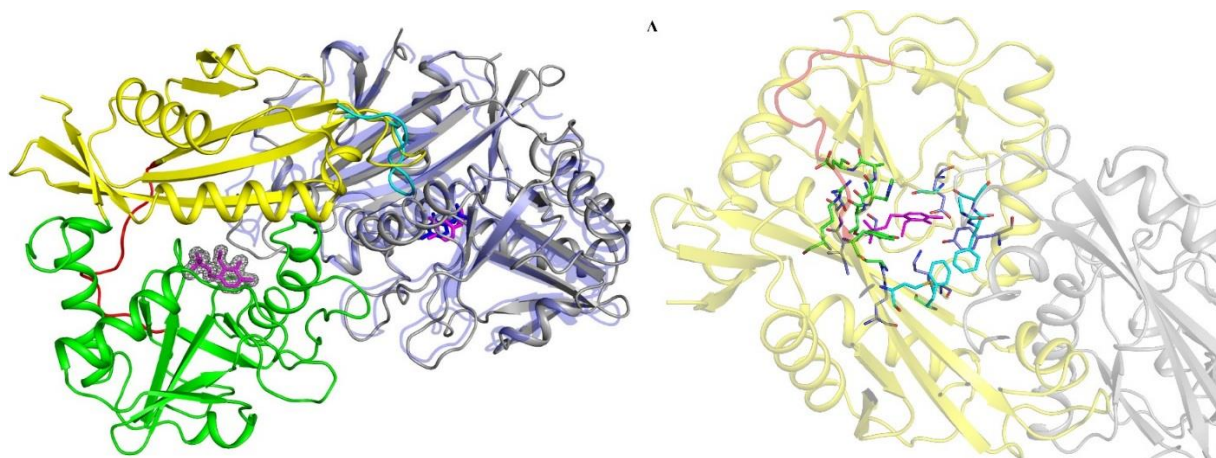


Рис. 3.45. (А) Функциональный димер ТаТТ. Две субъединицы, формирующие димер, отмечены зеленым/желтым и серым цветом. В левой субъединице малый домен выделен желтым, большой домен выделен зеленым, междоменная петля выделена красным цветом. Две конформации О-петли, формирующие центр соседней (серой) субъединицы, показаны желтым и голубым. Правая субъединица (серая) наложена на субъединицу ВСАТ из *E. coli* (синий). Молекула РМР показана «палочковой» моделью в лиловом цвете. Разностная карта плотности Fo-Fc для молекулы РЛР показана с уровнем срезки 3 $\sigma$ . (В) Положение остатков активного центра в субъединице. Субъединицы показаны желтым и серым цветом, междоменная петля отмечена красным. Остатки, образующие О-карман и Р-карман выделены голубым и зеленым, соответственно.

Подобно другим трансаминазам IV типа РЛР укладки субъединица ТаТТ состоит из большого и малого доменов и междоменной петли. РЛР ковалентно связан с  $\epsilon$ -аминогруппой каталитического Lys161, также в наличии консервативное для ВСАТ взаимодействие фенильной группы кофактора с гидроксильной группой Tyr166, координация N1 атома азота пиридинового кольца с Glu195, фосфатная

группа образует водородные связи с Arg64, Ile222, Thr223, Thr260, с карбонильной группой Gly41 через молекулу воды и с боковой группой Ser221.

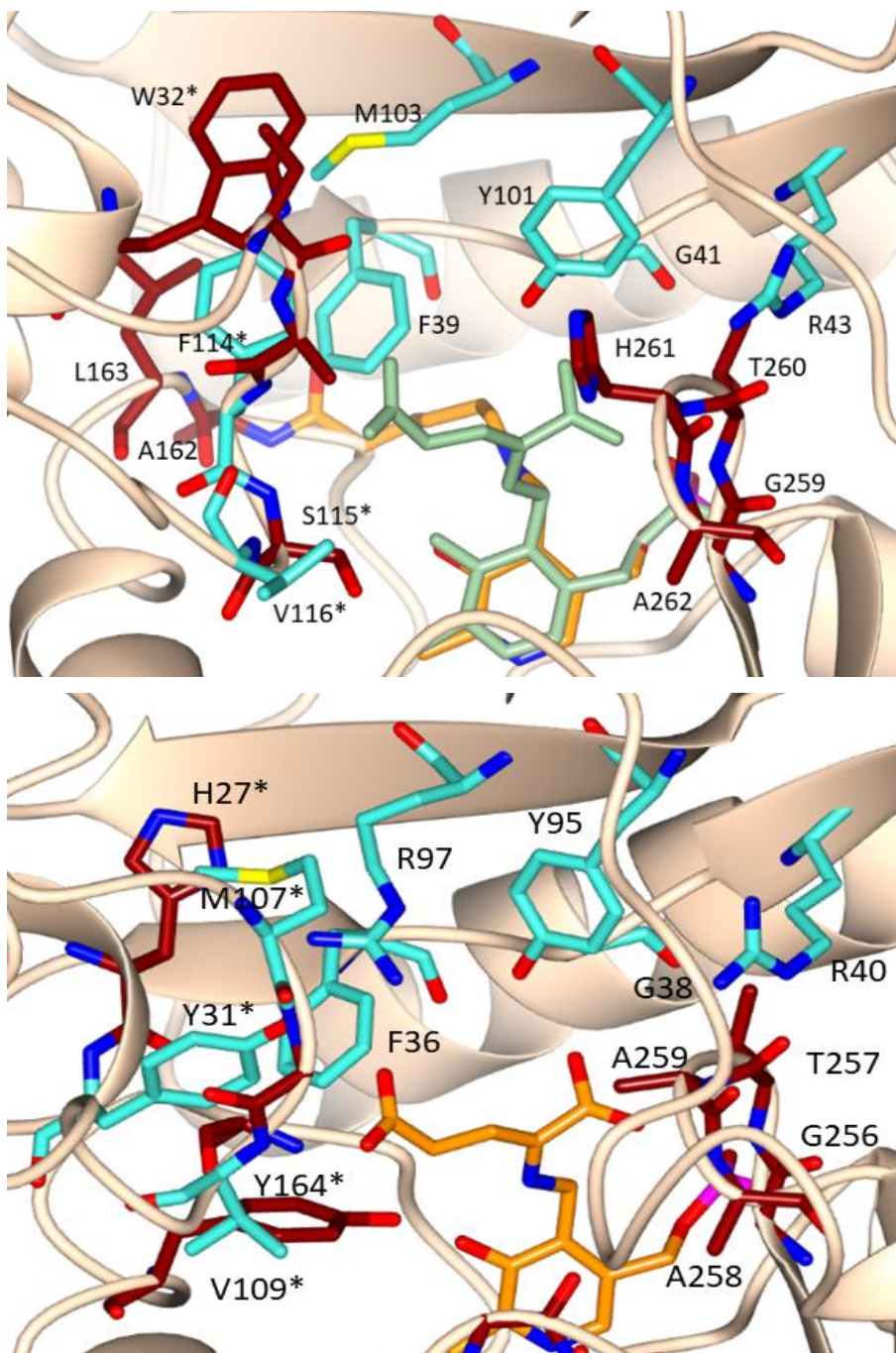


Рис. 3.46. Положение остатков в активном центре ТаТТ (А) и ВСАТ из *E. coli* (PDB код 1UYE) (В). Остатки характеристических мотивов выделены голубым. Другие остатки активного центра показаны коричневым. В активном центре ВСАТ из *E. coli* кофактор PLP присутствует в форме внешнего альдимины с субстратом L-глутаматом. В активном центре ТаТТ внешний альдимин ВСАТ из *E. coli* (мятный) совмещен с кофактором PLP (золотистый).

Координация фосфатной группы является наиболее консервативной для трансминаз IV типа укладки, наряду с водородной связью N1 атома PLP с остатками Glu или Asp. Другая форма кофактора – молекула PMP – развернута по оси N1-C6 на 15° по сравнению с молекулой PLP. Значительные различия между двумя формами TaTT наблюдаются в положении O-петли <sup>110</sup>GNKAFSVVGDR<sup>120</sup>, являющейся важным структурным элементом активного центра (Рис. 3.46). В структуре E-PLP формы петля находится в единичной конформации и как бы прикрывает активный центр. В E-PMP форме O-петля присутствует в двух конформациях, одна сходна с конформацией в E-PLP форме, другая ориентирована из активного центра и способствует расширению субстратного канала. Повышенный В-фактор в этой области в обеих структурах указывает на мобильность петли, что, по-видимому, необходимо для проявления каталитических свойств фермента. Стоит отметить, что остатки O-петли содержат фрагмент характеристического мотива 2, то есть определяют субстратную специфичность BCAT и R-TA. Движение O-петли ранее также наблюдалось структурными методами для R-TA из *Aspergillus fumigatus* [192].

Активный центр TaTT состоит из O- и P-карманов, которые сходны по структуре с O- и P-карманами канонических BCAT (Рис. 1.5, Рис. 3.45-3.46А). Остатки P-кармана TaTT формируют два центра координации α-COОН группы субстрата аналогично BCAT. Первый сайт связывания образован консервативным Arg43 и β-поворотом <sup>259</sup>GTNA<sup>262</sup>. Второй сайт изменен: отсутствует консервативный остаток Arg (мотив YxR в TaTT заменен на YxM, Таблица 3.18) и в наличии только остаток Tyr101. Но ион хлора из кристаллизационного буфера был обнаружен в структуре TaTT в P-кармане в позиции расположения α-COОН группы, что подтверждает пригодность P-кармана для связывания отрицательно заряженных групп. O-карман TaTT образуется остатками двух субъединиц димера Ser34\*, Phe39, Trp31\*, Trp32\*, Tyr166, Gly198, Met103, Leu105 (\* отмечены остатки соседней субъединицы), формирующих стенки и дно полости, и O-петлей, <sup>110</sup>GNKAFSVVGDR<sup>120</sup> (Рис. 3.46). Остаток Ser115\* образует водородную связь с Thr197, что, по-видимому, стабилизирует O-петлю в одной из конформаций. Междоменная петля <sup>130</sup>PAVSRLEEDFS<sup>140</sup> в обеих структурах удалена от активного

центра, т.е. активный центр открыт растворителю. Принято считать, что междоменная петля накрывает подобно крышке оба кармана и вместе с О-петлей закрывает полость активного центра от растворителя. В обеих структурах ТаТТ активный центр не закрыт от растворителя. В структурах ВСАТ из мезофильных организмов междоменная петля не видна (по-видимому, из-за своей высокой подвижности). Однако в структурах холоформ термостабильных TUZN1299, GEO1900 и ТаТТ междоменная петля видна хорошо на картах электронной плотности. По-видимому, это связано с повышенной жесткостью структур термостабильных ферментов, что находит отражение в снижении подвижности (В-фактора) петель и их появлению на картах электронной плотности.

Геометрия активного центра ТаТТ сходна с каноническими ВСАТ, однако, замены в характеристических мотивах последовательности (Таблица 1.1, Таблица 3.18) определили, следующие изменения в Р- и О-карманах, которые, по-видимому, и привели к смешанного типу активности у ТаТТ. Во-первых, замена Arg97 (в нумерации еВСАТ) на Met103 (в нумерации ТаТТ) приводит к потере консервативной водородной связи Arg-Tyr, которая присутствует во всех канонических ВСАТ (мотив YIR, Таблица 1.1, Таблица 3.18) и, собственно, формирует второй сайт связывания  $\alpha$ -COOH группы в Р-кармане путем поляризации остатка Tyr (Tyr101 в нумерации ТаТТ). Отсутствие поляризации этого остатка в ТаТТ, по-видимому, изменяет электростатику в Р-кармане и способствует связыванию метильной группы R-PEA. Далее, О-карман ТаТТ обогащен гидрофобными остатками Phe39, Leu105, Phe114\*, Trp31\*, Trp32\*, и Leu163, в то время как в канонических ВСАТ, гидрофильные остатки внедрены в гидрофобную полость (Arg97, Tyr31\*, Tyr129, и N\_Val109\*) (Рис. 3.46). Гидрофобная область, сформированная остатками Phe114\*, Trp31\* и Trp32\* может фиксировать О-петлю в позиции рядом с активным центром при связывании субстрата, что может дополнительно приводить к повышению эффективности связывания гидрофобных субстратов (эффект стабилизации). Ser34\*, который замещает консервативный остаток Tyr (Tyr31\* в еВСАТ) канонических ВСАТ, вместе с Trp31\* и Trp32\* изменяют в значительной степени геометрию (рельеф) дна О-кармана, что, по-видимому, благоприятствует связыванию L-ароматических аминокислот и ароматической группы R-PEA.

Отдельного рассмотрения заслуживает положение Tyr166 в активном центре ТаТТ. Сравнение активных димеров ТаТТ в PLP и PMP формах выявили одну особенность: в PMP форме ТаТТ расстояние между ОН группой Tyr166 и атомом O3\_PMP составляет 2,5 Å, что явно указывает на водородную связь, тогда как в PLP форме ТаТТ это расстояние сокращается, примерно, до 2,0 Å. Аналогичное короткое расстояние между группой ОН остатка Tyr и атомом O3\_PLP обнаружено в структуре ВСАТ из *Burkholderia pseudomallei* (PDB коды 3U0G, 4WHX). Это же расстояние среди гомологичных PLP-зависимых ферментов IV типа укладки находится в диапазон 1.93-3.05 Å со средним значением 2,42 Å. Молекулярное моделирование показало, что в течение 100 нс боковая цепь Tyr166 может переключаться между двумя устойчивыми ориентациями на *re* и *si* сторонах PLP при сохранении стабильного взаимодействия с атомом O3\_PLP (Рис. 3.47).

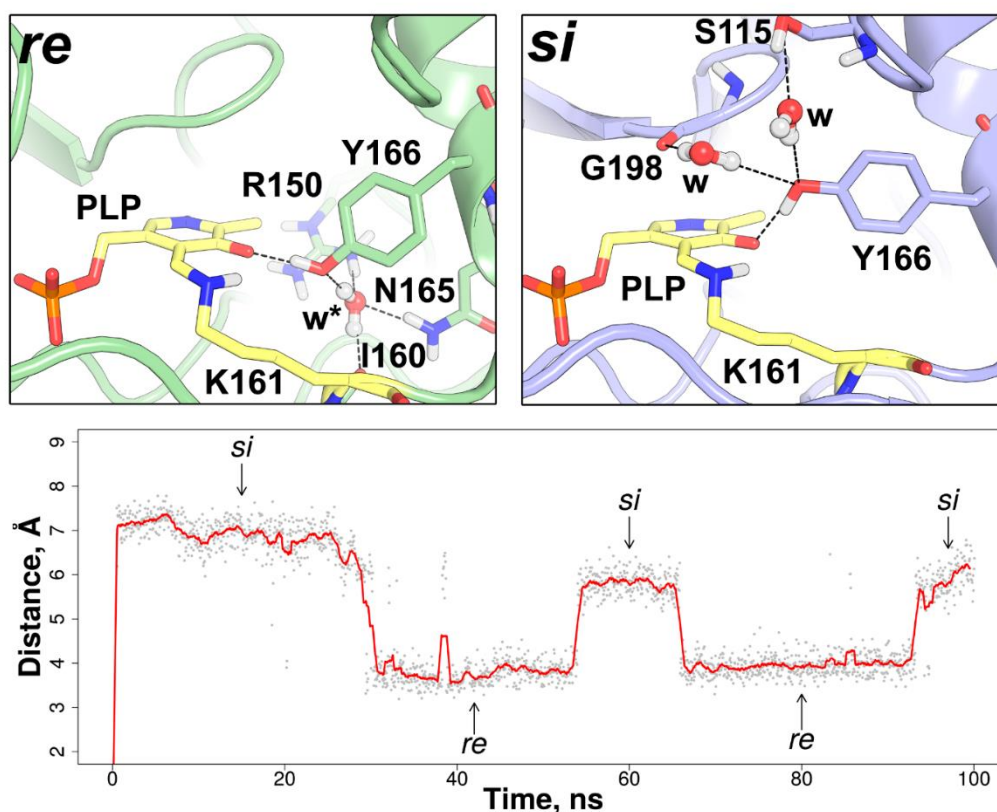


Рис. 3.47. Ориентация остатка Tyr166, проанализированная методами молекулярной динамики (MD) в течение 100 нс при 300К. Вид активного центра с молекулой PLP с Tyr166 в *si* и *re* ориентации. Отмечены “w” – молекулы воды, и “w\*” означает молекулу воды, положение которой в структуре в процессе MD совпадает с положением в кристаллической структуре. На графике представлено изменение в расстоянии между атомом кислорода гидроксильной группы Tyr166 расстояние служит индикатором, *si* или *re* состояния Tyr166. Серые точки обозначают фактические значения расстояния, наблюдаемые в течение 100 нс. Красная линия построена по усредненным значениям за 1 нс.

На *re* стороне кофактора ОН группа Tyr166 координирована с кристаллографической молекулой воды, которая располагается глубоко в сайте связывания PLP и координирована остатками Arg150, Ile160 и Asn165. С *si* стороны кофактора боковая цепь Tyr166 стабилизируется динамической сетью молекул воды, которые могут образовывать водородные связи с Ser155 и Gly198.

В настоящее время среди депонированных в базе данных PDB структур TA IV типа укладки 15% моделей имеют эквивалентный остаток Tyr на *si* стороне кофактора и 85% структур – на *re* стороне. Следует отметить, что в структуре GEO1900 (PDB код 5E25, субъединица C) эквивалентный Tyr156 находится в двух положениях. Полученные результаты указывают на высокую мобильность боковой цепи Tyr166 в TaTT и его гомологах, подтверждая гипотезу о каталитической роли этого остатка, которая состоит во взаимодействии с высвободившимся каталитическим лизином после образования внешнего альдимины, тогда как состояние *si* соответствует комплексу Михаэлиса с субстратом [178,182].

### **3.5.5. Исследование активного центра трансаминазы TaTT методом направленного мутагенеза**

Для уточнения роли остатков, формирующих активный центр, в реализации смешанного типа активности TaTT (по VCAT-типу и по R-TA-типу) было выполнено исследование с применением направленного мутагенеза. Описанные в 2010 году М. Хоне (M. Hohne) и соавторами [193] два характеристических мотива специфичны для каждого из трех канонических семейств трансаминаз IV типа PLP укладки (Таблицы 1.1, 3.18). Показанная взаимосвязь "последовательность-функция" ставит вопрос о возможности изменить специфичность трансаминазы путем замены остатков характеристических мотивов при сохранении универсальной для трансаминаз IV типа PLP-укладки трехмерной структуры. К. Восс (K. Voss) с соавторами [396] попытался изменить активные центры канонических eVCAT и bsDAAT для достижения активности по типу R-TA. Неплохой результат был достигнут только с bsDAAT: вариант bsDAAT с шестью заменами остатков в активном центре проявлял удельную активность 0.33 U/мг в реакции между R-PEA и пируватом, но утратил природную активность в реакции с D-аминокислотами (скорость природных R-TA в реакции с R-PEA находится в диапазоне 0.1-10 U/мг

[157,159]). Замены в характеристических мотивах eBCAT не привели к появлению активности с R-PEA. И bsDAAT, и eBCAT – узкоспецифичные ферменты, возможно поэтому изменение специфичности оказалось малоэффективным. Задача изменить специфичность ТаТТ, повысить ее эффективность в реакциях по R-ТА-типу отличалась принципиально иным подходом к проблеме изменения специфичности трансаминаз: для ТаТТ предлагалось сузить специфичность фермента с широкой до активности с (R)-первичными аминами. Смешанный тип активности у ТаТТ является результатом изменений в характеристических мотивах последовательности (Таблица 1.1, Рис. 3.46). Эти изменения, очевидно, затронули систему водородных связей и зарядов в активном центре и, по-видимому, ослабили жесткую BCAT-подобную организацию Р-кармана и увеличили гидрофобность О-кармана ТаТТ, тем самым способствуя связыванию ароматических L-аминокислот и фенильного, и метильного фрагментов R-PEA. Введение дополнительных замен в активный центр ТаТТ с целью имитации активного центра R-ТА показалось результативным. Заданное направление исследований позволяло ответить на несколько вопросов: (1) является ли ТаТТ переходной формой между каноническими BCAT и R-ТА, (2) возможно ли улучшить R-ТА-подобную активность ТаТТ, (3) какова роль ключевых остатков активного центра ТаТТ в реализации смешанного типа активности.

Общий план эксперимента по замене остатков в активном центре ТаТТ представлен на Рис 3.48. Замена подлежали остатки в позициях, которые с высокой вероятностью не участвуют в поддержании трехмерной структуры ТаТТ. Выбор позиций для мутагенеза проводился по результатам сравнения активных центров ТаТТ и гомологичных BCAT и R-ТА. Позиции для замен представлены в Таблице 3.24. Замены были введены как отдельно в Р-карман и О-карман, так и в оба кармана одновременно (Рис 3.48). *Здесь и далее мутации прописаны однобуквенным кодом.* Стратегию мутагенеза в Р-кармане можно характеризовать как последовательное замещение в позициях, где располагаются ключевые для активности по BCAT-типу остатки, на остатки, которые наиболее часто встречаются в этих позициях у канонических R-ТА. В О-кармане стратегия замен включала как добавление важных для R-ТА типа активности остатков, так и замещение остатков, характерных для BCAT на остатки, характерные для R-ТА. Эффекты замен были проанализированы в режиме полной реакции (Таблица 3.25) и в режиме полуреакции (Таблица 3.26).

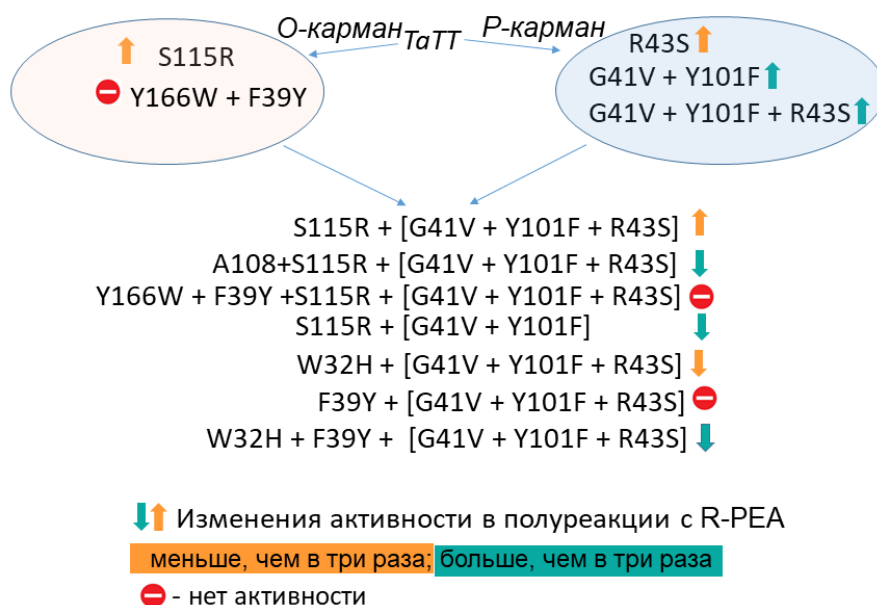


Рис. 3.48. Общий план эксперимента по замене остатков в активном центре ТаТТ.

Удельная активность в полной реакции, катализируемая вариантами ТаТТ представлена в Таблице 3.25. Были проанализированы изменения активности ТаТТ в реакции между L-лейцином и  $\alpha$ -кетоглутаратом (активность по типу ВСАТ) активность в реакции между R-РЕА и  $\alpha$ -кетоглутаратом (катализируется только ТаТТ) и активность между R-РЕА и пируватом (по типу R-ТА). Предложенные замены привели к снижению всех типов активности ТаТТ в полной реакции, при этом активность по ВСАТ типу оказалась наиболее восприимчивой к изменениям. В реакции R-РЕА +  $\alpha$ -кетоглутарат активность вариантов mP1 и mP2 оказалась сопоставима с активностью WT ТаТТ. Кроме того, наблюдалось увеличение активности по R-ТА типу при pH 7.0: вариант mP3O1 (Таблица 3.25) активнее в реакции с R-РЕА при pH 7.0, чем при pH 9.0. Введение двойной замены (Y166W + F39Y) оказалось фатальным для всех видов активности (см. mO4 и mP3O4 в Таблицах 3.25 и 3.26). Следует отметить, что полученные значения *Tm* вариантов ТаТТ выше 82 °С указывают на сохранение термостабильности ТаТТ при введенных заменах: ни одна из замен не нарушила структурную целостность ТаТТ.

Для дальнейшей детализации эффектов замен на активность ТаТТ по R-ТА типу были определены кинетические параметры полуреакций с R-РЕА при pH 8.0 и 9.0 (pH 9.0 является оптимальным для ТаТТ в реакциях с R-РЕА, pH 8.0 является оптимальным для ТаТТ в реакциях с L-аминокислотами).



Таблица 3.24. Аминокислотные остатки в специфических позициях подсемейств(СПП) ВСАТ и R-ТА, показанные на примере структур ВСАТ из *E. coli* and R-ТА из *A. fumigatus*. Позиции замен в последовательности ТаТТ выделены жирным шрифтом. *Здесь остатки прописаны однобуквенным кодом.* Остатки из соседней субъединицы отмечены \*.

Части активного центра:	BCAT из <i>E. coli</i> , (PDB ID: 1IYE)	R-ТА из <i>A. fumigatus</i> , (PDB ID: 4CHI)	ТаТТ (PDB ID: 6GKR)
<b>Р-карман:</b>			
СПП	G39 R40 G256	V60 -	<b>G41</b> <b>R43</b> G259
Элементы структуры:	A259	G276	A262
сайты связывания αСООН	R40 + <sup>256</sup> GТАА <sup>259</sup> Y99 + R97		R43 + <sup>259</sup> GТНА <sup>262</sup> <b>Y101</b>
β-поворот	<sup>256</sup> GТАА <sup>259</sup>	<sup>273</sup> ТТАG <sup>276</sup>	<sup>259</sup> GТНА <sup>262</sup>
междоменная петля	<sup>125</sup> PWGAYLGAEALE <sup>136</sup>	<sup>144</sup> PYIWVMAPENQL <sup>155</sup>	<sup>130</sup> PAVSRLEEDFS <sup>140</sup>
<b>-карман:</b>			
СПП	Y31* F36 R97 -	H53* Y58 -	S34* <b>F39</b> M103 <b>S115*</b>
Элементы структуры:	Y164	W183	<b>Y166</b>
сайт связывания αСООН	-	R126*	-
Левая сторона/дно	H27*, H30*, F36, R97, M107*, L109*, G161, Tyr164	F51*, M52*, H53*, Y58, E115, I117, L181, W183	W31*, <b>W32*</b> , <b>F39</b> , M103, L105, L163, <b>Y166</b>
О-петля* (от соседней субъединицы)	<sup>103</sup> GДVGMGVNPPAGYS <sup>116</sup>	<sup>121</sup> GLTGVRGSKPEDLY NN <sup>136</sup>	<sup>110</sup> GNKAFSVVGDR <sup>120</sup>
<b>Координация PLP:</b>			
Фенильной группы			
Атома N1	Y164 F36	W183 Y58	<b>Y166 F39</b>
Фосфатной группы	E193 R59 I220 T221 T257	E212 R77 I237 T238 T274	E195 R64 I222 T223 T260

Параметры полуреакций с разными вариантами ТаТТ собраны в Таблице 3.26. Увеличение активности наблюдались при обоих значениях pH; более эффективное связывание R-PEA и насыщение наблюдались преимущественно при pH 9.0. Наибольшая специфичность к R-PEA наблюдалась в полуреакции с вариантом mP3O1: три замены в Р-кармане вместе с заменой S115R в О-петле улучшили как продуктивное связывание R-PEA, так и эффективность переноса аминокислотной группы. Примечательно, что достигнутый эффект не был суммой эффектов отдельных замен в Р-кармане (mP1 + mP2) и О-кармане (mO1); скорее, это был кумулятивный эффект четырех замен (G41V + Y101P + R43S + S115R).

Таблица 3.25. Варианты ТаТТ и их начальная активность в полной реакции трансаминирования между R-PEA и пируватом, R-PEA и  $\alpha$ -кетоглутаратом, L-лейцином и  $\alpha$ -кетоглутаратом. Замены в О-кармане отмечены коричневым. Замены в Р-кармане отмечены синим. Варианты с заменами в Р-кармане обозначены как mP1-mP3; варианты с заменами в О-кармане обозначены mO1-mO2; варианты с заменами в обоих карманах обозначены mPxOx, соответственно. Наблюдаемая температура плавления ( $T_m$ ) определена методом Термофлюор.

ТаТТ	Замены	Удельная активность, U/мг			$T_m$ , °C
		R-PEA + пируват <sup>a</sup>	R-PEA + $\alpha$ -кетоглутарат <sup>a</sup>	L-лейцин + $\alpha$ -кетоглутарат <sup>b</sup>	
WT	нет	0.124 ± 0.005 <i>0.004 ± 0.001<sup>c</sup></i>	0.147 ± 0.003 <i>0.002 ± 0.001<sup>c</sup></i>	40 ± 5 <i>23 ± 6*</i>	88.0 ± 0.6
mP1	<b>R43S</b>	0.095 ± 0.004	0.14 ± 0.01	0.79 ± 0.02	85.8 ± 0.4
mP2	<b>G41V + Y101F</b>	0.004 ± 0.001	0.16 ± 0.01	n.d.	84.2 ± 0.3
mP3	<b>R43S + G41V + Y101F</b>	0.004 ± 0.001 <i>0.008 ± 0.001<sup>c</sup></i>	0.018 ± 0.006 <i>0.008 ± 0.001<sup>c</sup></i>	n.d.	86.2 ± 0.2
mO1	<b>S115R</b>	0.112 ± 0.005	0.064 ± 0.003	1.8 ± 0.4	n.m.
mO2	<b>Y166W + F39Y</b>	n.d.	n.d.	n.d.	83.9 ± 0.2
mP2O1	<b>G41V + Y101F + S115R</b>	0.003 ± 0.001	0.004 ± 0.001	n.d.	n.m.
mP3O1	<b>R43S + G41V + Y101F + S115R</b>	0.003 ± 0.001 <i>0.012 ± 0.008<sup>c</sup></i>	0.024 ± 0.002 <i>0.066 ± 0.003<sup>c</sup></i>	n.d.	82.9 ± 0.4
mP3O3	<b>R43S + G41V + Y101F + S115R + A108</b>	<i>0.007 ± 0.002<sup>c</sup></i>	n.d.	n.m.	n.m.

Таблица 3.23. Продолжение.

mP3O4	<b>R43S + G41V + Y101F + S115R + Y166W + F39Y</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.m.
mP3O5	<b>R43S + G41V + Y101F + W32H</b>	n.m.	0.008 ± 0.001	n.d.	n.m.
mP3O6	<b>R43S + G41V + Y101F + F39Y</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.m.
mP3O7	<b>R43S + G41V + Y101F + F39Y + W32H</b>	n.m.	0.003 ± 0.001	n.d.	n.m.

<sup>a</sup> начальная активность определена при pH 9.0 ацетофеноновым методом;

<sup>b</sup> начальная активность определена при pH 8.0 GDH методом;

<sup>c</sup> реакцию проводили при pH 7.0 (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 50 °C);

n.m. = не измеряли;

n.d. = не определяется. Предел обнаружения ацетофеноновым методом составляет 0.0001 U/мг. Предел обнаружения методом GluDH составляет 0.08 U/мг.

Таблица 3.26. Активность в полуреакции с R-PEA вариантов *TaTT* в PLP форме. Замены в О-кармане отмечены коричневым. Замены в Р-кармане отмечены синим. Варианты с заменами в Р-кармане обозначены как mP1-mP3; варианты с заменами в О-кармане обозначены mO1-mO2; варианты с заменами в обоих карманах обозначены mPxOx, соответственно.

TaTT	Замены	pH 8.0, Tris-HCl буфер, 30 °C			pH 9.0, Ches буфер, 40 °C		
		$k_{\max}$ , s <sup>-1</sup>	Kd, mM	$k_{\max}/Kd$ , s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup>	$k_{\max}$ , s <sup>-1</sup>	Kd, mM	$k_{\max}/Kd$ , s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup>
WT	No	0.030 ± 0.001	82 ± 6	0.36 ± 0.03	0.073 ± 0.004	81 ± 8	0.9 ± 0.1
mP1	R43S	0.030 ± 0.002	110 ± 13	0.27 ± 0.04	n.m.	n.m.	n.m.
mP2	G41V + Y101F	Нет насыщения		2.1 ± 0.5	0.28 ± 0.02	13 ± 2	20 ± 3
mP3	R43S+ G41V + Y101F	Нет насыщения		10.0 ± 0.5	0.15 ± 0.01	2.6 ± 0.4	60 ± 10
mO1	S115R	0.050 ± 0.004	48 ± 8	1.0 ± 0.2	0.011 ± 0.001	3.3 ± 1.2	3.3 ± 1.2
mO2	Y166W + F39Y	n.d.		n.d.		n.d.	n.d.
mP2O1	G41V + Y101F + S115R	Нет насыщения		5.7 ± 0.2	n.m.	n.m.	n.m.
mP3O1	R43S + G41V + Y101F + S115R	Нет насыщения		35 ± 1	0.13 ± 0.01	1.5 ± 0.5	90 ± 30
mP3O3	R43S + G41V + Y101F + S115R + A108	0.9 ± 0.2	101 ± 22	9 ± 3	n.m.	n.m.	n.m.
mP3O4	R43S + G41V + Y101F + Y166W + F39Y	n.d.		n.d.		n.d.	n.d.
mP3O5	R43S + G41V + Y101F + W32H	Нет насыщения		6.5 ± 0.8	n.m.	n.m.	n.m.
mP3O6	R43S + G41V + Y101F + F39Y	n.d.		n.d.		n.d.	n.d.
mP3O7	R43S + G41V + Y101F + F39Y + W32H	0.011 ± 0.001	44 ± 8	0.25 ± 0.05	n.m.	n.m.	n.m.

Другие замены в О-кармане в сочетании с тремя заменами в Р-кармане были неуспешными. Двойная замена (Y166W + F39Y) инактивировала ТаТТ. Замены W32H и F39Y (в mP3O5, mP3O6 и mPeO7) также инактивировали ТаТТ. Для варианта mP3O1 при pH 7.0 (50 mM Tris-HCl, 40°C) зависимость скорости полуреакции от концентрации R-PEA не достигла насыщения; константа специфичности ( $k_{max}/K_D$ ) для R-PEA составили  $(2,6 \pm 0,2) \text{ c}^{-1}\text{M}^{-1}$ , что в 30 раз хуже, чем при pH 9.0. Для WT ТаТТ при pH 7.0 зависимость скорости полуреакции от концентрации R-PEA также не достигла насыщения, константа специфичности для R-PEA составила  $0.009 \pm 0.001 \text{ M}^{-1}\text{c}^{-1}$ , что в 300 раз хуже, чем специфичность варианта mP3O1. И, хотя при pH 7.0 комплекс Михаэлиса, по-видимому, не образуется, катализ сближением имеет место, и R-PEA эффективнее взаимодействует с PLP. Повышение активности mP3O1 в полной реакции с R-PEA при pH 7.0 (Таблица 3.25), по-видимому, относится к улучшению координации второго субстрата аминокцептора при нейтральном pH.

Для анализа структурных эффектов замен получены структуры двух вариантов: mP3 и mP3O1. Совмещение субъединиц в программе WinCoot показало, что ход полипептидной цепи обоих вариантов хорошо совпадает с WT ТаТТ: парное RMSD между C $\alpha$  атомами субъединиц не превысило 0.3 (Таблица 3.27). Основные различия обнаружены в положении О-петли и взаимодействиях между остатками этой петли и остатками Р-кармана и междоменной петли (Рис. 3.49).

Таблица 3.27. RMSD (Å) между C $\alpha$  атомами субъединиц WT ТаТТ и вариантов.

ТаТТ	WT	mP3	mP3O3
WT (PDB ID 6GKR)	-	0.267	0.286
mP3 (PDB ID 7NEA)	0.267	-	0.190
mP3O3 (PDB ID 7NEB)	0.286	0.190	-

В WT ТаТТ боковая группа Arg43 образует водородные связи с атомами основной цепи остатков His261 и Thr260 из  $\beta$ -поворота I <sup>259</sup>GTHA<sup>262</sup> и одновременно может образовывать водородные связи с карбонильными группами остатков Ala131 и Val132 из междоменной петли <sup>130</sup>PAVSRLEEDFS<sup>140</sup> (Рис. 3.49B).

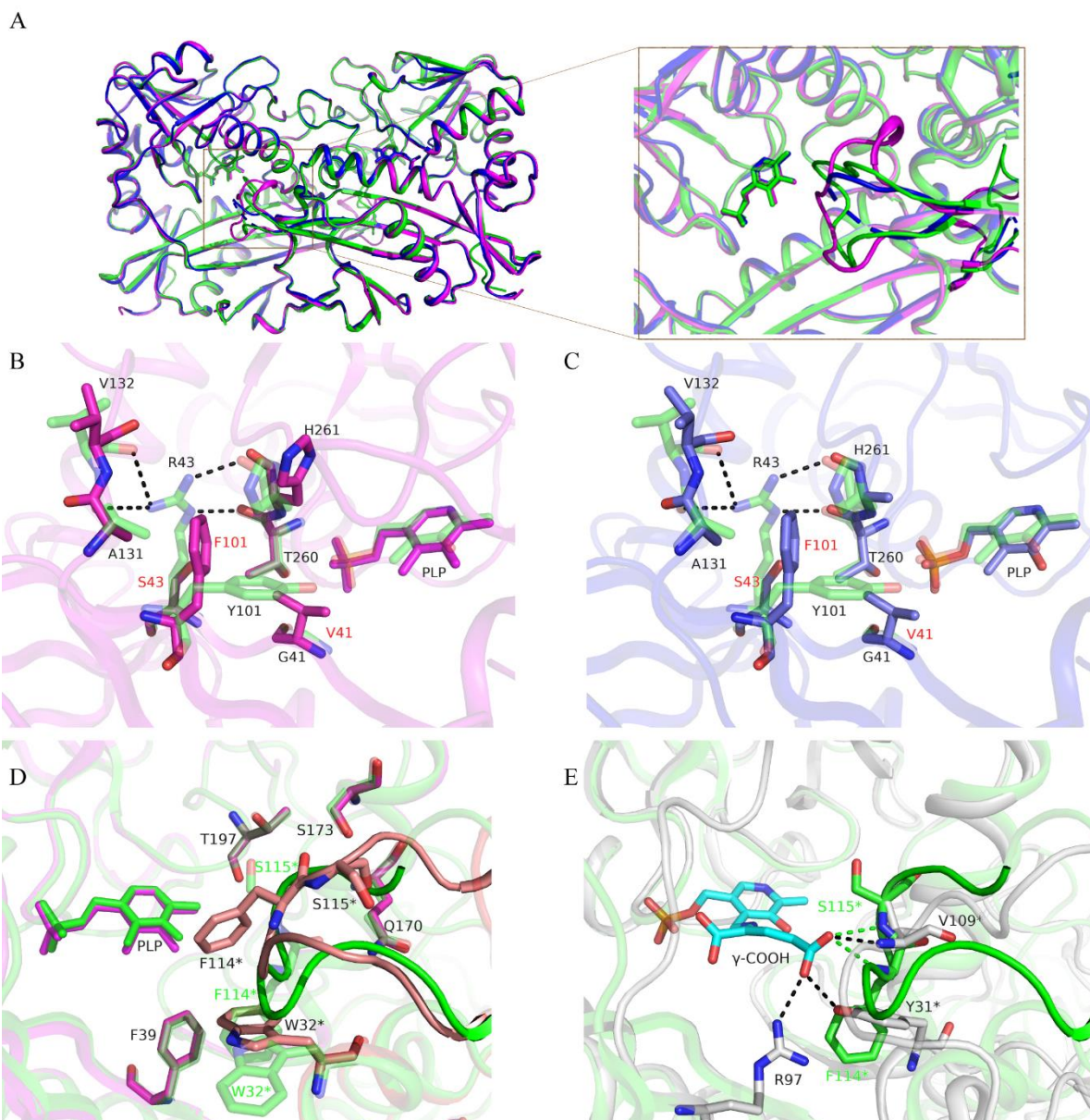


Рис. 3.49. Сравнение структур WT TaTT и вариантов mP3 и mP3O1. (А) Наложение димеров WT TaTT (зеленый), mP3 (пурпурный) и mP3O1 (синий). Молекулы PLP показаны в виде палочек. Вставка – увеличенное изображение области О-петли в О-кармане для демонстрации изменений в положении О-петли (остальная часть димера показана прозрачно для ясности). (В) Наложение активных центров WT TaTT (зеленый, прозрачный) и mP3 (розовый). Водородные связи показаны пунктирными линиями. Замены в mP3 показаны красным. (С) Наложение активных центров WT TaTT (зеленый, прозрачный) и mP3O1 (синий). (D) Сравнение положения О-петли в WT TaTT (зеленый) и mP3 (розовый). О-петля в mP3 окрашена в коралловый цвет. Остальная часть молекулы прозрачна. Остатки О-петли у WT TaTT подписаны зеленым и отмечены звездочкой (так как принадлежат соседней субъединице димера). Остатки mP3 подписаны черным. Остатки соседней субъединицы отмечены \*. (Е) Сравнение связывания  $\gamma$ -COOH группы  $\alpha$ -кетоглутарата в BCAT из *E.coli* (белый, PDB код 1IYE) и WT TaTT (зеленый).  $\alpha$ -Кетоглутарат, ковалентно связанный с молекулой PLP, показан голубым цветом. Соответствующие водородные связи показаны пунктирными линиями.

Другими словами, остаток Arg43 формирует и сайт связывания  $\alpha$ -COOH в Р-кармане через водородные связи с атомами основной цепи  $\beta$ -поворота I, и вход в активный центр, фиксируя междоменную петлю. Мутация R43S в обоих вариантах привела к смещению  $\beta$ -поворота и междоменной петли в сторону активного центра: примерно на 0.6 Å между соответствующими C $\alpha$  атомами His261 и Val132 (Рис. 3.49В,С). В WT ТаТТ боковая группа Arg43 участвует в катион- $\pi$  взаимодействии с His261. Замена боковой цепи Arg43 и, как следствие, отсутствие водородных связей и прочих взаимодействий привела к увеличению подвижности боковой цепи His261 в обоих вариантах, что отражается в высоком В-факторе (mP3) или даже в отсутствии электронной плотности для боковой цепи (mP3O1) (Рис. 3.49С). В обоих вариантах при замене Y101F боковая цепь фенилаланина оказалась развернутой почти на 180 ° из Р-кармана и приняла конформацию, индуцированную заменами R43S и G41V (Рис. 3.49В, С). Замена R43S создала полость для боковой группы фенилаланина, а боковой остаток валина (замена G41V) вытеснил боковую цепь F101 в эту полость.

Кроме того, наблюдаются значительные изменения конформации О-петли у вариантов mP3 и mP3O1 (Рис. 3.49А). В mP3O1 О-петля частично разупорядочена (остатки 113-117 не имеют четкой электронной плотности). По сравнению с WT ТаТТ, в mP3 в положении О-петли отсутствуют некоторые стабилизирующие водородные связи: между атомом O\_Ser115\* и боковыми группами Thr197 и Ser173, а также между атомом O\_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. 3.49D). В WT ТаТТ остаток Phe114\* расположен напротив остатка Phe39 и участвует в стэкинг взаимодействии с Trp32\*, тогда как в варианте mP3 боковая группа Trp32\* занимает позицию остатка Phe114\* WT. Стоит отметить, что ориентация боковой цепи Trp32\* и конформация О-петли взаимосвязаны. Мутация S115R в О-петле индуцировала ее разупорядочение и увеличила подвижность боковой группы Trp32\*. В mP3O1 (mP3 + S115R) Trp32\* имеет две конформации: одна конформация как в mP3, а другая уникальна и занимает позицию основной цепи О-петли из WT ТаТТ. Таким образом, введенные замены привели к изменениям в активном центре, в том числе к увеличению гидрофобности и увеличению подвижности  $\beta$ -поворота Р-кармана и О-

петли в О-кармане. Прделанная работа показала, что введение замен в активный центр ТаТТ с целью имитации активного центра R-ТА не приводит к усилению R-ТА-подобной активности и ТаТТ – уникальный фермент, который не является переходной формой между ВСАТ и R-ТА.

Роль отдельных остатков активного центра ТаТТ в реализации активности по смешанному типу можно сформулировать следующим образом. В канонических ВСАТ Р-карман содержит два сайта связывания  $\alpha$ -СООН группы: один сформирован фенильной группой остатка тирозина из  $\beta$ Y-тяжа (Tyr101 в ТаТТ, Tyr95 в eBCAT), поляризованной соседним консервативным остатком аргинина (Arg97 в eBCAT), другой – формируется атомами основной цепи  $\beta$ -поворота, поляризованными другим консервативным остатком аргинина из  $\beta$ X-тяжа (Arg43 в ТаТТ, Arg40 в eBCAT) (Рис. 3.45В). Мутация R43S вызывала резкое снижение ВСАТ-подобной активности ТаТТ, но не изменила R-ТА-подобной активности (Таблица 3.25). Двойная замена G41V + Y101F (вариант mP2) также вызвала снижение ВСАТ-подобной активности ТаТТ, но и вызывала значительное снижение активности ТаТТ в реакции R-PEA + пируват. Однако активность ТаТТ в реакции R-PEA +  $\alpha$ -кетоглутарат не изменилась. Эти наблюдения подтверждают значимость организации Р-кармана для реализации активности по ВСАТ типу и указывают на многоточечное связывание  $\alpha$ -кетоглутарата. Интересно, что Tyr101 неполяризован в ТаТТ, в отличие от идентичного остатка тирозина в канонических ВСАТ. Однако неполяризованный Tyr101, по-видимому, сохраняет способность координировать  $\alpha$ -СООН группу пирувата и L-лейцина. Тройная мутация G41V + Y101F + R43S (в mP3) разрушает связывание  $\alpha$ -СООН группы в ТаТТ и приводит к потере как ВСАТ-подобной, так и R-ТА-подобной активности. Однако тройная мутация улучшила сродство к R-PEA более чем в 60 раз.

Для варианта mP3O1, включающего тройную мутацию в Р-кармане и мутацию S115R в О-петле, показано самое высокое сродство к R-PEA. Одна мутация S115R также улучшила связывание R-PEA в WT ТаТТ. Улучшение, по-видимому, является результатом введения в О-карман положительного заряда, который повлиял на координацию R-PEA путем фиксации ее ароматической части на удалении от положительно заряженной боковой цепи R115\*. Все четыре замены



имитировали ключевые остатки в активном центре природных R-TA и, очевидно, оказались благоприятны для связывания R-PEA. Дальнейшая замена уникальных остатков ТаТТ W32H и F39Y на дне O-кармана на остатки R-TA в аналогичных позициях (в mP3O5, mP3O6 и mPeO7) только уменьшили сродство ТаТТ к R-PEA. Двойная замена Y166W + F39Y привела к потере активности ТаТТ как с L-лейцином, так и с R-PEA. Сравнительный анализ структур известных ВСАТ показал, что остаток тирозина (Tyr166 в ТаТТ) связан с остатком фенилаланина (Phe39 в ТаТТ) и эта пара важна для функции PLP и его координации. Координация PLP в ТаТТ реализуется аналогично каноническим ВСАТ (Рис. 3.50, 3.46В). Напомним, что остаток тирозина участвует в каталитическом превращении в ВСАТ и перемещается во время каталитического процесса с *si*-стороны PLP на его *re*-сторону, образуя разные водородные связи с другим участниками каталитического процесса. В R-TA другая пара остатков – триптофан и тирозин (Trp183 + Tyr58 в R-TA из *A. fumigatus* (Рис. 3.50)), по-видимому, координируют фенильную группу PLP через молекулу воды; однако их вклад в каталитический процесс у R-TA не уточнен. В то время как координация фосфатной группы PLP универсальна среди ТА IV типа PLP-укладки, взаимодействие с фенильной группой PLP, по-видимому, специфично для канонических семейств и согласованы с организацией O-кармана и, в конечном итоге, с субстратной специфичностью. Инактивация ТаТТ в результате двойной замены Y166W + F39Y (mP3O4 и mO4) подтвердила специфичность координации PLP. На структурном уровне инактивация ТаТТ, по-видимому, является результатом снижения подвижности введенных остатков триптофана и тирозина по сравнению с их аналогами в природных R-TA. В R-TA остаток триптофана (Рис. 3.50) расположен в петле рядом с  $\alpha$ -спиралью, тогда как аналогичная позиция в ТаТТ находится на  $\alpha$ -спирали. Упорядоченная  $\alpha$ -спираль, по-видимому, не позволяет остатку триптофана занимать правильное положение в вариантах mP3O4 и mO4. Вставка A108 в O-петлю в mP3O3 с целью удлинение O-петли по аналогии с природными каноническими R-TA также не увеличила активность ТаТТ по R-TA типу.

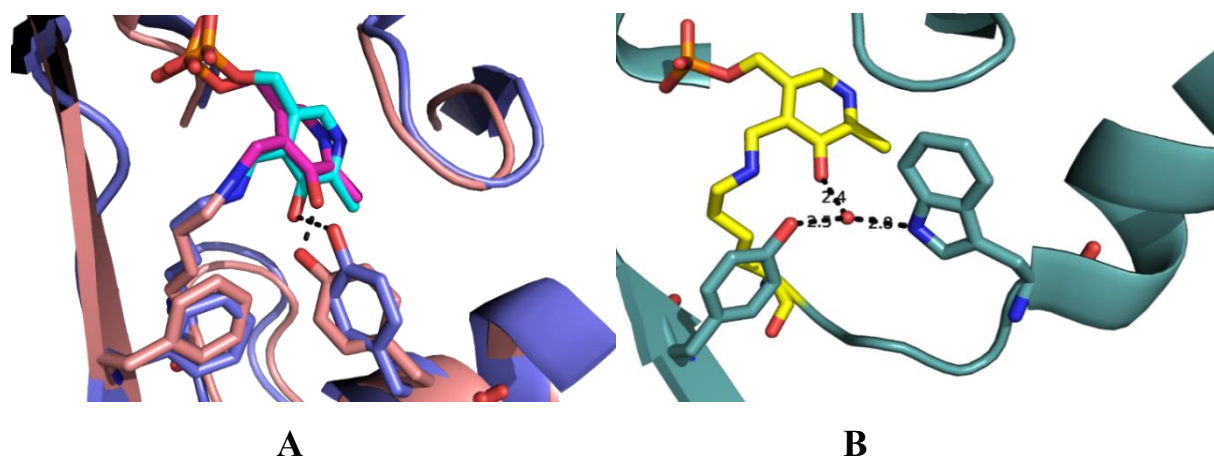


Рис. 3.50. (А) Положение остатков Tyr166 + Phe39 в ТаТТ (розовый, PDB код 6GKR) и в eBCAT (синий, PDB код 1IYK). (В) Положение остатков Trp183 + Tyr58 в R-TA из *Nectria haematococca* (PDB код 4CMD).

Эффективное связывание  $\alpha$ -кетоглутарата – отличительная особенность катализа ТаТТ,  $\alpha$ -кетоглутарат является лучшим субстратом, и его аминирование не лимитирует скорость общей реакции. Связывание  $\alpha$ -кетоглутарата в ТаТТ в целом воспроизводит связывание  $\alpha$ -кетоглутарата в канонических BCAT, за исключением координации группы  $\gamma$ -COOH. В канонических BCAT  $\gamma$ -COOH группа координируется остатком тирозина из  $\beta$ X-тяжа, остатком аргинина из  $\beta$ Y-тяжа и NH-группой основной цепи остатка лейцина (валина) из O-петли (PDB код 5E25, 1IYE). В ТаТТ  $\gamma$ -COOH группа, по-видимому, взаимодействует исключительно с NH группами основной цепи Phe114\* и Ser115\* из O-петли (Рис. 3.49E). Тройная мутация в Р-кармане вызывала значительный сдвиг O-петли с перестройкой водородных связей между O-петлей и структурными элементами, формирующими вход в активный центр. Следовательно, сайты связывания  $\alpha$ -кетоглутарата оказались нарушены в mP3. Более того, боковая цепь Phe114\* оказалась на потенциальном месте  $\gamma$ -COOH группы, что, по-видимому, воспрепятствовало правильному связыванию  $\alpha$ -кетоглутарата (Рис. 3.49D,E). Примечательно, что одиночная мутация S115R снижает активность ТаТТ в реакциях R-PEA +  $\alpha$ -кетоглутарат и L-лейцин +  $\alpha$ -кетоглутарат. Смещение O-петли, по-видимому, сделало аминирование  $\alpha$ -кетоглутарата скоростью лимитирующим процессом даже с таким «медленным» субстратом, как R-PEA. Полученные результаты подтвердили значительный вклад O-петли в продуктивное связывание  $\alpha$ -кетоглутарата и многоточечный характер этого связывания. Однако одиночная мутация S115R не

влияет на аминирование пирувата, предположительно из-за отсутствия сайтов связывания пирувата в О-кармане. В качестве имитации сайта связывания пирувата R-TA замена S115R в mP3 оказалась неудачной: продуктивное связывание пирувата в proD-положении (за счет координации  $\alpha$ -COOH группы с боковой группой R115\* из О-петли) не получилось. Анализ методом ВЭЖХ продуктов трансаминирования между R-PEA и пируватом, катализируемых mP3O1, выявил только L-аланин (Приложение 3).

Проведенная работа показала, что природа широкой субстратной специфичности ТаТТ является более сложной, чем просто комбинация остатков, специфичных для ВСАТ и R-TA, в одном активном центре. Другими словами, ТаТТ – это не «переходная форма» между ВСАТ и R-TA, а уникальный фермент. Активность ТаТТ в отношении R-PEA и высокая каталитическая эффективность с  $\alpha$ -кетоглутаратом и ВСАА достигаются за счет нескольких структурных факторов, включая уникальную комбинацию гидрофобных остатков в активном центре, отсутствие некоторых водородных связей, присущих каноническим ВСАТ, и особое положение О-петли, ее состав и взаимодействие с соседними остатками.

### **3.5.6. Стабильность трансаминазы ТаТТ в водно-органических средах**

Профиль ДСК ТаТТ представлен двумя калориметрическими доменами с температурами плавления ( $T_m$ ) 79.43 °C и 84.3 °C (Рис. 3.51А). Повторное сканирование ДСК показало необратимость термической денатурации ТаТТ. Анализ кинетической стабильности показал снижение активности ТаТТ на 50% только после 40 ч. инкубации при 70 °C и 150 ч. инкубации при 50 °C. То есть ТаТТ относится к термостабильным ферментам, поэтому интересно было оценить стабильность ТаТТ в водно-органических смесях.

Было обнаружено, что ТаТТ сохранял 100% активность после 24 ч. инкубации в 50% ДМСО и 70% активности после 24 ч. инкубации в 50% метаноле при 50 °C (Рис. 3.51В, С). Добавление 50% ДМСО или 50% метанола в реакционную смесь в реакции трансаминирования между L-лейцином и  $\alpha$ -кетоглутаратом при 50 °C снизило наполовину удельную активность ТаТТ. Напротив, добавление 15% метанола и 15% ДМСО привело к увеличению удельной активности в ТаТТ в

стандартной реакции в 1.5-1.6 раза. Также после 24 ч. инкубации в присутствии 15% метанола и 15% ДМСО при 50 °С ТаТТ сохранял исходную активность, то есть при низких концентрациях ДМСО и метанола нет денатурации ТаТТ и/или изменения в молекуле ТаТТ обратимы.

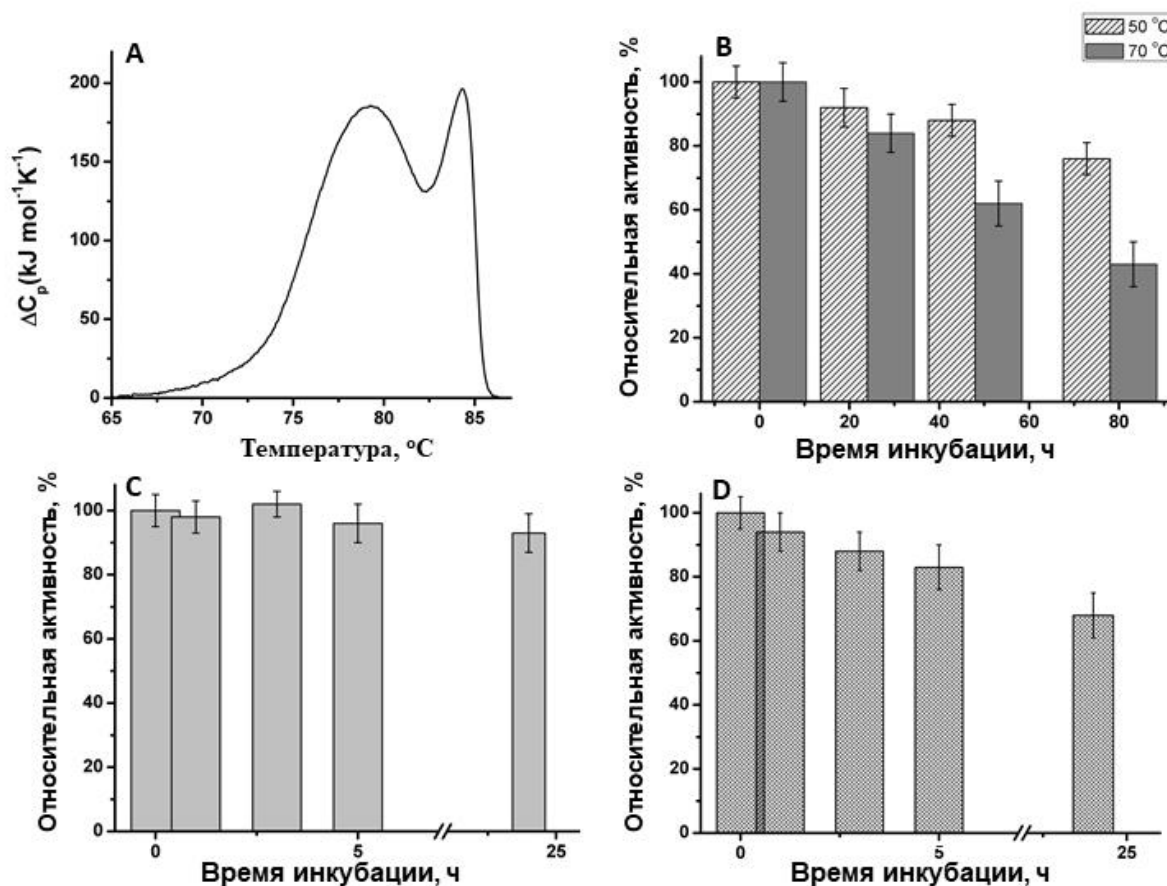


Рис. 3.51. Термостабильность ТаТТ. (А) ДСК профиль 1.0 мг/мл ТаТТ. (В)-(D) Остаточная активность ТаТТ после инкубации (В) в буфере S (50 мМ Tris-HCl, pH 8.0, содержащем 100 мМ NaCl, 60 μМ PLP) при 50 °С и 70 °С; (С) в буфере S с 50% ДМСО (v/v) при 50 °С; (D) в буфере S с 50% (v/v) метанола при 50 °С. 100% соответствуют 40 ± 4 U/мг в реакции трансаминирования между L-лейцином и α-кетоглутаратом.

При введении 15% метанола и 15% ДМСО в катализируемую ТаТТ реакцию трансаминирования между L-лейцином и α-кетоглутаратом наблюдается смещение оптимальной температуры реакции ( $T_{opt}$ ) в сторону низких температур и, как следствие, повышение активности ТаТТ при 50 °С, то есть в стандартном эксперименте (Рис. 3.52). Наблюдаемое снижение оптимальной температуры реакции, по-видимому, есть следствие структурных изменений в молекуле ТаТТ, или влияния растворителя на механизм реакции. Чтобы прояснить этот вопрос, были

определены кинетические параметры реакции трансаминирования в присутствии 15% ДМСО (ДМСО оказался совместимым с GDH методом, см. Раздел «Материалы и методы»). Добавление 15% ДМСО вызывало 1,5-кратное увеличение параметров  $V_m$  и  $K_m$  при 50 °С, при этом каталитическая эффективность к L-лейцину не изменилась (Таблица 3.28). Незначительные изменения кинетических параметров можно интерпретировать как сохранение свойств активного центра в присутствии растворителя.

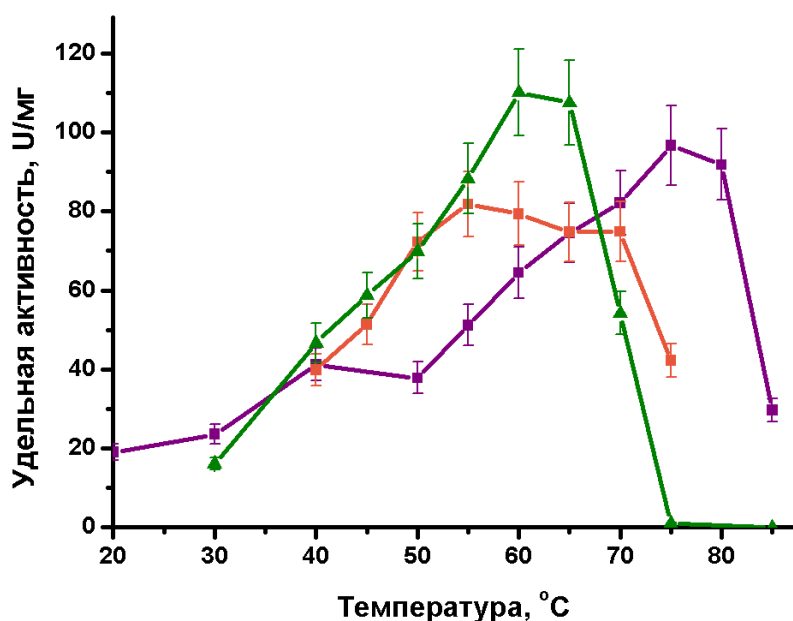


Рис. 3.52. Зависимость начальной активности ТаТТ в реакции трансаминирования между L-лейцином и  $\alpha$ -кетоглутаратом в 50 мМ Na-фосфатном буфере, рН 8.0, содержащем 50 мМ NaCl (фиолетовый), и при добавлении 15% DMSO (оранжевый) или 15% метанола (оливковый).

Таблица 3.28. Кинетические параметры реакции трансаминирования, катализируемой ТаТТ, при 50 °С.

	$V_{max}$ , U/мг	$K_m$ , мМ	$k_{cat}/K_m$ , с <sup>-1</sup> М <sup>-1</sup>
Буфер	178 ± 23	7.8 ± 2.3	13700 ± 4400
Буфер + 15% ДМСО	280 ± 40	12 ± 4	14000 ± 5000

Структурные изменения в молекуле ТаТТ в присутствии ДМСО и метанола были проанализированы методом триптофановой флуоресценции (Рис. 3.53А). Тепловую денатурацию ТаТТ наблюдали в присутствии 15% растворителя по изменению флуоресцентного сигнала на 313нм и 370 нм (соответствуют полувысоте

пика флуоресценции ТаТТ в буфере). Температура полуперехода  $T_{0,5}$  снизилась с 74.9 °С в буфере до 68.3 °С и 64,5 °С в буфере с 15% ДМСО и с 15% метанола соответственно. Примечательно, что в присутствии растворителей температурный диапазон тепловой денатурации ТаТТ расширился с ~ 10 °С в буфере до 20.5 °С и 22.5 °С в присутствии 15% ДМСО и 15% метанола. Эти наблюдения указывают на значительное снижение кооперативности теплового перехода ТаТТ в буфере с растворителями, что, по-видимому, есть следствие увеличения конформационной подвижности молекулы фермента, которое способствует протеканию структурных перестроек ТаТТ в более широком диапазоне температур. Кроме того, введение растворителя в буфер, по-видимому, снимает в молекуле ТаТТ некоторые структурные ограничения (жесткость), типичные для термостабильных ферментов при низких температурах.

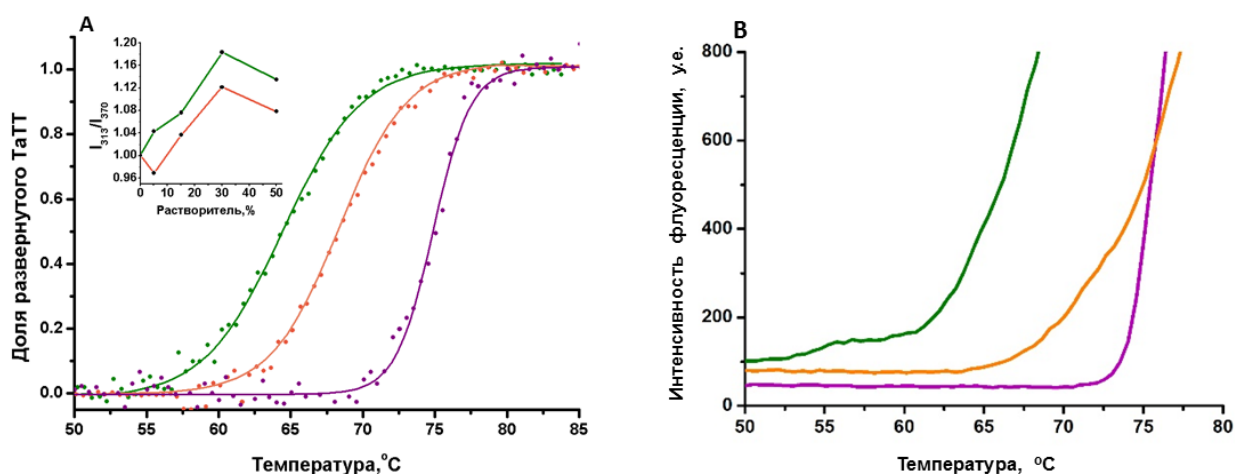


Рис. 3.53. А. Кривые тепловой денатурации ТаТТ в Na-фосфатном буфере (фиолетовый) и при добавлении 15% ДМСО (оранжевый) or 15% метанола (оливковый). Вкладка: зависимость отношения  $I_{313}/I_{370}$  для 0.1 мг/мл ТаТТ от доли (v/v) метанола (оливковый) и ДМСО (оранжевый) в Na-фосфатном буфере при 50 °С. В. Кривые светорассеяния ТаТТ.

Добавление 0-30% метанола или ДМСО вызывает голубой сдвиг в спектре флуоресценции триптофанов ТаТТ (вставка на Рис. 3.53А) при 50 °С, что означает изменение окружения остатков триптофана на более гидрофобное [282,375]. Добавление 30-50% растворителя вызвало красный сдвиг, который означает начало денатурации в результате ослабления нековалентных взаимодействий. Среди восьми остатков триптофана субъединицы ТаТТ все, кроме одного, экспонированы в буфер. Голубой сдвиг согласуется с представлением о том, что молекулы растворителя

проникают через гидратную оболочку белка, вызывая снижение плотности молекул воды вблизи гидрофобных остатков Trp и предпочтительную сольватацию остатков Trp (и аналогичным образом других доступных гидрофобных групп) молекулами растворителя [57,397,398]. Тепловая денатурация ТаТТ сопровождалась резким ростом светорассеяния, что указывало на агрегацию, сопровождающую разворачивание (Рис. 3.53В). Эти изменения, а также изменения термостабильности и активности ТаТТ, были более выражены в присутствии метанола. Вероятно, что это связано с большей гидрофобностью метанола ( $\log P = -0.74$ ) по сравнению с ДМСО ( $\log P = -1.35$ ). Как более гидрофобный растворитель метанол способствует эффективному разрушению гидрофобного ядра молекулы ТаТТ. Снижение температуры полуперехода в буферах с растворителями коррелирует со снижением оптимальной температуры реакции трансаминирования, что свидетельствует о единой причине наблюдаемых изменений. Таким образом, структурные изменения, вызванные растворителем, могут изменять конформационную подвижность фермента и, тем самым, регулировать жесткостью и гибкостью молекулы при субоптимальных температурах, то есть ниже 75 °С.

В контексте анализа эффектов органических растворителей на термостабильность ТаТТ и оптимальную температуру ферментативной реакции трансаминирования были проанализированы водородные связи в молекуле ТаТТ. Водородные связи – важный фактор стабильности в молекулах термостабильных ферментов и, по-видимому, разрушение водородных связей один из ключевых факторов денатурации белков в водно-органических смесях. Согласно недавним исследованиям, проникновение молекул растворителя в гидратную оболочку молекулы фермента нарушает поверхностные водородные связи из-за амфифильной природы растворителей (дипольный момент составляет 3.96 Д для ДМСО, 1.70 Д для метанола и 1.85 Д для воды) [47,397,399]. И ДМСО, и метанол могут взаимодействовать с атомами основной цепи и вытеснять молекулы воды с образованием новых водородных связей [47,399–401]. Проникший в гидратную оболочку ДМСО может взаимодействовать с доступными NH-группами основной цепи через свой атом кислорода [397]. Метанол, напротив, является донором водородных связей, который может образовывать водородные связи с карбонильной группой основной цепи молекулы белка [400]. В то же время ДМСО и метанол не

оказывают значительного влияния на водородные связи между атомами боковых групп и на солевые мостики [47,397,400]. Анализ водородных связей в функциональных димерах ТаТТ и ее гомологов показал, что ТаТТ отличается высоким содержанием поверхностных водородных связей, водородных связей, образованных боковыми группами заряженных остатков (солевые мостики), и удельным количеством водородных связей (Рис. 3.54).

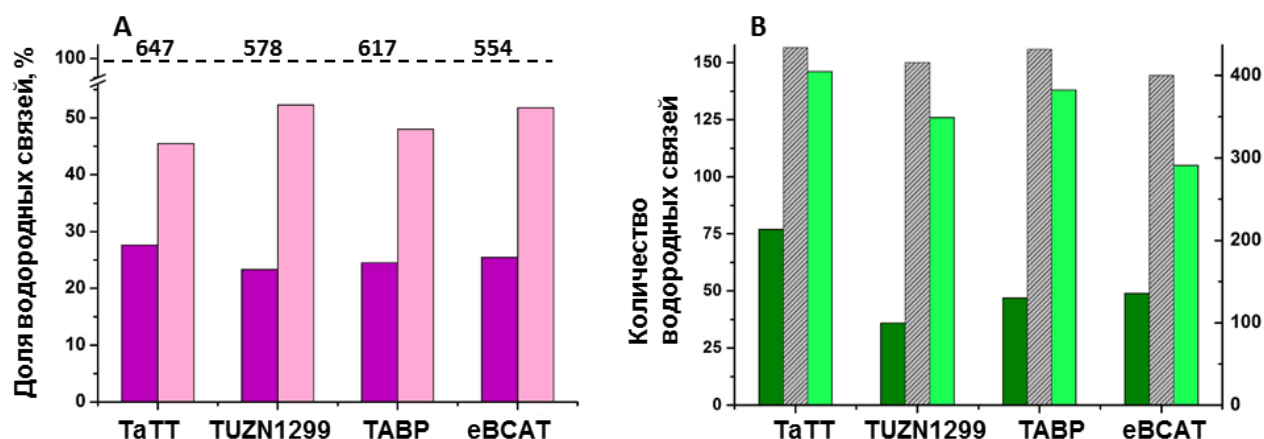


Рис. 3.54. Доля водородных связей в функциональных димерах ТаТТ (PDB код 6GKR) и его гомологов TUZN1299 (Toptm в стандартной реакции 95 °С, PDB код 5CE8), TABP из *B. pseudomallei* (Toptm неизвестен, организм растет при 40 °С, PDB код 3U0G) и eBCAT (Toptm в стандартной реакции 37 °С [180], PDB код 11K). (А) Доля поверхностных **Surface-Surface** (фиолетовый) и внутренних **Inside-Inside** (розовый) водородных связей (100%, общее количество водородных связей подчеркнуто пунктиром) в димерах; (В) Количество **Charged-Charged** водородных связей (зеленый, левая ось), **Charged-Neutral** (светло-зеленый, левая ось) и **Neutral-Neutral** (серый, правая ось) в димерах.

Примечательно, что во всех гомологичных димерах количество **Neutral-Neutral** водородных связей является наибольшим среди трех категорий. В то время, как солевые мостики устойчивы в водно-органических средах и поддерживают целостность как белковой глобулы, так и гидратной оболочки, поверхностные водородные связи **Neutral-Neutral** и **Charged-Neutral** восприимчивы к растворителю из-за взаимодействия молекул растворителя с атомами азота и кислорода основной цепи. Вызванные растворителем нарушения могут увеличить подвижность определенных участков поверхности и снять избыточное напряжение во фрагментах структуры фермента, которые важны для катализа. Таким образом, сочетание гидрофобных эффектов и нарушений водородных связей могут приводить к ослаблению некоторых структурных ограничений, присущих молекуле ТаТТ как



термостабильному ферменту при низких температурах. Эти изменения вызывают увеличение конформационной подвижности молекул ТаТТ и усиливают катализ при субоптимальных температурах.

Итого: голубой сдвиг спектра флуоресценции триптофана, по-видимому, свидетельствует о проникновении молекул растворителя в гидратную оболочку фермента. Анализ водородных связей ТаТТ выявил большое количество солевых мостиков и поверхностных водородных связей, среди которых водородные связи, образованные атомами азота и кислорода основной цепи. Солевые мостики стабилизируют белковые глобулы против атак «горячей» воды и денатурации органических растворителей, но водородные связи, образованные атомами азота и кислорода основной цепи, чувствительны к присутствию молекул растворителя и замыкаются на молекулы растворителя, что приводит к ослаблению некоторых ограничений, присущих термостабильным фермент при низких температурах. При 50 °С баланс между целостностью структуры и гибкостью молекулы ТаТТ не является оптимальным для катализа. Добавление растворителей, по-видимому, снимает некоторое напряжение в молекуле и оптимизирует ее конформационную подвижность, тем самым улучшая каталитические свойства фермента. В то же время, запас прочности молекулы ТаТТ предотвращает денатурацию ТаТТ в водно-органических смесях. Несмотря на сложность предсказания эффектов растворителей, их влияние на баланс стабильности и активности является полезным инструментом для настройки эффективности биокатализаторов в заданных условиях.

### **3.6. СПЕЦИФИЧНОСТЬ К ПЕРВИЧНЫМ (S)-АМИНАМ ТРАНСАМИНАЗЫ I ТИПА PLP-УКЛАДКИ ИЗ ХОЛОДОАКТИВНОЙ БАКТЕРИИ *Psychrobacter cryohalolentis***

#### **3.6.1. Общие сведения о трансаминазах 7,8-диаминопеларгоновой кислоты**

Выдвинутый Штефеном-Мюнсбергом и соавторами [157] тезис о том, что специфичность к (S)-первичным аминам является неотъемлемым свойством трансаминаз I типа укладки PLP-связывающего домена был проверен для

узкоспецифичной трансминазы 7,8-диаминопеларгоновой кислоты (EC 2.6.1.62) (7,8-diaminopelargonic acid aminotransferase (DAPA AT) или 7,8,-diaminopelargonic acid synthases или S-adenosyl-L-methionine:7-keto-8-aminoperlarginic acid TA (SAM:KAPA TA) или adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate TA). В этом разделе представлена структурно-функциональная характеристика трансминазы из *P. cryohalolentis* (Pcryo361), аннотированной как adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate transaminase (WP\_011512731.1). Pcryo361 относится к трансминазам I типа укладки PLP-связывающего домена. Суперсемейство трансминаз I типа PLP-укладки отличаются специфичностью к L-аминокислотам/(S)-аминам, *si*-ориентацией кофактора в активном центре и не столь очевидным делением активного центра на два кармана, как в структурах трансминаз IV типа PLP-укладки, хотя связывание боковой группы и  $\alpha$ -карбоксильной группы субстрата происходит по разные стороны кофактора. Целью проведенного исследования был анализ дополнительной активности к первичным (S)-аминам, кетонам и альдегидам у представителя узкоспецифичных DAPA-АТ – Pcryo361. Pcryo361 проявляла активность в реакции деаминирования с SAM (S-adenosyl-L-methionine), который является аминодонором узкоспецифичных DAPA АТ, а также с S-PEA и некоторыми альдегидами и дикетонами. На сегодня это первый анализ (S)-amine активности у DAPA АТ. Кроме фундаментального интереса к специфичности трансминаз с первичными аминами, в исследованиях был еще биотехнологический аспект: оценка возможности применения холодоактивной Pcryo361 в реакциях аминирования кетонов и альдегидов.

В природе DAPA АТ катализирует вторую стадию биосинтеза биотина: превращение (8S)-амино-7-кетопеларгоновой кислоты (KAPA, 8-амино-7-оксонаноат) в (7R,8S)-диаминопеларгоновую кислоту (DAPA) [402], где донором аминогруппы является SAM [403–405]. Охарактеризованные на сегодня немногие DAPA АТ, продукты экспрессии гена *bioA*, рассматриваются как узкоспецифичные TA, активные в отношении пары субстратов SAM и KAPA [403,404,406,407]. Исключением является DAPA АТ из *B. subtilis* [408], катализирующая аминирование KAPA с такими аминодонорами как L-лизин, D-лизин и S-2-аминоэтил-L-цистеин. Этот фермент на сегодня является единственным представителем подсемейства L-Lys:KAPA TA (EC 2.6.1.105). Катализируемое DAPA АТ трансаминирование –

стереоселективный процесс [403,404]: присоединение аминогруппы к КАРА идет в про-R положение, но донорная аминогруппа переносится от (S)-хирального центра SAM. Более того, для DAPA ТА из *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb DAPAS) показано, что, как полная реакция, так и обе полуреакции ингибируются энантиомером КАРА – (8R)-амино-7-оксононаноатом [409]. Т.е. фермент отличается высокой энантиоспецифичностью к природным субстратам. Скорость трансаминирования у DAPA АТ низкая. Так,  $V_m$  составила 15.8 мU/мг для DAPA ТА из *E. coli* и 21 мU/мг для Mtb DAPAS [403,404]. Для DAPA ТА из *E. coli*  $K_m$  для КАРА составила 1.2 мМ,  $K_m$  для SAM составила 0.15 мМ. Для Mtb DAPAS  $K_m$  для КАРА составила 3.8 мМ и  $K_m$  для SAM составила 0.78 мМ. Детальный анализ полуреакций DAPA ТА из *E. coli* показал, что деаминирования DAPA протекает эффективнее деаминирования SAM: константа специфичности фермента к DAPA в 15000 выше, чем к SAM [410]. Однако *in vivo* протекает только деаминирование SAM. Согласно биоинформатическому анализу, проведенному Штефен-Мюнсбергом и соавторами [157], уникальная специфичность к КАРА определяется у DAPA АТ следующим характеристическим мотивом –Tyr18-Tyr144-Asp147 + «подвижный» Arg391 (в нумерации DAPA ТА из *E. coli*). Стоит отметить, что у активных с аминами S-АТА нет остатка Asp в позиции, аналогичной этой характеристической для DAPA АТ позиции [157].

Выравнивание аминокислотной последовательности Pscyo361 с охарактеризованными DAPA ТА показало 51% идентичности с DAPA ТА из *E. coli*, 48% идентичности с Mtb DAPAS и 34% идентичности с DAPA ТА из *B. subtilis*.

### 3.6.2. Функциональная характеристика трансаминазы Pscyo361

Очищенный в одну стадию аффинной хроматографии Pscyo361 имеет УФ-видимый спектр, характерный для PLP-зависимых ферментов (Рис. 3.55). Из спектра очевидно, что S-PEA является субстратом для Pscyo361, а R-PEA – нет.

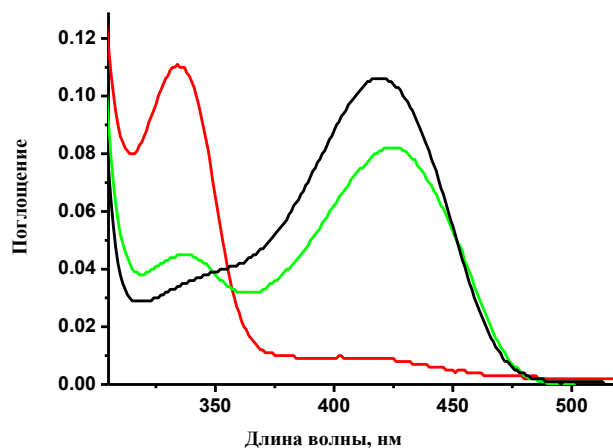


Рис. 3.55. Спектр поглощения 20  $\mu$ M Pscyo361 в 50 mM Na-фосфатном буфере, 100 mM NaCl, pH 7.9, (черный) и после добавления 4 mM S-PEA (красный), 4 mM R-PEA (зеленый). Черный спектр соответствует PLP-форме Pscyo361, красный – PMP-форме.

Поиск аминокислотных доноров Pscyo361 был проведен по полуреакциям. Поскольку общая реакция трансаминирования представляет собой сумму двух последовательных полуреакций, наиболее точную информацию о сродстве трансаминазы к субстрату можно получить из концентрационных зависимостей наблюдаемой константы скорости полуреакции, поскольку отсутствует ингибирование вторым субстратом и продуктом его полуреакции. В Таблице 3.29 представлены параметры полуреакции PLP-формы Pscyo361 с некоторыми аминокислотными донорами при двух значениях pH.

Наибольшую аффинность Pscyo361 проявляет к SAM. L-Lys не является эффективным аминокислотным донором, Pscyo361 не активен с  $\beta$ - и  $\gamma$ -аминокислотами. Специфичность фермента к S-PEA соизмерима со специфичностью к SAM при обоих pH. При pH 10.0 максимальная константа скорости полуреакции с S-PEA даже выше, чем с SAM. Константа специфичности Pscyo361 к S-PEA превышает более чем в 300 раз константу специфичности Pscyo361 к R-PEA. Таким образом, полученный спектр субстратов согласуется с принадлежностью фермента к подсемейству DAPA AT и, кроме того, указывает на эффективный, но единственный из набора аминокислотных доноров R-TA, аминокислотный донор S-PEA. Эта дополнительная неприродная активность будет далее охарактеризована в деталях.

Таблица 3.29. Параметры полуреакции Pcyo361 при 35 °С.

Аминодонор	$k_{\max}^{\text{half}}$ , $\text{с}^{-1}$	$K_D^{\text{half}}$ , мМ	$k_{\max}^{\text{half}}/K_D^{\text{half}}$ , $\text{с}^{-1} \text{мМ}^{-1}$
<b>В 100 мМ Na-бикарбонатном буфере, рН 10.0</b>			
SAM	$0.068 \pm 0.005$	$0.12 \pm 0.03$	$0.58 \pm 0.18$
L-лизин	$0.0029 \pm 0.0001$	$27.42 \pm 3.09$	$0.000105 \pm 0.000015$
S-PEA	$0.158 \pm 0.009$	$1.45 \pm 0.15$	$0.109 \pm 0.017$
R-PEA	$0.0016 \pm 0.0001$	$4.81 \pm 0.86$	$0.00034 \pm 0.00008$
1-метил-3-фенилпропиламин	ND	ND	
изобутиламин	ND	ND	
$\beta$ -аланин	ND	ND	
$\gamma$ -аминобутановая кислота	ND	ND	
<b>В 75 мМ Na фосфатном буфере, рН 8.0</b>			
SAM	$0.0177 \pm 0.0003$	$0.72 \pm 0.05$	$0.025 \pm 0.002$
L-лизин	$0.00044 \pm 0.00004$	$54.8 \pm 7.9$	$0.000008 \pm 0.000002$
S-PEA	$0.0101 \pm 0.0007$	$1.3 \pm 0.2$	$0.0079 \pm 0.0017$
R-PEA	ND	ND	ND

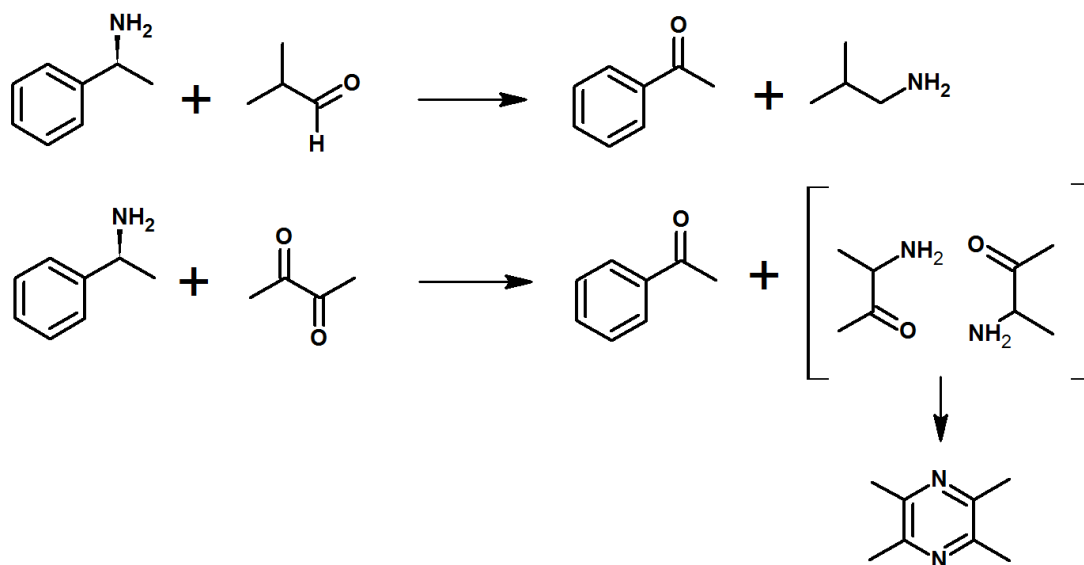


Схема IX. Схема полной реакции трансминирования, катализируемой Pcyo361 с аминодонором S-PEA и аминокцепторами 2-метилпропаналем и 2,3-бутандионом. Продукт аминирования 2,3-бутандиона далее димеризуется с образованием 2,3,5,6-тетраметилпиразина.

В Таблице 3.30 представлены значения удельной активности Pcryo361 в полной реакции трансминирования с альдегидами и  $\alpha$ -дикетонами и аминокетонами S-PEA. Активность определяли как в Na-фосфатном буфере, pH 8.0, так и при оптимальном pH 10.0, при котором, однако, наблюдалась значительная побочная реакция циклизации  $\alpha$ -дикетонов [411].

Таблица 3.30. Удельная активность Pcryo361 в полной реакции в двух разных условиях: неоптимальных (pH 8.0) и оптимальных (pH 10.0) при 35 °C.

Субстраты	pH 10.0		pH 8.0	
	Удельная активность, mU/мг	Относительная активность (%)	Удельная активность, mU/мг <sup>a</sup>	Относительная активность (%)
Аминодоноры				
S-PEA	132 ± 14	100	28.1 ± 3.7	
S-PPA	60 ± 4	45	28 ± 2	
R-PEA	ND	0	0	0
Аминоакцепторы				
2-метилпропаналь	132 ± 14	100	28.1 ± 3.7	
фенилметаналь <sup>a</sup>	236 ± 16	179	-	
гексан-2,3-дион <sup>b</sup>	238 ± 10	180	33.3 ± 2.3	
пентан-2,3-дион <sup>b</sup>	217 ± 16	164	28.5 ± 1.3	
бутан-2,3-дион <sup>b</sup>	173 ± 35	131	24.5 ± 0.3	
пентан-2,4-дион	0	0	0	
гексаналь	160 ± 11	121	24.7 ± 2.7	
2-оксо-2-фенилацеталь	68 ± 5	52		
2-окопропаналь	42 ± 4	32	26.9 ± 2.5	
пропаналь	48 ± 5	36	22.7 ± 2.5	
глиоксилат	42 ± 5	32		
2,3-дигидроксипропаналь	36 ± 7	27	16.7 ± 0.3	
2-оксобутират	0		0	
ацетон	0		0	
пируват	4 ± 2	3	0	
ацетофенон <sup>c</sup>	0	0	0	

<sup>a</sup> Бензальдегид 0.5 mM и 10 mM S-PPA. Количество образовавшегося пропиофенона детектировали HPLC.

<sup>b</sup> Наблюдается побочная неферментативная реакция - по-видимому, циклизация  $\alpha$ -дикетонов [411].

<sup>c</sup> Обратной реакции аминирования ацетофенона изобутиламином не наблюдается. При этом 2 mM ацетофенона не ингибирует активность фермента в полной реакции между S-PEA и isobutyraldehyde. 5.5 mM изобутиламина в тех же условиях снижают на 50% активность Pcryo361.

Активности с ацетофеноном и изобутиламином – это обратная реакция трансминирования между S-PEA и 2-метилпропаналем – не наблюдалась. Pcryo361 не проявлял активности к субстратам с карбоксильными группами, таким как  $\alpha$ -,  $\beta$ -,

$\gamma$ -аминокислоты и их кетоаналоги, к изопропиламину, 1,3-диметилбутиламину и 6-аминогексановой кислоте. Максимальная удельная активность Pcyo361 в реакции с S-PEA и 2-метилпропаналем наблюдалась в интервале pH 9.0 - 11.0 (Рис. 3.56А). Температурный оптимум этой реакции составил 35-42 °С (Рис. 3.56В). Таким образом, наилучшими из проанализированных аминокцепторов являются фениламетаналь и дикетоны. Однако специфичность фермента проявляется лучше в pH-оптимуме. Примечательно, что уровень активности Pcyo361 с S-PEA достигает уровня ранее охарактеризованных S-АТА [157,241].

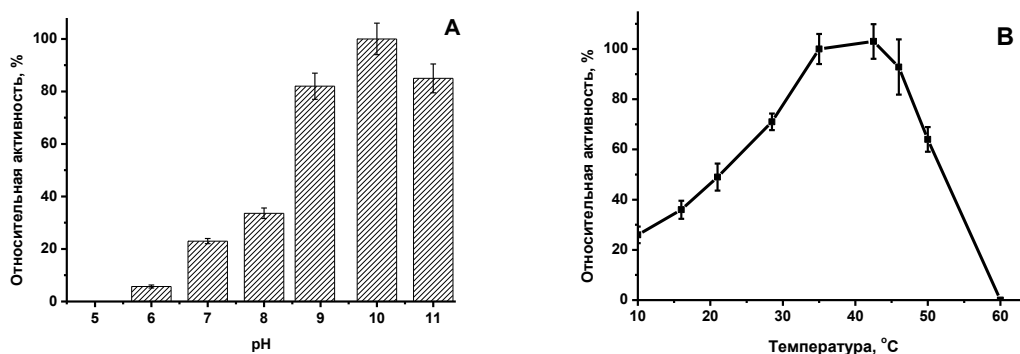


Рис. 3.56. (А) pH-зависимость реакции трансминирования, катализируемой Pcyo361 с 10 мМ S-PEA и 8 мМ 2-метилпропаналя при 35 °С. pH определяли, используя следующие буферы: 50 мМ Na - ацетат (pH 5.0), 50 мМ Na - фосфат (pH 6.0, 7.0, 8.0), 50 мМ Na - борат (pH 8.9), 100 мМ Na - бикарбонат (pH 10.0) и 50 мМ Gly/NaOH (pH 11.0). Все буферы (кроме бикарбонатного) содержали 100 мМ NaCl. pH буфером доводили при 25 °С. (В) Температурная зависимость полной реакции трансминирования в 100 мМ Na-бикарбонатном буфере (pH 10.0) с 10 мМ S-PEA и 10 мМ 2-метилпропаналя. 100% соответствует  $176 \pm 10$  мU/мг.

Из-за наличия двух кетогрупп в  $\alpha$ -дикетонах и существовании  $\alpha$ -дикетонов в кето- и кето-енольной формах возник вопрос о составе продуктов аминирования 2,3-бутандиона и 2,3-пентандиона. Анализ продуктов реакции (Схема IX) методом ГХ-МС показал только один продукт аминирования 2,3-бутандиона – 2,3,5,6-тетраметилпирозин ( $C_8H_{12}N_2$ ). Среди продуктов аминирования 2,3-пентандиона оказались гетероциклические ароматические органические соединения 2,6-диэтил-3,5-диметилпирозин и/или 2,5-диэтил-3,6-диметилпирозин ( $C_{10}H_{16}N_2$ ). По-видимому, аминирование дикетонов идет по одной кетогруппе с последующей димеризацией и окислительной ароматизацией образующихся  $\alpha$ -аминокетонов [208].

### 3.6.3. pH- и Термостабильность трансаминазы Pсгуо361

Анализ термостабильности Pсгуо361 проводили с учетом ранее определенных значений оптимальной температуры и pH реакции трансаминирования между S-PEA и 2-метилпропаналем. При оптимальных условиях реакции: 35 °С и pH 10.0, Pсгуо361 не стабилен (Рис. 3.57А), и период его полуинактивации составляет около 90 мин. Когда при pH 10.0 температуру реакции снизили до 5 °С, через 1 час наблюдалась стабилизация активности на уровне 70% от начального значения. Важно отметить, что значительная стабильность фермента была достигнута при снижении pH среды до 8.0 при оптимальной температуре реакции 35 °С. В этих условиях активность в общей реакции практически не снижалась в течение 24 ч. и 60% максимальной активности сохранялось через два дня. Очевидно, снижение температуры или pH стабилизируют активную конформацию Pсгуо361. Также важно отметить, что при 0 °С в карбонатном буфере, pH 10.0 фермент воспроизводимо сохраняет 10% активности в оптимальных условиях (Рис. 3.57А).

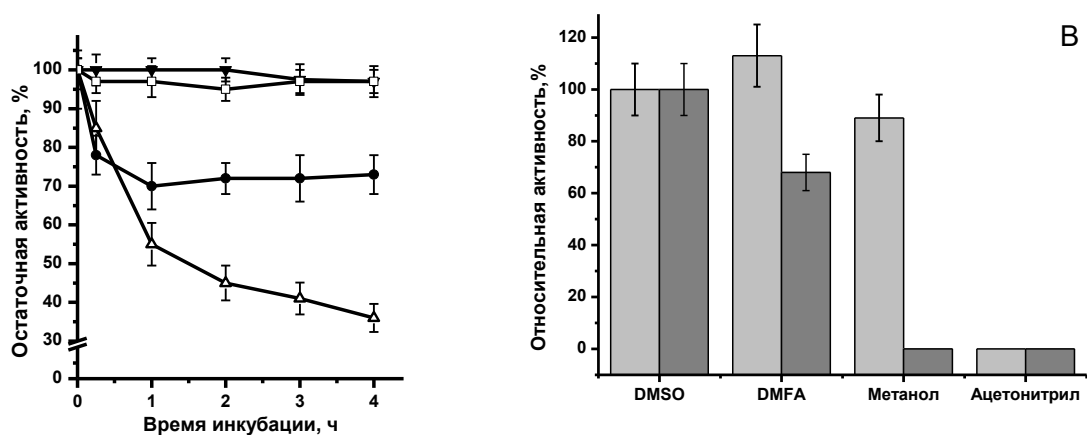


Рис. 3.57. (А) Влияние температуры на активность и стабильность Pсгуо361. Остаточная активность Pсгуо361 в полной реакции трансаминирования между 10 мМ S-PEA и 10 мМ изобутиральдегида после инкубации в 100 мМ Na - бикарбонатном буфере, pH 10.0, при 35 °С ( $\Delta$ ), 5 °С ( $\bullet$ ) и 0 °С ( $\blacktriangledown$ ) или после инкубации в 100 мМ Na - фосфатном буфере, pH 8.0, при 35 °С ( $\square$ ). Оба буфера содержали 30  $\mu$ M PLP, 100% активность соответствует  $196 \pm 12$  мU/мг ( $\Delta$ ),  $51 \pm 5$  мU/мг ( $\bullet$ ),  $18 \pm 2$  мU/мг ( $\blacktriangledown$ ),  $32 \pm 4$  мU/мг ( $\square$ ). (В) Стабильность Pсгуо361 в 75 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8.0, содержащем 25% растворителя при 35 °С. Остаточную активность измеряли через 3 ч. (серый) и 24 ч. (темно-серый) инкубации. 100% соответствуют исходной активности в буфере. Гидрофобность растворителя увеличивается ( $\log P$ ) в порядке DMSO<DMFA<метанол<ацетонитрил; индекс полярности снижается в порядке DMSO>DMFA>ацетонитрил>метанол



Наблюдаемый диапазон стабильности Pcryo361 совпадает с температурным диапазоном роста бактерии *P. cryohalolentis* от -10 °C до 30 °C [279]. Бактерия *P. cryohalolentis* K5 была изолирована из почв зоны вечной мерзлоты Сибири [279]. Ранее широкий температурный диапазон активности (0-80 °C) наблюдался для другой PLP-зависимой трансаминазы из *Soccosbacillus Psychrobacter sp.* B6 [412]. Авторы высказали предположение, что такие структурные особенности холодоактивных ферментов, как снижение доли остатков Arg в структуре (уменьшение соотношения Arg/(Arg+Lys)), а также дополнительные остатки Gly в неструктурированных областях активного центра, вместе с увеличением числа заряженных остатков и компактностью белковой глобулы [412–414], что обычно приписывается термостабильным ферментам [32,65], позволило трансаминазе поддерживать активность в широком диапазоне температур. В структуре Pcryo361 (PDB код 6ERK) соотношения Arg/(Arg + Lys) также снижено по сравнению с гомологичными DAPA AT из мезофильной *E. coli* (PDB код 1QJ5) и *M. tuberculosis* (PDB код 4WIW). Однако не было обнаружено увеличения заряженных остатков и особенностей в распределении остатков Gly. Активность Pcryo361 в щелочном диапазоне pH 8.0-11.0 (Рис. 3.56) при низкой температуре является перспективной для промышленного применения [234,415]. Мы предполагаем, что повышение pH-стабильности Pcryo361 в этом диапазоне может быть достигнуто за счет снижения температуры реакции, что также полезно для реакций с лабильными субстратами.

Состояние пространственной структуры фермента в разных экспериментальных условиях анализировали, сравнивая спектры собственной флуоресценции триптофанов 0,1 мг/мл Pcryo361 в буферах при pH 8.0 и 10.0 при 0 °C, 5 °C и 35 °C сразу после разбавления из концентрированного раствора и после 3 ч. инкубации (Рис. 3.58А,В). Красный сдвиг, который соответствует перемещению остатка триптофана в гидрофильную (водную) среду [375], наблюдался в спектре в карбонатном буфере, pH 10.0, при 35 °C (максимум флуоресценции триптофанов Pcryo361 сдвинулся с 332 нм на 337 нм после 3 ч. инкубации Рис. 3.58А). Обнаруженные изменения, по-видимому, и приводят к снижению активности Pcryo361. Инкубация в течение 3 ч. при 5 °C и 0 °C в карбонатном буфере не вызывала сдвига в спектрах триптофановой флуоресценции Pcryo361. Никаких изменений не наблюдалось и при инкубации в фосфатном буфере, pH 8.0, при 35 °C,

что подтвердило стабильность Rsgyo361 в этих условиях. Наблюдаемое уширение на полувысоте максимума при 5 °С и 0 °С в карбонатном буфере, рН 10.0, по сравнению со спектром при 35 °С можно приписать некоторым изменениям микрополярности окружения остатков триптофана, вызванное структурными различиями между функциональными димерами при разных температурах. Спектры при рН 8.0 и 10.0 при 35 °С имеют максимум на одной длине волны, но различаются по ширине (Рис. 3.58А). Этот результат также указывает на некоторые различия в состоянии остатков триптофана и некоторые структурные различия между активными конформациями фермента при разных значениях рН.

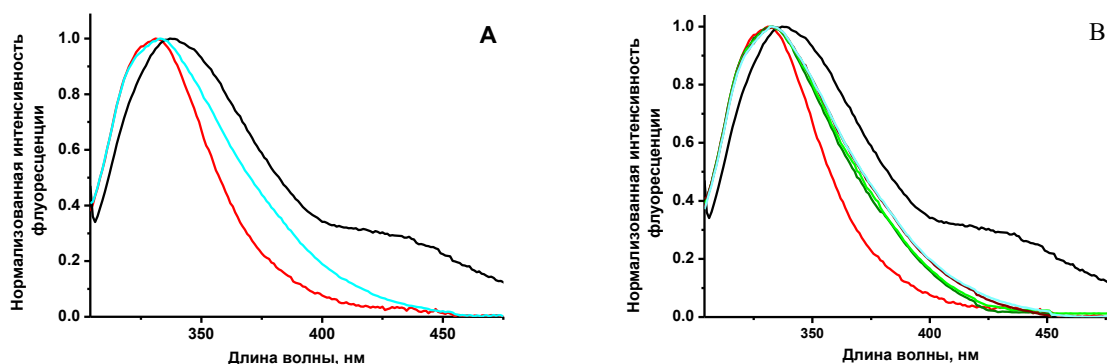


Рис. 3.58. Спектры триптофановой флуоресценции Rsgyo361 при разных температурах. (А) в 100 мМ карбонатном буфере, рН 10.0, при 35 °С через 0 мин (красный) и после 3 ч. инкубации (черный), в 100 мМ Na-фосфатном буфере, рН 8.0, при 35 °С через 0 мин (голубой); (В) в 100 мМ карбонатном буфере, рН 10.0, при 35 °С через 0 мин (красный) и после 3 ч. инкубации (черный), в 100 мМ карбонатном буфере, рН 10.0, при 5 °С 0 мин (салатовый) и после 3 ч. инкубации (оливковый); в 100 мМ карбонатном буфере, рН 10.0, при 0 °С 0 мин (циан) и после 3 ч. инкубации (коричневый).

### 3.6.4. Стабильность трансаминазы Rsgyo361 в водно-органических средах

Влияние растворителя на активность фермента зависит от организации пространственной структуры, свойств поверхности фермента и свойств растворителя: полярности и гидрофобности. Органические растворители вызывают нарушения в структуре белковой глобулы с последующей денатурацией, молекулы растворителя могут проникать в активный центр, вызывая инактивацию и ингибирование, или могут улучшать растворимость субстрата и даже переводить фермент в более активное состояние [416,417]. В экспериментах с Rsgyo361 были протестированы четыре типичных для ферментативных систем смешивающихся с водой растворителя - протонный (метанол) и апротонные: ДМСО, ДМФА и ацетонитрил, которые различаются гидрофобностью (log P) и индексами

полярности [417,418]. Влияние растворителя оценивали по изменению активности при добавлении растворителя в реакцию, так и по остаточной активности после инкубации фермента в водно-органических смесях 3 ч. или 24 ч. при 35 °С, рН 8.0. Активность Pсгуо361 оставалась на уровне 100% после инкубации в 10% (v/v) растворителя в 75 мМ фосфатном буфере, рН 8.0, в течение 24 ч. После 3 ч. инкубации в 25% (v/v) растворителя остаточная активность Pсгуо361 сохраняла исходные значения в присутствии ДМСО, ДМФА и метанола, и снижалась до 0% в присутствии ацетонитрила (Рис. 3.57В). В тех же условиях через 24 ч. остаточная активность Pсгуо361 составила 100% для ДМСО и снизилась до 68% и 0% для ДМФА и метанола, соответственно. В присутствии 50% ДМСО в фосфатном буфере, рН 8.0, активность Pсгуо361 снизилась на 60% через 4 ч. инкубации. Эффекты растворителей на общую реакцию трансаминирования отображены в Таблице 3.31. Очевидно, что ацетонитрил, как наиболее гидрофобный среди растворителей, инактивирует Pсгуо361 эффективнее других.

Таблица 3.31. Влияние органических растворителей на реакцию трансаминирования между S-PEA и 2-метилпропаналем, катализируемую Pсгуо361 при 35 °С.

Растворитель	Концентрация, % (v/v)	Относительная активность, %	
		рН 8.0	рН 10.0
Без растворителя		100	100
DMSO	10	163 ± 15	110 ± 10
	25	116 ± 11	0
DMFA	10	143 ± 10	25 ± 5
	25	0	0
метанол	10	74 ± 3	22 ± 5
	25	0	0
ацетонитрил	10	62 ± 2	0
	25	0	0

<sup>a</sup>100% соответствуют 40 ± 4 мU/мг при рН 8.0 и 125 ± 10 мU/мг при рН 10.0.

Метанол в концентрации 25% (v/v) не вызывает денатурации фермента после 3 ч инкубации, однако вызывает ингибирование Pсгуо361 в общей реакции. Среди исследованных растворителей ДМСО является наиболее совместимым с активной формой фермента. Более того, ДМСО и ДМФА в концентрации 10% (v/v) увеличивают активность Pсгуо361. Активирующий эффект ДМСО сохраняется при концентрации 25% (v/v). Стабилизирующие и активирующие эффекты ДМСО на ферменты наблюдаются регулярно [43,419,420]. Показано, что эффекты ДМСО

зависят от дозы; согласно некоторым исследованиям, эффекты могут быть связаны с влиянием растворителя на стабильность  $\alpha$ -спиралей и водородных связей [421].

ДМСО может играть роль стабилизатора, активатора, денатурирующего агента, ингибитора и криопротектора [43,416,419]. Активирующий эффект ДМСО наблюдается при 10-25% (v/v) и объясняется благоприятными для катализа конформационными изменениями в ферменте или, возможно также, что ДМСО снижает активационный барьер реакции (эффект среды) [50,419,420]. Учитывая, что активирующий эффект наблюдался преимущественно при неоптимальных для Pcrv361 условиях катализа, pH 8.0, по-видимому, 10-25% ДМСО способствуют достижению оптимальной для катализа конформации фермента в неоптимальных условиях. При pH 10.0 введение ДМСО и ДМФА не приводит к стабилизации активной конформации Pcrv361 и снижению активационного барьера.

### **3.6.5. Кинетические параметры реакции трансаминирования, катализируемой трансаминазой Pcrv361**

Кинетические параметры реакции трансаминирования, катализируемой Pcrv361 представлены в Таблице 3.32. Снижение температуры и pH 8.0 приводят к значительному снижению  $k_{cat}$  реакции. Снижение температуры и pH сопровождается уменьшением константы специфичности ( $k_{cat}/K_m$ ) фермента к S-PEA, но константы специфичности к 2,3-бутандиону и 2-метилпропаналу практически не меняются. При pH 8.0 фермент проявляет наибольшую специфичность к 2,3-бутандиону, тогда как при pH 10.0 было невозможно определить кинетические параметры для  $\alpha$ -дикетонов из-за сильной неферментативной реакции [411]. Следует также отметить, что противоположное влияние температуры на специфичность фермента к S-PEA и 2,3-бутандиону может быть следствием разной природы взаимодействий, контролирующих связывание этих субстратов. Известно, что гидрофобные взаимодействия, которые являются эндотермическими, становятся слабее при снижении температуры, но экзотермические электростатические взаимодействия усиливаются при снижении температуры [413]. С помощью молекулярного докинга было показано, что гидрофобные взаимодействия в значительной степени способствуют связыванию S-PEA в активном центре Pcrv361 [422]. Ослабление гидрофобных взаимодействий при низких температурах [423,424] может

способствовать ухудшению связывания S-PEA в активном центре и последующему снижению эффективности ферментативного деаминации S-PEA. При связывании 2,3-бутандиона, по-видимому, доминируют электростатические взаимодействия, эффективность которых увеличивается или не меняется с понижением температуры [65].

Таблица 3.32. Наблюдаемые кинетические параметры полной реакции трансминирования Psgu361 при 35°C и 10°C.

Косубстрат	35°C				10°C				
	<i>K<sub>m</sub></i> , мМ	<i>V<sub>max</sub></i> , мU/мг	<i>k<sub>cat</sub></i> , с <sup>-1</sup>	<i>k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub></i> , с <sup>-1</sup> мМ <sup>-1</sup>	<i>K<sub>m</sub></i> , мМ	<i>V<sub>max</sub></i> , мU/мг	<i>k<sub>cat</sub></i> , с <sup>-1</sup>	<i>k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub></i> , с <sup>-1</sup> мМ <sup>-1</sup>	
S-PEA <sup>a</sup>	2-метилпропаналь, 10 мМ	3.2 ± 0.2	53.0 ± 1.2	0.044 ± 0.001	0.014 ± 0.001	-	-	-	-
S-PEA <sup>b</sup>	2-метилпропаналь, 10 мМ	1.4 ± 0.1	203 ± 3	0.16 ± 0.02	0.11 ± 0.03	2.1 ± 0.3	30.5 ± 0.3	0.025 ± 0.002	0.012 ± 0.003
S-PEA <sup>a</sup>	2,3-бутандион, 3 мМ	3.9 ± 0.4	48.5 ± 2.2	0.045 ± 0.002	0.012 ± 0.002	7.0 ± 1.3	10.2 ± 1.1	0.009 ± 0.001	0.0013 ± 0.0004
2,3-бутандион <sup>a</sup>	S-PEA, 10 мМ	0.22 ± 0.02	31 ± 1	0.026 ± 0.001	0.13 ± 0.025	0.051 ± 0.004	9.1 ± 0.1	0.008 ± 0.001	0.15 ± 0.02
2-метилпропаналь <sup>a</sup>	S-PEA, 10 мМ	1.2 ± 0.1	33.4 ± 0.8	0.028 ± 0.002	0.023 ± 0.004	-	-	-	-
2-метилпропаналь <sup>b</sup>	S-PEA, 10 мМ	8.2 ± 1.0	320 ± 20	0.25 ± 0.02	0.031 ± 0.006	-	-	-	-

<sup>a</sup> Реакцию проводили в 75 мМ Na-фосфатном буфере, pH 8.0, с 30 μM PLP.

<sup>b</sup> Реакцию проводили в 100 мМ бикарбонатном буфере, pH 10.0, с 30 μM PLP.

### 3.6.6. Структура трансаминазы Pcr361. Сравнение структур классических DAPA АТ и Pcr361

Функциональный димер Pcr361 показан на Рис. 3.59. Субъединицы димера устроены типично для трансаминаз I типа PLP укладки и состоят из двух доменов, образованных характерными элементами вторичной структуры [148,157,188,425,426].

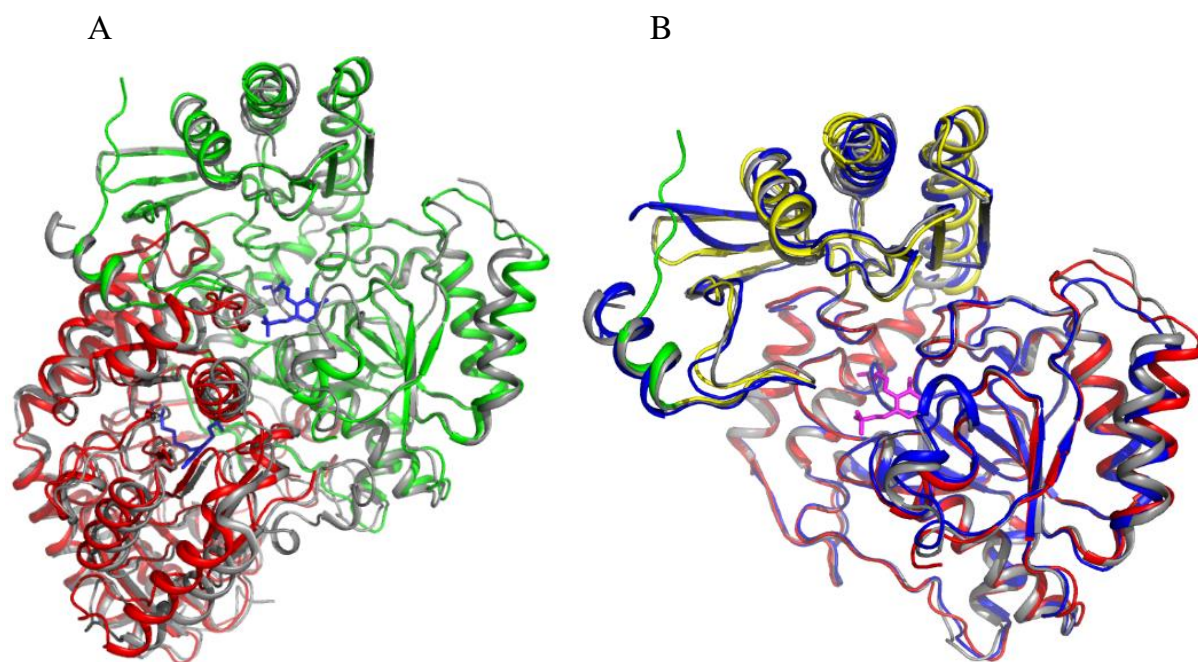


Рис. 3.59. Пространственная структура Pcr361. (А) Наложение димеров Pcr361 и DAPA ТА из *E. coli* (серый). Субъединицы Pcr361 окрашены в зеленый и красный цвета. PLP молекула показана синими палочками. Ориентация «зеленой» субъединицы Pcr361 идентична субъединице на Рис. В. (В) Наложение субъединиц Pcr361 и DAPA ТА из *E. coli* (серый) и Mtb DAPA (синий). N-терминальный домен Pcr361 окрашен в желтый, С- терминальный – в красный. N-терминальная спираль и соседняя петля, которые значительно отличаются от аналогичных элементов DAPA ТА из *E. coli* и Mtb DAPA окрашены в зеленый. Молекула PLP показана лиловыми палочками.

Димер Pcr361 содержит два активных центра, образованных двумя доменами одной субъединицы и большим доменом соседней субъединицы. Молекулы PLP хорошо видны в обоих активных центрах, ковалентно связанные с каталитическим Lys276 и координированные остатками Gly113, Ser114, Asp247 и Thr311 (здесь и после нумерация соответствует последовательности Pcr361) (Рис. 3.60). В обеих субъединицах PLP одинаково прочно связан с активным центром. Пиридиновая группа PLP образует водородные связи с консервативным

среди DAPA TAs остатком Asp247, тогда как фосфатный фрагмент образует водородные связи с остатками Gly113 и Ser114 одной субъединицы и Thr311 соседней субъединицы. Координация молекулы PLP в Pcryo361 идентична координации PLP в гомологичных DAPA TA.

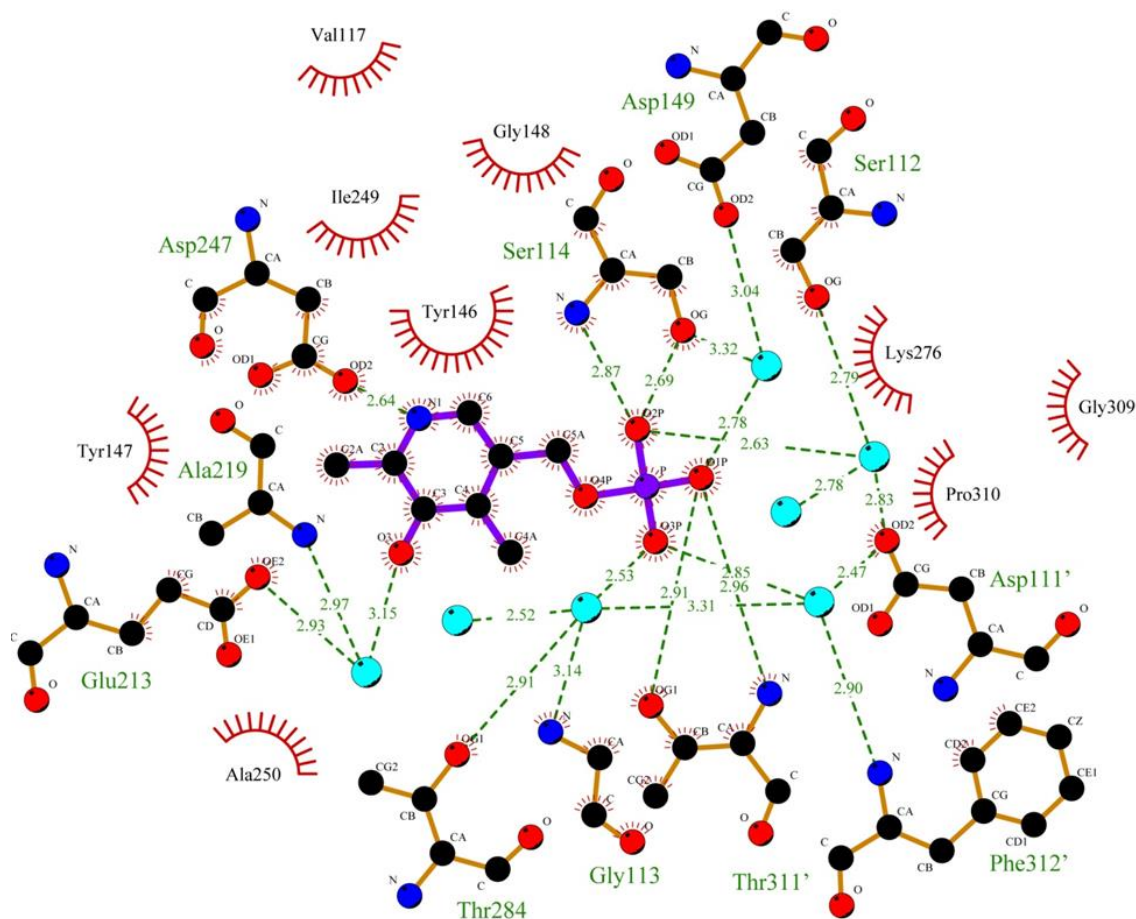


Рис. 3.60. Координация PLP в Pcryo361. Молекулы воды, участвующие в водородных связях, показаны голубыми шарами. Отмечены соответствующие расстояния. Рисунок создан в программе LigPlot.

Сравнение структур (Таблица 3.33) выявило наибольшее сходство между Pcryo361 и Mtb DAPA и DAPA AT из *E. coli*. Различия между субъединицами Pcryo361 и гомологичных TA обнаружены в основном в петлях и в N-концевой спирали (остатки 8-13). Организация димеров сходна среди гомологов.

Активный центр Pcryo361 образован остатками Tyr18, Trp53, Trp54, Tyr146, Asp149, Glu213, Gly218, Ala219, Met222, Asp247, Ala250, Arg393, Phe395 и Tyr400 одной субъединицы, а также остатками Gly309\*-Thr311\* второй субъединицы, консервативными среди гомологичных DAPA TA (Рис. 3.61). Большинство этих



остатков расположены внутри петель, что обеспечивает конформационную подвижность активному центру. У Rcyo361 аналогично классическим DAPA TA есть важная для катализа консервативная триада Tyr18-Tyr146-Asp149 и «подвижный» Arg393.

Таблица 3.33. Структурная гомология Rcyo361 и трансаминаз I типа PLP укладки.

ТА	PDB код	Z-оценка	RMSD, Å <sup>2</sup>	Доля выровненных остатков, %	Сходство последовательностей, %
Mtb DAPA	4XJM, 3LV2	21.1	0.97	95	48
DAPA TA из <i>E. coli</i>	1QJ5, 1QJ3	21.6	1.05	95	51
DAPA TA из <i>C. rodentium</i>	5UC7	21.4	1.15	94	51
Lys:KAPA TA из <i>B. subtilis</i>	3DU4	19.2	1.45	88	34
S-ATA из <i>V. fluvialis</i>	4E3Q	16.7	1.78	86	26
ω-TA из <i>Silicibacter sp.</i> TM1040	3FCR	15.6	2.03	93	27
ω-TA из <i>C. violaceum</i>	4A6R	14.9	2.07	87	29

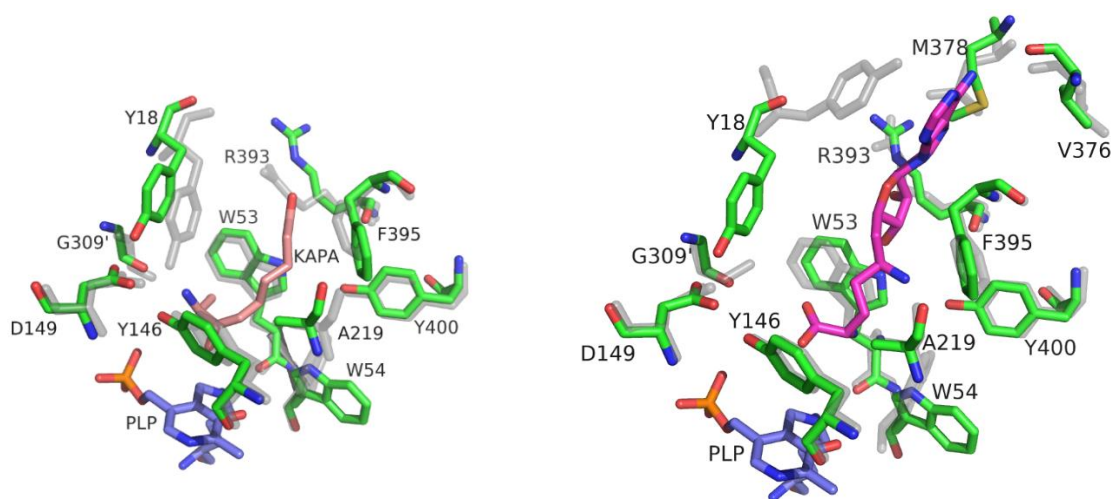


Рис. 3.61. Сравнение активных центров Rcyo361 и DAPA AT из *E. coli* и Mtb DAPA. (А) Наложение активных центров Rcyo361 (зеленый) и DAPA AT из *E. coli* (прозрачный серый) с молекулой KAPA (PDB код 1QJ3). Молекула KAPA окрашена в коралловый цвет. Молекула PLP окрашена в голубой цвет. (В) Наложение активных центров Rcyo361 (зеленый) и Mtb DAPA (серый) со связанной молекулой ингибитора синефунгина (PDB код 3LV2). Молекула синефунгина окрашена в лиловый.

### 3.6.7. Анализ структурных факторов S-АТА-активности у трансаминазы Pcr361

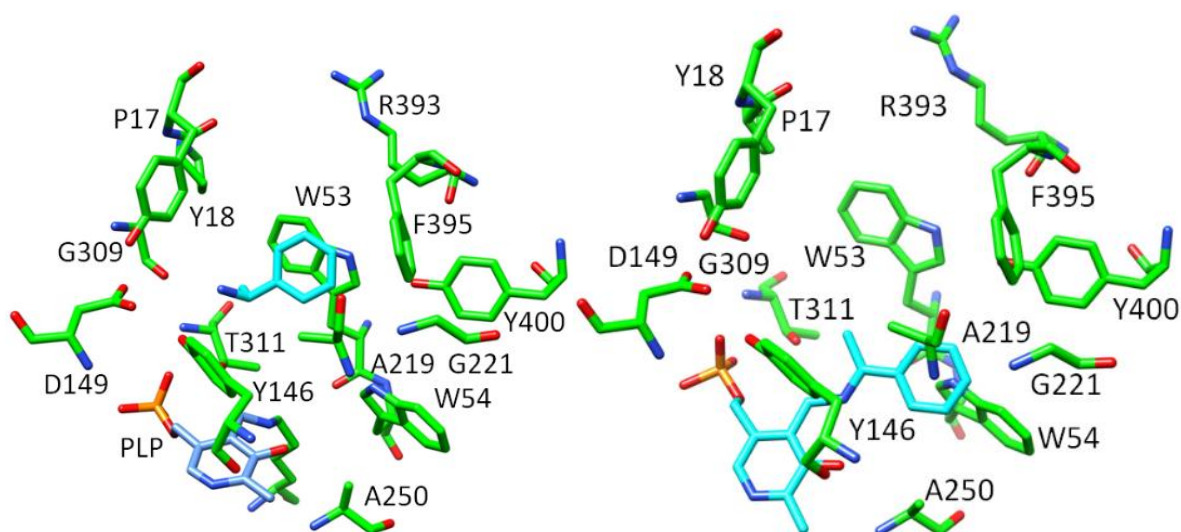


Рис. 3.62. Моделирование связывания субстрата S-PEA (А) и его хиноидного интермедиата (В) в активном центре Pcr361.

В результате моделирования связывания S-PEA и его хиноидного интермедиата в активном центре Pcr361 (Рис. 3.62А,В) установлено, что субстрат размещается в гидрофобной области активного центра, созданной остатками Tyr18, Trp53, Trp54, Tyr146, Ala219 и Phe395. Атом азота аминогруппы S-PEA расположен на расстоянии 6,5 Å от атома NZ PLP. Аминогруппа S-PEA связана водородными связями с ОН-группой Tyr146 и кислородом основной цепи Gly309\*. Карбоксильная группа остатка Asp149, который отсутствует в S-АТА, не препятствует размещению гидрофобного S-PEA рядом с PLP в позиции, близкой к атаке (т.е. не препятствует образованию комплекса Михаэлиса). В состоянии «хиноидный интермедиат» молекула S-PEA сдвинута на 4 Å (между C1-атомами S-PEA) в сторону PLP, что приводит к образованию нового π-стэкинг-взаимодействия ароматического кольца с боковой группой Trp54. RMSD между любыми атомами, участвующими в связывании S-PEA в комплексе Михаэлиса и в состоянии «хиноидный интермедиат» составляет 0,3 Å. Никаких нарушений взаимодействий в консервативной триаде Tyr18-Tyr146-Asp149 при связывании хиноидного интермедиата не обнаружено. Таким образом, структура активного центра Pcr361 допускает активность с S-PEA

и, по-видимому, взаимное распределение гидрофобных и полярных остатков в активном центре, а также их подвижность, определяют проявление дополнительной (промискуитетной) активности с неприродными субстратами.

Сравнение активных центров Pcruo361 и S-АТА из «быстрой» *V. fluvialis* (PDB код: 4E3Q, [427] и «медленной» S-АТА из *Silicibacter sp.* TM1040 (PDB код: 3FCR, [157,239] показало низкую гомологию активных центров Pcruo361 и S-АТА. Однако характеристический мотив «быстрой» S-АТА просматривается в активном центре Pcruo361 - это остатки Trp54-Ala219-Arg393 (Рис. 3.63А). Trp54 и Ala219 занимают «правильные» S-АТА подобные позиции, тогда как боковая цепь Arg393 расположена по-другому. Основное различие в организации активного центра обусловлено присутствием остатков Asp149 (Val153 в 4E3Q) и Trp53 (Leu56 в 4E3Q), последние характерны для DАРА АТ, которые катализируют трансаминирование между SAM и КАРА [157].

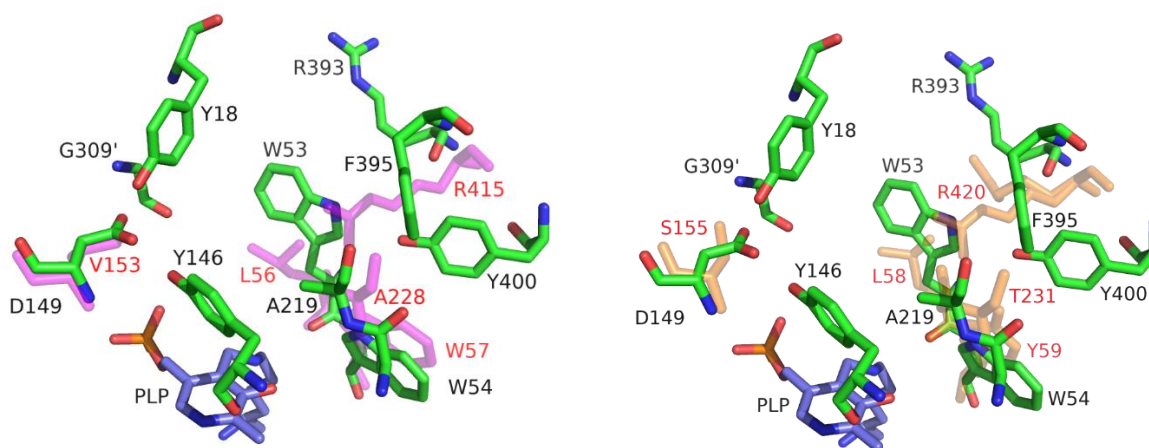


Рис. 3.63. Сравнение активных центров Pcruo361 и S-АТА из *Vibrio fluvialis* (PDB код: 4E3Q) и R-АТА из *Silicibacter sp.* TM1040 (PDB код: 3FCR). (А) Наложение активных центров Pcruo361 (зеленый) и S-АТА из *V. fluvialis* (лиловый прозрачный). Уникальные для S-АТА остатки выделены красным. Молекула PLP показана синим. (В) Наложение активных центров Pcruo361 (зеленый) и R-АТА из *Silicibacter sp.* TM1040 (прозрачный оранжевый). Уникальные для R-АТА остатки выделены красным.

Активный центр Pcruo361 существенно отличается от активного центра «медленной» S-АТА остатками в положениях 53 и 149 (нумерация Pcruo361), а

также остатками Ala219 и Trp54 на месте доноров водородной связи Thr213 и Tyr59 в 3FCR (Рис. 3.63В). Тем не менее, хотя в структуре Pсгуо361 присутствует мотив «быстрой» R-ТА, ферментативная активность с S-PEА не достигает значений, характерных для R-ТА [242,245]. Кроме того, хотя Pсгуо361 и содержит «подвижный» Arg393 в нужном положении в активном центре, активность Pсгуо361 с пируватом и  $\alpha$ - и  $\beta$ -кетокислотами незначительна.

Среди трансминаз I типа PLP укладки, DAPA ТА относятся к узкоспецифичным трансминазам, катализирующим уникальный перенос аминогруппы между SAM и КАРА [403,404,406,407]. Оба субстрата содержат объемный гидрофобный фрагмент, для координации которого существует гидрофобная область в активном центре [410,425,428]. «Подвижный» аргинин, характеристический остаток трансминаз I типа PLP укладки, в DAPA ТА участвует только в связывании КАРА, его смещение не имеет большого угла поворота, как в  $\omega$ -ТА или трансминазах ароматических аминокислот [239,246]. Отрицательный заряд карбоксильной группы консервативного Asp149 эффективно нейтрализуется водородными связями с Tyr18 и Tyr146 из мотива Tyr18-Tyr146-Asp149 (важного для активности SAM: КАРА) в холоформе DAPA АТ. По-видимому, связывание SAM или КАРА сопровождается не только перераспределением водородных связей, но и оптимизацией гидрофобных взаимодействий в активном центре за счет смещения боковых групп остатков. Эти структурные особенности создают возможность для S-АТА-активности у DAPA АТ. рН оптимум S-АТА активности Pсгуо361 совпадает с рН оптимумом типичных DAPA АТ в реакции аминирования КАРА [403,404,406], что указывает на участие одних и тех же остатков в реализации DAPA АТ-активности и S-АТА-активности. Важно отметить, что S-АТА-активность Pсгуо361 включает не только деаминирование S-PEА, но и аминирование альдегидов и дикетонов, то есть является полноценной. ГХ-МС анализ показал образование тетраметилпиперидина как основного продукта аминирования 2,3-бутандиона. Региоселективное асимметрическое биоаминирование дикетонов в реакции, катализируемой  $\omega$ -ТА было впервые описано в [429]. Основными продуктами были замещенные хиральные  $\Delta$ 1-пиперидины. Биоаминирование дикетонов перспективно для синтеза хиральных циклических соединений [206,430].

Таким образом, активность Pcrp361 в реакциях с S-PEA –это так называемая дополнительная активность или «promiscuous activity» [431]. Моделирование амина в активном центре Pcrp361 показало, что связывание ароматического фрагмента S-PEA происходит в том же месте, что и связывание природного субстрата SAM, точнее его L-метионинового фрагмента: в этой области эффективно образуются гидрофобные контакты и стэкинг-взаимодействия. Остатки Ala219 и Trp53, которые участвуют в реализации S-специфичности в S-ATA, участвуют в связывании как S-PEA, так и L-метионинового фрагмента SAM. Более того, связыванию S-PEA не препятствует мотив Tyr18-Tyr146-Asp149, который является характеристическим мотивом DARA AT и который отсутствует в S-ATA. То есть, по-видимому, отрицательный заряд Asp149, расположенный вблизи активного центра, нейтрализован. Кроме того, близость к триаде приводит к снижению pKa аминокислотной группы S-PEA, что, возможно, благоприятствует реакции трансальдиминирования. Интересно, что эта триада разрушается при связывании SAM (согласно [425]). Отрицательный заряд боковой цепи Asp149, вероятно, важен для правильной ориентации карбоксильной группы SAM для продуктивного связывания, что приводит к образованию хиноидного интермедиата. Для дикетонов участие Arg393 в координации карбонильной группы маловероятно. Tyr18 и Tyr146 могут координировать карбонильную группу, потому что они протонированы в мотиве Tyr18-Tyr146-Asp149. Слабая активность с пируватом, по-видимому, связана с низкой подвижностью остатка Arg393.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы получены детальные структурно-функциональные характеристики нескольких дегидрогеназ и трансаминаз из архей и термофильных бактерий. Исследования пространственных структур, субстратной специфичности и стабильности алкогольдегидрогеназы из архей *Thermococcus sibiricus*, альдегиддегидрогеназы из *Pyrobaculum ferrireducens*, трансаминаз разветвленных L-аминокислот из архей *Thermoproteus usoniensis*, *Vulkanizaeta moutnovskia*, *Geoglobus acetivorans* и трансаминаз из *Thermobaculum terrenum* и *Haliangium ochraceum* с широкой субстратной специфичностью и с активностью с первичными (R)-аминами позволили сделать выводы о структурных факторах, определяющих субстратную специфичность и стабильность этих ферментов. Исследованные ферменты относятся к биотехнологически значимым и перспективны для получения оптически активных спиртов и аминов.

Впервые проведен детальный анализ сети водородных связей и солевых мостиков у термостабильных дегидрогеназ из архей *T. sibiricus*, *P. ferrireducens* и у трансаминазы из *T. terrenum*. Показано, что стабилизирующая роль водородных связей достигается через увеличение плотности водородных связей в белковой глобуле, через увеличение внутренних водородных связей, через разветвленную сеть солевых мостиков (водородных связей между атомами заряженных боковых групп) на поверхности белковой глобулы, через повышение прочности связывания кофактора дополнительными водородными связями и увеличение количества водородных связей в межсубъединичных контактах. Совокупность этих эффектов достижима в результате повышения доли заряженных аминокислотных остатков в последовательности ферментов и наблюдается как в ферментах из архей, так и из термофильных бактерий.

Впервые получены пространственные структуры трансаминаз разветвленных L-аминокислот из архей для трансаминаз из *T. usoniensis* и *G. acetivorans*. Установлено, что активный центр архейных трансаминаз разветвленных L-аминокислот сходен с активными центрами трансаминаз разветвленных L-аминокислот из бактерий и эукариот, в том числе и из человека. Таким образом, показана универсальность организации активного центра у этих ферментов.

Проведено определение возможных вариантов характеристических мотивов в последовательностях трансаминаз IV-типа укладки PLP-связывающего домена из архей и бактерий и отобраны трансаминазы с нарушениями характеристических мотивов по типу ВСАТ. Для отобранных ферментов проведена структурно-функциональная характеристика и установлено, как нарушения в характеристических мотивах влияют на субстратную специфичность трансаминаз и связывание субстратов в активном центре этих ферментов. Впервые проведена детальная структурно-функциональная характеристика ферментов с нарушениями в характеристических мотивах, методами направленного мутагенеза установлена роль отдельных остатков активного центра в реализации субстратной специфичности у этих трансаминаз.

Детально охарактеризована дополнительная активность с первичными (*R*)-аминами у трансаминаз из *H. ochraceum* и *T. terrenum*. Проведенная работа показала, что структурные основы субстратной специфичности трансаминаз из *T. terrenum* более сложные, чем просто комбинация остатков, специфичных для ВСАТ и R-ТА, в одном активном центре. Активность ТаТТ в реакции с (*R*)-фенилэтиламином и высокая каталитическая эффективность в реакциях между  $\alpha$ -кетоглутаратом и ВСАА не являются взаимоисключающими, а достигаются уникальной комбинацией гидрофобных остатков в активном центре, отсутствием отдельных водородных связей, присущих ВСАТ, и особым положением O-петли, ее аминокислотным составом и взаимодействием с соседними остатками.

Выбирая ферменты из экстремофильных организмов для применения в медицине и биотехнологии надо учитывать их следующие особенности: адаптация ферментов к высоким температурам реализуется на уровне белковой глобулы (это и высокая плотность водородных связей в белковой глобуле, и прочность связывания кофактора за счет дополнительных взаимодействий с глобулой, и усиление межсубъединичных контактов), изменения в активном центре приводят к изменению субстратной специфичности. Регуляция активности возможна как на уровне белковой глобулы (изменения оптимальных условий функционирования фермента), так и на уровне остатков активного центра (изменение субстратной специфичности).

## 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 внешних водородных связей и усилении межсубъединичных контактов.
2. Поверхность супертермостабильной алкогольдегидрогеназы из архей *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 PLP-связывающего 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 трансаминаз, приводят к расширению субстратной специфичности у трансаминаз разветвленных L-аминокислот из архей *T. uzoniensis* 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 ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Michaelis L., Menten M.L., Johnson K.A., Goody R.S., The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. // *Biochemistry* - 2011. - V. 50. - P. 8264–9.
- [2] Gerlt J.A., Genomic enzymology: web tools for leveraging protein family sequence–function space and genome context to discover novel functions. // *Biochemistry* - 2017. - V. 56. - P. 4293–4308.
- [3] Tawfik O.K. and D.S., Enzyme promiscuity: a mechanistic and evolutionary perspective. // *Annu. Rev. Biochem.* - 2010. - V. 79. - P. 471–505.
- [4] Warshel A., Multiscale modeling of biological functions: from enzymes to molecular machines (Nobel Lecture). // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2014. - V. 53. - P. 10020–10031.
- [5] Curry S., Structural Biology: A Century-long journey into an unseen world. // *Interdiscip. Sci. Rev.* - 2015. - V. 40. - P. 308–328.
- [6] Horowitz N.H., On the evolution of biochemical syntheses. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1945. - V. 31. - P. 153–157.
- [7] Carbonell P., Lecointre G., Faulon J.-L., Origins of specificity and promiscuity in metabolic networks. // *J. Biol. Chem.* - 2011. - V. 286. - P. 43994–44004.
- [8] Yčas M., On earlier states of the biochemical system. // *J. Theor. Biol.* - 1974. - V. 44. - P. 145–160.
- [9] Jensen R.A., Enzyme recruitment in evolution of new function. // *Annu. Rev. Microbiol.* - 1976. - V. 30. - P. 409–425.
- [10] Rison S.C.G., Thornton J.M., Pathway evolution, structurally speaking. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2002. - V. 12. - P. 374–382.
- [11] Copley S.D., Shining a light on enzyme promiscuity. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 2017. - V. 47. - P. 167–175.

- [12] Nam H., Lewis N.E., Lerman J.A., Lee D.-H., Chang R.L., Kim D., Palsson B.O., Network context and selection in the evolution to enzyme specificity. // *Science* (80-). - 2012. - V. 337. - P. 1101–1104.
- [13] Copley S.D., Toward a systems biology perspective on enzyme evolution. // *J. Biol. Chem.* - 2012. - V. 287. - P. 3–10.
- [14] Feist A.M., Scholten J.C.M., Palsson B.Ø., Brockman F.J., Ideker T., Modeling methanogenesis with a genome-scale metabolic reconstruction of *Methanosarcina barkeri*. // *Mol. Syst. Biol.* - 2006. - V. 2. - P. 2006.0004.
- [15] Mo M.L., Palsson B.Ø., Herrgård M.J., Connecting extracellular metabolomic measurements to intracellular flux states in yeast. // *BMC Syst. Biol.* - 2009. - V. 3. - P. 37.
- [16] Chang R.L., Ghamsari L., Manichaikul A., Hom E.F.Y., Balaji S., Fu W., Shen Y., Hao T., Palsson B.Ø., Salehi-Ashtiani K., Papin J.A., Metabolic network reconstruction of *Chlamydomonas* offers insight into light-driven algal metabolism. // *Mol. Syst. Biol.* - 2011. - V. 7. - P. 518.
- [17] Wagner A., Energy costs constrain the evolution of gene expression. // *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* - 2007. - V. 308B. - P. 322–324.
- [18] Gur E., Biran D., Ron E.Z., Regulated proteolysis in Gram-negative bacteria — how and when? // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2011. - V. 9. - P. 839–848.
- [19] Morar M., Wright G.D., The genomic enzymology of antibiotic resistance. // *Annu. Rev. Genet.* - 2010. - V. 44. - P. 25–51.
- [20] Woese C.R., Fox G.E., Zablen L., Uchida T., Bonen L., Pechman K., Lewis B.J., Stahl D., Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. // *Nature* - 1975. - V. 254. - P. 83–86.
- [21] Whittaker R.H., New concepts of kingdoms of organisms. // *Science* (80-). - 1969. - V. 163. - P. 150–160.
- [22] Kletzin, A. General characteristics and important model organisms. *In Archaea*; ASM Press: Washington, DC, USA, 2014; pp. 14–92.

- [23] Zillig W., Comparative biochemistry of Archaea and Bacteria. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* - 1991. - V. 1. - P. 544–551.
- [24] Balch W.E., Magrum L.J., Fox G.E., Wolfe R.S., Woese C.R., An ancient divergence among the bacteria. // *J. Mol. Evol.* - 1977. - V. 9. - P. 305–311.
- [25] Brock T.D., Life at High Temperatures: Evolutionary, ecological, and biochemical significance of organisms living in hot springs is discussed. // *Science* (80- ). - 1967. - V. 158. - P. 1012–1019.
- [26] Orphan V.J., House C.H., Hinrichs K.-U., McKeegan K.D., DeLong E.F., Multiple archaeal groups mediate methane oxidation in anoxic cold seep sediments. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2002. - V. 99. - P. 7663–7668.
- [27] Wang Y., Wegener G., Hou J., Wang F., Xiao X., Expanding anaerobic alkane metabolism in the domain of Archaea. // *Nat. Microbiol.* - 2019. - V. 4. - P. 595–602.
- [28] Eme L., Spang A., Lombard J., Stairs C.W., Ettema T.J.G., Archaea and the origin of eukaryotes. // *Nat. Rev. Microbiol.* - 2017. - V. 15. - P. 711–723.
- [29] *Extremophiles Handbook*. Springer Japan: Tokyo 2011.
- [30] Takai K., Nakamura K., Toki T., Tsunogai U., Miyazaki M., Miyazaki J., Hirayama H., Nakagawa S., Nunoura T., Horikoshi K., Cell proliferation at 122 C and isotopically heavy CH<sub>4</sub> production by a hyperthermophilic methanogen under high-pressure cultivation. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2008. - V. 105. - P. 10949–10954.
- [31] Atomi H., Sato T., Kanai T., Application of hyperthermophiles and their enzymes. // *Curr. Opin. Biotechnol.* - 2011. - V. 22. - P. 618–626.
- [32] Berezovsky I.N., Shakhnovich E.I., Physics and evolution of thermophilic adaptation. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2005. - V. 102. - P. 12742–12747.
- [33] Nelson K.E., Clayton R.A., Gill S.R., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Nelson W.C., Ketchum K.A., McDonald L., Utterback T.R., Malek J.A., Linher K.D., Garrett M.M., Stewart A.M., Cotton M.D., Pratt M.S., Phillips C.A., Richardson D., Heidelberg J., Sutton G.G., Fleischmann R.D., Eisen J.A., White O., Salzberg S.L., Smith H.O., Venter J.C., Fraser C.M., Evidence for lateral gene transfer

between Archaea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. // Nature - 1999. - V. 399. - P. 323–329.

[34] Deckert G., Warren P. V., Gaasterland T., Young W.G., Lenox A.L., Graham D.E., Overbeek R., Snead M.A., Keller M., Aujay M., Huber R., Feldman R.A., Short J.M., Olsen G.J., Swanson R. V., The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. // Nature - 1998. - V. 392. - P. 353–358.

[35] Matsui I., Harata K., Implication for buried polar contacts and ion pairs in hyperthermostable enzymes. // FEBS J. - 2007. - V. 274. - P. 4012–4022.

[36] Kumar S., Nussinov R., Salt bridge stability in monomeric proteins 1 Edited by J. M. Thornton. // J. Mol. Biol. - 1999. - V. 293. - P. 1241–1255.

[37] Elcock A.H., The stability of salt bridges at high temperatures: implications for hyperthermophilic proteins 1 Edited by B. Honig. // J. Mol. Biol. - 1998. - V. 284. - P. 489–502.

[38] Graziano G., Merlino A., Molecular bases of protein halotolerance. // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics - 2014. - V. 1844. - P. 850–858.

[39] Britton K.L., Baker P.J., Fisher M., Ruzheinikov S., Gilmour D.J., Bonete M.-J., Ferrer J., Pire C., Esclapez J., Rice D.W., Analysis of protein solvent interactions in glucose dehydrogenase from the extreme halophile *Haloferax mediterranei*. // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2006. - V. 103. - P. 4846–4851.

[40] Frolow F., Harel M., Sussman J.L., Mevarech M., Shoham M., Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. // Nat. Struct. Biol. - 1996. - V. 3. - P. 452–458.

[41] Richard S.B., Madern D., Garcin E., Zaccai G., Halophilic Adaptation: Novel solvent protein interactions observed in the 2.9 and 2.6 Å resolution structures of the wild type and a mutant of malate dehydrogenase from *Haloarcula marismortui*// Biochemistry - 2000. - V. 39. - P. 992–1000.

[42] Irimia A., Ebel C., Madern D., Richard S.B., Cosenza L.W., Zaccai G., Vellieux F.M.D., The Oligomeric States of *Haloarcula marismortui* Malate dehydrogenase are modulated by solvent components as shown by crystallographic and biochemical

studies. // *J. Mol. Biol.* - 2003. - V. 326. - P. 859–873.

[43] Doukyu N., Ogino H., Organic solvent-tolerant enzymes. // *Biochem. Eng. J.* - 2010. - V. 48. - P. 270–282.

[44] Kawata T., Ogino H., Roy S., Jana B., Bagchi B., Amino acid residues involved in organic solvent-stability of the LST-03 lipase. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2012. - V. 136. - P. 384–388.

[45] Stepankova V., Damborsky J., Chaloupkova R., Organic co-solvents affect activity, stability and enantioselectivity of haloalkane dehalogenases. // *Biotechnol. J.* - 2013. - V. 8. - P. 719–729.

[46] Polizzi K.M., Bommarius A.S., Broering J.M., Chaparro-Riggers J.F., Stability of biocatalysts. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* - 2007. - V. 11. - P. 220–225.

[47] Mohtashami M., Fooladi J., Haddad-Mashadrizeh A., Housaindokht M.R., Monhemi H., Molecular mechanism of enzyme tolerance against organic solvents: Insights from molecular dynamics simulation. // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2019. - V. 122. - P. 914–923.

[48] Kuper J., Wong T.S., Roccatano D., Wilmanns M., Schwaneberg U., Understanding a mechanism of organic cosolvent inactivation in heme monooxygenase P450 BM-3. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2007. - V. 129. - P. 5786–5787.

[49] Kuper J., Tee K.L., Wilmanns M., Roccatano D., Schwaneberg U., Wong T.S., The role of active-site Phe87 in modulating the organic co-solvent tolerance of cytochrome P450 BM3 monooxygenase. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* - 2012. - V. 68. - P. 1013–1017.

[50] Roccatano D., Computer simulations study of biomolecules in non-aqueous or cosolvent/water mixture solutions. // *Curr. Protein Pept. Sci.* - 2008. - V. 9. - P. 407–426.

[51] Gupta M.N., Tyagi R., Sharma S., Karthikeyan S., Singh T.P., Enhancement of catalytic efficiency of enzymes through exposure to anhydrous organic solvent at 70 oC. Three-dimensional structure of a treated serine proteinase at 2.2 Å resolution. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* - 2000. - V. 39. - P. 226–234.

[52] English A.C., Groom C.R., Hubbard R.E., Experimental and computational mapping of the binding surface of a crystalline protein. // *Protein Eng. Des. Sel.* - 2001. - V. 14. - P. 47–59.

[53] Kumar S., Tsai C.-J., Nussinov R., Factors enhancing protein thermostability. // *Protein Eng. Des. Sel.* - 2000. - V. 13. - P. 179–191.

[54] Kumar S., Tsai C.-J., Ma B., Nussinov R., Contribution of salt bridges toward protein thermostability. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* - 2000. - V. 17. - P. 79–85.

[55] Bustamante J.P., Bonamore A., Nadra A.D., Sciamanna N., Boffi A., Estrin D.A., Boechi L., Molecular basis of thermal stability in truncated (2/2) hemoglobins. // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* - 2014.

[56] Dong Y., Liao M., Meng X., Somero G.N., Structural flexibility and protein adaptation to temperature: Molecular dynamics analysis of malate dehydrogenases of marine molluscs. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2018. - V. 115. - P. 1274–1279.

[57] Markel U., Zhu L., Frauenkron-Machedjou V., Zhao J., Bocola M., Davari M., Jaeger K.-E., Schwaneberg U., Are directed evolution approaches efficient in exploring nature's potential to stabilize a lipase in organic cosolvents? // *Catalysts* - 2017. - V. 7. - P. 142.

[58] Karabec M., Łyskowski A., Tauber K.C., Steinkellner G., Kroutil W., Grogan G., Gruber K., Structural insights into substrate specificity and solvent tolerance in alcohol dehydrogenase ADH-‘A’ from *Rhodococcus ruber* DSM 44541. // *Chem. Commun.* - 2010. - V. 46. - P. 6314.

[59] Said Z.S. A.M., Arifi F.A.M., Salleh A.B., Rahman R.N.Z.R.A., Leow A.T.C., Latip W., Ali M.S.M., Unravelling protein -organic solvent interaction of organic solvent tolerant elastase from *Pseudomonas aeruginosa* strain K crystal structure. // *Int. J. Biol. Macromol.* - 2019. - V. 127. - P. 575–584.

[60] Fitzpatrick P.A., Steinmetz A.C.U., Ringe D., Klivanov A.M., Enzyme crystal structure in a neat organic solvent. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1993. - V. 90. - P. 8653–8657.

[61] Cianci M., Tomaszewski B., Helliwell J.R., Halling P.J., Crystallographic

Analysis of Counterion Effects on Subtilisin Enzymatic Action in Acetonitrile. // J. Am. Chem. Soc. - 2010. - V. 132. - P. 2293–2300.

[62] Gupta A., Ray S., Kapoor S., Khare S.K., Solvent-stable *Pseudomonas aeruginosa* PseA protease gene: identification, molecular characterization, phylogenetic and bioinformatic analysis to study reasons for solvent stability. // J. Mol. Microbiol. Biotechnol. - 2008. - V. 15. - P. 234–43.

[63] Wu M.-H., Lin M.-C., Lee C.-C., Yu S.-M., Wang A.H.J., Ho T.-H.D., Enhancement of laccase activity by pre-incubation with organic solvents. // Sci. Rep. - 2019. - V. 9. - P. 9754.

[64] Cao H., Nie K., Xu H., Xiong X., Krastev R., Wang F., Tan T., Liu L., Insight into the mechanism behind the activation phenomenon of lipase from *Thermus thermophilus* HB8 in polar organic solvents. // J. Mol. Catal. B Enzym. - 2016. - V. 133. - P. S400–S409.

[65] Feller G., Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. // J. Phys. Condens. Matter - 2010. - V. 22. - P. 323101.

[66] Goldstein R.A., Amino-acid interactions in psychrophiles, mesophiles, thermophiles, and hyperthermophiles: Insights from the quasi-chemical approximation. // Protein Sci. - 2007. - V. 16. - P. 1887–1895.

[67] Feller G., Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. // Scientifica (Cairo). - 2013. - V. 2013. - P. 1–28.

[68] Rossmann M.G., Moras D., Olsen K.W., Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. // Nature - 1974. - V. 250. - P. 194–199.

[69] Filling C., Berndt K.D., Benach J., Knapp S., Prozorovski T., Nordling E., Ladenstein R., Jörnvall H., Oppermann U., Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. // J. Biol. Chem. - 2002. - V. 277. - P. 25677–25684.

[70] Kavanagh K.L., Jörnvall H., Persson B., Oppermann U., Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. // Cell. Mol. Life Sci. - 2008. - V. 65. - P. 3895.

[71] Penning, T. M. Introduction and Overview of the Aldo-Keto Reductase Superfamily. *In ACS Symposium Series*; 2003; pp. 3–20.

[72] Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H., Persson B., Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). // *Eur. J. Biochem.* - 2002. - V. 269. - P. 4409–4417.

[73] Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H., Persson B., Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) relationships: A large family with eight clusters common to human, animal, and plant genomes. // *Protein Sci.* - 2009. - V. 11. - P. 636–641.

[74] Jörnvall H., Höög J.-O., Persson B., SDR and MDR: completed genome sequences show these protein families to be large, of old origin, and of complex nature. // *FEBS Lett.* - 1999. - V. 445. - P. 261–264.

[75] Tashiro Y., Rodriguez G.M., Atsumi S., 2-Keto acids based biosynthesis pathways for renewable fuels and chemicals. // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* - 2015. - V. 42. - P. 361–373.

[76] Atsumi S., Hanai T., Liao J.C., Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. // *Nature* - 2008. - V. 451. - P. 86–89.

[77] Magomedova Z., Grecu A., Sensen C.W., Schwab H., Heidinger P., Characterization of two novel alcohol short-chain dehydrogenases/reductases from *Ralstonia eutropha* H16 capable of stereoselective conversion of bulky substrates. // *J. Biotechnol.* - 2016. - V. 221. - P. 78–90.

[78] Srinivasamurthy V.S.T., Böttcher D., Bornscheuer U.T., A multi-enzyme cascade reaction for the production of 6-hydroxyhexanoic acid. // *Zeitschrift für Naturforsch. C* - 2019. - V. 74. - P. 71–76.

[79] Kohl A., Srinivasamurthy V., Böttcher D., Kabisch J., Bornscheuer U.T., Co-expression of an alcohol dehydrogenase and a cyclohexanone monooxygenase for cascade reactions facilitates the regeneration of the NADPH cofactor. // *Enzyme Microb. Technol.* - 2018. - V. 108. - P. 53–58.

[80] Wu S., Snajdrova R., Moore J.C., Baldenius K., Bornscheuer U.T., Biocatalysis: enzymatic synthesis for industrial applications. // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2021. - V. 60. - P. 88–119.



[81] Zheng Y.-G., Yin H.-H., Yu D.-F., Chen X., Tang X.-L., Zhang X.-J., Xue Y.-P., Wang Y.-J., Liu Z.-Q., Recent advances in biotechnological applications of alcohol dehydrogenases. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2017. - V. 101. - P. 987–1001.

[82] Musa M.M., Phillips R.S., Recent advances in alcohol dehydrogenase-catalyzed asymmetric production of hydrophobic alcohols. // *Catal. Sci. Technol.* - 2011. - V. 1. - P. 1311.

[83] Stampfer W., Kosjek B., Moitzi C., Kroutil W., Faber K., Biocatalytic Asymmetric Hydrogen Transfer. // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2002. - V. 41. - P. 1014–1017.

[84] Stampfer W., Kosjek B., Faber K., Kroutil W., Biocatalytic Asymmetric Hydrogen Transfer Employing *Rhodococcus ruber* DSM 44541. // *J. Org. Chem.* - 2003. - V. 68. - P. 402–406.

[85] Benach J., Atrian S., González-Duarte R., Ladenstein R., The refined crystal structure of *Drosophila lebanonensis* alcohol dehydrogenase at 1.9 Å resolution 1 Edited by R. Huber. // *J. Mol. Biol.* - 1998. - V. 282. - P. 383–399.

[86] Kaaber Brendskag M., McKinley-McKee J.S., Winberg J.-O., *Drosophila lebanonensis* alcohol dehydrogenase: pH dependence of the kinetic coefficients. // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* - 1999. - V. 1431. - P. 74–86.

[87] Ghosh D., Weeks C.M., Grochulski P., Duax W.L., Erman M., Rimsay R.L., Orr J.C., Three-dimensional structure of holo 3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: a member of a short-chain dehydrogenase family. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1991. - V. 88. - P. 10064–10068.

[88] Tanabe T., Tanaka N., Uchikawa K., Kabashima T., Ito K., Nonaka T., Mitsui Y., Tsuru M., Yoshimoto T., Roles of the Ser146, Tyr159, and Lys163 residues in the catalytic action of 7 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase from *Escherichia coli*. // *J. Biochem.* - 1998. - V. 124. - P. 634–641.

[89] Persson B., Hedlund J., Jörnvall H., Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. // *Cell. Mol. Life Sci.* - 2008. - V. 65. - P. 3879.

[90] Ladenstein R., Winberg J.-O., Benach J., Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families. // Cell. Mol. Life Sci. - 2008. - V. 65. - P. 3918–3935.

[91] Jörnvall H., Hedlund J., Bergman T., Oppermann U., Persson B., Superfamilies SDR and MDR: From early ancestry to present forms. Emergence of three lines, a Zn-metalloenzyme, and distinct variabilities. // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 2010. - V. 396. - P. 125–130.

[92] Varughese K.I., Skinner M.M., Whiteley J.M., Matthews D.A., Xuong N.H., Crystal structure of rat liver dihydropteridine reductase. // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1992. - V. 89. - P. 6080–6084.

[93] Thoden J.B., Wohlers T.M., Fridovich-Keil J.L., Holden H.M., Molecular Basis for Severe Epimerase Deficiency Galactosemia. // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276. - P. 20617–20623.

[94] Mulichak A.M., Theisen M.J., Essigmann B., Benning C., Garavito R.M., Crystal structure of SQD1, an enzyme involved in the biosynthesis of the plant sulfolipid headgroup donor UDP-sulfoquinovose. // Proc. Natl. Acad. Sci. - 1999. - V. 96. - P. 13097–13102.

[95] Ghosh D., Vihko P., Molecular mechanisms of estrogen recognition and 17-keto reduction by human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1. // Chem. Biol. Interact. - 2001. - V. 130–132. - P. 637–650.

[96] Alphey M.S., Yu W., Byres E., Li D., Hunter W.N., Structure and Reactivity of Human Mitochondrial 2,4-Dienoyl-CoA Reductase. // J. Biol. Chem. - 2005. - V. 280. - P. 3068–3077.

[97] Benach J., Atrian S., González-Duarte R., Ladenstein R., The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 Å resolution by X-ray crystallography. // J. Mol. Biol. - 1999. - V. 289. - P. 335–355.

[98] Ohshima T., Nishida N., Purification and Characterization of Extremely Thermo-Stable Glutamate Dehydrogenase from a Hyperthermophilic Archaeon,

*Thermococcus Litoralis*. // *Biocatalysis* - 1994. - V. 11. - P. 117–129.

[99] Ghosh D., Sawicki M., Pletnev V., Erman M., Ohno S., Nakajin S., Duax W.L., Porcine Carbonyl Reductase. // *J. Biol. Chem.* - 2001. - V. 276. - P. 18457–18463.

[100] Kitson T.M., Kitson K.E., Studies of the esterase activity of cytosolic aldehyde dehydrogenase with resorufin acetate as substrate. // *Biochem. J.* - 1997. - V. 322. - P. 701–708.

[101] Shortall K., Djeghader A., Magner E., Soulimane T., Insights into Aldehyde Dehydrogenase Enzymes: A Structural Perspective. // *Front. Mol. Biosci.* - 2021. - V. 8.

[102] Rodríguez-Zavala J.S., Allali-Hassani A., Weiner H., Characterization of *E. coli* tetrameric aldehyde dehydrogenases with atypical properties compared to other aldehyde dehydrogenases. // *Protein Sci.* - 2006. - V. 15. - P. 1387–1396.

[103] Liu L.-K., Tanner J.J., Crystal Structure of Aldehyde Dehydrogenase 16 Reveals Trans-Hierarchical Structural Similarity and a New Dimer. // *J. Mol. Biol.* - 2019. - V. 431. - P. 524–541.

[104] Valenzuela-Soto E.M., Muñoz-Clares R.A., Betaine-aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso Ordered Bi Bi steady state mechanism. // *J. Biol. Chem.* - 1993. - V. 268. - P. 23818–23823.

[105] Sidhu R., Blair A., Human liver aldehyde dehydrogenase. Kinetics of aldehyde oxidation. // *J. Biol. Chem.* - 1975. - V. 250. - P. 7899–7904.

[106] Kotchoni S.O., Kuhns C., Ditzer A., Kirch H.-H., Bartels D., Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. // *Plant, Cell Environ.* - 2006. - V. 29. - P. 1033–1048.

[107] Ahmed Laskar A., Younus H., Aldehyde toxicity and metabolism: the role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. // *Drug Metab. Rev.* - 2019. - V. 51. - P. 42–64.

[108] Hanlon S.P., Hill T.K., Flavell M.A., Stringfellow J.M., Cooper R.A., 2-Phenylethylamine catabolism by *Escherichia coli* K-12: gene organization and expression.

// Microbiology - 1997. - V. 143. - P. 513–518.

[109] Caballero E., Baldomá L., Ros J., Boronat A., Aguilar J., Identification of lactaldehyde dehydrogenase and glycolaldehyde dehydrogenase as functions of the same protein in *Escherichia coli*. // J. Biol. Chem. - 1983. - V. 258. - P. 7788–7792.

[110] Vasiliou V., Nebert D.W., Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. // Hum. Genomics - 2005. - V. 2. - P. 138.

[111] Riveros-Rosas H., Julián-Sánchez A., Moreno-Hagelsieb G., Muñoz-Clares R.A., Aldehyde dehydrogenase diversity in bacteria of the *Pseudomonas* genus. // Chem. Biol. Interact. - 2019. - V. 304. - P. 83–87.

[112] Hempel, J.; Perozich, J.; Chapman, T.; Rose, J.; Boesch, J. S.; Liu, Z.-J.; Lindahl, R.; and Wang, B.-C. Aldehyde dehydrogenase catalytic mechanism. *In Advances in Experimental Medicine and Biology*; 1999; pp. 53–59.

[113] Vedadi M., Szittner R., Smillie L., Meighen E., Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP<sup>+</sup>-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*. // Biochemistry - 1995. - V. 34. - P. 16725–16732.

[114] Wang X., Weiner H., Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (Class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. // Biochemistry - 1995. - V. 34. - P. 237–243.

[115] Brunner N.A., Brinkmann H., Siebers B., Hensel R., NAD<sup>+</sup>-dependent Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. // J. Biol. Chem. - 1998. - V. 273. - P. 6149–6156.

[116] Verhees, C.H., Kengen, S.W.M., Tuininga, J.E., Schut, G.J., Adams, M.W.W., Vos, W.M. De, and Oost, J. Van Der The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochemical Journal*. . (2003).

[117] Ettema T.J.G., Ahmed H., Geerling A.C.M., Oost J. van der, Siebers B., The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) of *Sulfolobus solfataricus*: a key-enzyme of the semi-phosphorylative branch of the Entner–Doudoroff pathway. // Extremophiles - 2008. - V. 12. - P. 75–88.

- [118] Bucur B., Munteanu F.-D., Marty J.-L., Vasilescu A., Advances in Enzyme-Based Biosensors for Pesticide Detection. // *Biosensors* - 2018. - V. 8. - P. 27.
- [119] Noguer T., Marty J.-L., High sensitive bienzymic sensor for the detection of dithiocarbamate fungicides. // *Anal. Chim. Acta* - 1997. - V. 347. - P. 63–70.
- [120] Steffler F., Sieber V., Refolding of a Thermostable Glyceraldehyde Dehydrogenase for Application in Synthetic Cascade Biomanufacturing. // *PLoS One* - 2013. - V. 8. - P. e70592.
- [121] Lee S., Park D.J., Yoon J., Bang S.H., Kim Y.-H., Min J., Formaldehyde Treatment Using Overexpressed Aldehyde Dehydrogenase 6 from Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2018. - V. 18. - P. 2979–2985.
- [122] Zhang X.-Y., Ou X.-Y., Fu Y.-J., Zong M.-H., Li N., Efficient synthesis of 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid by *Escherichia coli* overexpressing aldehyde dehydrogenases. // *J. Biotechnol.* - 2020. - V. 307. - P. 125–130.
- [123] Shi S.-S., Zhang X.-Y., Zong M.-H., Wang C.-F., Li N., Selective synthesis of 2-furoic acid and 5-hydroxymethyl-2-furancarboxylic acid from bio-based furans by recombinant *Escherichia coli* cells. // *Mol. Catal.* - 2019. - V. 469. - P. 68–74.
- [124] Shang J., Wang X., Zhang M., Li L., Wang R., Huang H., Wang S., An NAD-specific 6-hydroxy-3-succinoyl-semialdehyde-pyridine dehydrogenase from nicotine-degrading *Agrobacterium tumefaciens* strain S33. // *Microbiol. Spectr.* - 2021. - V. 9. - P. 1–13.
- [125] Steffler F., Guterl J.-K., Sieber V., Improvement of thermostable aldehyde dehydrogenase by directed evolution for application in Synthetic Cascade Biomanufacturing. // *Enzyme Microb. Technol.* - 2013. - V. 53. - P. 307–314.
- [126] Rodriguez-Zavala J., Weiner H., Role of the C-terminal tail on the quaternary structure of aldehyde dehydrogenases. // *Chem. Biol. Interact.* - 2001. - V. 130–132. - P. 151–160.
- [127] Hurley, T. D.; Steinmetz, C. G.; and Weiner, H. Three-Dimensional Structure of Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *In Advances in Experimental Medicine and Biology*; 1999; pp. 15–25.

[128] Liu Z.-J., Sun Y.-J., Rose J., Chung Y.-J., Hsiao C.-D., Chang W.-R., Kuo I., Perozich J., Lindahl R., Hempel J., Wang B.-C., The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. // *Nat. Struct. Biol.* - 1997. - V. 4. - P. 317–326.

[129] Keller M.A., Zander U., Fuchs J.E., Kreutz C., Watschinger K., Mueller T., Golderer G., Liedl K.R., Ralser M., Kräutler B., Werner E.R., Marquez J.A., A gatekeeper helix determines the substrate specificity of Sjögren–Larsson Syndrome enzyme fatty aldehyde dehydrogenase. // *Nat. Commun.* - 2014. - V. 5. - P. 4439.

[130] Tsybovsky Y., Donato H., Krupenko N.I., Davies C., Krupenko S.A., Crystal Structures of the Carboxyl Terminal Domain of Rat 10-Formyltetrahydrofolate Dehydrogenase: Implications for the Catalytic Mechanism of Aldehyde Dehydrogenases. // *Biochemistry* - 2007. - V. 46. - P. 2917–2929.

[131] Cobessi D., Tête-Favier F., Marchal S., Branlant G., Aubry A., Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. // *J. Mol. Biol.* - 2000. - V. 300. - P. 141–152.

[132] González-Segura L., Rudiño-Piñera E., Muñoz-Clares R.A., Horjales E., The Crystal Structure of A Ternary Complex of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* Provides New Insight into the Reaction Mechanism and Shows A Novel Binding Mode of the 2'-Phosphate of NADP and A Novel Cation Binding Site. // *J. Mol. Biol.* - 2009. - V. 385. - P. 542–557.

[133] Ahvazy B., Coulombe R., Delarge M., Vedadi M., Zhang L., Meignen E., Vrielink A., Crystal structure of the NADP<sup>+</sup>-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. // *Biochem. J.* - 2000. - V. 349. - P. 853–861.

[134] Tsybovsky Y., Krupenko S.A., Conserved Catalytic Residues of the ALDH1L1 Aldehyde Dehydrogenase Domain Control Binding and Discharging of the Coenzyme. // *J. Biol. Chem.* - 2011. - V. 286. - P. 23357–23367.

[135] D'Ambrosio K., Pailot A., Talfournier F., Didierjean C., Benedetti E., Aubry A., Branlant G., Corbier C., The First Crystal Structure of a Thioacylenzyme Intermediate

in the ALDH Family: New Coenzyme Conformation and Relevance to Catalysis †. // *Biochemistry* - 2006. - V. 45. - P. 2978–2986.

[136] Marchal S., Rahuel-Clermont S., Branlant G., Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. // *Biochemistry* - 2000. - V. 39. - P. 3327–3335.

[137] Muñoz-Clares R.A., González-Segura L., Díaz-Sánchez Á.G., Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction. // *Chem. Biol. Interact.* - 2011. - V. 191. - P. 137–146.

[138] Muñoz-Clares R.A., González-Segura L., Riveros-Rosas H., Julián-Sánchez A., Amino acid residues that affect the basicity of the catalytic glutamate of the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. // *Chem. Biol. Interact.* - 2015. - V. 234. - P. 45–58.

[139] Perez-Miller S.J., Hurley T.D., Coenzyme isomerization is integral to catalysis in aldehyde dehydrogenase. // *Biochemistry* - 2003. - V. 42. - P. 7100–7109.

[140] Johansson K., Ramaswamy S., Eklund H., El-Ahmad M., Hjelmqvist L., Jörnvall H., Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. // *Protein Sci.* - 1998. - V. 7. - P. 2106–2117.

[141] Langendorf C.G., Key T.L.G., Fenalti G., Kan W.-T., Buckle A.M., Caradoc-Davies T., Tuck K.L., Law R.H.P., Whisstock J.C., The X-Ray Crystal Structure of *Escherichia coli* Succinic Semialdehyde Dehydrogenase; Structural Insights into NADP+/Enzyme Interactions. // *PLoS One* - 2010. - V. 5. - P. e9280.

[142] Costanzo L. Di, Gomez G.A., Christianson D.W., Crystal Structure of Lactaldehyde Dehydrogenase from *Escherichia coli* and Inferences Regarding Substrate and Cofactor Specificity. // *J. Mol. Biol.* - 2007. - V. 366. - P. 481–493.

[143] Bains J., Boulanger M.J., Structural and Biochemical Characterization of a Novel Aldehyde Dehydrogenase Encoded by the Benzoate Oxidation Pathway in *Burkholderia xenovorans* LB400. // *J. Mol. Biol.* - 2008. - V. 379. - P. 597–608.

[144] Díaz-Sánchez Á.G., González-Segura L., Rudiño-Piñera E., Lira-Rocha A., Torres-Larios A., Muñoz-Clares R.A., Novel NADPH-cysteine covalent adduct found in

the active site of an aldehyde dehydrogenase. // *Biochem. J.* - 2011. - V. 439. - P. 443–452.

[145] Muñoz-Clares R.A., Díaz-Sánchez Á.G., González-Segura L., Montiel C., Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: Mechanistic and regulatory implications. // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2010. - V. 493. - P. 71–81.

[146] Tsybovsky Y., Malakhau Y., Strickland K.C., Krupenko S.A., The mechanism of discrimination between oxidized and reduced coenzyme in the aldehyde dehydrogenase domain of Aldh111. // *Chem. Biol. Interact.* - 2013. - V. 202. - P. 62–69.

[147] Wymore T., Deerfield D.W., Hempel J., Mechanistic Implications of the Cysteine–Nicotinamide Adduct in Aldehyde Dehydrogenase Based on Quantum Mechanical/Molecular Mechanical Simulations. // *Biochemistry* - 2007. - V. 46. - P. 9495–9506.

[148] Grishin N. V., Phillips M.A., Goldsmith E.J., Modeling of the spatial structure of eukaryotic ornithine decarboxylases. // *Protein Sci.* - 1995. - V. 4. - P. 1291–1304.

[149] Schneider G., Käck H., Lindqvist Y., The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. // *Structure* - 2000. - V. 8. - P. R1–R6.

[150] Percudani R., Peracchi A., The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. // *BMC Bioinformatics* - 2009. - V. 10. - P. 273.

[151] John R.A., Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* - 1995. - V. 1248. - P. 81–96.

[152] Hayashi H., Pyridoxal Enzymes: Mechanistic Diversity and Uniformity. // *J. Biochem.* - 1995. - V. 118. - P. 463–473.

[153] Jansonius J.N., Structure, evolution and action of vitamin B6-dependent enzymes. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* - 1998. - V. 8. - P. 759–769.

[154] Cooper A.J.L., Meister A., An appreciation of Professor Alexander E. Braunstein. The discovery and scope of enzymatic transamination. // *Biochimie* - 1989. - V. 71. - P. 387–404.



[155] Ovchinnikov Y.A., Egorov C.A., Aldanova N.A., Feigina M.Y., Lipkin V.M., Abdulaev N.G., Grishin E.V., Kiselev A.P., Modyanov N.N., Braunstein A.E., Polyanovsky O.L., Nosikov V.V., The complete amino acid sequence of cytoplasmic aspartate aminotransferase from pig heart. // FEBS Lett. - 1973. - V. 29. - P. 31–34.

[156] Eliot A.C., Kirsch J.F., Pyridoxal Phosphate Enzymes: Mechanistic, Structural, and Evolutionary Considerations. // Annu. Rev. Biochem. - 2004. - V. 73. - P. 383–415.

[157] Steffen-Munsberg F., Vickers C., Kohls H., Land H., Mallin H., Nobili A., Skalden L., Bergh T. van den, Joosten H.-J., Berglund P., Höhne M., Bornscheuer U.T., Bioinformatic analysis of a PLP-dependent enzyme superfamily suitable for biocatalytic applications. // Biotechnol. Adv. - 2015. - V. 33. - P. 566–604.

[158] Rudat J., Brucher B.R., Syldatk C., Transaminases for the synthesis of enantiopure beta-amino acids. // AMB Express - 2012. - V. 2. - P. 11.

[159] 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. - P. 2343–2357.

[160] Velick S.F., Vavra J., A kinetic and equilibrium analysis of the glutamic oxaloacetate transaminase mechanism. // J. Biol. Chem. - 1962. - V. 237. - P. 2109–2122.

[161] Goldberg J.M., Swanson R. V., Goodman H.S., Kirsch J.F., The tyrosine-225 to phenylalanine mutation of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase results in an alkaline transition in the spectrophotometric and kinetic pK<sub>a</sub> values and reduced values of both k<sub>cat</sub> and K<sub>m</sub>. // Biochemistry - 1991. - V. 30. - P. 305–312.

[162] Kirsch J.F., Eichele G., Ford G.C., Vincent M.G., Jansonius J.N., Gehring H., Christen P., Mechanism of action of aspartate aminotransferase proposed on the basis of its spatial structure. // J. Mol. Biol. - 1984. - V. 174. - P. 497–525.

[163] Toney M.D., Controlling reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics - 2011. - V. 1814. - P. 1407–1418.

[164] Toney M.D., Reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. // Arch.

Biochem. Biophys. - 2005. - V. 433. - P. 279–287.

[165] Toney M.D., Kirsch J.F., Brønsted analysis of aspartate aminotransferase via exogenous catalysis of reactions of an inactive mutant. // *Protein Sci.* - 1992. - V. 1. - P. 107–119.

[166] Toney M.D., Kirsch J.F., The K258R mutant of aspartate aminotransferase stabilizes the quinonoid intermediate. // *J. Biol. Chem.* - 1991. - V. 266. - P. 23900–23903.

[167] Griswold W.R., Toney M.D., Role of the Pyridine Nitrogen in Pyridoxal 5'-Phosphate Catalysis: Activity of Three Classes of PLP Enzymes Reconstituted with Deazapyridoxal 5'-Phosphate. // *J. Am. Chem. Soc.* - 2011. - V. 133. - P. 14823–14830.

[168] Karsten W.E., Cook P.F., Detection of a gem-diamine and a stable quinonoid intermediate in the reaction catalyzed by serine-glyoxylate aminotransferase from *Hyphomicrobium methylovorum*. // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* - 2009. - V. 1790. - P. 575–580.

[169] Gehring H., Transfer of C.alpha.-hydrogen of glutamate to coenzyme of aspartate aminotransferase during transamination reaction. // *Biochemistry* - 1984. - V. 23. - P. 6335–6340.

[170] Slabu I., Galman J.L., Lloyd R.C., Turner N.J., Discovery, Engineering, and Synthetic Application of Transaminase Biocatalysts. // *ACS Catal.* - 2017. - V. 7. - P. 8263–8284.

[171] Patel R., Biocatalytic Synthesis of Chiral Alcohols and Amino Acids for Development of Pharmaceuticals. // *Biomolecules* - 2013. - V. 3. - P. 741–777.

[172] Rishavy M.A., Cleland W.W., <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N kinetic isotope effects on the reaction of aspartate aminotransferase and the tyrosine-225 to phenylalanine mutant. // *Biochemistry* - 2000. - V. 39. - P. 7546–7551.

[173] Spies M.A., Toney M.D., Multiple hydrogen kinetic isotope effects for enzymes catalyzing exchange with solvent: application to alanine racemase. // *Biochemistry* - 2003. - V. 42. - P. 5099–5107.

[174] Goldberg J.M., Kirsch J.F., The Reaction Catalyzed by *Escherichia coli*

Aspartate Aminotransferase Has Multiple Partially Rate-Determining Steps, While That Catalyzed by the Y225F Mutant Is Dominated by Ketimine Hydrolysis. // *Biochemistry* - 1996. - V. 35. - P. 5280–5291.

[175] Amorim Franco T.M., Hegde S., Blanchard J.S., Chemical mechanism of the branched-chain aminotransferase IlvE from *Mycobacterium tuberculosis*. // *Biochemistry* - 2016. - V. 55. - P. 6295–6303.

[176] Dunathan H.C., Conformation and reaction specificity in pyridoxal phosphate enzymes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1966. - V. 55. - P. 712–6.

[177] Scaletti E.R., Luckner S.R., Krause K.L., Structural features and kinetic characterization of alanine racemase from *Staphylococcus aureus* (Mu50). // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2012. - V. 68. - P. 82–92.

[178] Goto M., Miyahara I., Hayashi H., Kagamiyama H., Hirotsu K., Crystal structures of branched-chain amino acid aminotransferase complexed with glutamate and glutarate: true reaction intermediate and double substrate recognition of the enzyme. // *Biochemistry* - 2003. - V. 42. - P. 3725–3733.

[179] Iwasaki A., Matsumoto K., Hasegawa J., Yasohara Y., A novel transaminase, (R)-amine:pyruvate aminotransferase, from *Arthrobacter* sp. KNK168 (FERM BP-5228): purification, characterization, and gene cloning. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2012. - V. 93. - P. 1563–1573.

[180] Inoue K., Kuramitsu S., Aki K., Watanabe Y., Takagi T., Nishigai M., Ikai A., Kagamiyama H., Branched-Chain Amino Acid Aminotransferase of *Escherichia coli*: Overproduction and Properties1. // *J. Biochem.* - 1988. - V. 104. - P. 777–784.

[181] Norton J.E., Sokatch J.R., Purification and partial characterization of the branched chain amino acid transaminase of *Pseudomonas aeruginosa*. // *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.* - 1970. - V. 206. - P. 261–269.

[182] Okada K., Hirotsu K., Hayashi H., Kagamiyama H., Structures of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase and its complexes with 4-methylvalerate and 2-methylleucine: induced fit and substrate recognition of the Enzyme. // *Biochemistry* - 2001. - V. 40. - P. 7453–7463.

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

[184] Sayer C., Martinez-Torres R.J., Richter N., Isupov M.N., Hailes H.C., Littlechild J.A., Ward J.M., The substrate specificity, enantioselectivity and structure of the ( R )-selective amine : pyruvate transaminase from *Nectria haematococca*. // *FEBS J.* - 2014. - V. 281. - P. 2240–2253.

[185] Thomsen M., Skalden L., Palm G.J., Höhne M., Bornscheuer U.T., Hinrichs W., Crystallographic characterization of the ( R )-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus*. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2014. - V. 70. - P. 1086–1093.

[186] Sugio S., Petsko G.A., Manning J.M., Soda K., Ringe D., Crystal Structure of a D-Amino Acid Aminotransferase: How the Protein Controls Stereoselectivity. // *Biochemistry* - 1995. - V. 34. - P. 9661–9669.

[187] Inoue K., Kuramitsu S., Okamoto A., Hirotsu K., Higuchi T., Morino Y., Kagamiyama H., Tyr225 in Aspartate Aminotransferase: Contribution of the Hydrogen Bond between Tyr225 and Coenzyme to the Catalytic Reaction1. // *J. Biochem.* - 1991. - V. 109. - P. 570–576.

[188] Wybenga G.G., Crismaru C.G., Janssen D.B., Dijkstra B.W., Structural Determinants of the  $\beta$ -Selectivity of a Bacterial Aminotransferase. // *J. Biol. Chem.* - 2012. - V. 287. - P. 28495–28502.

[189] Iglesias C., Panizza P., Rodriguez Giordano S., Identification, expression and characterization of an R- $\omega$ -transaminase from *Capronia semiimmersa*. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2017. - V. 101. - P. 5677–5687.

[190] Guan L.-J., Ohtsuka J., Okai M., Miyakawa T., Mase T., Zhi Y., Hou F., Ito N., Iwasaki A., Yasohara Y., Tanokura M., A new target region for changing the substrate specificity of amine transaminases. // *Sci. Rep.* - 2015. - V. 5. - P. 1–8.

[191] Chen C.-D., Lin C.-H., Chuankhayan P., Huang Y.-C., Hsieh Y.-C., Huang T.-F., Guan H.-H., Liu M.-Y., Chang W.-C., Chen C.-J., Crystal Structures of Complexes

of the Branched-Chain Aminotransferase from *Deinococcus radiodurans* with - Ketoisocaproate and L-Glutamate Suggest the Radiation Resistance of This Enzyme for Catalysis. // J. Bacteriol. - 2012. - V. 194. - P. 6206–6216.

[192] Skalden L., Thomsen M., Höhne M., Bornscheuer U.T., Hinrichs W., Structural and biochemical characterization of the dual substrate recognition of the ( R )-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus*. // FEBS J. - 2015. - V. 282. - P. 407–415.

[193] Höhne M., Schätzle S., Jochens H., Robins K., Bornscheuer U.T., Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. // Nat. Chem. Biol. - 2010. - V. 6. - P. 807–813.

[194] Thomsen M., Skalden L., Palm G.J., Höhne M., Bornscheuer U.T., Hinrichs W., Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of the ( R )-selective amine transaminase from *Aspergillus fumigatus*. // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. - 2013. - V. 69. - P. 1415–1417.

[195] Hutson, S. Structure and function of branched chain aminotransferases. 2001; pp. 175–206.

[196] Zaitseva J., Lu J., Olechoski K.L., Lamb A.L., Two Crystal Structures of the Isochorismate Pyruvate Lyase from *Pseudomonas aeruginosa*. // J. Biol. Chem. - 2006. - V. 281. - P. 33441–33449.

[197] Wildermuth M.C., Dewdney J., Wu G., Ausubel F.M., Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. // Nature - 2001. - V. 414. - P. 562–565.

[198] Savile C.K., Janey J.M., Mundorff E.C., Moore J.C., Tam S., Jarvis W.R., Colbeck J.C., Krebber A., Fleitz F.J., Brands J., Devine P.N., Huisman G.W., Hughes G.J., Biocatalytic Asymmetric Synthesis of Chiral Amines from Ketones Applied to Sitagliptin Manufacture. // Science (80-. ). - 2010. - V. 329. - P. 305–309.

[199] Fuchs M., Farnberger J.E., Kroutil W., The Industrial Age of Biocatalytic Transamination. // European J. Org. Chem. - 2015. - V. 2015. - P. 6965–6982.

[200] Desai A.A., Sitagliptin Manufacture: A Compelling Tale of Green Chemistry,

Process Intensification, and Industrial Asymmetric Catalysis. // *Angew. Chemie Int. Ed.* - 2011. - V. 50. - P. 1974–1976.

[201] Busto E., Simon R.C., Grischek B., Gotor-Fernández V., Kroutil W., Cutting short the asymmetric synthesis of the ramatroban precursor by employing  $\omega$ -transaminases. // *Adv. Synth. Catal.* - 2014. - V. 356. - P. 1937–1942.

[202] Simon R.C., Richter N., Busto E., Kroutil W., Recent developments of cascade reactions involving  $\omega$ -transaminases. // *ACS Catal.* - 2014. - V. 4. - P. 129–143.

[203] Dunbabin A., Subrizi F., Ward J.M., Sheppard T.D., Hailes H.C., Furfurylamines from biomass: transaminase catalysed upgrading of furfurals. // *Green Chem.* - 2017. - V. 19. - P. 397–404.

[204] Brundiek, H. and Höhne, M. Transaminases - A Biosynthetic Route for Chiral Amines. In *Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2016; pp. 199–218.

[205] Patil M.D., Grogan G., Bommarius A., Yun H., Recent advances in  $\omega$ -transaminase-mediated biocatalysis for the enantioselective synthesis of chiral amines. // *Catalysts* - 2018. - V. 8. - P. 254.

[206] Guo F., Berglund P., Transaminase biocatalysis: optimization and application. // *Green Chem.* - 2017. - V. 19. - P. 333–360.

[207] Tufvesson P., Jensen J.S., Kroutil W., Woodley J.M., Experimental determination of thermodynamic equilibrium in biocatalytic transamination. // *Biotechnol. Bioeng.* - 2012. - V. 109. - P. 2159–2162.

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

[209] Yoon S., Patil M.D., Sarak S., Jeon H., Kim G., Khobragade T.P., Sung S., Yun H., Deracemization of Racemic Amines to Enantiopure ( R )- and ( S )-amines by Biocatalytic Cascade Employing  $\omega$ -Transaminase and Amine Dehydrogenase. // *ChemCatChem* - 2019. - V. 11. - P. 1898–1902.

- [210] Bornscheuer U.T., The fourth wave of biocatalysis is approaching. // *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* - 2018. - V. 376. - P. 20170063.
- [211] Bornscheuer U.T., Huisman G.W., Kazlauskas R.J., Lutz S., Moore J.C., Robins K., Engineering the third wave of biocatalysis. // *Nature* - 2012. - V. 485. - P. 185–194.
- [212] Grishin D. V., Zhdanov D.D., Pokrovskaya M. V., Sokolov N.N., D-amino acids in nature, agriculture and biomedicine. // *Front. Life Sci.* - 2020. - V. 13. - P. 11–22.
- [213] Park E.-S., Kim M., Shin J.-S., One-pot conversion of L-threonine into L-homoalanine: biocatalytic production of an unnatural amino acid from a natural one. // *Adv. Synth. Catal.* - 2010. - V. 352. - P. 3391–3398.
- [214] Xian M., Alaux S., Sagot E., Gefflaut T., Chemoenzymatic synthesis of glutamic acid analogues: substrate specificity and synthetic applications of branched chain aminotransferase from *Escherichia coli*. // *J. Org. Chem.* - 2007. - V. 72. - P. 7560–7566.
- [215] D’Este M., Alvarado-Morales M., Angelidaki I., Amino acids production focusing on fermentation technologies – A review. // *Biotechnol. Adv.* - 2018. - V. 36. - P. 14–25.
- [216] Jiang J., Chen X., Zhang D., Wu Q., Zhu D., Characterization of (*R*)-selective amine transaminases identified by in silico motif sequence blast. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2015. - V. 99. - P. 2613–2621.
- [217] Xing R.Y., Whitman W.B., Characterization of amino acid aminotransferases of *Methanococcus aeolicus*. // *J. Bacteriol.* - 1992. - V. 174. - P. 541–548.
- [218] 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.
- [219] Venos E.S., Knodel M.H., Radford C.L., Berger B.J., Branched-chain amino acid aminotransferase and methionine formation in *Mycobacterium tuberculosis*. // *BMC Microbiol.* - 2004. - V. 4. - P. 1–14.
- [220] Gao S., Su Y., Zhao L., Li G., Zheng G., Characterization of a (*R*)-selective

amine transaminase from *Fusarium oxysporum*. // *Process Biochem.* - 2017. - V. 63. - P. 130–136.

[221] Yu X., Wang X., Engel P.C., The specificity and kinetic mechanism of branched-chain amino acid aminotransferase from *Escherichia coli* studied with a new improved coupled assay procedure and the enzyme's potential for biocatalysis. // *FEBS J.* - 2014. - V. 281. - P. 391–400.

[222] Fuchikami Y., Yoshimura T., Gutierrez A., Soda K., Esaki N., Construction and Properties of a Fragmentary D-Amino Acid Aminotransferase. // *J. Biochem.* - 1998. - V. 124. - P. 905–910.

[223] Barber J.E.B., Damry A.M., Calderini G.F., Walton C.J.W., Chica R.A., Continuous colorimetric screening assay for detection of d-amino acid aminotransferase mutants displaying altered substrate specificity. // *Anal. Biochem.* - 2014. - V. 463. - P. 23–30.

[224] Hirotsu K., Goto M., Okamoto A., Miyahara I., Dual substrate recognition of aminotransferases. // *Chem. Rec.* - 2005. - V. 5. - P. 160–172.

[225] Radkov A.D., Moe L.A., Bacterial synthesis of d-amino acids. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2014. - V. 98. - P. 5363–5374.

[226] Pucci M.J., Thanassi J.A., Ho H.T., Falk P.J., Dougherty T.J., *Staphylococcus haemolyticus* contains two D-glutamic acid biosynthetic activities, a glutamate racemase and a D-amino acid transaminase. // *J. Bacteriol.* - 1995. - V. 177. - P. 336–342.

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

[228] Kishimoto K., Yoshimura T., Nobuyoshi E., Shigetoshi S., Manning J.M., Role of Leucine 201 of Thermostable Aminotransferase from a Thermophile, *Bacillus* sp. YM-1. // *J. Biochem.* - 1995. - V. 117. - P. 691–696.

[229] Bhatia M.B., Pozo A.M. Del, Ringe D., Yoshimura T., Soda K., Manning J.M., Role reversal for substrates and inhibitors. Slow inactivation of D-amino acid transaminase by its normal substrates and protection by inhibitors. // *J. Biol. Chem.* - 1993.



- V. 268. - P. 17687–17694.

[230] Kobayashi J., Shimizu Y., Mutaguchi Y., Doi K., Ohshima T., Characterization of d-amino acid aminotransferase from *Lactobacillus salivarius*. // J. Mol. Catal. B Enzym. - 2013. - V. 94. - P. 15–22.

[231] Lepore B.W., Liu D., Peng Y., Fu M., Yasuda C., Manning J.M., Silverman R.B., Ringe D., Chiral Discrimination among Aminotransferases: Inactivation by 4-Amino-4,5-dihydrothiophenecarboxylic Acid. // Biochemistry - 2010. - V. 49. - P. 3138–3147.

[232] Schätzle S., Steffen-Munsberg F., Thontowi A., Höhne M., Robins K., Bornscheuer U.T., Enzymatic asymmetric synthesis of enantiomerically pure aliphatic, aromatic and arylaliphatic amines with (*R*)-selective amine transaminases. // Adv. Synth. Catal. - 2011. - V. 353. - P. 2439–2445.

[233] Telzerow A., Paris J., Håkansson M., González-Sabín J., Ríos-Lombardía N., Schürmann M., Gröger H., Morís F., Kourist R., Schwab H., Steiner K., Amine Transaminase from *Exophiala Xenobiotica* —Crystal Structure and Engineering of a Fold IV Transaminase that Naturally Converts Biaryl Ketones. // ACS Catal. - 2019. - V. 9. - P. 1140–1148.

[234] Ferrandi E.E., Monti D., Amine transaminases in chiral amines synthesis: recent advances and challenges. // World J. Microbiol. Biotechnol. - 2018. - V. 34. - P. 13.

[235] Park E.-S., Dong J.-Y., Shin J.-S., Active site model of (*R*)-selective  $\omega$ -transaminase and its application to the production of d-amino acids. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2014. - V. 98. - P. 651–660.

[236] Iwasaki A., Yamada Y., Kizaki N., Ikenaka Y., Hasegawa J., Microbial synthesis of chiral amines by (*R*)-specific transamination with *Arthrobacter* sp. KNK168. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2006. - V. 69. - P. 499–505.

[237] Fesko K., Steiner K., Breinbauer R., Schwab H., Schürmann M., Strohmeier G.A., Investigation of one-enzyme systems in the  $\omega$ -transaminase-catalyzed synthesis of chiral amines. // J. Mol. Catal. B Enzym. - 2013. - V. 96. - P. 103–110.

[238] Schirotti D., Peracchi A., A subfamily of PLP-dependent enzymes specialized

in handling terminal amines. // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* - 2015. - V. 1854. - P. 1200–1211.

[239] Steffen-Munsberg F., Vickers C., Thontowi A., Schätzle S., Meinhardt T., Svedendahl Humble M., Land H., Berglund P., Bornscheuer U.T., Höhne M., Revealing the structural basis of promiscuous amine transaminase activity. // *ChemCatChem* - 2013. - V. 5. - P. 154–157.

[240] Watanabe N., Sakabe K., Sakabe N., Higashi T., Sasaki K., Aibara S., Morita Y., Yonaha K., Toyama S., Fukutani H., Crystal Structure Analysis of  $\omega$ -Amino Acid: Pyruvate Aminotransferase with a Newly Developed Weissenberg Camera and an Imaging Plate Using Synchrotron Radiation1. // *J. Biochem.* - 1989. - V. 105. - P. 1–3.

[241] Steffen-Munsberg F., Matzel P., Sowa M.A., Berglund P., Bornscheuer U.T., Höhne M., *Bacillus anthracis*  $\omega$ -amino acid:pyruvate transaminase employs a different mechanism for dual substrate recognition than other amine transaminases. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2016. - V. 100. - P. 4511–4521.

[242] Kaulmann U., Smithies K., Smith M.E.B., Hailes H.C., Ward J.M., Substrate spectrum of  $\omega$ -transaminase from *Chromobacterium violaceum* DSM30191 and its potential for biocatalysis. // *Enzyme Microb. Technol.* - 2007. - V. 41. - P. 628–637.

[243] Bea H.-S., Park H.-J., Lee S.-H., Yun H., Kinetic resolution of aromatic  $\beta$ -amino acids by  $\omega$ -transaminase. // *Chem. Commun.* - 2011. - V. 47. - P. 5894.

[244] Shon M., Shanmugavel R., Shin G., Mathew S., Lee S.-H., Yun H., Enzymatic synthesis of chiral  $\gamma$ -amino acids using  $\omega$ -transaminase. // *Chem. Commun.* - 2014. - V. 50. - P. 12680–12683.

[245] Shin J.-S., Yun H., Jang J.-W., Park I., Kim B.-G., Purification, characterization, and molecular cloning of a novel amine:pyruvate transaminase from *Vibrio fluvialis* JS17. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2003. - V. 61. - P. 463–471.

[246] Okamoto A., Nakai Y., Hayashi H., Hirotsu K., Kagamiyama H., Crystal structures of *Paracoccus denitrificans* aromatic amino acid aminotransferase: a substrate recognition site constructed by rearrangement of hydrogen bond network 1 1 Edited by R. Huber. // *J. Mol. Biol.* - 1998. - V. 280. - P. 443–461.

[247] Villalobos A., McConnell K., Midelfort K.S., Chang J.S., Mistry A., Han S., Karmilowicz M.J., Govindarajan S., Wong J.W., Gehlhaar D.K., Kumar R., Minshull J., Anderson M., Redesigning and characterizing the substrate specificity and activity of *Vibrio fluvialis* aminotransferase for the synthesis of imagabalin. // Protein Eng. Des. Sel. - 2012. - V. 26. - P. 25–33.

[248] Sayer C., Isupov M.N., Westlake A., Littlechild J.A., Structural studies of *Pseudomonas* and *Chromobacterium*  $\omega$ -aminotransferases provide insights into their differing substrate specificity. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2013. - V. 69. - P. 564–576.

[249] Pavkov-Keller T., Strohmeier G.A., Diepold M., Peeters W., Smeets N., Schürmann M., Gruber K., Schwab H., Steiner K., Discovery and structural characterisation of new fold type IV-transaminases exemplify the diversity of this enzyme fold. // Sci. Rep. - 2016. - V. 6. - P. 38183.

[250] 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.

[251] Zeifman Y.S., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., Timofeev V.I., Rakitina T. V., Popov V.O., Bezsudnova E.Y., Functional characterization of PLP fold type IV transaminase with a mixed type of activity from *Haliangium ochraceum*. // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics - 2019. - V. 1867. - P. 575–585.

[252] Nikulin M., Švedas V., Prospects of using biocatalysis for the synthesis and modification of polymers. // Molecules - 2021. - V. 26. - P. 2750.

[253] Bell E.L., Finnigan W., France S.P., Green A.P., Hayes M.A., Hepworth L.J., Lovelock S.L., Niikura H., Osuna S., Romero E., Ryan K.S., Turner N.J., Flitsch S.L., Biocatalysis. // Nat. Rev. Methods Prim. - 2021. - V. 1. - P. 46.

[254] Fryszkowska A., Devine P.N., Biocatalysis in drug discovery and development. // Curr. Opin. Chem. Biol. - 2020. - V. 55. - P. 151–160.

[255] Sedlaczek L., Smith L.L., Biotransformations of Steroids. // Crit. Rev. Biotechnol. - 1988. - V. 7. - P. 187–236.

[256] Estell D.A., Graycar T.P., Wells J.A., Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. // *J. Biol. Chem.* - 1985. - V. 260. - P. 6518–6521.

[257] Jensen, V. J. and Rugh, S. [33] Industrial-scale production and application of immobilized glucose isomerase. *In Methods in Enzymology*; 1987; pp. 356–370.

[258] Bruggink A., Roos E.C., Vroom E. DE, ChemInform Abstract: Penicillin Acylase in the Industrial Production of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. // *ChemInform* - 2010. - V. 29. - P. no-no.

[259] Seki M., Development of a Practical Synthesis of a Key Intermediate for Diltiazem. // *J. Synth. Org. Chem. Japan* - 2003. - V. 61. - P. 236–245.

[260] Hills G., Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* - 2003. - V. 105. - P. 601–607.

[261] Nagasawa T., Nakamura T., Yamada H., Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 1990. - V. 34.

[262] Liang J., Lalonde J., Borup B., Mitchell V., Mundorff E., Trinh N., Kochrekar D.A., Development of a biocatalytic process as an alternative to the ( - ) -DIP-Cl-mediated asymmetric reduction of a key intermediate of montelukast abstract : A ketoREDuctase ( KRED ) engineered via directed evolution. // *Org. Process Res. Dev.* - 2010. - P. 193–198.

[263] Ro D.-K., Paradise E.M., Ouellet M., Fisher K.J., Newman K.L., Ndungu J.M., Ho K.A., Eachus R.A., Ham T.S., Kirby J., Chang M.C.Y., Withers S.T., Shiba Y., Sarpong R., Keasling J.D., Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. // *Nature* - 2006. - V. 440. - P. 940–943.

[264] Yim H., Haselbeck R., Niu W., Pujol-Baxley C., Burgard A., Boldt J., Khandurina J., Trawick J.D., Osterhout R.E., Stephen R., Estadilla J., Teisan S., Schreyer H.B., Andrae S., Yang T.H., Lee S.Y., Burk M.J., Dien S. Van, Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. // *Nat. Chem. Biol.* - 2011. - V. 7. - P. 445–452.

[265] Jeschek M., Reuter R., Heinisch T., Trindler C., Klehr J., Panke S., Ward

T.R., Directed evolution of artificial metalloenzymes for in vivo metathesis. // Nature - 2016. - V. 537. - P. 661–665.

[266] Siegel J.B., Zanghellini A., Lovick H.M., Kiss G., Lambert A.R., St.Clair J.L., Gallaher J.L., Hilvert D., Gelb M.H., Stoddard B.L., Houk K.N., Michael F.E., Baker D., Computational Design of an Enzyme Catalyst for a Stereoselective Bimolecular Diels-Alder Reaction. // Science (80-. ). - 2010. - V. 329. - P. 309–313.

[267] Röthlisberger D., Khersonsky O., Wollacott A.M., Jiang L., DeChancie J., Betker J., Gallaher J.L., Althoff E.A., Zanghellini A., Dym O., Albeck S., Houk K.N., Tawfik D.S., Baker D., Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. // Nature - 2008. - V. 453. - P. 190–195.

[268] Laemmli U.K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. // Nature - 1970. - V. 227. - P. 680–685.

[269] Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. // Anal. Biochem. - 1976. - V. 72. - P. 248–254.

[270] Pace C.N., Vajdos F., Fee L., Grimsley G., Gray T., How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. // Protein Sci. - 1995. - V. 4. - P. 2411–2423.

[271] Davis B.J., DISC electrophoresis - II method and application to human serum proteins\*. // Ann. N. Y. Acad. Sci. - 2006. - V. 121. - P. 404–427.

[272] Mardanov A. V., Ravin N. V., Svetlitchnyi V.A., Beletsky A. V., Miroshnichenko M.L., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G., Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis. // Appl. Environ. Microbiol. - 2009.

[273] Mardanov A. V., Gumerov V.M., Beletsky A. V., Prokofeva M.I., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N. V., Skryabin K.G., Complete Genome Sequence of the Thermoacidophilic Crenarchaeon *Thermoproteus uzoniensis* 768-20. // J. Bacteriol. - 2011. - V. 193. - P. 3156–3157.

[274] Gumerov V.M., Mardanov A. V., Beletsky A. V., Prokofeva M.I., Bonch-

Osmolovskaya E.A., Ravin N. V., Skryabin K.G., Complete Genome Sequence of “*Vulcanisaeta moutnovskia*” Strain 768-28, a Novel Member of the Hyperthermophilic Crenarchaeal Genus *Vulcanisaeta*. // J. Bacteriol. - 2011. - V. 193. - P. 2355–2356.

[275] Mardanov A. V., Slododkina G.B., Slobodkin A.I., Beletsky A. V., Gavrillov S.N., Kublanov I. V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Skryabin K.G., Ravin N. V., The *Geoglobus acetivorans* Genome: Fe(III) Reduction, Acetate Utilization, Autotrophic Growth, and Degradation of Aromatic Compounds in a Hyperthermophilic Archaeon. // Appl. Environ. Microbiol. - 2015. - V. 81. - P. 1003–1012.

[276] Boyko K., Gorbacheva M., Rakitina T., Korzhenevskiy D., Vanyushkina A., Kamashev D., Lipkin A., Popov V., Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the histone-like HU protein from *Spiroplasma melliferum* KC3. // Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun. - 2015. - V. 71. - P. 24–27.

[277] Makarova O., Kamberov E., Margolis B., Generation of deletion and point mutations with one primer in a single cloning step. // Biotechniques - 2000. - V. 29. - P. 970–972.

[278] Mikhailova A.G., Rakitina T. V., Timofeev V.I., Karlinsky D.M., Korzhenevskiy D.A., Agapova Y.K., Vlaskina A. V., Ovchinnikova M. V., Gorlenko V.A., Rumsh L.D., Activity modulation of the oligopeptidase B from *Serratia proteamaculans* by site-directed mutagenesis of amino acid residues surrounding catalytic triad histidine. // Biochimie - 2017. - V. 139. - P. 125–136.

[279] Bakermans C., *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. - 2006. - V. 56. - P. 1285–1291.

[280] Wittig I., Braun H.-P., Schägger H., Blue native PAGE. // Nat. Protoc. - 2006. - V. 1. - P. 418–428.

[281] Cellini B., Bertoldi M., Montioli R., Paiardini A., Borri Voltattorni C., Human wild-type alanine:glyoxylate aminotransferase and its naturally occurring G82E variant: functional properties and physiological implications. // Biochem. J. - 2007. - V.

408. - P. 39–50.

[282] Bushueva T.L., Busel E.P., Burstein E.A., Relationship of thermal quenching of protein fluorescence to intramolecular structural mobility. // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct.* - 1978. - V. 534. - P. 141–152.

[283] Пермяков Е.А. 2003. Метод собственной люминесценции белка. М.: Наука. 189 с.

[284] Итоги науки и техники, сер. Биофизика. Москва, ВИНТИ, т.7. Бурштейн, Э.А. 1976. Изучение быстрой подвижности белковых структур методами собственной флуоресценции. В сб. «Равновесная динамика нативной структуры белка» Пушкино 60-83.

[285] Permyakov E.A., Burstein E.A., Some aspects of studies of thermal transitions in proteins by means of their intrinsic fluorescence. // *Biophys. Chem.* - 1984. - V. 19. - P. 265–271.

[286] Privalov, P. L. and Potekhin, S. A. [2]Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *In Methods in Enzymology*; 1986; pp. 4–51.

[287] Kremneva E., Nikolaeva O., Maytum R., Arutyunyan A.M., Kleimenov S.Y., Geeves M.A., Levitsky D.I., Thermal unfolding of smooth muscle and nonmuscle tropomyosin alpha-homodimers with alternatively spliced exons. // *FEBS J.* - 2006. - V. 273. - P. 588–600.

[288] Galkin O., Vekilov P.G., Nucleation of protein crystals: critical nuclei, phase behavior, and control pathways. // *J. Cryst. Growth* - 2001. - V. 232. - P. 63–76.

[289] McPherson A., Gavira J.A., Introduction to protein crystallization. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* - 2014. - V. 70. - P. 2–20.

[290] Takahashi S., Tsurumura T., Aritake K., Furubayashi N., Sato M., Yamanaka M., Hirota E., Sano S., Kobayashi T., Tanaka T., Inaka K., Tanaka H., Urade Y., High-quality crystals of human haematopoietic prostaglandin D synthase with novel inhibitors. // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* - 2010. - V. 66. - P. 846–850.

[291] Tanaka H., Inaka K., Sugiyama S., Takahashi S., Sano S., Sato M., Yoshitomi

S., A simplified counter diffusion method combined with a 1D simulation program for optimizing crystallization conditions. // *J. Synchrotron Radiat.* - 2004. - V. 11. - P. 45–48.

[292] Kabsch W., Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. // *J. Appl. Crystallogr.* - 1993. - V. 26. - P. 795–800.

[293] Kabsch W., XDS. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* - 2010. - V. 66. - P. 125–32.

[294] Dodson, E. J.; Winn, M.; and Ralph, A. [32] Collaborative computational project, number 4: Providing programs for protein crystallography. *In Methods in Enzymology*; 1997; pp. 620–633.

[295] Winn M.D., Ballard C.C., Cowtan K.D., Dodson E.J., Emsley P., Evans P.R., Keegan R.M., Krissinel E.B., Leslie A.G.W., McCoy A., McNicholas S.J., Murshudov G.N., Pannu N.S., Potterton E.A., Powell H.R., Read R.J., Vagin A., Wilson K.S., Overview of the CCP 4 suite and current developments. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2011. - V. 67. - P. 235–242.

[296] Vagin A.A., Isupov M.N., Spherically averaged phased translation function and its application to the search for molecules and fragments in electron-density maps. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2001. - V. 57. - P. 1451–1456.

[297] Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S., Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A., REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2011. - V. 67. - P. 355–367.

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

[299] Vagin A., Teplyakov A., Molecular replacement with MOLREP. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2010. - V. 66. - P. 22–25.

[300] Afonine P. V., Grosse-Kunstleve R.W., Echols N., Headd J.J., Moriarty N.W., Mustyakimov M., Terwilliger T.C., Urzhumtsev A., Zwart P.H., Adams P.D., Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. // *Acta*



Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2012. - V. 68. - P. 352–367.

[301] Vagin A., Lebedev A., MoRDa , an automatic molecular replacement pipeline. // Acta Crystallogr. Sect. A Found. Adv. - 2015. - V. 71. - P. s19–s19.

[302] Diederichs K., Karplus P.A., Improved R-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. // Nat. Struct. Biol. - 1997. - V. 4. - P. 269–275.

[303] Karplus P.A., Diederichs K., Linking Crystallographic Model and Data Quality. // Science (80-. ). - 2012. - V. 336. - P. 1030–1033.

[304] Vaguine A.A., Richelle J., Wodak S.J., SFCHECK : a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with the atomic model. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 1999. - V. 55. - P. 191–205.

[305] Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M., PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. // J. Appl. Crystallogr. - 1993. - V. 26. - P. 283–291.

[306] Long F., Vagin A.A., Young P., Murshudov G.N., BALBES : a molecular-replacement pipeline. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2008. - V. 64. - P. 125–132.

[307] Laskowski R.A., Swindells M.B., LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. // J. Chem. Inf. Model. - 2011. - V. 51. - P. 2778–2786.

[308] Wallace A.C., Laskowski R.A., Thornton J.M., LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. // "Protein Eng. Des. Sel. - 1995. - V. 8. - P. 127–134.

[309] Holm L., Park J., DaliLite workbench for protein structure comparison. // Bioinformatics - 2000. - V. 16. - P. 566–567.

[310] Krissinel E., Henrick K., Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. - 2004. - V. 60. - P. 2256–2268.

[311] Krissinel E., Henrick K., Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. // *J. Mol. Biol.* - 2007. - V. 372. - P. 774–797.

[312] Vriend G., WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. // *J. Mol. Graph.* - 1990. - V. 8. - P. 52–56.

[313] Collaborative Computational Project N. 4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography. // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* - 1994. - V. 50. - P. 760–3.

[314] Pronk S., Páll S., Schulz R., Larsson P., Bjelkmar P., Apostolov R., Shirts M.R., Smith J.C., Kasson P.M., Spoel D. van der, Hess B., Lindahl E., GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. // *Bioinformatics* - 2013. - V. 29. - P. 845–854.

[315] Kaminski G.A., Friesner R.A., Tirado-Rives J., Jorgensen W.L., Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. // *J. Phys. Chem. B* - 2001. - V. 105. - P. 6474–6487.

[316] Lindahl E., Hess B., Spoel D. van der, GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. // *J. Mol. Model.* - 2001. - V. 7. - P. 306–317.

[317] Trott oleg, Arthur J. Olson, AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. // *J. Comput. Chem.* - 2010.

[318] Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E., UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. // *J. Comput. Chem.* - 2004. - V. 25. - P. 1605–1612.

[319] Fiser, A. and Šali, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. *In Methods in Enzymology*; 2003; pp. 461–491.

[320] Suplatov D.A., Kopylov K.E., Popova N.N., Voevodin V. V., Švedas V.K., Mustguseal: a server for multiple structure-guided sequence alignment of protein families. // *Bioinformatics* - 2018. - V. 34. - P. 1583–1585.

[321] Søndergaard C.R., Olsson M.H.M., Rostkowski M., Jensen J.H., Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of p K a Values. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2011. - V. 7. - P. 2284–2295.

[322] Dolinsky T.J., Nielsen J.E., McCammon J.A., Baker N.A., PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. // *Nucleic Acids Res.* - 2004. - V. 32. - P. W665–W667.

[323] Salomon-Ferrer R., Götz A.W., Poole D., Grand S. Le, Walker R.C., Routine Microsecond Molecular Dynamics Simulations with AMBER on GPUs. 2. Explicit Solvent Particle Mesh Ewald. // *J. Chem. Theory Comput.* - 2013. - V. 9. - P. 3878–3888.

[324] Boratyn G.M., Schäffer A.A., Agarwala R., Altschul S.F., Lipman D.J., Madden T.L., Domain enhanced lookup time accelerated BLAST. // *Biol. Direct* - 2012. - V. 7. - P. 12.

[325] Edgar R.C., MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. // *BMC Bioinformatics* - 2004. - V. 5. - P. 113.

[326] Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J., CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. // *Nucleic Acids Res.* - 1994. - V. 22. - P. 4673–4680.

[327] Galperin M.Y., Rigden D.J., Fernández-Suárez X.M., The 2015 Nucleic Acids Research Database Issue and Molecular Biology Database Collection. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. - V. 43. - P. D1–D5.

[328] Galperin M.Y., Makarova K.S., Wolf Y.I., Koonin E. V., Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. // *Nucleic Acids Res.* - 2015. - V. 43. - P. D261–D269.

[329] Kumar S., Stecher G., Tamura K., MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. // *Mol. Biol. Evol.* - 2016. - V. 33. - P. 1870–1874.

[330] Krissinel, E. and Henrick, K. Multiple Alignment of Protein Structures in Three Dimensions. *In Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture*

*Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics*); 2005; pp. 67–78.

[331] Machielsen R., Uria A.R., Kengen S.W.M., Oost J. Van Der, Production and characterization of a thermostable alcohol dehydrogenase that belongs to the aldo-keto reductase superfamily. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2006. - V. 72. - P. 233–238.

[332] Ma, K. and Adams, M. W. W. [16] Alcohol dehydrogenases from *Thermococcus litoralis* and *Thermococcus strain ES-1*. In *Methods in Enzymology*; 2001; pp. 195–201.

[333] Giordano A., Febbraio F., Russo C., Rossi M., Raia C.A., Evidence for cooperativity in coenzyme binding to tetrameric *Sulfolobus solfataricus* alcohol dehydrogenase and its structural basis: Fluorescence, kinetic and structural studies of the wild-type enzyme and non-co-operative N249Y mutant. // *Biochem. J.* - 2005. - V. 388. - P. 657–667.

[334] Hess M., Antranikian G., Archaeal alcohol dehydrogenase active at increased temperatures and in the presence of organic solvents. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* - 2008. - V. 77. - P. 1003–1013.

[335] Marino-Marmolejo E.N., León-Rodríguez A. De, la Rosa A.P.B. de, Santos L., Heterologous Expression and Characterization of an Alcohol Dehydrogenase from the Archeon *Thermoplasma acidophilum*. // *Mol. Biotechnol.* - 2009. - V. 42. - P. 61–67.

[336] Raia, C. A.; Giordano, A.; and Rossi, M. [15] Alcohol dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*. In *Methods in Enzymology*; 2001; pp. 176–195.

[337] Yanai H., Doi K., Ohshima T., *Sulfolobus tokodaii* ST0053 Produces a Novel Thermostable, NAD-Dependent Medium-Chain Alcohol Dehydrogenase. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2009. - V. 75. - P. 1758–1763.

[338] Li D., Stevenson K.J., Purification and sequence analysis of a novel NADP(H)-dependent type III alcohol dehydrogenase from *Thermococcus strain AN1*. // *J. Bacteriol.* - 1997. - V. 179. - P. 4433–4437.

[339] Ma K., Hutchins A., Sung S.-J.S., Adams M.W.W., Pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*, functions as a CoA-dependent pyruvate decarboxylase. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1997. - V. 94. - P.

9608–9613.

[340] Ma K., Robb F.T., Adams M.W.W., Purification and characterization of NADP-specific alcohol dehydrogenase and glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. // Appl. Environ. Microbiol. - 1994. - V. 60. - P. 562–568.

[341] Oost J. van der, Voorhorst W.G.B., Kengen S.W.M., Geerling A.C.M., Wittenhorst V., Gueguen Y., Vos W.M. de, Genetic and biochemical characterization of a short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. // Eur. J. Biochem. - 2001. - V. 268. - P. 3062–3068.

[342] Machielsen R., Leferink N.G.H., Hendriks A., Brouns S.J.J., Hennemann H.-G., Daußmann T., Oost J. van der, Laboratory evolution of *Pyrococcus furiosus* alcohol dehydrogenase to improve the production of (2S,5S)-hexanediol at moderate temperatures. // Extremophiles - 2008. - V. 12. - P. 587–594.

[343] Fukuda Y., Sakuraba H., Araki T., Ohshima T., Yoneda K., Catalytic properties and crystal structure of thermostable NAD(P)H-dependent carbonyl reductase from the hyperthermophilic archaeon *Aeropyrum pernix* K1. // Enzyme Microb. Technol. - 2016. - V. 91. - P. 17–25.

[344] Miroshnichenko M., Hippe H., Stackebrandt E., Kostrikina N., Chernyh N., Jeanthon C., Nazina T., Belyaev S., Bonch-Osmolovskaya E., Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir. // Extremophiles - 2001. - V. 5. - P. 85–91.

[345] Weckbecker A., Hummel W., Cloning, expression, and characterization of an ( R )-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus kefir*. // Biocatal. Biotransformation - 2006. - V. 24. - P. 380–389.

[346] Rossmann M.G., Argos P., Protein Folding. // Annu. Rev. Biochem. - 1981. - V. 50. - P. 497–532.

[347] MacKenzie A.K., Kershaw N.J., Hernandez H., Robinson C. V., Schofield C.J., Andersson I., Clavulanic acid dehydrogenase: structural and biochemical analysis of the final step in the biosynthesis of the  $\beta$ -Lactamase inhibitor clavulanic acid. //

Biochemistry - 2007. - V. 46. - P. 1523–1533.

[348] Walker E.A., Clark A.M., Hewison M., Ride J.P., Stewart P.M., Functional expression, characterization, and purification of the catalytic domain of human 11- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. // J. Biol. Chem. - 2001. - V. 276. - P. 21343–21350.

[349] Grimm C., Maser E., Möbus E., Klebe G., Reuter K., Ficner R., The Crystal Structure of 3 $\alpha$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Carbonyl Reductase from *Comamonas testosteroni* Shows a Novel Oligomerization Pattern within the Short Chain Dehydrogenase/Reductase Family. // J. Biol. Chem. - 2000. - V. 275. - P. 41333–41339.

[350] Hoffmann F., Sotriffer C., Evers A., Xiong G., Maser E., Understanding oligomerization in 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: An in silico approach and evidence for an active protein. // J. Biotechnol. - 2007. - V. 129. - P. 131–139.

[351] Duax W.L., Pletnev V., Adlagatta A., Bruenn J., Weeks C.M., Rational proteomics I. Fingerprint identification and cofactor specificity in the short-chain oxidoreductase (SCOR) enzyme family. // Proteins Struct. Funct. Genet. - 2003. - V. 53. - P. 931–943.

[352] Bottoms C.A., Smith P.E., Tanner J.J., A structurally conserved water molecule in Rossmann dinucleotide-binding domains. // Protein Sci. - 2009. - V. 11. - P. 2125–2137.

[353] Mizuguchi K., Sele M., Cubellis M., Environment specific substitution tables for thermophilic proteins. // BMC Bioinformatics - 2007. - V. 8. - P. S15.

[354] Aguilar C.F., Sanderson I., Moracci M., Ciaramella M., Nucci R., Rossi M., Pearl L.H., Crystal structure of the  $\beta$ -glycosidase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*: resilience as a key factor in thermostability. // J. Mol. Biol. - 1997. - V. 271. - P. 789–802.

[355] Danson, M. J.; Hough, D. W.; and Lee, C. K. Enzyme stability and activity at high temperatures. *In Protein Adaptation in Extremophiles*; 2008;

[356] Unsworth L.D., Oost J. van der, Koutsopoulos S., Hyperthermophilic enzymes – stability, activity and implementation strategies for high temperature

applications. // FEBS J. - 2007. - V. 274. - P. 4044–4056.

[357] Bieger B., Essen L.-O., Oesterhelt D., Crystal Structure of Halophilic Dodecin. // Structure - 2003. - V. 11. - P. 375–385.

[358] Kumar S., Nussinov R., Relationship between Ion Pair Geometries and Electrostatic Strengths in Proteins. // Biophys. J. - 2002. - V. 83. - P. 1595–1612.

[359] Chapter 1. Hydrogen Bond – Definitions, Criteria of Existence and Various Types. *In RSC Theoretical and Computational Chemistry Series*; 2020; pp. 1–40.

[360] Pauling L., The nature of the chemical bond. Application of results obtained from the quantum mechanics and from a theory of paramagnetic susceptibility to the structure of molecules. // J. Am. Chem. Soc. - 1931. - V. 53. - P. 1367–1400.

[361] Kuntz I.D., Hydration of macromolecules. IV. Polypeptide conformation in frozen solutions. // J. Am. Chem. Soc. - 1971. - V. 93. - P. 516–518.

[362] Dym O., Mevarech M., Sussman J.L., Structural Features That Stabilize Halophilic Malate Dehydrogenase from an Archaeobacterium. // Science (80-. ). - 1995. - V. 267. - P. 1344–1346.

[363] Lins L., Thomas A., Brasseur R., Analysis of accessible surface of residues in proteins. // Protein Sci. - 2003. - V. 12. - P. 1406–1417.

[364] Siddiqui K.S., Cavicchioli R., Cold-Adapted Enzymes. // Annu. Rev. Biochem. - 2006. - V. 75. - P. 403–433.

[365] Finkelstein, A. V. and Ptitsyn, O. B. Protein Physics: A Course of Lectures: Second, Updated and Extended Edition. 2016.

[366] Donald J.E., Kulp D.W., DeGrado W.F., Salt bridges: Geometrically specific, designable interactions. // Proteins Struct. Funct. Bioinforma. - 2011. - V. 79. - P. 898–915.

[367] Nandel F.S., Verma R., Singh B., Jain D.V.S., Mechanism of hydration of urea and guanidium ion: A model study of denaturation of proteins. // Pure Appl. Chem. - 1998. - V. 70. - P. 659–664.

[368] Yousef M.S., Baase W.A., Matthews B.W., Use of sequence duplication to

engineer a ligand-triggered, long-distance molecular switch in T4 lysozyme. // Proc. Natl. Acad. Sci. - 2004. - V. 101. - P. 11583–11586.

[369] Povarova O.I., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Differences in the Pathways of Proteins Unfolding Induced by Urea and Guanidine Hydrochloride: Molten Globule State and Aggregates. // PLoS One - 2010. - V. 5. - P. e15035.

[370] Das M., Dasgupta D., Enhancement of transcriptional activity of T7 RNA polymerase by guanidine hydrochloride. // FEBS Lett. - 1998. - V. 427. - P. 337–340.

[371] Aziz I., Rashid N., Ashraf R., Siddiqui M.A., Imanaka T., Akhtar M., Pcal\_0632, a phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Pyrobaculum calidifontis*. // Extremophiles - 2018. - V. 22. - P. 121–129.

[372] Mardanov A. V., Gumerov V.M., Slobodkina G.B., Beletsky A. V., Bonch-Osmolovskaya E.A., Ravin N. V., Skryabin K.G., Complete genome sequence of strain 1860, a crenarchaeon of the genus *Pyrobaculum* able to grow with various electron acceptors. // J. Bacteriol. - 2012. - V. 194. - P. 727–728.

[373] Krupenko S.A., Wagner C., Cook R.J., Expression, Purification, and Properties of the Aldehyde Dehydrogenase Homologous Carboxyl-terminal Domain of Rat 10-Formyltetrahydrofolate Dehydrogenase. // J. Biol. Chem. - 1997. - V. 272. - P. 10266–10272.

[374] Marchal S., Branlant G., Evidence for the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. // Biochemistry - 1999. - V. 38. - P. 12950–12958.

[375] Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer US: Boston, MA 2006.

[376] Takahashi K., Weiner H., Hu J.H.J., Increase in the stoichiometry of the functioning active sites of horse liver aldehyde dehydrogenase in the presence of magnesium ions. // Arch. Biochem. Biophys. - 1980. - V. 205. - P. 571–578.

[377] Hayes K., Noor M., Djeghader A., Armshaw P., Pembroke T., Tofail S., Soulimane T., The quaternary structure of *Thermus thermophilus* aldehyde dehydrogenase



is stabilized by an evolutionary distinct C-terminal arm extension. // *Sci. Rep.* - 2018. - V. 8. - P. 13327.

[378] Steinmetz C.G., Xie P., Weiner H., Hurley T.D., Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. // *Structure* - 1997. - V. 5. - P. 701–711.

[379] Cobessi D., Tête-Favier F., Marchal S., Azza S., Branlant G., Aubry A., Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans* 1 Edited by R. Huber. // *J. Mol. Biol.* - 1999. - V. 290. - P. 161–173.

[380] Huo L., Davis I., Liu F., Andi B., Esaki S., Iwaki H., Hasegawa Y., Orville A.M., Liu A., Crystallographic and spectroscopic snapshots reveal a dehydrogenase in action. // *Nat. Commun.* - 2015. - V. 6. - P. 5935.

[381] Tanner J.J., Hecht R.M., Krause K.L., Determinants of Enzyme Thermostability Observed in the Molecular Structure of *Thermus aquaticus* d - Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase at 2.5 Å Resolution, // *Biochemistry* - 1996. - V. 35. - P. 2597–2609.

[382] Vogt G., Argos P., Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing? // *Fold. Des.* - 1997. - V. 2. - P. S40–S46.

[383] Inoue Y., Kuramitsu S., Inoue K., Kagamiyama H., Hiromi K., Tanase S., Morino Y., Substitution of a lysyl residue for arginine 386 of *Escherichia coli* aspartate aminotransferase. // *J. Biol. Chem.* - 1989. - V. 264. - P. 9673–9681.

[384] Goldberg R.N., Tewari Y.B., Thermodynamics of Enzyme-Catalyzed Reactions: Part 2. Transferases. // *J. Phys. Chem. Ref. Data* - 1994. - V. 23. - P. 547–617.

[385] Tewari Y.B., Kishore N., Goldberg R.N., Luong T.N., An equilibrium and calorimetric study of some transamination reactions. // *J. Chem. Thermodyn.* - 1998. - V. 30. - P. 777–793.

[386] Stetefeld J., Jenny M., Burkhard P., Intersubunit signaling in glutamate-1-semialdehyde-aminomutase. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 2006. - V. 103. - P. 13688–13693.

[387] Ruzicka F.J., Frey P.A., Kinetic and Spectroscopic Evidence of Negative Cooperativity in the Action of Lysine 2,3-Aminomutase. // J. Phys. Chem. B - 2010. - V. 114. - P. 16118–16124.

[388] 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. 271. - P. 26–28.

[389] Zhou X., Toney M.D., PH Studies on the Mechanism of the Pyridoxal Phosphate-Dependent Dialkylglycine Decarboxylase. // Biochemistry - 1999. - V. 38. - P. 311–320.

[390] Chu W.C., Metzler D.E., Enzymatically Active Truncated Cat Brain Glutamate Decarboxylase: Expression, Purification, and Absorption Spectrum. // Arch. Biochem. Biophys. - 1994. - V. 313. - P. 287–295.

[391] Kintanar A., Metzler C.M., Metzler D.E., Scott R.D., NMR observation of exchangeable protons of pyridoxal phosphate and histidine residues in cytosolic aspartate aminotransferase. // J. Biol. Chem. - 1991. - V. 266. - P. 17222–17229.

[392] Scott R.D., Chang Y.C., Graves D.J., Metzler D.E., Studies of 6-fluoropyridoxal and 6-fluoropyridoxamine 5'-phosphates in cytosolic aspartate aminotransferase. // Biochemistry - 1985. - V. 24. - P. 7668–7681.

[393] Kelly S.A., Megaw J., Caswell J., Scott C.J., Allen C.C.R., Moody T.S., Gilmore B.F., Isolation and Characterisation of a Halotolerant  $\omega$ -Transaminase from a Triassic Period Salt Mine and Its Application to Biocatalysis. // ChemistrySelect - 2017. - V. 2. - P. 9783–9791.

[394] Muriana F.J.G., Alvarez-Ossorio M.C., Sánchez-Garcés M.M., Rosa F.F. de la, Relimpio A.M., Effect of Salt on the Activity and Stability of Aspartate Aminotransferase from the Halophilic Archaeobacterium *Haloferax mediterranei*. // Zeitschrift für Naturforsch. C - 1992. - V. 47. - P. 375–381.

[395] Tremblay L.W., Blanchard J.S., The 1.9 Å structure of the branched-chain amino-acid transaminase (IlvE) from *Mycobacterium tuberculosis*. // Acta Crystallogr.

Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun. - 2009. - V. 65. - P. 1071–1077.

[396] Voss M., Xiang C., Esque J., Nobili A., Menke M.J., André I., Höhne M., Bornscheuer U.T., Creation of ( R )-amine transaminase activity within an  $\alpha$ -amino acid transaminase scaffold. // ACS Chem. Biol. - 2020. - V. 15. - P. 416–424.

[397] Srivastava K.R., Goyal B., Kumar A., Durani S., Scrutiny of electrostatic-driven conformational ordering of polypeptide chains in DMSO: a study with a model oligopeptide. // RSC Adv. - 2017. - V. 7. - P. 27981–27991.

[398] Johnson M.E., Malardier-Jugroot C., Head-Gordon T., Effects of co-solvents on peptide hydration water structure and dynamics. // Phys. Chem. Chem. Phys. - 2010. - V. 12. - P. 393–405.

[399] Pazhang M., Mardi N., Mehrnejad F., Chaparzadeh N., The combinatorial effects of osmolytes and alcohols on the stability of pyrazinamidase: Methanol affects the enzyme stability through hydrophobic interactions and hydrogen bonds. // Int. J. Biol. Macromol. - 2018. - V. 108. - P. 1339–1347.

[400] Shao Q., Methanol Concentration Dependent Protein Denaturing Ability of Guanidinium/Methanol Mixed Solution. // J. Phys. Chem. B - 2014. - V. 118. - P. 6175–6185.

[401] Kamal M.Z., Yedavalli P., Deshmukh M. V., Rao N.M., Lipase in aqueous-polar organic solvents: Activity, structure, and stability. // Protein Sci. - 2013. - V. 22. - P. 904–915.

[402] Mann S., Ploux O., Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes involved in biotin biosynthesis: Structure, reaction mechanism and inhibition. // Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics - 2011. - V. 1814. - P. 1459–1466.

[403] Mann S., Ploux O., 7,8-Diaminoperlargonic acid aminotransferase from *Mycobacterium tuberculosis*, a potential therapeutic target. // FEBS J. - 2006. - V. 273. - P. 4778–4789.

[404] Stoner G.L., Eisenberg M.A., Biosynthesis of 7,8 diaminoperlargonic acid from 7 keto 8 aminoperlargonic acid and S adenosyl L methionine. The kinetics of the reaction. // J. Biol. Chem. - 1975.

[405] Breen R.S., Campopiano D.J., Webster S., Brunton M., Watt R., Baxter R.L., The mechanism of 7,8-diaminopelargonyl synthase; the role of S-adenosylmethionine as the amino donor. // *Org. Biomol. Chem.* - 2003. - V. 1. - P. 3498.

[406] Izumi Y., Sato K., Tani Y., Ogata K., Purification of 7-Keto-8-aminopelargonyl-CoA:7,8-Diaminopelargonyl-CoA Aminotransferase, an Enzyme Involved in Biotin Biosynthesis, from *Brevibacterium divaricatum*. // *Agric. Biol. Chem.* - 1973. - V. 37. - P. 2683–2684.

[407] Cobessi D., Dumas R., Pautre V., Meinguet C., Ferrer J.-L., Alban C., Biochemical and Structural Characterization of the Arabidopsis Bifunctional Enzyme Dethiobiotin Synthetase–Diaminopelargonyl-CoA Aminotransferase: Evidence for Substrate Channeling in Biotin Synthesis. // *Plant Cell* - 2012. - V. 24. - P. 1608–1625.

[408] Yocum R.R., Pero J.G., Arsdell S.W. Van, Howitt C.L., Luan L., Perkins J.B., Prasad Chatterjee N., Removing a bottleneck in the *Bacillus subtilis* biotin pathway: BioA utilizes lysine rather than S-adenosylmethionine as the amino donor in the KAPA-to-DAPA reaction. // *Biotechnol. Bioeng.* - 2005. - V. 91. - P. 75–83.

[409] Mann S., Colliandre L., Labesse G., Ploux O., Inhibition of 7,8-diaminopelargonyl-CoA aminotransferase from *Mycobacterium tuberculosis* by chiral and achiral analogs of its substrate: Biological implications. // *Biochimie* - 2009. - V. 91. - P. 826–834.

[410] Sandmark J., Eliot A.C., Famm K., Schneider G., Kirsch J.F., Conserved and Nonconserved Residues in the Substrate Binding Site of 7,8-Diaminopelargonyl-CoA Synthase from *Escherichia coli* Are Essential for Catalysis. // *Biochemistry* - 2004. - V. 43. - P. 1213–1222.

[411] Machell G., 142. The action of alkali on diacetyl. // *J. Chem. Soc.* - 1960. - P. 683–687.

[412] Bujacz A., Rutkiewicz-Krotewicz M., Nowakowska-Sapota K., Turkiewicz M., Crystal structure and enzymatic properties of a broad substrate-specificity psychrophilic aminotransferase from the Antarctic soil bacterium *Psychrobacter sp.* B6. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* - 2015. - V. 71. - P. 632–645.

[413] Struvay C., Feller G., Optimization to Low Temperature Activity in Psychrophilic Enzymes. // Int. J. Mol. Sci. - 2012. - V. 13. - P. 11643–11665.

[414] Mandelman D., Ballut L., Wolff D.A., Feller G., Gerday C., Haser R., Aghajari N., Structural determinants increasing flexibility confer cold adaptation in psychrophilic phosphoglycerate kinase. // Extremophiles - 2019. - V. 23. - P. 495–506.

[415] Santiago M., Ramírez-Sarmiento C.A., Zamora R.A., Parra L.P., Discovery, Molecular Mechanisms, and Industrial Applications of Cold-Active Enzymes. // Front. Microbiol. - 2016. - V. 7. - P. 1–32.

[416] Serdakowski A.L., Dordick J.S., Enzyme activation for organic solvents made easy. // Trends Biotechnol. - 2008. - V. 26. - P. 48–54.

[417] Stepankova V., Bidmanova S., Koudelakova T., Prokop Z., Chaloupkova R., Damborsky J., Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. // ACS Catal. - 2013. - V. 3. - P. 2823–2836.

[418] Gupta M.N., Batra R., Tyagi R., Sharma A., Polarity Index: The Guiding Solvent Parameter for Enzyme Stability in Aqueous-Organic Cosolvent Mixtures. // Biotechnol. Prog. - 1997. - V. 13. - P. 284–288.

[419] Roy S., Jana B., Bagchi B., Dimethyl sulfoxide induced structural transformations and non-monotonic concentration dependence of conformational fluctuation around active site of lysozyme. // J. Chem. Phys. - 2012. - V. 136. - P. 115103.

[420] Mangiagalli M., Carvalho H., Natalello A., Ferrario V., Pennati M.L., Barbiroli A., Lotti M., Pleiss J., Brocca S., Diverse effects of aqueous polar co-solvents on *Candida antarctica* lipase B. // Int. J. Biol. Macromol. - 2020. - V. 150. - P. 930–940.

[421] Batista A.N.L., Batista Jr J.M., Bolzani V.S., Furlan M., Blanch E.W., Selective DMSO-induced conformational changes in proteins from Raman optical activity. // Phys. Chem. Chem. Phys. - 2013. - V. 15. - P. 20147.

[422] 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  $\alpha$ -diketones. // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 2018. - V. 102. - P. 9621–9633.

[423] Southall N.T., Dill K.A., Haymet A.D.J., A View of the Hydrophobic Effect. // J. Phys. Chem. B - 2002. - V. 106. - P. 521–533.

[424] Feller G., Protein folding at extreme temperatures: Current issues. // Semin. Cell Dev. Biol. - 2018. - V. 84. - P. 129–137.

[425] Dey S., Lane J.M., Lee R.E., Rubin E.J., Sacchettini J.C., Structural characterization of the mycobacterium tuberculosis biotin biosynthesis enzymes 7,8-diaminopelargonic acid synthase and dethiobiotin synthetase. // Biochemistry - 2010. - V. 49. - P. 6746–6760.

[426] Käck H., Sandmark J., Gibson K., Schneider G., Lindqvist Y., Crystal structure of diaminopelargonic acid synthase: evolutionary relationships between pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. // J. Mol. Biol. - 1999. - V. 291. - P. 857–876.

[427] Midelfort K.S., Kumar R., Han S., Karmilowicz M.J., McConnell K., Gehlhaar D.K., Mistry A., Chang J.S., Anderson M., Villalobos A., Minshull J., Govindarajan S., Wong J.W., Redesigning and characterizing the substrate specificity and activity of *Vibrio fluvialis* aminotransferase for the synthesis of imagabalin. // Protein Eng. Des. Sel. - 2013. - V. 26. - P. 25–33.

[428] Eliot A.C., Sandmark J., Schneider G., Kirsch J.F., The dual-specific active site of 7,8-diaminopelargonic acid synthase and the effect of the R391A mutation. // Biochemistry - 2002. - V. 41. - P. 12582–12589.

[429] Simon R.C., Grischek B., Zepeck F., Steinreiber A., Belaj F., Kroutil W., Regio- and stereoselective monoamination of diketones without protecting groups. // Angew. Chemie Int. Ed. - 2012. - V. 51. - P. 6713–6716.

[430] Ghislieri D., Turner N.J., Biocatalytic approaches to the synthesis of enantiomerically pure chiral amines. // Top. Catal. - 2014. - V. 57. - P. 284–300.

[431] Hult K., Berglund P., Enzyme promiscuity: mechanism and applications. // Trends Biotechnol. - 2007. - V. 25. - P. 231–238.

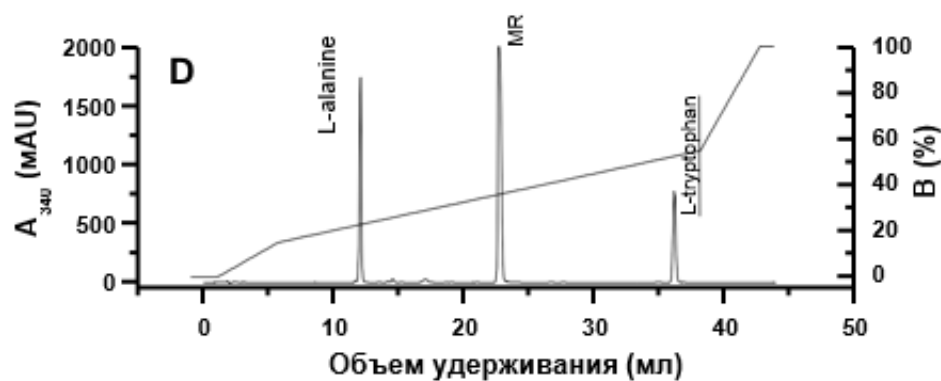
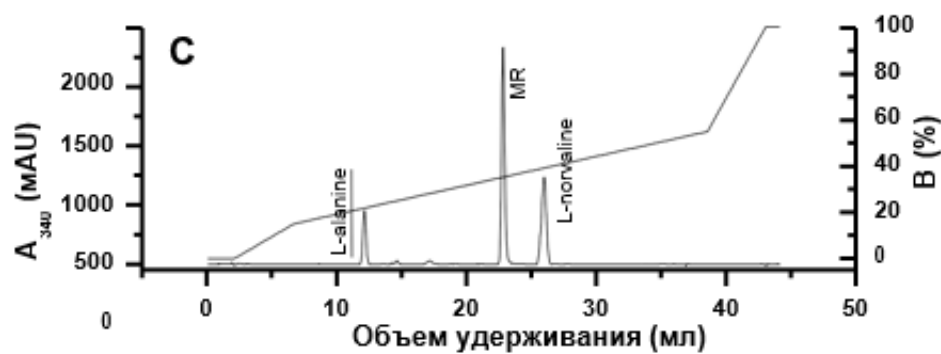
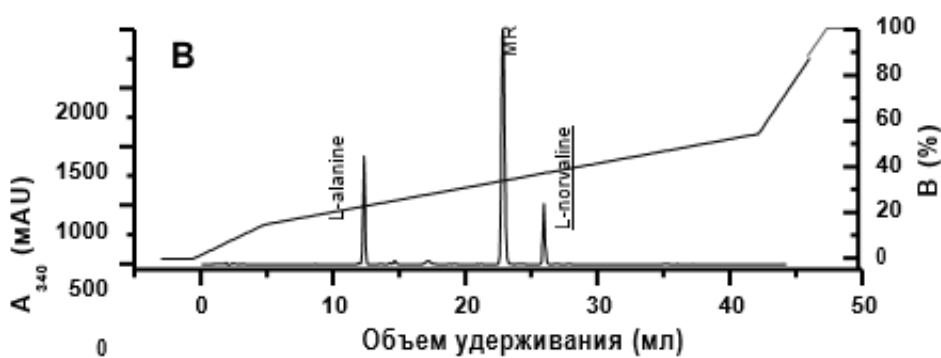
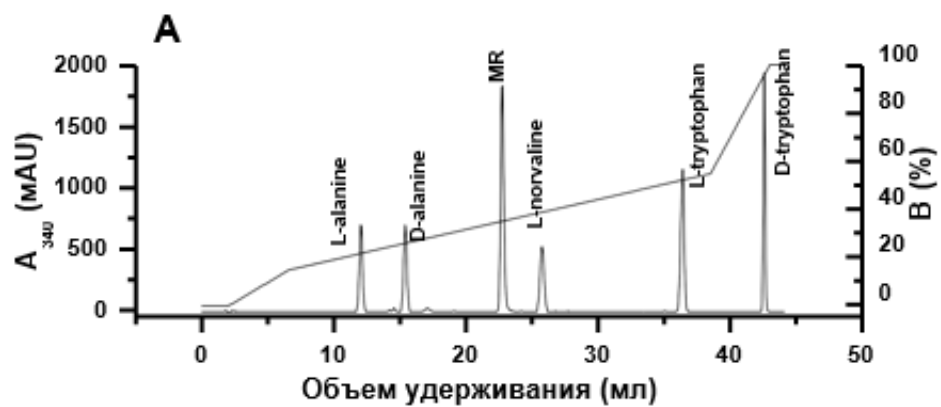
# ПРИЛОЖЕНИЯ

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Определение конфигурации продуктов реакции трансаминирования, катализируемой трансаминазой VMUT0738. На рисунке представлены профили элюции дериватизированных реактивом Мерфи (MR) аминокислот: (A) референтные аминокислоты (контроли); субстрат и продукт реакции трансаминирования (B) между 2-оксвалератом и L-аланином; (C) пируватом и L-норвалином; (D) между индол -3- пируватом и L-аланином. Продукты реакции (норвалин, аланин и триптофан) подчеркнуты. Анализ проводили методом HPLC на колонке Eclipse XDB-C18, 4.6 x 150 mm, 5µm диаметр колонки, температура комнатная, скорость потока 0.9 мл/мин. Буфер А: 100 mM ацетата аммония/ТФУ (pH 3.0) с 15% ацетонитрила; буфер В: 100 mM ацетата аммония/ТФУ (pH 3.0) с 45% ацетонитрила.

Условия проведения дериватизации энантиомеров аминокислот реагентом Мерфи:

25 мкл реагента Мерфи (25 mM в ацетонитриле) и 10 мкл 1 M NaHCO<sub>3</sub> добавляли к 10 мкл образца реакционной смеси. После инкубации при 50 °C в течение 2 ч. с последующим охлаждением реакцию дериватизации останавливали добавлением 3 мкл 4 M HCl и 10 мкл 100% метанола. Полученную реакционную смесь центрифугировали в течение 15 мин при 10000g и анализировали с помощью обращенно-фазовой хроматографии.





## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Филогенетическое дерево, построенное по последовательностям трансаминаз, принадлежащих кластеру ортологических групп COG115 (branched-chain amino acid aminotransferases and 4-amino-4-deoxychorismate lyases) (Galperin, M.Y., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Koonin, E.V., 2015. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res.* 43 (Database issue), D261–D269.) Белковые последовательности указаны под NCBI или EMBL номерами. Также в качестве референсных были добавлены последовательности еще 23 (R)-амин:пируват трансаминаз, (Hohne et al. (2010) Rational assignment of key motifs for function guides in silico enzyme identification. *Nat Chem Biol* 6: 807-813, Pavkov-Keller et al (2016) Discovery and structural characterization of new fold type IV-transaminases exemplify the diversity of this enzyme fold. *Sci. Rep.* 6:38183:1), и последовательности детально изученных трансаминаз из известных суперсемейств с каноническими характеристическими мотивами последовательности, определяющими субстратную специфичность данного суперсемейства внутри суперсемейства трансаминаз IV типа PLP укладки: трансаминаза разветвленных аминокислот из *E. coli* ecBCAT (последовательность ILVE\_ECOLI), изохоризматлиаза из *E. coli* ecADCL (последовательность PABC\_ECOLI) и трансаминаза D-аминокислот из *Bacillus* sp. (последовательность DAAA\_BACUM). Использование репрезентативной выборки геномов позволило значительно увеличить количество потенциальных клад, содержащих белки, которые могут иметь ранее неизученную субстратную специфичность. В итоге, в филогеномный анализ были включены 298 последовательностей из репрезентативной с точки зрения таксономии выборки из 124 прокариотических геномов, отнесенных к COG0115 и представленных в последнем релизе базы данных кластеров ортологичных групп, составленном и аннотированном с использованием экспертного ручного анализа. Все указанные последовательности были выровнены с помощью программы MUSCLE (Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:113.). Филогенетическое дерево было построено программой MEGA7 (Kumar et al., (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33: 1870-1874) с помощью алгоритма Neighbor-Joining.

Характеристические мотивы, участвующие в формировании активного центра окрашены согласно химической природе остатков. Позиции А, В, С, и D относятся к характеристическому мотиву 1. Остатки, помеченные XXX и ZZZ относятся к мотиву 2. Референсные последовательности выделены синим. Последовательности, для которых получены кристаллические структуры, окрашены зеленым. Клада, к которой относятся трансаминазы HO3033 и TaTT, отмечена красной рамочкой.

Рис. П1. Филогенетическое дерево.

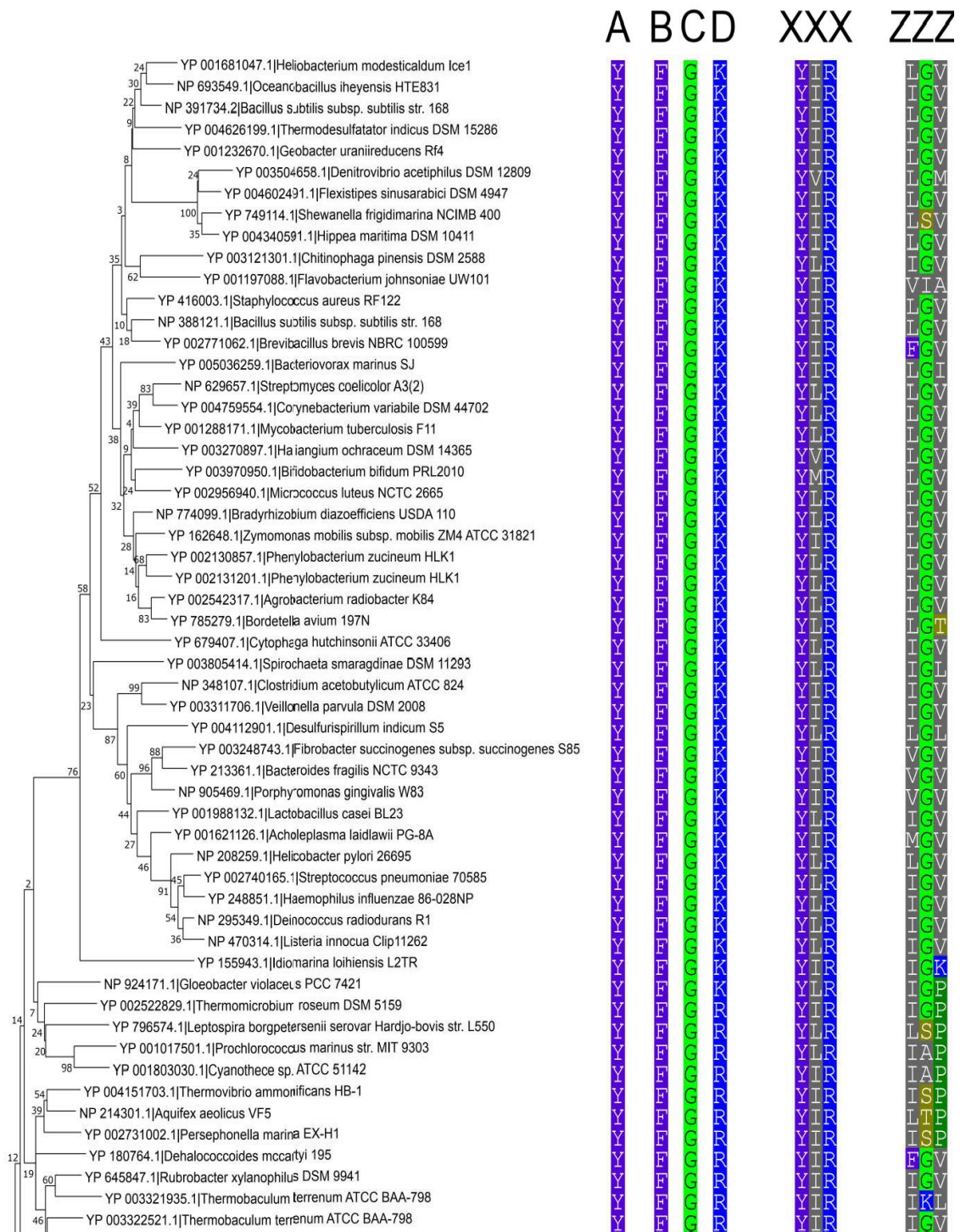
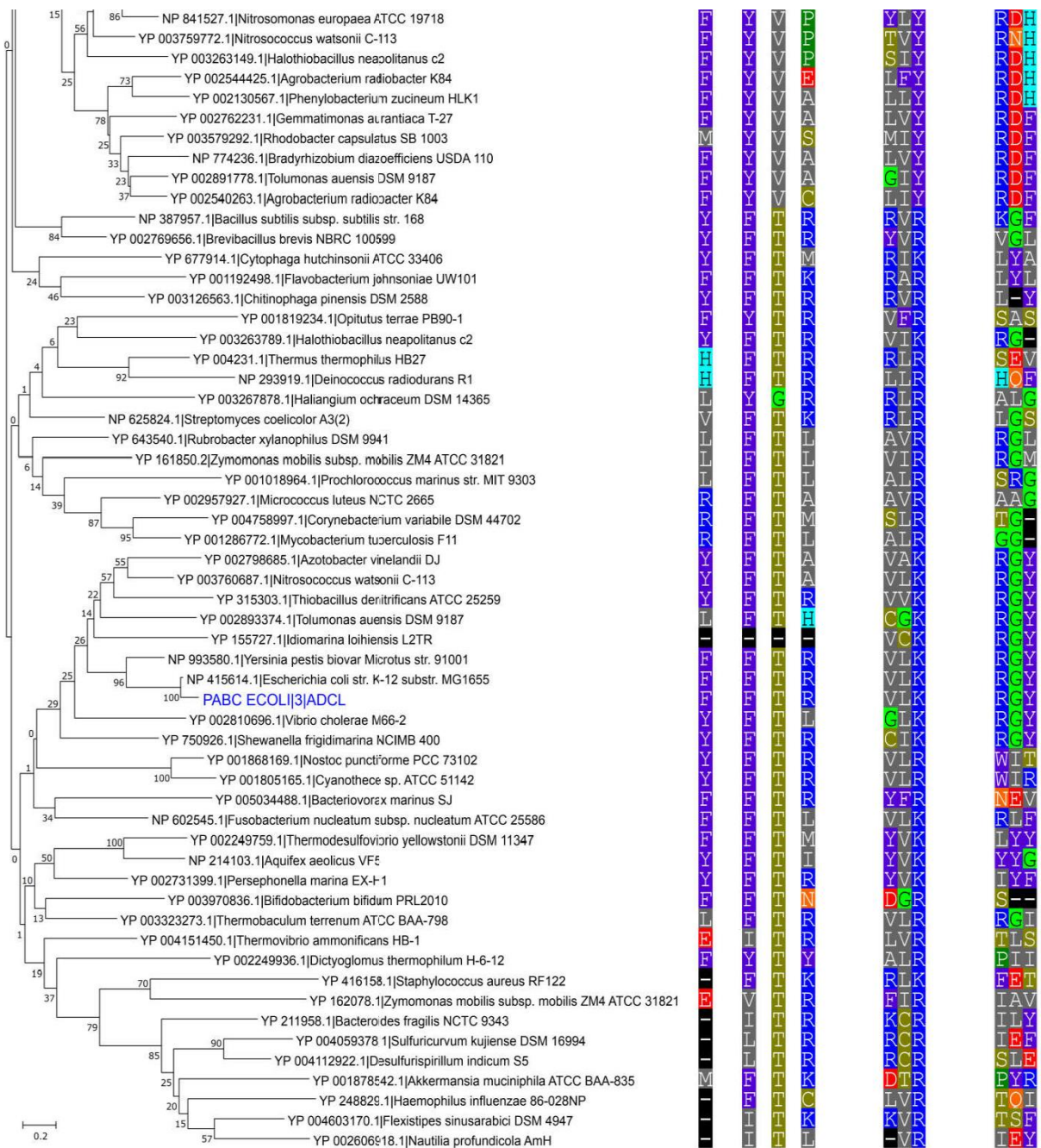








Рис. П1. Филогенетическое дерево. Окончание.



### ПРИЛОЖЕНИЕ 3

**Анализ продуктов полной реакции трансминирования, катализируемой мРЗО1.**

**Реакция:** R-PEA + пируват  $\leftrightarrow$  ацетофенон + аланин (D- or L-)

**Условия реакции:** 50 мМ Tris-HCl, pH 7.0, с добавлением 60 мМ PLP, 15 мМ R-PEA и 15 мМ пирувата при 50 °С.

**Определение продуктов:** Аликвоты реакционной смеси отбирали через 7 ч. и 14 ч. Белок удаляли центрифугированием в концентраторах Amicon 10 (Millipore, США). Энантиомеры идентифицировали хроматографическим анализом супернатантов с использованием колонки CROWNPAK\_CR(+) (150×4 мм×5 мкм; Daicel, Iwakura, Франция) с УФ-детекцией при 200 нм., +25 °С: А) смесь 1 мМ D-Ala и 1 мМ L-Ala в 50 мМ Tris-HCl, содержащая 60 мМ PLP и 5 мМ пирувата; В) реакционная смесь.

